



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**EVALUACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA Y SEROLÓGICA  
DE DOS CEPAS DEL VIRUS DE INFLUENZA SUBTIPO H1N1  
EN CERDOS CALOSTRADOS Y NO CALOSTRADOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MIREYA JUÁREZ RAMÍREZ**

**TUTOR:**

**FRANCISCO JOSÉ TRIGO TAVERA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMITÉ TUTOR:**

**MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
SUSANA MENDOZA ELVIRA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**MÉXICO, D.F., DICIEMBRE DE 2012**



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**

**A mis padres Esperanza y Antonio**

**A mi hermana Miriam**

**Gracias por se parte de esta experiencia**

**Su apoyo y amor son invaluable**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Francisco Trigo por su confianza, comentarios y apoyo invaluable.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. María Elena Trujillo y Dra. Susana Mendoza por su apoyo y comentarios.

Al Dr. Iván Sánchez y a la Dra. Laura Romero por todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Rosalba Carreón, Dra Patricia Mora y Dr. Luis Padilla por sus observaciones y comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Benjamín Fuente por su colaboración en el análisis estadístico de este trabajo.

A la Dra. Adriana Méndez por su colaboración, paciencia y enseñanzas en el área de microscopía electrónica.

A los médicos veterinarios Adrian Rodríguez, Luis Miguel Flores, Johnatan Ruíz, Carmen Flores, Erandi Toledo, Rolando Beltrán y Bernardo Saucedo por su valiosa colaboración en la toma de muestras de este trabajo.

A los médicos veterinarios Ruth Tejeda, Isaac Conrado y Ricardo Jimenez por su colaboración en la limpieza, desinfección y adaptación de las instalaciones.

Al personal técnico del departamento de Patología José Alfredo Sánchez, Luis Antonio Morales, Lorenzo Martínez y Joel Rodríguez por su colaboración y facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A Jaime Eugenio Córdova por su apoyo en la edición del material fotográfico.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A mis cerdos seres extraordinarios y nobles maestros.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Contenido</b>	I
<b>Lista de cuadros</b>	IV
<b>Lista de figuras</b>	VII
<b>Resumen</b>	IX
<b>Abstract</b>	
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Definición de influenza porcina	3
1.2. Características del virus de influenza	4
1.2.1. Clasificación taxonómica del virus de influenza	4
1.2.2. Sistema de nomenclatura para los virus de influenza	4
1.2.3. Morfología del virus de influenza	5
1.2.4. Estructura molecular del virus de influenza	6
1.2.5. Composición química del virus de influenza	8
1.2.6. Sensibilidad del virus de influenza a los agentes químicos y físicos	9
1.2.7. Sistemas hospederos de laboratorio para el virus de influenza	9
1.2.8. Ciclo de replicación del virus de influenza	10
1.2.9. Variación antigénica del virus de influenza	13
1.2.9.1. Deriva antigénica	14
1.2.9.2. Cambio antigénico o reordenamiento	15
1.3. Transmisión, vía de entrada, período de incubación y excreción del virus de influenza en cerdos	15
1.4. Signos clínicos observados durante una infección por virus de influenza en cerdos	16
1.5. Morbilidad y mortalidad durante una infección por virus de influenza en cerdos	17
1.6. Lesiones macroscópicas observadas en una infección por virus de influenza en cerdos	17
1.7. Lesiones microscópicas observadas en una infección por virus de influenza en cerdos	18
1.8. Cambios ultraestructurales observados en pulmón durante una infección por virus de influenza en cerdos	19
1.9. Respuesta inmune contra el virus de influenza	19
1.10. Diagnóstico del virus de influenza	22
1.11. Rol de los cerdos en la transmisión interespecies	24
1.11. Justificación	26
1.12. Hipótesis	26
<b>2. Objetivos</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivo general	27
2.2. Objetivos particulares	27
<b>3. Material y métodos</b>	<b>28</b>
3.1. Virus para la inoculación	28
3.2. Animales para experimentación	28

3.3. Diseño experimental	29
3.4. Evaluación clínica antes de la inoculación	30
3.5. Evaluación serológica antes de la inoculación	30
3.5.1. ELISA	30
3.5.2. Inhibición de la hemaglutinación	33
3.6. Evaluación clínica después de la inoculación	34
3.7. Evaluación serológica después de la inoculación	35
3.8. Evaluación patológica	35
3.8.1. Evaluación macroscópica	35
3.8.2. Evaluación microscópica	36
3.8.3. Evaluación ultraestructural	39
3.9. Análisis estadístico	40
<b>4. Resultados</b>	46
4.1. Resultados de la evaluación clínica en cerdos calostrados y no calostrados antes de la inoculación con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	46
4.2. Resultados de la evaluación serológica en cerdos calostrados y no calostrados antes de la inoculación con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	46
4.3. Resultados de la evaluación clínica en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	47
4.4. Temperatura corporal rectal en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	48
4.5. Ganancia diaria de peso en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	50
4.6. Resultados de la evaluación serológica realizada en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 utilizando las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y ELISA	51
4.7. Resultados de la evaluación macroscópica realizada en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	61
4.8. Resultados de la evaluación microscópica realizada en diferentes tejidos provenientes de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	65
4.8.1. Cornete nasal	66
4.8.2. Tráquea	69
4.8.3. Pulmón	74
4.8.4. Tonsila	78
4.8.5. Linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal)	82
4.8.6. Párpado	89
4.8.7. Timo	92
4.8.8. Bazo	94

4.8.9. Hígado	97
4.8.10. Íleon	100
4.8.11. Vejiga	103
4.9. Resultados de la evaluación ultraestructural realizada en pulmones provenientes de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza pH1N1 y swH1N1	106
4.9.1. Cambios ultraestructurales en pulmón de cerdo, calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación	106
4.9.2. Cambios ultraestructurales en pulmón de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación	110
4.9.3. Cambios ultraestructurales en pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación	113
4.9.4. Cambios ultraestructurales en pulmón de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación	116
<b>5. Discusión</b>	119
<b>6. Conclusiones</b>	132
<b>7. Perspectivas</b>	134
<b>8. Literatura citada</b>	135

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Función y peso molecular de cada uno de los segmentos del virus de influenza	8
<b>Cuadro 2.</b> Lesiones microscópicas evaluadas en el cornete nasal	37
<b>Cuadro 3.</b> Lesiones microscópicas evaluadas en tráquea	38
<b>Cuadro 4.</b> Lesiones microscópicas evaluadas en pulmón	38
<b>Cuadro 5.</b> Lesiones microscópicas evaluadas en tonsila palatina	38
<b>Cuadro 6.</b> Lesiones microscópicas evaluadas en linfonodos	38
<b>Cuadro 7.</b> Lesiones microscópicas evaluadas en otros tejidos	39
<b>Cuadro 8.</b> Resultados de la evaluación clínica realizada en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	48
<b>Cuadro 9.</b> Temperatura corporal rectal (°C) en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	49
<b>Cuadro 10.</b> Ganancia diaria de peso en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.	51
<b>Cuadro 11.</b> Resultados de la evaluación serológica realizada en el grupo de cerdos calostrados/pH1N1 mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)	52
<b>Cuadro 12.</b> Resultados de la evaluación serológica realizada en el grupo de cerdos no calostrados/pH1N1 mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)	53
<b>Cuadro 13.</b> Resultados de la evaluación serológica realizada en el grupo de cerdos calostrados/swH1N1 mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)	54
<b>Cuadro 14.</b> Resultados de la evaluación serológica realizada en el grupo de cerdos no calostrados/swH1N1 mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)	55
<b>Cuadro 15.</b> Títulos de anticuerpos obtenidos mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	56
<b>Cuadro 16.</b> Resultados de la evaluación macroscópica realizada en pulmones de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	63
<b>Cuadro 17.</b> Porcentajes de lesión pulmonar transformados obtenidos en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	64
<b>Cuadro 18.</b> Porcentajes de lesión pulmonar transformados obtenidos en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	65
<b>Cuadro 19.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en cornete nasal de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	67
<b>Cuadro 20.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en el cornete nasal a lo largo de los días posinoculación	68

<b>Cuadro 21.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en cornete nasal de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	69
<b>Cuadro 22.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en tráquea de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	70
<b>Cuadro 23.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en la tráquea a lo largo de los días posinoculación	71
<b>Cuadro 24.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en la tráquea de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	72
<b>Cuadro 25.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en pulmón de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	75
<b>Cuadro 26.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en el pulmón a lo largo de los días posinoculación	75
<b>Cuadro 27.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en el pulmón de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	77
<b>Cuadro 28.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en tonsila palatina de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	79
<b>Cuadro 29.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en la tonsila palatina a lo largo de los días posinoculación	79
<b>Cuadro 30.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en la tonsila palatina de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	82
<b>Cuadro 31.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en linfonodos (submadibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	85
<b>Cuadro 32.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en linfonodos (submadibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) a lo largo de los días posinoculación	86
<b>Cuadro 33.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en linfonodos (submadibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	88
<b>Cuadro 34.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en párpado de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	90
<b>Cuadro 35.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por infiltrado inflamatorio perivascular en párpado a lo largo de los días posinoculación	91

<b>Cuadro 36.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en párpado de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	91
<b>Cuadro 37.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en el timo de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	93
<b>Cuadro 38.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en timo a lo largo de los días posinoculación	93
<b>Cuadro 39.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en timo de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	94
<b>Cuadro 40.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en el bazo de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	95
<b>Cuadro 41.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en bazo a lo largo de los días posinoculación	96
<b>Cuadro 42.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en bazo de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	97
<b>Cuadro 43.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en el hígado de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	99
<b>Cuadro 44.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en hígado a lo largo de los días posinoculación	99
<b>Cuadro 45.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en hígado de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	100
<b>Cuadro 46.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en íleon de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	101
<b>Cuadro 47.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide en íleon a lo largo de los días posinoculación	102
<b>Cuadro 48.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en íleon de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	102
<b>Cuadro 49.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en vejiga urinaria de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	104
<b>Cuadro 50.</b> Resultados de la evaluación del grado de afectación por degeneración vacuolar en la vejiga urinaria a lo largo de los días posinoculación	105
<b>Cuadro 51.</b> Resultados de la evaluación microscópica realizada en vejiga urinaria de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	105

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático de un virus de influenza	7
<b>Figura 2.</b> Diagrama esquemático del ciclo de replicación del virus de influenza	13
<b>Figura 3.</b> Diagrama esquemático del pulmón de cerdo	36
<b>Figura 4.</b> Temperatura corporal rectal (°C) en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1	49
<b>Figura 5.</b> Evaluación del efecto del calostro sobre los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus pH1N1 a lo largo de los días posinoculación	57
<b>Figura 6.</b> Evaluación del efecto del calostro sobre los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	58
<b>Figura 7.</b> Evaluación del efecto del virus sobre los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus pH1N1 a lo largo de los días posinoculación	59
<b>Figura 8.</b> Evaluación del efecto del virus sobre los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus swH1N1 a lo largo de los días posinoculación	60
<b>Figura 9.</b> Lesiones macroscópicas observadas en pulmones de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus pH1N1 y swH1N1 a los 2 días posinoculación	61
<b>Figura 10.</b> Lesiones macroscópicas observadas en pulmones de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus pH1N1 y swH1N1 a los 6 días posinoculación	62
<b>Figura 11.</b> Lesiones macroscópicas observadas en pulmones de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus pH1N1 y swH1N1 a los 14 días posinoculación	62
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografía de cornete nasal de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 6 DPI, (H&E)	67
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografía de cornete nasal de cerdo, calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 DPI, (H&E)	68
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografía de tráquea de cerdo, calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 14 DPI, (H&E)	72
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografía de tráquea de cerdo, calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI, (H&E)	73
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografía de pulmón de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 DPI, (H&E)	76
<b>Figura 17.</b> Fotomicrografía de pulmón de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI, (H&E)	77
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografía de tonsila de cerdo, calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 6 DPI, (H&E)	80
<b>Figura 19.</b> Fotomicrografía de tonsila de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI, (H&E)	81
<b>Figura 20.</b> Fotomicrografía de linfonodo traqueobronquial de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 DPI, (H&E)	84
<b>Figura 21.</b> Fotomicrografía de linfonodo traqueobronquial de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 6 DPI, (H&E)	86

<b>Figura 22.</b> Fotomicrografía de párpado de cerdo, no calostrado, inoculado con virus pH1N1, 6 DPI, (H&E)	90
<b>Figura 23.</b> Fotomicrografía de hígado de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI, (H&E)	98
<b>Figura 24.</b> Fotomicrografía de tejido linfoide asociado a tracto intestinal de cerdo, calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI, (H&E)	101
<b>Figura 25.</b> Fotomicrografía de vejiga de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 6 DPI, (H&E)	104
<b>Figura 26.</b> Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 7,000x	107
<b>Figura 27.</b> Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 12,000x	108
<b>Figura 28.</b> Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 3,000x	109
<b>Figura 29.</b> Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 30,000x	111
<b>Figura 30.</b> Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 50,000x	112
<b>Figura 31.</b> Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 3,000x	114
<b>Figura 32.</b> Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 20,000x	115
<b>Figura 33.</b> Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 20,000x	117
<b>Figura 34.</b> Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo, 3,000x	118

## **EVALUACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA Y SEROLÓGICA DE DOS CEPAS DEL VIRUS DE INFLUENZA SUBTIPO H1N1 EN CERDOS CALOSTRADOS Y NO CALOSTRADOS**

### **RESUMEN**

En este estudio nos propusimos comparar la presentación clínica, respuesta serológica, lesiones macroscópicas, microscópicas y cambios ultraestructurales en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza humana A/México/La Gloria-3/2009/H1N1 (referido de aquí en adelante como virus pH1N1) y con virus de influenza porcina A/swine/New Jersey/11/1976/H1N1 (referido de aquí en adelante como virus swH1N1), para esto se diseñaron cuatro grupos experimentales: calostrados/pH1N1, no calostrados/pH1N1, calostrados/swH1N1 y no calostrados/swH1N1. Los cerdos fueron inoculados vía intranasal con 5 ml de una solución que contenía 6,400 UHA. Al hacer la evaluación clínica se observaron estornudos esporádicos y descarga nasal leve en los cuatro grupos evaluados, la temperatura corporal se encontró dentro parámetros normales y la ganancia de peso en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (421 g) fue menor que en los inoculados con el virus swH1N1 (524 g). Al evaluar la respuesta serológica se observó que los títulos de anticuerpos en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 fueron más altos que en los inoculados con el virus swH1N1 y que hay reacción serológica cruzada entre estos virus. Al realizar la necropsia el único órgano que presentó lesiones macroscópicas fue el pulmón, las áreas afectadas se localizaban en los lóbulos craneales y medios, los cuales eran de color rojo, firmes al tacto y estaban claramente delimitadas por tejido pulmonar normal, en algunos casos

se observaron áreas de atelectasia y enfisema las cuales se localizaban en los lóbulos caudales. El grupo de cerdos no calostrados/pH1N1 fue el que exhibió el mayor porcentaje de lesión pulmonar a los 6 días posinoculación. En relación a las lesiones microscópicas además de observarse las lesiones características del virus de influenza en pulmón, se describieron lesiones necróticas, inflamatorias y degenerativas en otros tejidos como: cornete nasal, tráquea, tonsila, linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal), párpado, timo, bazo, hígado, íleon y vejiga urinaria en los cuatro grupos evaluados. Se observó que la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H1N1 en los cerdos calostrados tuvo cierto efecto protector contra el virus pH1N1 al observarse un menor número de animales con signos clínicos, un menor porcentaje de lesión pulmonar y menor grado de afectación en los tejidos a nivel microscópico. A nivel ultraestructural se observaron partículas virales consistentes con virus de influenza en el citoplasma de células epiteliales alveolares, células endoteliales, espacio intersticial y alveolar en los pulmones de los cuatro grupos evaluados. En conclusión, el comportamiento clínico, respuesta serológica, lesiones macroscópicas y microscópicas observado en los cerdos inoculados con el virus de influenza pH1N1 fue diferente al observado en los cerdos inoculados con el virus swH1N1, la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza porcina en los cerdos calostrados tuvo cierto efecto protector contra el virus pH1N1, se lograron identificar lesiones extrapulmonares y se detectó la presencia de virus de influenza en células endoteliales en el pulmón.

**Palabras clave:** cerdo, influenza H1N1, calostro, clínico-patológica, serológica.

**CLINICO-PATHOLOGICAL AND SEROLOGICAL EVALUATION OF TWO  
STRAINS OF INFLUENZA VIRUS H1N1 IN COLOSTRUM PIGS AND  
COLOSTRUM-DEPRIVED PIGS**

**Abstract**

In this study we aimed to compare the clinical signs, serological response, gross lesions, microscopic lesions and ultrastructural changes in colostrum pigs and colostrum-deprived pigs inoculated with human influenza virus A/Mexico/La Gloria-3/2009/H1N1 (hereafter referred to as pH1N1) and swine influenza virus A/swine/New Jersey/11/1976/H1N1 (hereafter referred to as swH1N1). The study was designed in four experimental groups: colostrum/pH1N1, colostrum-deprived/pH1N1, colostrum/swH1N1, colostrum-deprived/swH1N1 and pigs were intranasally inoculated with 5 ml of a solution containing 6,400 HAU. Clinical signs like sneezing and nasal discharge were mild, body temperature was normal in any of the experimental groups and weight gain in pigs inoculated with pH1N1 (421 g) was lower than pigs inoculated swH1N1 (524 g). To evaluate the serological response antibody titers in pigs inoculated with pH1N1 were higher than pigs inoculated with swH1N1 and serological cross reaction was observed between pH1N1 and swH1N1 viruses. At the necropsy pathological changes were restricted to the lung, the affected areas were located in the cranial and middle lobes, which were red and firm, and were clearly delimited by normal lung tissue, in some cases atelectasis and emphysema were observed in the caudal lobes. Colostrum-deprived/pH1N1 pigs exhibited the highest percentage of lung injury at 6 days after inoculation. Microscopic lesions in the lung were characteristic of influenza in addition were

described necrotic, inflammatory and degenerative changes in other tissues such as nasal turbinate, trachea, tonsils, lymph nodes (submandibular, tracheobronchial, mesenteric and inguinal), eyelid, thymus, spleen, liver, ileum and urinary bladder in the four groups evaluated. Antibodies against swine influenza virus subtype H1N1 in colostrum pigs had some protective effect against pH1N1 infection because were observed fewer animals with clinical signs, a lower percentage of lung injury and microscopic lesions were mild. At the ultrastructural level viral particles consistent with influenza virus were observed in the cytoplasm of alveolar epithelial cells, endothelial cells, interstitial and alveolar space in the lungs of the four groups evaluated. In conclusion, clinical signs, serological response, gross and microscopic lesions observed in pigs inoculated with pH1N1 were different that observed in pigs inoculated with swH1N1, antibodies against swine influenza virus in colostrum pigs had some protective effect against pH1N1 virus, extrapulmonary lesions were identified and viral particles consistent with influenza virus were observed in the cytoplasm of endothelial cells in the lung.

**Keywords:** pig, influenza H1N1, colostrum, clinico-pathological, serological

## 1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la carne de cerdo es la de mayor consumo *per cápita* a nivel mundial, por arriba de la carne de pollo y de bovino. México ocupa el lugar 15 entre los mayores productores porcícolas a nivel mundial. Asimismo, la industria porcícola en México ocupa el tercer lugar en importancia como sistema productor de carne, después de la cría de aves y bovinos. El inventario nacional de porcinos es de 15 millones de animales y los principales estados productores son: Sonora, Jalisco, Puebla, Guanajuato, Yucatán y Veracruz (SAGARPA, 2007; Cabello y Torres, 2010). La porcicultura en estos estados ha cambiado sustancialmente en los últimos años; actualmente se alojan grandes grupos de cerdos bajo condiciones intensivas. La alta densidad y el manejo inadecuado de los sistemas de ventilación facilitan la transmisión de agentes patógenos llevados por vía aerógena dentro de las pjaras. Por consiguiente, los trastornos respiratorios y las enfermedades sistémicas de transmisión aérea se consideran actualmente los problemas sanitarios de mayor relevancia en la producción porcina moderna (Olsen *et al.*, 2006). Las neumonías constituyen uno de los problemas más comunes y extendidos de los animales jóvenes siendo frecuente encontrar lesiones pulmonares en el rastro. Las pérdidas económicas por esta causa son numerosas y están relacionadas con muertes súbitas, desarrollo desigual de lotes, disminución de la ganancia diaria de peso, decomisos, gastos en medicación y mano de obra adicional (Cabrera, 2009).

Durante el 2009, la influenza porcina, una de las enfermedades respiratorias que afectan a los cerdos, se convirtió en un tema de gran relevancia en el mundo, ante la aparición de una nueva variante del virus de influenza humana A H1N1 que fue identificada como la causante de neumonías en el estado de California en Estados Unidos y La Gloria en México. Esta variante fue erróneamente denominada como “Influenza porcina”, aunque nunca había sido detectada en las poblaciones porcinas, hasta que se presentaron los casos en Alberta y Manitoba en Canadá y Argentina durante Mayo y Junio de 2009 (Howden *et al.*, 2009; Pasma and Joseph, 2010; Pereda *et al.*, 2010). El manejo inadecuado de la información y el desconocimiento por parte de la gente sobre la patogénesis del virus de influenza en los cerdos, generó gran incertidumbre con respecto al consumo de productos de origen porcino, lo que provocó que durante los primeros días de mayo los sectores turismo, restaurantero y porcícola en México tuvieran importantes pérdidas. El director de la Confederación de Porcicultores Mexicanos Alejandro Ramírez González informó que las ventas en el sector porcícola disminuyeron entre el 80-90% y las pérdidas se estimaron en 2,500 millones de pesos (Aparicio y Delgado, 2009).

Los virus de influenza A infectan una gran variedad de especies animales entre las que se encuentran cerdos, aves, hurones, caballos, visones, focas, ballenas y desde luego humanos. Dada la interacción entre humanos, cerdos, aves y otros mamíferos existe un gran potencial para la transmisión entre especies de virus de influenza. En el caso de los cerdos aunque se han detectado anticuerpos contra H4, H5 y H9 de origen aviar y que se han logrado

aislar virus de los subtipos H1N1, H1N2, H3N2, H3N3, H4N6, H5N2 y H9N2, solo los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 han logrado establecerse en la población porcina (Olsen *et al.*, 2006; Brown, 2000; De Vleeschauwer *et al.*, 2009). La infección con virus de los subtipos H1N1 clásicos generalmente se limita al aparato respiratorio y los esfuerzos destinados a demostrar replicación viral fuera del aparato respiratorio han sido infructuosos (Orcutt and Shope, 1935; Olsen *et al.*, 2006; Brookes *et al.*, 2009). Considerando que el virus de influenza humana A H1N1 pandémico está conformado por genes provenientes de virus de influenza porcinos, humanos y aviares (Gibbs *et al.*, 2009; van der Meer *et al.*, 2010), que la presentación clínica en humanos en algunos casos presentó complicaciones sistémicas y que este no fue detectado previamente en las piaras porcinas del país, es de gran relevancia realizar un estudio experimental donde se evalúe la presentación clínica, respuesta serológica, lesiones macroscópicas, microscópicas y cambios ultraestructurales en cerdos no calostrados y calostrados infectados con la cepa pandémica del virus de influenza humana A H1N1 y se compare con una cepa de referencia de influenza porcina A subtipo H1N1.

### **1.1. Definición de influenza porcina**

Es una enfermedad respiratoria aguda causada por un *Influenzavirus* tipo A. La enfermedad se caracteriza por un comienzo súbito, tos, disnea, fiebre y postración, seguida por una recuperación rápida. Las lesiones se desarrollan con rapidez en el aparato respiratorio ocasionando una neumonía broncointersticial y remiten con la misma celeridad, pero en algunos casos la

neumonía puede ser grave y provocar la muerte. Es probable que el curso, naturaleza y magnitud de la enfermedad varíen con la cepa del virus, la edad, estado inmune del cerdo y la presencia de infecciones intercurrentes (Olsen *et al.*, 2006).

## **1.2. Características del virus de influenza**

### **1.2.1. Clasificación taxonómica del virus de influenza**

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* la cual comprende 5 géneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus* e *Isavirus*. Los virus de influenza A se clasifican en subtipos basados en la antigenicidad de sus moléculas de superficie: hemaglutininas (16 subtipos, de H1 a H16) y neuraminidasas (9 subtipos, de N1 a N9) (Maclachlan and Dubovi, 2011).

### **1.2.2. Sistema de nomenclatura para los virus de influenza**

Los virus de influenza se clasifican formalmente en tipos, subtipos y cepas. Hay tres tipos antigénicamente diferentes del virus de influenza: A, B y C. La especificidad de los tipos se determina por la naturaleza antigénica de la nucleoproteína (NP) y de la proteína matriz (M) que se encuentran estrechamente relacionados entre todos los tipos de virus de influenza A. Los tipos B y C se encuentran típicamente solo en humanos. Los virus de influenza tipo A se hallan en seres humanos, cerdos, caballos, ocasionalmente en otros mamíferos como el mink, focas, ballenas y muchas especies aviares.

Los virus del tipo A se dividen en subtipos de acuerdo a la naturaleza antigénica de la hemaglutinina (H1 al 16) y la neuraminidasa (N1 al 9).

En 1971 se propuso un sistema estándar de nomenclatura para los virus de influenza y se revisó en 1980 (WHO, 1980). El nombre del virus de influenza incluye el tipo (A, B o C), el huésped de origen con excepción del humano, el origen geográfico, el número de cepa (si existe) y el año de aislamiento seguido por la descripción antigénica de la H y N entre paréntesis. El siguiente ejemplo ilustra el uso de la nomenclatura:

Tipo de virus de influenza: A

Subtipo: H3N2

Cepa: A/Sw/Hong Kong/76(H3N2)

### **1.2.3. Morfología del virus de influenza**

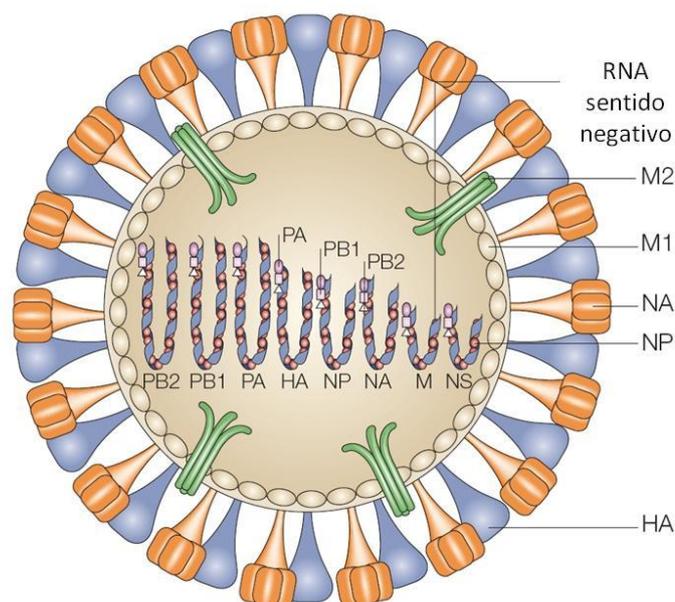
Los *Influenzavirus* son esféricos o pleomórficos, miden de 80-120 nm de diámetro. Algunas veces pueden adoptar formas filamentosas y medir hasta 400 nm. La superficie del virión exhibe proyecciones espaciadas de manera estrecha de 10-12 nm de longitud. Estas proyecciones con dos formas distintas son la hemaglutinina (HA) la cual es un trímero en forma de bastón, y la neuraminidasa (NA) que es un tetrámero en forma de hongo. Dentro de la envoltura viral está incluida la nucleoproteína (NP) la cual tiene simetría helicoidal (Olsen *et al.*, 2006; Swayne and Halvorson, 2003)

#### 1.2.4. Estructura molecular del virus de influenza

Los virus de influenza presentan una envoltura derivada de la célula huésped. Es precisamente esta envoltura la que alberga la hemaglutinina (HA), la neuraminidasa (NA) y a la proteína matriz 2 (M2). La HA se encuentra en una proporción de 4-5 a 1 con respecto a la NA. La HA está constituida por 3 polipéptidos y cada polipéptido se descompone a su vez en dos subunidades HA1 y HA2. Por la extremidad hidrófoba (HA2) se une a la capa lipídica de la envoltura y por su extremidad hidrófila (HA1) se fija a los receptores mucoproteínicos de los glóbulos rojos y de las células del epitelio respiratorio. Las HA son responsables de la hemaglutinación y de la fijación del virus a las células, primer paso para su penetración y replicación. La neuraminidasa (NA) está compuesta por una cabeza y un filamento, la cabeza está constituida por la asociación de cuatro glicopéptidos, que presentan actividad fermentativa, pues al actuar sobre el ácido siálico (N-acetilneuramínico), principal componente de los receptores celulares, los destruye produciendo un fenómeno de elusión o separación del virus de los glóbulos rojos y células infectadas. La proteína M2 es un tetrámero en el que los monómeros están unidos por puentes disulfuro, estos monómeros forman un canal iónico el cual es activado a pH ácido y es fuertemente selectivo para protones. Por debajo de la envoltura viral está la principal proteína estructural, la proteína matriz 1 (M1) que rodea a las moléculas de RNA con relación a la nucleoproteína (NP) y tres proteínas grandes denominadas polimerasa básica 1 (PB1), polimerasa básica 2 (PB2) y polimerasa ácida (PA) que constituyen el origen de la replicación y transcripción de RNA. El genoma de los virus de influenza es segmentado, en

el caso de los *Influenzavirus A* y *B* está compuesto por 8 segmentos de RNA y en el caso del *Influenzavirus C* por 7 segmentos de RNA. Estos segmentos están compuestos por RNA lineal, de una sola cadena en sentido. En el caso de los *Influenzavirus A* los 8 segmentos de RNA codifican para 10-11 proteínas virales; ocho de las cuales son parte de la estructura de los viriones (HA, NA, NP, M1, M2, PB1, PB2 y PA). El segmento de RNA con el peso molecular más bajo codifica para dos proteínas no estructurales NS1 y NS2, además existe una proteína proapoptótica denominada PB1-F2 que no está presente en todos los virus de influenza A pero que puede ser traducida en una segunda fase de lectura del segmento que normalmente codifica para la PB1. (Heinen, 2003; Swayne and Halvorson, 2003; Hiromoto and Kawaoka, 2005; Olsen *et al.*, 2006; Talledo y Zumaeta, 2009; Bouvier and Palese, 2008) (Figura y Cuadro 1)

Figura 1. Diagrama esquemático de un virus de influenza. Se observan las glicoproteínas, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), y la proteína M2 (canal iónico) incrustadas en la envoltura viral derivada de la célula huésped. Los ocho segmentos de RNA que conforman el genoma viral están asociados con nucleoproteína (NP) y tres polimerasas (PA, PB1 y PB2). La proteína matriz (M1) se asocia a los segmentos de RNA y a la envoltura viral (Hiromoto T, Kawaoka Y., 2005).



Cuadro 1. Función y peso molecular de cada uno de los segmentos del virus de influenza.

Segmento	Tamaño (nucleótidos)	Polipéptido	Función
1	2341	PB2	Polimerasa subunidad, reconocimiento de la cap en mRNA, iniciación de la transcripción
2	2341	PB1 PB1-F2	Polimerasa subunidad, enlongación de RNA, actividad de endonucleasa Actividad proapoptótica
3	2233	PA	Polimerasa subunidad, actividad de proteasa
4	1778	HA	Glicoproteína de superficie, principal antígeno en la respuesta inmune, unión al receptor celular y proteína de fusión
5	1565	NP	Forma parte del complejo polimerasa, transporta el RNA viral del núcleo al citoplasma
6	1413	NA	Glicoproteína de superficie, actividad de sialidasa, liberación del virus
7	1027	M1	Proteína matriz, interacción con vRNP, regulación de la exportación nuclear del RNA
		M2	Proteína integral de la membrana, canal iónico
8	890	NS1	Proteína no estructural, tiene efecto inmunomodulador inhibiendo la producción de interferón tipo 1 (interferón $\alpha$ y $\beta$ ) en las células infectadas, regula la expresión génica del hospedero
		NS2	Proteína no estructural, exportación nuclear del RNA

(Heinen P, 2003; Swayne and Halvorson, 2003; Bouvier MN, 2008; Talledo M y Zumaeta K, 2009)

### 1.2.5. Composición química del virus de influenza

La composición global aproximada de las partículas virales es 0.8-1% de RNA, 5-8% de carbohidratos, 20-24% de lípidos y cerca del 70-75% de proteínas. Los lípidos están situados en la membrana viral, en su mayor parte son fosfolípidos con cantidades menores de colesterol y glicolípidos. En el virión hay varios carbohidratos que comprenden ribosa en el RNA, galactosa, manosa, fructosa y glucosamina, principalmente como glucoproteínas o glicolípidos. Las proteínas del virión, así como los sitios de glucosilación potencial, se encuentran especificados por el genoma viral, pero la composición de las cadenas de lípidos y carbohidratos enlazadas a glucoproteínas o glicolípidos de la membrana viral son determinadas por la célula huésped (Swayne and Halvorson, 2003; Talledo y Zumaeta, 2009).

### **1.2.6. Sensibilidad del virus de influenza a los agentes químicos y físicos**

El virus de influenza es muy sensible a desinfectantes comunes como el hipoclorito de sodio 1-2%, etanol al 60-95%, cuaternarios de amonio 4%, formaldehído 5-8%, glutaraldehído 2%, ácido cítrico 2%, hidróxido de sodio 2%, iodo 2% y fenol 5%. El virus puede ser inactivado por calor a 56°C (133°F) durante 60 minutos, o temperaturas más altas por periodos más cortos. La infectividad del virus se reduce luego de la exposición a la radiación ionizante (25 kGy) o pH ácidos (pH 2) (Swayne and Halvorson, 2003; De Benedictis, 2007; The Center for Food Security & Public, 2009). Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) recomiendan para la desinfección el uso de etanol al 70%, Lysol® al 5% o blanqueador al 10%.

### **1.2.7. Sistemas de hospederos de laboratorio para el virus de influenza**

El virus de influenza porcina se desarrolla con facilidad cuando se inocula en embriones de pollo de 9-11 días vía cavidad alantoidea. La temperatura de incubación varía entre 33 y 37°C. Normalmente los embriones infectados no mueren y la presencia del virus se demuestra después de 48-72 horas de incubación por la prueba de hemaglutinación utilizando el líquido alantoideo y una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%. Los virus de influenza también son capaces de replicarse en diferentes líneas celulares primarias, diploides o continuas, aunque la susceptibilidad a la infección es baja en la mayoría de ellas. En el caso de los virus de influenza porcina se han utilizado varios sistemas de cultivos de células, estos incluyen: células de riñón de ternero, de pulmón de feto de cerdo, de riñón de perro, de riñón de cerdo,

fibroblastos de embrión de pollo, células diploides humanas y conjuntivales de Chang. Otros incluyen una línea de células de oviducto porcino, células de testículo de cerdo, cultivos de tráquea y pulmón de cerdo fetal, cultivo de epitelio nasal y tráquea de pollo. La línea celular más comúnmente utilizada son las células Madin Darby de riñón de perro (MDCK), las células inoculadas se incuban a 33-35°C en presencia de tripsina para asegurar la activación proteolítica del virus. La identificación del crecimiento del virus sobre la monocapa de células se realiza de modo convencional mediante la observación del efecto citopático causado en ellas, que consiste en la aparición de células degeneradas y redondeadas que se desprenden de la monocapa. La caracterización del virus aislado se efectúa por inmunofluorescencia mediante la utilización de anticuerpos monoclonales. En ocasiones, el efecto citopático del virus es difícil de apreciar por lo que es necesario disponer de otros métodos para identificar el crecimiento viral en los cultivos celulares, como la hemaglutinación, la hemadsorción o la detección de antígenos virales con técnicas de inmunofluorescencia (Olsen *et al.*, 2006; Eiros *et al.*, 2009).

#### **1.2.8. Ciclo de replicación del virus de influenza**

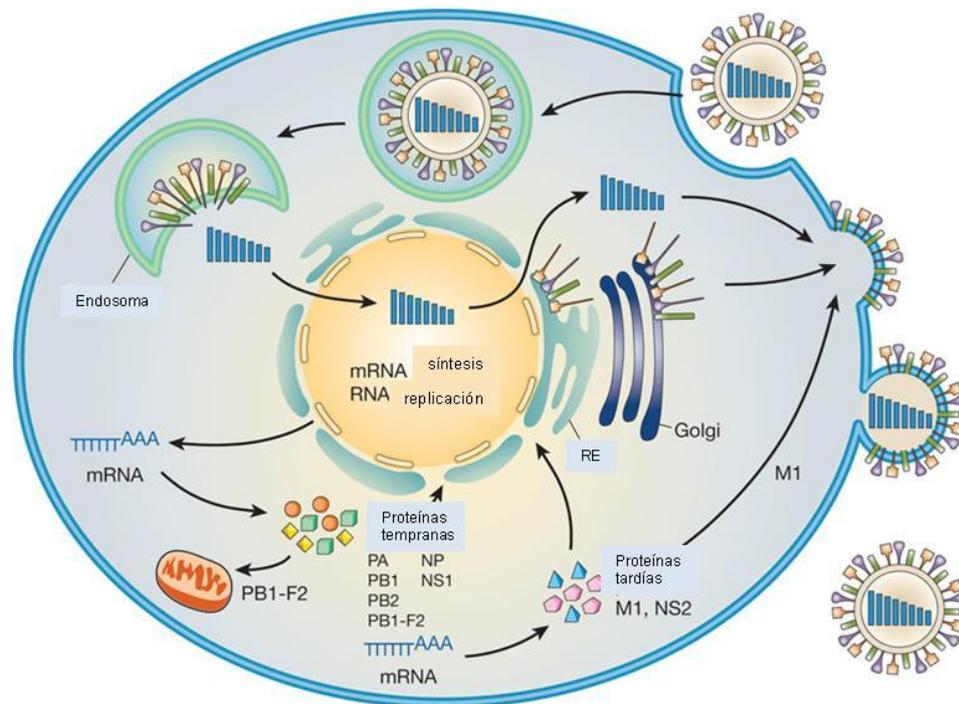
El virus llega a la mucosa del aparato respiratorio superior, en donde tiene que vencer la acción defensiva del aparato mucociliar, una vez que logra llegar a la superficie de la célula epitelial se une a receptores de ácido siálico (N-acetilneuramínico) que en el caso del cerdo son de dos tipos: el ácido siálico  $\alpha$  2,6 galactosa en el epitelio traqueal y bronquial y el ácido siálico  $\alpha$  2,3 galactosa en la lámina propia del tracto respiratorio (Nelli *et al.*, 2010). El virus

es incorporado a la célula mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor. El endosoma tiene un pH 5 a 6 el cual favorecerá un cambio conformacional en la HA que induce la fusión de la envoltura viral con la membrana endocítica, este descenso de pH también activa el flujo de protones desde el endosoma al interior de la partícula viral, a través de los canales iónicos formados por la proteína M2. Su activación disminuye el pH en el interior de la partícula viral provocando la desestabilización de las interacciones entre los segmentos de RNA y la proteína M1 que los recubre liberándolos de esta manera en el citoplasma, para ser transportados al núcleo a través de los poros nucleares. Para iniciar la transcripción el virus de influenza requiere la participación de una RNA polimerasa II celular para la generación de RNAs mensajeros (mRNAs) con cap y un sitio de metilación. La PB2 reconocerá y se unirá al cap metilado del extremo 5' de los mRNA celulares y los cortará a 10-15 nucleótidos de la cap, estos fragmentos serán utilizados por la PB1 que catalizará la adición de nucleótidos durante la elongación del mRNA correspondiente a cada segmento del genoma viral. Durante este proceso se obtendrán 2 tipos de RNA en sentido positivo: los mRNAs que darán origen a las proteínas virales y RNAs complementarios (cRNA) serán utilizados para elaborar más copias de RNA viral (vRNA) en sentido negativo. Los segmentos de vRNA del 1 al 6 darán origen a los mRNA que serán traducidos en HA, NA, NP y las tres polimerasas (PB1, PB2 y PA), los segmentos 7 y 8 darán origen a mRNAs que serán traducidos en las proteínas M1, M2, NS1 y NS2. La HA y NA serán glucosiladas en el retículo endoplásmico rugoso, recortadas en el aparato de Golgi y transportadas junto con la M2 mediante vesículas hacia la

porción apical de las células donde serán embebidas en la membrana celular. Un requerimiento importante para la HA es su corte mediante proteasas de la célula huésped a HA1 y HA2, que permanecen unidas por puentes disulfuro; se requiere de dicho desdoblamiento para la producción de virus infectante. Asimismo, se requiere el empaquetamiento de los 8 diferentes segmentos de RNA viral, este proceso se realiza de manera selectiva lo que garantiza que todos los segmentos serán incorporados en la mayoría de las partículas virales. La proteína M1 juega un papel importante al interactuar con las proteínas HA, NA y M2 presentes en la membrana celular, iniciando el proceso de curvatura de la membrana celular, además sobre esta proteína se incorporarán los segmentos de RNA viral. Después de la producción y ensamble de las proteínas virales y el RNA, las partículas virales constituidas salen de la célula por gemación a partir de la superficie apical de la célula, quedando envueltas por una bicapa lipídica procedente de la célula infectada. En esta etapa la neuraminidasa viral contribuye a la salida de los viriones de la célula infectada al evitar su agregación y formación de grandes grumos de partículas debido a la afinidad que tiene la HA por el ácido siálico presente en la membrana. En el proceso de replicación viral algunas células mueren por efecto del virus o de la respuesta inmune celular; otras permiten varios ciclos replicativos (Bouvier and Palese, 2008; Samji, 2009; Manjarrez *et al.*, 2010; Resa-Infante *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2010). La infección por el virus de influenza porcina generalmente se limita al aparato respiratorio y etapas de viremia han sido detectadas sólo en raras ocasiones. Se ha demostrado replicación del virus en

la mucosa nasal, amígdalas, tráquea, linfonodos traqueobronquiales y pulmón, siendo este último el principal órgano blanco (Olsen *et al.*, 2006) (Figura 2).

Figura 2. Diagrama esquemático del ciclo de replicación del virus de influenza. Después del ingreso del virus por endocitosis mediada por receptor, los segmentos de RNA son liberados en el citoplasma y transportados al núcleo a través de los poros nucleares, donde la replicación y transcripción se llevarán a cabo. Los mRNAs serán transportados al citoplasma para llevar a cabo la traducción de las proteínas tempranas necesarias para la replicación y transcripción las cuales serán transportadas de regreso al núcleo. En el retículo endoplásmico rugoso la HA y NA serán glucosiladas y recortadas en el aparato de Golgi. En la fase tardía de la infección las proteínas M1 y NS2 (NEP) facilitarán la exportación de los nuevos segmentos de RNA viral del núcleo a la membrana celular donde se llevará a cabo el ensamblado de las partículas virales (Neumann *et al.*, 2009).



### 1.2.9. Variación antigénica del virus de influenza

Dos características del virus de influenza A contribuyen a la variación antigénica que presenta la primera es su genoma, ya que en los virus RNA, en general, la RNA polimerasa es proclive al error, por lo que las mutaciones se

acumulan, además de que la naturaleza segmentada del genoma permite una mayor recombinación, y la segunda es que el virus puede infectar una amplia variedad de animales, lo cual permite que durante la síntesis de los componentes del virus se presente la mezcla o intercambio de información genética entre diferentes virus, que pueden provenir de especies animales diferentes o incluso el humano (Manjarrez *et al.*, 2010). La variación antigénica ocurre por dos mecanismos: deriva antigénica y cambio antigénico.

#### **1.2.9.1. Deriva antigénica**

La deriva antigénica es la forma más común de variación para estos virus, se da mediante cambios de nucleótidos en los genes que codifican para los sitios antigénicos de la HA y NA. La deriva antigénica que se observa en los virus de influenza A se debe casi por completo a mutaciones en la HA, estas pueden alterar la antigenicidad de un virus o modificar la especificidad y afinidad por el receptor. Este tipo de fenómeno es muy importante para la patogénesis del virus y no sólo se restringe a modificaciones de la HA, ya que en algunos casos la deriva antigénica ha llevado a modificaciones en la nucleoproteína (NP) provocando que los virus consigan escapar al reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos. En la práctica, una variante por deriva antigénica que cause enfermedad significativa aparece en promedio cada 4 años y tiene 4 o más sustituciones de aminoácidos en dos o más sitios antigénicos. La deriva antigénica se toma muy en cuenta cuando se consideran cepas para su inclusión en vacunas de influenza. Es importante señalar que la selección de las sustituciones de aminoácidos es dirigida, al

menos en parte, por la presión inmunológica, ya que la HA es el principal blanco de la respuesta inmune del huésped (Swayne and Halvorson, 2003; Olsen *et al.*, 2006; Talledo y Zumaeta, 2009; Salazar *et al.*, 2010).

#### **1.2.9.2. Cambio antigénico o reordenamiento**

Como ya se mencionó la naturaleza segmentada del genoma viral permite que los virus puedan intercambiar segmentos completos cuando se dan infecciones con dos virus de influenza del mismo tipo en una célula, este fenómeno ha sido llamado reordenamiento. Como producto de este reordenamiento pueden aparecer cepas con nuevas características capaces de infectar a otra especie o adaptarse para ser transmitidas directamente. Estos cambios por lo general se presenta en períodos largos de 10 a 40 años y han sido los causantes de la aparición de los diferentes subtipos virales pandémicos a lo largo de la historia conocida de los virus de influenza (Swayne and Halvorson, 2003; Olsen *et al.*, 2006; Talledo y Zumaeta, 2009; Salazar *et al.*, 2010; Manjarrez *et al.*, 2010).

### **1.3. Transmisión, vía de entrada, período de incubación y excreción del virus de influenza en cerdos**

El virus se disemina por vía aérea a través de aerosoles generados por tos o estornudos, también por contacto con descargas nasales. El contacto directo de cerdo a cerdo y los ambientes cerrados favorecen la transmisión. La vía de entrada es a través del tracto respiratorio y el período de incubación es corto de 24 a 72 horas. El virus comienza a excretarse 24 horas después de la

infección y su excreción puede durar de 7-10 días, aunque se ha documentado un caso en un cerdo cuya excreción viral duró hasta 4 meses (The Center for Food Security & Public Health, 2009).

En cuanto a las vías de excreción en el caso del virus de influenza A H1N1 pandémico se han realizado experimentos en cerdos no inmunizados y se logró detectar RNA viral en muestras de hisopos nasales, oculares, orales y rectales mediante el uso de RT-PCR en tiempo real (Brookes *et al.*, 2009).

#### **1.4. Signos clínicos observados durante una infección por virus de influenza en cerdos**

La influenza porcina es una enfermedad de la pira, el comienzo es súbito, después de un período de incubación de 24-72 horas. La mayoría de los animales muestran los signos al mismo tiempo. Hay anorexia, inactividad, postración, los animales se agrupan y amontonan. También se observa respiración jadeante, laboriosa y entrecortada, puede presentarse respiración abdominal, sobre todo cuando los animales son obligados a moverse. Además, el movimiento puede estar acompañado por tos grave. La fiebre por lo común se encuentra en el rango de 40.5 - 41.7°C. También pueden observarse conjuntivitis, rinitis, descarga nasal y estornudos. Existe una evidente pérdida de peso y debilidad relacionada con la anorexia e inactividad. Los signos mencionados corresponden a las primeras descripciones clínicas de la enfermedad y actualmente estos signos pueden observarse en animales seronegativos. La presencia de anticuerpos maternos y la vacunación influyen en la presentación clínica de la enfermedad haciendo que en ocasiones la

mayoría de los animales no se vean afectados. Sin embargo, el nivel de anticuerpos puede influir en el desarrollo de infecciones subclínicas ya que se ha observado que animales de finalización exhiben un alto título de anticuerpos en ausencia de enfermedad respiratoria durante la etapa de engorda, además de que se ha logrado aislar el virus de cerdos sin signos de enfermedad. Otros factores que pueden influir en el desarrollo de la signología clínica son: la cepa del virus, la dosis infectante, la edad de los cerdos al momento de la infección, la temperatura y ventilación en las casetas, la densidad de población, el manejo zootécnico (un sitio o multisitios), contar con programas de medicación y vacunación para el control de otros agentes bacterianos o virales que pudieran interactuar con el virus de influenza (Olsen *et al.*, 2006).

### **1.5. Morbilidad y mortalidad durante una infección por virus influenza en cerdos**

La morbilidad es alta cerca del 100%, pero la mortalidad es baja por lo usual menos del 1%, a menos que haya infecciones intercurrentes o que los cerdos sean muy jóvenes. En general la recuperación comienza 5-7 días después del inicio de la enfermedad y es tan súbita y notable como el comienzo (Olsen *et al.*, 2006).

### **1.6. Lesiones macroscópicas observadas durante una infección por virus de influenza en cerdos**

Los cambios más relevantes se observan primordialmente en los pulmones, los lóbulos afectados son rojos y firmes al tacto, las áreas de lesión

se encuentran claramente demarcadas por tejido pulmonar normal y su distribución es craneoventral. Los lóbulos adyacentes ocasionalmente están enfisematosos y pueden exhibir edema interlobular. En la luz de los bronquios puede observarse exudado seromucoso e hiperemia. Los linfonodos mediastínicos y bronquiales pueden observarse aumentados de tamaño y edematosos. La mucosa traqueal se observa algunas veces hiperémica y edematosa (Olsen *et al.*, 2006; Caswell and Williams, 2007; The Center for Food Security & Public Health, 2009).

### **1.7. Lesiones microscópicas observadas durante una infección por virus de influenza en cerdos**

La lesión característica es la degeneración, necrosis y descamación del epitelio bronquial y bronquiolar. Las luces de bronquios, bronquiolos y alvéolos están llenas de exudado que contiene células descamadas y neutrófilos, que más tarde serán sustituidos por linfocitos y células plasmáticas. Además hay dilatación de los capilares e infiltración de los tabiques alveolares con linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Puede observarse también una extensa atelectasia alveolar y enfisema. Hay infiltrado linfocitario y plasmocitario peribronquial y perivascular, además de lesiones proliferativas caracterizadas por hiperplasia de neumocitos tipo II (Olsen *et al.*, 2006; Caswell and Williams, 2007).

### **1.8. Cambios ultraestructurales observados en pulmón durante una infección por virus de influenza en cerdos**

Los cambios ultraestructurales en células epiteliales alveolares infectadas con virus de influenza durante la fase de síntesis proteica consisten en incremento de la densidad del nucléolo, seguido de dispersión del mismo y desarrollo de discretos agregados granulares a lo largo del núcleo. En el citoplasma pueden observarse agregados fibrilares o bien densos entramados proteínicos que están rodeados por ribosomas, las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi pueden estar dilatados. El ensamblado de las partículas virales se lleva a cabo en la membrana celular y la liberación de estas es por gemación, debido a esto la membrana puede exhibir diferentes grados de alteración. El espacio intersticial puede estar distendido debido a la presencia de edema y fibrina, las células intersticiales y fibroblastos pueden exhibir una mayor cantidad de retículo endoplásmico. En el septo y espacio alveolar pueden observarse células polimorfonucleares, macrófagos, restos celulares y agregados de plaquetas asociadas a sitios de degeneración y desprendimiento endotelial (Winkler and Cheville, 1986; Cheville, 1994).

### **1.9. Respuesta inmune contra el virus de influenza**

Durante las primeras horas de la infección se activa la inmunidad innata, las células infectadas inician la producción de interferón tipo I cuya función es inhibir la replicación viral interfiriendo en la transcripción del RNA, además de aumentar la expresión de moléculas del CPH de clase I potenciando el reconocimiento de antígenos víricos asociados a esta molécula. Otras citocinas

producidas durante la fase aguda de la infección son las interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6), 12 (IL-12), 15 (IL-15) y 18 (IL-18) y el factor de necrosis tumoral (TNF). La IL-1 y el TNF se encargarán de atraer neutrófilos y monocitos hacia el sitio de infección favoreciendo la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, la IL-6 estimulará la producción de neutrófilos en la médula ósea y la producción de proteínas de fase aguda. Las IL-12, IL-15 y IL-18 son inductores de la proliferación de linfocitos NK los cuales reconocerán a las células infectadas en las que el virus ha anulado la expresión de moléculas del CPH de clase I. Estas interleucinas son también el nexo con la respuesta inmune adaptativa ya que entre sus funciones se encuentran la estimulación de la diferenciación de linfocitos T (CD4+ y CD8+) y potenciar las funciones de los linfocitos T citotóxicos, los cuales juegan un rol importante en la eliminación del virus en el tracto respiratorio. En la respuesta inmune humoral se lleva a cabo la producción de anticuerpos contra las proteínas HA, NA, M y NP del virus de influenza, los isotipos predominantes en el suero son IgM e IgG y en los lavados nasales o bronquiales la IgA. Sin embargo, solo los anticuerpos generados contra la porción globular de la HA pueden bloquear la unión del virus con la célula huésped impidiendo de esta forma la infección viral. Los anticuerpos generados contra las proteínas NA, M y NP no impiden la infección pero participan en la destrucción de células infectadas por otros mecanismos dependientes de anticuerpos. La respuesta inmune generada contra el virus de influenza es sólida y protege contra la reinfección con el mismo subtipo o uno similar (Larsen *et al.*, 2000; Abbas and Lichtman, 2004; Olsen *et al.*, 2006).

La presencia de anticuerpos en el suero puede ser detectada entre los 7 y 10 días posinfección mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, los títulos más altos (1:160 – 1:320) se alcanzan de 2 - 3 semanas posinfección. En el caso de la técnica ELISA pueden detectarse anticuerpos en suero contra la proteína HA desde los 3 días posinfección y en secreciones nasales después del día 4 posinfección. La presencia de anticuerpos neutralizantes es detectada mediante la técnica de virus suero neutralización y se ha observado que la presencia de altos títulos neutralizantes reduce la replicación del virus en el pulmón (Olsen *et al.*, 2006).

La inmunidad materna juega un papel importante en la protección contra la infección con el virus de influenza en cerdos jóvenes; sin embargo, los títulos de anticuerpos en los cerdos recién nacidos dependen de los niveles de anticuerpos de la cerda por lo que su duración puede variar de 4 – 14 semanas. Se ha observado que en infecciones con virus de influenza en presencia de altos niveles de anticuerpos maternos no se desarrolla una respuesta inmune adecuada por lo que los cerdos pueden estar totalmente susceptibles a una reinfección, cuando los niveles de anticuerpos maternos son bajos la respuesta inmune generada es débil o se retrasa. Por lo que determinar los títulos de anticuerpos maternos es de gran importancia cuando se pretende establecer un programa de vacunación ya que los anticuerpos maternos pueden interferir con el desarrollo de la respuesta inmune (Olsen *et al.*, 2006).

### 1.10. Diagnóstico del virus de influenza

El diagnóstico clínico de influenza porcina es solo presuntivo debido a que no hay signos o lesiones patognomónicas de la enfermedad por lo que se debe establecer el diagnóstico diferencial con otras enfermedades respiratorias. El diagnóstico definitivo requiere del uso de técnicas de diagnósticas que sean capaces de identificar al virus o a los anticuerpos generados contra este. Entre las técnicas que se han utilizado para diagnóstico de influenza se encuentran: inmunocromatografía rápida, aislamiento viral en cultivo celular o en huevos embrionados, inmunofluorescencia directa, inmunohistoquímica, inmunoperoxidasa, RT-PCR, microscopía electrónica de transmisión, inmunodifusión en agar, inmunofluorescencia indirecta, inhibición de la hemaglutinación, inhibición de la neuraminidasa, ELISA y virus sueroneutralización (Burleson *et al.*, 1992; Janke, 2000; Petric *et al.*, 2006; Eiros *et al.*, 2009).

Las técnicas utilizadas de forma rutinaria son: el aislamiento viral, la inhibición de la hemaglutinación y el ELISA. En el caso del aislamiento viral este se puede realizar a partir de muestras de hisopos nasales y fragmentos de pulmón provenientes de animales que se encuentren en la fase aguda de la enfermedad. Dichas muestras serán utilizadas para inocular cultivos celulares o huevos embrionados. La confirmación del aislamiento del virus requerirá del empleo de técnicas como hemadsorción o hemaglutinación las cuales permitirán saber si ha aislado un virus hemaglutinante, si la reacción es positiva, se tendrán que realizar técnicas que permitan identificar al subtipo

viral del que se trata entre las que se encuentran: inmunofluorescencia directa, inmunoperoxidasa, inhibición de la hemaglutinación o RT-PCR (Burleson *et al.*, 1992).

Para el uso de técnicas serológicas como inhibición de la hemaglutinación y ELISA son necesarias muestras pareadas de suero colectadas durante la fase aguda de la enfermedad y la fase de convalecencia (2-4 semanas después del inicio del cuadro clínico) con el objetivo de determinar si existe o no seroconversión. La prueba de inhibición de la hemaglutinación aprovecha la capacidad hemaglutinante del virus de influenza para poder identificar y cuantificar los anticuerpos dirigidos contra la proteína HA, ya que se basa en la unión de los anticuerpos a la hemaglutunina, con la resultante inhibición de la hemaglutinación. Las pruebas ELISA utilizadas para el diagnóstico de influenza pueden ser dirigidas contra las proteínas NP y HA. Consisten en placas revestidas con antígenos o anticuerpos marcados con una enzima que al estar sobre un soporte (inmunoabsorbente) permitirán que la reacción antígeno-anticuerpo quede inmovilizada y sea revelada mediante la adición de un sustrato específico para la enzima, que al reaccionar provocara un cambio de coloración que puede ser observado a simple vista o cuantificado mediante el uso de un espectrofotómetro (Burleson *et al.*, 1992). Las pruebas ELISA disponibles para la detección de anticuerpos contra HA en cerdos son de tipo indirecto y están dirigidas contra los subtipos H1N1 y H3N2. La prueba ELISA dirigida contra la proteína NP es una prueba de bloqueo de tipo cualitativo que permite detectar anticuerpos contra cualquier subtipo de influenza A por lo que es considerada una prueba tamiz.

Los avances en el área de biología molecular han permitido el desarrollo e implementación de técnicas moleculares para la identificación, tipificación y subtipificación del virus de influenza entre las que se encuentran el RT-PCR, RT-PCR tiempo real, RT-PCR múltiple, estas técnicas han demostrado ser una herramienta poderosa en el diagnóstico de influenza, debido a que disminuyen considerablemente el tiempo necesario para la identificación del virus si se compara con las técnicas que se han utilizado de forma rutinaria, además de que disminuyen considerablemente el riesgo de contaminación o falsos positivos asociados a reacciones inespecíficas (Wang and Taubenberger, 2010).

### **1.11. Rol de los cerdos en la transmisión interespecies**

Por muchos años se ha pensado que los cerdos participan como hospedadores intermediarios para la adaptación y transmisión de virus influenza aviar ó virus de influenza con reordenamientos genéticos a humanos; sin embargo, las infecciones con subtipos H5 y H7 en humanos han estado relacionadas con contacto cercano con aves infectadas, además de que estos virus también han infectado a otras especies como tigres, leopardos, garduñas, gatos y perros. En el caso de los cerdos la incidencia de infecciones con el subtipo H5N1 en Asia es muy baja comparada con la incidencia existente en aves. Es importante señalar que en estudios de patogénesis con virus aviares no todos los virus han sido capaces de infectar a los cerdos, en algunos casos no se ha logrado detectar excreción ó respuesta serológica. Así que el mantenimiento de virus de influenza aviar o virus de influenza con

reordenamientos genéticos en la población porcina está influenciada por un gran número de factores entre los que se incluyen la cepa del virus, su nivel de adaptación en el cerdo, el estado inmunológico de la piara, la edad, los métodos de cría y producción, la movilización de los animales y desde luego los factores climáticos (Ito and Kawaoka, 2000; Olsen, 2006; Brown, 2000; De Vleeschauwer *et al.*, 2009).

### **1.12. JUSTIFICACIÓN.**

El virus de la influenza porcina es uno de los pocos patógenos respiratorios primarios en porcinos. La infección con virus de los subtipos H1N1 clásicos generalmente se limita al aparato respiratorio y los esfuerzos destinados a demostrar replicación viral fuera del aparato respiratorio han sido infructuosos. Considerando el origen genético del virus de influenza humana A H1N1 pandémico (referido de aquí en adelante como virus pH1N1), su presentación clínica en humanos y que este no fue detectado previamente en las piaras porcinas del país, es de gran relevancia realizar un estudio experimental en cerdos calostrados y no calostrados donde se evalúe y se compare la presentación clínica, respuesta serológica, lesiones macroscópicas, microscópicas y cambios ultraestructurales de una cepa clásica de virus de influenza porcina A H1N1 (referido de aquí en adelante como virus swH1N1) contra el virus pH1N1.

### **1.13. HIPÓTESIS**

La presentación clínica, respuesta serológica, lesiones macroscópicas, microscópicas y cambios ultraestructurales en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con el virus pH1N1 será diferente a la de los cerdos calostrados y no calostrados inoculados con el virus swH1N1.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Comparar la presentación clínica, respuesta serológica, lesiones macroscópicas, microscópicas y cambios ultraestructurales en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con el virus pH1N1 contra cerdos calostrados y no calostrados inoculados con el virus swH1N1.

### **2.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

Realizar la evaluación clínica de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1.

Determinar los títulos de anticuerpos en suero contra el virus pH1N1 y el virus swH1N1; así como, contra el virus de influenza porcina A subtipo H3N2, mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1.

Evaluar las lesiones macroscópicas, microscópicas y cambios ultraestructurales en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Virus para la inoculación**

Se utilizaron dos virus de influenza A en este estudio: virus de influenza humana A/México/La Gloria-3/2009/H1N1 y virus de influenza porcina A/swine/New Jersey/11/1976/H1N1, los dos virus con un título viral de 64 UHA (unidades hemoaglutinantes) obtenido por hemaglutinación y de  $10^{5.8}$  copias de RNA/ $\mu$ l por RT-PCR tiempo real.

#### **3.2. Animales para experimentación y alojamiento**

Se utilizaron 40 cerdos, 20 calostrados y 20 no calostrados provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Los cuales fueron alojados en las unidades de aislamiento del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos. Antes de la inoculación los cerdos recibieron un período de adaptación que en el caso de los cerdos calostrados fue de 1-2 semanas; durante el cual recibieron alimento y agua a libre acceso, 5 días antes de la inoculación se les administraron 20 mg de tilosina (Macrotyl®, Laboratorios MAVER) por kilogramo de peso vía intramuscular. Los cerdos no calostrados fueron separados de su madre al momento de nacimiento, fueron secados, los cordones umbilicales fueron cortados y desinfectados con una solución de iodo y posteriormente alimentados con un sustituto lácteo (Bayovac Lactomilk®, Laboratorios Bayer Animal Health) por un período de 21 días, se les proporcionó alimento en pellet (NUPIG UNO Evolution®, Grupo Nutec) a libre acceso desde el día 7 de edad y hasta que concluyó el experimento. Se les

administraron 2.5 mg de enrofloxacin (Baytril inyectable 5%®, Laboratorios Bayer Animal Health) por kilogramo de peso vía intramuscular del día 1 al 7 de edad, 5 días antes de la inoculación se les administraron 20 mg de tilosina (Macrotyl®, Laboratorios MAVER) por kilogramo de peso vía intramuscular con la finalidad de disminuir la carga microbiana. Los cerdos fueron mantenidos a una temperatura ambiente que osciló entre los 28 y 30°C durante todo el experimento.

### **3.3. Diseño experimental**

Se conformaron cuatro grupos denominados: calostrados/pH1N1 (n=9), no calostrados/pH1N1 (n=9), calostrados/swH1N1 (n=9) y no calostrados/swH1N1 (n=9). Los grupos calostrados/pH1N1 y no calostrados/pH1N1 fueron inoculados a los de 29 días de edad, vía intranasal con 5ml de una solución que contenía 6,400 UHA y los grupos calostrados/swH1N1 y no calostrados/swH1N1 fueron inoculados a los 36 días de edad, vía intranasal con 5ml de una solución que contenía 6,400 UHA. La diferencia en la edad de inoculación se debe a que el grupo de cerdos calostrados/swH1N1 presentó un problema digestivo por el cual se tuvo que posponer la infección una semana hasta que los cerdos estuvieron clínicamente sanos.

Adicionalmente 4 cerdos (2 calostrados y 2 no calostrados) fueron inoculados con 5ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y mantenidos durante toda la fase experimental con el objetivo de obtener muestras de sangre para la obtención de suero que serviría como control

negativo en las pruebas serológicas y a los cuales se les realizó la eutanasia y necropsia al final del experimento con el objetivo de obtener muestras de los diferentes órganos que servirían como referencia de tejidos sin alteraciones en la evaluación microscópica y ultraestructural.

### **3.4. Evaluación clínica antes de la inoculación**

Se determinó la temperatura rectal, peso corporal y se estableció la presencia o ausencia de signos clínicos como: estornudos, tos, disnea, descarga nasal y secreción ocular.

### **3.5. Evaluación serológica antes de la inoculación**

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular para la obtención de suero y se determinó la presencia de anticuerpos contra Influenza, Ojo azul, Circovirus porcino tipo 2, Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino y *Mycoplasma hyopneumoniae*, para esto se utilizaron las técnicas de ELISA e inhibición de la hemaglutinación.

#### **3.5.1. ELISA**

- **Influenza (AniGen AIV Ab®, BIONOTE, Inc)**

Anigen AIV Ab® es una prueba ELISA de tipo competitivo, cualitativa utilizada para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza dirigidos contra nucleoproteína, por lo que las placas están recubiertas con esta proteína del virus de influenza. El procedimiento de la prueba, lectura de las placas e interpretación de los resultados se realizó según las especificaciones del fabricante. Para la interpretación de la prueba se calculó el valor PI (Porcentaje

de inhibición) de cada muestra aplicando la fórmula del porcentaje de inhibición.

Valor PI =  $(1 - \text{Densidad óptica (DO) muestra} / \text{media de la DO negativa}) \times 100$

Se consideró una muestra como positiva cuando el valor PI era  $\geq 50$  y negativa cuando el valor PI fue  $< 50$ .

- ***Mycoplasma hyopneumoniae* (HerdChek\*<sup>M</sup> hyo<sup>®</sup>, IDEXX Laboratories, Inc.)**

HerdChek\*<sup>M</sup> hyo<sup>®</sup> es una prueba ELISA de tipo indirecto, cualitativa utilizada para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. El procedimiento de la prueba, lectura de las placas e interpretación de los resultados se realizó según las especificaciones del fabricante. Para la interpretación de la prueba se calculó el cociente M/P de cada muestra aplicando la siguiente fórmula:

$M/P = (\text{DO de la muestra} - \text{promedio del control negativo}) / (\text{Promedio del control positivo} - \text{promedio del control negativo})$

Se consideró una muestra como positiva si la relación M/P era mayor o igual que 0.40 y negativa cuando la relación M/P era menor que 0.30. Si la relación M/P era mayor o igual que 0.30 pero menor o igual que 0.40, entonces la muestra se consideró como sospechosa.

- **Circovirus porcino tipo 2 (INGEZIM CIRCO IgG®, Inmunología y Aplicada S.A.)**

Ingezim Circo IgG® es una prueba ELISA de tipo indirecto, cualitativa utilizada para la detección de anticuerpos contra la proteína VP2 del Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2). El procedimiento de la prueba, lectura de las placas e interpretación de los resultados se realizó según las especificaciones del fabricante. Para la interpretación de la prueba se calcularon los puntos de corte de la siguiente manera:

Punto de corte negativo = DO del control negativo + 0.2

Punto de corte positivo = DO del control negativo + 0.25

Se consideró una muestra como positiva si la DO era superior al punto de corte positivo y negativa cuando la DO era menor que el punto de corte negativo. Si la DO se encontraba entre los dos puntos de corte las muestras eran consideradas como sospechosas.

- **Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (HerdChek\*PRRS 2XR®, IDEXX Laboratories, Inc.)**

HerdChek\*PRRS 2XR® es una prueba ELISA de tipo indirecto, cualitativa utilizada para la detección de anticuerpos contra la proteína N del virus de PRRS. El procedimiento de la prueba, lectura de las placas e interpretación de los resultados se realizó según las especificaciones del fabricante. Para la interpretación de la prueba se calculó el cociente M/P de cada muestra aplicando la siguiente fórmula:

$M/P = (DO \text{ de la muestra:PRRS} - DO \text{ de la muestra:NHC}) / (\text{Media del control positivo:PRRS} - \text{Media del control positivo:NHC})$

Se consideró una muestra como positiva si la relación M/P era superior o igual a 0.40 y negativa cuando la relación M/P era menor que 0.40.

### **3.5.2. Inhibición de la hemaglutinación**

Se determinó la presencia de anticuerpos contra Ojo azul, Influenza A pH1N1 y swH1N1 e Influenza A H3N2 mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación. Para esto los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos, con la finalidad de eliminar posibles inhibidores o aglutinantes inespecíficos. Se realizó la adsorción de los sueros en placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en U, en el caso de Ojo azul se adsorbieron 100 µl de suero con 50 µl de caolín y 50 µl de una suspensión de glóbulos rojos de bovino al 5%; en el caso de Influenza se adsorbieron 50 µl de suero con 100 µl de caolín y 100 µl de una suspensión de glóbulos rojos de gallina al 10% las placas se dejaron en refrigeración (4°C) por 24 horas y posteriormente, se colectó el sobrenadante el cual se utilizó en la prueba.

Los antígenos utilizados en la prueba fueron virus de Ojo azul, virus de Influenza A pH1N1 y swH1N1 y virus de Influenza A H3N2 porcino, los cuales fueron titulados por hemaglutinación en placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en U, realizándose diluciones dobles seriadas para obtener el título viral, en este caso el título del virus de Ojo azul fue de 16 UHA y para los virus de Influenza A fue de 128 UHA, estos antígenos fueron ajustados a 8 UHA para la realización de la prueba.

Como sistema indicador en el caso de Ojo azul se utilizó una suspensión de glóbulos rojos de bovino al 0.5% y en el caso de Influenza una suspensión de glóbulos rojos de gallina al 0.5%.

Para la prueba de inhibición de la hemaglutinación se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en U, a todos los pozos se agregaron 50 µl de PBS, a los pozos de la primera fila de cada placa se les agregó 50 µl del suero adsorbido, esta mezcla fue homogeneizada y posteriormente se realizaron diluciones dobles seriadas hasta llegar al último pozo. Después de esto se agregaron 50 µl de antígeno con 8 UHA a todos los pozos y las placas se dejaron incubar por 30 minutos para permitir la reacción antígeno-anticuerpo, una vez transcurrido este tiempo se agregó la suspensión de glóbulos rojos y se dejaron incubar las placas de 15-20 minutos y posteriormente se realizó la lectura (Rodríguez *et al.*, 1996).

Para la interpretación de la prueba en el caso de Influenza se consideró una muestra como positiva cuando el título de anticuerpos fue  $\geq 1:80$  y para Ojo azul cuando el título de anticuerpos fue  $\geq 1:16$ .

### **3.6. Evaluación clínica después de la inoculación**

Los cerdos de los cuatro grupos fueron evaluados diariamente con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de signos respiratorios tales como: estornudos, tos, disnea, descarga nasal y secreción ocular. También se determinó la temperatura rectal y peso corporal con el objetivo de obtener la ganancia diaria de peso.

### **3.7. Evaluación serológica después de la inoculación**

Se colectaron muestras de sangre al día 1, 3, 6, 9, 12 y 14 posinoculación para la obtención de suero, posteriormente las muestras fueron inactivadas, adsorbidas y se les determinó la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 e influenza A H3N2 mediante inhibición de la hemaglutinación y ELISA como se describió anteriormente.

### **3.8. Evaluación patológica**

Se realizó la eutanasia y necropsia de tres cerdos de cada uno de los grupos a los 2, 6 y 14 días posinoculación. Se evaluaron las lesiones macroscópicas y se colectaron muestras para histología y microscopía electrónica de transmisión.

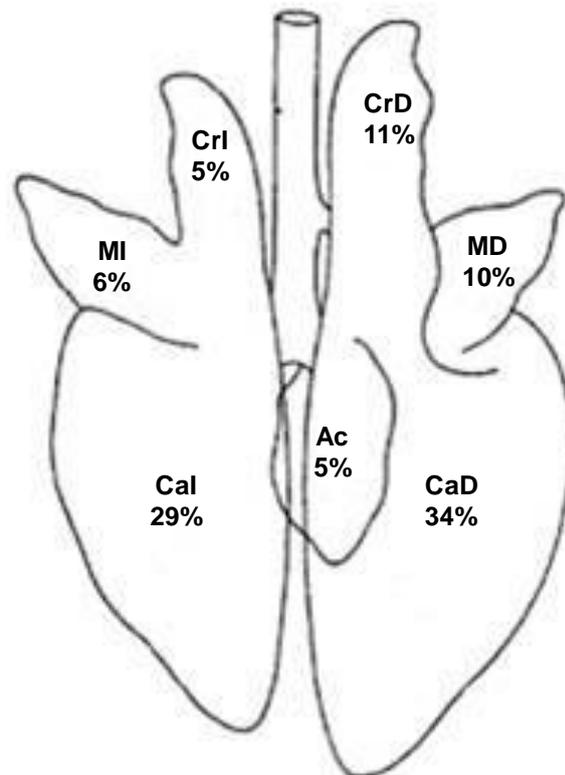
La eutanasia se realizó mediante la inducción de los cerdos a un plano profundo de anestesia y su posterior exanguinación. Para esto los cerdos recibieron una dosis de 2.2 mg/kg xilacina y 4.4 mg/kg Tiletamina-Zolacepam vía intramuscular. Esta mezcla de tranquilizantes y anestésicos favoreció la sedación e inmovilización de los cerdos necesarios para realizar la exanguinación (NOM-033-Z00-1995; Bollen *et al.*, 2000; AVMA Panel on Euthanasia American Veterinary Medical Association, 2000; Aluja y Constantino, 2002).

#### **3.8.1. Evaluación macroscópica**

Se realizó la necropsia completa de cada cerdo, con especial énfasis en el tracto respiratorio, donde se determinó el porcentaje de lesión del pulmonar.

Para esto se utilizaron como referencia los porcentajes que Christensen asignó a cada lóbulo pulmonar del cerdo (Sorensen, 2006) (Figura 3). Así que dependiendo del o los lóbulos pulmonares que estuvieron lesionados; así como, del porcentaje de lesión que se estimó que tenía cada lóbulo, los porcentajes se sumaron y se obtuvo el porcentaje de lesión del pulmón.

Figura 3. Diagrama esquemático del pulmón de cerdo. Se observa el porcentaje que representa cada lóbulo. CrI: Lóbulo craneal izquierdo, MI: Lóbulo medio izquierdo, Cal: Lóbulo caudal izquierdo, CrD: Lóbulo craneal derecho, MD: Lóbulo medio derecho, CaD: Lóbulo caudal derecho, Ac: Lóbulo accesorio.



### 3.8.2. Evaluación microscópica

Para la evaluación microscópica se colectaron muestras de párpado, cornete nasal, tráquea, pulmón, linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico, inguinal) tonsila palatina, timo, bazo, glándula salival, estómago,

duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, páncreas, hígado, riñón, vejiga urinaria, ovario, oviducto, testículo, encéfalo, médula espinal, músculo cardíaco, músculo diafragmático y músculo esquelético (regiones del lomo y pierna). Dichas muestras fueron conservadas en formalina al 10% amortiguada a pH de 7.2 y posteriormente procesadas por las técnicas de rutina de inclusión en parafina y tinción de rutina con hematoxilina y eosina (Hall, 1995; Allen, 1995). Los tejidos fueron evaluados mediante el uso de microscopía óptica asignando a las lesiones que se enlistan en los Cuadros 2 al 7 los siguientes grados de lesión: sin cambios significativos = 0, leve = 1, moderado = 2 y severo = 3. Las lesiones que se evaluaron en cada tejido fueron determinadas después de realizar una evaluación rápida en la que se identificaron los cambios más relevantes. En el caso de órganos como el cornete nasal, tráquea, pulmón, tonsila y linfonodos debido a que se evaluaron un gran número de lesiones se optó por realizar una reducción de estas mediante la técnica de componentes principales lo que permitió agrupar a las lesiones en dos grupos que fueron nombrados de acuerdo el tipo de lesión que predominó en cada uno.

Cuadro 2. Lesiones microscópicas evaluadas en el cornete nasal de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.

<b>Lesiones necróticas e inflamatorias</b>	<b>Lesiones hiperplásicas</b>
Hemorragia	Congestión
Pérdida de cilios	Hiperplasia de células epiteliales
Necrosis epitelial	Hiperplasia de células calciformes
Exfoliación epitelial	Metaplasia escamosa
Infiltrado inflamatorio	

Cuadro 3. Lesiones microscópicas evaluadas en tráquea de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.

<b>Lesiones hiperplásicas</b>	<b>Lesiones necróticas e inflamatorias</b>
Pérdida de cilios Hiperplasia epitelial Hiperplasia de células caliciformes	Infiltrado inflamatorio Necrosis epitelial

Cuadro 4. Lesiones microscópicas evaluadas en pulmón de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.

<b>Alteraciones circulatorias e inflamatorias</b>	<b>Lesiones necróticas y regenerativas</b>
Congestión Hemorragia Edema perivascular Edema alveolar Infiltrado inflamatorio bronquial Infiltrado inflamatorio bronquiolar Infiltrado inflamatorio en el tabique interalveolar Infiltrado inflamatorio alveolar Infiltrado inflamatorio perivascular Hiperplasia de neumocitos tipo II	Necrosis del epitelio bronquial Necrosis del epitelio bronquiolar Pérdida de cilios del epitelio bronquial Pérdida de cilios del epitelio bronquiolar Exfoliación del epitelio bronquial Exfoliación del epitelio bronquiolar Hiperplasia epitelial bronquial Hiperplasia del epitelio bronquiolar Hiperplasia de células caliciformes

Cuadro 5. Lesiones microscópicas evaluadas en tonsila palatina de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.

<b>Lesiones necróticas e inflamatorias</b>	<b>Lesiones atróficas e hiperplásicas</b>
Degeneración vacuolar Descamación epitelial Necrosis epitelial Necrosis/apoptosis linfóide Infiltrado inflamatorio en criptas	Atrofia linfóide Hiperplasia linfóide Hemorragia

Cuadro 6. Lesiones microscópicas evaluadas en linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.

<b>Alteraciones circulatorias</b>	<b>Lesiones linfoides</b>
Edema Congestión Hemorragia	Necrosis/apoptosis linfóide Atrofia linfóide Hiperplasia linfóide

Cuadro 7. Lesiones microscópicas evaluadas en otros tejidos de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.

<b>Órgano</b>	<b>Lesión</b>
Párpado	Infiltrado inflamatorio perivascular
Timo	Necrosis/apoptosis linfoide Hemorragia
Bazo	Necrosis/apoptosis linfoide Hiperplasia linfoide
Hígado	Degeneración vacuolar Infiltrado inflamatorio periportal
Íleon	Necrosis/apoptosis linfoide
Vejiga	Degeneración vacuolar

### 3.8.3. Evaluación ultraestructural

Para la evaluación ultraestructural se colectaron fragmentos de pulmón los cuales fueron fijados en una mezcla de glutaraldehído 2.5% - paraformaldehído 4% durante 24 horas, después los tejidos fueron lavados con una solución de cacodilatos amortiguada a pH de 7.2, postfijados con tetraóxido de osmio al 1% y lavados con la solución amortiguada de cacodilatos. Posteriormente, fueron deshidratados con concentraciones ascendentes de acetona e incluidos en resinas epóxicas. Después, se realizaron cortes semifinos (200nm) los cuales se montaron en portaobjetos y contrastaron con azul de toluidina. Finalmente, se realizaron cortes finos de 60nm los cuales fueron montados en rejillas de cobre, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación y evaluación en un microscopio electrónico Zeiss EM 900 (Vázquez y Echeverría, 2000). Se realizó la descripción de los cambios extra e intracelulares, se determinó la presencia o ausencia de partículas virales; así como, la morfología y tamaño de las mismas.

### 3.9. Análisis estadístico

Los resultados de la evaluación de la signología clínica fueron presentados de forma descriptiva. La temperatura corporal y ganancia diaria de peso fueron analizados mediante un diseño completamente al azar con un arreglo factorial multivariado (Hair JF, 1995)  $2 \times 2 \times 15$  donde el primer factor fue el calostro (calostrado y no calostrado); el segundo factor el virus (pH1N1 y swH1N1) y el tercer factor fueron los días posinoculación 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico JMP® 8.

El modelo estadístico utilizado para el experimento fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{(ijkl)}$$

En donde:

$\mu$  = media general

$\alpha_i$  = efecto del i-ésimo nivel del factor calostro

$i$  = 1 (calostrado) y 2 (no calostrado)

$\beta_j$  = efecto del j-ésimo nivel del factor virus

$j$  = 1 (pH1N1) y 2 (swH1N1)

$(\alpha\beta)_{ij}$  = efecto de la interacción de los factores calostro y virus

$\gamma_k$  = efecto del k-ésimo nivel del factor días posinoculación

$k$  = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 días posinoculación

$\alpha\gamma_{ik}$  = efecto de la interacción de los factores calostro y días posinoculación

$\beta\gamma_{jk}$ = efecto de la interacción de los factores virus y días posinoculación

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = efecto de la interacción de los factores calostro, virus y días posinoculación

$\varepsilon_{(ijk)_l}$ = error experimental

$l = 1, 2, 3, 4$  y  $5$

$Y_{ijkl}$ = matriz de los valores observados para cada variable

Los resultados del ELISA e inhibición de la hemaglutinación fueron presentados de forma descriptiva. Adicionalmente, a los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación se les realizó una transformación logarítmica ( $\log 10$ ). Estos resultados transformados fueron analizados mediante un diseño completamente al azar con un arreglo factorial multivariado  $2 \times 2 \times 7$  donde el primer factor fue el calostro (calostrado y no calostrado); el segundo factor el virus (pH1N1 y swH1N1) y el tercer factor fueron los días posinoculación 0, 1, 3, 6, 9, 12 y 14. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico JMP® 8.

El modelo estadístico utilizado para el experimento fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{(ijk)_l}$$

En donde:

$\mu$ = media general

$\alpha_i$ = efecto del  $i$ -ésimo nivel del factor calostro

$i = 1$  (calostrado) y  $2$  (no calostrado)

$\beta_j =$  efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor virus

$j = 1$  (pH1N1) y  $2$  (swH1N1)

$(\alpha\beta)_{ij} =$  efecto de la interacción de los factores calostro y virus

$\gamma_k =$  efecto del  $k$ -ésimo nivel del factor días posinoculación

$k = 0, 1, 3, 6, 9, 12$  y  $14$  días posinoculación

$\alpha\gamma_{ik} =$  efecto de la interacción de los factores calostro y días posinoculación

$\beta\gamma_{jk} =$  efecto de la interacción de los factores virus y días posinoculación

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk} =$  efecto de la interacción de los factores calostro, virus y días posinoculación

$\varepsilon_{(ijk)l} =$  error experimental

$l = 1, 2, 3, 4, 5$  y  $6$

$Y_{ijkl} =$  matriz de los valores observados para cada variable

Para el análisis de las lesiones macroscópicas se realizó la transformación de los porcentajes de lesión pulmonar mediante la técnica de Box-Cox (Kuehl RO, 2001) utilizando la siguiente fórmula:

$$\lambda = \frac{(\text{Porcentaje de lesión} + 1)^{-0.2} - 1}{-0.072}$$

Los resultados transformados fueron analizados mediante un diseño completamente al azar con un arreglo factorial multivariado  $2 \times 2 \times 3$  donde el

primer factor fue el calostro (calostrado y no calostrado); el segundo factor el virus (pH1N1 y swH1N1) y el tercer factor fueron los días posinoculación 2, 6 y 14. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico JMP® 8.

El modelo estadístico utilizado para el experimento fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{(ijk)l}$$

En donde:

$\mu$ = media general

$\alpha_i$ = efecto del i-ésimo nivel del factor calostro

$i$ = 1 (calostrado) y 2 (no calostrado)

$\beta_j$ = efecto del j-ésimo nivel del factor virus

$j$ = 1 (pH1N1) y 2 (swH1N1)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción de los factores calostro y virus

$\gamma_k$ = efecto del k-ésimo nivel del factor días posinoculación

$k$ = 2, 6 y 14 días posinoculación

$\alpha\gamma_{ik}$ = efecto de la interacción de los factores calostro y días posinoculación

$\beta\gamma_{jk}$ = efecto de la interacción de los factores virus y días posinoculación

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = efecto de la interacción de los factores calostro, virus y días posinoculación

$\varepsilon_{(ijk)l}$ = error experimental

$l = 1, 2 \text{ y } 3$

$Y_{ijkl}$  = matriz de los valores observados para cada variable

Para el análisis de las lesiones microscópicas en tejidos como cornete nasal, tráquea, pulmón, tonsila y linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) debido a que se evaluaron una gran cantidad de lesiones o variables se optó por realizar una reducción de estas mediante la técnica de componentes principales, lo que permitió que las lesiones se agruparan en dos componentes, los cuales fueron identificados de acuerdo a las lesiones que predominaban en cada uno (Hair JF, 1995). Estos dos componentes fueron utilizados como nuevas variables y analizados mediante un diseño completamente al azar con un arreglo factorial multivariado  $2 \times 2 \times 3$  donde el primer factor fue el calostro (calostrado y no calostrado); el segundo factor el virus (pH1N1 y swH1N1) y el tercer factor fueron los días posinoculación 2, 6 y 14. Para el párpado, timo, bazo, hígado, íleon y vejiga no se obtuvieron componentes principales y las lesiones evaluadas fueron analizadas como se describió anteriormente. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico JMP® 8.

El modelo estadístico utilizado para el experimento fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{(ijk)l}$$

En donde:

$\mu$  = media general

$\alpha_i$  = efecto del  $i$ -ésimo nivel del factor calostro

$i = 1$  (calostrado) y  $2$  (no calostrado)

$\beta_j =$  efecto del  $j$ -ésimo nivel del factor virus

$j = 1$  (pH1N1) y  $2$  (swH1N1)

$(\alpha\beta)_{ij} =$  efecto de la interacción de los factores calostro y virus

$\gamma_k =$  efecto del  $k$ -ésimo nivel del factor días posinoculación

$k = 2, 6$  y  $14$  días posinoculación

$\alpha\gamma_{ik} =$  efecto de la interacción de los factores calostro y días posinoculación

$\beta\gamma_{jk} =$  efecto de la interacción de los factores virus y días posinoculación

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk} =$  efecto de la interacción de los factores calostro, virus y días posinoculación

$\varepsilon_{(ijk)l} =$  error experimental

$l = 1, 2$  y  $3$

$Y_{ijkl} =$  matriz de los valores observados para cada variable

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Resultados de la evaluación clínica en cerdos calostrados y no calostrados antes de la inoculación con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.**

Durante la evaluación clínica no se detectaron estornudos, tos, disnea, descarga nasal y secreción ocular en ninguno de los grupos. La temperatura corporal osciló entre 39°C y 39.66°C, la cual se encontró dentro del rango descrito para cerdos de esta edad. En relación al peso corporal el grupo de cerdos no calostrados/pH1N1 fue el grupo que exhibió el promedio de peso corporal más bajo con 4.79 kg, esto se debió a un problema entérico que presentó esta camada durante la primera semana de vida por el cual los animales exhibieron retraso en el crecimiento. El peso corporal en el resto de los grupos fue de 9.98 kg para el grupo de calostrados/pH1N1, 9.44 kg para el grupo de calostrados/swH1N1 y 8.33 kg para el grupo de no calostrados/swH1N1.

### **4.2. Resultados de la evaluación serológica en cerdos calostrados y no calostrados antes de la inoculación con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.**

En la evaluación serológica los cerdos no calostrados fueron negativos por inhibición de la hemaglutinación a la presencia de anticuerpos contra el virus pH1N1 y H3N2, en el caso del virus swH1N1 se detectaron 10 cerdos no calostrados positivos por inhibición de la hemaglutinación, así que con el objetivo de confirmar o descartar que esos sueros fueran positivos a la

presencia de anticuerpos contra influenza se realizó ELISA anti-NP y los resultados fueron negativos, por lo que el observar resultados positivos en cerdos no calostrados por inhibición de la hemaglutinación se atribuyó a una reacción inespecífica. En el caso de los cerdos calostrados los sueros fueron negativos por inhibición de la hemaglutinación a la presencia de anticuerpos contra el virus H3N2, en el caso del virus swH1N1 18/18 sueros fueron positivos y para el virus pH1N1 15/18 sueros fueron positivos lo cual se atribuyó a una reacción cruzada con el virus swH1N1, al realizar ELISA anti-NP a esos sueros 17/18 fueron positivos. Los resultados de inhibición de la hemaglutinación contra Ojo azul fueron negativos; así como los resultados de ELISA contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, Circovirus porcino tipo 2 y Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino.

#### **4.3. Resultados de la evaluación clínica en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.**

Durante la evaluación clínica (Cuadro 8) se observaron estornudos y descarga nasal leve en todos los grupos; sin embargo, existieron variaciones en la cantidad de animales afectados y el período de días en los que se presentaron los signos clínicos entre los grupos. Los grupos inoculados con el virus pH1N1 exhibieron un mayor número de animales con signos clínicos y la duración de estos fue de 6-8 días, mientras que los cerdos inoculados con el virus swH1N1 exhibieron un menor número de animales afectados y la duración de los signos clínicos fue de 3-4 días. Se pudo apreciar que el calostro tuvo cierto efecto protector contra los dos virus ya que en los grupos de animales calostrados se observó un menor número de animales con la

signología clínica mencionada; sin embargo, en la duración de los signos clínicos el grupo de calostrados/pH1N1 fue el que presentó los signos clínicos por un mayor período de tiempo (8 días). Las variaciones observadas en el número de animales afectados y la duración de la signología clínica sugieren que bajo las condiciones del presente estudio el comportamiento clínico del virus pH1N1 es diferente al del virus swH1N1.

Cuadro 8. Resultados de la evaluación clínica realizada en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.

Grupo	Signología	Días posinfección														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Calostrados/pH1N1	Estornudos	0/9	0/9	0/9	3/6	3/6	3/6	3/6	1/3	2/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Descarga nasal	0/9	0/9	0/9	3/6	3/6	3/6	3/6	1/3	2/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
No calostrados/pH1N1	Estornudos	0/9	0/9	0/9	0/6	6/6	6/6	6/6	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Descarga nasal	0/9	0/9	0/9	0/6	6/6	6/6	6/6	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Calostrados/swH1N1	Estornudos	0/9	0/9	0/9	0/6	1/6	1/6	1/6	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Descarga nasal	0/9	0/9	0/9	0/6	1/6	1/6	1/6	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
No calostrados/swH1N1	Estornudos	0/9	0/9	2/9	2/6	2/6	0/6	0/6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Descarga nasal	0/9	0/9	2/9	2/6	2/6	0/6	0/6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

#### 4.4. Temperatura corporal rectal en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.

Se observó que la media de la temperatura corporal (Cuadro 9) fue similar entre los cerdos calostrados (39.29°C) y los no calostrados (39.22°C); así como, entre los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (39.23°C) y los inoculados con el virus swH1N1 (39.28°C) ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se evaluó la interacción entre el calostro y el virus se observó que la temperatura corporal se comportó de forma similar en los cuatro grupos evaluados. Sin embargo, cuando se evaluó la temperatura corporal a lo largo de los días posinoculación

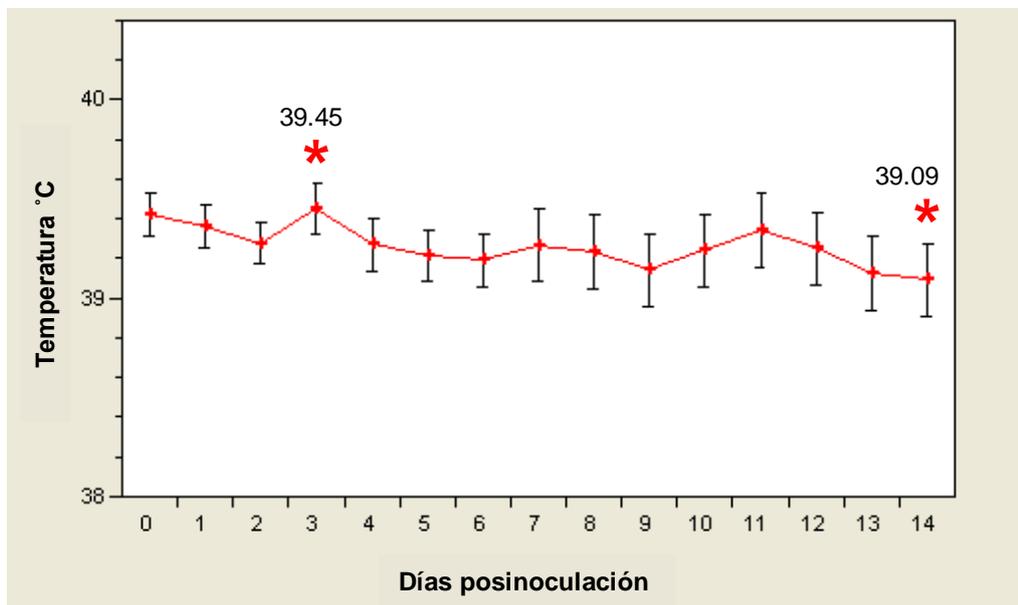
(Figura 4) se observó que la temperatura rectal fue más alta al día 3 (39.45°C) posinoculación que la observada al día 14 (39.09°C) posinoculación ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 9. Temperatura corporal rectal (°C) en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de la temperatura corporal rectal de 75 mediciones realizadas por grupo durante todo el experimento. Del día 0 al 2 posinoculación se obtuvo la media de la temperatura corporal rectal de 9 cerdos en cada grupo, del día 3 al 6 posinoculación la media de 6 cerdos por grupo y del día 7 al 14 posinoculación la media de 3 cerdos por grupo obteniéndose de esta manera 75 mediciones por grupo.

Calostro	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1	
Si	39.27 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	39.31 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	39.29 <sup>a</sup>
No	39.19 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	39.26 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	39.22 <sup>a</sup>
Media	39.23 <sup>a</sup>	39.28 <sup>a</sup>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Figura 4. Temperatura corporal rectal (°C) en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos en cada punto corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de la temperatura corporal rectal obtenida por día considerando todos los grupos. Del día 0 al 2 posinoculación se observa la media de 36 cerdos, del día 3 al 6 posinoculación la media de 24 cerdos y del día 7 al 14 posinoculación la media de 12 cerdos.



Considerando los resultados de temperatura corporal obtenidos y que en cerdos destetados de entre 9 y 18 kg la temperatura corporal se encuentra

entre 39.3°C y 39.6°C, se concluye que los datos obtenidos no muestran evidencia suficiente para afirmar que la inoculación con los virus de influenza pH1N1 y swH1N1 tuvo algún efecto sobre la temperatura corporal.

#### **4.5. Ganancia diaria de peso en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1.**

Considerando que existía una marcada diferencia en el peso corporal de los cerdos al inicio del estudio asociada a la privación de calostro y a que uno de los grupos curso con un problema digestivo antes de la inoculación, se decidió evaluar la ganancia diaria de peso en lugar del peso corporal con la intención de realizar una evaluación más objetiva. Se observó que la ganancia diaria de peso (Cuadro 10) fue similar en cerdos calostrados (478 g) y los no calostrados (468 g) ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, cuando se agruparon a los cerdos de acuerdo al virus con que fueron inoculados se observó que los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (421 g) exhibieron una ganancia de peso más baja que los inoculados con el virus swH1N1 (524 g) ( $P < 0.05$ ). Al evaluar la interacción entre el calostro y el virus se observó que la ganancia diaria de peso observada en los grupos no calostrados/pH1N1 (448 g) y no calostrados/swH1N1 (488 g) fue similar ( $P \geq 0.05$ ), mientras que en el grupo de calostrados/pH1N1 (394 g) exhibió una menor ganancia de peso que el grupo de calostrados/swH1N1 (561 g) ( $P < 0.05$ ).

Considerando los resultados de ganancia diaria de peso obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que la ganancia diaria de peso en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (421 g) es diferente a la observada en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (524 g). Observando

una menor ganancia diaria de peso en los grupos inoculados con el virus pH1N1.

Cuadro 10. Ganancia diaria de peso en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de la ganancia diaria de peso (gramos) de 66 mediciones realizadas por grupo durante todo el experimento. Del día 1 al 2 posinoculación se obtuvo la media de la ganancia diaria de peso de 9 cerdos en cada grupo, del día 3 al 6 posinoculación la media de 6 cerdos por grupo y del día 7 al 14 posinoculación la media de 3 cerdos por grupo obteniéndose de esta manera 66 mediciones por grupo.

Calostro	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1	
Si	<b>394<math>\pm</math>26<sup>c</sup></b>	<b>561<math>\pm</math>26<sup>a</sup></b>	478 <sup>a</sup>
No	448 $\pm$ 26 <sup>bc</sup>	488 $\pm$ 26 <sup>b</sup>	468 <sup>a</sup>
Media	<b>421<sup>b</sup></b>	<b>524<sup>a</sup></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

#### **4.6. Resultados de la evaluación serológica realizada en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 utilizando las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y ELISA.**

Cuando se evaluó la respuesta serológica en el grupo de cerdos calostrados/pH1N1 (Cuadro 11) se observó que cuando se utilizó como antígeno al virus pH1N1 en la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) los títulos de anticuerpos se encontraron en un rango de 10-160 y 16/30 sueros fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus pH1N1. En relación al comportamiento de los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se observó que del día 6 al 14 posinoculación el número de animales positivos y el título de anticuerpos disminuyeron. Por otro lado, cuando se utilizó como antígeno al virus swH1N1 en la prueba de IH se observó que los títulos de anticuerpos se encontraron en un rango de 80-320 y

30/30 sueros fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus swH1N1. En relación al comportamiento de los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se observó que el título de anticuerpos disminuyó a los días 12 y 14 posinoculación. Con el uso del ELISA se detectaron 30/30 sueros positivos lo cual coincide con los resultados obtenidos con la prueba de IH cuando se utilizó como antígeno al virus swH1N1.

Cuadro 11. Resultados de la evaluación serológica realizada en el grupo de cerdos calostrados/pH1N1 mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH). Los datos corresponden al rango de títulos de anticuerpos obtenidos por día posinoculación, entre paréntesis se muestra la proporción de sueros con títulos de anticuerpos  $\geq 80$ .

Días posinoculación	IH-pH1N1	IH-swH1N1	ELISA
1	40-160 (7/9)	80-320 (9/9)	77.01 – 98.78 (9/9)
3	40-160 (5/6)	80-320 (6/6)	64.99 – 97.75 (6/6)
6	40-80 (2/6)	160-320 (6/6)	59.51 – 96.36 (6/6)
9	40-160 (1/3)	320 (3/3)	84.47 – 95.82 (3/3)
12	10-40 (0/3)	80 (3/3)	93.35 – 97.03 (3/3)
14	40-80 (1/3)	80-160 (3/3)	95.37 – 97.53 (3/3)
Sueros positivos	16/30	30/30	30/30

En el grupo de cerdos no calostrados/pH1N1 (Cuadro 12) cuando se utilizó como antígeno al virus pH1N1 en la prueba de IH los títulos de anticuerpos se encontraron en un rango de 10-160 y 7/30 sueros fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus pH1N1. En relación al comportamiento de los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se observó que del día 1 al 6 posinoculación los sueros fueron negativos y del día 9 al 14 posinoculación el número de animales positivos y el título de anticuerpos aumentaron. En el mismo grupo pero cuando se utilizó como antígeno al virus swH1N1 en la prueba de IH se observó que los títulos de anticuerpos se encontraron en un rango de 40-320 y 29/30 sueros fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus swH1N1. En relación al

comportamiento de los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se detectaron sueros positivos día 1 al 14 posinoculación. Cuando se utilizó ELISA se detectaron 6/30 sueros positivos, resultados que son similares a los observados con la prueba de IH cuando se utilizó como antígeno al virus pH1N1, además de que se confirmó que los sueros eran negativos del día 1 al 6 posinoculación y que es hasta el día 9 posinoculación cuando se detectan muestras positivas, lo que sugiere que los anticuerpos detectados del día 1 al 6 posinoculación por inhibición de la hemaglutinación cuando se utilizó como antígeno al virus swH1N1 pueden estar asociados a una reacción inespecífica.

Cuadro 12. Resultados de la evaluación serológica realizada en el grupo de cerdos no calostrados/pH1N1 mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH). Los datos corresponden al rango de títulos de anticuerpos obtenidos por día posinoculación, entre paréntesis se muestra la proporción de sueros con títulos de anticuerpos  $\geq 80$ .

Días posinoculación	IH-pH1N1	IH-swH1N1	ELISA
1	10 (0/9)	40-160 (8/9)	-5.11 – 28.41 (0/9)
3	10 (0/6)	80-160 (6/6)	10.00 – 23.02 (0/6)
6	10 (0/6)	80-160 (6/6)	16.42 – 31.37 (0/6)
9	10-80 (1/3)	80-160 (3/3)	46.67 – 61.13 (2/3)
12	160 (3/3)	160-320 (3/3)	42.86 – 63.59 (2/3)
14	80-160 (3/3)	80-160 (3/3)	42.50 – 58.61 (2/3)
Sueros positivos	7/30	29/30	6/30

En el grupo de cerdos calostrados/swH1N1 (Cuadro 13) cuando se utilizó como antígeno al virus pH1N1 en la prueba de IH los títulos de anticuerpos se encontraron en un rango de 10-640 y 14/30 sueros fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus pH1N1. En relación al comportamiento de los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se observó que del día 6 al 14 posinoculación el número de animales positivos y el título de anticuerpos disminuyen hasta ser negativos a

los 12 y 14 días posinoculación. En el mismo grupo pero ahora utilizando como antígeno al virus swH1N1 en la prueba de IH se observó que los títulos de anticuerpos se encontraron en un rango de 20-320 y 28/30 sueros fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus swH1N1. En relación al comportamiento de los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se detectaron sueros positivos día 1 al 14 posinoculación. Cuando se evaluaron estos sueros mediante el uso del ELISA se detectaron 18/30 sueros positivos, resultados que son similares a los obtenidos con la prueba de IH cuando se utilizó como antígeno al virus pH1N1, el observar títulos de anticuerpos más altos y un mayor número de animales positivos cuando se utilizó como antígeno al virus swH1N1 en la prueba de IH, puede asociarse a una baja capacidad del virus para aglutinar eritrocitos o a la presencia de inhibidores inespecíficos.

Cuadro 13. Resultados de la evaluación serológica realizada en el grupo de cerdos calostrados/swH1N1 mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH). Los datos corresponden al rango de títulos de anticuerpos obtenidos por día posinoculación, entre paréntesis se muestra la proporción de sueros con títulos de anticuerpos  $\geq 80$ .

Días posinoculación	IH-pH1N1	IH-swH1N1	ELISA
1	10-160 (6/9)	40-160 (8/9)	42.14 – 92.59 (6/9)
3	20-160 (4/6)	80-160 (6/6)	35.27 – 89.27 (3/6)
6	20-640 (3/6)	20-160 (5/6)	31.59 – 87.11 (4/6)
9	10-80 (1/3)	80-320 (3/3)	37.34 – 82.80 (2/3)
12	10-40 (0/3)	80-160 (3/3)	41.24 – 83.84 (2/3)
14	10-40 (0/3)	80-160 (3/3)	39.94 – 81.59 (1/3)
Sueros positivos	14/30	28/30	18/30

Finalmente, en el grupo de no calostrados/swH1N1 (Cuadro 14) cuando se utilizó como antígeno al virus pH1N1 en la prueba de IH los sueros fueron negativos a la presencia de anticuerpos contra el virus pH1N1. En el mismo grupo pero ahora utilizando como antígeno al virus swH1N1 en la prueba de IH

se observó que los títulos de anticuerpos se encontraron en un rango de 40-320 y 24/30 sueros fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el virus swH1N1. En relación al comportamiento de los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se detectaron sueros positivos del día 1 al 14 posinoculación. Cuando se evaluaron estos sueros mediante el uso del ELISA los sueros evaluados fueron negativos, lo cual coincide con los resultados obtenidos con la prueba de IH cuando se utilizó como antígeno al virus pH1N1; sin embargo, es importante considerar que con ELISA hubo muestras al día 12 y 14 posinoculación cuyos porcentajes de inhibición fueron cercanos al 50%, lo cual sugiere que en esas muestras podría estarse llevando a cabo una respuesta inmune primaria.

Cuadro 14. Resultados de la evaluación serológica realizada en el grupo de cerdos no calostrados/swH1N1 mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH). Los datos corresponden al rango de títulos de anticuerpos obtenidos por día posinoculación, entre paréntesis se muestra la proporción de sueros con títulos de anticuerpos  $\geq 80$ .

Días posinoculación	IH-pH1N1	IH-swH1N1	ELISA
1	10 (0/9)	40-320 (6/9)	-14.85 – 13.15 (0/9)
3	10 (0/6)	40-80 (3/6)	-5.92 – 11.13 (0/6)
6	10 (0/6)	80-320 (6/6)	-5.78 – 23.38 (0/6)
9	10 (0/3)	80 (3/3)	7.67 – 28.81 (0/3)
12	10 (0/3)	80-160 (3/3)	10.45 – 45.33 (0/3)
14	10 (0/3)	80 (3/3)	6.01 – 48.47 (0/3)
Sueros positivos	0/30	24/30	0/30

Finalmente cuando se realizó la prueba de IH utilizando como antígeno al virus H3N2 los resultados fueron negativos en todos los sueros de los cuatro grupos evaluados.

Al realizar el análisis estadístico (Cuadro 15) de los resultados obtenidos mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación cuando se utilizó a los

virus pH1N1 y swH1N1 como antígeno se encontraron diferencias entre los títulos de anticuerpos de los cerdos calostrados y los cerdos no calostrados; así como, entre los títulos de anticuerpos de los cerdos inoculados con el virus pH1N1 y los inoculados con el virus swH1N1 ( $P < 0.05$ ). Se evaluó la interacción entre el calostro y el virus se observó que cuando se utilizó como antígeno en la prueba de inhibición de la hemaglutinación al virus pH1N1 no se encontró diferencia en los títulos de anticuerpos entre los grupos de cerdos calostrados/pH1N1 (1.70) y calostrados/swH1N1 (1.54) ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, si se encontró diferencia en los títulos de anticuerpos entre los grupos de cerdos no calostrados/pH1N1 (0.86) y no calostrados/swH1N1 (0.00) teniendo una mayor respuesta en el grupo de cerdos no calostrados/pH1N1 ( $P < 0.05$ ). También se evaluó la interacción entre el calostro y el virus pero cuando se utilizó como antígeno en la prueba de inhibición de la hemaglutinación al virus swH1N1 y no se encontró diferencia en los títulos de anticuerpos entre ninguno de los grupos evaluados ( $P \geq 0.05$ ).

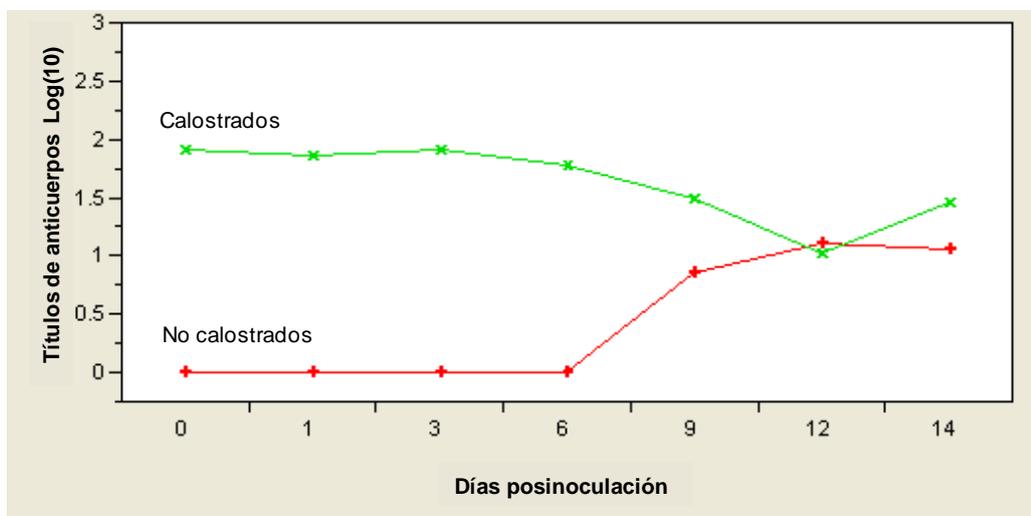
Cuadro 15. Títulos de anticuerpos obtenidos mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el error estándar del título de anticuerpos transformado obtenido de 30 sueros por grupo durante todo el experimento.

Inhibición de la hemaglutinación pH1N1				Inhibición de la hemaglutinación swH1N1		
Calostro	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	1.70 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.54 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	<b>1.62<sup>a</sup></b>	2.22 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	<b>2.13<sup>a</sup></b>
No	0.86 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	<b>0.43<sup>b</sup></b>	2.04 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.93 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	<b>1.98<sup>b</sup></b>
Media	<b>1.28<sup>a</sup></b>	<b>0.77<sup>b</sup></b>		<b>2.13<sup>a</sup></b>	<b>1.99<sup>b</sup></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

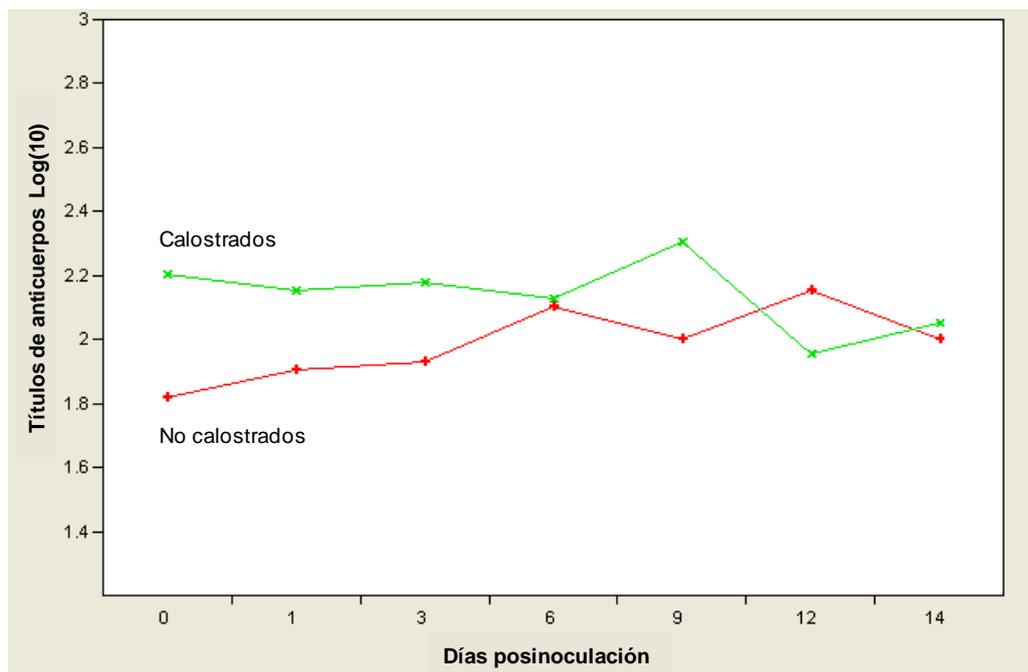
Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación. En relación al efecto del calostro sobre los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se observó que cuando se utilizó como antígeno en la prueba de IH al virus pH1N1 se encontró diferencia estadística entre los títulos de anticuerpos de los cerdos calostrados y no calostrados del día 0 al 9 posinoculación, debido a que en los cerdos no calostrados no se detectaron anticuerpos del día 0 al 6 y en los cerdos calostrados en el mismo período los títulos de anticuerpos fueron superiores a 1.5. Al día 9 posinoculación el título de anticuerpos en los cerdos no calostrados (0.85) fue más bajo que en los cerdos calostrados (1.48) ( $P < 0.05$ ). Finalmente a los 12 y 14 días posinoculación los títulos de anticuerpos fueron similares en cerdos no calostrados y calostrados ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 5).

Figura 5. Evaluación del efecto del calostro sobre los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus pH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos en cada punto corresponden a la media del título de anticuerpos transformado obtenido por día agrupando a los animales como calostrados y no calostrados. Al día 0 y 1 posinoculación se obtuvo la media de 18 cerdos calostrados y 18 no calostrados, al día 3 y 6 posinoculación la media de 12 cerdos calostrados y 12 cerdos no calostrados y a los días 9, 12 y 14 posinoculación la media de 6 cerdos calostrados y 6 cerdos no calostrados.



Cuando se utilizó como antígeno en la prueba de IH al virus swH1N1 se encontró diferencia entre los títulos de anticuerpos de los cerdos calostrados y no calostrados al día 0 y 1 posinoculación debido a que los títulos de anticuerpos en los cerdos calostrados (2.20 y 2.15) son más altos que en los no calostrados (1.82 y 1.90) ( $P < 0.05$ ). Del día 3 al 14 posinoculación los títulos de anticuerpos fueron similares en cerdos calostrados y no calostrados ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 6).

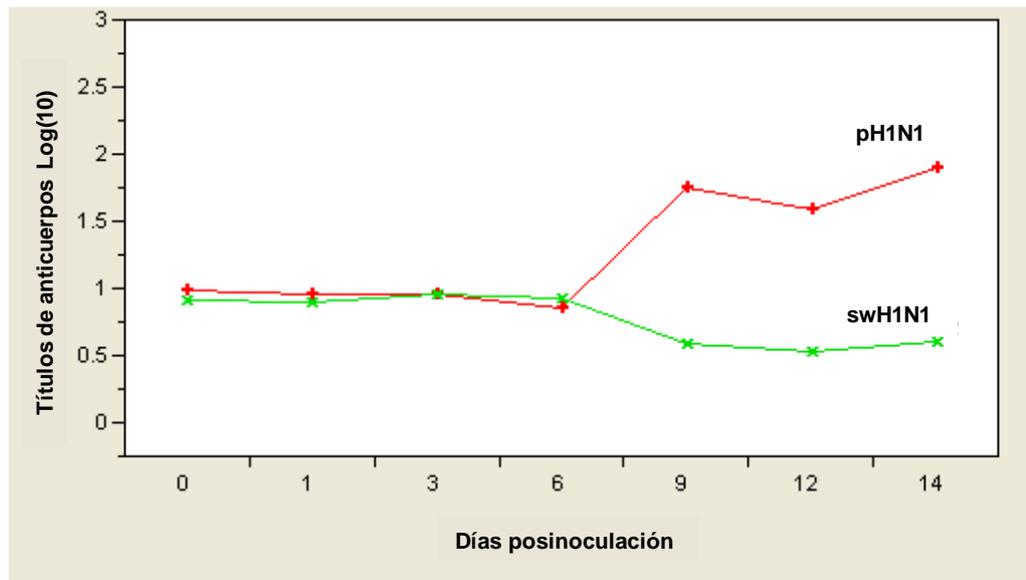
Figura 6. Evaluación del efecto del calostro sobre los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos en cada punto corresponden a la media del título de anticuerpos transformado obtenido por día agrupando a los animales como calostrados y no calostrados. Al día 0 y 1 posinoculación se obtuvo la media de 18 cerdos calostrados y 18 no calostrados, al día 3 y 6 posinoculación la media de 12 cerdos calostrados y 12 cerdos no calostrados y a los días 9, 12 y 14 posinoculación la media de 6 cerdos calostrados y 6 cerdos no calostrados.



En relación al efecto del virus sobre los títulos de anticuerpos a lo largo de los días posinoculación se observó que cuando se utilizó como antígeno en la prueba de IH al virus pH1N1 el comportamiento de los títulos de anticuerpos

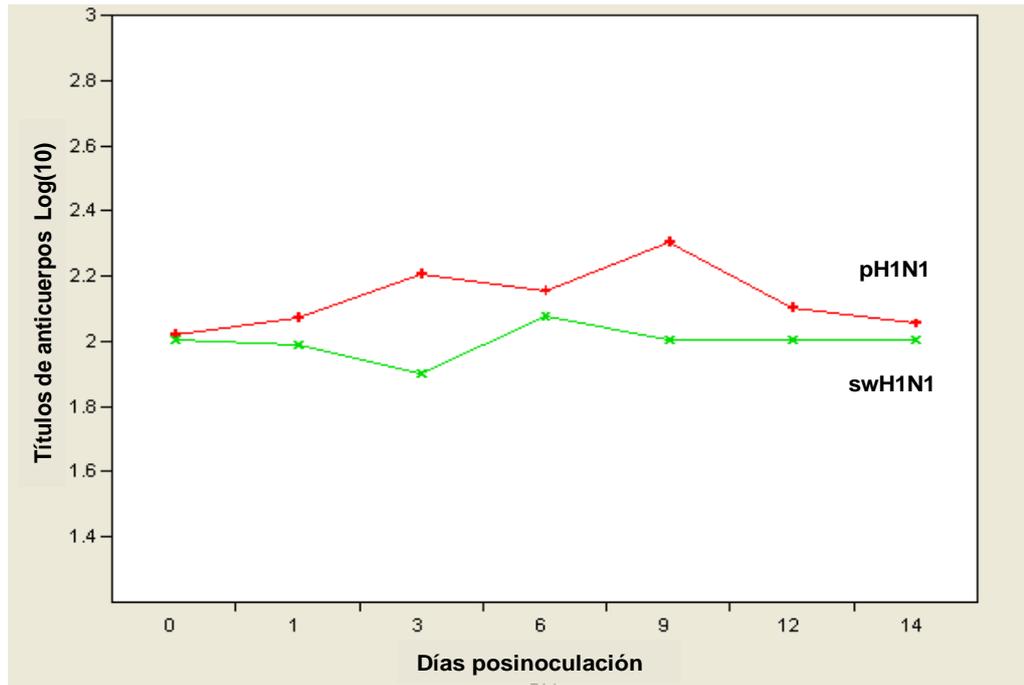
de los cerdos inoculados con el virus pH1N1 fue similar al de los cerdos inoculados con el virus swH1N1 del día 0 al 6 posinoculación ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, del día 9 al 14 posinoculación los títulos de anticuerpos en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 tienden a incrementar su título mientras que en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 los títulos de anticuerpos permanecieron bajos ( $P < 0.05$ ) (Figura 7).

Figura 7. Evaluación del efecto del virus sobre los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus pH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos en cada punto corresponden a la media del título de anticuerpos transformado obtenido por día agrupando a los animales como inoculados con el virus pH1N1 e inoculados con el virus swH1N1. Al día 0 y 1 posinoculación se obtuvo la media de 18 cerdos inoculados con el virus pH1N1 y 18 cerdos inoculados con el virus swH1N1, al día 3 y 6 posinoculación la media de 12 cerdos inoculados con virus pH1N1 y 12 cerdos inoculados con virus swH1N1 y a los días 9, 12 y 14 posinoculación la media de 6 cerdos inoculados con virus pH1N1 y 6 cerdos inoculados con virus swH1N1.



Cuando se utilizó como antígeno en la prueba de IH al virus swH1N1 se observó que los títulos de anticuerpos en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 fueron similares a los títulos de anticuerpos obtenidos en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 8).

Figura 8. Evaluación del efecto del virus sobre los títulos de anticuerpos obtenidos por inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos en cada punto corresponden a la media del título de anticuerpos transformado obtenido por día agrupando a los animales como inoculados con el virus pH1N1 e inoculados con el virus swH1N1. Al día 0 y 1 posinoculación se obtuvo la media de 18 cerdos inoculados con el virus pH1N1 y 18 cerdos inoculados con el virus swH1N1, al día 3 y 6 posinoculación la media de 12 cerdos inoculados con virus pH1N1 y 12 cerdos inoculados con virus swH1N1 y a los días 9, 12 y 14 posinoculación la media de 6 cerdos inoculados con virus pH1N1 y 6 cerdos inoculados con virus swH1N1.



Considerando los títulos de anticuerpos obtenidos con el uso de inhibición de la hemaglutinación se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que la respuesta serológica en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (1.28) es diferente a la observada en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.77) cuando se utiliza como antígeno en la prueba de inhibición de la hemaglutinación al virus pH1N1. Sin embargo, al utilizar como antígeno al virus swH1N1 el comportamiento de los títulos de anticuerpos es similar (pH1N1 2.13 y swH1N1 1.99). Las diferencias en la respuesta serológica además de estar asociadas al virus con el que fueron inoculados los cerdos, se asocian al

virus utilizado como antígeno en esta prueba y a la reacción cruzada que se observó entre estos virus.

#### **4.7. Resultados de la evaluación macroscópica realizada en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1**

Durante la necropsia el único órgano en donde se observaron lesiones macroscópicas evidentes fue el pulmón. En donde el tejido pulmonar afectado era de color rojo, firme al tacto y estaba claramente delimitado por tejido pulmonar normal, estas áreas de lesión afectaban predominantemente a los lóbulos craneales y medios, en algunos casos se observaron áreas de atelectasia y enfisema las cuales se localizaban en los lóbulos caudales. En las Figuras 9 a la 11 se observan algunas imágenes representativas de las lesiones observadas en cada grupo a los 2, 6 y 14 días posinoculación.

Figura 9. Lesiones macroscópicas observadas en pulmones de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus pH1N1 y swH1N1 a los 2 días posinoculación. En los pulmones identificados como no calostrado/pH1N1, calostrado/pH1N1 y calostrado/swH1N1 se observan pequeñas e irregulares zonas de consolidación, de color rojo, delimitadas por tejido pulmonar normal las cuales se localizan en los lóbulos craneales y medios. El pulmón identificado como no calostrado/swH1N1 no exhibe cambios macroscópicos evidentes.

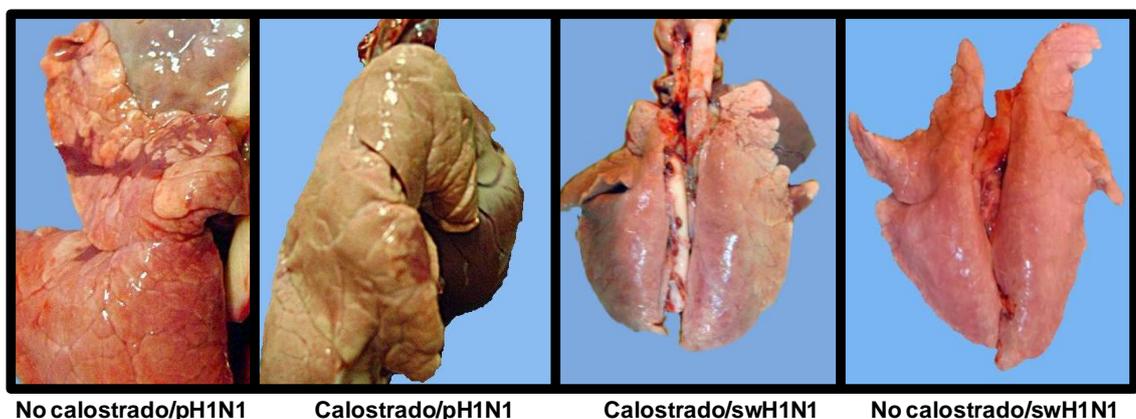
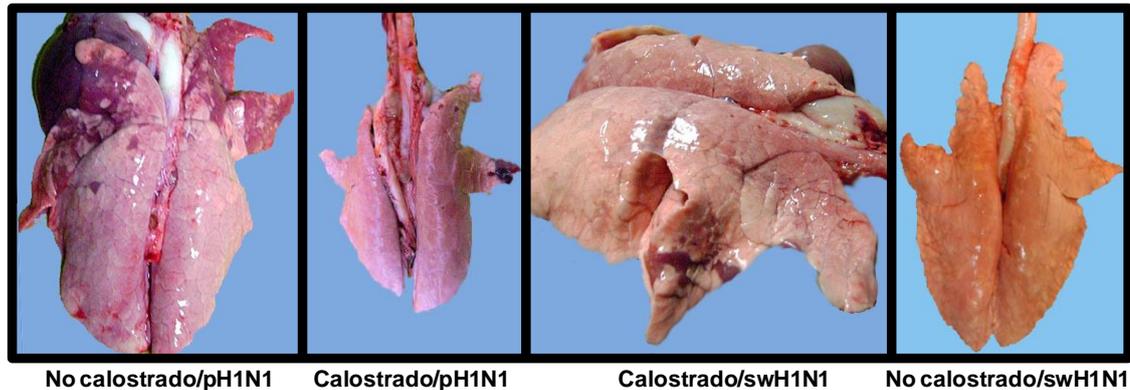


Figura 10. Lesiones macroscópicas observadas en pulmones de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus pH1N1 y swH1N1 a los 6 días posinoculación. En los pulmones identificados como no calostrado/pH1N1, calostrado/pH1N1 y calostrado/swH1N1 se observan de pequeñas a moderadas e irregulares zonas de consolidación, de color rojo, delimitadas por tejido pulmonar normal las cuales se localizan en los lóbulos craneales y medios. El pulmón identificado como no calostrado/swH1N1 no exhibe cambios macroscópicos evidentes.



No calostrado/pH1N1

Calostrado/pH1N1

Calostrado/swH1N1

No calostrado/swH1N1

Figura 11. Lesiones macroscópicas observadas en pulmones de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus pH1N1 y swH1N1 a los 14 días posinoculación. En el pulmón identificado como no calostrado/pH1N1, se observan pequeñas e irregulares zonas de consolidación, de color rojo, delimitadas por tejido pulmonar normal las cuales se localizan en el lóbulo craneal y medio. En el pulmón identificado como calostrado/pH1N1 se observa una bulla enfisematosa en el lóbulo caudal además de áreas de depresión de color rojo que corresponden a zonas de atelectasia pulmonar. El pulmón identificado como calostrado/swH1N1 no exhibe cambios macroscópicos evidentes. Finalmente el pulmón identificado como no calostrado/swH1N1 exhibe una pequeña zona de consolidación, de color rojo, delimitadas por tejido pulmonar normal la cual se localizan en el lóbulo medio.



No calostrado/pH1N1

Calostrado/pH1N1

Calostrado/swH1N1

No calostrado/swH1N1

Como se describió en la sección de metodología se determinó el porcentaje de lesión pulmonar (Cuadro 16) el cual se encontró entre 0.5% y 29%, el grupo que exhibió el mayor porcentaje de lesión fue el de no calostrados/pH1N1 al 6 día posinoculación.

Cuadro 16. Resultados de la evaluación macroscópica realizada en pulmones de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden al rango de porcentaje de lesión observado en 3 cerdos por grupo a los 2, 6 y 14 días posinoculación.

Grupo	Días posinoculación		
	2	6	14
Calostrados/pH1N1	0-0.5	1-4	0-1.5
No calostrados/pH1N1	3-11	<b>15-29</b>	3-15
Calostrados/swH1N1	0-3	0-1.5	0
No calostrados/swH1N1	0-0.5	0-0.5	0-0.5

Al hacer el análisis estadístico (Cuadro 17) de los porcentajes de lesión transformados se observó que cuando se agrupó a los cerdos como calostrados y no calostrados el porcentaje de lesión pulmonar fue mayor en los cerdos no calostrados (2.74) que en los calostrados (1.14); por otro lado, cuando se agrupó a los cerdos considerando el virus con el que fueron inoculados se observó que los inoculados con el virus pH1N1 (3.23) exhibieron mayor porcentaje de lesión que los inoculados con el virus swH1N1 (0.66) ( $P < 0.05$ ). Cuando se evaluó la interacción entre el calostro y el virus se observó que el grupo de cerdos calostrados/pH1N1 (1.40) y el grupo de cerdos calostrados/swH1N1 (0.88) exhibieron porcentajes de lesión similares ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, el porcentaje de lesión pulmonar en el grupo de cerdos no calostrados/pH1N1 (5.05) fue mayor que el observado en el grupo de cerdos no calostrados/swH1N1 (0.44) ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 17. Porcentajes de lesión pulmonar transformados obtenidos en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de los porcentajes de lesión transformados obtenidos en 9 cerdos por grupo.

Calostro	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1	
Si	1.40 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	0.88 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	<b>1.14<sup>b</sup></b>
No	<b>5.05<math>\pm</math>0.33<sup>a</sup></b>	<b>0.44<math>\pm</math>0.33<sup>b</sup></b>	<b>2.74<sup>a</sup></b>
Media	<b>3.23<sup>a</sup></b>	<b>0.66<sup>b</sup></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el porcentaje de lesión pulmonar a lo largo de los días posinoculación se observó que al día 6 (2.60) el porcentaje de lesión pulmonar fue mayor que el observado a los días 2 (1.91) y 14 (1.33) posinoculación ( $P < 0.05$ ).

Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el porcentaje de lesión pulmonar a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 18). En el caso del calostro se observó que los porcentajes de lesión pulmonar fueron similares en cerdos calostrados y no calostrados a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). En relación al el efecto del virus sobre el porcentaje de lesión pulmonar a lo largo de los días posinoculación se observó que los cerdos inoculados con el virus pH1N1 exhibieron mayor porcentaje de lesión al día 6 (4.64) posinoculación que a los 2 (2.57) y 14 (2.48) días posinoculación ( $P < 0.05$ ). En el caso de los cerdos inoculados con el virus swH1N1 los porcentajes de lesión pulmonar a lo largo de los días posinoculación fueron similares ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 18. Porcentajes de lesión pulmonar transformados obtenidos en cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  el error estándar de los porcentajes de lesión transformados obtenidos en 6 cerdos por grupo, por día posinoculación.

	Días posinoculación		
	2	6	14
Calostrados	1.31 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
No calostrados	2.51 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	3.37 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	2.36 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
pH1N1	<b>2.57<math>\pm</math>0.41<sup>b</sup></b>	<b>4.64<math>\pm</math>0.41<sup>a</sup></b>	<b>2.48<math>\pm</math>0.41<sup>b</sup></b>
swH1N1	1.24 $\pm$ 0.41 <sup>bc</sup>	0.56 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>	0.18 $\pm$ 0.41 <sup>c</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el porcentaje de lesión pulmonar en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (3.23) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.66). Siendo los grupos inoculados con el virus pH1N1 los que exhibieron un mayor porcentaje de lesión pulmonar. Se observó que el calostro tuvo efecto protector contra los dos virus, lo que confirma la reacción serológica cruzada observada con el uso de inhibición de la hemaglutinación.

#### **4.8. Resultados de la evaluación microscópica realizada en diferentes tejidos provenientes de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1**

Se evaluaron secciones de glándula salival, estómago, duodeno, yeyuno, ciego, colon, recto, páncreas, riñón, ovario, oviducto, testículo, encéfalo, médula espinal, músculo cardíaco, músculo diafragmático y músculo esquelético (regiones del lomo y pierna) en las que no se observaron cambios significativos. En las secciones histológicas de cornete nasal, tráquea, pulmón, tonsila palatina, linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e

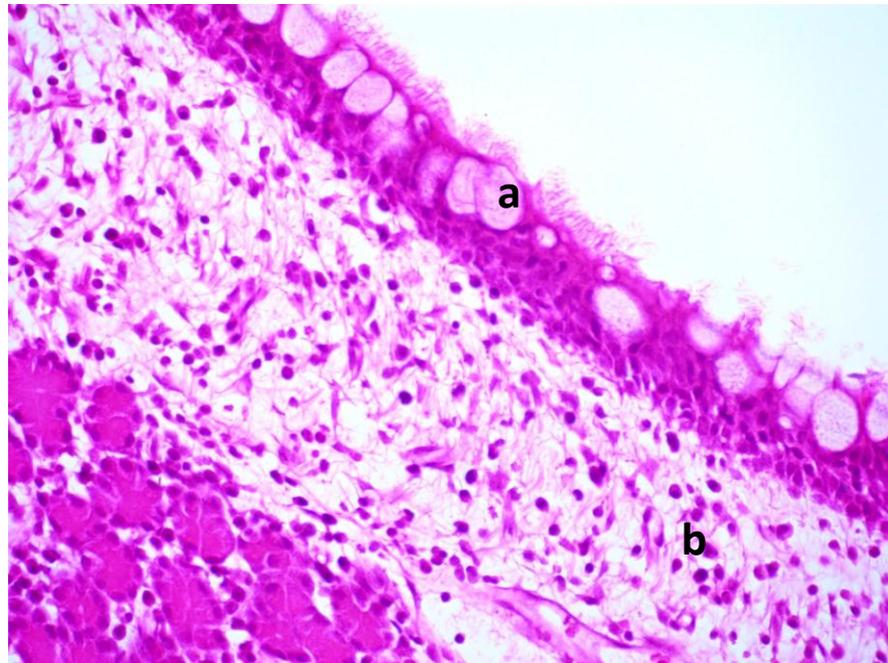
inguinal), párpado, timo, bazo, hígado, íleon y vejiga urinaria se evaluaron una serie de lesiones que fueron descritas en la sección de metodología, en esta sección se presentan los resultados de la evaluación estadística realizada con los datos transformados de los valores que se asignaron a las lesiones según el grado de afectación de los tejidos.

#### **4.8.1. Cornete nasal**

Se evaluaron dos grupos de lesiones en el cornete nasal lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas (Cuadro 19). Cuando se evaluaron las lesiones necróticas e inflamatorias se observó que el grado de afectación por este tipo de lesiones en cerdos calostrados (0.92) fue mayor que en los no calostrados (-0.92) ( $P < 0.05$ ); en relación a las lesiones hiperplásicas el grado de afectación en cerdos calostrados (0.01) y no calostrados (-0.01) fue similar ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se comparó el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias pero agrupando a los cerdos como inoculados con el virus pH1N1 (0.29) e inoculados con el virus swH1N1 (-0.29) el grado de afectación fue similar ( $P \geq 0.05$ ); en el caso de las lesiones hiperplásicas se observó que el grado de afectación fue mayor en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (1.04) (Figura 12) que el observado en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (-1.04) ( $P < 0.05$ ).

Se evaluó la interacción del calostro con el virus (Cuadro 19) y se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas fue similar en los cuatro grupos evaluados ( $P \geq 0.05$ ).

Figura 12. Fotomicrografía de cornete nasal de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 6 DPI. Se observa hiperplasia de células calciformes (a) moderada e infiltrado inflamatorio (b) en la submucosa leve (H&E).



Cuadro 19. Resultados de la evaluación microscópica realizada en cornete nasal de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas según el grado de afectación del cornete nasal, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Calostro	Lesiones necróticas e inflamatorias			Lesiones hiperplásicas		
	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	1.40 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	<b>0.92<sup>a</sup></b>	-0.81 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>
No	-0.81 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	-1.03 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	<b>-0.92<sup>b</sup></b>	-1.27 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	-0.01 <sup>a</sup>
Media	0.29 <sup>a</sup>	-0.29 <sup>a</sup>		<b>-1.04<sup>b</sup></b>	<b>1.04<sup>a</sup></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

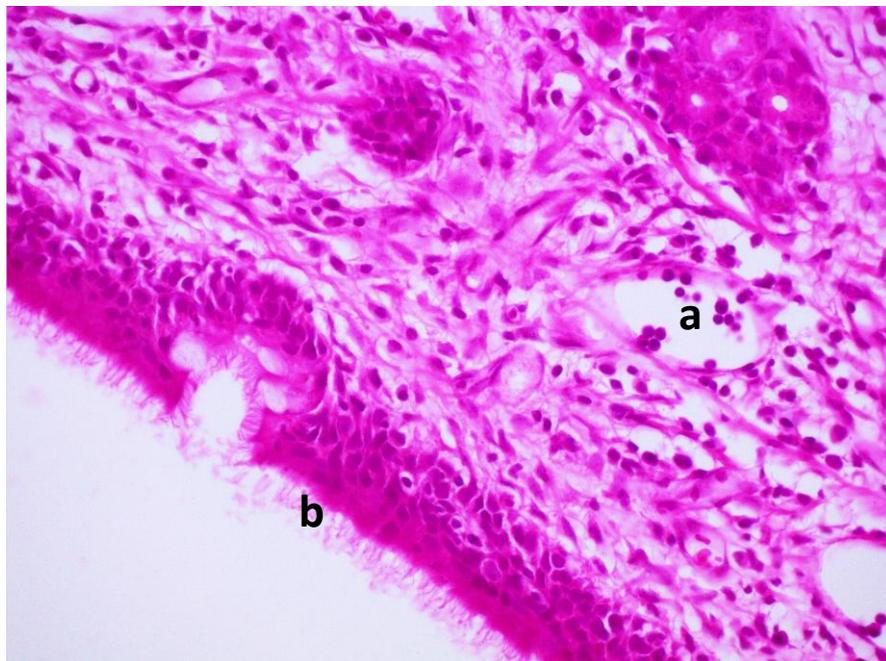
Se evaluó el grado de afectación por tipo de lesión en el cornete nasal a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 20) y se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias fue mayor a los 2 (0.73) días posinoculación (Figura 13) que a los 14 (-0.86) días posinoculación ( $P < 0.05$ ). En el caso de las lesiones hiperplásicas el grado de afectación fue similar a largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 20. Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en el cornete nasal a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas según el grado de afectación del cornete nasal, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Tipo de lesión	Días posinoculación		
	2	6	14
Necróticas e inflamatorias	<b>0.73<sup>a</sup></b>	0.12 <sup>ab</sup>	<b>-0.86<sup>b</sup></b>
Hiperplásicas	-0.32 <sup>a</sup>	0.37 <sup>a</sup>	-0.05 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Figura 13. Fotomicrografía de cornete nasal de cerdo, calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 DPI. Se observa infiltrado inflamatorio intravascular y perivascular (a) en la submucosa y pérdida de cilios leve (b) (H&E).



Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas observadas en el cornete nasal a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 21) y se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas fue similar en cerdos calostrados, no calostrados, inoculados con el virus pH1N1 e inoculados con el virus swH1N1 ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 21. Resultados de la evaluación microscópica realizada en cornete nasal de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas según el grado de afectación del cornete nasal, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Lesiones necróticas e inflamatorias			Lesiones hiperplásicas		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	2.12 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-0.26 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-0.36 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.29 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
No calostrados	-0.65 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-0.65 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-1.47 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-0.28 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
pH1N1	0.68 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-0.51 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-1.09 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.82 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-1.21 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
swH1N1	0.79 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-0.45 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	-1.22 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por lesiones hiperplásicas en el cornete nasal en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (-1.04) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (1.04). Siendo los grupos inoculados con el virus swH1N1 los que exhibieron un mayor grado de lesiones hiperplásicas. En relación a las lesiones necróticas e inflamatorias no existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por este tipo de lesiones en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.29) sea diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (-0.29).

#### 4.8.2. Tráquea

Se evaluaron dos grupos de lesiones en tráquea lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas (Cuadro 22). Cuando se evaluaron las lesiones necróticas e inflamatorias se observó que el grado de afectación por este tipo de lesiones en cerdos calostrados (0.34) fue mayor que en los cerdos no calostrados (-0.34) ( $P < 0.05$ ); en relación a las lesiones hiperplásicas el

grado de afectación en cerdos calostrados (0.15) y no calostrados (-0.15) fue similar ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se comparó el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias pero agrupando a los cerdos como inoculados con el virus pH1N1 (0.31) e inoculados con el virus swH1N1 (-0.31) el grado de afectación fue mayor en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 ( $P < 0.05$ ) y en el caso de las lesiones hiperplásicas se observó que el grado de afectación fue mayor en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (0.84) que el observado en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (-0.84) ( $P < 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con el virus y se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas fue similar en los cuatro grupos evaluados ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 22. Resultados de la evaluación microscópica realizada en tráquea de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas según el grado de afectación de la tráquea, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Calostro	Lesiones necróticas e inflamatorias			Lesiones hiperplásicas		
	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	0.55 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	<b>0.34<sup>a</sup></b>	-0.74 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>
No	0.07 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	-0.76 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	<b>-0.34<sup>b</sup></b>	-0.94 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	-0.15 <sup>a</sup>
Media	<b>0.31<sup>a</sup></b>	<b>-0.31<sup>b</sup></b>		<b>-0.84<sup>b</sup></b>	<b>0.84<sup>a</sup></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el grado de afectación por tipo de lesión en tráquea a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 23) y se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias fue mayor a los 6 (0.24) y 14 (0.37) días posinoculación que a los 2 (-0.61) días posinoculación ( $P < 0.05$ ). En el caso de las lesiones hiperplásicas el grado de afectación fue similar a largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 23. Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en la tráquea a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas según el grado de afectación de la tráquea, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Tipo de lesiones	Días posinoculación		
	2	6	14
Necróticas e inflamatorias	<b>-0.61<sup>b</sup></b>	<b>0.24<sup>a</sup></b>	<b>0.37<sup>a</sup></b>
Hiperplásicas	-0.20 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas observadas en la tráquea a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 24). Se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias fue similar en cerdos calostrados y no calostrados a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). En el caso de las lesiones hiperplásicas se observó que el grado de afectación en cerdos calostrados al día 14 (0.78) posinoculación (Figura 14) fue mayor que el observado al día 2 (-0.67) posinoculación ( $P < 0.05$ ), mientras que el grado de afectación por este tipo de lesiones en cerdos no calostrados fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se evaluó el efecto del virus en el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias se observó que en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 al día 6 (1.04) posinoculación (Figura 15) el grado de afectación fue mayor que el observado a los 2 (-0.47) días posinoculación ( $P < 0.05$ ); mientras que en cerdos inoculados con el virus swH1N1 el grado de afectación fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). En caso de las lesiones hiperplásicas se observó que el grado de afectación en cerdos inoculados con

el virus pH1N1 y con el virus swH1N1 fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 24. Resultados de la evaluación microscópica realizada en la tráquea de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones hiperplásicas según el grado de afectación de la tráquea, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Lesiones necróticas e inflamatorias			Lesiones hiperplásicas		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	0.05 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	<b>-0.67<math>\pm</math>0.44<sup>b</sup></b>	0.35 $\pm$ 0.44 <sup>ab</sup>	<b>0.78<math>\pm</math>0.44<sup>a</sup></b>
No calostrados	-1.28 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.44 <sup>ab</sup>	0.01 $\pm$ 0.44 <sup>ab</sup>	-0.74 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>
pH1N1	<b>-0.47<math>\pm</math>0.29<sup>b</sup></b>	<b>1.04<math>\pm</math>0.29<sup>a</sup></b>	0.37 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	-1.15 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	-0.81 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	-0.56 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>
swH1N1	-0.75 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	-0.56 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	0.74 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	0.60 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Figura 14. Fotomicrografía de tráquea de cerdo, calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 14 DPI. Se observa pérdida de cilios severa (a) e hiperplasia epitelial leve (b) (H&E).

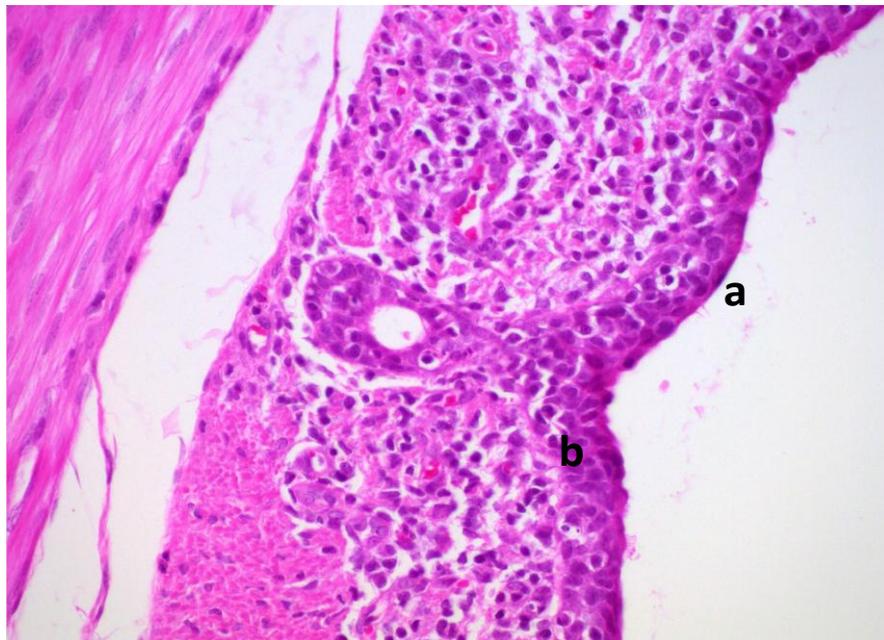
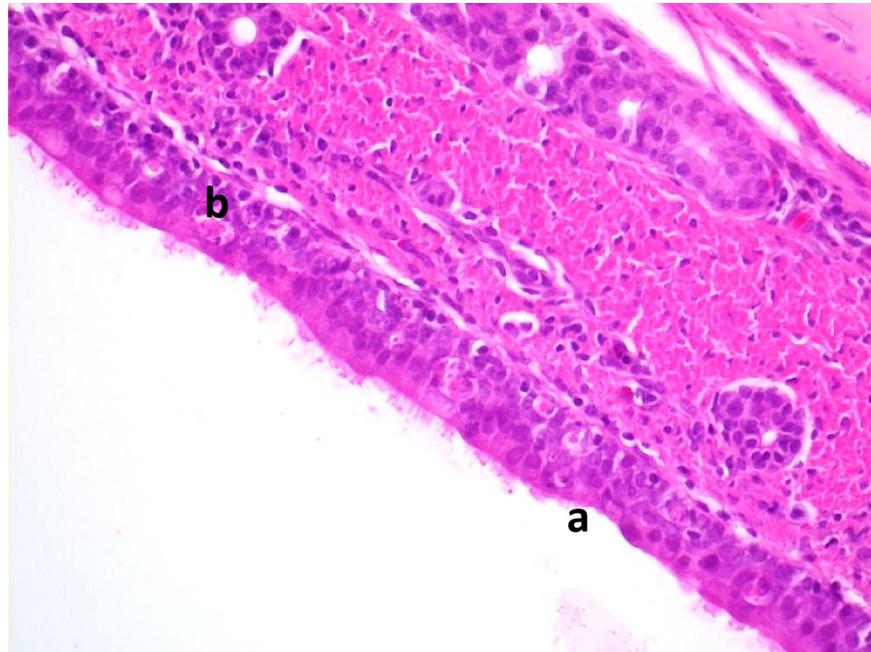


Figura 15. Fotomicrografía de tráquea de cerdo, calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI. Se observa pérdida de cilios moderada (a) y necrosis epitelial leve (b) (H&E).



Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias en la tráquea de los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.31) es diferente al observado en los inoculados con el virus swH1N1 (-0.31). Siendo los grupos inoculados con el virus pH1N1 los que exhibieron un mayor grado de lesiones necróticas e inflamatorias. En relación a las lesiones hiperplásicas se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por este tipo de lesiones en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (-0.84) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.84). Siendo los grupos inoculados con el virus swH1N1 los que exhibieron un mayor grado de lesiones hiperplásicas.

### 4.8.3. Pulmón

Se evaluaron dos grupos de lesiones en pulmón alteraciones circulatorias e inflamatorias y lesiones necróticas y regenerativas (Cuadro 25). Cuando se evaluaron las alteraciones circulatorias e inflamatorias se observó que el grado de afectación por este tipo de alteraciones en cerdos no calostrados (1.37) fue mayor que en los cerdos calostrados (-1.37) ( $P < 0.05$ ); en relación a las lesiones necróticas y regenerativas el grado de afectación en cerdos no calostrados (0.46) fue mayor que en los cerdos calostrados (-0.46) ( $P < 0.05$ ). Cuando se comparó el grado de afectación por alteraciones circulatorias e inflamatorias pero agrupando a los cerdos como inoculados con el virus pH1N1 (1.31) e inoculados con el virus swH1N1 (-1.31) el grado de afectación fue mayor en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 ( $P < 0.05$ ); en el caso de las lesiones necróticas y regenerativas se observó que el grado de afectación fue mayor en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (0.52) que el observado en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (-0.52) ( $P < 0.05$ ). Al evaluar la interacción entre el calostro y el virus se observó que el grado de afectación por alteraciones circulatorias e inflamatorias fue mayor en el grupo de cerdos no calostrados/pH1N1 (3.24) y en el caso de las lesiones necróticas y regenerativas el grado de afectación fue mayor en el grupo de cerdos no calostrados/swH1N1 (1.45) ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 25. Resultados de la evaluación microscópica realizada en pulmón de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las alteraciones circulatorias e inflamatorias y lesiones necróticas y regenerativas según el grado de afectación del pulmón, obtenidos de 45 secciones histológicas por grupo.

Alteraciones circulatorias e inflamatorias				Lesiones necróticas y regenerativas		
Calostro	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	-0.61 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	-2.14 $\pm$ 0.30 <sup>c</sup>	<b>-1.37<sup>b</sup></b>	-0.53 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	-0.40 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	<b>-0.46<sup>b</sup></b>
No	<b>3.24<math>\pm</math>0.30<sup>a</sup></b>	-0.49 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	<b>1.37<sup>a</sup></b>	-0.52 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	<b>1.45<math>\pm</math>0.17<sup>a</sup></b>	<b>0.46<sup>a</sup></b>
Media	<b>1.31<sup>a</sup></b>	<b>-1.31<sup>b</sup></b>		<b>-0.52<sup>b</sup></b>	<b>0.52<sup>a</sup></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

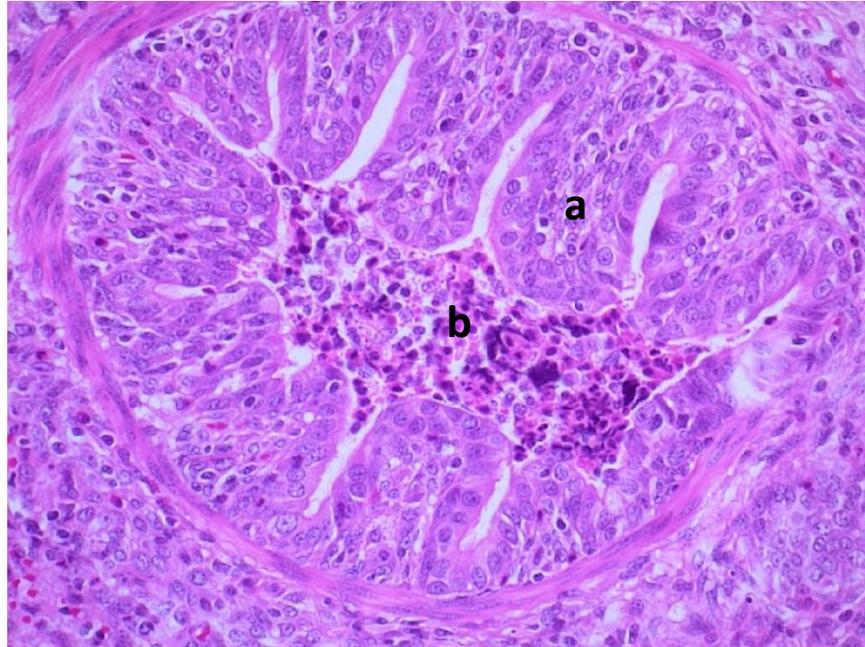
Se evaluó el grado de afectación por tipo de lesión en pulmón a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 26) y se observó que el grado de afectación por alteraciones circulatorias e inflamatorias fue mayor a los 2 (0.34) y 6 (0.79) días posinoculación que a los 14 (-1.13) días posinoculación (P<0.05). En el caso de las lesiones necróticas y regenerativas al día 2 (0.47) posinoculación (Figura 16) se observó el mayor grado de afectación por este tipo de lesiones (P $\geq$ 0.05).

Cuadro 26. Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en el pulmón a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores transformados que se asignaron a las alteraciones circulatorias e inflamatorias y lesiones necróticas y regenerativas según el grado de afectación del pulmón, obtenidos de 60 secciones histológicas por día posinoculación.

Tipo de lesiones	Días posinoculación		
	2	6	14
Alteraciones circulatorias e inflamatorias	<b>0.34<sup>a</sup></b>	<b>0.79<sup>a</sup></b>	<b>-1.13<sup>b</sup></b>
Necróticas y regenerativas	<b>0.47<sup>a</sup></b>	-0.23 <sup>b</sup>	-0.23 <sup>b</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Figura 16. Fotomicrografía de pulmón de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 DPI. Se observa hiperplasia del epitelio bronquiolar moderada (a), restos de células epiteliales e inflamatorias necróticas y degeneradas en la luz alveolar (b) (H&E).



Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por alteraciones circulatorias e inflamatorias y lesiones necróticas y regenerativas observadas en el pulmón a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 27). Se observó que el grado de afectación por alteraciones circulatorias e inflamatorias y lesiones necróticas y regenerativas fue similar en cerdos calostrados y no calostrados a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se evaluó el efecto del virus en el grado de afectación por alteraciones circulatorias e inflamatorias se observó que en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 a los días 2 (1.64) y 6 (3.01) posinoculación (Figura 17) el grado de afectación fue mayor que a los 14 (-0.70) días posinoculación ( $P < 0.05$ ); mientras que en cerdos inoculados con el virus swH1N1 el grado de afectación fue similar a lo largo de los días posinoculación

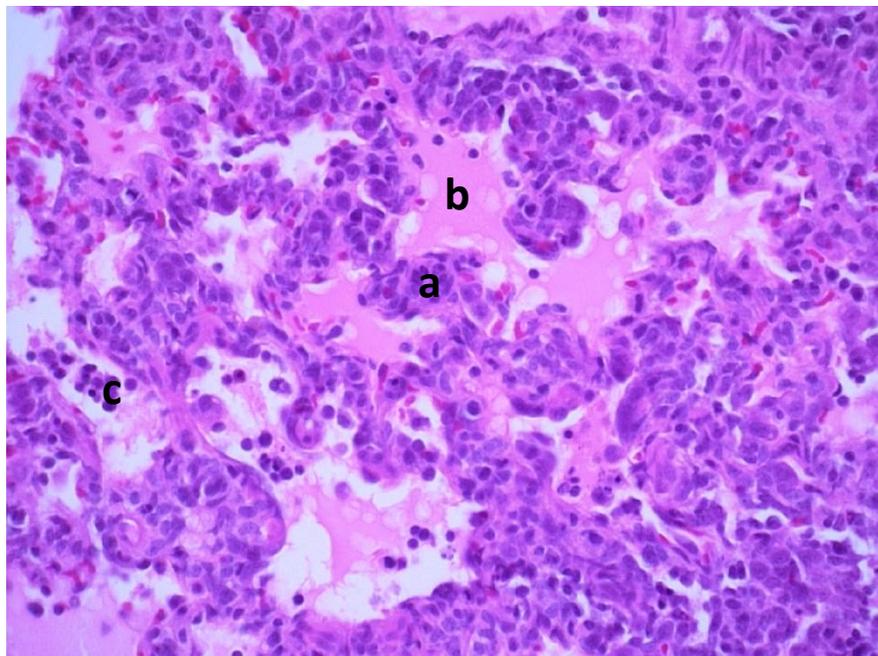
( $P \geq 0.05$ ). En caso de las lesiones necróticas y regenerativas se observó que el grado de afectación en cerdos inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1 fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 27. Resultados de la evaluación microscópica realizada en el pulmón de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las alteraciones circulatorias e inflamatorias y lesiones necróticas y regenerativas según el grado de afectación del pulmón, obtenidos de 30 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Alteraciones circulatorias e inflamatorias			Lesiones necróticas y regenerativas		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	-1.34 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.70 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-2.08 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.18 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	-0.62 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	-0.58 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
No calostrados	2.02 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	2.29 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.18 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	1.12 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
pH1N1	<b>1.64<math>\pm</math>0.37<sup>a</sup></b>	<b>3.01<math>\pm</math>0.37<sup>a</sup></b>	<b>-0.70<math>\pm</math>0.37<sup>b</sup></b>	0.08 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	-1.01 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	-0.65 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
swH1N1	-0.96 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	-1.42 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	-1.57 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	0.85 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Figura 17. Fotomicrografía de pulmón de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI. Se observa engrosamiento de septos alveolares debido a la hiperplasia de neumocitos tipo II (a), en el espacio alveolar se aprecia edema (b) e infiltrado inflamatorio mononuclear (c) (H&E).



Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por alteraciones circulatorias

e inflamatorias en el pulmón de los grupos inoculados con el virus pH1N1 (1.31) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (-1.31). Siendo los grupos inoculados con el virus pH1N1 los que exhibieron un mayor grado de alteraciones circulatorias e inflamatorias. En relación a las lesiones necróticas y regenerativas se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por este tipo de lesiones en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (-0.52) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.52). Siendo los grupos inoculados con el virus swH1N1 los que exhibieron un mayor grado de lesiones necróticas y regenerativas.

#### **4.8.4. Tonsila**

Se evaluaron dos grupos de lesiones en tonsila lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones atróficas e hiperplásicas (Cuadro 28). Cuando se evaluaron las lesiones necróticas e inflamatorias se observó que el grado de afectación por este tipo de lesiones fue similar en cerdos calostrados (0.22) y no calostrados (-0.22) ( $P \geq 0.05$ ); en relación a las lesiones atróficas e hiperplásicas se observó que el grado de afectación en cerdos calostrados (-0.31) y no calostrados (0.31) fue similar ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se evaluó el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias pero agrupando a los cerdos como inoculados con el virus pH1N1 (0.09) e inoculados con el virus swH1N1 (-0.09) el grado de afectación fue similar ( $P \geq 0.05$ ). En el caso de las lesiones atróficas e hiperplásicas el grado de afectación en cerdos inoculados con el virus pH1N1 (-0.14) fue similar al observado en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (0.14) ( $P \geq 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con

el virus y se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias y por lesiones atróficas e hiperplásicas fue similar en los cuatro grupos evaluados ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 28. Resultados de la evaluación microscópica realizada en tonsila palatina de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones atróficas e hiperplásicas según el grado de afectación de la tonsila palatina, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Lesiones necróticas e inflamatorias				Lesiones atróficas e hiperplásicas		
Calostro	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	0.52 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.08 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	-0.01 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup>	-0.61 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	-0.31 <sup>a</sup>
No	-0.33 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.10 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.22 <sup>a</sup>	-0.28 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup>	0.90 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>
Media	0.09 <sup>a</sup>	-0.09 <sup>a</sup>		-0.14 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

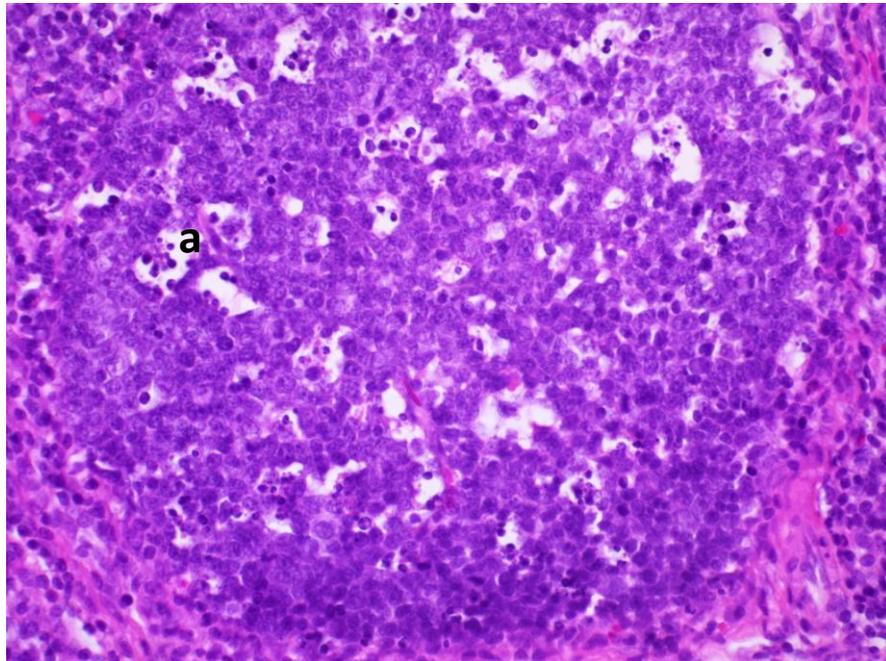
Se evaluó el grado de afectación por tipo de lesión en la tonsila palatina a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 29) y se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). En el caso de las lesiones linfoides se observó que al día 6 (0.56) posinoculación (Figura 18) el grado de afectación fue mayor que a los 14 (-0.54) días posinoculación ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 29. Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en la tonsila palatina a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones atróficas e hiperplásicas según el grado de afectación de la tonsila palatina, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Tipo de lesiones	Días posinoculación		
	2	6	14
Necróticas e inflamatorias	-0.56 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>
Atróficas e hiperplásicas	-0.02 <sup>ab</sup>	<b>0.56<sup>a</sup></b>	<b>-0.54<sup>b</sup></b>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

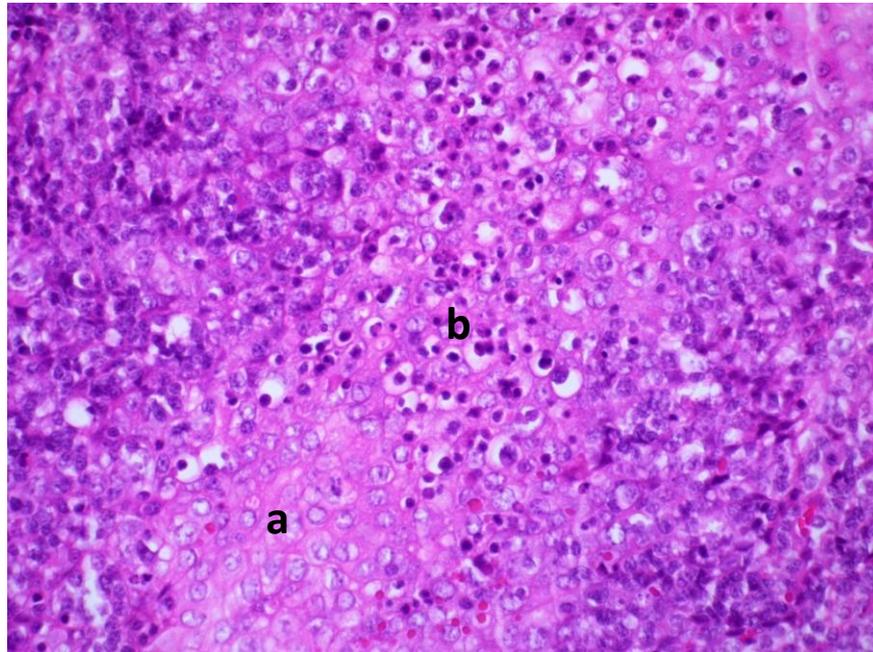
Figura 18. Fotomicrografía de tonsila de cerdo, calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 6 DPI. Se observa un folículo linfoide en donde se aprecian células linfoides que exhiben disminución de tamaño con condensación y fragmentación de la cromatina (a) (H&E).



Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones atróficas e hiperplásicas observadas en la tonsila palatina a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 30). Se observó que el grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias fue similar en cerdos calostrados y no calostrados a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). En relación a las lesiones atróficas e hiperplásicas se encontró que el grado de afectación por este tipo de lesiones fue similar en los cerdos calostrados a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, en los cerdos no calostrados se encontraron diferencias en el grado de afectación entre los 6 (1.55) y 14 (-0.56) días posinoculación, siendo el día 6 posinoculación cuando se observó el mayor grado de lesiones atróficas e hiperplásicas ( $P < 0.05$ ). Cuando se evaluó el efecto del virus en el

grado de afectación por lesiones necróticas e inflamatorias se observó que en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 al día 6 (0.88) posinoculación (Figura 19) el grado de afectación fue mayor que al día 2 (-1.38) posinoculación ( $P < 0.05$ ); mientras que en cerdos inoculados con el virus swH1N1 el grado de afectación con este tipo de lesiones fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). En el caso de las lesiones atróficas e hiperplásicas se observó que los cerdos inoculados con el virus swH1N1 exhibieron un mayor grado de afectación al día 6 (1.27) posinoculación que al día 14 (-0.51) posinoculación ( $P < 0.05$ ); mientras que en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 el grado de afectación con este tipo de lesiones fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Figura 19. Fotomicrografía de tonsila de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI. Se observa degeneración vacuolar leve (a) y algunas células epiteliales exhiben disminución de tamaño con condensación y fragmentación de la cromatina (b) (H&E).



Cuadro 30. Resultados de la evaluación microscópica realizada en la tonsila palatina de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las lesiones necróticas e inflamatorias y lesiones atróficas e hiperplásicas según el grado de afectación de la tonsila palatina, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Lesiones necróticas e inflamatorias			Lesiones atróficas e hiperplásicas		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	-0.14 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.40 <sup>ab</sup>	-0.43 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	-0.52 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>
No calostrados	-0.98 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	-0.06 $\pm$ 0.40 <sup>ab</sup>	<b>1.55<math>\pm</math>0.40<sup>a</sup></b>	<b>-0.56<math>\pm</math>0.40<sup>b</sup></b>
pH1N1	<b>-1.38<math>\pm</math>0.49<sup>b</sup></b>	<b>0.88<math>\pm</math>0.49<sup>a</sup></b>	0.79 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	0.28 $\pm$ 0.40 <sup>ab</sup>	-0.15 $\pm$ 0.40 <sup>ab</sup>	-0.56 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>
swH1N1	0.25 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	-0.28 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	-0.26 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	-0.32 $\pm$ 0.40 <sup>ab</sup>	<b>1.27<math>\pm</math>0.40<sup>a</sup></b>	<b>-0.51<math>\pm</math>0.40<sup>b</sup></b>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Considerando los resultados obtenidos se concluye que no existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por lesiones necróticas y lesiones atróficas e hiperplásicas observado tonsila en los grupos inoculados con el virus pH1N1 sea diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1.

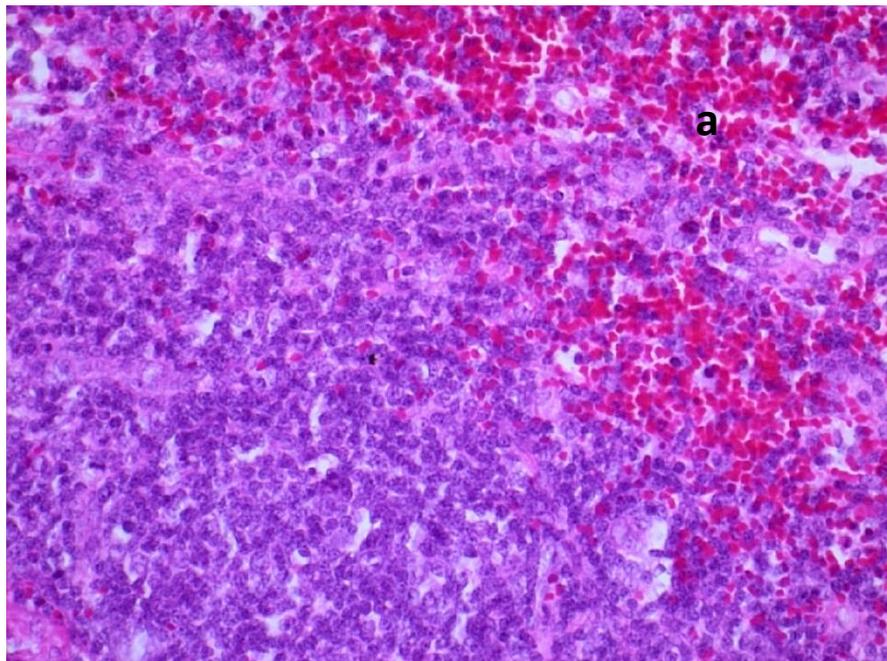
#### 4.8.5. Linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal)

Se evaluaron dos grupos de lesiones en linfonodos alteraciones circulatorias y lesiones linfoides (Cuadro 31). Cuando se evaluaron las alteraciones circulatorias se observó que el grado de afectación por este tipo de alteraciones en cerdos calostrados y no calostrados fue similar en los cuatro linfonodos evaluados (P $\geq$ 0.05); en relación a las lesiones linfoides en los linfonodos traqueobronquial, mesentérico e inguinal este tipo de lesiones fueron similares en cerdos calostrados y no calostrado (P $\geq$ 0.05); sin embargo, en el linfonodo submandibular el grado de afectación por lesiones linfoides fue mayor en cerdos calostrados (0.43) que en cerdos no calostrados (-0.43) (P<0.05).

Cuando se comparó el grado de afectación por alteraciones circulatorias pero agrupando a los cerdos como inoculados con el virus pH1N1 e inoculados con el virus swH1N1 se observó que el grado de afectación por este tipo de alteraciones fue similar en los linfonodos submandibular, mesentérico e inguinal; sin embargo, en el linfonodo traqueobronquial se observó que en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (0.75) (Figura 20) el grado de afectación por alteraciones circulatorias fue mayor que el observado en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (-0.75) ( $P < 0.05$ ). En relación a las lesiones linfoides el grado de afectación fue similar con los dos virus en los linfonodos traqueobronquial, mesentérico e inguinal ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, en el linfonodo submandibular se observó que los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (0.43) exhibieron mayor grado de afectación que los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (-0.43) ( $P < 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con el virus y se observó que el grado de afectación por alteraciones circulatorias en los cerdos calostrados/pH1N1 fue similar al observado en los cerdos calostrados/swH1N1 en los cuatro linfonodos evaluados ( $P \geq 0.05$ ); en el caso de los cerdos no calostrados/swH1N1 el grado de afectación por alteraciones circulatorias fue mayor que el observado en los cerdos no calostrados/pH1N1 en los linfonodos submandibular (swH1N1 1.11 y pH1N1 -0.88) y traqueobronquial (swH1N1 1.27 y pH1N1 -0.95) ( $P < 0.05$ ), por otro lado, en los linfonodos mesentérico e inguinal el grado de afectación por alteraciones circulatorias en cerdos no calostrados/pH1N1 y no calostrados/swH1N1 fue similar ( $P \geq 0.05$ ). En el caso de las lesiones linfoides se observó que el grado de afectación por este tipo de lesiones en los cerdos calostrados/pH1N1 fue

similar al observado en los cerdos calostrados/swH1N1 en los cuatro linfonodos evaluados ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, en los cerdos no calostrados/swH1N1 el grado de afectación por lesiones linfoides fue mayor que el observado en los cerdos no calostrados/pH1N1 en los linfonodos mesentérico (swH1N1 1.20 y pH1N1 -1.05) e inguinal (swH1N1 0.86 y pH1N1 -0.66) ( $P < 0.05$ ), en el caso de los linfonodos submandibular y traqueobronquial el grado de afectación por lesiones linfoides en cerdos no calostrados/pH1N1 y no calostrados/swH1N1 fue similar ( $P \geq 0.05$ ).

Figura 20. Fotomicrografía de linfonodo traqueobronquial de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 DPI. Se observa congestión y hemorragia cortical moderada (a) (H&E).



Cuadro 31. Resultados de la evaluación microscópica realizada en linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las alteraciones circulatorias y lesiones linfoides según el grado de afectación de los linfonodos, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo y por linfonodo.

Linfonodo submandibular						
Alteraciones circulatorias				Lesiones linfoides		
Calostro	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	0.19 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup>	-0.42 $\pm$ 0.42 <sup>ab</sup>	-0.11 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	-0.04 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	<b>0.43<sup>a</sup></b>
No	<b>-0.88<math>\pm</math>0.42<sup>b</sup></b>	<b>1.11<math>\pm</math>0.42<sup>a</sup></b>	0.11 <sup>a</sup>	-0.04 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	-0.82 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	<b>-0.43<sup>b</sup></b>
Media	-0.34 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>		<b>0.43<sup>a</sup></b>	<b>-0.43<sup>b</sup></b>	
Linfonodo traqueobronquial						
Alteraciones circulatorias				Lesiones linfoides		
Calostro	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	-0.55 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	0.23 $\pm$ 0.35 <sup>ab</sup>	-0.16 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>	-0.44 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	-0.09 <sup>a</sup>
No	<b>-0.95<math>\pm</math>0.35<sup>b</sup></b>	<b>1.27<math>\pm</math>0.35<sup>a</sup></b>	0.16 <sup>a</sup>	-0.22 $\pm$ 0.28 <sup>ab</sup>	0.41 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>
Media	<b>-0.75<sup>b</sup></b>	<b>0.75<sup>a</sup></b>		0.02 <sup>a</sup>	-0.02 <sup>a</sup>	
Linfonodo mesentérico						
Alteraciones circulatorias				Lesiones linfoides		
Calostro	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	-0.14 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	-0.06 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.46 <sup>ab</sup>	-0.86 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	-0.07 <sup>a</sup>
No	0.08 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	<b>-1.05<math>\pm</math>0.46<sup>b</sup></b>	<b>1.20<math>\pm</math>0.46<sup>a</sup></b>	0.07 <sup>a</sup>
Media	-0.03 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>		-0.17 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	
Linfonodo inguinal						
Alteraciones circulatorias				Lesiones linfoides		
Calostro	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	0.59 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	-0.30 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup>	-0.48 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup>	-0.10 <sup>a</sup>
No	-0.12 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	-0.16 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	-0.14 <sup>a</sup>	<b>-0.66<math>\pm</math>0.37<sup>b</sup></b>	<b>0.86<math>\pm</math>0.37<sup>a</sup></b>	0.10 <sup>a</sup>
Media	0.23 <sup>a</sup>	-0.23 <sup>a</sup>		-0.19 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Se evaluó el grado de afectación por tipo de lesión en los linfonodos a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 32) y se observó que el grado de afectación por alteraciones circulatorias fue similar a lo largo de los días posinoculación en los cuatro linfonodos evaluados (P $\geq$ 0.05). En el caso de las lesiones linfoides se observó que el grado de afectación fue similar en los linfonodos submandibular y mesentérico a lo largo de los días posinoculación;

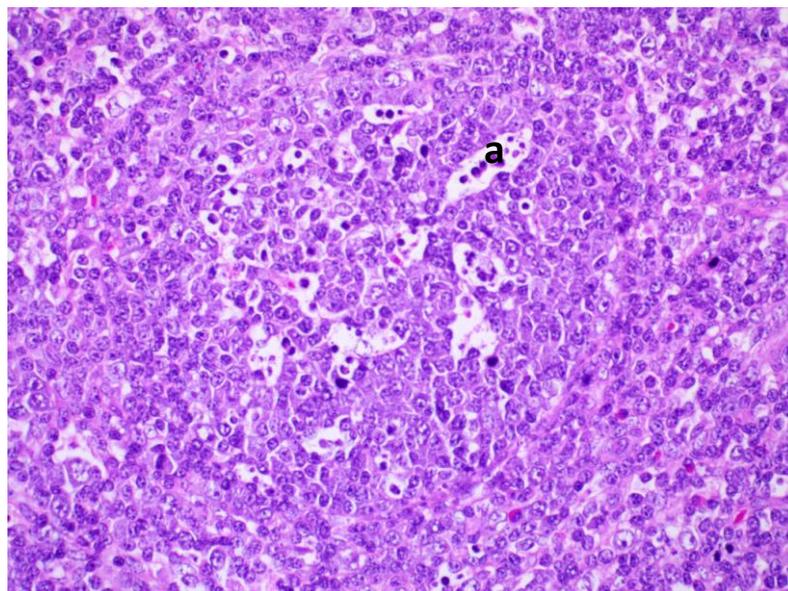
mientras que en los linfonodos traqueobronquial (0.60) e inguinal (0.39) el grado de afectación fue mayor al día 6 posinoculación (Figura 21) que el observado al día 2 ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 32. Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores transformados que se asignaron a las alteraciones circulatorias y lesiones linfoides según el grado de afectación de los linfonodos, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación y por linfonodo.

<b>Linfonodo submandibular</b>			
<b>Tipo de lesiones</b>	<b>Días posinoculación</b>		
	2	6	14
Alteraciones circulatorias	0.01 <sup>a</sup>	-0.10 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>
Linfoides	0.29 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	-0.35 <sup>a</sup>
<b>Linfonodo traqueobronquial</b>			
Alteraciones circulatorias	0.10 <sup>a</sup>	-0.34 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>
Linfoides	<b>-0.70<sup>b</sup></b>	<b>0.60<sup>a</sup></b>	0.10 <sup>ab</sup>
<b>Linfonodo mesentérico</b>			
Alteraciones circulatorias	-0.30 <sup>a</sup>	-0.09 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>
Linfoides	-0.23 <sup>a</sup>	-0.28 <sup>a</sup>	0.51 <sup>a</sup>
<b>Linfonodo inguinal</b>			
Alteraciones circulatorias	-0.39 <sup>a</sup>	-0.20 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>
Linfoides	<b>-0.76<sup>b</sup></b>	<b>0.39<sup>a</sup></b>	0.36 <sup>ab</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Figura 21. Fotomicrografía de linfonodo traqueobronquial de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 6 DPI. Se observa un folículo linfoide en donde se aprecian células linfoides que exhiben disminución de tamaño con condensación y fragmentación de la cromatina (a) (H&E).



Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por alteraciones circulatorias y lesiones linfoides observadas en los linfonodos a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 33). Se observó que el grado de afectación por alteraciones circulatorias fue similar en cerdos calostrados y no calostrados a lo largo de los días posinoculación en los cuatro linfonodos evaluados ( $P \geq 0.05$ ). En el caso de las lesiones linfoides se observó que en los linfonodos submandibular, mesentérico e inguinal el grado de afectación en cerdos calostrados fue similar al observado en los cerdos no calostrados a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). En el caso del linfonodo traqueobronquial aunque el grado de afectación en los cerdos calostrados fue similar a lo largo de los días posinoculación, en los cerdos no calostrados se observó que el día 14 (0.76) posinoculación exhibió un mayor grado de afectación que el día 2 (-0.95) posinoculación ( $P < 0.05$ ). Cuando se evaluó el efecto del virus en el grado de afectación por alteraciones circulatorias y lesiones linfoides a lo largo de los días posinoculación se observó que el grado de afectación de los cerdos inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1 fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 33. Resultados de la evaluación microscópica realizada en linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal) de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores transformados que se asignaron a las alteraciones circulatorias y lesiones linfoides según el grado de afectación de los linfonodos, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

Linfonodo submandibular						
	Alteraciones circulatorias			Lesiones linfoides		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	-0.16 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	-0.67 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.23 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
No calostrados	0.18 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	-0.30 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	-0.43 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.38 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.48 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
pH1N1	0.03 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	-0.34 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	-0.72 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
swH1N1	-0.01 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	-0.26 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.31 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	-0.72 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
Linfonodo traqueobronquial						
	Alteraciones circulatorias			Lesiones linfoides		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	-0.11 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	-0.47 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	-0.45 $\pm$ 0.34 <sup>ab</sup>	0.73 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	-0.55 $\pm$ 0.34 <sup>ab</sup>
No calostrados	0.30 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	-0.22 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	<b>-0.95<math>\pm</math>0.34<sup>b</sup></b>	0.47 $\pm$ 0.34 <sup>ab</sup>	<b>0.76<math>\pm</math>0.34<sup>a</sup></b>
pH1N1	-0.72 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	-1.03 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	-0.50 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	-0.88 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	-0.07 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>
swH1N1	0.92 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	-0.53 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>
Linfonodo mesentérico						
	Alteraciones circulatorias			Lesiones linfoides		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	0.04 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.21 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.02 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.36 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	-0.03 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>
No calostrados	-0.64 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.09 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	-0.53 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>
pH1N1	-0.24 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.17 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	-0.62 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	-0.40 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>
swH1N1	-0.35 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	-0.16 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>
Linfonodo inguinal						
	Alteraciones circulatorias			Lesiones linfoides		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	-0.25 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	-0.31 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.99 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	-0.94 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
No calostrados	-0.52 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	-0.09 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	-0.57 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
pH1N1	-0.25 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	-0.58 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	-0.45 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>
swH1N1	-0.52 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	-0.46 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	-0.94 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa (P<0.05)

Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por lesiones linfoides en el linfonodo submandibular de los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.43) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (-0.43). Siendo los grupos inoculados con el virus pH1N1 los que exhibieron un mayor grado de lesiones linfoides en el linfonodo submandibular. En relación a los

linfonodos traqueobronquial, mesentérico e inguinal se concluye que no existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por lesiones linfoides en los grupos inoculados con el virus pH1N1 sea diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1.

En relación a las alteraciones circulatorias se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por este tipo de alteraciones en el linfonodo traqueobronquial de los grupos inoculados con el virus pH1N1 (-0.75) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.75). Siendo los grupos inoculados con el virus swH1N1 los que exhibieron un mayor grado de alteraciones circulatorias en el linfonodo traqueobronquial. En relación a los linfonodos submandibular, mesentérico e inguinal se concluye que no existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por alteraciones circulatorias en los grupos inoculados con el virus pH1N1 sea diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1.

#### **4.8.6. Párpado**

En el caso del párpado la única lesión encontrada fue la presencia de infiltrado inflamatorio perivascular en la conjuntiva palpebral (Cuadro 34) se observó que el grado de afectación por este tipo de lesión en los cerdos calostrados (0.38) fue similar a la observada en los cerdos no calostrados (0.16) ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, se encontraron diferencias entre los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (0.44) y los inoculados con el virus swH1N1 (0.11), siendo los inoculados con el virus pH1N1 (Figura 22) los que exhibieron

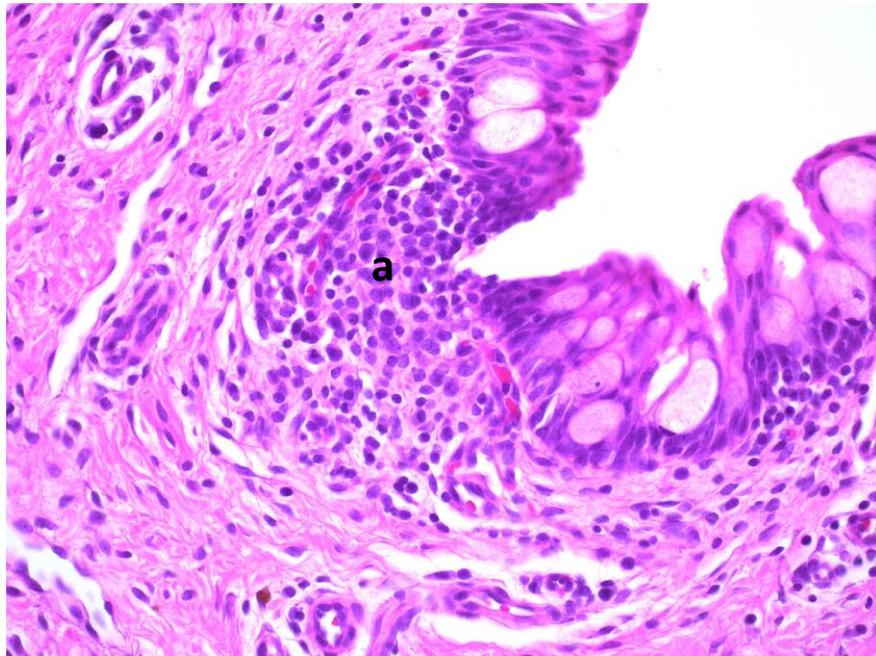
el mayor grado de afectación ( $P < 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con el virus y se observó que el grado de afectación por infiltrado inflamatorio perivascular fue similar en los cuatro grupos evaluados ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 34. Resultados de la evaluación microscópica realizada en párpado de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron al infiltrado inflamatorio perivascular según el grado de afectación del párpado, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Calostro	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1	
Si	$0.66 \pm 0.12^a$	$0.11 \pm 0.12^a$	$0.38^a$
No	$0.22 \pm 0.12^a$	$0.11 \pm 0.12^a$	$0.16^a$
Media	<b><math>0.44^a</math></b>	<b><math>0.11^b</math></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Figura 22. Fotomicrografía de párpado de cerdo, no calostrado, inoculado con virus pH1N1, 6 DPI. Se observa infiltrado inflamatorio perivascular linfocitario de leve a moderado (a) (H&E).



Se evaluó el grado de afectación por infiltrado inflamatorio perivascular en el párpado a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 35) y se observó

que al día 6 (0.50) posinoculación el grado de afectación fue mayor que a los 14 (0.08) días posinoculación ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 35. Resultados de la evaluación del grado de afectación por infiltrado inflamatorio perivascular en párpado a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores que se asignaron al infiltrado inflamatorio perivascular según el grado de afectación del párpado, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Días posinoculación		
2	6	14
0.25 <sup>ab</sup>	<b>0.50<sup>a</sup></b>	<b>0.08<sup>b</sup></b>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por infiltrado inflamatorio perivascular observado en el párpado a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 36). Se observó que el grado de afectación por infiltrado inflamatorio perivascular fue similar en cerdos calostrados, no calostrados, inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1 a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 36. Resultados de la evaluación microscópica realizada en párpado de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron al infiltrado inflamatorio perivascular según el grado de afectación del párpado, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Días posinoculación		
	2	6	14
Calostrados	0.50 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
No calostrados	0.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
pH1N1	0.50 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
swH1N1	0.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por infiltrado inflamatorio perivascular en párpado de los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.44) es

diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.11). Siendo los grupos inoculados con el virus pH1N1 los que exhibieron un mayor grado infiltrado inflamatorio perivascular.

#### **4.8.7. Timo**

Se evaluaron dos tipos de lesiones en timo necrosis/apoptosis linfoide y hemorragia (Cuadro 37). Cuando se evaluaron este tipo de lesiones en cerdos calostrados y no calostrados se observó que el grado de afectación fue similar ( $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, cuando se agruparon a los cerdos como inoculados con el virus pH1N1 (0.94) e inoculados con el virus swH1N1 (1.33) se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide fue mayor en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 ( $P < 0.05$ ). En el caso de la hemorragia el grado de afectación en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (0.44) fue similar al de los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (0.22) ( $P \geq 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con el virus y se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide fue similar en los grupos de calostrados/pH1N1 (1.44) y calostrados/swH1N1 (1.11); en el caso de los no calostrados/swH1N1 (1.55) el grado de afectación fue mayor que el observado en los no calostrados/pH1N1 (0.44) ( $P < 0.05$ ). En el caso de la hemorragia el grado de afectación fue similar en los cuatro grupos evaluados ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 37. Resultados de la evaluación microscópica realizada en el timo de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis linfóide y hemorragia según el grado de afectación del timo, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Calostro	Necrosis/apoptosis linfóide			Hemorragia		
	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	1.44 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>
No	<b>0.44<math>\pm</math>0.16<sup>b</sup></b>	<b>1.55<math>\pm</math>0.16<sup>a</sup></b>	1.00 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.27 <sup>a</sup>
Media	<b>0.94<sup>b</sup></b>	<b>1.33<sup>a</sup></b>		0.44 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el grado de afectación por tipo de lesión en el timo a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 38) y se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfóide al día 14 (1.33) posinoculación fue mayor que al día 2 (0.83) posinoculación ( $P < 0.05$ ). En el caso de la hemorragia el grado de afectación fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 38. Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en timo a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis linfóide y hemorragia según el grado de afectación del timo, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Tipo de lesiones	Días posinoculación		
	2	6	14
Necrosis/apoptosis linfóide	<b>0.83<sup>b</sup></b>	1.25 <sup>ab</sup>	<b>1.33<sup>a</sup></b>
Hemorragia	0.16 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.66 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfóide y hemorragia observados en el timo a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 39). Se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfóide y hemorragia fue similar en cerdos calostrados, no calostrados, inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1 a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 39. Resultados de la evaluación microscópica realizada en timo de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis linfóide y hemorragia según el grado de afectación del timo, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Necrosis/apoptosis linfóide			Hemorragia		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	1.16 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
No calostrados	0.50 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
pH1N1	0.66 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
swH1N1	1.00 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.66 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por necrosis/apoptosis en timo en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.94) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (1.33). Siendo los grupos inoculados con el virus swH1N1 los que exhibieron un mayor grado de necrosis/apoptosis linfóide. En relación a la hemorragia no existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por este tipo de lesión en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.44) sea diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.22).

#### 4.8.8. Bazo

Se evaluaron dos tipos de lesiones en bazo necrosis/apoptosis linfóide e hiperplasia linfóide (Cuadro 40), se observó que cuando se agrupó a los cerdos como calostrados (0.94) y no calostrados (1.27) el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfóide fue similar ( $P \geq 0.05$ ); en relación a la hiperplasia linfóide se encontró que los cerdos calostrados (0.38) exhibieron un mayor grado de afectación que los no calostrados (0.05) ( $P < 0.05$ ). Cuando se

agruparon a los cerdos de acuerdo al virus con que fueron inoculados se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfóide en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (1.11) fue similar al observado en los inoculados con el virus swH1N1 (1.11) ( $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, en la hiperplasia linfóide se observó que los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (0.38) exhibieron un mayor grado de afectación que los inoculados con el virus pH1N1 (0.05) ( $P < 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con el virus y se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfóide fue similar en los cuatro grupos evaluados. En el caso de la hiperplasia linfóide se observó que el grado de afectación por esta lesión en los grupos de no calostrados/pH1N1 (0.11) y no calostrados/swH1N1 (0.00) fue similar; mientras que en los grupos de calostrados/pH1N1 (0.00) y calostrados/swH1N1 (0.77) este último exhibió un mayor grado de afectación ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 40. Resultados de la evaluación microscópica realizada en el bazo de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis linfóide e hiperplasia linfóide según el grado de afectación del bazo, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Necrosis/apoptosis linfóide				Hiperplasia linfóide		
Calostro	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	1.11 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.77 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	<b>0.00<math>\pm</math>0.09<sup>b</sup></b>	<b>0.77<math>\pm</math>0.09<sup>a</sup></b>	<b>0.38<sup>a</sup></b>
No	1.11 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	<b>0.05<sup>b</sup></b>
Media	1.11 <sup>a</sup>	1.11 <sup>a</sup>		<b>0.05<sup>b</sup></b>	<b>0.38<sup>a</sup></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el grado de afectación por tipo de lesión en el bazo a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 41) y se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfóide e hiperplasia linfóide fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 41. Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en bazo a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis linfoide e hiperplasia linfoide según el grado de afectación del bazo, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Tipo de lesiones	Días posinoculación		
	2	6	14
Necrosis/apoptosis linfoide	1.00 <sup>a</sup>	1.16 <sup>a</sup>	1.16 <sup>a</sup>
Hiperplasia linfoide	0.16 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide e hiperplasia linfoide observadas en bazo a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 42). Se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide e hiperplasia linfoide fue similar en cerdos calostrados y no calostrados a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se evaluó el efecto del virus en el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide se observó que el grado de afectación en cerdos inoculados con el virus pH1N1 fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 se observó que a los 6 (1.50) días posinoculación el grado de afectación fue mayor que el observado a los 2 (0.50) días posinoculación ( $P < 0.05$ ). En el caso de la hiperplasia linfoide el grado de afectación de los cerdos inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1 fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 42. Resultados de la evaluación microscópica realizada en bazo de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis linfóide e hiperplasia linfóide según el grado de afectación del bazo, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Necrosis/apoptosis linfóide			Hiperplasia linfóide		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	0.66 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
No calostrados	1.33 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
pH1N1	1.50 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	1.00 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	0.00 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
swH1N1	<b>0.50<math>\pm</math>0.22<sup>b</sup></b>	<b>1.50<math>\pm</math>0.22<sup>a</sup></b>	1.33 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	0.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

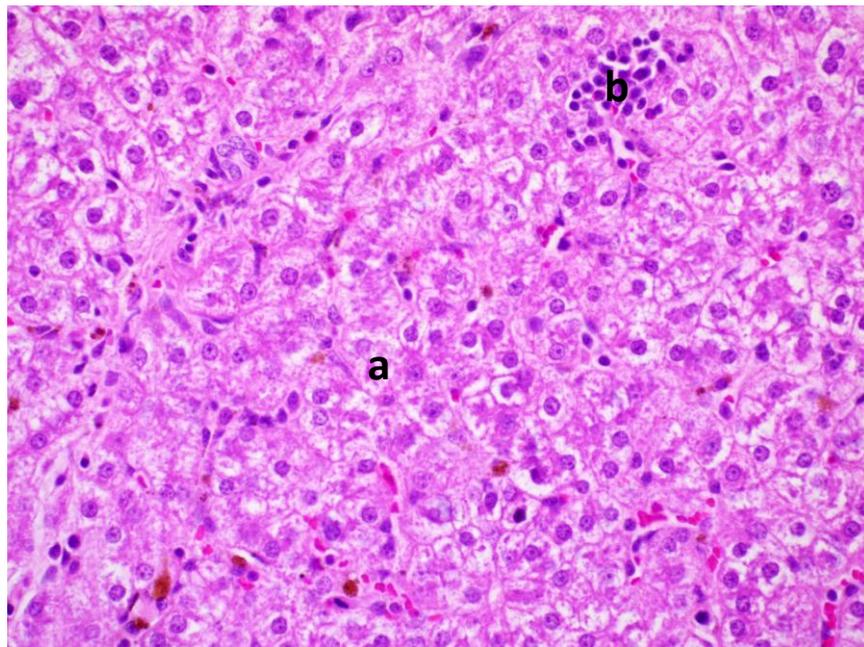
Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por hiperplasia linfóide en el bazo en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.05) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.38). Siendo los grupos inoculados con el virus swH1N1 los que exhibieron un mayor grado de hiperplasia linfóide. En relación a la necrosis/apoptosis linfóide no existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por este tipo de lesión en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (1.11) sea diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (1.11).

#### 4.8.9. Hígado

Se evaluaron dos tipos de lesiones en hígado degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal (Cuadro 43), se observó que el grado de afectación por degeneración vacuolar fue mayor en cerdos no calostrados (1.94) que en los calostrados (1.27) ( $P < 0.05$ ). En el caso del infiltrado inflamatorio periportal el grado de afectación en cerdos calostrados (0.22) y no calostrados (0.11) fue similar ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se agruparon a los cerdos de acuerdo al virus con que fueron inoculados se observó que el grado de

afectación por degeneración vacuolar en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (1.94) (Figura 23) fue mayor que el observado en los inoculados con el virus swH1N1 (1.27) ( $P < 0.05$ ).

Figura 23. Fotomicrografía de hígado de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI. Se observa degeneración vacuolar moderada (a) e infiltrado linfocitario leve (b) (H&E).



En el caso del infiltrado inflamatorio periportal se observó que el grado de afectación en cerdos inoculados con el virus pH1N1 (0.11) fue similar al observado en cerdos inoculados con el virus swH1N1 (0.22) ( $P \geq 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con el virus y se observó que el grado de afectación por degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal fue similar en los cuatro grupos evaluados ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 43. Resultados de la evaluación microscópica realizada en el hígado de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal según el grado de afectación del hígado, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Calostro	Degeneración vacuolar			Infiltrado inflamatorio periportal		
	Virus		Media	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1		pH1N1	swH1N1	
Si	1.55 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	<b>1.27<sup>b</sup></b>	0.22 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>
No	2.33 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	1.55 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	<b>1.94<sup>a</sup></b>	0.00 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>
Media	<b>1.94<sup>a</sup></b>	<b>1.27<sup>b</sup></b>		0.11 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el grado de afectación por tipo de lesión en el hígado a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 44) y se observó que el grado de afectación por degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 44. Resultados de la evaluación del grado de afectación por tipo de lesiones observadas en hígado a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores que se asignaron a la degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal según el grado de afectación del hígado, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Tipo de lesiones	Días posinoculación		
	2	6	14
Degeneración vacuolar	1.50 <sup>a</sup>	1.58 <sup>a</sup>	1.75 <sup>a</sup>
Infiltrado inflamatorio periportal	0.00 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.33 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal observados en hígado a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 45). Se observó que el grado de afectación por degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal fue similar en cerdos calostrados, no calostrados, inoculados con el virus pH1N1 e inoculados con el virus swH1N1 a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 45. Resultados de la evaluación microscópica realizada en hígado de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal según el grado de afectación del hígado, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Degeneración vacuolar			Infiltrado inflamatorio periportal		
	Días posinoculación			Días posinoculación		
	2	6	14	2	6	14
Calostrados	1.33 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.50 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
No calostrados	1.66 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.00 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
pH1N1	1.66 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	1.50 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	2.66 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
swH1N1	1.33 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	1.66 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	0.83 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

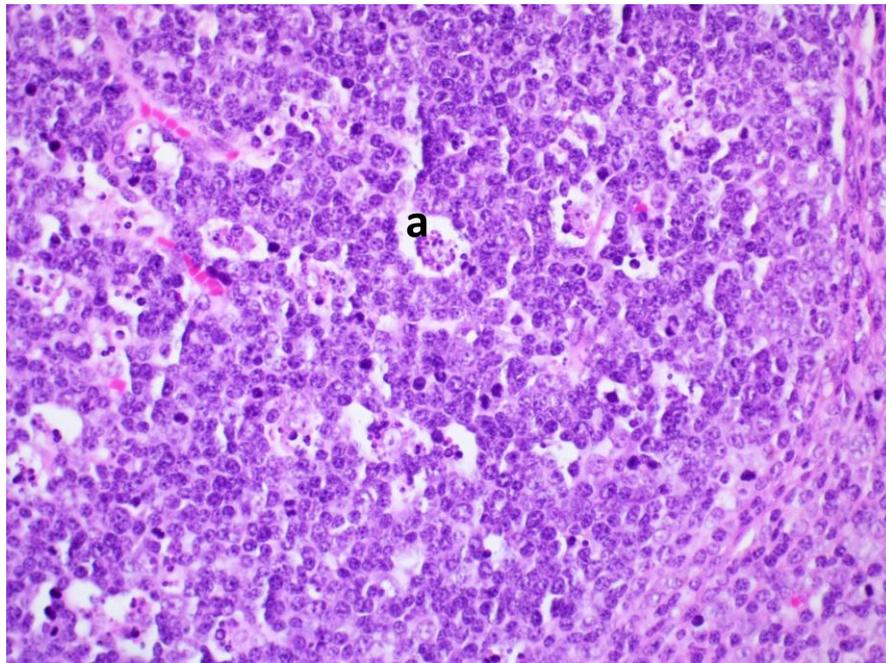
Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por degeneración vacuolar en el hígado en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (1.94) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (1.27). Siendo los grupos inoculados con el virus pH1N1 los que exhibieron un mayor grado de degeneración vacuolar. En relación al infiltrado inflamatorio periportal no existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por este tipo de lesión en los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.11) sea diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (0.22).

#### 4.8.10. Íleon

En el caso del íleon la única lesión encontrada fue necrosis/apoptosis del tejido linfoide asociado al tracto intestinal (Cuadro 46) se observó que el grado de afectación por este tipo de lesión en los cerdos calostrados (2.05) (Figura 24) fue mayor al observado en los cerdos no calostrados (0.94) ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, cuando se agruparon a los cerdos como inoculados con el virus pH1N1 (1.33) e inoculados con el virus swH1N1 (1.66) el grado de afectación

fue similar ( $P \geq 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con el virus y se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide fue similar en los cuatro grupos evaluados ( $P \geq 0.05$ ).

Figura 24. Fotomicrografía de tejido linfoide asociado a tracto intestinal de cerdo, calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 6 DPI. Se observan células linfoides que exhiben disminución de tamaño con condensación y fragmentación de la cromatina, en el citoplasma de algunas células reticulares se aprecian algunos restos de células linfoides (a) (H&E).



Cuadro 46. Resultados de la evaluación microscópica realizada en íleon de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis según el grado de afectación del íleon, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Calostro	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1	
Si	1.55 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	2.55 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	<b>2.05<sup>a</sup></b>
No	1.11 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	<b>0.94<sup>b</sup></b>
Media	1.33 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide en el íleon a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 47) y se observó que el grado de afectación fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 47. Resultados de la evaluación del grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide en íleon a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis linfoide según el grado de afectación del íleon, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Días posinoculación		
2	6	14
1.41 <sup>a</sup>	1.25 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide en el íleon a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 48). Se observó que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide fue similar en cerdos calostrados, no calostrados, inoculados con el virus pH1N1 y con el virus swH1N1 a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 48. Resultados de la evaluación microscópica realizada en íleon de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la necrosis/apoptosis linfoide según el grado de afectación del íleon, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Días posinoculación		
	2	6	14
Calostrados	1.50 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	2.83 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
No calostrados	1.33 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
pH1N1	1.50 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
swH1N1	1.33 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	1.83 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Considerando los resultados obtenidos se concluye que no existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por necrosis/apoptosis linfoide en el tejido linfoide asociado a tracto intestinal de los grupos inoculados con el virus pH1N1 (1.33) sea diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (1.66).

#### **4.8.11. Vejiga**

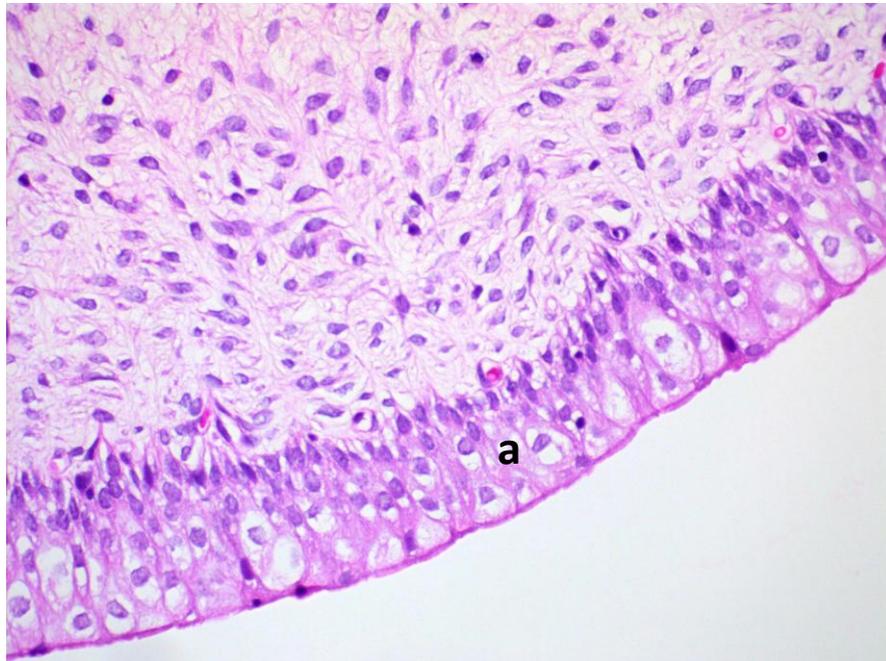
En el caso de la vejiga urinaria la única lesión encontrada fue degeneración vacuolar (Cuadro 49) se observó que el grado de afectación por este tipo de lesión en los cerdos no calostrados (1.55) fue mayor al observado en los cerdos calostrados (1.11) ( $P < 0.05$ ); cuando se agruparon de acuerdo al virus con el que fueron inoculados los cerdos se observó que el grado de afectación por este tipo de lesión fue mayor en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 (1.94) (Figura 25) que en los inoculados con el virus pH1N1 (0.72) ( $P < 0.05$ ). Se evaluó la interacción del calostro con el virus y se observó que en los grupos de calostrados/pH1N1 (1.00) y calostrados/swH1N1 (1.22) el grado de afectación fue similar ( $P \geq 0.05$ ); mientras que en el grupo de no calostrados/swH1N1 (2.66) el grado de afectación fue mayor que el observado en el grupo de no calostrados/pH1N1 (0.44) ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 49. Resultados de la evaluación microscópica realizada en vejiga urinaria de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la degeneración vacuolar según el grado de afectación de la vejiga urinaria, obtenidos de 9 secciones histológicas por grupo.

Calostro	Virus		Media
	pH1N1	swH1N1	
Si	1.00 $\pm$ 0.16 <sup>bc</sup>	1.22 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	<b>1.11<sup>b</sup></b>
No	<b>0.44<math>\pm</math>0.16<sup>c</sup></b>	<b>2.66<math>\pm</math>0.16<sup>a</sup></b>	<b>1.55<sup>a</sup></b>
Media	<b>0.72<sup>b</sup></b>	<b>1.94<sup>a</sup></b>	

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Figura 25. Fotomicrografía de vejiga de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 6 DPI. Se observan degeneración vacuolar moderada (a) (H&E).



Se evaluó el grado de afectación por degeneración vacuolar en la vejiga urinaria a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 50) y se observó que el grado de afectación fue mayor a los 2 (1.75) días posinoculación que a los 14 (1.00) días posinoculación ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 50. Resultados de la evaluación del grado de afectación por degeneración vacuolar en la vejiga urinaria a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media de los valores que se asignaron a la degeneración vacuolar según el grado de afectación de la vejiga urinaria, obtenidos de 12 secciones histológicas por día posinoculación.

Días posinfección		
2	6	14
<b>1.75<sup>a</sup></b>	1.25 <sup>ab</sup>	<b>1.00<sup>b</sup></b>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

Se evaluó el efecto del calostro y el virus sobre el grado de afectación por degeneración vacuolar en la vejiga urinaria a lo largo de los días posinoculación (Cuadro 51). Se observó que el grado de afectación en cerdos calostrados y no calostrados fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ). Cuando se evaluó el efecto del virus en el grado de afectación por degeneración vacuolar a lo largo de los días posinoculación se observó que en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 el grado de afectación a los 2 (1.33) días posinoculación fue mayor que el observado a los 14 (0.00) días posinoculación ( $P < 0.05$ ). En el caso de los cerdos inoculados con el virus swH1N1 el grado de afectación por degeneración vacuolar fue similar a lo largo de los días posinoculación ( $P \geq 0.05$ ).

Cuadro 51. Resultados de la evaluación microscópica realizada en vejiga urinaria de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza A pH1N1 y swH1N1 a lo largo de los días posinoculación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de los valores que se asignaron a la degeneración vacuolar según el grado de afectación de la vejiga urinaria, obtenidos de 6 secciones histológicas por grupo y por día posinoculación.

	Días posinfección		
	2	6	14
Calostrados	1.50 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.16 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
No calostrados	2.00 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
pH1N1	<b>1.33<math>\pm</math>0.20<sup>ab</sup></b>	0.83 $\pm$ 0.20 <sup>bc</sup>	<b>0.00<math>\pm</math>0.20<sup>c</sup></b>
swH1N1	2.16 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.66 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>	2.00 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>

Diferentes literales indican diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ )

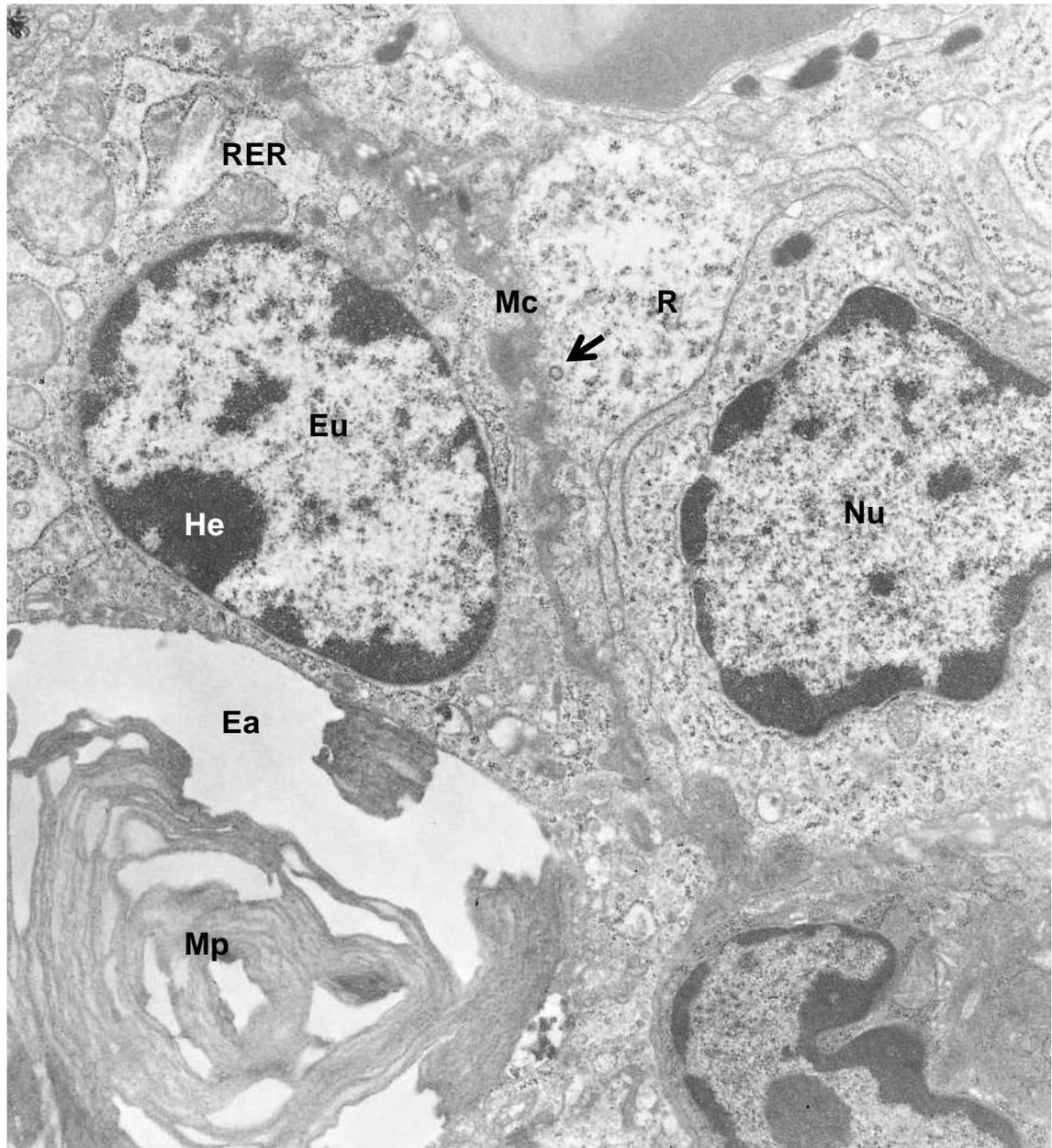
Considerando los resultados obtenidos se concluye que existe evidencia suficiente para afirmar que el grado de afectación por degeneración vacuolar en vejiga urinaria de los grupos inoculados con el virus pH1N1 (0.72) es diferente al observado en los grupos inoculados con el virus swH1N1 (1.94). Siendo los grupos inoculados con el virus swH1N1 los que exhibieron un mayor degeneración vacuolar.

#### **4.9. Resultados de la evaluación ultraestructural realizada en pulmones provenientes de cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza pH1N1 y swH1N1**

##### **4.9.1. Cambios ultraestructurales en pulmón de cerdo, calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación.**

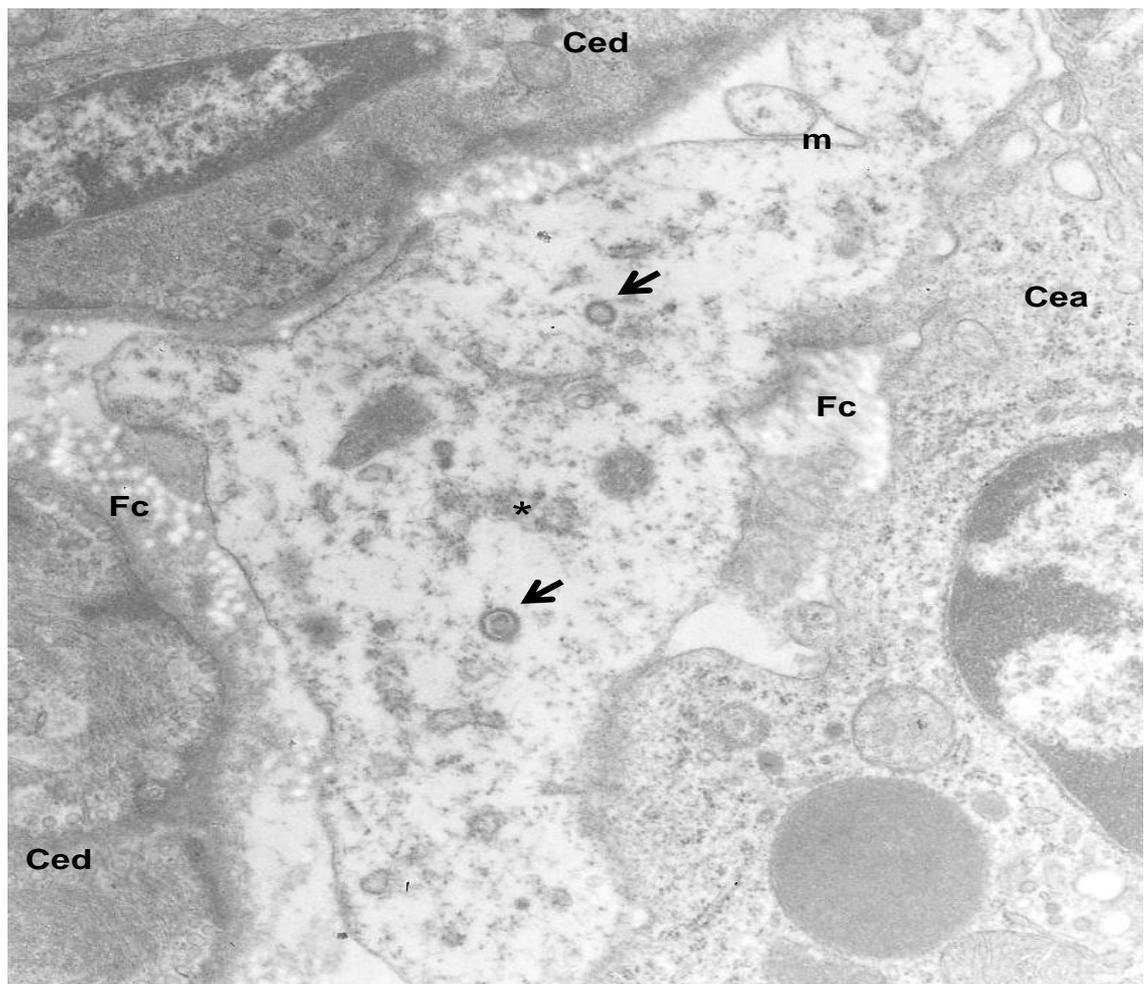
En las células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I) los núcleos exhibían escasa heterocromatina electrodensa desplazada a la periferia, en el citoplasma el retículo endoplásmico rugoso presentaba diferentes grados de tumefacción y se observaron agregados de ribosomas libres, entremezcladas se observaron escasas partículas virales cuyos diámetros oscilaban entre 115-190nm, estas partículas virales eran esféricas y se encontraban envueltas por una membrana electrodensa sobre la cual se observaban numerosas proyecciones que correspondían a las glicoproteínas de superficie HA y NA (Figura 26).

Figura 26. Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. Se observa un septo alveolar en el cual los núcleos (Nu) de las células epiteliales alveolares exhiben agregados de heterocromatina (He) y abundante eucromatina (Eu), el retículo endoplásmico rugoso (RER) está dilatado debido a la presencia de agregados proteínicos fibrilares y ribosomas (R) libres, adyacente a la membrana citoplasmática (Mc) de las células epiteliales alveolares se aprecia una partícula viral (flecha). En el espacio alveolar (Ea) se observa material proteínico (Mp) electrodenso dispuesto en laminas concéntricas (membranas hialinas). MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 7,000x.



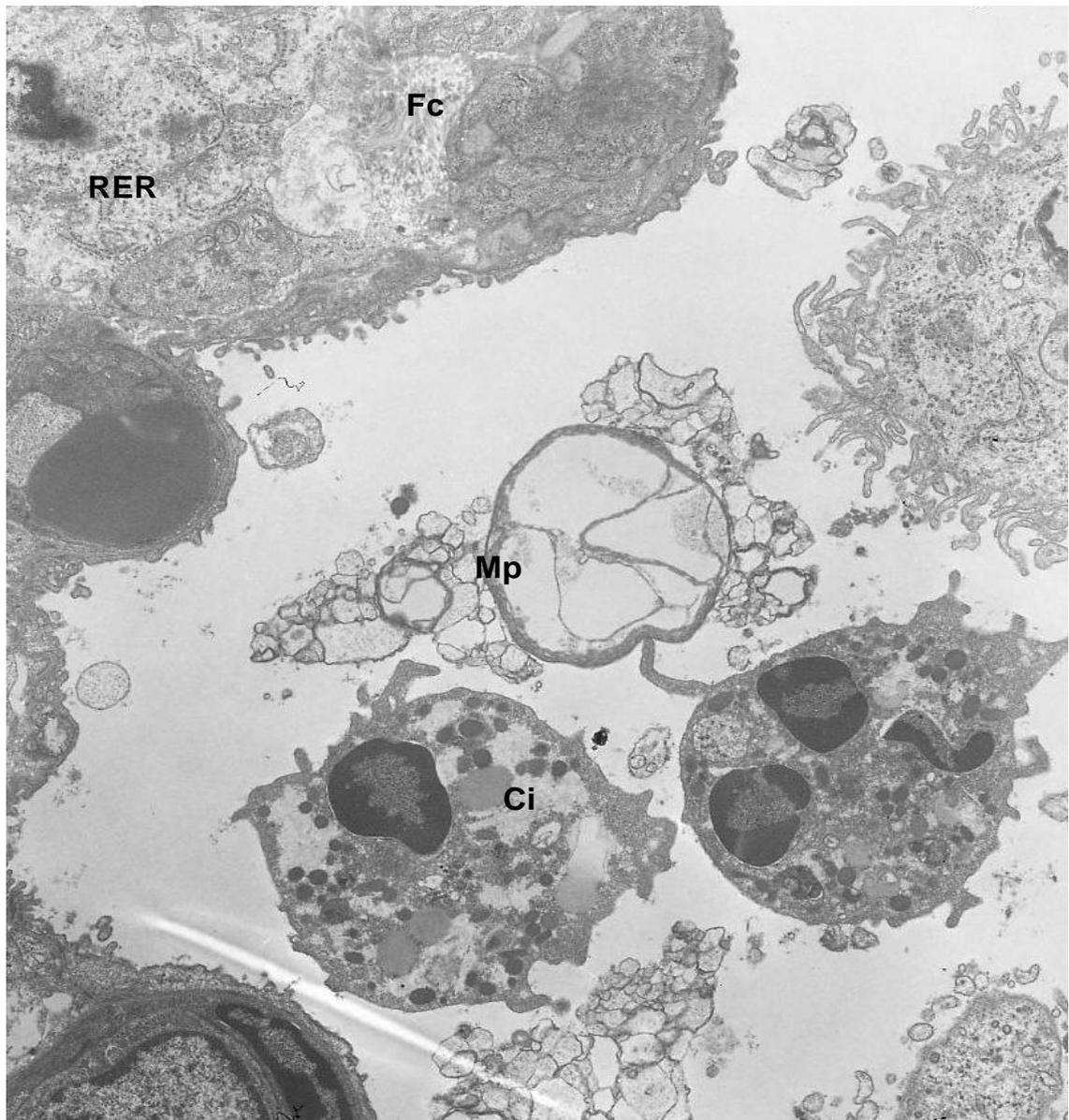
En otros campos, se observó expansión del espacio intersticial debido a la presencia de prominentes vacuolas delimitadas por una delgada membrana electrodensa en cuyo interior se observaron escasas partículas virales como las antes descritas entremezcladas con material electrodenso fibrilar. Delimitando estas vacuolas se observaron células endoteliales, células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I) y fibras de colágeno (Figura 27).

Figura 27. Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. En el septo alveolar se observa expansión del espacio intersticial en el cual se aprecia una prominente vacuola delimitada por una delgada membrana electrodensa (m) en cuyo interior se observaron algunas partículas virales (flechas) entremezcladas con agregados proteínicos fibrilares (\*). Adyacente a esta vacuola se observan fibras de colágeno (Fc), células epiteliales alveolares (Cea) y células endoteliales (Ced). MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 12,000x.



En vistas panorámicas del septo y luz alveolar se observaron macrófagos, células polimorfonucleares, material electrodensó laminar y globular (membranas hialinas); así como, restos celulares (Figuras 28).

Figura 28. Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. Se observa parte del septo alveolar en donde algunas células endoteliales y células epiteliales alveolares exhiben dilatación marcada del retículo endoplásmico (RER), en el espacio intersticial se aprecian áreas electrolucidas y fibras de colágeno (Fc). En el espacio alveolar se aprecian células inflamatorias (Ci) degeneradas y restos de material protéinico (Mp) electrodensó de aspecto globular. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 3,000x.



#### **4.9.2. Cambios ultraestructurales en pulmón de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación.**

En el citoplasma de células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I), se observaron abundantes partículas virales cuyos diámetros oscilaban entre 90-360nm, estas partículas virales eran esféricas y en algunos casos pleomórficas, se encontraban envueltas por una membrana electrodensa sobre la cual se observaban numerosas proyecciones que correspondían a las glicoproteínas de superficie HA y NA. Dichas partículas estaban adyacentes al aparato de Golgi, el cual estaba ligeramente tumefacto; asimismo, se observaron numerosos ribosomas libres y material electrodensso fibrilar. En otros campos, estas partículas virales se observaron emergiendo de células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I); así como, dentro de prominentes vacuolas que se localizaban en el espacio intersticial entre la membrana basal de las células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I) y la membrana basal de las células endoteliales, estas vacuolas contenían abundante material electrodensso fibrilar, en ocasiones agregados de ribosomas y entremezcladas se observaron numerosas partículas virales como las antes descritas (Figuras 29 y 30)

Figura 29. Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. En el citoplasma de una célula epitelial alveolar se observan numerosas partículas virales (flecha) adyacentes al núcleo (Nu) y al aparato de Golgi (AG) entremezcladas con ribosomas (R) libres y escaso material proteínico electrodenso fibrilar. Se observa expansión del espacio intersticial (Ei) debido a la presencia de material proteínico electrodenso fibrilar. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 30,000x.

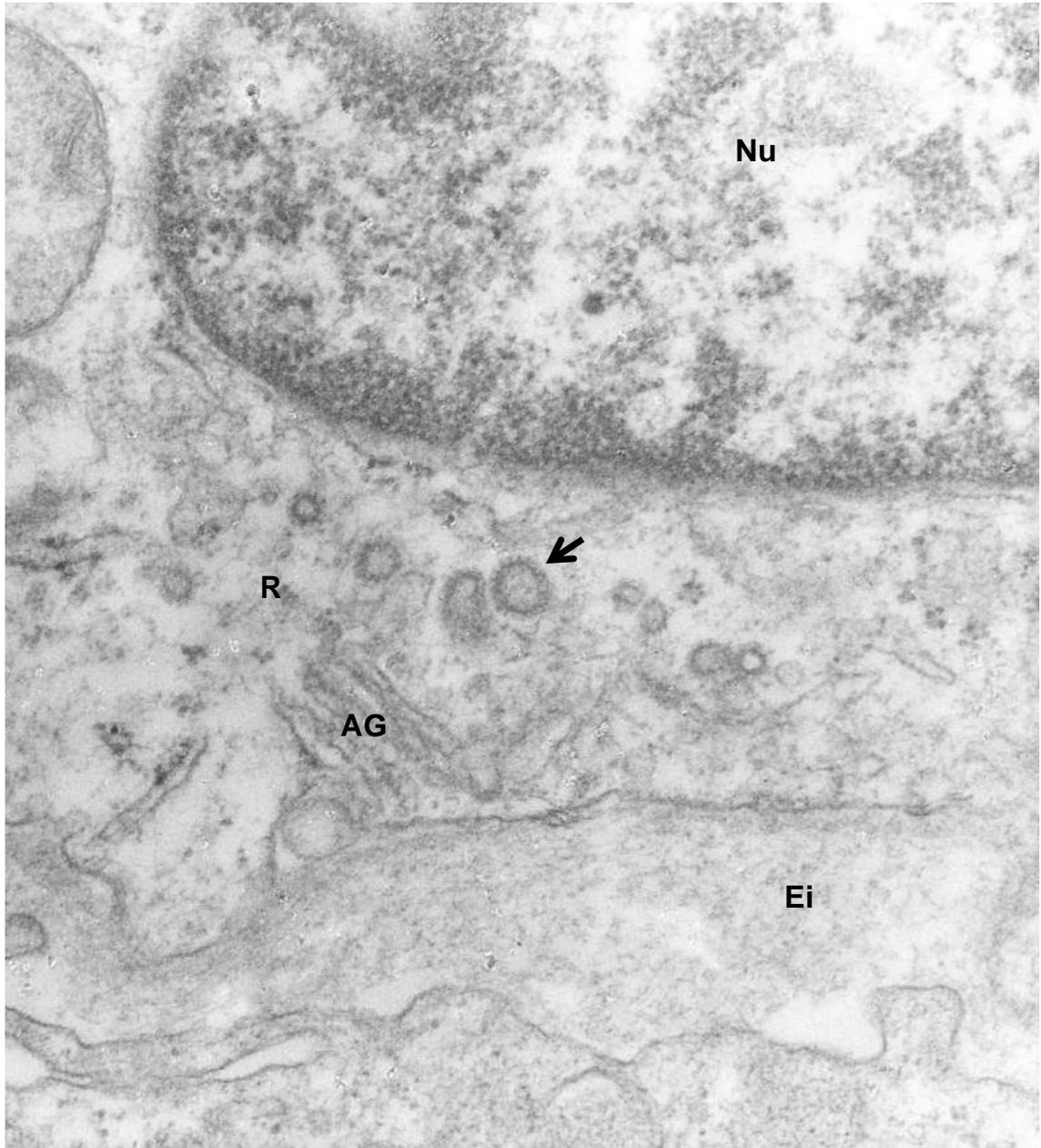
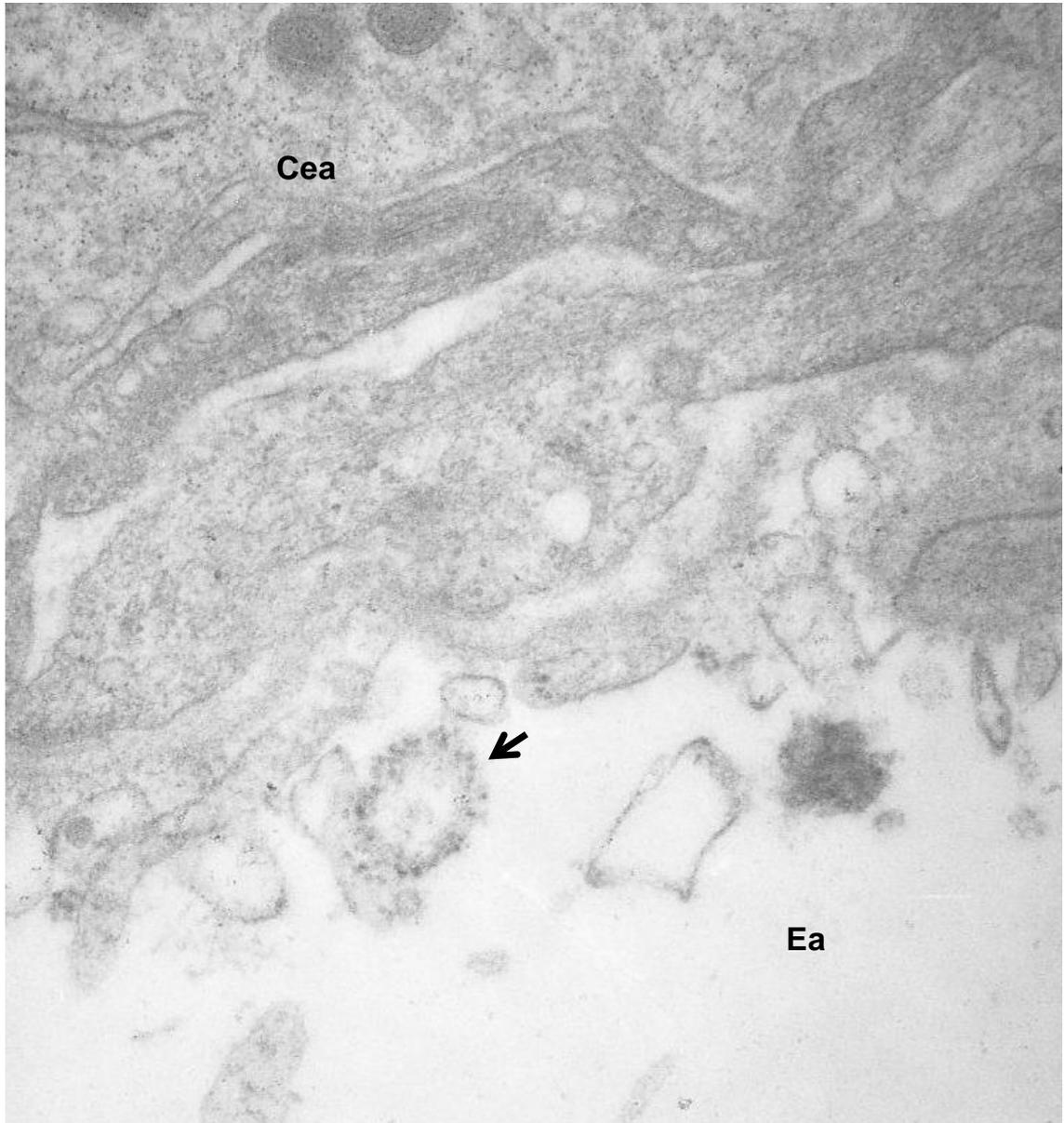


Figura 30. Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus pH1N1, 2 días posinoculación. En el espacio alveolar (Ea) se observa una partícula viral (flecha) adyacente a la membrana citoplasmática de una célula epitelial alveolar (Cea). MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 50,000x.



#### **4.9.3. Cambios ultraestructurales en pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación.**

Se observó engrosamiento de los septos alveolares debido a expansión del espacio intersticial en el cual se observaron numerosas vacuolas electrolucidas entremezcladas con material electrodense fibrilar y fibras de colágeno. En el citoplasma de algunas células epiteliales alveolares (neumocitos I) el retículo endoplásmico rugoso exhibía diferentes grados de tumefacción; asimismo, se observaron ribosomas libres entremezclados con material electrodense fibrilar (Figura 31).

En otros campos entre células endoteliales y células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I) se observaron algunas partículas virales cuyos diámetros oscilaban entre 130-170nm, estas partículas virales eran esféricas y se encontraban envueltas por una membrana electrodensa sobre la cual se observaban numerosas proyecciones que correspondían a las glicoproteínas de superficie HA y NA (Figuras 32).

Figura 31. Pulmón de cerdo calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación. Se observa un septo alveolar el cual se encuentra expandido debido a un incremento en el grosor del espacio intercelular (Ei) en el cual se aprecia material proteínico (Mp) electrodensos y fibras de colágeno (Fc), las células epiteliales alveolares (Cea) exhiben expansión de su citoplasma debido a la dilatación marcada del retículo endoplásmico rugo (RER) y al acúmulo de material proteínico granular y fibrilar, además de prominentes vacuolas (Vc). MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 3,000x.

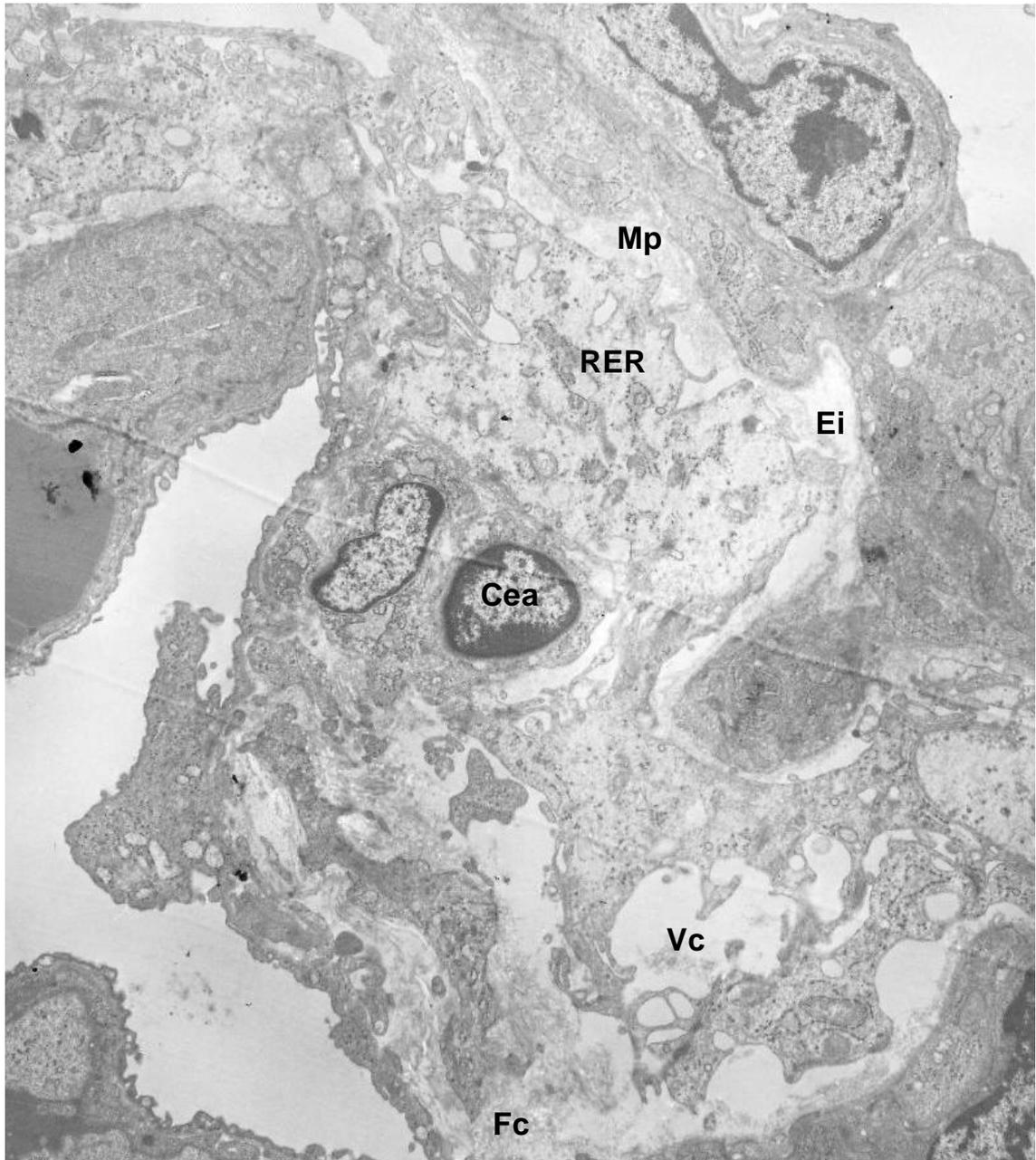
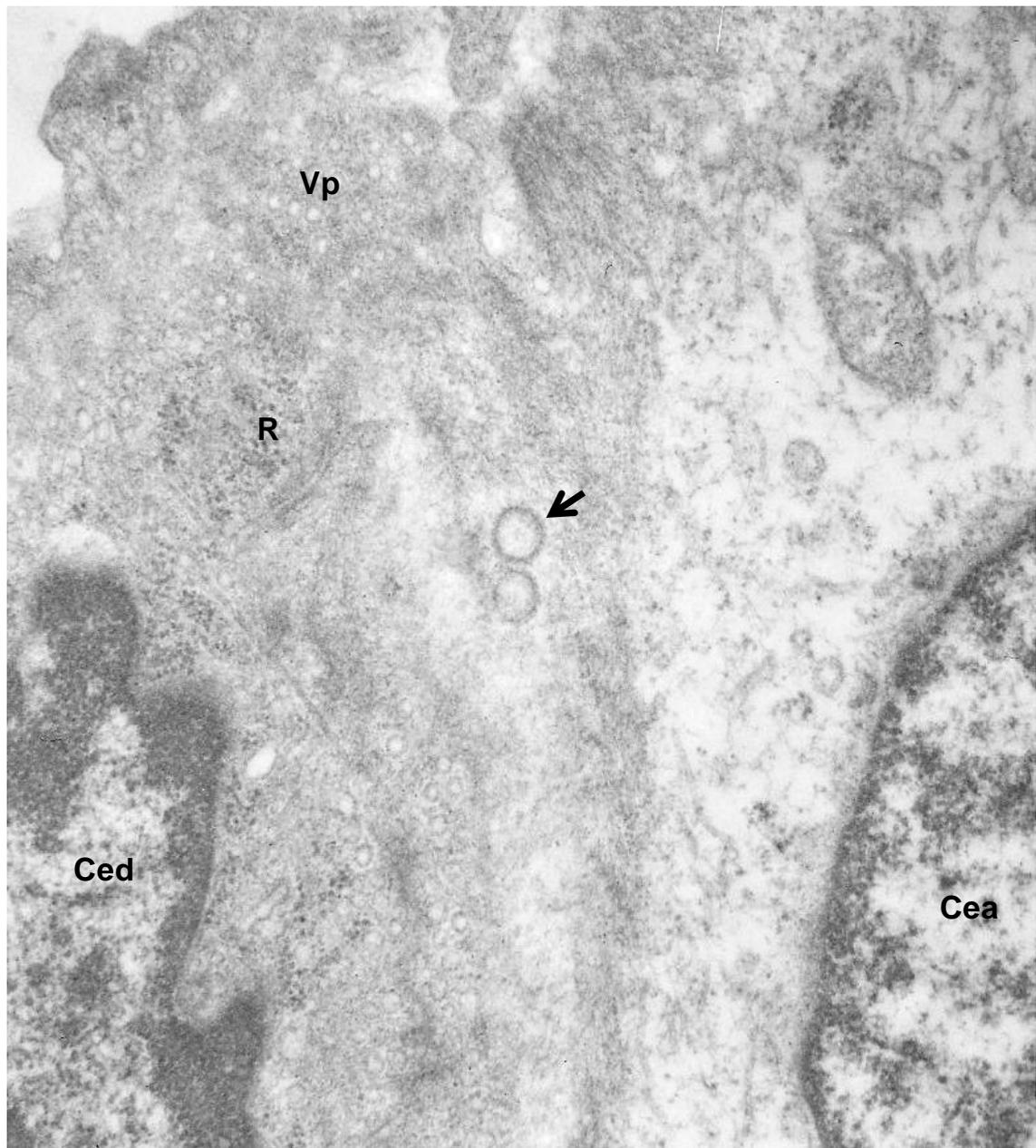


Figura 32. Pulmón de cerdo castrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación. En el citoplasma de una célula epitelial alveolar (Cea) se observan dos partículas virales esféricas (flecha) que poseen una membrana electrodensa la cual exhibe numerosas proyecciones, dichas partículas están entremezcladas con material proteínico fibrilar. Adyacente a esta célula epitelial alveolar hay una célula endotelial (Ced) en cuyo citoplasma se observan numerosas vacuolas pinocíticas (Vp) y ribosomas (R). MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 20,000x.



#### **4.9.4. Cambios ultraestructurales en pulmón de cerdo, no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación.**

Se observaron escasas partículas virales cuyos diámetros oscilaban entre 120-170nm, eran esféricas y se encontraban envueltas por una membrana electrodensa sobre la cual se observaban numerosas proyecciones que correspondían a las glicoproteínas de superficie HA y NA, estas partículas se encontraron en el citoplasma de células endoteliales, adyacentes al núcleo y al retículo endoplásmico rugoso el cual exhibía ligera tumefacción, en el citoplasma se observaron agregados de material electrodense fibrilar, ribosomas libres y algunas vacuolas electrolucidas (Figura 33).

En vistas panorámicas del septo alveolar se observó hiperplasia de neumocitos tipo II, expansión del espacio intersticial debido a la presencia de numerosas vacuolas en cuyo interior se observó material electrodense fibrilar (Figura 34); asimismo, en la luz alveolar se observaron células descamadas y restos necróticos.

Figura 33. Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación. Se observa una partícula viral (flecha) la cual exhibe una membrana electrodensa sobre la cual se aprecian numerosas proyecciones, dicha partícula está en el citoplasma entre el retículo endoplásmico rugoso (RER) dilatado y cercana al núcleo (Nu). En el citoplasma también se observan vacuolas electrolucidas (Ve), material proteínico (Mp) granular y fibrilar. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 20,000x.

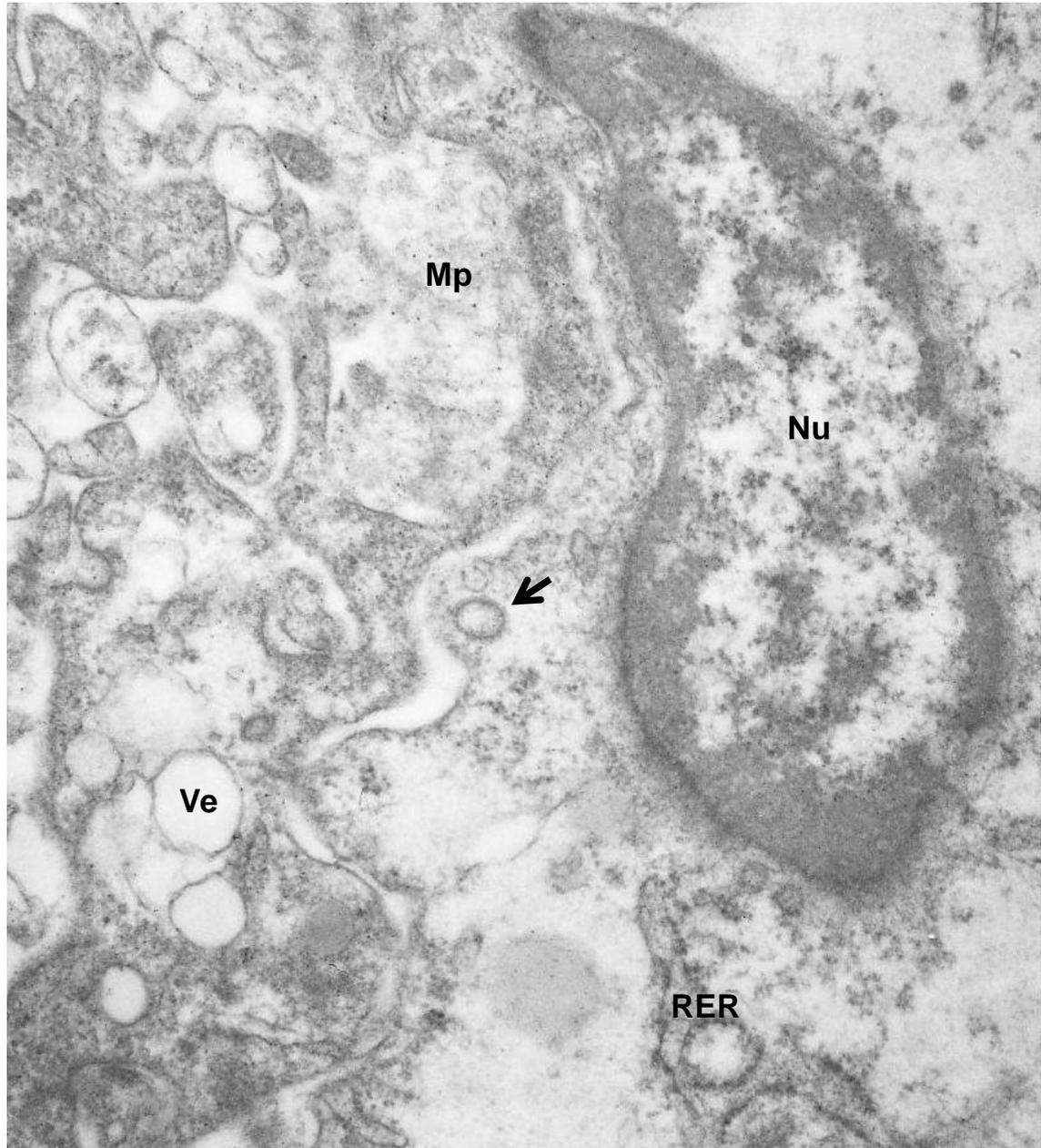
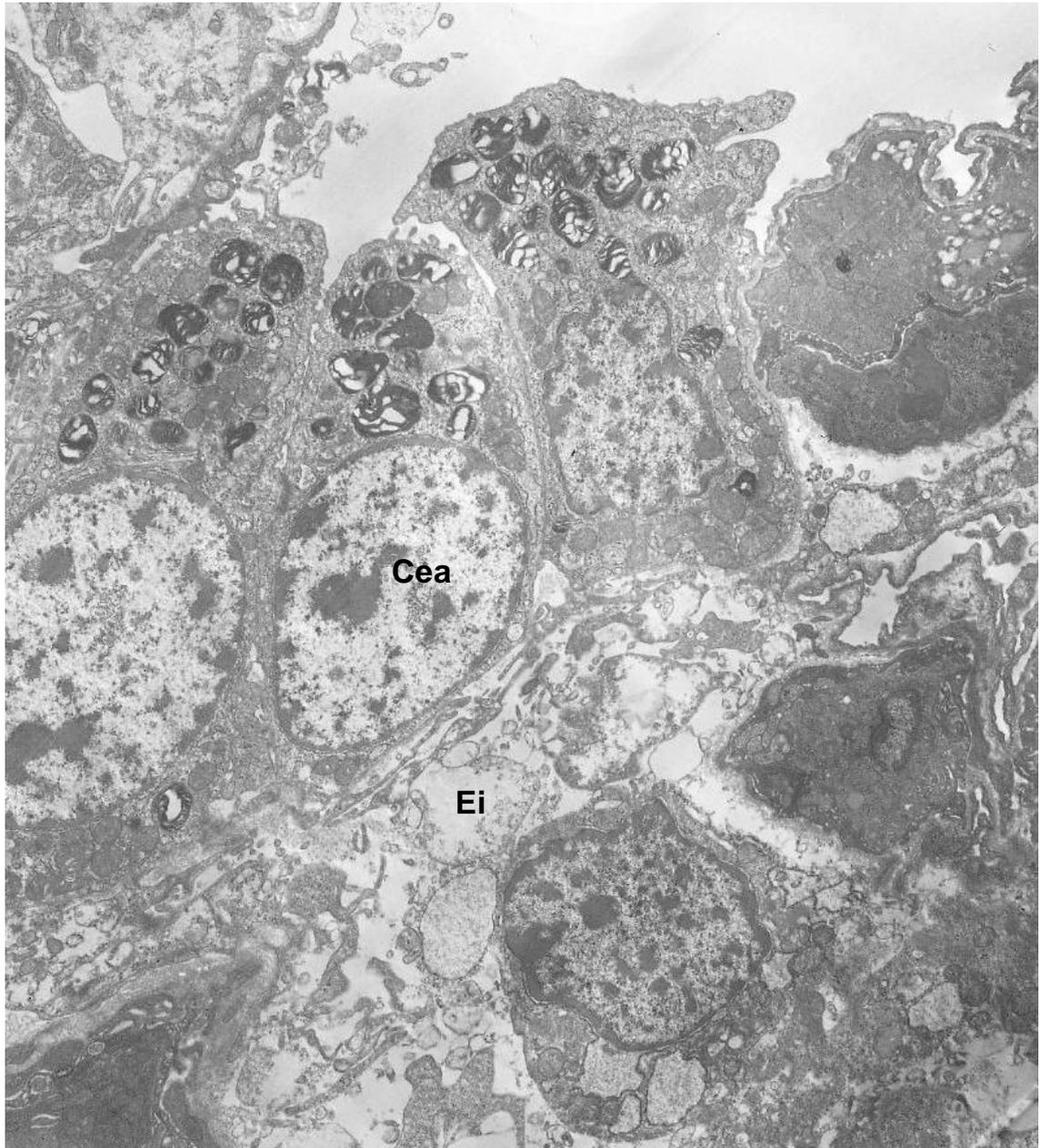


Figura 34. Pulmón de cerdo no calostrado, inoculado con el virus swH1N1, 2 días posinoculación. Se observa un septo alveolar el cual se encuentra engrosado debido a la hiperplasia de células epiteliales alveolares tipo II (Cea) y a la expansión del espacio intercelular (Ei) en el cual se aprecian restos de organelos membranosos que en ocasiones contienen material proteínico granular o fibrilar; asimismo, se observan prominentes áreas electrolucidas. MET. Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo 3,000x.



## 5. DISCUSIÓN

Existen muchas preguntas en relación a la participación del cerdo en la génesis del virus de influenza humana A H1N1 causante de la pandemia en 2009 y su circulación en las piaras porcinas. Aunque se han realizado estudios de patogénesis con este virus en cerdos no calostrados en donde se demostró que el virus era capaz de infectar, excretarse, inducir una respuesta serológica, generar lesiones, transmitirse de cerdo a cerdo y que se ha determinado que existe reacción serológica cruzada con virus de influenza porcina H1N1 (Brookes, *et al.*, 2009; Lange, *et al.*, 2009; Kyriakis, *et al.*, 2010), no se han realizado estudios en cerdos con inmunidad materna o vacunados contra los virus de influenza porcina subtipo H1N1 que circulan en las piaras porcinas, con el objetivo de evaluar su comportamiento clínico-patológico en presencia de anticuerpos y determinar si estos son capaces de proteger contra la infección por el virus de influenza A H1N1 causante de la pandemia.

En el presente estudio se inocularon cerdos calostrados y no calostrados con el virus de influenza A H1N1 cepa A/México/La Gloria-3/2009/H1N1 (referido de aquí en adelante como virus de influenza pH1N1) se evaluó la presentación clínica, respuesta serológica, lesiones macroscópicas, microscópicas y cambios ultraestructurales y se comparó contra cerdos calostrados y no calostrados inoculados con virus de influenza porcina subtipo H1N1 cepa A/swine/New Jersey/11/1976/H1N1 (referido de aquí en adelante como virus de influenza swH1N1). Se observó que aunque no se desarrollo un cuadro clínico típico del virus de influenza como el descrito por Brookes *et al.*, (2009) y Lange *et al.*, (2009) en cerdos no calostrados inoculados con el virus

de influenza A H1N1 cepas A/California/07/2009(H1N1) y A/Regensburg/D6/2009(H1N1) respectivamente en el que observaron secreción ocular, descarga nasal, tos, salivación, incremento en la frecuencia respiratoria, letargia, inapetencia, diarrea, edema palpebral y fiebre. En el presente estudio se observaron estornudos esporádicos y descarga nasal leve, los cuales fueron detectados por un período de 3 – 8 días dependiendo del virus con el que fueron inoculados los cerdos y si estaban o no calostrados. En relación a la temperatura corporal no se encontró evidencia suficiente para afirmar que la inoculación con los virus de influenza pH1N1 y swH1N1 tuvo algún efecto sobre la temperatura corporal ya que los resultados obtenidos se encontraron dentro del rango de temperatura considerado como normal (39.3°C a 39.6°C) para cerdos destetados de entre 9 y 18 kg. Sin embargo, se encontró evidencia suficiente para afirmar que los grupos de cerdos inoculados con el virus pH1N1 (421 g) tuvieron una menor ganancia diaria de peso que los inoculados con el virus swH1N1 (524 g).

El no observar un cuadro clínico típico de influenza no es algo extraño Busquets *et al.*, (2010) inoculó cerdos no calostrados con virus de influenza porcina A H1N1 cepa A/swine/Spain/53207/2004/H1N1 y con virus de influenza A H1N1 cepa A/Catalonia/63/2009/H1N1 y no observó ningún signo respiratorio o sistémico relevante y la temperatura corporal a lo largo de la evaluación estuvo por debajo de los 40°C. Vincent *et al.*, (2006) realizó la evaluación de 7 aislamientos del virus de influenza porcina del subtipo H1N1 realizados en Estados Unidos y observó que signos clínicos como tos y anorexia fueron casi imperceptibles y que la temperatura corporal fue  $\geq 40^{\circ}\text{C}$  solo en 2 de los 7

aislamientos. El observar estas variaciones en la presentación e intensidad de los signos clínicos causados por el virus de influenza bajo condiciones experimentales depende de diferentes factores como la vía de inoculación, la dosis infectante, el tipo de cepa, la edad de los cerdos al momento de la inoculación y su estado inmunológico. Se sabe que signos clínicos y lesiones típicas de influenza pueden reproducirse fácilmente cuando la inoculación es vía intratraqueal con altas dosis de virus  $\geq 10^{7.5}$  DIEP<sub>50</sub> y que con métodos menos invasivos como la inoculación intranasal se provocan infecciones leves como la observada en el presente estudio o completamente subclínicas como la observada por Busquets *et al.*, (2010), las cuales pueden observarse con gran frecuencia bajo condiciones de campo y pasar inadvertidas.

En relación a las infecciones de campo con el virus de influenza A H1N1 pandémico en los informes de las descripciones de los casos en Canadá (Alberta y Manitoba) y Argentina (Buenos Aires) se menciona que los cerdos presentaron descarga ocular y nasal, estornudos, tos, respiración abdominal, depresión, disminución en el consumo de alimento, fiebre, deshidratación y mortalidad que llegó a ser del 1 al 2% en algunas áreas a pesar de que los cerdos habían sido vacunados con Maxivac®H1N1 (Schering-Plough Animal Health, Kirkland, Quebec). El observar este tipo de presentación se asoció a la interacción del virus de influenza con PRRS, Circovirus porcino tipo 2, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* los cuales estaban presentes en algunas áreas de las granjas afectadas. (Howden *et al.*, 2009; Pasma and Joseph, 2010; Pereda *et al.*, 2010).

En relación a la respuesta serológica los títulos de anticuerpos detectados por la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) fueron más altos en los grupos inoculados con el virus pH1N1 que los observados en los grupos inoculados con el virus swH1N1, lo cual podría asociarse a la capacidad del virus pH1N1 para inducir una respuesta serológica.

Se observó que cuando se utilizó como antígeno en la prueba de inhibición de la hemaglutinación al virus swH1N1 los títulos de anticuerpos fueron más altos que los observados cuando se utilizó el virus pH1N1, de hecho con el virus swH1N1 se detectaron anticuerpos en animales no calostrados incluso antes de la inoculación lo que hizo necesario utilizar otra técnica en este caso ELISA para confirmar o descartar los resultados obtenidos, se observó que los sueros que eran positivos por inhibición de la hemaglutinación cuando se utilizó como antígeno al virus swH1N1 en ELISA e inhibición de la hemaglutinación utilizando como antígeno al virus pH1N1 eran negativos; así que el observar resultados falsos positivos se atribuyó a una extrema sensibilidad del virus swH1N1 a la presencia de inhibidores inespecíficos en el suero (Beardmore et al., 1968; Boliar *et al.*, 2006).

En cuanto a la detección de anticuerpos en el suero y su comportamiento en los diferentes grupos, en los cerdos no calostrados/pH1N1 se detectaron anticuerpos en el suero contra el virus pH1N1 a partir del día 9 posinoculación lo cual coincide con lo descrito por Brookes *et al.*, (2009); Lange *et al.* (2009); Busquets *et al.*, (2010), quienes detectaron anticuerpos después del día 7 posinoculación. En el grupo de no calostrados/swH1N1 los sueros fueron negativos mediante el uso de ELISA durante todo el estudio lo cual

puede asociarse a una débil respuesta inmune; ya que al observar los porcentajes de inhibición se observó que a partir del día 9 posinoculación se observaron muestras con porcentajes de inhibición del 28% y los porcentajes tienden a incrementarse hasta llegar al 48% pero no alcanzan el porcentaje requerido para dar una muestra como positiva ( $\geq 50\%$ ), lo cual podría sugerir que se estaba iniciando la producción de anticuerpos. Busquets *et al.*, (2010) observó algo similar en uno de sus grupos al obtener por ELISA porcentajes de inhibición iguales o menores al 60% asociando esto al desarrollo de una respuesta inmune primaria.

En el grupo de cerdos calostrados/pH1N1 se observó que los anticuerpos comenzaron a disminuir del día 6 al 14 posinoculación lo que se asoció a un posible efecto neutralizante de los anticuerpos maternos contra el virus pH1N1, lo que sugiere que existe reacción cruzada con el virus swH1N1. Esto coincide con lo descrito por Leuwerke *et al.*, (2008) quien observó reacción serológica cruzada entre diferentes cepas del subtipo H1N1 en cerdos. En otro estudio Kyriakis *et al.*, (2010) observó reacción serológica cruzada entre el virus de influenza A H1N1 pandémico y virus de influenza porcina en cerdos inoculados experimentalmente, vacunados e hiperinmunizados con cepas clásicas americanas y europeas del virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H1N2. Perera *et al.*, (2011) describió que humanos que generaron anticuerpos contra el virus de influenza A H1N1 pandémico tuvieron reacción serológica cruzada contra los principales virus porcinos del subtipo H1. Se observó también que a los 12 y 14 días posinoculación no hubo diferencia en los títulos de anticuerpos contra el virus

pH1N1 entre cerdos no calostrados y calostrados, esto se debe a que en los cerdos no calostrados aunque se incrementan los niveles de anticuerpos estos no son superiores a los de los cerdos calostrados pese a que en estos disminuyen por efecto de la infección. En el grupo de cerdos calostrados/swH1N1 se observó que los títulos de anticuerpos exhibieron una disminución no significativa al día 12 y 14 posinfección, la cual podría ser atribuida a un posible efecto neutralizante de los anticuerpos maternos contra el virus swH1N1; sin embargo, es posible que en este caso la disminución no haya sido tan notable debido a que la capacidad de replicación del virus swH1N1 fue más baja que la del virus pH1N1.

Al evaluar los cambios macroscópicos en los cuatro grupos evaluados se observó que la inoculación intranasal con 6,400 UHA de los virus pH1N1 y swH1N1 provocó lesiones evidentes macroscópicamente solo en el pulmón, lo cual coincide con los trabajos realizados por Vincent *et al.*, (2006), Brookes *et al.*, (2009), Lange *et al.*, (2009) y Busquets *et al.*, (2010). El grupo que exhibió el mayor porcentaje de lesión pulmonar en el presente estudio fue el de los cerdos no calostrados/pH1N1 a los 6 días posinoculación, lo cual se asoció a la ausencia de inmunidad contra el virus pH1N1 y a la alta capacidad infectante del virus pH1N1, la cual ha sido descrita en diferentes modelos animales y en algunos casos se ha observado que es superior a la de cepas porcinas o estacionales humanas (Itoh *et al.*, 2009; Munster *et al.*, 2009; Brookes *et al.*, 2009; Lange *et al.*, 2009; Rowe *et al.*, 2010; Busquets *et al.*, 2010), lo cual también también se observó en este estudio ya que los grupos inoculados con el virus swH1N1 exhibieron un menor porcentaje de lesión pulmonar que los

inoculados con el virus pH1N1. El observar diferencias en el porcentaje de lesión entre cepas del virus influenza porcina de un mismo subtipo no es algo extraño en un estudio realizado por Vincent *et al.*, (2006) se evaluaron 7 aislamientos del virus de influenza porcina subtipo H1N1 realizados en Estados Unidos en cerdos privados de calostro y se observó que el porcentaje de lesión pulmonar se encontró en un rango del 8 al 30% lo que indica que existen diferencias en la capacidad infectante y de producir lesión entre los aislamientos, la cual puede estar asociada a la capacidad que tenga cada cepa para inhibir o activar los mecanismos de defensa del huésped.

Es importante señalar que en este estudio se observó que la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza porcina en los cerdos calostrados tuvo cierto efecto protector contra el virus pH1N1 ya que el grupo de cerdos calostrados/pH1N1 exhibió un menor porcentaje de lesión pulmonar que el grupo de cerdos no calostrados/pH1N1, pero fue mayor que el observado en el grupo de cerdos calostrados/swH1N1 lo cual puede atribuirse a que si hay protección pero no en el mismo grado que el observado contra el virus swH1N1 o bien a que la capacidad infectante del virus pH1N1 es mayor a la del virus swH1N1 o a la interacción entre estos dos factores.

A diferencia de lo observado en este estudio en las infecciones de campo con el virus pandémico en granjas de Canadá y Argentina (Howden *et al.*, 2009; Pasma and Joseph, 2010; Pereda *et al.*, 2010) las lesiones en pulmón abarcaron del 5 al 60% de la superficie pulmonar y consistieron en áreas de consolidación cráneo-ventral de color rojo púrpura y en algunos casos

se observó la presencia de abscesos y exudado fibrinopurulento debido a la presencia de infecciones bacterianas secundarias.

En relación a los cambios microscópicos a diferencia de los estudios realizados por Brookes *et al.*, (2009), Lange *et al.*, (2009) y Busquets *et al.*, (2010) en el presente estudio además de describir los cambios característicos asociados a la infección por el virus de influenza en el pulmón se describieron los cambios histológicos observados en otros tejidos como el cornete nasal, tráquea, tonsila, linfonodos (submadibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal), párpado, timo, bazo, hígado, íleon y vejiga urinaria. Así como, las lesiones que predominaban ya sea con el virus pH1N1 o swH1N1. En el caso del pulmón se observó que las lesiones predominantes en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 fueron las alteraciones circulatorias e inflamatorias; mientras que en los inoculados con el virus swH1N1 fueron las lesiones necróticas y regenerativas. En el cornete nasal y tráquea, se observó que los cerdos inoculados con el virus swH1N1 exhibieron mayor grado de afectación por lesiones hiperplásicas que los inoculados con el virus pH1N1; como se sabe los cambios hiperplásicos pueden ocurrir como parte de una respuesta adaptativa; sin embargo, en el caso del virus de influenza se cree que son consecuencia de una serie de mecanismos de señalización producidos por diferentes mediadores químicos liberados durante la respuesta inflamatoria contra el virus (Buchweitz *et al.*, 2007), los cuales podrían incluso estar regulados por el mismo virus (Mukherjee *et al.*, 2011). Otro tipo de lesiones evaluadas en tráquea fueron las necróticas e inflamatorias las cuales predominaron en los cerdos inoculados con el virus pH1N1. Las diferencias en

el tipo de lesión predominante pueden estar asociadas con la capacidad de replicación de cada virus y a como activan o inhiben los mecanismos de defensa inespecíficos y específicos del hésped.

Se ha descrito que el virus de influenza se replica en tonsila palatina y linfonodo traqueobronquial (Olsen *et al.*, 2006); sin embargo, no hay descripciones de las lesiones causadas por el virus de influenza en estos órganos. A diferencia de Busquets *et al.*, (2010) que no observó cambios relevantes en tonsila, en el presente estudio, se observaron lesiones necróticas, atróficas e hiperplásicas; sin embargo, no se encontró diferencia en el grado de afectación entre los cerdos inoculados con el virus pH1N1 y los inoculados con el virus swH1N1. En relación a los linfonodos se observaron lesiones linfoides y alteraciones circulatorias que no solo afectaron al linfonodo traqueobronquial, si no también a los linfonodos submandibular, mesentérico e inguinal. Sin embargo, solo los linfonodos submandibular y traqueobronquial exhibieron diferencias en el grado de afectación por este tipo de lesiones, en el caso del linfonodo submandibular el grado de afectación por lesiones linfoides fue mayor en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 que el observado en los inoculados con el virus swH1N1; en el caso del linfonodo traqueobronquial predominaron las alteraciones circulatorias y se observó que el grado de afectación fue mayor en los cerdos inoculados con el virus swH1N1 que el observado en los inoculados con el virus pH1N1.

Algunos signos clínicos asociados a infecciones por influenza son secreción ocular, conjuntivitis y edema palpebral (Olsen *et al.*, 2006) los cuales no fueron evidentes macroscópicamente en el presente estudio; sin embargo,

al realizar la evaluación microscópica del párpado se observó infiltrado linfocitario perivascular en la submucosa de la conjuntiva palpebral, en los cuatro grupos evaluados; sin embargo, los grupos inoculados con el virus pH1N1 exhibieron mayor grado de afectación por este tipo de lesión que los inoculados con el virus swH1N1. Brookes *et al.* (2009) no evaluó los cambios histológicos en párpado; sin embargo, observó secreción ocular bilateral y detectó RNA viral en muestras de hisopos oculares mediante RT-PCR tiempo real y concluyó que el virus pH1N1 se excretaba por esta vía.

En infecciones por influenza se han descrito episodios de viremia de corta duración y con bajos títulos virales (Olsen *et al.*, 2006) lo que sugiere que el virus es controlado por el sistema inmune antes de llegar a otro órgano o que las lesiones observadas son incipientes y por lo tanto no se asocian con la infección viral. En el presente estudio se observó necrosis/apoptosis linfoide, hiperplasia linfoide y hemorragia en órganos como el timo, bazo e íleon, estas lesiones se observaron en los cuatro grupos evaluados y también estuvieron presentes en otros órganos linfoides como la tonsila y linfonodos, lo que puede indicar que estas cepas del virus de influenza tiene cierto tropismo por el tejido linfoide, lo cual ha sido observado con virus de influenza aviar (Perkins and Swayne, 2001). En el caso particular del timo Fislová *et al.*, (2009) observó atrofia cortical, logró el aislamiento y detección mediante RT-PCR del virus de influenza humana en ratones. En un estudio realizado por De Vleeschauwer *et al.*, (2009) se determinó la presencia de virus de influenza porcina en el bazo e íleon de cerdos inoculados con la cepa cepa A/swine/Belgium/1/98 H1N1 mediante el uso de RT-PCR tiempo real.

En el caso del hígado en el presente estudio se observó degeneración vacuolar e infiltrado inflamatorio periportal estos cambios no habían sido descritos en cerdos infectados con influenza o se consideraban relevantes ya que se no se ha descrito que el hígado sea un órgano blanco en las infecciones con virus de influenza; sin embargo, Fislová *et al.*, (2009) detectó RNA viral en el hígado de ratones inoculados con virus de influenza humana mediante RT-PCR anidado y Papic *et al.*, observó lesiones hepáticas leves e incremento en la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en un estudio retrospectivo realizado en pacientes infectados con el virus de influenza pandémico e infectados con cepas estacionales del virus de influenza humana subtipos H1N1 y H3N2, lo que sugiere que los cambios observados en el hígado podrían estar asociados a la infección con los virus de influenza pH1N1 y swH1N1.

Finalmente, en el caso de la vejiga urinaria se observó degeneración vacuolar, este cambio tampoco había sido descrito en cerdos y en el caso de humanos las descripciones de lesiones en el aparato urinario y particularmente la vejiga son escasas, Khakpour and Nik-Akhtar., (1977) hicieron una descripción de 33 pacientes con cistitis hemorrágica asociados a un virus de influenza subtipo H3N2 y Kulkarni, *et al.*, (2011) describieron dos casos de cistitis hemorrágica asociados al virus de influenza H1N1 pandémico en niños.

La descripción de lesiones extrapulmonares en el presente estudio sugiere que durante la infección los virus de influenza pH1N1 y swH1N1 fueron capaces de diseminarse a otros tejidos, lo cual puede asociarse a una viremia transitoria. Se observó también que la necrosis/apoptosis del tejido linfoide fue

una lesión constante en todos los órganos linfoides evaluados, por lo que es de gran relevancia realizar pruebas complementarias que permitan además de la detección del virus de influenza diferenciar entre necrosis y apoptosis más allá de los cambios morfológicos con el objetivo de definir si los virus pH1N1 y swH1N1 son capaces de inducir apoptosis.

Finalmente al evaluar los cambios ultraestructurales en el pulmón se observó engrosamiento de septos alveolares, debido a la expansión del espacio intersticial en donde se observaron numerosas vacuolas electrolucidas entremezcladas con material proteínico electrodensos fibrilar y fibras de colágeno. En el citoplasma de células epiteliales alveolares y células endoteliales se observaron partículas virales esféricas y en algunos casos pleomórficas, que medían entre 90 y 360 nm, las cuales estaban envueltas por una membrana electrodensa sobre la cual se observaban numerosas proyecciones que corresponden a las glicoproteínas de superficie (hemaglutininas y neuraminidasas), estas partículas se encontraron generalmente adyacentes a organelos como el núcleo, el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi; así mismo, se observaron en el espacio intersticial y en el espacio alveolar de los cuatro grupos evaluados con lo que se confirmó que el virus logró replicarse en el pulmón incluso en los grupos de cerdos calostrados. Un hallazgo relevante en este estudio fue la presencia de partículas virales en el citoplasma de células endoteliales lo cual podría contribuir al desarrollo de una viremia transitoria, la cual puede presentarse cuando las partículas virales salen de estas células al final de su ciclo de replicación y son liberadas directamente al torrente sanguíneo. Lo cual

explicaría el desarrollo de lesiones fuera del pulmón. El resto de los cambios descritos en general coinciden con lo descrito por Winkler and Cheville (1986); sin embargo, en el presente estudio no se observaron inclusiones intracitoplasmáticas o intranucleares en los neumocitos tipo I, las cuales también han sido descritas en cultivos celulares inoculados con virus de influenza (Goldsmith *et al.*, 2011), esto puede estar asociado a las horas posinoculación a las que se realizó el muestreo ya que Winkler and Cheville (1986) observaron estas inclusiones 24 horas después de la inoculación y el muestreo en el presente estudio se realizó 48 horas posinoculación. Goldsmith, *et al.* (2011) además de describir agregados de estructuras tubulares en el núcleo de células provenientes de un cultivo celular inoculado con el virus de influenza pandémico, observó partículas virales en el espacio alveolar y células de las glándulas submucosas en tejido pulmonar proveniente de humanos infectados con el virus de influenza pándemico y al igual que Winkler and Cheville, (1986) observó agregados tubulares intranucleares en las células infectadas. Estos agregados intranucleares e intracitoplasmáticos fueron identificados como agregados de proteína NS1 y proteína matriz (Winkler and Cheville, 1986; Goldsmith, *et al.*, 2011).

## 6. CONCLUSIONES

Las variaciones observadas en el número de animales afectados y la duración de la signología clínica sugieren que bajo las condiciones del presente estudio el comportamiento clínico del virus pH1N1 es diferente al del virus swH1N1.

La inoculación con los virus pH1N1 y swH1N1 no tuvo efecto sobre la temperatura corporal ya que esta se encontró dentro del rango descrito para cerdos destetados de entre 9 y 18 kg (39.3 – 39.6°C).

La inoculación con el virus pH1N1 tuvo un efecto negativo en la ganancia diaria de peso ya que los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (421 g) mostraron una menor a ganancia diaria de peso que los inoculados con el virus swH1N1 (524 g).

Los títulos de anticuerpos obtenidos mediante inhibición de la hemaglutinación en los cerdos inoculados con el virus pH1N1 fueron más altos que los observados en los cerdos inoculados con el virus swH1N1.

En la prueba de inhibición de la hemaglutinación se observó reacción serológica cruzada entre el virus pH1N1 y swH1N1.

Se detectaron falsos positivos cuando se utilizó como antígeno en la prueba de inhibición de la hemaglutinación al virus swH1N1, lo cual se atribuyó a una extrema sensibilidad del virus swH1N1 a la presencia de inhibidores inespecíficos en el suero.

El uso de un kit ELISA multiespecie dirigido contra nucleoproteína fue capaz de detectar anticuerpos contra el virus de influenza porcina en cerdos calostrados y contra los virus pH1N1 y swH1N1 utilizados en este estudio.

En los cuatro grupos evaluados el único órgano en donde se observaron lesiones macroscópicas fue el pulmón. Los cerdos inoculados con el virus pH1N1 (3.23) exhibieron un mayor porcentaje de lesión pulmonar que los inoculados con el virus swH1N1 (0.66).

Las lesiones microscópicas observadas en el pulmón de los cuatro grupos evaluados fueron características del virus de influenza. Además, se identificaron lesiones microscópicas en cornete nasal, tráquea, linfonodos (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal), párpado, timo, bazo, hígado, íleon y vejiga urinaria lo cual sugiere que los virus pH1N1 y swH1N1 pueden diseminarse a otros tejidos.

Los virus de influenza pH1N1 y swH1N1 son capaces de infectar células endoteliales, lo cual puede asociarse al desarrollo de una viremia transitoria la cual puede presentarse cuando el virus sale de estas células al final de su ciclo de replicación.

La presencia de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H1N1 en los cerdos calostrados tuvo cierto efecto protector contra la infección por los virus pH1N1 y swH1N1 al observarse un menor número de animales con signos clínicos, un menor porcentaje de lesión pulmonar y menor grado de afectación en los tejidos a nivel microscópico.

## 7. PERSPECTIVAS

En este estudio se encontraron diferencias en el comportamiento clínico, respuesta serológica, lesiones macroscópicas y microscópicas entre los cerdos inoculados con el virus de influenza pH1N1 y swH1N1. Sin embargo, hay tres puntos que requerirán atención para futuros trabajos.

1. El papel del calostro en la prevención de exposiciones tempranas al virus de influenza, su participación en el desarrollo de infecciones leves o subclínicas que al pasar inadvertidas pueden favorecer la adaptación de nuevas cepas del virus de influenza y como interfiere en la interpretación de las pruebas serológicas cuando no se cuenta con un programa de monitoreo serológico.
2. La determinación de la presencia del virus o de su material genético en estos los tejidos en donde se observaron lesiones microscópicas mediante el uso de técnicas como inmunohistoquímica, microscopía electrónica de transmisión o RT-PCR, ya que los cambios si bien pueden estar asociados a la replicación del virus, también pueden ser secundarios a la respuesta inmunológica contra el virus.
3. La detección de apoptosis linfoide mediante el uso técnicas microscopía electrónica de transmisión o inmunohistoquímica en tonsila, linfonodos, timo, bazo e íleon, que junto con la detección de virus de influenza confirmarían que los virus pH1N1 y swH1N1 fueron capaces de inducir apoptosis en el tejido linfoide.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. 5ª. ed., Madrid, España: Elsevier Science, 2004.
- Allen TC. Hematoxilina y Eosina. En Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editores. Métodos histotecnológicos. Washington: Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995:55-60.
- Aluja SA y Constantino CF. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2ª. ed., México, D.F.: Manual Moderno, 2002.
- Aparicio RMA y Delgado TG. México la economía antes y después de la influenza. Economía informa. Facultad de Economía, UNAM, Julio-Agosto. 2009; 369:185-189.
- AVMA Panel on Euthanasia American Veterinary Medical Association. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2001; 218:669-696.
- Beardmore WB, Jones KV, Clark TD, Hebeke EK. Induction of an inhibitor of influenza virus hemagglutination by treatment of serum with periodate. Appl Microbiol. 1968; 16:563-568.
- Boliar S, Stanislawek W, Chambers TM. Inability of kaolin treatment to remove nonspecific inhibitors from equine serum for the hemagglutination inhibition test against equine H7N7 influenza virus. J Vet Diagn Invest. 2006; 18:264-267.

- Bollen AJP, Hansen KA, Rasmussen JH. The laboratory swine. Florida, USA: CRC Press LLC, 2000.
- Bouvier MN and Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008; 12 (26 Suppl 4):D49-D53.
- Brookes SM, Núñez A, Choudhury B, Matrosovich M, Essen SC, *et al.* Replication, Pathogenesis and Transmission of Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Non-Immune Pigs. *PLoS ONE*. 2009; 5:e9068.
- Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol*. 2000; 74:29-46.
- Buchweitz JP, Harkema JR, Kaminski NE. Time-dependent airway epithelial and inflammatory cell responses induced by influenza virus A/PR/8/34 in C57BL/6 mice. *Toxicol Pathol*. 2007; 35:424-435.
- Burleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology a Laboratory Manual*. San Diego, California: Academic Press, INC, 1992.
- Busquets N, Segalés J, Córdoba L, Mussá T, Crisci E, Martín-Valls GE, *et al.* Experimental infection with H1N1 European swine influenza virus protects pigs from an infection with the 2009 pandemic H1N1 human influenza virus. *Vet. Res*. 2010; 41:74.
- Cabello VMA, Torres GE. *Panorama Agroalimentario. Carne de porcino, 2010-2011. Dirección de análisis económico y consultoría*. 2010. <http://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/TemasUsuario.jsp>

- Cabrera OY. Los trastornos respiratorios en la crianza del cerdo. Boletín técnico porcino. 2009; 10:2-4.
- Caswell JL and Williams KJ. Respiratory system. In Maxie MG. editor. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol. 2. 5<sup>th</sup> ed., Edinburgh: Elsevier. 2007:581-583.
- Cheville NF. Ultrastructural pathology: An introduction to interpretation. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1994.
- De Benedictis P, Beato MS, Capua I. Inactivation of avian influenza viruses by chemical agents and physical conditions: Review. Zoonoses Public Health. 2007; 54:51-68.
- De Vleeschauwer A, Atanasova K, Van Borm S, van den Berg T, Rasmussen TB, *et al.* Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a swine H1N1 influenza virus in pigs. PLoS ONE. 2009; 4:e6662.
- Eiros MJ, Ortiz Lr, Tenorio A, Casas I, Pozo, Ruiz G, Pérez-Breña P. Diagnóstico microbiológico de las infecciones virales respiratorias. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 2009; 27:168-177.
- Fislová T, Gocník M, Sládková T, Durmanová V, Rajcáni J, Varecková E, *et al.* Multiorgan distribution of human influenza A virus strains observed in a mouse model. Arch Virol. 2009; 154:409-419.
- Gibbs AJ, Armstrong JS, Downie JC. From where did the 2009 "swine-origin" influenza A virus (H1N1) emerge? Virol. J. 2009; 6:207.

- Goldsmith CS, Metcalfe MG, Rollin DC, Shieh WJ, Paddock CD, Xu X, *et al.* Ultrastructural characterization of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:2056-2059.
- Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. *Multivariate data analysis.* 4<sup>th</sup> ed., New Jersey: Prentice Hall, 1995.
- Hall J. Inclusión de Tejidos. En Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editores. *Métodos histotecnológicos.* Washington: Instituto de Patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América, 1995:55-60.
- Heinen P. Swine influenza: a zoonosis. *Vet Sci Tomorrow* [serial online]. 2003 Sept 15. Available at: <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html>.
- Hiromoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3:591-600.
- Howden KJ, Brockhoff EJ, Caya FD, McLeod LJ, Lavoie M, Ing JD, *et al.* An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. *Can Vet J.* 2009; 50:1153-1161.
- Ito T, Kawaoka Y. Host-range barrier of influenza A viruses. *Vet Microbiol.* 2000; 74:71-75.
- Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, *et al.* In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature.* 2009; 460:1021-1025.
- Janke BH. Diagnosis of swine influenza. *Swine Health Prod.* 2000; 8:79-84.

- Khakpour M, Nik-Akhtar B. Epidemics of haemorrhagic cystitis due to influenza A virus. *Postgrad Med J.* 1977; 53:251-253.
- Kuehl RO. *Diseño de experimentos.* 2a. ed., México: Thomson Learning, 2001.
- Kulkarni R, Kinikar A, Valvi Ch, Doshi P. Hemorrhagic cystitis in two cases of novel influenza A (H1N1) infection. *Journal of Pediatric Infectious Diseases.* 2011; 6:77-78.
- Kyriakis CS, Olsen CW, Carman S, Brown IH, Brookes SM, Doorselaere JV, *et al.* Serologic cross-reactivity with pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:96-99.
- Lange E, Kalthoff D, Blohm U, Teifke JP, Breithaupt A, Maresch C. *et al.* Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J Gen Virol.* 2009; 90(Pt9):2119-2123.
- Larsen DL, Karasin A, Zuckermann F, Olsen CW. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet. Microbiol.* 2000; 74:117-131.
- Leuwerke B, Kitikoon P, Evans R, Thacker E. Comparison of three serological assays to determine the cross-reactivity of antibodies from eight genetically diverse U.S. swine influenza virus. *J Vet Diagn Invest.* 2008; 20:426-432.

- Maclachlan NJ and Bubovi J. Orthomyxoviridae. In Fenner's Veterinary Virology. 4th ed., London: Academic Press, 2011:353-370.
- Manjarrez MEZ, Cabello CG, Rosete DPO. Biología del virus: familia Orthomyxoviridae. En Pérez JRP, Salas JH, Palomar AL, Vázquez JCG. editores. Influenza por el nuevo virus A H1N1. Un panorama integral. México: Graphimedica, 2010:26-41.
- Mukherjee S, Vipat VC, Mishra AC, Pawar SD, Chakrabarti AK. Pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induces weaker host immune responses in vitro: a possible mechanism of high transmissibility. Virol J. 2011; 8:140.
- Munster VJ, de Wit E, van den Brand JM, Herfst S, Schrauwen EJ, Bestebroer TM, *et al.* Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus in ferrets. Science. 2009; 325:481-483.
- Nelli KR, Kuchipudi VS, White AG, Baquero PB, Dunham PS, Chang K. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. BMC Veterinary Research. 2010; 6:4.
- Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature. 2009; 459:931-939
- Norma Oficial Mexicana NOM-033-Z00-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Available at: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=529>
- Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, Van Reeth K. Swine Influenza. In Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. 2006:469-482.

- Orcutt ML and Shope RE. The distribution of swine influenza virus in swine. *J. Exp. Med.* 1935; 62:823-826.
- Papic N, Pangercic A, Vargovic M, Barsic B, Vince A, Kuzman I. Liver involvement during influenza infection: perspective on the 2009 influenza pandemic. *Influenza Other Respi Viruses.* 2012; 6:e2-5.
- Pasma T and Joseph T. Pandemic (H1N1) 2009 infection in swine herds, Manitoba, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:706-708.
- Pereda A, Cappuccio J, Quiroga MA, Baumeister E, Insarralde L, Ibar M, *et al.* Pandemic (H1N1) 2009 Outbreak on pig farm, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:304-307.
- Perera RA, Riley S, Ma SK, Zhu HC, Guan Y, Peiris JS. Seroconversion to pandemic (H1N1) 2009 virus and cross-reactive immunity to other swine influenza viruses. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:1897-1899.
- Perkins LE, Swayne DE. Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol.* 2001; 38:149-164.
- Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis.* 2006; 194Suppl 2:S98-110
- Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol.* 2011; 8:207-215.

- Rodríguez TJ, Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC. Muestreo serológico a nivel de rastro para detectar anticuerpos contra el virus de influenza porcina. *Vet. Mex.* 1996; 27:17-21.
- Rowe T, León AJ, Crevar CJ, Carter DM, Xu L, Ran L, *et al.* Modeling host responses in ferrets during A/California/07/2009 influenza infection. *Virology.* 2010; 401:257-265.
- SAGARPA. Programa Nacional Pecuario 2007-2012. Available at: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Programa%20Nacional%20Pecuario/Attachments/1/PNP260907.pdf>
- Salazar MI, López OO, León GA, Ramírez JEG, Castro MEM. El origen de la variabilidad genética de los virus de influenza. *Gac Méd Méx.* 2010; 146:199-206.
- Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med.* 2009; 82:153-159.
- Sorensen V, Jorsal SE, Mousing J. Diseases of the respiratory system. In Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of swine.* 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006:469-482.
- Swayne DE and Halvorson DA. Influenza. In Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE, editors. *Diseases of Poultry.* 11th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 2003:135-160.
- Talledo M y Zumaeta K. Los virus de influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Rev. Peru. Biol.* 2009; 16:227-238.

- The Center for Food Security & Public Health. Swine influenza. Iowa (USA): Iowa State University, 2009. Available at: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/influenza.pdf>
- van der Meer FJ, Orsel K, Barkema HW. The new influenza A H1N1 virus: balancing on the interface of humans and animals. *Can Vet J.* 2010; 51:56-62
- Vázquez NG y Echeverría O. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. México, D.F.: Fondo de cultura económica, 2000.
- Vincent AL, Larger KM, Ma W, Lekcharoensuk P, Gramer MR, Loiacono C, *et al.* Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol.* 2006; 118:212-222.
- Wang R, Taubenberger JK. Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8:517-527.
- WHO Memorandum. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses. *Bull World Health Organ.* 1980; 58:585-591.
- Willekens C, Cornelius A, Guerry MJ, Wacrenier A, Fourrier F. Fulminant hemophagocytic lymphohistiocytosis induced by pandemic A (H1N1) influenza: a case report. *J Med Case Rep.* 2011; 5:280.
- Winkler GC and Cheville NF. Ultrastructural morphometric investigation of early lesions in the pulmonary alveolar region of pigs during experimental swine influenza infection. *Am J Pathol.* 1986; 122:541-552.