



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DEL VIRUS INFLUENZA A EN
PORCINOS DE RECRÍA Y CRIANZA, PERTENECIENTES A
SISTEMAS INTENSIVOS
UBICADOS EN LA ZONA CENTRAL DE CHILE**

RAÚL ANTONIO ARCE ROMÁN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Profesor Guía: Víctor Manuel Neira Ramírez

Proyecto Aislamiento, diagnóstico y caracterización de virus influenza A en producción
intensiva porcina nacional, 2014 Zoetis-Favet Etapa 1.

SANTIAGO, CHILE
2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DEL VIRUS INFLUENZA A EN
PORCINOS DE RECRÍA Y CRIANZA, PERTENECIENTES A
SISTEMAS INTENSIVOS
UBICADOS EN LA ZONA CENTRAL DE CHILE**

RAÚL ANTONIO ARCE ROMÁN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final

Firma

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR MANUEL NEIRA RAMÍREZ

PROFESOR CORRECTOR: JOSÉ PIZARRO LUCERO

PROFESOR CORRECTOR: JAIME FIGUEROA HAMED

SANTIAGO, CHILE
2016

“Siempre va haber alguien mejor que tú, y alguien peor que tú, lo importante es que tú des lo mejor de ti”

Papá

“Nunca pierdas la humildad”

Mamá

“Libertad es cuando las cosas vienen a ti y tú no vas tras ellas”

Yogi Bhajan

“Ni una inteligencia sublime, ni una gran imaginación, ni las dos cosas juntas forman el genio; AMOR, eso es el alma del genio”

Wolfgang Amadeus Mozart

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad” Querer es poder

Albert Einstein

La vida es muy corta... aprovéchala cada instante y da lo mejor de ti...eres extraordinario

Carpe Diem...

Carpe Diem...

Carpe Diem!!!

Agradecimientos y dedicatorias

Agradezco a mi Mamá, por estar siempre conmigo, por darme todo en la vida, por estar en las buenas y en las malas, por querer que sus hijos sean lo mejor posible, por dar todo por nosotros incluso más, por las horas de trabajo y esfuerzo, por darnos lo mejor de ella. Te quiero mucho vieja linda, y esto te lo dedico a ti, gracias por ser la mejor, todos tenemos defectos, pero tu demostraste ser más fuerte, de verdad no conozco persona más grande que tú... con mucho cariño espero que te sientas orgullosa de mí... y claro esto es solo un paso...nos quedan muchas más cosas por celebrar...

Agradezco a mi Papá, que a pesar de la distancia, siempre ha estado junto a mí, dándome el apoyo necesario para cumplir mis metas, estoy muy agradecido, te quiero mucho viejo. A mi hermano, que nos criamos juntos, decirle que es una gran persona... te quiero hermanito. A mi familia, todos mis tíos y primos que han sido un apoyo durante tantos años, y han estado siempre en las buenas y en las malas, en especial la tía Edith, el tío Leslie, Marlene y Paula, la familia Donoso y Román, los quiero mucho...

A mis amigos, quiero decirles que han sido los mejores años junto a ustedes, me gustaría poder nombrarlos a todos, pero los que siempre han estado conmigo desde el colegio, el Seba, el Chicuelo, los CDC, los amigos de la universidad; mi gran amigo Pastel, José, Marxelo, Oscar, Ropi, Diego, Feño, la Bea y la Maite, tantas personas que he tenido el gusto de conocer Mauro y Arturo, que me han entregado tanto y que han hecho que sea la persona que soy hoy, los quiero mucho amigos, y los extrañaré...

Al Dr. Carlos Navarro, por ser un gran apoyo y por mostrarme su espíritu de ir siempre al frente, al Dr. Patricio Pérez, por ser un muy buen amigo, al Dr. Iñigo Díaz, que fue mi maestro y me enseñó el cariño por los cerdos y al Dr. Juan Lazo, una gran persona. La tía Elcira, por entregarme tanto cariño. A Don Shone, maestro y gurú, como un segundo padre y un ejemplo de vida. La maestra Okarjhot Kaur, por apoyarme y ayudarme a superar las dificultades. La jefa Su, por ser tan linda persona. A mí amada hija Martina, que es mi motor de vida, por la que lucho cada día y una de las razones porque intento ser mejor persona... A mis queridos abuelos, que los llevo siempre conmigo... a mi Poitoo hermosa, que está recién empezando esta bella carrera y le deseo lo mejor... a todos quiero decirles: ¡¡¡GRACIAS TOTALES!!! Se acaba una etapa y empieza otra...

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
INTRODUCCIÓN	1
REVISION BIBLIOGRÁFICA	2
Etiología	2
Evolución de Influenza	4
Enfermedad	4
Diagnóstico	5
Bioseguridad	5
Normativa SAG	6
Justificación del estudio	7
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Ubicación geográfica de los planteles	9
Unidad Muestral y Toma de Muestras	9
Procesamiento de las muestras	10
Extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real	11
Aislamiento viral en cultivos celulares	11
Análisis Estadístico	12
RESULTADOS	14
Resultados por plantel	14
RT-PCR en tiempo real	15
Aislamiento viral	17
Concordancia entre técnicas	18
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXOS	27

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1: Número de muestras obtenidas por plantel	14
Tabla 2: Muestras positivas por plantel, según técnica utilizada	14
Tabla 3: RT-PCR en tiempo real	15
Tabla 4: Tabla de Contingencia de Chi Cuadrado (RT-PCR en tiempo real)	16
Tabla 5: Aislamiento viral en células MDCK.....	17
Tabla 6: Tabla de Contingencia de Chi Cuadrado (Aislamiento viral)	18
Tabla 7: Tabla de contingencia de 2 x 2 para análisis Kappa de Cohen.	18

FIGURAS

Figura 1: Ubicación Geográfica de los planteles muestreados.....	9
Figura 2: Resultados de RT-PCR en tiempo real, según tipo de muestra.	16
Figura 3: Resultados de aislamiento viral, según tipo de muestra.	17

RESUMEN

El virus de la influenza porcina o SIV (*Swine Influenza Virus*), es un patógeno que afecta el sistema respiratorio y produce una de las enfermedades más prevalentes a nivel de industria porcina. Está distribuido en todo el mundo y genera importantes pérdidas económicas. Además, SIV se considera un patógeno zoonótico con potencial pandémico. A partir del brote de influenza humana A H1N1 ocurrida el año 2009, ha surgido la necesidad de conocer y entender las dinámicas de evolución y transmisión de este virus, para beneficio de la salud humana y animal.

Realizar un estudio en Chile adquiere especial relevancia, ya que se necesita conocer la realidad actual de SIV en los planteles de producción intensiva de cerdos. El presente estudio tiene como objetivo detectar y aislar virus de Influenza A en la población de cerdos de la zona central de Chile, territorio en donde se concentra la gran mayoría de los planteles de producción intensiva. Para esto se obtuvieron muestras de hisopos nasales y fluidos orales desde 6 granjas ubicadas en esta zona (regiones V, RM, VI y VII) entre el año 2014-2015 en distintas épocas del año. Se utilizó RT-PCR en tiempo real para detectar el virus y se aisló mediante cultivo celular usando células MDCK.

Los resultados obtenidos demostraron la presencia del virus en todos los planteles muestreados. Hubo al menos dos muestras positivas a RT-PCR en tiempo real por granja. De las muestras sometidas a RT-PCR en tiempo real un 22,26% de ellas fueron positivas. Además se lograron aislar con éxito un total de 20 virus desde hisopos nasales y 2 desde fluidos orales, que corresponden a un 8,30% de las muestras obtenidas. Estos resultados indican que SIV es un patógeno frecuentemente encontrado en planteles de producción intensiva en Chile y altamente distribuido a nivel geográfico (desde la V a la VII región), por tanto podría considerarse endémico.

PALABRAS CLAVES: Aislamiento viral, fluidos orales, hisopos nasales, porcinos, RT-PCR en tiempo real, SIV (*Swine Influenza Virus*).

SUMMARY

Swine Influenza virus (SIV) is an important respiratory pathogen in intensive pig population, generating significant economic losses for the industry. Also, SIV is a zoonotic pathogen with pandemic potential. Since the 2009 human pandemic caused by a swine origin Influenza virus H1N1, the concern about this pathogen in pigs has been increased. Then, is urgent to understand the dynamics of evolution and transmission of this virus, for animal and public health.

The information about SIV in Chile is scarce; therefore any effort to understand or evidence SIV in the country is highly valuable. The aim of this study was the detection and isolation of SIV in intensive swine farms in central Chile, place where most of the pig are raising. Nasal swabs and oral fluids were collected from six farms (V, RM, VI and VII Regions) during 2014-2015 at different seasons through the year. Samples were tested by real time RT-PCR and virus isolation was attempted in canine kidney cells (MDCK).

The results showed the presence of SIV in all farms tested. At least 2 samples per farm tested positive by real time RT-PCR. Overall results by real time RT-PCR have shown a 22.3% positive samples. Also, virus isolation was succeeding in 20 nasal swabs and 2 oral fluids, corresponding to 8.30% of the samples collected. Results indicate that SIV is widespread in pig population in the region can be considered endemic.

KEYWORDS: Nasal swabs, oral fluids, real time RT-PCR, SIV (Swine Influenza Virus), Swine, viral isolation.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Influenza porcina (SIV, por sus siglas en inglés), es responsable de una de las enfermedades respiratorias más prevalentes en porcinos a nivel mundial (Brown, 2000) y una de las que causa mayores pérdidas económicas para la industria (Davies y Torremorell, 2009). La enfermedad se caracteriza por ser endémica en los planteles; es decir, está constantemente circulando entre los cerdos (Torremorell *et al.*, 2012). Se presenta con una alta morbilidad y una baja mortalidad, por lo que las pérdidas económicas son debido principalmente a la disminución en la ganancia de peso diaria de los cerdos, que se traduce en un retardo en alcanzar los pesos de venta (OIE, 2010).

Hoy en día, la enfermedad se considera un riesgo para la salud pública, ya que el virus tiene la capacidad de transmitirse a otras especies incluyendo al humano (Torremorell *et al.*, 2012). En esta situación el cerdo juega un rol fundamental al servir como “vaso mezclador”; ya que puede albergar virus de Influenza A de origen porcino, humano y aviar en su tracto respiratorio, producirse una infección múltiple y generar nuevas variantes por recombinación (Lekcharoensuk *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2007). Es así como una nueva variante del virus provocó el reciente brote pandémico de Influenza A H1N1 el año 2009 en la población humana, conocido inicialmente como la “Gripe Porcina”, causando miles de muertes alrededor del mundo (Chandra y Bisht, 2010; Vincent *et al.*, 2010). Esto sugiere la importancia de desarrollar programas de bioseguridad dentro de las granjas y mantener un seguimiento del virus a través de vigilancia epidemiológica.

En Chile aún se desconoce el *status* sanitario de las granjas porcinas respecto al virus de Influenza, aunque algunos estudios puntuales han descrito evidencia genética y serológica que demuestra la presencia de SIV en el país (Pereda, 2013; Nelson *et al.*, 2015).

En este estudio se logró identificar el virus Influenza A mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcripción reversa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real), además se pudo aislar el virus en células de riñón canino, *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) desde las mismas muestras. El objetivo era determinar la presencia del virus en los planteles de producción intensiva de cerdos en Chile, para posteriormente (como parte del proyecto) poder también evaluar la diversidad genética viral e identificar cepas con potencial zoonótico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La Influenza es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta el sistema respiratorio de los cerdos (OIE, 2010). Es producida por distintos subtipos del virus Influenza tipo A, que además de afectar al cerdo puede transmitirse a aves y humanos (Gramer, 2005). La severidad de los cuadros depende de algunos factores como: la edad del cerdo, la salud, el estado inmunológico y la presencia de co-infecciones (Schaefer *et al.*, 2008). El virus de la influenza porcina se presenta de dos formas en los planteles industriales: a) Enzootica con presencia de brotes intermitentes, en donde se observan signos clínicos como tos, descarga nasal y respiración abdominal, afectando generalmente a cerdos de recría (Gramer, 2007; Song *et al.*, 2007), b) Epizootica cuando el brote se propaga a todas las unidades del plantel (maternidad, recría, crianza y engorda) observándose los mismos signos clínicos pero con mayor gravedad (OIE, 2010). La enfermedad puede presentarse como entidad individual o como parte del complejo respiratorio porcino (conocida por sus siglas en inglés PRDC), en el que también participan el virus PRRS (Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino), *Mycoplasma hyopneumoniae* y el Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2) entre otros agentes, que complican los cuadros y generan mayores pérdidas económicas para la industria (Janke, 2000; Dykhuis *et al.*, 2012).

Etiología

El virus influenza que pertenece a la Familia *Orthomyxoviridae*, se caracteriza por ser un virus ARN, envuelto, de genoma segmentado, de hebra simple y sentido negativo (Gramer, 2005). La familia viral está compuesta por 5 géneros; Influenza A, B, C, Isavirus y Thogotovirus (Correa *et al.*, 2011). La Influenza A infecta a animales vertebrados, principalmente a cerdos, aves y humanos (Zhou *et al.*, 1999), aunque también suele encontrarse en equinos y ha sido descrita en mamíferos marinos (Brown, 2000). La Influenza B y C afectan solo al hombre, pero ocasionalmente pueden transferirse a los perros y a los cerdos (Vincent *et al.*, 2008). Isavirus se transmite entre salmones y el Thogotovirus se asocia a la infección de mamíferos por medio de garrapatas (Li *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2011).

Los virus Influenza A miden alrededor de 80-120 nm (Treanor, 2010) y poseen 8 segmentos que codifican para 10-11 proteínas (Vincent *et al.*, 2008). La Hemaglutinina (H) y la Neuraminidasa (N) son los principales antígenos virales y están ubicadas en la superficie viral. Estas proteínas son consideradas importantes, ya que definen los subtipos, el rango de hospederos y su patogenicidad (Vincent *et al.*, 2009). Se conocen 18 tipos de H (H1-H18) y 11 tipos de N (N1-N11) (Gramer, 2005; Tong *et al.*, 2013), y en los cerdos los subtipos más frecuentes son: H1N1, H3N2 y H1N2 (Ma *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2007; Allerson *et al.*, 2008).

Para identificar los virus Influenza se utiliza la nomenclatura que primero identifica el Género o tipo (Influenza A, B o C), luego la especie hospedera si no es humano, lugar de aislamiento (país o estado), número de laboratorio, año en el que fue aislado y finalmente el subtipo, ejemplo: A/Swine/Iowa/15/1930 (H1N1), que corresponde a un virus Influenza A, aislado en cerdos, en Iowa Estados Unidos, en el año 1930 y subtipificado como H1N1. Este virus es considerado un virus tipo para el cerdo, conocido hoy como H1N1 clásico (Gramer, 2005).

Debido a las características del virus (genoma ARN de hebra simple y segmentado) tienen una gran capacidad para mutar. Esto se ve reflejado principalmente en cambios a nivel de sus antígenos H y N (Canals, 2010). Existen dos mecanismos por los que el virus muta: deriva antigénica y recombinación genética. La deriva antigénica (*Antigenic Drift*) es la acumulación gradual de mutaciones puntuales que ocurren de forma natural y espontánea en las proteínas virales, en respuesta a una presión de selección en la población, dado generalmente por la acción del sistema inmune o la utilización de vacunas. Este fenómeno es muy común en el virus de la gripe humana, por lo que periódicamente se deben reemplazar las vacunas con cepas más contemporáneas (Olsen, 2002). Por otra parte, la recombinación genética (*Antigenic Shift*) ocurre cuando un animal sufre una infección múltiple, en donde los virus infectantes recombinan sus segmentos, pudiendo generar un nuevo virus con proteínas superficiales (H y N) o antígenos, que pueden no ser reconocidos por el sistema inmune del hospedero, y generar potencialmente brotes pandémicos (Stine *et al.*, 2002).

Evolución del SIV

Los primeros brotes de SIV, coincidieron con la primera pandemia de la era moderna, conocida como “La Gripe Española”, en el año 1918, donde murieron más de 20 millones de personas en el mundo (Olsen, 2002). El virus aislado fue un H1N1 (conocido hoy como H1N1 Clásico) y se mantuvo durante 80 años como el único subtipo identificado (Smith *et al.*, 2009). En el año 1998 el panorama cambia, surgiendo nuevos subtipos de virus Influenza. El H3N2, fue aislado por primera vez en granjas de EUA (Choi *et al.*, 2004) el cual poseía genes de origen porcino y humano (Doble-Recombinante). Posteriormente se identificó otro H3N2 que además contenía genes aviares (Triple-Recombinante o trH3N2) (Gramer, 2007). El virus trH3N2 se adaptó rápidamente a los cerdos volviéndose endémico y distribuyéndose por todo el mundo (Shin *et al.*, 2006). La presencia de dos subtipos, el H1N1 clásico y trH3N2 produjo una tercera recombinación de virus, creando el subtipo H1N2 (Lekcharoensuk *et al.*, 2006), en donde el H pertenecía al H1N1 Clásico y el N más los genes internos pertenecían al H3N2 (Vincent *et al.*, 2009). Estos son los subtipos que hoy en día predominan en la población de cerdos del mundo con diferencias antigénicas entre regiones (Vincent *et al.*, 2014).

En Chile se han realizado estudios serológicos que demuestran seropositividad de un 48% para Influenza A H1N1 y de un 22% para el subtipo H3N2 considerando 13 planteles de producción intensiva y animales positivos en todas las unidades de producción (maternidad, recría, crianza y engorda) (Pereda, 2013). Estas mediciones aún no han sido publicadas, pero se sospecha que los subtipos H1N1 y H3N2 han seguido circulando los últimos años en la industria porcina chilena.

Enfermedad

La transmisión de SIV se produce por contacto directo entre cerdos, a través de secreciones y aerosoles (Torremorell *et al.*, 2012). También puede transmitirse la enfermedad de un plantel a otro por el movimiento de animales (Brown, 2000). Del mismo modo puede infectarse un rebaño a través de agua contaminada con heces de aves silvestres, o por contacto directo de los cerdos con los trabajadores de la granja, a través de su ropa en forma de fomites e incluso puede ir en los camiones que transportan los animales (Torremorell *et al.*, 2012).

El virus de la influenza porcina entra al aparato respiratorio infectando desde el epitelio de la cavidad nasal, hasta llegar a las vías respiratorias bajas. La infección puede involucrar todas las vías aéreas en tan sólo unas horas. Los animales desarrollan posteriormente una neumonía bronco-intersticial que se caracteriza por lesiones pulmonares bruscamente demarcadas en los lóbulos apicales y cardíacos, con hiperemia, consolidación, y la presencia de exudados inflamatorios en las vías respiratorias. Histológicamente las superficies epiteliales son destruidas y se acumulan los restos celulares en el espacio intraluminal. Hay colapso de los espacios aéreos adyacentes, neumonía intersticial y enfisema (Fenner, 2011).

Los signos clínicos en los cerdos son similares a los de la gripe en humanos, con presencia de tos, descarga nasal, edema facial, fiebre, dificultad para respirar, conjuntivitis, letargo y disminución del apetito (Webster *et al.*, 1992; Allerson *et al.*, 2008). En algunas instancias se ha asociado también a enfermedades reproductivas como abortos debido a la fiebre que causa en hembras gestantes (OIE, 2010).

Diagnóstico

El virus puede obtenerse desde animales vivos infectados, a través de hisopos nasales y fluidos orales (Romagosa *et al.*, 2012). Los fluidos orales están compuestos por saliva y otros componentes y en ellos se pueden encontrar agentes patógenos y anticuerpos, siendo método no invasivo, que no requiere mucho entrenamiento de los operarios y no utiliza equipamiento especializado (Romagosa *et al.*, 2012). En la necropsia, se puede extraer desde muestras de tráquea y lóbulos pulmonares afectados (Vincent *et al.*, 2009). Las muestras pueden someterse a aislamiento viral en células MDCK o en huevos embrionados de pollo para amplificar el virus. Los subtipos de la gripe pueden determinarse a través de las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y de inhibición de la neuraminidasa o por medio de RT-PCR (OIE, 2010).

Bioseguridad

Es importante tener en cuenta, al trabajar con el Virus Influenza A que es un virus potencialmente riesgoso para la población humana y animal, además de tener la capacidad de propagarse fácilmente por contacto directo entre individuos y a través del aire. La CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades) junto con la OMS (Organización Mundial

de la Salud) recomiendan laboratorios con nivel mínimo de bioseguridad 2; esta designación se basa en una combinación de características de diseño, construcción, medios de contención, equipos, prácticas y procedimientos de operación necesarios para evitar la propagación del agente (Anexo 1).

El acceso al laboratorio debe ser solo de personal autorizado, debe haber señaléticas de advertencia, que alerten del peligro biológico. La protección del personal debe incluir el uso de delantal, guantes protectores, mascarillas y gafas de seguridad si es necesario, para proteger los ojos de salpicaduras. Además, se debe considerar siempre el lavado de manos antes y después de la manipulación de material infeccioso.

La manipulación de las muestras y material infeccioso debe efectuarse dentro de una cámara de flujo laminar o cabina de bioseguridad, que tiene por función proteger al operador, las muestras y el ambiente, manteniendo un constante flujo y recambio de aire, asimismo de filtrarlo y limpiarlo.

Las superficies de trabajo se deben descontaminar después de cada jornada de trabajo y después de todo derrame de material potencialmente peligroso. Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados deberán ser descontaminados antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a utilizar y para esto se debe contar con un equipo de autoclave o similar. El personal debe informar al jefe o encargado del laboratorio de inmediato si presenta síntomas relacionados a influenza que incluyen tos, dolor de garganta, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, secreción nasal y dolores musculares.

Normativa del SAG

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) no considera a la Influenza como una enfermedad de denuncia obligatoria, ya que es endémica en los planteles industriales. Sin embargo, si existe alguna denuncia por parte de los planteles, el SAG procede a tomar muestras para el diagnóstico.

Por otra parte, el control de la enfermedad incluye el uso de vacunas, las que pueden o no encontrarse autorizadas en nuestro país. Si no existiese autorización, los planteles deben solicitar la Autorización de Uso especial al SAG, en la cual adjunta todos los antecedentes requeridos para que el Servicio evalúe la pertinencia de la aplicación de ésta, señalando que

es por un tiempo determinado y por una cantidad de dosis específica exclusivas para quien las solicita (SAG, 2015).

Justificación del estudio

Debido a que el virus Influenza es un problema para la industria porcina y también tiene un potencial riesgo zoonótico, existe la necesidad de realizar estudios diagnósticos donde se detecten y caractericen los virus circulantes en el país, para mantener así una constante vigilancia epidemiológica y poder desarrollar vacunas locales para la prevención de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Detectar y aislar el virus Influenza A desde porcinos de recría y crianza, pertenecientes a planteles de producción intensiva ubicados en la zona central de Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Determinar la presencia del virus Influenza A en muestras obtenidas de porcinos de recría y crianza, pertenecientes a planteles de producción intensiva ubicados en la zona central de Chile.
- 2.** Aislar el virus Influenza A en células MDCK desde muestras obtenidas de porcinos de recría y crianza, pertenecientes a planteles de producción intensiva ubicados en la zona central de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica de los planteles

Los planteles del estudio están distribuidos en la zona central de Chile, donde se encuentra el mayor porcentaje de la producción porcina nacional. Todos los planteles incluidos en el estudio son considerados “Mono-sitios”; granjas en donde las distintas unidades productivas (maternidad, recría, crianza y engorda) se encuentran en el mismo lugar.

En total se muestrearon 6 granjas, las que fueron nombradas con letras desde la A a la F y ordenadas según su ubicación geográfica. El plantel A se encuentra ubicado más al norte en la comuna de San Esteban, Provincia de Los Andes V Región de Valparaíso. El plantel B en el valle de Malla Rauco, Provincia de Melipilla, Región Metropolitana. El plantel C en Isla de Maipo, Provincia de Talagante en la Región Metropolitana. El plantel D en San Francisco de Mostazal, VI Región de Libertador Bernardo O’Higgins. El plantel E en Teno y el plantel F en la ciudad de Curicó, Provincia de Curicó VII Región Del Maule (Figura 1).



Figura 1. Ubicación geográfica de los planteles muestreados. Foto tomada con Google Earth.

Unidad muestral y toma de muestras

Las muestras fueron obtenidas desde cerdos comerciales de recría y crianza, en un rango de 30 a 100 días de vida, que hayan estado cursando con signos clínicos de enfermedad respiratoria (tos, descarga nasal, decaimiento, dificultad para respirar, etc.), desde 6 planteles de producción intensiva de la zona central de Chile. De estos planteles se obtuvo hisopos nasales (muestra individual) y fluido oral (muestra grupal).

Para el muestreo de hisopado nasal (HN) cada cerdo fue restringido de movimiento con la ayuda de un puro (herramienta de sujeción para cerdos), el cual era sostenido por un operario. Luego, el investigador introdujo un hisopo (BD BBLTM CultureSwab™, Sparks, MD, USA) por ambas fosas nasales. La muestra de fluido oral (FO), se obtuvo utilizando cuerdas trenzadas de algodón (1 x corral), las que fueron colgadas desde las rejas de los corrales durante 20 minutos para que todos los cerdos del corral tengan acceso a morderla (Romagosa *et al.*, 2012) (Anexo 2). Este procedimiento se realizó de la siguiente forma: cada corral con cerdos sospechosos de enfermedad respiratoria fueron muestreados con hisopos nasales de forma individual, y luego en el mismo corral se obtuvo la muestra de fluidos orales.

Los protocolos descritos en el presente estudio fueron realizados según las normas y directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica que está certificado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 3).

Procesamiento de las Muestras

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Virología Animal del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Los hisopos nasales fueron depositados en criotubos con 2mL de medio SIV [Medio mínimo esencial (MEM), 0,1% tripsina tratada con TPCK (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone), 1% antibiótico/antimicótico (Penicilina/Streptomycin + Anfotericina B) y 2% seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) al 7%]. Los fluidos orales se centrifugaron por 10 minutos a 5.000 revoluciones por minuto (R.P.M) para decantar impurezas. El sobrenadante se depositó en criotubos de 2mL.

Cada muestra fue dividida en 3 alícuotas, una alícuota para RT-PCR de 300µl, otra de 1mL para aislamiento viral y como muestra de respaldo. Los tubos fueron posteriormente rotulados y congelados a -80°C hasta su diagnóstico.

Extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real

Se procedió a extraer y purificar el ARN presente en las muestras, para luego amplificarlo mediante la técnica de RT-PCR. Esta etapa es necesaria para eliminar los componentes celulares, citoplasma y otros que puedan interferir con la reacción de PCR. Para esto se utilizó TRIzol® LS Reagent siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 4). Finalmente, se obtuvo un precipitado de ARN que fue disuelto en 50µl de agua ultra pura para luego ser utilizado en el RT-PCR.

El ARN de las muestras se amplificó mediante RT-PCR en tiempo real, previamente estandarizado y que corresponde al procedimiento estándar de Centro de Control y Prevención de las Enfermedades (CDC) para el diagnóstico de Influenza A. La región amplificada se encuentra en el segmento 7 o gen de la matriz (M) de Influenza A, y que utiliza los siguientes Partidores (Primers): Promotor INF A 5'-GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGAC-3', Reverso INF A 5'-AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA-3' y Sonda 5' FAM- TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG- BHQ1-3'. La amplificación fue realizada utilizando TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante (CDC, 2009) (Anexo 5).

En cada reacción se incluyeron controles positivos y negativos. En el caso del control positivo se utilizó una muestra de campo previamente identificada y aislada. Como control negativo fue utilizado el sobrenadante de células MDCK no infectado. Muestras con ciclo umbral (C_T , por sus siglas en inglés) $C_T < 35$ fueron consideradas como positivas mientras que las que presenten $C_T > 35$ fueron consideradas negativas.

Aislamiento Viral en Cultivos Celulares

Posterior al RT-PCR se intentó el aislamiento viral en todas las muestras. Se prepararon monocapas de MDCK ATCC® CCL-34™ utilizando frascos de cultivo rectangulares con cuello oblicuo de 25cm² Corning®. Para el crecimiento celular fue usado MEM al 10% SFB (Suero fetal bovino) con 1% antibiótico/antimicótico y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

Una vez que las monocapas presentaron un 80% de confluencia fueron lavadas dos veces con PBS Corning® (Buffer Fosfato Salino) + tripsina TPCK SIGMA®. Posteriormente, se inoculó 100 a 200µl de muestra (hisopo nasal o fluido oral). Luego, los frascos fueron

incubados por 45 minutos a 37°C y con 5% CO₂. Una vez alcanzados los 45 minutos, se agregó 6mL de medio SIV y luego el cultivo se incubó a 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos inoculados con muestras provenientes de fluidos orales fueron lavados 2 veces más con PBS+TPCK antes de agregar el medio de cultivo, ya que contienen mayor cantidad de detritus.

Diariamente se evaluó la presencia de efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés) (destrucción de la monocapa) que produce el virus influenza en las células MDCK, observándose al microscopio a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación. Los resultados que pueden obtenerse son: positivo, cuando el virus destruye la monocapa de forma evidente y progresiva, negativo cuando la monocapa se mantiene integra (Anexo 6).

Una vez obtenidos los cultivos positivos a CPE, se confirmó la presencia de Influenza A a través de RT-PCR en tiempo real, tal como fue descrito previamente.

Análisis Estadístico

Una vez realizados los RT-PCR y los aislamientos virales a la totalidad de las muestras, se analizaron los resultados de forma descriptiva. El estudio contempló en primera instancia la comparación entre tipo de muestras (fluido oral vs hisopo nasal), esto para evidenciar con cual se logró obtener mayor cantidad de muestras positivas. Esta comparación se realizó tanto para la técnica de RT-PCR en tiempo real, como para los aislamientos virales. Incluyó una comparación de porcentaje de muestras positivas a través de gráfico de barras además de la utilización de la prueba de Chi cuadrado para ver si las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Finalmente se realizó una prueba de concordancia utilizando Kappa para determinar si los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real y el aislamiento viral tienen algún grado de similitud en el número de muestras positivas. Cada una de las muestras se categorizó de acuerdo a los resultados obtenidos por ambas técnicas. Con estos resultados, fue completada la tabla de 2 x 2 que permite realizar el análisis de concordancia, la que fue realizada utilizando QUICKCALCS GraphPad Software online. A continuación se detallan las categorías de nivel de concordancia respecto al valor Kappa.

Valor de Kappa	Nivel de concordancia	% de datos confiables
0.00 - 0.20	Ninguna	0 - 4%
0.21 - 0.39	Mínima	4 - 15%
0.40 - 0.59	Débil	15 - 34%
0.60 - 0.79	Moderada	35 - 63%
0.80 - 0.99	Fuerte	64 - 81%
Mayor a 0.99	Casi perfecta	82 - 100%

RESULTADOS

Resultados por plantel

Se obtuvieron 265 muestras desde los 6 planteles descritos, con un total de 51 fluidos orales (FO) y 214 hisopos nasales (HN). En la Tabla 1. se puede ver la fecha en que se tomaron las muestras, la edad de los cerdos y el número de muestras obtenidas por plantel según tipo de muestra.

Tabla 1. Número de muestras obtenidas por plantel según tipo de muestra

Planteles	Fecha	Edad (d)	Tipo de muestras		Total
			Fluido oral	Hisopo nasal	
Plantel A	01/12/2014	36 a 56	7	35	42
Plantel B	24/11/2014	45 a 54	8	40	48
Plantel C	24/07/2014	33 a 75	8	31	39
Plantel D	04/12/2014	50 a 67	7	43	50
Plantel E	11/03/2015	70- 100	7	30	37
Plantel F	21/01/2015	55	14	35	49
Total general			51	214	265

Los resultados obtenidos en cada uno de los planteles, tanto a la técnica RT-PCR en tiempo real y aislamiento viral se detallan a continuación.

Tabla 2. Muestras positivas por plantel, según técnica utilizada.

Planteles	RT-PCR (+)	fo	hn	Aisl. Viral (+)	fo	hn	Ambas (++)	fo	hn
Plantel A	7 (16,6%)	3	4	7 (16,6%)	2	5	4 (9,5%)	2	2
Plantel B	19 (39,58)	7	12	14 (29,16%)	0	14	10 (20,83%)	0	10
Plantel C	7 (17,94%)	4	3	0 (0%)	0	0	0 (0%)	0	0
plantel D	2 (4%)	2	0	0 (0%)	0	0	0 (0%)	0	0
Plantel E	22 (59,4%)	1	21	0 (0%)	0	0	0 (0%)	0	0
Plantel F	2 (4,08%)	1	1	1 (2%)	0	1	1 (2%)	0	1

El virus fue detectado en todas las granjas en estudio mediante la técnica RT-PCR en tiempo real y es importante destacar que se obtuvieron muestras positivas en distintas épocas del año. Por otra parte, el aislamiento viral solo fue posible en 3 de los planteles.

Posterior al análisis predial, se realizó un análisis global, el cual consideró el total de muestras obtenidas en el estudio, donde se compararon los tipos de muestra utilizada (fluido oral vs hisopo nasal), para determinar cual muestra es mejor según la técnica utilizada. También se evaluó el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real y aislamiento viral.

Resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real

Los resultados de RT-PCR en tiempo real de un total de 265 muestras, 59 muestras fueron positivas (22,26 % del total), esto incluye 18 fluidos orales y 41 hisopos nasales, mientras que 206 muestras fueron negativas a la presencia de Influenza A (77,74% del total), las que incluyen 33 fluidos orales y 173 hisopos nasales (Tabla 3).

Tabla 3. RT-PCR en tiempo real

	Positivo		Negativo		Total N°	Total %
Tipo de muestra	N°	%	N°	%		
Fluido Oral	18	35,29%	33	64,71%	51	100%
Hisopo nasal	41	19,16%	173	80,84%	214	100%
Total general	59	22,26%	206	77,74%	265	100%

Los resultados indican que los fluidos orales tienen un mayor porcentaje (35,29%) de muestras positivas al RT-PCR comparado con el hisopo nasal en el que se obtuvieron solo 19,16% de las muestras totales positivas a Influenza A (Figura 2.).

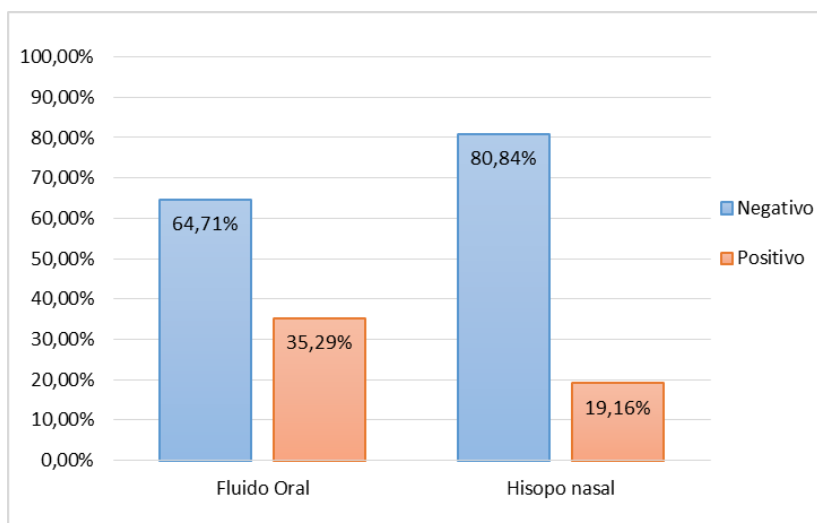


Figura 2. Resultados de RT-PCR en tiempo real, según tipo de muestra.

Para determinar diferencias estadísticas entre fluido orales e hisopos nasales en la detección mediante RT-PCR en tiempo real, se realizó un prueba de Chi cuadrado utilizando una tabla de contingencia (QUICKCALCS GraphPad Software online) (Tabla 4). En la prueba de Chi cuadrado se obtuvo un $p < 0,05$, por tanto las muestras son consideradas distintas. Es decir, el tipo de muestra influye en los resultados, y se considera que estadísticamente el fluido oral es mejor muestra que el hisopo nasal para el RT-PCR en tiempo real en condiciones de infección natural.

Tabla 4. Tabla de Contingencia de Chi Cuadrado

Tipo de muestra	Positivo RT-PCR	Negativo RT-PCR	Total
Fluido oral	18	33	51
Hisopo nasal	41	173	214
Total	59	206	265

Hipótesis nula= las muestras son iguales P = 0,0128

Resultados obtenidos por Aislamiento Viral

Los resultados obtenidos tras realizar aislamiento viral en células MDCK muestran que de un total de 265 muestras, 22 fueron positivas al aislamiento viral (8,30% del total) incluyendo 20 hisopos nasales y 2 fluidos orales, mientras que 243 (91,70% del total) muestras fueron negativas incluyendo 194 hisopos nasales y 49 fluidos orales (Tabla 5). Todos los aislamientos fueron corroborados a través de RT-PCR en tiempo real confirmando la presencia del virus.

Tabla 5. Aislamiento viral en células MDCK

Tipo de muestra	Positivo		Negativo		Total N°	Total %
	N°	%	N°	%		
Fluido Oral	2	3,92%	49	96,08%	51	100%
Hisopo nasal	20	9,35%	194	90,65%	214	100%
Total general	22	8,30%	243	91,70%	265	100%

Los resultados indican que hisopo nasal tiene mayor porcentaje de muestras positivas al aislamiento viral (9,35%), mientras que el fluido oral tuvo un menor porcentaje (3,92%) de las muestras positivas al aislamiento del virus Influenza A (Figura 3.).

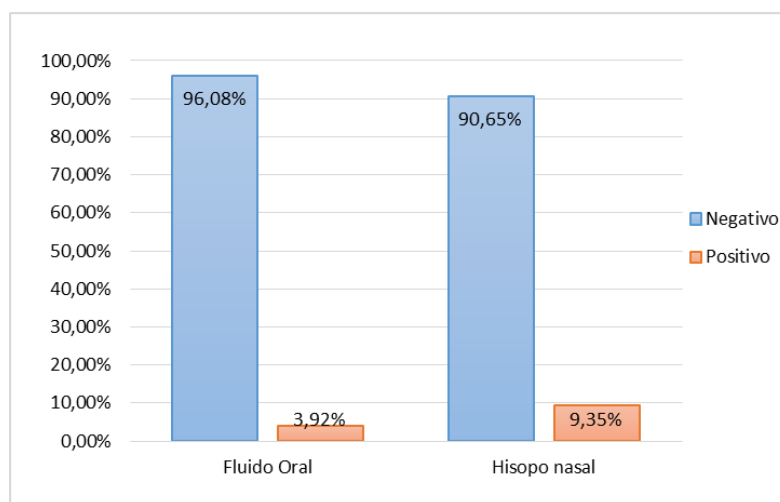


Figura 3. Resultados de aislamiento viral en células MDCK, según tipo de muestra.

Para determinar si las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas, se realizó una prueba de Chi cuadrado utilizando una tabla de contingencia (Tabla 6). En la prueba de Chi cuadrado se obtuvo un $p > 0,05$, por tanto las muestras son consideradas iguales para este método de diagnóstico. Es decir, el tipo de muestra no influye en los resultados, y se considera que estadísticamente el fluido oral es similar muestra que el hisopo nasal para el aislamiento viral en células MDCK para este estudio.

Tabla 6. Tabla de Contingencia de Chi Cuadrado.

Tipo de muestra	Positivo Aislamiento	Negativo Aislamiento	Total
Fluido oral	2	49	51
Hisopo nasal	20	194	214
Total	22	243	265

Hipótesis nula= las muestras son iguales P = 0,2071

Concordancia entre técnicas

La prueba de Kappa de Cohen (Tabla 5) reportó un valor de 0,284, que se encuentra dentro del rango 0,21- 0,40, que considera que existe una asociación mínima, por lo que podríamos inferir que los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real no son concordantes a los obtenidos por aislamiento viral.

Tabla 7. Tabla de contingencia de 2 x 2 para análisis Kappa de Cohen.

	+ aislamiento	- aislamiento	Total
+ RT-PCR	15	44	59
- RT-PCR	7	199	206
Total	22	243	265

Kappa= 0,284

DISCUSIÓN

Influenza A es una enfermedad que afecta tanto a la población humana como a la animal, comprobándose una estrecha relación en la evolución del virus por medio de la transmisión entre porcinos, personas y aves; ocurriendo recombinaciones genéticas que hacen que surjan nuevas cepas o subtipos (Yadav y Rawal 2015). A partir de la pandemia de H1N1 ocurrida el año 2009, nuestro entendimiento de las dinámicas de evolución y diversidad del virus influenza en los cerdos se ha incrementado, por lo que se ha hecho necesario profundizar en su estudio (Vincent *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2015). La presente investigación tuvo por objetivo detectar y aislar virus de Influenza A en la población de cerdos de la zona central de Chile, donde se concentra la gran mayoría de los planteles de producción intensiva.

Los resultados obtenidos indican que SIV es un patógeno frecuentemente encontrado en planteles de producción intensiva en Chile, ya que en todas las unidades muestreadas se logró identificar este agente, por tanto podría considerarse endémico. Además, se debe considerar que el virus estuvo presente desde la V a la VII región, lo que quiere decir que está altamente distribuido a nivel geográfico. El carácter endémico de SIV en Chile no ha sido previamente reportado, ya que solo existen descripciones serológicas y genéticas puntuales, sin considerar la distribución del virus (Pereda, 2013; Nelson *et al.*, 2015). La alta diseminación del virus en los planteles porcinos nacionales concuerda con lo que se describe en todo el mundo (Vincent *et al.*, 2014). Los diferentes niveles de detección observados en las granjas se pueden deber a factores prediales como el momento en que se tomaron las muestras respecto de la aparición de los signos clínicos y el nivel de infección de los animales que puede estar relacionado con el tipo de virus, nivel de inmunidad materna entre otros (Corzo *et al.*, 2012; Torremorell *et al.*, 2012).

Por otro lado, es importante mencionar que la mayoría de los muestreos fueron realizados durante la temporada primavera-verano, y aun así el virus fue detectado. Históricamente, se ha descrito a SIV como un patógeno más frecuente en otoño-invierno, aunque recientemente Corzo *et al.*, 2013 ha demostrado la presencia constante del virus a través del año, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Respecto a los resultados de RT-PCR en tiempo real, esta se consideró la técnica más sensible ya que el 22,3% de las muestras totales fueron positivas y en todos los planteles hubo al menos dos muestras positivas. El RT-PCR en tiempo real ha sido recomendado como la técnica de elección para cuadros de Influenza A por su excelente sensibilidad, no tan solo en porcinos si no que para cualquier especie animal (CDC, 2009). De acuerdo al tipo de muestra, el fluido oral resultó ser la muestra con la que se obtuvo mejores resultados (35.3% de las muestras fueron positivas). El fluido oral, corresponde a una muestra grupal en donde están representados la mayoría de los animales de un corral, por lo que debería existir una mayor probabilidad de detectar el virus. Estadísticamente ambos tipos de muestras fueron consideradas diferentes cuando el RT-PCR tiempo real es usado, siendo el fluido oral una muestra que aumento la sensibilidad de la técnica. Esta mayor sensibilidad ha sido comprobada a nivel experimental determinando que la probabilidad de detectar SIV en granjas con prevalencias de la enfermedad >18% es de un 99% y cuando esta disminuye a un 9% la probabilidad se reduce a un 69% (Romagosa *et al.*, 2012). Cabe destacar que nuestro muestreo de hisopos nasales está diseñada para detectar al menos un animal positivo con una prevalencia >10%. Así probablemente en el plantel D por ejemplo, que no tiene hisopo nasal, pero si fluido oral, la prevalencia de SIV sea menor al 10%.

Los resultados de aislamiento viral mostraron solo un 8,3% de positivos totales, siendo el hisopo nasal la muestra con mayor éxito, logrando el aislamiento de 20 virus (9,35% de los hisopos nasales), mientras que el fluido oral solo fue exitoso en 2 ocasiones (3,92% de los fluidos orales). El mayor éxito del aislamiento en hisopo nasal puede estar relacionado a que esta es una muestra mucho más limpia que el fluido oral, la que comúnmente contamina el cultivo y se ha demostrado es capaz de reducir la infectividad de SIV rápidamente (Decorte *et al.*, 2015). También podría explicarse por un efecto dilución del fluido oral, sin embargo, está descartado de acuerdo a los estudios previamente realizados que indican que la muestra de fluido oral para la técnica de RT-PCR tiene una alta sensibilidad (Romagosa *et al.*, 2012). Sin embargo, las diferencias detectadas no resultaron ser estadísticamente significativas.

A nivel predial, se observa una gran variación en el nivel de detección del virus entre predios encontrándose desde 2 a 23 muestras positivas, representando diferencias desde un 4% hasta

un 47,9% de muestras positivas en cada granja. El número de muestras positivas debería estar directamente relacionado con la prevalencia de la infección viral, y esto a su vez con la presentación clínica (Neira *et al.*, 2016).

El análisis estadístico mediante Kappa entre RT-PCR en tiempo real y aislamiento viral mostró que los resultados entre estas 2 técnicas tienen una “mínima” concordancia (Kappa=0,284). Este resultado se ve reflejado en el bajo número de muestras positivas a las 2 técnicas: tan solo 15 de un total de 66 muestras positivas, equivalente al 22,72 %. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios que demuestran de que a pesar de detectar mediante RT-PCR el virus en el 100% de animales infectados (experimentalmente mediante hisopos nasales), el aislamiento del virus desde las mismas muestras es difícil de lograr, y es aún más difícil desde muestras de fluido oral (Decorte *et al.*, 2015). Eso se debe a que la técnica de RT-PCR en tiempo real detecta material genético y este puede estar presente en un virus no viable o no infeccioso, por lo tanto será negativo al aislamiento.

Un resultado inesperado, es aquel en el cual se aísla el agente pero la muestra es negativa a RT-PCR en tiempo real, lo cual se observó en los planteles A y B en 3 y 4 ocasiones respectivamente. Cabe destacar que en estos planteles se obtuvo mayor éxito de aislamiento 21 de 22 aislados totales respectivamente, y existió también un gran número de RT-PCR en tiempo real positivos. Una muestra positiva a aislamiento y negativa a RT-PCR en tiempo real, puede explicarse por varias razones; la principal, la presencia de falsos negativos a RT-PCR en tiempo real. En este estudio se propuso como punto de corte el Ct 35, muestras con Ct entre 35 y 40 típicamente son consideradas como sospechosas y existe la posibilidad de que haya virus viable en ellas, los que serían capaces de propagarse en células. Cuatro de estas muestras presentaron Cts menores a 37 por lo cual es altamente factible de que esta sea la razón. Por otro lado, menos probable es que haya existido una inhibición de la reacción de RT-PCR en tiempo real o una contaminación del cultivo celular, ambas razones podrían explicar aquellas 3 muestras en esa condición. Esto puede estar relacionado a varios factores.

CONCLUSIONES

1. El virus Influenza A fue detectado en todos los planteles muestreados en esta memoria de título, esto sugiere que SIV es endémico en los planteles porcinos de producción intensiva ubicados entre la V a VII región de la zona central de Chile.
2. Fue posible detectar SIV tanto en las estaciones más frías otoño-invierno, como también en épocas de primavera-verano, esto sugiere que el virus se encuentra presente en los predios durante todo el año.
3. Utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real obtuvimos muestras positivas en todos los planteles, tanto en muestras de fluido oral como hisopo nasal. Los resultados indican que la muestra de fluido oral es mejor que el hisopo nasal en la detección de SIV en este estudio. Por lo tanto se puede considerar que RT-PCR es una herramienta efectiva en la detección del virus, tiene una alta capacidad diagnóstica y puede utilizarse de forma segura para el diagnóstico de SIV.
4. En el aislamiento viral se logró aislar con éxito SIV solo desde 3 planteles, con un menor número de muestras positivas en comparación con el RT-PCR en tiempo real, lo que demuestra que es una técnica que tiene menor éxito, debido a la complejidad que esta presenta. En este caso, la muestra de hisopo nasal permitió obtener un mayor número de virus que la muestra de fluido oral, aunque sin obtenerse diferencias estadísticamente significativas.
5. El análisis de concordancia indica que el aislamiento viral y el RT-PCR en tiempo real tienen una concordancia mínima, por lo que estas técnicas deben usarse para objetivos distintos y complementarios. Así, para la detección del virus en un plantel es recomendable usar la RT-PCR en tiempo real, preferentemente con muestras de fluido oral. El aislamiento viral, preferentemente con muestras de hisopo nasal, es la elección para obtener el virus y mantenerlo infectivo, por ejemplo para el desarrollo de vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

ALLERSON, M.; SCHAEFER, N.; GRAMER, M.; WAYNE, S.; NEREM, J.L.; BRADFORD, J.R.; NEWBERRY J.R. 2008. Maternally derived antibody transfer to piglets following SIV vaccination. **In:** AASV 39 Annual Meeting. San Diego, California USA. March 8-11, 2008. 41-44.

BROWN, I.H. 2000. The epidemiology and evolution of influenza virus in pigs. *Vet Microbiol.* 74: 29-46.

CANALS, M. 2010. Análisis comparado de la dinámica epidemiológica de la Influenza A (H1N1) en Chile. *Rev Med Chile.* 138: 1186-1196.

CDC. 2009. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). pag: 1-7.

CHANDRA, S.; BISHT, N. 2010. Swine Influenza. *Apollo Medicine,* 7(1):21-31.

CHOI, Y.K.; LEE, J.H.; ERICKSON, G.; GOYAL, S.M.; JOO, H.S.; WEBSTER, R.G.; WEBBY, R.J. 2004. H3N2 influenza virus transmission from swine to turkeys, United States. *Emerg Infect Dis.* 10(12):2156-60.

CORREA, J.J.; MANCIPE, L.F.; DIAZ, C.A. 2011. Actualización sobre la influenza porcina en Colombia. *Rev Porcicultura Iberoam* 2:1.

CORZO, C A.; CULHANE, M.; JULEEN, K.; STIGGER-ROSSER, E.; DUCATEZ, M F.; WEBBY, R J.; LOWE, J F. 2013. Active Surveillance for Influenza A Virus among Swine, Midwestern United States, 2009–2011. *Emerg Infect Dis.* 19(6): 954–960.

DAVIES, P.; TORREMORELL, M. 2009. Impact of 2009 H1N1 pandemic flu. **In:** 2009 Allen D. Lemay Swine Conference. St. Paul Minnesota, EUA. Miercoles 29 de Abril de 2009. University of Minnesota. pp. 95-100.

DECORTE, I.; STEENSELS, M.; LAMBRECHT, B.; CAY, AB.; DE REGGE, N. 2015. Detection and Isolation of Swine Influenza A Virus in Spiked Oral Fluid and Samples from Individually Housed, Experimentally Infected Pigs: Potential Role of Porcine Oral Fluid in Active Influenza A Virus Surveillance in Swine. *PLoS One* 10(10).

DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

DYKHUIS, C.; PAINTER, T.; FANGMAN, T.; HOLTKAMP, D. 2012. Assessing production parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* on finishing pigs in a large production system. **In:** AASV 43rd Annual Meeting. Denver, Colorado USA. March 10-13, 2012:75-76.

FENNERS. 2011. Orthomyxoviridae. **In:** Fenner's Veterinary Virology. Elsevier. Part II Veterinary and Zoonotic Viruses. Capitulo 21: 353-370.

GRAMER, M. 2005. Defining Swine Influenza Virus. *J Swine Health Prod.* 13 (3):157–160.

GRAMER, M. 2007. SIV: An update on circulating strains, advances in diagnostic tests and interpretation of test results. **In:** AASV 38th Annual Meeting. Orlando, Florida USA. March 3-6, 2007. 11-17.

JANKE, B.H. 2000. Diagnostic of swine influenza. *Swine Health Prod.* 8(2):79-84.

JO, S.K.; KIM, H.S.; CHO, S.W.; SEO, S.H. 2007. Pathogenesis and inflammatory responses of swine H1N2 influenza viruses in pigs. *Virus Res.* 129 (1):64-70.

LEKCHAROENSUK, P.; LAGER, K.M.; VEMULAPALLI, R.; WOODRUFF, M.; VINCENT, A.L.; RICHT, J.A. 2006. Novel Swine Influenza Virus Subtype H3N1, United States. *EID journal.* Vol. 12. (5):787-794.

LI, G.; WANG, N.; GUZMAN, H.; SBRANA, E.; YOSHIKAWA, T.; TSENG, C.T.; TESH, R.B.; XIAO, S.Y. 2008. Dhori virus (Orthomyxoviridae: Thogotovirus) infection of mice produces a disease and cytokine response pattern similar to that of highly virulent influenza A (H5N1) virus infection in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 78(4):675-80.

MA, W.; GRAMER, M.; ROSSOW, K.; YOON, K.J. 2006. Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the midwestern United States. *J Virol.* 80(10):5092-6.

NEIRA, V.; RABINOWITZ, P.; RENDAHL, A.; PACCHA, B.; G. GIBBS, S.; TORREMORELL, M. 2016. Characterization of Viral Load, Viability and Persistence of Influenza A Virus in Air and on Surfaces of Swine Production Facilities. *PLoS One.* 11(1).

NELSON, M.; CULHANE, M R.; ROVIRA, A.; TORREMORELL, M.; GUERRERO, P.; NORAMBUENA, J. 2015. Novel Human-like Influenza A Viruses Circulate in Swine in Mexico and Chile. *PLoS Curr.* 7

OIE. 2010. Swine Influenza. *OIE Terrestrial Manual 2010.* Chapter 2.8.8

OLSEN, C. 2002. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res.* 85:199–210.

PEREDA, A. 2013. Swine Influenza in South and Central America. **In:** Swine influenza Technical Meeting. Roma, Italia. 16 de abril 2013. Instituto Nacional de Tecnología Veterinaria- Centro de investigación en Ciencias Veterinarias y Agropecuarias- Instituto de Virología “Dr. Scholein Rivenson”- University of Maryland”. [Diapositivas].

ROMAGOSA, A.; GRAMER, M.; JOO, H.S.; TORREMORELL, M. 2012. Sensitivity of oral fluids for detecting influenza A virus in populations of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Influenza Other Respir Viruses.* 6(2):110-8.

SAG. 2015. [consulta en línea] <<http://www.sag.cl/contacto>> [consulta: 20/07/2015].

SCHAEFER, N.; ALLERSON, M.; GRAMER, M.; WAYNE, S.; NEREM, J.L.; BRADFORD, J.R.; NEWBERRY, J.R. 2008. Evaluation of swine influenza virus serum antibody levels following vaccination of sows with FluSure™ and Biomune autogenous vaccines. **In:** AASV 39 Annual Meeting. San Diego, California USA. March 8-11, 2008. 289-292.

SHIN, J.Y.; SONG, M.S.; LEE, E.H.; LEE, Y.M.; KIM, S.Y.; KIM, H.K.; CHOI, J.K.; KIM, C.J.; WEBBY, R.J.; CHOI, Y.K. 2006. Isolation and characterization of novel H3N1 swine influenza viruses from pigs with respiratory diseases in Korea. *J Clin Microbiol.* 44(11):3923-7.

SMITH, G.J.; BAHL, J.; VIJAYKRISHNA, D.; ZHANG, J.; POON, L.L.; CHEN, H.; WEBSTER, R.G.; PEIRIS, J.S.; GUAN, Y. 2009. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(28):11709-12.

SONG, D.S.; LEE, C.S.; JUNG, K.; KANG, B.K.; OH, J.S.; YOON, Y.D.; LEE, J.H.; PARK, B.K. 2007. Isolation and phylogenetic analysis of H1N1 swine influenza virus isolated in Korea. *Virus Res.* 125(1):98-103.

STINE, D.L.; ANDERSON, G.A.; LIEM, A. 2002. Comparative analysis of recent and dated swine influenza subtypes. **In:** AASV 33rd Annual Meeting. Kansas City, Missouri, USA. March 2 to 5, 2002. 113-117.

TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; SHI, M.; ZHANG, J.; BOURGEOIS, M.; YANG, H.; CHEN, X.; RECUENCO, S.; GOMEZ, J.; CHEN, L.M.; JOHNSON, A.; TAO, Y.; DREYFUS, C.; YU, W.; MCBRIDE, R.; CARNEY, P.J.; GILBERT, A.T.; CHANG, J.; GUO, Z.; DAVIS, C.T.; PAULSON, J.C.; STEVENS, J.; RUPPRECHT, C.E.; HOLMES, E.C.; WILSON, I.A.; DONIS, R.O. 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9(10):e1003657.

TORREMORELL, M.; ALLERSON, M.; CORZO, C.; DIAZ, A.; GRAMER, M. 2012. Transmission of Influenza A Virus in Pigs. *Transbound Emerg Dis.* 59(1): 68-84.

TREANOR, J.J. 2010. Influenza Viruses, Including Avian Influenza and Swine Influenza **In:** *Infectious Diseases and Their Etiologic Agents.* Seventh Edition. Elsevier. Volume 2. Capítulo 165. Pag: 2265-2288.

VINCENT, A.L.; WENJUN, M.; LAGER, K.M.; JANKE, B.H.; RICHT, J.A. 2008. Swine Influenza Viruses: A North American Perspective **In:** *Advances in Virus Research.* ELSEVIER. Burlington. Vol. 72. 127-154.

VINCENT, A.L.; SWENSON, S.L.; LAGER, K.M.; GAUGER, P.C.; LOIACONO, C.; ZHANG, Y. 2009. Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. *Vet Microbiol.* 137(1-2):51-9.

VINCENT, A.L.; LAGER, K.M.; FAABERG, K.S.; HARLAND, M.; ZANELLA, E.L.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; KEHRLI, M.E. JR.; JANKE, B.H.; KLIMOV, A. 2010. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. *Influenza Other Respir Viruses.* 4(2):53-60.

VINCENT, A.L.; AWADA, L; BROWN, I.; CHEN, H.; CLAES, F.; DAUPHIN, G.; DONIS, R.; CULHANE, M.; HAMILTON, K.; LEWIS, N.; MUMFORD, E.; NGUYEN, T.; PARCHARIYANON, S.; PASICK, J.; PAVADE, G.; PEREDA, A.; PEIRIS, M.; SAITO, T.; SWENSON, S.; VAN REETH, K.; WEBBY, R.; WONG, F.; CIACCI-ZANELLA, J. 2014. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health*. 61(1):4-17.

WEBSTER, R.; BEAN, W.; GORMAN, O.; CHAMBERS, T. KAWAOKA, Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev*. 56(1). p. 152-179.

YADAV, S.; RAWAL, G. 2015. Swine flu-have we learnt any lesson from the past? *Pan Afr Med J*. 22 (118).

ZHOU, N.N.; SENNE, D.A.; LANDGRAF, J.S.; SWENSON, S.L.; ERICKSON, G.; ROSSOW, K.; LIU, L.; YOON, K.J.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R.G. 1999. Genetic Reassortment of Avian, Swine, and Human Influenza A Viruses in American Pigs. *J Virol*. 73(10):8851-6.

ANEXO 1



CERTIFICADO N° 54

Santiago 25 de agosto del 2015

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto de memoria titulado: "Detección y Aislamiento del virus influenza en cerdos de producción intensiva", del alumno Sr. Raúl Arce R., y que corresponde a su proyecto de memoria para optar al título de Médico Veterinario. Profesor Guía Dr. Víctor Neira.

En el proyecto se estipulan entre otras, las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El Personal recibirá vacunación contra virus influenza. Se utilizará vestimenta y equipos adecuados para realizar el trabajo en el laboratorio.
- 2.- Uso de gabinete de bioseguridad clase 2, desinfección de mesones en forma adecuada.
- 3.- Los desechos biológicos serán eliminados en autoclave.

El proyecto de memoria de título fue revisado por el comité en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medio ambiente.



ESTELLE LAPIERRE ACEVEDO
Coordinadora
Comité de Bioseguridad

ANEXO 2

Procedimiento de muestreo

Hisopo nasal

El equipamiento necesario para la toma de muestras son: guantes, puro o lazo para sostener al animal, hisopos nasales estériles y un marcador.

1. Sujetar al cerdo, apoyarlo contra una pared, y evitar que levante sus extremidades anteriores. Los cerdos más pequeños, pueden tomarse en los brazos mientras se les toma la muestra. Se seleccionan los cerdos que aparentemente presenten signos de enfermedad respiratoria (tos, descarga nasal, decaimiento).



2. Introducir el hisopo en cada fosa nasal con un ángulo de 45° latero-medial hacia el tabique nasal, luego se endereza y se inserta cuidadosamente lo más rostral posible.

3. Gire el hisopo de las agujas del reloj y en sentido contrario a la entrada y salida (puede presentar sangrado temporal).

4. Rotular las muestras, y almacenar a temperatura de refrigeración (4°C) en un cooler hasta su posterior procesamiento.

Fluidos orales

Para tomar las muestras de fluidos orales se necesitarán: guantes estériles, cuerdas de algodón, bolsas de plástico herméticas, tubos de 50 ml, tijeras y marcador permanente.

1. Amarrar las cuerdas con un nudo en una zona limpia del corral lejos del alimento y de los bebederos. Para corrales de 25 o más cerdos pueden utilizarse 2 cuerdas en el mismo corral y posteriormente mezclar su contenido.



2. Las cuerdas deben permanecer entre 20 a 30 minutos para asegurarse de que la mayoría de los cerdos del corral muerdan la cuerda y se absorban sus fluidos orales.



3. Retirar las cuerdas utilizando los guantes, depositar la cuerda en las bolsas de plástico herméticas y exprimirla de manera que el líquido se acumule en una esquina de la bolsa.

4. Por último, pasar el contenido de la bolsa a los tubos Falcon, se recomienda un mínimo de 2,5 ml de muestra por corral. Luego rotular y almacenar a 4°C.



ANEXO 3



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 4 de septiembre de 2015

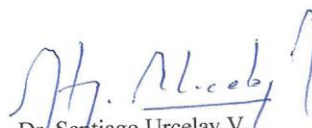
CERTIFICADO N° 20-2015

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Detección, Aislamiento y Caracterización del Virus Influenza A en porcinos de sistemas de producción intensiva en la Zona Central de Chile”**. Dicho proyecto corresponde será financiado por ZOETIS FAVET-1, donde el Investigador Responsable será el **Dr. Víctor Neira R.**, y sus detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable trabajará muestras de hisopado nasal de cerdos provenientes de granjas comerciales, donde todos los animales continuarán sus ciclos productivos normales.


Dra. Tamara Tadich
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

ANEXO 4

Protocolo Extracción RNA utilizando TRIzol® Reagent

1. Se le adiciona 300µl de TRIzol® Reagent a 150µl de muestra dejando incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir una completa disociación del complejo nucleoproteína.
2. Añadir 60µl de cloroformo, y realizar vortex.
3. Incubar en frío durante 15 minutos, luego centrifugar a 12.000g durante 15 minutos a 4°C.
4. Se observará que la mezcla se separará en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase, y una fase acuosa superior incolora en la cual permanece el RNA. Esta última se transferirá a un tubo nuevo.
5. Para precipitar el RNA se agregará a la fase acuosa 150µl de Isopropanol al 100%, dejando incubar en hielo por 10 minutos e inmediatamente centrifugar a 12.000g durante 10 minutos a 4°C.
6. Lavar RNA eliminando el sobrenadante del tubo, dejar solo precipitado de RNA que será lavado con 300µl de etanol al 75%. (up down).
7. Realizar vortex a la muestra y enseguida centrifugar a 7.500g durante 5 minutos a 4°C.
8. Descartar el lavado y dejar secar por aireación para continuar con la resuspensión del RNA.
9. El pellet de RNA resultante deberá ser diluido en 50µl de agua de grado molecular. Almacenar a -80°C hasta realización de RT-PCR en tiempo real.

ANEXO 5

Preparación de la Mezcla Maestra para RT-PCR en tiempo real

N= número de muestras

Reactivos	Volumen de reactivo por reacción
<i>Agua libre de Nucleasas</i>	N x 5,5 µl
<i>Primer Promotor</i>	N x 0,5 µl
<i>Primer Reverso</i>	N x 0,5 µl
<i>Sonda</i>	N x 0,5 µl
<i>SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix</i>	N x 0,5 µl
<i>2X PCR Master Mix</i>	N x 12,5 µl
<i>Total Volumen</i>	N x 20 µl

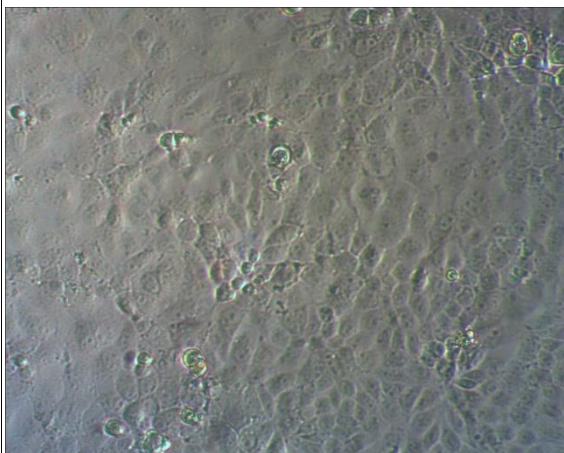
Programación de Tiempo y Temperatura del Termociclador

Transcripción Reversa (RT)	50°C por 30 minutos
Activación de la Taq Polimerasa	95°C por 2 minutos
Amplificación PCR (45 ciclos)	
Denaturación	95°C por 15 segundos
Annealing y extensión	55°C por 30 segundos*

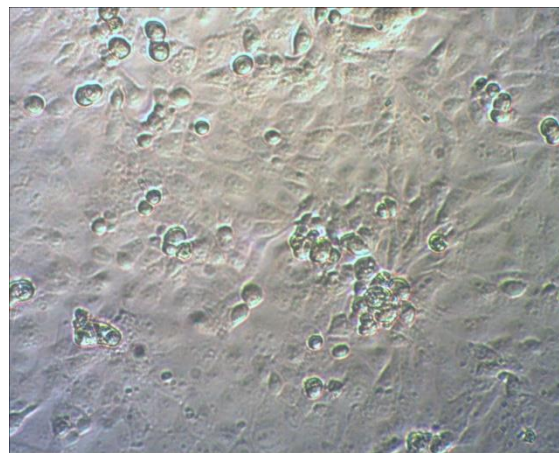
* Los datos de fluorescencia son recopilados durante la etapa de incubación a 55 °C.

ANEXO 6

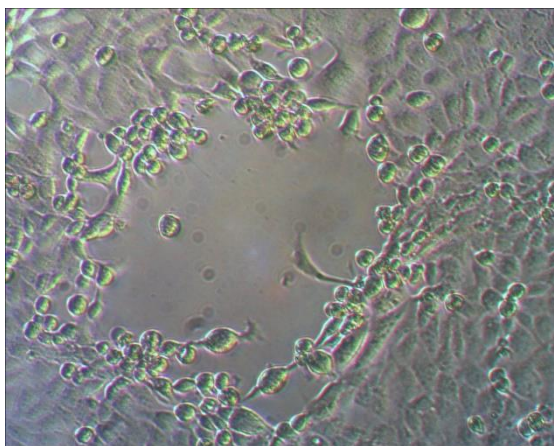
Aislamiento viral en células MDCK y efecto citopático (400x). Fotos tomadas en el Laboratorio Virología de Favet.



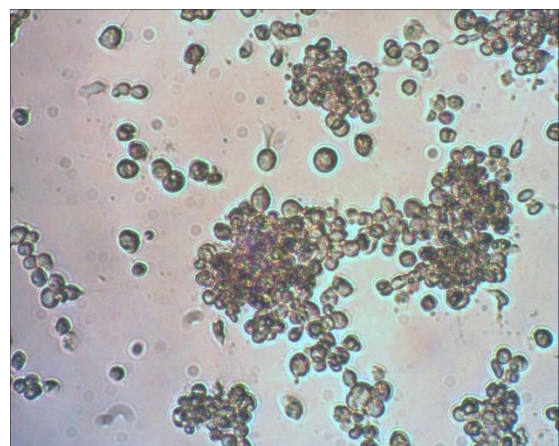
Confluencia de 80% monocapa de células MDCK.



Efecto citopático temprano a las 24 hrs post inoculación del virus Inf A.



Destrucción de monocapa de células MDCK por acción del virus Inf A. se observa desprendimiento de células y células con aspecto fusiforme.



Efecto citopático transcurridas 72 hrs. El virus destruye completamente la monocapa de células MDCK y se forman cúmulos de células que flotan en el medio de cultivo.