



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y salud  
Animal**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**REPORTE DE UN CASO CLÍNICO REPRODUCTIVO ASOCIADO A LA  
ENFERMEDAD DE INFLUENZA PORCINA EN UNA GRANJA DEL ESTADO DE  
MÉXICO.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PRESENTA**

**MVZ. LUIS CORTÉS MANDUJANO**

**TUTOR:**

**Dr. José Iván Sánchez Betancourt (FMVZ-UNAM)**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega (FMVZ-UNAM)**

**Dra. Susana Mendoza Elvira (FES-Cuautitlán-UNAM)**

**México, D.F. Julio 2014**



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 mi hijo

Luis Francisco,

con el cariño que un padre puede ofrecer a sus hijos.

A mi hija

Diana,

con el amor que una hija puede inspirar a su padre.

A mi esposa,

Norma Angélica,

con el cariño, el amor, el deseo y el respeto que se le puede ofrecer a una compañera de vida.

A mi Madre,

María Cosme

que siempre ha sido una fuente de inspiración por su gran fortaleza y tenacidad.

A mi padre

Francisco,

que siempre está en mi mente y en mi corazón por sus grandes enseñanzas.

A mis hermanos:

Paco,

Rebe,

Clemen,

Meles,

Yola,

Polo,

Mario,

Martha,

Cutber,

Mary,

Ale;

por el compañerismo y cariño que nos profesamos.

---

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios,  
por darme la vida, la fuerza, y el empuje para salir siempre adelante.

A mi familia,  
por tener la paciencia y atención en mí, para poder seguir adelante.

A mi asesor,  
José Ivan Sánchez Betancourt por el gran apoyo y dirección para poder llevar a cabo este trabajo de tesis.  
Ma. Elena Trujillo Ortega y Susana Mendoza Elvira, por su apoyo.

A mis profesores,  
De las diferentes materias impartidas durante este curso de Maestría en Medicina Veterinaria.

Al Departamento de Producción Porcina,  
Por el apoyo prestado por el personal técnico, profesional y académico para la elaboración de la presente tesis.

A mi UNAM,  
Porque gracias a esta institución se forma gente de bien.

A CONACYT  
Porque gracias al apoyo de beca otorgado es posible dedicar el tiempo y esfuerzo necesario para la elaboración y conclusión de los trabajos que se pueden generar.

**GRACIAS POR TODO**

---

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio muestra la falla reproductiva generada por un nuevo virus de influenza porcina H3N2 llamado A/swine/Mex/Mex51(H3N2), el cual muestra variación genética comparado con el virus de referencia A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2). Los parámetros productivos afectados fueron: baja de fertilidad al 83%, lechones nacidos muertos 6.0 al 8.0%, fetos momificados del 5.7 al 8% y una mortalidad pre destete del 10 al 15%. Con la prueba de inhibición de la hemoaglutinación no fue posible detectar anticuerpos contra los virus de referencia A/swine/NewJersey/11/1976(H1N1) y A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2), sin embargo al procesar los sueros con el virus aislado en este estudio A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2) las muestras fueron positivas. El análisis filogenético entre diferentes virus obtenidos del GenBank muestran la relación filogenética entre ellos, en donde podemos observar que el virus reportado en este estudio se encuentra en un cluster diferente al virus de referencia. La variación genética constante de estos virus demuestra la evolución viral la cual conlleva a cambios antigénicos. Es necesario poner especial atención en granjas con brotes con falla reproductiva y considerar el uso del propio virus para ser usado por el laboratorio diagnóstico.

---

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to show the reproductive failure generated by new influenza virus H3N2 named A/swine/Mex/Mex51(H3N2) which show evolutionary divergence and genetic changes compared with reference virus A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2). Productive parameters were 83% of fertility, born dead of 6 to 8%, mummified piglets of 5.7 to 8% and pre-weaning mortality of 10 to 15%. With IH test we undetect antibodies against A/swine/NewJersey/11/1976(H1N1) and A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2) reference virus, however all samples were positive with virus isolated reported in this study A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2). Phylogenetic analysis between different strains obtained from GenBank shown the relationship between them and it observed that our virus is in different cluster than reference virus. The constant genetic variations demonstrate the evolution of these viruses shown antigenic changes. It has been proposed that special attention is required in the reproductive failure outbreaks and we should use of the suitable antigen for the laboratory diagnosis.

---

## CONTENIDO

Dedicatoria	Página II
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abstract	V
Cuadro de contenido	VI
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
Antecedentes	1
Etiología	1
Replicación viral	4
Patogenia	5
Signos clínicos	5
Diagnóstico	6
Prevención y control	6
Enfermedades diagnosticadas clínicamente en el Hato	7
Enfermedades Asociadas a Falla Reproductiva en Cerdos	8
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	9
<b>OBJETIVOS</b>	10
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	11
Manejo de granja	11
Parámetros reproductivos evaluados	12
Descripción clínica	12
Muestras enviadas al laboratorio diagnóstico	13
Aislamiento viral	14
Replicación viral	14
Secuenciación viral	16
Inhibición de la hemoaglutinación	17
IH Homóloga (Virus aislado)	17

---

<b>RESULTADOS</b>	19
Descripción del impacto reproductivo	19
Parámetros productivos	20
Espermatobioscopía	22
Resultados serológicos	22
Secuenciación viral	24
Análisis filogenético	25
<b>DISCUSIÓN</b>	26
<b>CONCLUSIONES</b>	31
<b>Lista de Gráficas</b>	
<b>Gráfica 1.</b> Seropositividad de hembras contra virus de referencia y el aislamiento viral obtenido de la granja.	32
<b>Gráfica 2.</b> Seropositividad en 16 sementales.	32
<b>Gráfica 3.</b> Lechones Nacidos Vivos del año 2006 al 2011	33
<b>Gráfica 4.</b> Lechones Nacidos Muertos del año 2006 al 2011.	33
<b>Gráfica 5.</b> Lechones Nacidos Momias del año 2006 al 2011	34
<b>Gráfica 6.</b> Lechones Nacidos Totales del año 2006 al 2011.	34
<b>Gráfica 7.</b> Parición del año 2006 al 2011.	35
<b>Gráfica 8.</b> Peso al nacimiento del año 2006 al 2011.	35
<b>Gráfica 9.</b> Número de lechones destetados del año 2006 al 2011.	36
<b>Gráfica 10.</b> Peso ajustado a los 21 días del año 2006 al 2011.	36
<b>Gráfica 11.</b> Porcentajes de fertilidad del año 2006 al 2011.	37
<b>Gráfica 12.</b> Tasa de Parición del año 2006 al 2011.	37
<b>Gráfica 13.</b> Mortalidad Pre-destete por número de parto del año 2006 al 2011.	38
<b>Gráfica 14.</b> Porcentaje de inventario Promedio del año 2006 al 2011.	38



---

**Figuras**

**Figuras 1.** Árbol filogenético del aislamiento viral con respecto a otros reportados. 39

**Bibliografía** 40

**APÉNDICE**

Secuencias completas del marco de lectura abierto 1 al 8 45

---

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes

La influenza porcina, es una enfermedad aguda respiratoria del cerdo que se observó por primera vez en 1918 en América del Norte, el virus implicado se recobró en 1930 y se clasificó como un *influenzavirus* tipo A subtipo H1N1, de la familia *Orthomyxoviridae*, desde entonces dicha enfermedad es endémica en Estados Unidos. En 1970 durante un brote de influenza porcina en Hong Kong, se proporcionó la primera evidencia de transmisión inter especies del virus de influenza, mediante el aislamiento del subtipo H3N2, que afecta a los humanos, más tarde la combinación del virus de influenza de Hong Kong (H3N2) y el virus de influenza porcino (H1N1) dieron origen a los subtipos H3N1 y H1N2 (Pensae, 1989; Plonait and Bickhardt, 2001; Lozano, 2006; Carrera, 2010).

A la fecha brotes de influenza porcina han sido reportados en Bélgica Brasil, Canadá, República de China, Colombia, Checoslovaquia, Dinamarca, Francia, Alemania, Gran Bretaña, Hong Kong, Korea, Iran, Italia, Japón, Kenya, Holanda, Polonia, Unión Soviética, Sudán, Taiwan y en Estados Unidos (Morilla *et al.*, 2002).

### Etiología

La Familia Orthomyxoviridae está formada por cuatro géneros del virus de influenza, el A, B, C y el Togavirus (algunas veces llamado virus de influenza tipo D). Los tipos A, B y C pueden ser diferenciados por las bases antigénicas de su nucleocápside (NP) y su proteína matriz (M).

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

El genoma del virus de Influenza tipo A está constituido por 8 segmentos de una cadena simple de RNA que codifican 10 proteínas.

Segmento de RNA	Proteína
1	PB2
2	PB1
3	PA
4	HA
5	NP
6	NA
7	M1+M2
8	NS1+NS 2

Los segmentos 1, 2, y 3 del RNA codifican las proteínas PB1, PB2 y PA. La función de las proteínas PB1, PB2 y PA es actuar como polimerasas. El segmento 4 del RNA codifica para las Hemaglutininas (HA), estas a su vez, son glicoproteínas que se localizan en la superficie del virus, tienen forma de barra, miden de 10 a 15 nm de largo y son aproximadamente 500 HA las que revisten al virus.

Las principales características y funciones de la hemaglutinina:

1. En ella radica la especificidad de infección de especie y tejido.
2. Su secuencia de aminoácidos o regiones de su estructura está asociado con la virulencia del subtipo viral.
3. Se une a receptores específicos que contienen ácido siálico localizado en la superficie de la célula.
4. Es la responsable de la penetración del virus al citoplasma de la célula mediante la fusión de la membrana y la endocitosis de la partícula viral con la membrana endosomal para la liberación de su nucleocápside en el citoplasma de la célula infectada.
5. Es el mayor antígeno del virus e induce la producción de anticuerpos neutralizantes.

---

El segmento 5 del RNA codifica la Nucleoproteína o Nucleocápside (NP), la cual como ya se había mencionado antes, es uno de los antígenos específicos para cada tipo del virus de influenza (A, B o C), además es la proteína que tiene mayor interacción con el RNA viral.

El segmento 6 del RNA codifica para la Neuraminidasa (NA), la cual es el segundo subtipo de las glicoproteínas del virus de influenza tipo A. Son aproximadamente 100 las NA presentes en la envoltura del virus, cada una de ellas está formada por una cabeza que es enzimáticamente activa y una región como tallo que le permite acoplarse a la membrana de la célula. La actividad enzimática de la NA remueve el ácido siálico presente en la membrana celular de las hemaglutininas del virus para liberar la progenie de viriones a partir de la célula huésped (Morilla *et al.*, 2002).

El virus de influenza tipo A se ha clasificado en subtipos, en función del carácter antigénico de las glicoproteínas de superficie, HA y NA. Existen 15 HA y 9 NA, denominadas correlativamente como H1 a H15 y N1 a N9.

El segmento 7 del RNA codifica dos tipos de proteínas la M1 y M2, la proteína M1 ó proteína de Matriz es el polipéptido más abundante del virus, constituye la base de la envoltura lipídica y provee de rigidez a la membrana viral ya que se localiza dentro de la envoltura lipídica, además interactúa con las glicoproteínas HA, NA, proteína M2 y con las ribonucleoproteínas (RNPs). La proteína M2 es una proteína integral de membrana del virus que se expresa de manera abundante en la superficie de la célula que ha sido infectada. La proteína M2 forma canales de iones activos los cuales son altamente específicos para protones (H<sup>+</sup>).

El segmento 8 del RNA codifica para las proteínas NS1 y NS2, la proteína NS1 se expresa en grandes cantidades en el núcleo de las células infectadas regulando la exportación de proteínas a partir su núcleo. Se pensaba que la proteína NS2 era una proteína no estructural, ahora se sabe que existe en los viriones y que forma una asociación con la proteína M1. Su localización en la célula infectada está en el citoplasma y el núcleo (Morilla *et al.*, 2002).

### **Replicación viral**

---

Las hemaglutininas del virus de influenza se unen a receptores específicos presentes en la membrana celular del huésped. Estos receptores son: el ácido N – acetilneuramínico  $\alpha$  2,3 para las aves, el ácido N – acetilneuramínico  $\alpha$  2,6 para el ser humano y ambos el ácido N – acetilneuramínico  $\alpha$  2,3 y  $\alpha$  2,6 para el caso del cerdo., estos receptores son una llave determinante en la restricción de la transferencia del virus de influenza directamente de las aves a los seres humanos sin mutaciones en el sitio de unión de las HA con el ácido siálico. Después de que los receptores de la membrana celular se unen fuertemente y con un alto grado de especificidad a las hemaglutininas comienzan el proceso de endocitosis. La endocitosis se lleva a cabo por medio de cavidades denominadas endosomas las cuales se caracterizan por tener un pH cercano a 5.0, el pH ácido activa los canales de iones activos del virus asociados a la proteína M2, estos canales permiten el flujo de iones del endosoma hacia el interior del virus para interrumpir la interacción proteína – proteína y liberar los RNPs de la proteína M1. Las RNPs liberadas en el citosol se dirigen y entran intactas en el núcleo celular a través de poros nucleares (Morilla *et al.*, 2002).

En cerdos, tres subtipos del virus de influenza A (H1N1, H1N2 y H3N2) han sido identificados en diferentes países, en Estados Unidos la enfermedad clínica había sido asociada principalmente con el subtipo H1N1 (Chambers *et al.*, 1991), sin embargo, a finales de 1998 muchas granjas de cerdos, al oeste de ese país experimentaron severos problemas de enfermedades respiratorias y reproductivas, en las que posteriormente se determinó que el brote fue ocasionado por el subtipo H3N2 (SIV), el cual fue aislado de cerdos clínicamente afectados (Zhou *et al.*, 1999; Webby *et al.*, 2000). En noviembre de 1999 en el estado de Indiana se reportó el aislamiento del subtipo H1N2 a partir de muestras obtenidas de un brote en donde se observaron problemas respiratorios y abortos. En la actualidad, los subtipos H1N1 y H3N2 de SIV coexisten en las poblaciones de cerdos en los Estados Unidos y se demostró que el virus H1N2 es una segunda generación de los subtipos H1N1 y H3N2 (Karasin *et al.*, 2000).

## **Patogenia**

---

El virus de influenza porcina se encuentra principalmente en las secreciones del tracto respiratorio de los cerdos que presentan un curso agudo de la enfermedad, se transmite por vía aerógena o por contacto directo y se absorbe por vía oro nasal. Una vez que las partículas virales han ingresado al huésped se adhieren a la mucosa del tracto respiratorio, penetran a la célula por medio de receptores específicos y se replican en las células de la mucosa nasal, tonsilas, traquea, linfonodos traqueobronquiales y pulmones, siendo estos últimos el principal órgano blanco (Majno and Joris, 1999; Straw *et al.*, 1999; Plonait and Bickhardt, 2001).

Estudios de inmonofluorescencia con tejido pulmonar demostraron la rápida replicación del virus y su alto tropismo para el epitelio bronquial. A las 2 horas pos infección el antígeno se detecta en las células del epitelio nasal, a las 4 horas en el septo alveolar, a las 16 horas en las células del epitelio bronquial y en un periodo de 24 – 72 horas el virus alcanza su máxima concentración en los bronquios, ductos alveolares y alveolos, después de 72 horas la concentración del virus empieza a disminuir, al 9° día post-infección no se observa fluorescencia en bronquios, bronquiolos, ductos alveolares y alveolos, observando en este día la máxima respuesta celular del epitelio bronquial, septo alveolar, área peribronquial y perivascular; después de 2 semanas post-infección los cerdos llegan a recuperarse de la enfermedad (Pensae, 1989; Straw *et al.*, 1999; Avalos *et al.*, 2008).

### **Signos clínicos**

La replicación del virus en los cerdos infectados generalmente está limitada al tracto respiratorio y los signos de la enfermedad aparecen súbitamente observando tos, descargas nasales y oculares, estornudos, heces pastosas, letargia, anorexia, disnea e hipertermia ( $\geq 41$  °C). Frecuentemente se observa que los animales jóvenes rehúsan a moverse y los animales adultos pierden el apetito; en estos últimos la actividad reproductiva puede verse afectada, en particular cuando se encuentra el subtipo H3N2 (Plonait y Bickhardt, 2001; Morilla *et al.*, 2002).

### **Diagnóstico**

---

Los signos clínicos generados no se asocian a un subtipo en particular, la subtipificación del virus debe determinarse con pruebas de laboratorio. El primer paso es la detección del antígeno de influenza porcina tipo A mediante el aislamiento del virus, a partir de la inoculación de embriones de pollo de 9 – 10 días de edad o de cultivo celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK cell line), con la determinación del subtipo mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH) o con la prueba de la inhibición de la neuraminidasa utilizando antisuero específico para cada subtipo (Murphy y Webster, 1996).

Otras pruebas de diagnóstico utilizadas son: Inmuno-histoquímica, Anticuerpos Fluorescentes (AF), ELISA considerada como la prueba serológica más sensible (Takimoto *et al.*, 1991), e histopatología a partir de muestras de tejido pulmonar.

La presencia del virus también puede determinarse por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a partir de exudados nasales (ante mortem) y de tejido pulmonar (pos mortem), comparado con el aislamiento viral y la detección de anticuerpos con las técnicas de ELISA o IH, también permite identificar el subtipo o los subtipos presentes en las muestras mediante la técnica de PCR múltiple. (Choi *et al.*, 2002).

### **Prevención y control**

El tratamiento para las infecciones durante los brotes agudos, se limita a terapia de soporte: administrando antipiréticos, antibióticos y reduciendo el estrés.

Para reducir el riesgo de que el virus entre a la granja es necesario limitar el acceso a personas y vehículos, los camiones de transporte deben ser lavados y desinfectados apropiadamente y los animales recién llegados deben cuarentenarse antes de ser incorporados a la población de la granja. Para minimizar las pérdidas reproductivas por la infección, se recomienda vacunar a las cerdas y verracos de reemplazo, así como a las cerdas preñadas antes del parto (Pensae, 1989; Straw *et al.*, 1999; Morilla *et al.*, 2002).

### **Enfermedades diagnosticadas clínicamente en el Hato**

---

### Parvovirus porcino

Desde antes del 2007 se había diagnosticado por la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación, la enfermedad de parvovirus porcino en hembras de diferentes partos, expresándose clínicamente con incremento de hasta el 7% en el porcentaje de fetos momificados, cerdos nacidos débiles; una notable baja de la fertilidad e incremento en el número de repeticiones.

### Circovirus porcino

La enfermedad de circovirus porcino (PCV) ocasionada por un virus de la familia circoviridae, que durante mucho tiempo se consideró ubicuo para las granjas sin producir enfermedad en los cerdos. Esta enfermedad se presentó clínicamente en el hato con retraso en el crecimiento, emaciación, neumonía, palidez, ictericia y mortalidad del 12-15%. Se realizó el diagnóstico confirmatorio con la prueba de PCR en muestras de lechones débiles con ictericia, así como en muestras de pulmón de lechones destetados con retraso en el crecimiento. El PCV2 se le relacionó con el síndrome de desgaste multisistémico post-destete (PMWS) así como con el síndrome de dermatitis nefro-pático porcino (PDNS) en la etapa de crecimiento y engorda. La transmisión puede ser por vía oro-nasal de forma horizontal, aunque también de forma vertical; es importante mencionar que la presencia de PCV2 como un asociado a la falla reproductiva.

### Leptospirosis

En el hato se presentaron algunos abortos en hembras del área de gestación en el mes de agosto del 2009, únicamente con un desalojo del vientre materno prematuramente hacia el tercer tercio de gestación. Estos casos de leptospirosis se relacionaron con la presencia de perros dentro de la granja, así como al encharcamiento del agua en los corrales de gestación.

### Influenza porcina



A finales del año 2007 se observaron signos clínicos de lagaña y epífora en lechones durante la lactancia, presencia de tos pasajera con ligera disnea y flujo nasal cristalino y en algunos periodos con ligero estornudos. Las cerdas presentaron flujo nasal cristalino y sin signos aparentes, algunas presentaron anorexia por uno o dos días y hubo un brote de abortos en hembras gestantes con diferente tiempo de gestación. Incrementó el número de repeticiones por reabsorción embrionaria y disminuyó el porcentaje de fertilidad. Los sementales no presentaron signos clínicos aparentes, salvo ligera disminución de líbido en un corto periodo de tiempo.

### Enfermedades Asociadas a Falla Reproductiva en Cerdos

Enfermedad	Etiología	Signos clínicos	Diagnóstico	Tratamiento y control
Parvovirus Porcino	Parvovirus porcino (DNA)	Infertilidad mortinatos camadas pequeñas	Inmunofluorescencia Inhibición de hemaglutinación PCR	Vacunación
Enfermedad de Aujeszky	Herpesvirus Porcino tipo 2 (DNA)	Nerviosos Abortos Semen	ELISA Virusneutralización	Vacunación
Enfermedad del Ojo Azul	Rubulavirus porcino (RNA)	Abortos Repeticiones Orquitis	Inhibición de hemoaglutinación Inmunofluoresc. Indi. ELISA	Manejo
Fiebre Porcina Clásica	Pestivirus porcino (RNA)	Fiebre Anorexia Abortos Lechones débiles	Inmunofluorescencia ELISA PCR Aislamiento viral	Vacunación
PRRS	Arterivirus porcino (RNA)	Abortos Repeticiones Infertilidad	Elisa PCR Inmunofluorescencia	Manejo Vacunación
Leptospirosis	<i>Leptospira spp.</i>	Fiebre Abortos Nacidos muertos	Microaglutinación Inmunofluorescencia	Medicación
Circovirus Porcino	Circovirus porcino tipo 2 (DNA)	Emaciación Falla reproductiva	ELISA PCR	Vacunación

### JUSTIFICACIÓN

---

La presencia de la enfermedad de influenza porcina actualmente ha tomado mayor importancia debido a la pandemia del año 2009 ocasionada por un virus de influenza tipo A, del subtipo H1N1 que afectó a humanos. Debido a esta situación, la industria porcina tuvo afecciones comerciales, ya que los cerdos fueron señalados como responsables del brote en humanos.

Desde finales del año 2007 se observó un problema clínico reproductivo en hembras y en sementales de una granja del Estado de México que no se pudo diagnosticar, debido a que las pruebas de laboratorio empleadas de biología molecular (reacción en cadena de la polimerasa PCR) con los primers diseñados para los subtipos de influenza estacionales (H1N1 y H3N2) no generaron ningún amplicón, por tal motivo se hizo una serie de estudios para tratar de determinar el agente etiológico que ocasionaba el problema reproductivo.

## **OBJETIVOS**

- 
- Reportar el comportamiento reproductivo de un brote de influenza atípica en una granja del Estado de México.
  - Comprobar la presencia de un virus de influenza porcina diferente a los virus de referencia utilizados en laboratorio.
  - Determinar si es factible de hacer diagnóstico serológico del agente etiológico causal del problema aquí descrito.
  - Determinar si la presencia del nuevo virus influye en el desempeño reproductivo del hato.

## **MATERIAL Y METODOS**

---

A partir del mes de octubre 2007 se identificaron manifestaciones clínicas reproductivas en una granja, localizada en el Estado de México, de 250 vientres considerada como sitio 1 y sitio 2 (reproductoras-destete).

En esta granja se realiza un 100% de inseminación artificial haciendo la recolección y dilución del semen en la propia granja.

#### Manejo de la granja

Se realizó una vacunación en sábana contra el circovirus porcino (PCV2) vacuna comercial, a todo el pie de cría en diciembre del año 2007.

Se aplicó una vacunación en sábana, el 10 de noviembre del 2008 en forma general y repetición 21 días posteriores a la primera aplicación, contra el virus de Influenza porcina (vacuna comercial subtipo H3N2 y H1N1), En hembras reproductoras, esta vacuna se continuó aplicando 10 semanas antes del parto.

#### Calendario de vacunación

##### Reemplazos

- Erisipela 98 y 119 días edad
- *Haemophilus parasuis* 139 y 164 días edad
- Parvovirus 182 y 203 días edad
- Circovirus 224 y 245 días edad
- Influenza 266 días edad

##### Gestación

- Influenza 6ª semana
- *Haemophilus parasuis* 8ª semana
- Circovirus 10ª y 13ª sem.

##### Maternidad

Vacuna triple (parvovirus, leptospira y erisipela) a los 10 días de lactancia.

##### Destetes

- Circovirus 42 días

### Parámetros reproductivos evaluados

Para establecer la relación de la presencia del virus con el impacto productivo se evaluaron mensualmente los siguientes parámetros: fertilidad al parto, el número de lechones totales, nacidos vivos, nacidos muertos, momias. A su vez se determinó la mortalidad en la lactancia (mortalidad pre-destete) y se pudo obtener el número de cerdos destetados por hembra. Los años evaluados son 2006, 2007, 2008, 2009, 2010 y 2011.

### Descripción clínica del brote: Octubre 2007

Al interior de la granja en el área de maternidad se manifestaron signos de palidez y debilidad en los lechones al nacimiento; en algunas cerdas se presentaron agalactia, anorexia, ligero flujo nasal cristalino, fiebre.

En el área de destete se manifestaron signos respiratorios: disnea, tos y estornudos; en algunos casos incoordinación, en otros, con nistagmo; algunos mostraron palidez, adelgazamiento, y algunos con lesiones en piel de forma difusa, con distribución generalizada. Hubo muertes asintomáticas sin causa aparente que a la necropsia se observaron nódulos linfáticos inguinales aumentados de tamaño, y en general la mayoría se encontraban agrandados; algunos cerdos con ascitis y adherencias; los pulmones mostraron ligera neumonía.

En el área de gestación se observaron cerdas con flujo nasal, anorexia y algunas con apatía; se presentaron algunos abortos en el primero, segundo y tercer tercio de gestación, sin ser de carácter explosivo; se incrementó el número de repeticiones de en hembras que llevaban más de 30 días de haber sido inseminadas y que no habían repetido celo a los 21 días, esto asociado a reabsorciones embrionarias.

Los sementales se mostraban sin problemas clínicos aparentes; esporádicamente, alguno con líbido disminuido, sin causa aparente.

Muestras enviadas al laboratorio de diagnóstico

---

Se obtuvieron 30 muestras de sangre de cerdas lactantes y gestantes y 16 muestras de sangre de sementales, mediante el sangrado en la vena yugular, se enviaron en refrigeración al laboratorio de diagnóstico para realizar pruebas serológicas para detección de anticuerpos por medio de las pruebas:

ELISA. Para el diagnóstico de circovirus porcino tipo2 (kit INGENASA), PRRS (Kit IDEXX) y enfermedad de Aujeszky (Kit HYPRA GI).

Inhibición de la hemoaglutinación (IH). Para el diagnóstico de influenza porcina (subtipos H1N1 y H3N2), parvovirus porcino (virus de referencia vacunal) y enfermedad del ojo azul (Cepa PAC-3).

Micro aglutinación en placa (MAP). Para el diagnóstico de leptospirosis hacia 17 diferentes serotipos.

Observación en campo oscuro. Se enviaron fetos abortados en fresco para la observación directa de formas semejantes a *Leptospira spp.*, usando el microscopio de campo oscuro.

Evaluación de semen por espermato-bioscopia. Se colectaron muestras de semen, para evaluación en fresco (es decir que se procesó dentro de las primeras dos horas después de ser colectado) para realizar la evaluación espermática.

Transcriptasa Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Se colectaron muestras de fetos abortados, pulmones y semen para la prueba de PCR para la detección del virus de Influenza Porcina, PRRS y Circovirus Porcino, mediante las técnicas desarrolladas en el laboratorio diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, FMVZ, UNAM.

RT-PCR con primers para el gen de matriz (M). Se utilizaron fetos abortados, pulmones y semen, para la prueba de RT-PCR con los primers dirigidos al gen M (Matriz) del virus de influenza porcina, usando los siguientes iniciadores SIVM-

---

F(5´TGAGTCTTCTAACCGAGGT3´) y SIVM-R(5´AGCGTCTACGCTGCAGTC 3´). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo a 50 ° C por 30 minutos, un ciclo a 95 ° por 15 minutos, 35 ciclos a 94 ° C por 30 segundos, 60 ° C por 60 segundos y 72 ° C por 60 segundos y una extensión final a 72 ° C por 10 minutos. Una vez obtenido el producto de PCR se realizó la electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% tenido con bromuro de etidio y visualizado en un fotodocumentador GelLogic 112 marca Kodak, con el Kit de QIAGEN OneStep RT-PCR, CAT. No. 210212.

#### Técnica de aislamiento viral (Huges, 2007)

Se colectaron muestras de pulmón y semen de animales con signos sugerentes al problema reproductivo (las muestras se mantuvieron en congelación hasta el momento de ser trabajadas).

El macerado se realizó en un mortero o utilizando una licuadora estéril. Una vez realizado el macerado se filtro de manera no estéril por membranas de pre filtro, 1.2, 0.8, 0.65, 0.45 y 0.22 micras; este último filtrado se pasó por una membrana de 0.22 micras utilizando material estéril y en una campana de flujo laminar, este último filtrado fue utilizado para inocular los embriones de pollo (Mercado, 2007).

Todo el proceso de filtración se realizó con refrigerantes.

Previamente se tenían al menos 5 embriones de pollo de 9-11 días de edad que se inocularon con cada muestra sospechosa, incluyendo los que fueron inoculados con los virus de referencia H1N1 y H3N2 y los controles negativos.

#### Replicación viral

Que se realizó bajo campana BSL-2, dentro del Laboratorio BSL-3 del Laboratorio Diagnóstico del DMZ: Cerdos, FMVZ, UNAM (Método de Prueba DMZC, FMVZ, UNAM).

- Con el ovoscopio se marcó la cámara de aire y la posición del embrión. Los embriones que habían muerto fueron eliminados.
- Se desinfecto con alcohol el área donde se encuentra la cámara de aire.
- Se realizó una pequeña perforación del lado opuesto del embrión.

- 
- Los embriones fueron inoculados con 200µl del macerado y de los controles positivos (H1N1 y H3N2) a través del orificio por medio de una jeringa para insulina.
  - Se cubrió el orificio con pegamento blanco.
  - A los embriones control negativo se les realizó la perforación, se inoculo 200µl de MEM y se cubrió el orificio con pegamento blanco.
  - Se dejaron incubar en estufa de al menos 37°C.
  - A las 24 horas se revisaron los embriones. Los embriones muertos fueron eliminados ya que se considera que su muerte fue debida a la manipulación durante la inoculación y no debida al efecto del virus.
  - Se revisaron diariamente hasta las 72 horas y a los embriones que murieron a partir de las 48 horas se les colecto el líquido corioalantoideo en tubos vacutainer estériles.

#### Colección del líquido corioalantoideo

- Se limpió el área de la cámara de aire con alcohol.
- Se cortó el cascarón siguiendo la línea que indica la ubicación de la cámara de aire.
- Se extrajo el líquido corioalantoideo de cada embrión y se depositó de manera individual en tubos vacutainer estériles.
- Esta colección se realizó por medio de micropipetas de 1000 µl.
- Los líquidos colectados fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos.
- Las muestras fueron tituladas en placas de 96 pozos utilizando eritrocitos de ave al 0.5%, para eliminar los sobrenadantes que son negativos y alicuotar los positivos.
- Si no existía actividad aglutinante a partir del primer pase, se procedió a repetir todos los pasos anteriores para realizar un segundo pase.

#### Titulación de virus

Se tituló por hemoaglutinación de la siguiente manera:

- Se colocó 50µl de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con un PH de 7 a 7.2 en una placa de micro titulación de 96 pozos con fondo en “U”.



- 
- Se colocó 50µl de virus y se realizaron diluciones dobles seriadas desde 2 hasta 4096.
  - Se colocó 50µl por pozo de una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5% (previamente preparados con PBS) en toda la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta que sedimentaron los botones de control de eritrocitos para posteriormente realizar la lectura.
  - El título del virus se ajustó a 8 UH para la realización de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación.

Una vez que se sabía que había virus de influenza tipo A (mediante RT-PCR dirigido al gen M) se realizó aislamiento viral de influenza a partir de muestras de pulmones y del semen. Ya que teníamos replicado el virus se realizó la prueba de IH contra éste, así como contra los subtipos descritos anteriormente (H1N1 y H3N2) con la finalidad de identificar la seropositividad del subtipo viral presente en la granja y compararlo con los subtipos típicos estacionales (Gráfica 1 y 2).

Secuenciación viral. Las muestras positivas a influenza porcina por la prueba de RT-PCR fueron remitidas y procesadas en la unidad de secuenciación masiva del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con el equipo Illumina, el cual se encuentra en la Unidad de Secuenciación.

Para tratar de relacionar la signología antes descrita, se enviaron a laboratorio muestras de suero, y se solicitaron pruebas de inhibición de la hemaglutinación para observación de anticuerpos contra influenza porcina con los subtipos de referencia, así como contra el virus aislado en la propia granja.

---

### Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH)

Esta prueba se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Snyder (1989).

- Se utilizó placas de micro titulación de 96 pozos de fondo en “U”.
- Se colocó 50 µl de PBS en toda la placa.
- Se colocó 50 µl de cada uno de los sueros en la fila “A”.
- Se realizaron diluciones dobles seriadas de la fila “A-H”.
- Se colocó 50 µl de antígeno de VIP previamente diluido con 8 UH de la fila “B-H” y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30min.
- Se colocó 50 µl de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5 % a toda la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta que sedimentaron los eritrocitos para poder realizar la lectura.
- Se colocó un testigo de virus con 50 µl de PBS + 50 µl de antígeno + 50 µl de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%.
- Se colocó un control de eritrocitos con 50 µl de PBS + 50 µl de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%.
- Las diluciones de los sueros fueron a partir de 1:10 hasta 1:1280 y se consideraron positivas aquellas muestras con un título mayor o igual a 1:80.

### IH homóloga (virus aislado)

La prueba se utilizó para detectar la presencia de anticuerpos específicos de cada aislamiento con su suero hiper-inmune respectivo por medio de la IH. Las diferentes diluciones dobles de los sueros se pusieron en contacto con el virus en cantidades constantes (8 UH) para que se llevara a cabo una reacción antígeno-anticuerpo y el virus fuera neutralizado por anticuerpos específicos. La reacción fue evidenciada por medio de eritrocitos de ave, los cuales en ausencia de anticuerpos aglutinaron (suero negativo) y en presencia de anticuerpos sedimentaron (suero positivo). Las diluciones de los sueros iniciaron con 1:10 hasta 1:20480 y se consideró un título positivo a partir de una dilución de 1:80. La lectura se realizará

---

tomando la dilución inversa a donde comience a observarse la aglutinación de cada uno de los sueros.

---

## RESULTADOS

### Descripción del impacto reproductivo

Inicialmente se detectó en relación con sus parámetros reproductivos que era una granja que tenía una buena fertilidad al parto, pero a partir de los últimos meses del 2007, decrecieron los nacidos vivos, se incrementaron los nacidos muertos y fetos momificados. La mortalidad en maternidades se incrementó, se redujo el promedio de lechones destetados por hembra y disminuyó la fertilidad. Estas fueron las primeras evidencias de que había falla reproductiva (Ver en gráficas).

Después de que se incrementaron los nacidos muertos al nacimiento, en los lechones nacidos vivos, se empezaron a detectar animales débiles y pálidos, que posteriormente morían; así mismo se incrementó el número de cerdos retrasados, se presentaron esporádicamente lechones con trastornos nerviosos, y en su mayoría los lechones presentaban problemas respiratorios, lo cual incrementó la mortalidad hasta el 8% en la etapa de lactancia.

En las hembras reproductoras se observaron ciclos irregulares, abortos y algunas hembras murieron repentinamente.

Esto representó una disminución de la fertilidad al parto entre un 5 al 7%. En los sementales no se observan lesiones o signos clínicos aparentes; la falla en sementales se inició a principios de octubre del 2007, afectando a un solo semental, pero posteriormente se fueron afectados todos los sementales que se tenía en la granja; también es importante mencionar, que la falla reproductiva era recurrente; es decir, se trabajaba en la semana de montas un mismo semental presentaba mortalidad espermática en diferentes colectas.

También se presentaba azospermia, la cual no era permanente, sin embargo se observó: aglutinación, baja viabilidad espermática y espermatozoides muertos.

---

## Parámetros productivos

En la gráfica del parámetro Lechones Nacidos Vivos (LNV) (Gráfica 3) se observa que el comportamiento del nacimiento de lechones vivos de cada año es diferente, en el año 2009 se observa que se rebasan los 10 nacidos vivos y a partir de ahí se mantiene con una ligera disminución, con tendencia a aumentar el número de LNV.

En la gráfica 4 se observa que el porcentaje de nacidos muertos en el año 2007 es mayor al 6%, que se incrementa para el 2008 hasta un 8.3% y luego empieza a disminuir.

La Gráfica 5 representa el número de lechones nacidos momias a lo largo de los años, en donde se observa en el 2007 el porcentaje de momias al nacimiento se ve incrementado hasta un 8%, aunque nunca se disminuye por abajo del 5.7% a lo largo del estudio.

En la gráfica 6 se muestra el número de lechones nacidos totales a lo largo de los años, en donde el número total de lechones nacidos ha rebasado los 10.5 nacidos totales, llegando incluso a ser mayor a los 11 nacidos totales durante los años posteriores al 2008.

La gráfica 7 muestra el porcentaje de parición. Durante el año 2006 se tiene una estructura de hato entre 3 y 3.5.; para el año 2008 el hato aumenta su número de parto y para el 2009 el hato se envejece, de tal manera que para el 2010 se renueva el hato y para el 2011 se va madurando.

Grafica 8. En los primeros años de evaluación del peso al nacimiento fue menor a 1.5kg mientras que a medida que avanza el tiempo el peso se incrementa hasta 1.77kg.

La Gráfica 9 muestra el número de lechones destetados. Durante los años de 2007 y 2008 es cuando se muestra el menor número de lechones destetados en promedio, para el año 2009 y siguientes se tienen destetes mayores a los 8.8 lechones destetados en promedio.

---

En la Gráfica 10 podemos observar que durante los primeros años de estudio se observa un peso menor a los 6 kg a los 21 días de edad, y a partir del 2008 el peso está por encima de los 6 kg a los 21 días de edad.

La Gráfica 11 muestra los porcentajes de fertilidad a través de los años. En donde se observa que la fertilidad se ha afectado negativamente en los diferentes años, siendo a finales del 2007 y a la mitad del 2008 cuando se encuentra la menor fertilidad y al llegar al 2011 la fertilidad cae nuevamente de manera más drástica por efecto del ingreso de PRRS que fue diagnosticado en febrero del año 2011.

Gráfica 12. La tasa de parición evidencia el daño productivo generado por la infección de PRRS diagnosticada por RT-PCR en los primeros meses del 2011, verificando un diagnóstico negativo en muestras remitidas de la misma granja, en muestreos previos a esta fecha. Lo cual concuerda con los porcentajes de la tasa de parición años anteriores.

La gráfica 13 muestra el parámetro Mortalidad Pre-destete. Con esta gráfica se evidencia que la mortalidad más alta en lactancia se identifica a partir del año 2008, detectando las primeras muestras positivas a influenza porcina por RT-PCR dirigido al gen de Matriz, en febrero del año 2008.

En la gráfica 14 se evidencia un alto porcentaje de hembras jóvenes que son susceptibles a enfermedades, que quizá permitió la entrada de PRRS en el 2011 y a su vez el movimiento de parvovirus que se manifestó con un alto porcentaje de lechones momificados. En el 2006 hay un alto porcentaje de hembras jóvenes que genera en el año 2007 más del 7% de fetos momificados (ver gráfica), quizá este parámetro también pudo verse aumentado debido a la presentación del virus H3N2 aislado en la granja y reportado en el presente estudio. En esta gráfica podemos ver que en el año 2010 hubo más del 40% de hembras jóvenes, lo cual permitió la desestabilización inmunológica de hato, que pudo haber favorecido la entrada del virus de PRRS un año después (2011).

---

## Espermatobioscopia

Los resultados de esta prueba registraron las siguientes alteraciones en semen: azospermia, aglutinación, baja viabilidad y espermatozoides muertos.

## Resultados serológicos

### Enfermedad de Aujeszky

Todos los sueros remitidos al laboratorio diagnóstico resultaron negativos por la prueba de ELISA para esta enfermedad.

### Enfermedad del ojo azul

Los sueros examinados por prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación fueron negativos.

### Circovirus porcina

Los resultados de los sueros con la prueba de ELISA fueron positivos con valores de densidad óptica de 1 a 2 veces más que el punto de corte (0.04).

Los resultados de los tejidos enviados de pulmón y fetos fueron positivos por la prueba de PCR, excepto las muestras de semen, las cuales resultaron negativas.

### Enfermedad de parvovirus porcino

De los sueros enviados al laboratorio para realizar la prueba de inhibición de la Hemoaglutinación IH, los resultados obtenidos fueron positivos (>1:400).

### Enfermedad de leptospirosis porcina

De los sueros enviados al laboratorio para la prueba de microaglutinación, se obtuvo un solo caso positivo a *Leptospira bratislava*, con el mínimo título para tomarla como positiva; y negativos todos los sueros al resto de los serotipos: *Leptospiras australis*, *L.ballum*, *L.grippotyphosa*, *L.hicterohaemorrhagiae*, *L.pomona*, *L.serjoe*, *L.tarassovi*, *L.autumnalis*, *L.vataviae*, *L.canícola*, *L.hardjo*, *L.panama*, *L.pyrogenes*, *L.shermani*, *L.wolffi*.

El diagnóstico por observación en Campo Oscuro se observaron algunas formas semejantes a *leptospiras spp.*

Enfermedad del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRS)

Se enviaron muestras de suero al laboratorio para el diagnóstico de PRRS obteniendo seronegatividad mediante las pruebas de ELISA, con los kits de laboratorios IDDEX así como de HYPRA.

En cuanto a la prueba de RT-PCR con primers dirigidos al ORF 5, los resultados fueron negativos.

En relación a la enfermedad de influenza porcina

El primer envío de muestras al laboratorio Diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de cerdos de las 30 cerdas seleccionadas con signos sugerentes a falla reproductiva, se procesaron mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación contra influenza porcina y se obtuvieron resultados negativos hacia los subtipos A/swine/NewJersey/11/1976(H1N1) y A/swine/Minnesota/9088-2/98(H3N2).

Resultados de prueba IH

	OJO AZUL	(H1N1) *	(H3N2).**	H3N2, Virus aislado***	Parvovirus porcino
30 HEMBRAS	0 (0%)	3 (10%)	3 (10%)	30 (100%)	29 (97%)
16 MACHOS	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	16 (100%)	14 (88%)
46 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (7%)	46 (100%)	43 (93%)

\*Virus de referencia A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1)

\*\*Virus de referencia A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)

\*\*\*Virus aislado A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)

Se enviaron muestras de pulmones y semen, para la identificación de la presencia del virus de influenza porcina en sus órganos, mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); dando resultados negativos con los primers dirigidos a estos subtipos virales H1N1 y H3N2 de referencia.

RT-PCR para el gen de matriz (M) de influenza tipo A

Se observó que amplificaron bandas de aproximadamente 239 pb (pares de bases), las cuales correspondían al gen M, de influenza tipo A, de acuerdo a la metodología descrita en material y métodos.

Resultados de pruebas moleculares PCR

	PRRS	CIRCOVIRUS	INFLUENZA* H1N1	INFLUENZA** H3N2	INFLUENZA GEN M***
10 pulmones	0 (0%)	7 (70%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (80%)
10 semen	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)
Positivos/total	0 (0%)	7 (35%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (60%)

\*Virus de referencia A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1)

\*\*Virus de referencia A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)

\*\*\*Virus aislado A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)

Aislamiento viral de influenza porcina



---

El resultado de aislamiento viral de influenza en embrión de pollo fue positivo al segundo pase, observando aglutinación en eritrocitos de ave al 0.5% con un título de 8 Unidades Hemoaglutinantes (UHA).

#### Secuenciación viral

El virus detectado por RT-PCR con el gen de Matriz y posteriormente aislado, fue secuenciado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca Morelos.

El virus aislado tiene linaje H3N2 y fue analizado filogenéticamente el cual adquirió la nomenclatura: A/Swine/Mexico/51/2010/H3N2 y los números de acceso de cada uno de sus genes al GenBank son (CY122346, CY122347, CY122348, CY122349, CY122350, CY122351, CY122352, CY122353). Este virus secuenciado tiene la característica de ser un virus genéticamente diferente al virus de referencia A/swine/Minnesota/1989/H3N2 (Figura 1).

La **gráfica 1** muestra la seropositividad de las hembras reproductoras enfrentando sueros contra los virus de referencia A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1) GeneBank access K00992 y A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) (GeneBank access No: AF153234). En donde se observa una negatividad en hembras de 0 - 3er parto, contra los virus de referencia pero una seropositividad del 100% contra el virus que se reporta en este estudio.

En la **gráfica 2** podemos demostrar que los sementales eran seropositivos, sin embargo se evidencia que 3 de ellos D58, D70 y HD75 presentaban los títulos más altos (1:1240) del nuevo antígeno viral.

#### Análisis filogenético

---

El árbol filogenético se realizó por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de sustitución GTR + G. Árbol filogenético de los dos aislamientos virales (diamante violeta). Se analizaron 49 secuencias de nucleótidos, que están representadas en 2 ramas diferentes. La primera de ellas es la rama superior que da origen a secuencias de H3N2 reportadas en humanos en diferentes años, sin embargo las dos secuencias reportadas en este estudio *A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2)* y *A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)* se encuentran filogenéticamente relacionadas a una secuencia reportada en humanos en Indiana E.U. en 1999 del subtipo H1N2, así como en otra cepa del subtipo H3N2 reportada en Wisconsin en el año del 2002. Cabe mencionar que la cepa reportada en este estudio se encuentra en un cluster independiente al resto de las cepas H3N2 reportadas en el GenBank. En la otra rama se observan las cepas pandémicas y no tienen ninguna relación filogenética con las reportadas en nuestro estudio.

---

## DISCUSIÓN

La influenza Porcina es una enfermedad altamente contagiosa, capaz de ocasionar una morbilidad del 100% y una mortalidad del 1% hasta el 100%, dependiendo del subtipo viral y la rápida diseminación en poblaciones de animales susceptibles; pueden ser afectados por subtipos provenientes de otras especies, y la severidad del daño ocasionado en el nuevo hospedador, dependerá de la capacidad de adaptación del virus (Ellis *et al.*, 1997)

Los resultados demuestran que fue una enfermedad generada por un subtipo viral diferente al virus de referencia: (A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) reportado anteriormente, lo cual generó una presentación clínica que se confundía con otras enfermedades; apoyados en técnicas serológicas, como la IH, con anticuerpos específicos, así como la prueba de RT-PCR dirigida a un gen conservado (Gen M), fue posible determinar que estaba presente un nuevo virus infectando a los animales. (Brown, 2000).

El análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud (ML) con un modelo de sustitución GTR + G. Árbol filogenético para el **gen HA-3** de los siete aislamientos virales (diamante violeta), basado en secuencias de nucleótidos y otras secuencias disponibles en el GenBank. Se analizaron 49 secuencias de nucleótidos, que están representados en 2 ramas diferentes. La primera de ellas es la rama superior que da origen a secuencias de H3 reportadas en humanos en diferentes años, sin embargo las dos secuencias reportadas en este estudio A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2) y A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2) se encuentran filogenéticamente relacionadas a secuencias reportadas en la década de los 90s en estados Unidos. Y en otro cluster se encuentran secuencias de origen asiático, reportado entre el año 2005 y 2007. Esto indica que la hemaglutinina 3 de virus mexicana proviene de subtipos porcinos H3N2 reportados en estados Unidos 2 décadas atrás.

Esta nueva secuencia del virus de Influenza porcina obtenida, pretende ser el primer reporte clínico con una afección principalmente reproductiva en hembras de pie de cría, y que está estrechamente relacionado con un virus reportado en el 2006 en Korea

---

(A/swine/Korea/CAS09/2006(H3N2)) y con dos subtipos H1N2 (A/duck/NC/91347/02(H1N2) y (A/swine/Indiana/9K035/99(H1N2)).

Es debido a que la prueba de IH fue negativa con los virus de referencia, que podemos asumir que ni el H1N1 ni el H3N2, tienen relación antigénica con este nuevo virus reportado; por tal motivo este virus solamente podrá ser diagnosticado a través de pruebas de laboratorio: como aislamiento y tipificación del virus por secuenciación. Es necesario mencionar que las manifestaciones clínicas generalmente están enmascaradas, o relacionadas a la presencia de otros microorganismos que genera falla reproductiva, por tal motivo será más difícil poder identificar este virus de influenza como responsable directo de la falla reproductiva.

Con los resultados de variación antigénica: obtenido en un estudio alterno a éste, reportado por (Juárez *et al.*, 2013), se puede asegurar que existen virus antigénicamente diferentes, que se encuentran circulando en la población porcina de México. (Carreón *et al.*, 2005). También, se puede asegurar que los resultados del diagnóstico serológico de los laboratorios, están determinados por el virus que maneje el laboratorio diagnóstico, ya que un suero generado por un virus de campo, antigénicamente diferente, puede dar resultados falsos negativos.

Esto también tiene implicaciones en el control de la enfermedad, ya que si las vacunas comerciales que actualmente existen no contemplan antígenos “semilla,” con capacidad antigénica protectora, seguirán circulando los virus que no hayan sido controlados por los anticuerpos vacunales y se presentarán variantes virales como la reportada en este estudio.

La aparición en el año 2009 de un brote de influenza causado por una nueva cepa viral: A/H1N1 Pandémico en humanos, nos sugiere que es muy importante disponer en México de sistemas de monitoreo permanente, que nos permitan predecir las cepas prevalentes en nuestro país, así como conocer su distribución y su capacidad de transmisión, que nos permita diseñar programas adecuados para su prevención y control en las diferentes especies.

---

Este trabajo justifica la importancia y la necesidad de realizar un estudio epidemiológico, para determinar el contacto de los cerdos con el virus de influenza: información que permitiría implementar medidas preventivas, para minimizar el impacto clínico por esta nueva variante H3N2 de influenza en cerdos, nominada: A/Swine/Mexico/Mex51/2009(H3N2).

Por otro lado, hay que mencionar que el cerdo ha sido inculcado como responsable de las recombinaciones de virus provenientes de aves y humanos; debido a que presenta los receptores celulares de ambas especies (Humano  $\alpha$ -2,6; Aves  $\alpha$ -2,3), sin embargo se ha reportado que los virus rearrreglantes, independientemente de la especie de la que provengan, tienen la capacidad de unirse a receptores celulares  $\alpha$ -2,8 que existe solamente en la especie humana (Wenxin y Gillan, 2004), lo cual podría implicar que el ser humano juega un papel fundamental (hasta el momento no reportado) como hospedero y transmisor de subtipos virales que no son propios de la especie. Podría estar jugando un papel de hospedero intermediario, como lo es el cerdo, y esto es fundamentado con el reporte que hace la Organización Mundial de la Salud, en donde se puede observar que hay casos en el continente asiático del virus H5N1 de alta patogenicidad de origen aviar.

El riesgo constante de la presentación de las pandemias por los virus de influenza tipo A, a nivel mundial, generan una gran preocupación a las autoridades de salud, debido a que existen subtipos virales en donde cada especie puede ser afectada por uno o varios subtipos virales (Carreón *et al.*, 2005), pero también un mismo subtipo viral con algunas diferencias en sus genes puede ser capaz de infectar a otra especie (Coiras *et al.*, 2001) en este reporte se evidencia que es un brote reproductivo que con los primers dirigidos hacia los virus de referencia (Offringa *et al.*, 2000) los resultados son negativos (falsos negativos), así como con la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación, única autorizada por la Organización Internacional de Epizootias, lo cual indica que los laboratorios nacionales de referencia oficiales deberán tener cuidado con las pruebas de laboratorio diagnóstico, ante este reporte de variantes virales (Choi, 2010).

---

Se utilizó la prueba de IH para confrontar respuestas homologas y heterólogas utilizando el método de Archetti y Hosfall, 1950; este método se ha reportado ya por otros autores para determinar la relación antigénica entre subtipos (Wadey y Faragher, 1981).

Un estudio realizado en Argentina en influenza humana, mediante el uso de IH, demostró que algunos aislamientos presentan respuesta específica con sus antisueros homólogos, y menos específica con los antisueros de las cepas vacunales, lo que obliga a modificar las vacunas constantemente, dependiendo la variedad del virus que este circulando en ese momento.

Se recomendaría realizar un estudio epizo-tiológico periódicamente, para que las vacunas comerciales porcinas contengan cepas virales con capacidad de protección homóloga. En un estudio realizado por Juarez G. y colaboradores, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, se evidencia la variación antigénica de siete cepas virales aisladas en campo, que incluye la cepa que se reporta en este estudio.

La cepa viral encontrada el presente estudio, tiene un valor de relación antigénica de 0.72, con respecto a un virus aislado en el estado de Michoacán, identificado con el número 40; esto en términos coloquiales, quiere decir que antigénicamente cruzan el 72% (Juarez, 2013).

Archetti y Hosfall 1950, encontraron variabilidad antigénica en VIP, observando *in ovo* una neutralización incompleta del virus, utilizando sueros inmunes con virus heterólogos. A pesar de que en este estudio no se realizaron ensayos de neutralización viral, podemos inferir que los resultados encontrados utilizando la técnica de IH, apoyan lo encontrado por Archetti y Hosfall, debido a la correlación de los resultados que se presentan entre ambas técnicas.

Un estudio realizado en 2004, utilizó la técnica de IH para identificar diferencias entre aislamientos virales de ojo azul, la cual evidenció que los virus presentan diferencias antigénicas entre ellos, y a través de esta técnica es posible identificar el virus que está circulando en esos momentos en alguna granja (Sánchez, 2012). Lo que también ocurre en el caso de IP, como lo demuestran los resultados de este estudio, donde se encontraron diferencias en los títulos al confrontar los sueros obtenidos con los virus homólogos y heterólogos.

---

En 2004, un estudio realizado por Sánchez Betancourt, utilizando la prueba de IH, se analizó la relación que existe entre diferentes aislamientos y sueros de cerdos infectados de forma natural. Los resultados demostraron un reconocimiento variable de los anticuerpos para cada uno de los aislamientos del Rubulavirus porcino. Con lo que concluyó, que existe variación antigénica entre cada uno de ellos, como los reporta Juárez G, 2013, y que se complementa con el estudio clínico y productivo reportado en este estudio.

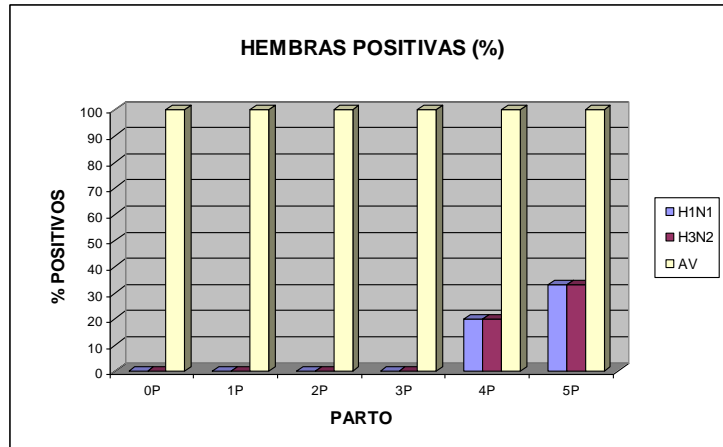
## **CONCLUSIONES.**

- 
- El comportamiento clínico asociado a falla reproductiva fue debido a la presencia de un nuevo subtipo viral H3N2 de influenza porcina A/Swine/Mexico/Mex51/2009 (H3N2).
  - Existen variaciones clínicas por el virus de influenza reportado en este estudio, comparado con los reportes previos del virus H3N2 de referencia.
  - Se evidenció la falta de especificidad de los aislados de referencia H1N1 y H3N2 para reconocer anticuerpos proporcionados por este virus H3N2 de campo por la prueba de IH.
  - El conocer que existen variaciones antigénicas entre aislamientos del VIP, permitirá generar vacunas que proporcionen una respuesta más específica hacia la variedad de VIP que este circulando en la zona.
  - En la medida en que los laboratorios de diagnóstico puedan tener el virus de referencia, descrito en el presente trabajo, se podrá ser capaz de hacer diagnóstico por IH, o bien si se tienen los primers para el gen M de influenza porcina para RT-PCR.
  - Los programas de control contra la enfermedad de influenza porcina serán eficaces, si los laboratorios de referencia, cuentan con cepas de campo previamente caracterizadas genética y antigénicamente.

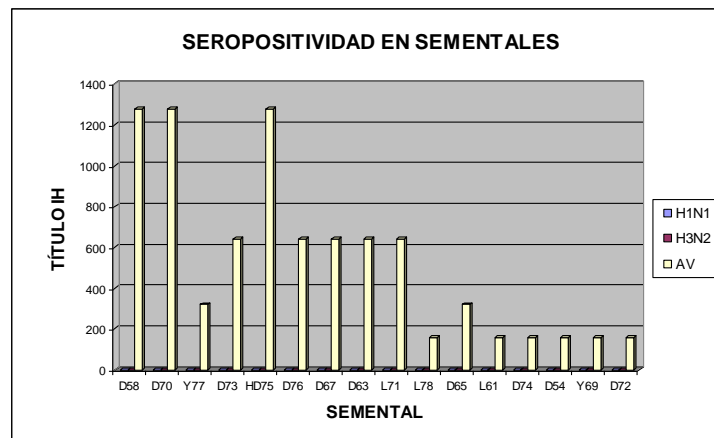
## **GRÁFICAS**



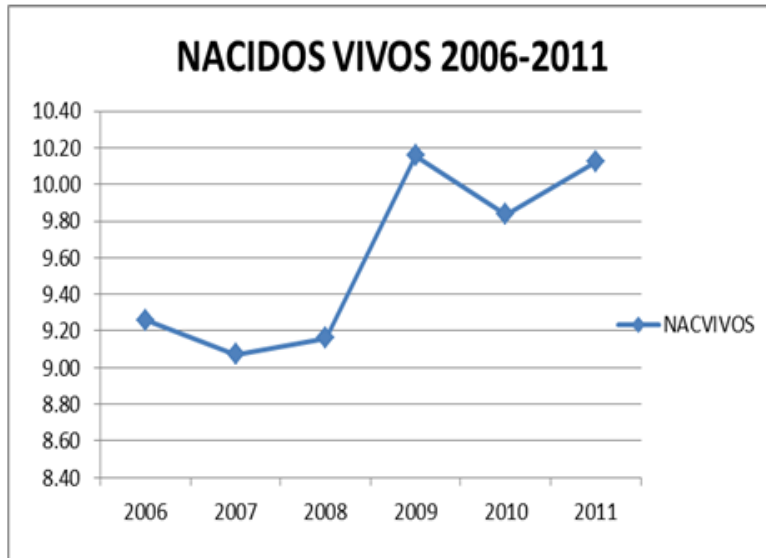
**Gráfica 1.** Seropositividad de hembras contra virus de referencia y el aislamiento viral obtenido de la granja.



**Gráfica 2.** Seropositividad en 16 sementales.



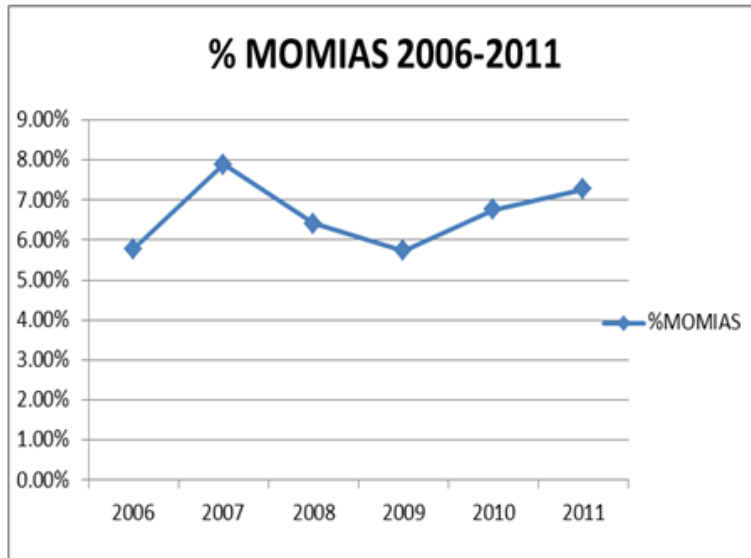
**Gráfica 3.** Lechones Nacidos Vivos (promedio) del año 2006 al 2011



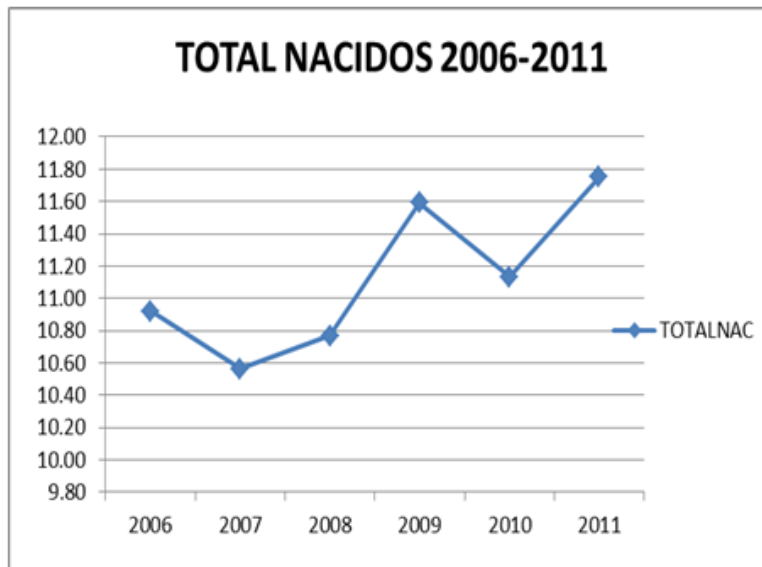
**Gráfica 4.** Lechones Nacidos Muertos del año 2006 al 2011.



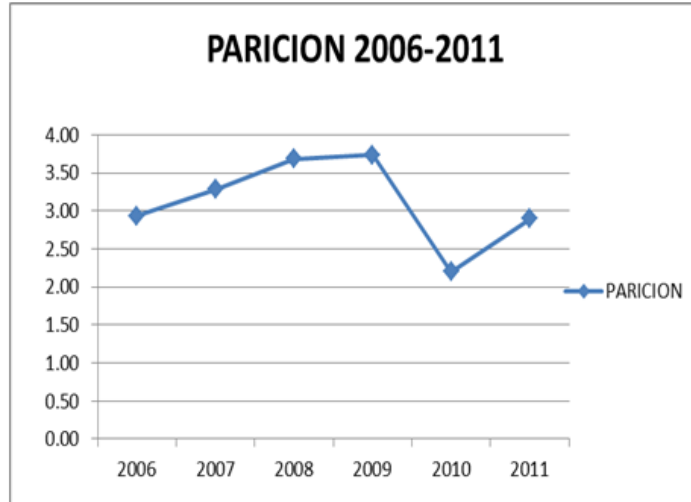
**Gráfica 5.** Lechones Nacidos Momias del año 2006 al 2011.



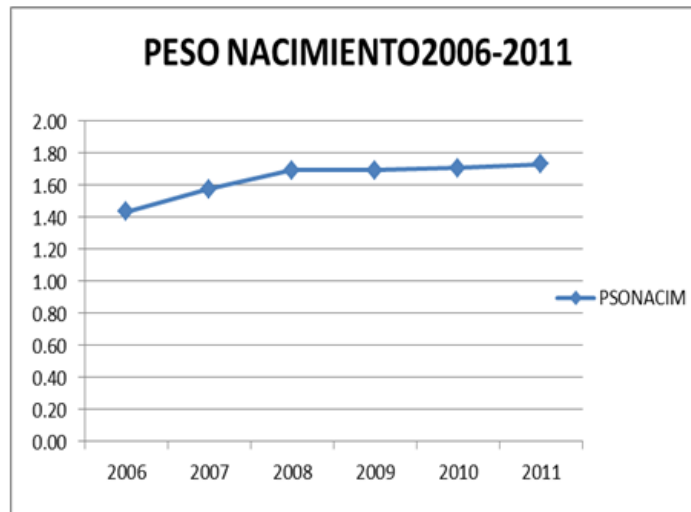
**Gráfica 6.** Lechones Nacidos Totales (promedio) del año 2006 al 2011.



**Gráfica 7.** Parición del año (parto promedio) 2006 al 2011.



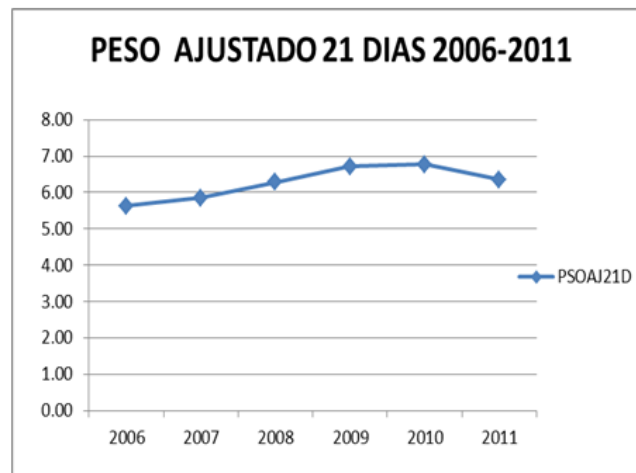
**Gráfica 8.** Peso al nacimiento (kg) del año 2006 al 2011.



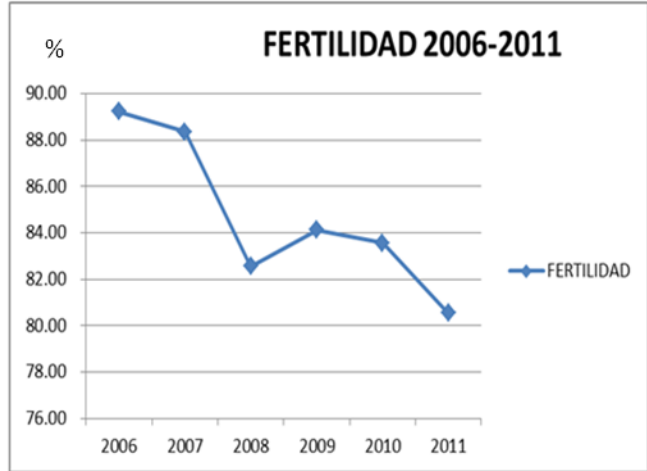
**Gráfica 9.** Número de lechones destetados del año 2006 al 2011.



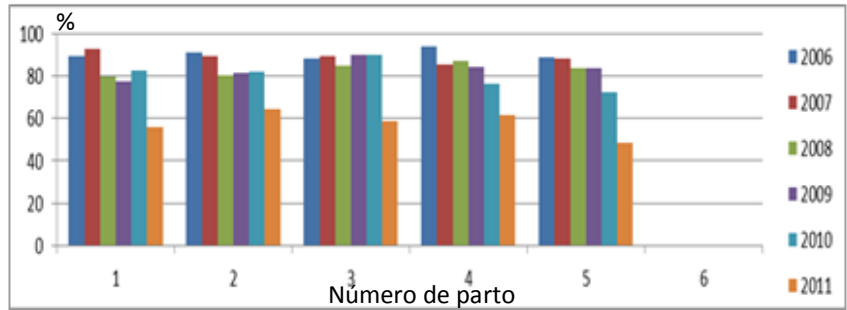
**Gráfica 10.** Peso ajustado (kg) a los 21 días del año 2006 al 2011.



**Gráfica 11.** Porcentajes de fertilidad del año 2006 al 2011.

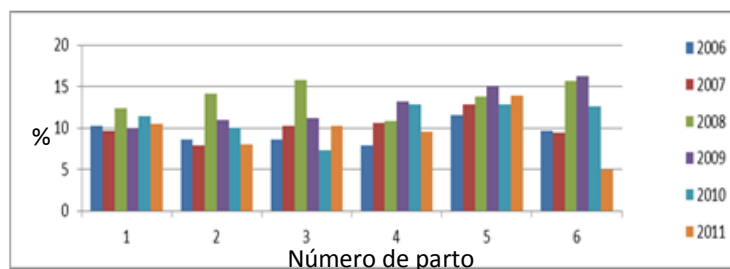


**Gráfica 12.** Tasa de Parición del año 2006 al 2011.



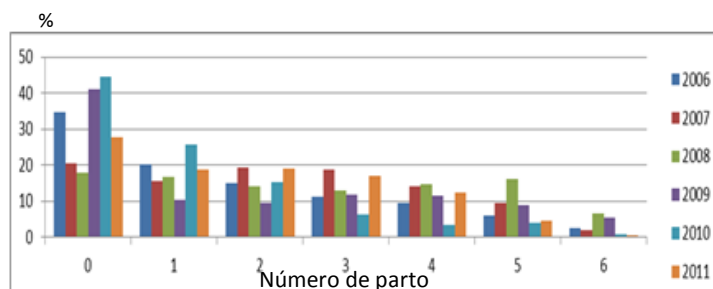
Se observa en esta gráfica que la tasa de parición disminuye en el 2011, lo cual sugiere una afectación directa en la capacidad reproductiva de la cerda, la cual se presenta indistintamente de acuerdo al número de parto.

**Gráfica 13.** Mortalidad Pre-destete por número de parto del año 2006 al 2011.



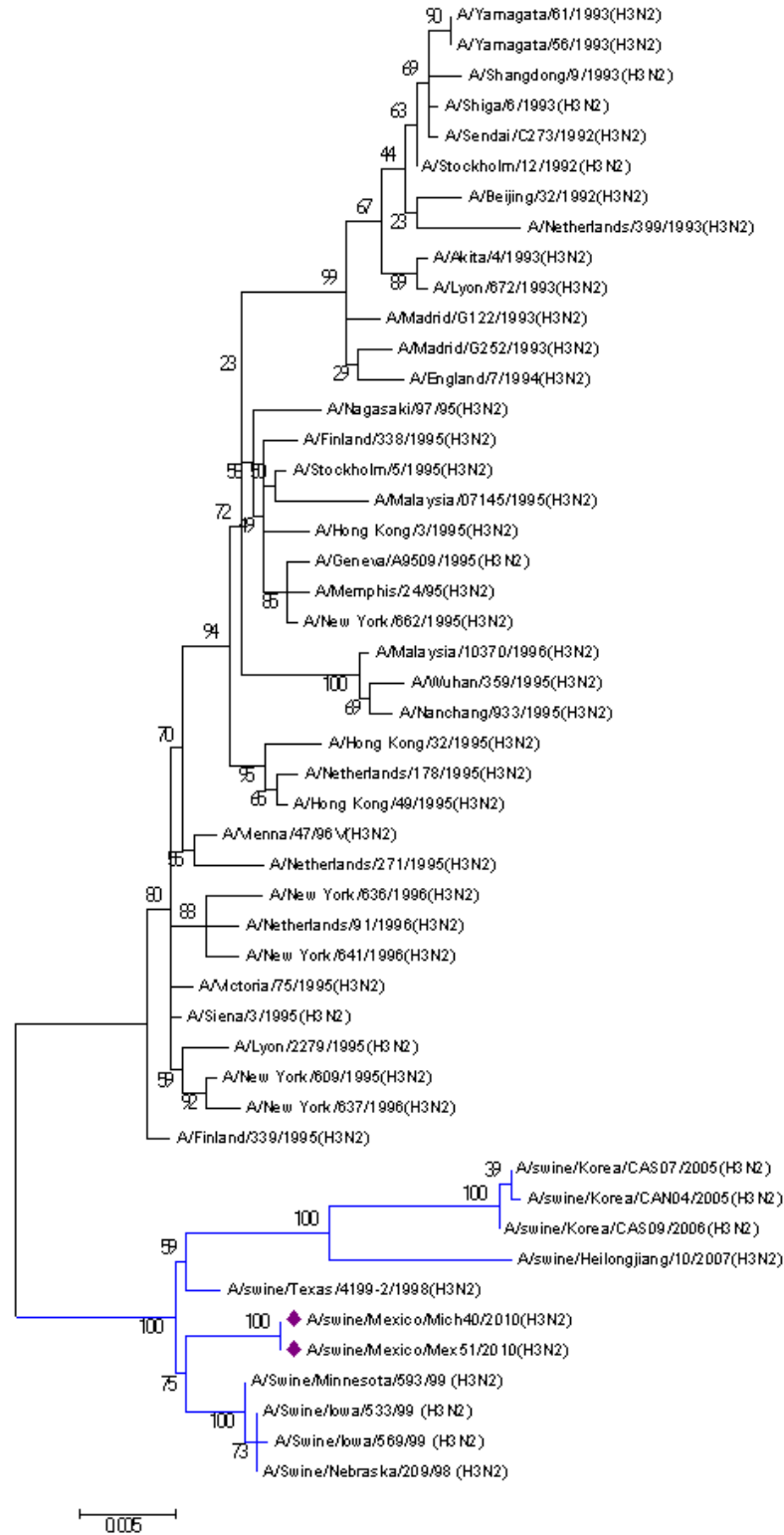
Se observa que las mayores mortalidades durante la lactancia se dan en el parto 5 y 6, aunque en el año 2008, los lechones de las hembras de 3er parto presentaron alta mortalidad. También se observa que durante el año 2008 se presentó la mayor mortalidad pre destete.

**Gráfica 14.** Porcentaje de inventario Promedio del año 2006 al 2011.



Para el año 2006, 2009, 2010 y 2011 los reemplazos se incrementan. Durante el 2011 la distribución de partos en el hato reproductor es más homogénea, teniendo hembras de todos los partos.

**Figura 1.** Árbol filogenético del aislamiento viral con respecto a otros reportados.





---

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Alexander I. Karasin, I, Brown H, Carman S, Olsen C. (2000) Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada. *J Virol.* October; 74(19).
- 2.- Archetti, I., Horsfall, F.L. (1950). Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. of Exp. Med.* 92, 441-462.
- 3.- Arias CF, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Río Mde L, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S.(2009). Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res.* 2009,Nov;40(8):643-54.
- 4.-Avalos GP, Mendoza ES, Macías M, Trujillo ME, Sánchez JI.(2008). Seroprevalencia del virus de influenza porcina en el Bajío de la República Mexicana. *Memorias del XLIII Congreso Nacional de 2008. Julio 23-26; Morelia (Michoacán) México. México (DF): asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2008. 170*
- 5.- Brown I H. (2000).The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs, *Vet. Microbiol.* 74:29–46.
- 6.- Carreón NR, Mercado GC, Trujillo OME, Chávez RS. (2005). Coexistencia serológica de los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina en diferentes zonas de México. *Memorias de XL Congreso Nacional de julio 25-29; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2005: 197.*
- 7.-Carrera A.,V.M.(2010). Estudio serológico retrospectivo (2000-2009) de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en el distrito Federal. (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- 
- 8.- Chambers TM, Hinshau VS, Kawaoka Y, Easterday BC and Webster RG. (1991). Influenza viral infection of swine in the United States 1988-1989. *Arch. Virol.* 116:261-265.
- 9.- Choi YJ, Nam HS, Park JS, Kim HJ, Park KB, Jeon MH, Kim CJ, Hwangbo Y, Park KS, Baek KA.(2010). Comparative analysis of the multiple test methods for the detection of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 virus. *J Microbiol Biotechnol.* 2010 Oct; 20(10) 1450-6.
- 10.- Coiras MT, Aguilar JC, Galiano M, Carlos S, Gregory V, Lin YP, Hay A, Pérez-Breña P. (2001). Rapid molecular analysis of the haemagglutinin gene of human influenza A H3N2 viruses isolated in Spain from 1996 to 2000. *Arch Virol.* 2001;146: 2133–2147.
- 11.- Easterday B.C., Van Reeth K .(1999). Swine influenza. In: Straw BE, D'Allaire SD, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Diseases of swine.* 8th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1999. p. 277-90.
- 12.- Ellis J S, Zambon M. C.(1997). Molecular analysis of an outbreak of influenza in the United Kingdom. *European Journal of Epidemiology* 13: 369–372.
- 13.- Hughes K, Zachertowska A, Wan S, Li L, Klimaszewski D, Euloth M, Hatchette TF. Yield .(2007). increases in intact influenza vaccine virus from chicken allantoic fluid through isolation from insoluble allantoic debris. *Vaccine.* 25(22):4456-63.
- 14.- Qi X, Lu C. (2009).Swine influenza virus: Evolution mechanism and epidemic characterization. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2009 Sep 4; 49(9):1138-45.
- 15.- Jung T, Choi C, Chae C. (2002) Localization of swine influenza virus in naturally infected pigs. *Vet Pathol.* Jan;39 (1):10-6.

- 
- 16.- Karasin A I, Brown I H, Carman S, Olsen C W (2000). Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J Virol.* Oct; 74(19):9322-7.
- 17.- Lozano HMA, Mercado GC, Carreón NR, Jimenez NJL.(2006). Evidencia serológica de los subtipos H1N1 Y H3N2 del virus de influenza porcina en tres diferentes sistemas de producción en México. Memorias de XLI Congreso nacional de 2006. Agosto 16 – 19; Ixtapa (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2006: 251.
- 18.- Majno G. and Joris I. (1999). Cells, tissues, and disease. Principles of general pathology. Department of Pathology University of Massachusetts Medical School. Ed. Blackwell Science. Worcester, Massachusetts. pp. 588-591.
- 19.-Mercado G., C. (2007). Método de prueba, área de virología, aislamiento viral influenza porcina (IP) en embrión de pollo. 1ª edición. Departamento de Producción Animal: cerdos. 2007.
- 20.- Morilla A, Gonzalez-Vega D, Estrada E, Diosdado F. (2002). Influenza Virus. In: Morilla A, Yoon K, Zimmerman J (eds) Trends in emerging viral infections of swine. Iowa State University Press, Ames.
- 21.- Murphy, B.R. and R.G. Webster. (1996). Orthomyxoviruses, in: Fields Virology (Eds. B.N. Fields et al.), pp. 1397-1445. Lippincott-Raven Publishers; Philadelphia, PA.
- 22.- Offringa D P, Tyson M V, Zhiping Y, Levandowski R A.(2000). A comprehensive systematic approach to identification of influenza A virus genotype using RT-PCR and RFLP. *Journal of Virological Methods* 88 (2000) 15–24

- 
- 23.- Olsen C.W. (2002). Emergence of novel strains of swine influenza virus in North America, In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine, Morilla A., Yoon K.J. & Zimmerman J.J., eds. Iowa State University Press, Iowa, USA, 37–43.
- 24.- Pérez T., M.(2010). Estudio de la respuesta de anticuerpos en pacientes infectados por el virus de la influenza A H1N1 durante el periodo de la pandemia abril-mayo 2009. (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- 25.- Pensae M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA (1989). Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. . Bull. World Hlth. Org. 59:75-78
- 26.- Plonait H., Bickhardt K. (2001). Manual De Las Enfermedades Del Cerdo. Hardcover. Plonait and Bickhardt.
- 27.- Sánchez Betancourt JI, Trujillo ME, Mendoza ES, Reyes-Leyva J., Alonso MR. (2012). Genetic and antigenic changes in porcine rubulavirus. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 76; 36-37.
- 28.- Straw EB, D´allaire S, Mengeling LW and Taylor JD. (1999). Diseases of swine. Ed. Iowa states press. 8th Edition. Iowa. pp. 277-290.
- 29.- Takimoto S, M Grandien, M A Ishida, M S Pereira, T M Paiva, T Ishimaru, E M Makita, and C H Martinez.(1991). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol*. Mar; 29(3): 470–474.
- 30.- Wadey CN, Faragher JT. (1981). Australian infectious bronchitis viruses: Identification of nine subtypes by a neutralization test. *Res in Vet Sc*; 30:70–74.

- 
- 31.- Webby RJ1, Swenson SL, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG (2000). Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol.* Sep;74(18):8243-51.
- 32.- Webster R G, Bean WJ, Gorman O T, Chambers TM, Kawaoka Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* Mar; 56(1):152-79.
- 33.- Wenxin Wu and Gillan M. Ain. (2004). Binding of influenza viruses to sialic acids: reassortant viruses with A/NWS/33 hemagglutinin bind to  $\alpha$ -2,8 linked sialic acid. *Virology*, 325: 340-350.
- 34.- Zhou, N. et al.(1999). Characterization of H3N2 influenza viruses from pigs in the United States, p. 32. In: Programme and Abstracts of the European Society for Veterinary Virology Symposium on Animal Influenza Viruses, Gent, Belgium.

---

## APENDICE:

### Secuencia completa del Marco de Lectura Abierto 1 (ORF1).

GenBank: CY122346

```
atggagagaa taaaagaact aagagatcta atgtcgcagt cccgcactcg
cgagatactc actaagacca ctgtggacca tatggccata atcaaaaagt
acacatcagg aaggcaagag aagaaccccg cactcagaat gaagtggatg
atggcaatga aataccaat tacagcagac aagagaataa tggacatgat
tccagagagg aatgaacaag gacaaaccct ctggagcaaa acaaacgatg
ctggatcaga cgcgctgatg gtatcacctc tggccgtaac atggtggaat
aggaatggcc caacaacaag tacagttcac taccctaagg tatataaac
ttatttcgaa aaagtcgaaa ggttaaaaca tggtagcttt ggccctgtcc
acttcagaaa tcaagttaaa ataagaagga gagttgacac aaaccctggt
cacgcagatc tcagtgtctaa ggaggcacag gatgtgatca tgggaagtgt
tttcccaaat gaagtggggg caagaatact gacatcagag tcacagctga
caataacaaa agagaagaaa gaagagctcc aggattgtaa aattgctccc
ttgatgggtg catacatgct ggaaagagag ttggtccgca aaacgagggt
tctcccggtg gctggtggaa caggcagtgt ttatattgag gtgctgctact
taaccagggy gacatgctgg gagcagatgt aactccagg aggagaagtg
agaaatgatg atgttgacca aagtttgatt atcgctgcta gaaacatagt
aagaagagca gcagtgtcag cagaccatt agcatctctc ttggagatgt
gccacagcac acagattgga ggaataagga tggtaggacat ccttagacag
aatccaacag aggaacaagc cgtagacata tgcaaggcag caatgggggt
gaggattagc tcatctttca gttttgggtg gttcactttc aaaagaacaa
gcgatcatc agtcaagaaa gaagaagaag tgctcacggg caacctcaa
aactgaaaa taagagtaca tgaaggatat gaagaattca caatggtcgg
gagaagagca acagctattc tcagaaaggc aaccaggaga ttgatccagt
taatagtaag tgggaggggac gagcagtcaa ttgtagaggc aataattgtg
gccatggtat tttcacaaga ggattgcatg atcaaagcag ttagggcgca
tctgaacttt gtcaataggg caaaccagcg actgaatccc atgcaccaac
tcttgaggca tttccaaaa gatgcaaaag tgcttttcca gaactgggga
actgaacca tcgacaatgt gatgggaatg atcggaatat tgcccgatat
gacccaagc acggagatgt cgatgagagg gataagagtc agcaaaatgg
gagtagatga atactccagc acggagagag tggtagtgag cattgaccga
tttttgagag ttcgggatca acgagggaac gtactattgt ctccgaaga
ggtcagcgag acacaaggaa cggagaagt gacaataact tattcgtcat
caatgatgtg ggagatcaat ggtcctgagt cagtgtggt caacacttat
caatggatca tcaggaactg ggaaactgtg aaaattcaat ggtcacaaga
```

---

tcccacgatg ttatacaaca aatggaatt tgaaccattt cagtctcttg  
tccctaaggc aaccagaagc cgatacagtg gattcgtaag gacactgttc  
cagcaaatgc gggatgtgct tggaacattt gacactgtcc aaataataaa  
acttctcccc tttgctgctg ctccaccaga acagagtagg atgcagtttt  
cctcattggc tgtgaatgtg agaggatcag ggatgaggat actggtaaga  
ggcaattctc cagtattcaa ttacaacaag gcaacaaaaa ggcttacagt  
tcttggaag gatgcaggtg cattgactga agatccagat gaaggcacag  
ctgggggtgga gtctgctgtc ctgagaggat ttctcatttt gggcaaagaa  
gacaagagat atggcccagc attaagtatc aatgaactga gcaatcttgc  
aaaaggagag aaggctaata tgctaattgg gcaaggagac gtagtgttgg  
taatgaaacg gaaacgggac tctagcatac ttactgacag ccagacagcg  
acaaaaagaa ttcggatggc catcaattag t

**Secuencia completa del Marco de Lectura Abierto 2 ( ORF 2) Gen PB1-F2.**

GenBank: CY122347.1

atggatgtca atccgactct acttttcccta aaagttccag cgcaaaatgc  
cataagcacc acattccctt atactggaga tcctccatac agccatggaa  
caggaacagg atacaccatg gacacagtca acagaacaca ccaatattca  
gaaaaagggg agtggacgac aaacacagag actggggcac cccagctcaa  
cccgattgat ggaccactac ctgaggataa tgaaccaagt ggatatgcac  
aaacagactg tgttctggag gccatggctt tccttgaaga atccccacca  
gggatatttg agaattcatg ccttgaaaca atggaagttg ttcaacaaac  
aagagtggat aaactaactc aaggtcgcca gacttatgat tggacattaa  
acagaaatca accggcagca actgcattgg ccaacacatc agaagttttt  
agatcgaatg gtctaacagc taatgagtca ggaaggctaa tagatttcct  
aaaggatgta atggaatcaa tggataaaga ggaaatagag ataacaacac  
actttcaaag aaaaaggaga gtaagagaca acatgaccaa gaagatggtc  
acacaaagaa caataggaaa gaaaaaaca agagtgaata agagaggtta  
tctaataaga gcaactgacat tgaatacgat gaccaaagat gcagagagag  
gcaaattaa aagaagggtc atcgcaacac ctgggatgca aattagaggg  
ttcgtgtact ttgttgaac tttagctagg agcatttgcg aaaagcttga  
acagtctgga ctcccagtag ggggcaatga aaagaaggcc aaattggcaa  
atgttgtgag aaagatgatg actaattcac aagacacaga gctttctttc  
acaatcactg gggacaacac taagtggaat gaaaatcaaa atcctcgaat  
gttctctggcg atgattacat atatcaccag aatcaacc gagtggttca  
gaaacatcct gagcatggca ccataatgt tctcaaaca aatggcaaga  
ctaggaaaag gatacatgtt cgagagtaaa agaataagc tccgaacaca  
aataccagca gaaatgctag caagcattga cctgaagtat ttcaatgaat  
caacaaggaa gaaaattgag aaaataaggc ctcttctaata agatggcaca

---

gcatcattga gccctggaat gatgatgggc atggtcaaca tgctaagtac  
ggttttggga gtctcgatac tgaatcctgg acaaaagaaa tacaccagga  
caacatactg gtgggatggg ctccaatcct ccgacgattt tgccctcata  
gtgaatgcac caaatcatga ggaatacaa gcaggagtgg atagattcta  
caggacctgc aagttagtgg gaatcaacat gagcaaaaag aagtcctata  
taaataagac agggacattt gaattcacia gcttttttta tcgctatgga  
tttgtggcta attttagcat ggagctgcc agttttggag tgtctggaat  
aatgaatca gctgatatga gtattggagt aacagtgata aagaacaaca  
tgataaacia tgacctgga cctgcaacag cccagatggc cttcaattg  
ttcatcaaag actacagata cacatatagg tgccatagag gaaacacaca  
aattcagacg agaagatcat tcgagctaaa gaagctgtgg gatcaaacc  
aatcaaaggc aggactatta gtatctgatg gaggaccaa cttatacaat  
atccggaatc ttcacattcc tgaagtctgc ttaaaatggg agctaattgga  
tgaggattat cggggaagac tttgtaatcc cctgaatccc tttgtcagcc  
ataaagagat tgattctgta aacaatgctg tggatgatgcc agcccatggt  
ccagccaaaa gcatggaata tgatgccgtt gcaactacac actcctggat  
tccaagagg aaccgctcta ttctcaacac aagccaaagg ggaattcttg  
aggatgaaca gatgtaccag aagtgtgca acctgttcga gaaattttc  
cctagtagtt catacaggag accggttggg atttctagca tgggtggaggc  
catggtgtct agggcccga ttgatgccag gatcgacttc gagtctggac  
ggattaagaa agaagagttc tctgagatca tgaagatctg ttccaccatt  
gaagaactca gacggcaaaa ataatga

**Secuencia completa del Marco de Lectura Abierto 3 (ORF3). Gen PA**  
GenBank: CY122348.1

atggaagact ttgtgcgaca atgcttcaat ccaatgatcg tcgagcttgc  
ggaaaaggcaatgaaggaat atggagaaga tccgaaaatc gaaactaaca  
aattcgctgc aatatgtacacacttggag tctgtttcat gtattcagat  
ttccatttca tcgacgaacg gggatgaatcaataattgtag aatctggtga  
tccaaatgca ttactgaagc accgatttga gataattgaaggaagagacc  
gaaccatggc ctggacagtg gtgaacagta tctgcaacac cacaggggta  
gagaagccta aatttcttcc ggatttgtat gattacaaag agaaccgatt  
cattgaaattggagtgcac ggagggaggt ccacatatac tacctagaga  
aagccaacia aataaaatccgagaagacac acattcacat tttttcattc  
actggagagg agatggccac taaagcggactacacccttg atgaagagag  
cagggaaga atcaaaacca ggcttttcac cataagacaagaaatggcca  
gtaggggtct atgggattcc tttcgtcagt ccgagagagg cgaagagaca  
attgaagaaa gatttgaat tacaggaacc atgctcagggc ttgccgacca  
aagtctcccaccgaatttct ccagccttga aaactttaga gcctatgtag



---

atggattcga accgaacggctgcattgagg gcaagctttc tcaaatgtca  
aaagaagtga ggcgcaaaat tgaaccattcttgaagacaa caccacgccc  
cctcagattg cctgatgggc ctcccttgctc tcagcgggtcaaagttcttgc  
tgatggatgc tctgaaacta agtattgaag acccgagtca tgagggggaa  
gggataccac tatatgatgc aatcaaatgc atgaagacat tttttggctg  
gaaagagcctaacataatca aaccacatga gaaaggcata aacccaatt  
acctcctggc ttggaagcaggtgctagcag agctccagga cattgaaat  
gaagagaaga tcccaaagac aaagaacatgaagagaacaa gccaatgaa  
gtgggcactc ggtgagaata tggcaccaga gaaagtagattttgatgact  
gcaaagatgt tggatgatctt aacagtatg acagcgatga gccagagccc  
agatctatag caagctgggt ccaaaatgaa ttcaataagg catgtgaatt  
gaccgattcaagctggatag aacttgatga gataggagaa gatgttgccc  
cgattgaaca catcgcaagcatgaggagga actattttac agcagaagtg  
tcccattgca gggctactga atacataatgaagggagtgt acataaatac  
ggctttgctc aatgcatctt gtgcagccat ggatgacttccagctgatcc  
caatgataag caaatgtagg accaaagaag gaaggcggaa aacaaatctg  
tatgggttca ttataaaagg aaggtctcat ttgagaaatg atactgacgt  
ggtgaactttgtaagtatgg agttctccct cactgacccg agactggagc  
cacacaaatg ggaaaagtactgtgttcttg aataggaga catgctcctg  
aggactgcca taggccaagt gtcgaggcccatgttctat atgtgagaac  
caatggaacc tccaagatca agatgaaatg gggcatggaaatgaggcgct  
gccttcttca gtctcttcag cagattgaga gcatgattga ggccgagtct  
tctgtcaaag agaaagacat gaccaaggaa ttctttgaaa ccaaatcgga  
aacatggccaatcggagaat cacccaaagg agtggaggaa ggctctattg  
ggaaagtgtg caggaccttactggcaaagt ctgtattcaa cagtctatac  
gcgtctccac aacttgaggg gttttcggctgaatcgagaa aattgcttct  
cattgttcag gcacttaggg acaacctgga acctggaaccttcgatcttg  
gggggctata tgaagcaatc gaggagtgcc tgattaatga tccctgggtt  
ttgcttaatg catcttggtt caactccttc ctcacacatg cactgaaata g

### **Secuencia completa del Marco de Lectura Abierto 4 ( ORF 4) Gen HA**

GenBank: CY122347.1

atgaagacta tcattgcttt gagctacatt ttatgtctgg ttttcgctca  
aaaacttccc ggaaatgaca acaacagcac agcaatgctg tgcctgggac  
accatgcagt gccaaacgga accctagtga aaacaatcac gaatgatcaa  
attgaagtga ctaatgctac tgagctgggt cagagttcct caacaggtag  
aatatgagac agtcctcacc gaatccttga tggaaaaagc tgcacattga  
tagatgctct actgggagac cctcattgag atggctttca aaataaggaa

---

tgggaccttt ttattgaacg cagcaaagct tacagcaact gttaccctta  
tgatgtgccg gattattcct cccttaggtc actagttgcc tcatcaggca  
ccctggagtt taccaatgaa gacttcaatt ggactggggg cgctcaggat  
gggggaagca attccttgcaa aaggggatct gttaaaagtt tctttagtag  
attgaattgg ttacacaaat tagaatacaa atatccagca ctgaacgtga  
ctatgccaaa caatgacaaa tttgacaaa tgtacatttg ggggggtcac  
cacccgagca cggacagtga acaaaccagc ctatatgttc aagcaatagg  
gagagtcaca gtctctacca aaagtagcca acaaactgta atccccgaaca  
tcgggtccag accctgggtg aggggcatct ccagtagaat aagcatctat  
tgacaatag taaaaccggg agacatacttttgattagca gcacagggaa  
tctaattgct cctcgggggtt acttcaaaat acgaaatggg aaaagctcaa  
taatgaggtc agaagcacc attgacaact gctattctga atgcatcact  
ccaaatggaa gcattcccaa tgacaaacct tttcaaaatg taaacaggat  
cacatatggg gcctgtccca aatatgttaa gcaaaaaact ctgaaactgg  
caacagggat gcggaatgta ccagagaaac aaactagagg catattcggc  
gcaatcgcag gtttcataga aaatgggttg gagggaatgg tagacggttg  
gtacggtttc aggtatcaaa attctgaggg cacaggacaa gcagcagatc  
ttaaagcac tcaagcagca atcgatcaag tcaacgggaa attgaatagg  
ttaatcgaga aaacgaacga gaaattccat caaatcgaaa aagaattttc  
agaagtagaa gggagaattc aggacctcga gaaatatggt gaagacacta  
aatagatct ctggtcttac aacgcggagc tccttgttgc cctggagaat  
caacatacaa ttgatctaac tgactcagaa atgtacaaac tgtttgaaaa  
aacaaggaag caactgaggg aaaatgctga ggacatgggc aatgggtgct  
tcaaaatata ccacaaatgt gacaatgcct gcatagggtc aatcagaaat  
acaaccgggt ccagatcaaa ggtggtgagc tgaatcagg atacaaagat  
tgatcctat ggatttcctt tgccatatca tgctttttgc tttgtgttgt  
tttgcctggg ttcatcatgt gggcctgcca aaaaggcaac attagatgca  
acatttgc at ttaa

**Secuencia completa del Marco de Lectura Abierto 5 ( ORF 5) Gen NP**

GenBank: CY122350.1

atgagtgaca tcgaagccat ggcgactcaa ggcaccaaac gatcatatga  
acaaatggag actggtgggg aacgccagga tgccacagaa atcagagcat  
ctgtcgggaag aatgattggt ggaatcggga gattctacat ccaaatgtgc  
actgaactca aactcagtga ctatgagggg cgactaatcc aaaatagcat  
aacaatagag agaatggtgc tctctgcttt tgatgagaga agaataaat  
acctagaaga gcatcccagt gctgggaagg atcctaagaa aactggagga  
cccatatata gaagagtaaa cggaaagtgg atgagagAAC tcatccttta  
tgacaaagaa gaaataagga gagtttggcg ccaagcaaac aatgggtgaag

---

atgcaacagc tggcttact catatcatga tttggcattc caatctgaat  
gatgccacgt atcagagAAC aagagcgctt gttcgcaccg gaatggatcc  
cagaatgtgc tctctaatagc aaggttcaac acttcccaga aggtctgggg  
ccgcaggtgc tgcagtgaaa ggagttggaa caatagcaat ggagttaatc  
agaatgatca aacgtggaat caatgaccga aacttctgga ggggtgaaaa  
tggacgaaga acaaggattg catatgaaag aatgtgcaat attctcaaag  
gaaaatttca gacagctgcc cagagggcaa tgatggatca agtgagagaa  
agtcggaacc caggaaacgc tgagattgaa gatctcattt tcctggcacg  
gtcagcactt attctaaggg gatcagttgc acataagtct tgcctgcctg  
cttgtgtgta tgggcttgca gtagcaagtg ggcatgactt tgaaagggaa  
gggtattcac tggctcgggat agaccattt aaattactcc aaaacagtca  
agtgttcagc ctgataagac caaatgaaaa cccagctcac aagagtcaat  
tgggtgtggat ggcatgccac tctgctgcat ttgaggattt aagagtatca  
agtttcataa gagggaagaa agtgattcca agaggaaagc tttccacaag  
aggggttcag attgcttcaa atgagaatgt ggaagccatg gactccaata  
ccctagaact gagaagcaga tactgggcca taaggaccag gagtggagga  
aataccaatc aacagaaggc atccgcgggc cagatcagtg tgcaacctac  
attctcagtg caacggaatc tcccttttga aagagcaacc gttatggcag  
ctttcagcgg gaacaatgaa ggacggacat ccgacatgcg aacagaagtt  
ataaggatga tggaaagtgc aaagccagaa gatttgtcct tccagggggcg  
gggagtcttc gagctctcgg acgaaaaggc aacgagcccg atcgtgcctt  
cctttgacat gagtaatgaa gggctttatt tcttcggaga caatgcagag  
gagtatgaca gttga

**Secuencia completa del Marco de Lectura Abierto 6 ( ORF 6) Gen NA**

GenBank: CY122351.1

atgaatccaa atcaaaagat aataacgatt ggctctgttt ctctcactat  
tgccacaatg tgcttcctta tgcaaattgc catcctggta actactgtaa  
cattgcattt caagcaatat gaatgcaact ccccccaaa caaccaagta  
atactgtgtg aaccaacaat aatagaaaga aacataacag agatagtgta  
tctgaccaac accaccatag agaaggaaat atgccccaaa cttagcagaat  
acagaaattg gtcaaagccg caatgtaaaa ttacaggatt tgcacctttt  
tccaaggaca attcgattag gctttccgct ggtggggaca tttgggtgac  
aagagaacct tatgtgtcat gcgatcctga caagtgttat caatttgccc  
ttggacaggg aacaacacta aacaacaggc attcaaatac cacagtacat  
gataggacc cttatcgaac cctattgatg aatgagttgg gtgttccatt  
tcatttggga accaagcaag tgtgcatagc atggtccagc tcaagttgtc  
acgatggaaa agcatggctg catgtttgtg taactgggca tgatgaaaat

---

gcaactgcta gcttcattta cgatgggagg cttgtagata gtattggttc  
atgggtccaaa aaaatcctca ggacccagga gtcggaatgc gtttgtatca  
atggaacttg tacagtagta atgactgatg ggagtgcttc aggaagagct  
gatactaaaa tattattcat tgaggagggg aaaatcgttc atattagccc  
attgtagga agtgctcagc atgtcgagga gtgctcctgt tatcctcgat  
atcctgggtg cagatgtgtc tgcagagaca actggaaagg ctccaatagg  
cccatcgtag atataaatgt aaaggattat agcattgttt ccagttatgt  
gtgctcagga cttgttggag acacacccag aaaaaacgac agatccagca  
gtagcaattg cctgaatcct aacaatgagg aagggggtca tggagtgaaa  
ggctgggcct ttgatgatgg aatgacgtg tggatgggaa gaacgatcag  
cgagaagcta cgctcaggtt atgaaacctt caaagtcatt gaaggctggt  
ccaaacctaa ctccaaattg cagataaata ggcaagtcat agttgacaga  
ggtgataggt ccggttattc tggcattttc tctggtgaag gcaaaagctg  
catcaatcgg tgcttttatg tggagttgat aaggggaagg aaacaggaaa  
ctgaagtctg gtggacctca aacagtattg ttgtgttttg tggcacctca  
ggtacatatg gaacaggctc atggcctgat ggggcggaca tcaatctcat  
gcctatataa

### **Secuencia completa del Marco de Lectura Abierto 7 ( ORF 7) Gen M2 y M1**

GenBank: CY122352.1

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtat gttctctcta tcgttccgtc  
aggccccctc aaagccgaga tagcgcagag actcgaagac gtttttgcag  
ggaaaaacac cgatcttgag gcactcatgg aatggctaaa gacaagacca  
atcctgtcac ctctgactaa ggggatttta ggatttgtgt tcacgctcac  
cgtgcccgagt gagcagaggac tgcagcgtag acgctttgtc tcaatgggaa  
tggtgaccog aacaacatgg acaaagcggc caaactgtac aggaaactaa  
aaagggaaat aacattccat ggggccaaag aagtagcgct cagttactct  
gctggtgcac ttgccagttg catgggcctc atatataaca gaatggggac  
tgtcaccact gaggtggcct ttggtctagt atgcgcaacc tgtgaacaga  
ttgctgattc ccagcatcga tctcatagac aatgggtgac aacaaccaat  
cactaatca ggcacgagaa cagaatggta ttagccagta caacagctaa  
agccatggaa caaatggctg gctcaagcga acaagcagca gaggctatgg  
aggttgccag ccaggctaga caaatggtag aggcaatgag aacaattggg  
actcacccta gttccagtg c tggctctaaa gatgatcttc ttgaaaattt  
acagacctat cagaaacgga tgggagtgca aatgcaacga ttcaagtgat  
cctctcattg ctgcccgaag catcattggg attttgcacc tgatattgtg  
gattcttgat cgtctttttt tcaaatacat ttaccgctcg tttaaatacg  
gtctgaaaag agggccttct acggaaggag tgccggagtc catgagggaa  
gaatatcgac aggaacagca gagtgctgtg gatggtgacg atggtcattt

---

tgtcaacata gtgctagagt aaaaaactac cttgtttcta ct

**Secuencia completa del Marco de Lectura Abierto 8 ( ORF 8) Gen NS1 y NS2**

GenBank: CY122353.1

atgacaaaga cataatgaat tccaacactg tgtcaagctt tcaggtagac  
tgtttccttt ggcatatccg caaacggttt gcagacaatg gatcgggtga  
tgccccattc cttgatcggc tccgccgaga tcaaaagtcc ctaaaaggaa  
gaggcaacac ccttggcctc gacatcgaaa cagccactct tgttgggaaa  
caaattgtgg agtggattht gaaagaggaa tccagcgaga cacttaagat  
gaccattgca tctgtaccta cttcgcgcta cctagctgac atgaccctcg  
aggaaatgtc acgagactgg ttcattgctca tgcctaggca aaagataata  
ggctctcttt gtgtgcgaat ggaccaggcg atcatggaaa agaacatcat  
actgaaagcg aacttcagtg tgatctttaa ccgattagag actttgatac  
tactaagggc tttcactgag gagggagcaa tcgttggaga aatttcacca  
ttaccttctc ttccaggaca tactgatgag gatgtcaaaaatgcagttgg  
ggtcctcatc ggaggacttg aatggaatgg taacacgggt cgagtctctg  
aaaatctaca gagattcgct tggagaaacc gtaatgagga tgggagacct  
tcactacctc cagagcagaa atgaaaagtg gcgagagcaa ttgggacaga  
aatttgagga aataaggtgg ttaattgaag aagtgcggca cagattgaaa  
gcgacagaga atagtttcga acaaataaca tttatgcaag ccttacaact  
actgcttgaa gtagaacaag agataaggac tttctcgtht cagcttattt  
aatgataaaa aacac