

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

*Beltran, F.R.¹, Trujillo, O.M.E.¹, , Martinez R.R.², Sánchez, B.J.I.¹

¹Departamento de Producción Animal Cerdos. FMVZ, UNAM, México D.F.

² Centro de Enseñanza e Investigación en Producción Porcina FMVZ, UNAM, Edo. Méx.

INTRODUCCIÓN

El virus de influenza es un virus RNA que pertenece a la familia *Orthomixoviridae* con tres tipos antigénicamente distintos A, B y C. Existen varios subtipos basados en la antigenicidad de las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), actualmente se han identificado 16 subtipos reconocidos de HA y 9 subtipos NA, los subtipos virales que afectan a los cerdos son el H1N1, H3N2 y H1N2.

En la actualidad el uso de técnicas moleculares como la transcriptasa reversa reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) han proporcionado alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de enfermedades infecciosas lo cual permite su utilización como un complemento de otras pruebas de diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una granja porcina de ciclo completo, con 150 hembras en producción, localizada en el municipio de Tenango, Morelos. El trabajo se dividió en dos fases: En la fase uno se muestrearon 30 hembras de 10 cada una de las siguientes áreas: servicios, gestación y maternidad, de cada animal se obtuvieron muestras de sangre para identificar la presencia de anticuerpos mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) y mediante la RT-PCR se identificó la presencia de RNA específico de los subtipos H1N1 y H3N2 en sueros porcinos e hisopos nasales.

La fase dos consistió en un estudio longitudinal a 5 diferentes camadas eligiendo a 4 lechones por camada para identificar el nivel de anticuerpos y la presencia antigénica en suero e hisopo nasal, los muestreos se obtuvieron a partir de la semana 4 hasta la semana 24 de edad, con un intervalo de 4 semanas.

La identificación de anticuerpos se realizó con la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación, considerando un título positivo a partir de la dilución 1:80. La presencia del virus se identificó con la estandarización de la técnica de Transcriptasa Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) multiplex, con las siguientes condiciones de reacción: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C 5 min; Treinta ciclos de desnaturalización 95°C por 30s, alineación 55.5°C por 1 min. y extensión 72°C por 30s; por último un ciclo de extensión final a 72° por 5 min. Los iniciadores utilizados son los descritos por Choi y cols. (2002). La extracción del RNA viral se realizó con la técnica descrita por Gibco Life Technologies 1996. Los antígenos utilizados en ambas técnicas, se encuentran reportados en el GenBank con el siguiente número de acceso K00992 para H1N1 y AF153234 para H3N2.

RESULTADOS

Subtipo H1N1: con la técnica de IH, se encontró el 93% de seropositividad en los animales de pié de cría; el 100% de los animales de la línea de producción fueron

positivos a las 4 semanas de edad. En la semana ocho el 70% fueron seropositivos y para la semana 12 el 89% de los cerdos; finalmente se encontró seropositividad en el 100% de los cerdos a las 16 y a las 24 semanas de edad. Con la técnica de RT-PCR multiplex hacia el subtipo H1N1, no se encontró presencia antigénica en suero e hisopo nasal proveniente del pié de cría, mientras que en la línea de producción el 10% de los cerdos fueron positivos a las cuatro semanas de edad, posteriormente se encontró al 15% de los animales positivos en la octava semana de edad; para la semana 12 en ningún cerdo se encontró el virus. En la semanas 16 y 20 se encontró al 17% y 11% de los animales positivos, respectivamente hacia el subtipo H1N1.

Subtipo H3N2: con la técnica de IH se encontró lo siguiente el 96% de las hembras fueron seropositivas; los cerdos de la línea de producción, en el estudio longitudinal, presentaron un 75%, 40% y 84% de seropositividad a las 4, 8 y 12 semanas de edad, respectivamente. A las 16, 20 y 24 semanas de edad el 100% de los animales fueron seropositivos. Los resultados de la técnica de RT-PCR multiplex hacia el subtipo (H3N2), mostraron que 17% de hembras fueron positivas identificando el antígeno en suero e hisopo nasal. En la línea de producción se detectó al 15% de los cerdos positivos en la semana cuatro y ocho de edad. Con la técnica de RT-PCR ningún animal fue positivo a este subtipo en los muestreos posteriores.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten identificar que el subtipo H3N2 se encuentra circulando en las hembras de pié de cría y el subtipo H1N1 prevalece circulando en los animales de la línea de producción. Es importante mencionar que este patrón de circulación viral ya ha sido reportado anteriormente, sin embargo los resultados se habían basado exclusivamente en técnicas serológicas. También se puede observar que el subtipo H3N2 presente en las hembras, es transmitido a sus lechones por contacto directo, pero la cantidad de anticuerpos transmitidos vía calostro permiten el control de la reinfección viral a las pocas semanas de vida del lechón. También se detecta a través de los resultados serológicos la disminución de anticuerpos maternos hacia las 8 semanas como lo reporta Morilla (2004) sin embargo la reinfección viral en estas semanas, donde el sistema inmune madura, permite que haya un incremento de anticuerpos a partir de la semana 12 hasta encontrar para ambos subtipos el 100% de animales seropositivos a las 16 y 24 semanas de edad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Mercado *et al.* (2004) Memorias del XXXIX AMVEC.
2. Morilla (2005) Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos.