



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**REPÚBLICA ARGENTINA**

**DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias Veterinarias**

**TÍTULO:**

**“Evaluación de diferentes métodos de monitoreo para el diagnóstico de virus de Influenza A en granjas porcinas”**

Méd. Vet. Mariana BISCIA

DIRECTOR: Dr. Méd. Vet. Javier Eduardo SARRADELL

CODIRECTOR: PhD. Méd. Vet. Andrés Maximiliano PÉREZ

2022

*Cuando además de leer los apellidos, comencé a prestar atención a los nombres de quienes habían realizado las publicaciones que usé como referencia para este trabajo, me di cuenta de que había muchas más mujeres liderando, dirigiendo e integrándolas de lo que pensaba.*

*Mariana, febrero de 2022*

## **DEDICATORIA**

A mi hija Sofía, por guiarme a descubrir que el verdadero Doctorado no es académico - científico, sino Esencial.

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, los Dres. Javier E. Sarradell y Andrés M. Perez, por confiar en mí, alentarme para desarrollar esta Tesis y abrirme puertas que permitieron mejorar mi formación académica y profesional, así como mi crecimiento personal.

A las personas que forman parte de la Cátedra de Patología General y Especial Veterinaria, FCV-UNR. Dentro de ella, al MSc. Méd. Vet. Guillermo S. Ibargoyen y todo el cuerpo docente y técnico por su apoyo; a MSc. Méd. Vet. Melisa Fossaroli también por su colaboración en muestreos; a Lic. Lilian Anthony y Méd. Vet. Paula Tugores por su asistencia técnica; a las Sras. Viviana Palacios y Mirta Martín por su colaboración en la preparación y acondicionamiento de gran parte del material usado en el desarrollo de esta tesis; a Melisa Spadaro por revisar y corregir las traducciones al inglés.

A quienes participaron como estudiantes en becas de iniciación en Ciencia y Tecnología en nuestros proyectos: Méd Vet Marcia Samardich, Aldana Girotti, Lucio Meroi y Antonela Galiñanes por su interés, compromiso, acompañamiento y ayuda. Han sido para mí, una gran motivación.

A las personas que forman parte de los Department of Veterinary Population Medicine y Department of Preventive Medicine y del Veterinary Diagnostic Laboratory del College of Veterinary Medicine- University of Minnesota, especialmente al Dr. Thomas W. Molitor por aceptar mi visita; a la Dra. Montserrat Torremorell por recibirme, pero además, por su enorme generosidad, por permitirme participar de diversas actividades y por poner a mi disposición todo lo necesario para mi capacitación durante el tiempo que estuve allí; a My Yang por capacitarme y enseñarme las técnicas que luego apliqué en Argentina para llevar adelante el procesamiento de la mayoría de las muestras de esta Tesis; a los y las becarias de Swine Group con quienes compartí esos meses y permitieron que me sintiera sumamente cómoda y contenida.

Al Dr. Víctor Neira Ramírez, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, por su gran disposición para guiarme y ayudarme a resolver dificultades técnicas, por sus aportes y por su motivación.

A la Dra. Méd. Vet. María Alejandra Quiroga y el Dr. Méd. Vet. Carlos Perfumo de la Cátedra de Patología Especial de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata por su colaboración para el desarrollo de la técnica de IHQ y la sesión de cortes control positivo.

Al Dr. Ariel Pereda y la Dra. Marina Dibárbora del Instituto de Virología del CICVyA del INTA Castelar y al Dr. Javier Cappuccio del Laboratorio de diagnóstico en enfermedades

virales y bacterianas en cerdos del INTA Marcos Juárez por su gentil capacitación y colaboración en el procesamiento de parte de las muestras de este estudio.

A los propietarios, Médicos/as veterinarios/as y personal de las granjas por permitirnos ingresar a ellas y asistirnos en la recolección de muestras. Gracias por la confianza.

Al Dr. Ricardo Di Masso por su ayuda en temas estadísticos, pero principalmente por su contención y motivación para darle el cierre a esta tesis.

Al Servicio de Asesoramiento Sanitario en Porcinos (FCV-UNR) por financiar la mayor parte de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario por brindarme el espacio donde realizar esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de una Beca Interna Doctoral para Temas Estratégicos.

A mis amigas y amigos por su cariño, contención y compañía.

A mi familia, por su amor, apoyo y acompañamiento. Especialmente gracias a mi mamá y papá. Sin su aliento y su ayuda, hubiera sido muy difícil finalizar este estudio. ¡Gracias!

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS  
PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS Y A LA DIFUSIÓN  
REALIZADA EN EL MARCO DE REUNIONES CIENTÍFICAS**

Biscia, M.; Girotti, A.; Samardich, M.; Anthony, L.; Peirone, C.; Torremorell, M.; Perez, A.M.; Sarradell, J. "DETECCIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA A EN GRANJAS PORCINAS INTENSIVAS MEDIANTE RECOLECCIÓN SIMULTÁNEA DE MUESTRAS DE FLUIDO ORAL Y SECRECIÓN NASAL". XIV Congreso de Producción Porcina, XX Jornadas de Actualización Porcina, IX Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. Córdoba. Agosto de 2018.

Biscia, M.; Girotti, A.; Anthony, L.; Peirone, C.; Ibargoyen, G.; Sarradell, J. "DINÁMICA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE INFLUENZA A EN UNA GRANJA PORCINA INTENSIVA NATURALMENTE INFECTADA MEDIANTE DETECCIÓN VIRAL Y ESTUDIOS SEROLÓGICOS". XIV Congreso de Producción Porcina, XX Jornadas de Actualización Porcina, IX Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. Córdoba. Agosto de 2018.

Biscia, M.; Girotti, A.; Anthony, L.; Tugores, P.; Peirone, C.; Ibargoyen, G.; Sarradell, J. "DINÁMICA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE INFLUENZA A EN UNA GRANJA MEDIANTE DETECCIÓN VIRAL Y ESTUDIOS SEROLÓGICOS". "XII Jornada de Ciencia y Tecnología", Universidad Nacional de Rosario. 17 y 18 de octubre de 2018.

Biscia, Mariana; Girotti, Aldana; Anthony, Lilian María; Peirone, Carina; Ibargoyen, Guillermo Siro; Sarradell, Javier Eduardo. "DINÁMICA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE INFLUENZA A EN UNA GRANJA MEDIANTE DETECCIÓN VIRAL Y ESTUDIOS SEROLÓGICOS". XIX Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2018. Facultad de Ciencias Veterinarias. VI Jornada Latinoamericana. IV Jornadas de Ciencia y Tecnología 2018. Facultad de Ciencias Agrarias. III Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias 2018, Universidad Nacional de Rosario. Zavalla y Casilda, 16 y 17 de agosto de 2018

Biscia, M.; Girotti, A.; Anthony, L.; Torremorell, M.; Perez, A.M.; Sarradell, J. "DYNAMICS OF INFECTION BY INFLUENZA A VIRUS USING NASAL SWABS AND ORAL FLUIDS IN SWINE FARMS IN ARGENTINA". Presentado en Allen D. Lemman Swine Conference, UMN. Saint Paul, Minnesota. Septiembre de 2018

Biscia, Mariana; Girotti, Aldana; Meroi, Lucio A.; Anthony, Lilian M.; Tugores, Paula; Sarradell, Javier E. "CONCORDANCIA ENTRE MUESTRAS DE FLUIDO ORAL Y SECRECIÓN NASAL PARA DETECCIÓN, MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR, DE VIRUS DE INFLUENZA A EN CERDOS". Presentado y premiado como "Mejor Trabajo Científico en el Área Agropecuaria" en el XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Noviembre de 2018.

Sarradell, Javier Eduardo; Biscia, Mariana; Anthony, Lilian María; Samardich, Marcia; Tugores, Paula Soledad; Peirone, Carina. "VIRUS DE INFLUENZA A: DIAGNÓSTICO POR RT-PCR, ELISA E INMUNOHISTOQUÍMICA EN UNA GRANJA PORCINA NATURALMENTE INFECTADA". XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2017. Facultad de Ciencias Veterinarias. V Jornada Latinoamericana III Jornadas de Ciencia y Tecnología 2017. Facultad de Ciencias Agrarias. II Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias 2017, Universidad Nacional de Rosario. Casilda y Zavalla, 12 y 13 de septiembre de 2017.

Presentación oral en el III Seminario Anual de Divulgación de Proyectos y Programas de Investigación Acreditados - Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR "EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE MONITOREO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS DE INFLUENZA A EN GRANJAS PORCINAS", acreditado mediante Res. CS N° 1399/16. 10 de noviembre de 2016.

Biscia, M.; Torremorell, M.; Perez, A.; Yang, M.; Ruffo, M.; Matteucci, J.; Sarradell, J. "IMPLEMENTACIÓN DEL MUESTREO DE AIRE EN GRANJAS PORCINAS INTENSIVAS PARA DETECCIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA A. RESULTADOS PRELIMINARES" XIIIº Congreso Nacional de Producción Porcina (XIIIº CNPP); las XIX Jornadas de Actualización Porcina (XIXº JAP); el VIIIº Congreso de Producción Porcina de MERCOSUR (VIIIº MERCOSUR) y el encuentro Más productores más producción. (E+P+P). Agosto 2016.

Biscia, M.; Torremorell, M.; Perez, A.; Yang, M.; Ruffo, M.; Matteucci, J.; Sarradell, J. "IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA A EN MUESTRAS DE FLUIDO ORAL. RESULTADOS PRELIMINARES" XIIIº Congreso Nacional de Producción Porcina (XIIIº CNPP); las XIX Jornadas de Actualización Porcina (XIXº JAP); el VIIIº Congreso de Producción Porcina de MERCOSUR (VIIIº MERCOSUR) y el encuentro Más productores más producción. (E+P+P). Agosto 2016.

Biscia M.; Torremorell, M.; Perez, A.; Yang, M.; Sarradell J. "IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA A EN MUESTRAS DE FLUIDO ORAL- RESULTADOS PRELIMINARES". Presentación oral en las VI Jornadas de Jóvenes Investigadores, FCV-UBA. 8 al 10 de junio de 2016.

Biscia, M.; Torremorell, M.; Perez, A.; Yang, M.; Sarradell, J. "IMPLEMENTACIÓN DEL MUESTREO DE AIRE EN GRANJAS PORCINAS INTENSIVAS PARA DETECCIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA A. RESULTADOS PRELIMINARES". Presentación oral en las VI Jornadas de Jóvenes Investigadores, FCV-UBA. 8 al 10 de junio de 2016.

Biscia, M.; Pérez, A.; Sarradell, J.E. INFLUENZA EN CERDOS: CARACTERÍSTICAS Y SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN ARGENTINA. Drovot News, vol. 2, pp. 25-29, 2015 (ISSN 2422-7633).

Sarradell, J.; Biscia, M.; Di Masso, R.; Anthony, L.; Garófolo, F.; Perez, A. "COMPARISON OF THREE COMMERCIALY AVAILABLE ELISA KITS FOR DETECTION OF ANTI-INFLUENZA A ANTIBODIES IN ARGENTINE SWINE FARMS". Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. Cancún, Quintana Roo, México. 2014

Biscia, M.; Marcaccini, A.; Pereda, A.; Dibárbora, M.; Sarradell, J. "COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO: CO-INFECCIÓN VIRUS DE AUJESZKY-INFLUENZA A EN UNA GRANJA PORCINA". VII Congreso de Producción Porcina del Mercosur, XII Congreso Nacional de Producción Porcina, XVIII Jornadas de Actualización Porcina. Mar del Plata. 2014

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	17
<b>SUMMARY</b> .....	18
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	21
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	23
A. OBJETIVO GENERAL.....	23
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
A. VIRUS DE INFLUENZA A.....	24
a. Características generales.....	24
b. Clasificación de los virus de Influenza A.....	26
c. Epidemiología.....	26
c.1. Hospedadores .....	26
c.2. Transmisión.....	29
c.3. Mecanismos de evolución de los VIA.....	29
B. INFLUENZA PORCINA (INFLUENZA EN CERDOS) .....	30
a. Presentación clínica de la influenza en las granjas porcinas.....	31
b. Distribución anual de las infecciones por VIA en las granjas porcinas.....	33
c. Virus de influenza A en las granjas porcinas argentinas.....	34
d. Impacto económico y en Salud Pública.....	35
C. ENFERMEDAD EN LOS CERDOS.....	35
a. Signos clínicos.....	35
b. Lesiones macroscópicas.....	38
c. Lesiones microscópicas.....	39
D. MÉTODOS DE MONITOREO Y DIAGNÓSTICO DE VIA EN CERDOS.....	42
a. Pruebas de diagnóstico que detectan antígenos virales.....	43
a.1. Inmunofluorescencia (IFA) .....	43
a.2. Inmunohistoquímica (IHQ) .....	44

b.	Pruebas de diagnóstico que detectan ácido nucleico viral: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT- PCR) .....	49
b.1.	Hisopos nasales.....	54
b.2.	Hisopos orofaríngeos.....	56
b.3.	Fluido oral con cuerda.....	56
b.4.	Gasas mamarias.....	63
b.5.	Bioaerosoles .....	64
c.	Prueba para la detección de virus activo: aislamiento viral.....	66
d.	Pruebas serológicas para la demostración de anticuerpos específicos contra el virus.....	67
d.1.	Inhibición de la hemoaglutinación (IH) .....	68
d.2.	ELISA.....	69
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>
A.	PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN DE VIA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS – UNR .....	74
a.	Evaluación de dos productos comerciales para la extracción de ARN a partir de una muestra con alta concentración viral y de muestras de fluido oral.....	74
b.	Evaluación del efecto de dilución del templado de ARN sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral.....	75
c.	Evaluación del efecto de dilución del templado de ARN y la concentración de la mezcla de enzimas en la RT-PCR sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral.....	75
B.	EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE MONITOREO PARA DETECCIÓN DE VIA EN GRANJAS PORCINAS.....	76
a.	Características generales de las granjas incluidas en el estudio.....	76
b.	Muestreos.....	78
b.1.	Muestreos para el monitoreo de VIA en múltiples etapas de producción.....	78
I.	Muestreos serológicos y moleculares en edades establecidas previamente.....	78
II.	Recolección de muestras de secreción nasal y fluido oral para estudios moleculares en edades seleccionadas en base a la presencia de signos clínicos...	78
III.	Recolección de muestras de fluido oral para estudios moleculares en edades seleccionadas en base a la presencia de signos clínicos.....	79
IV.	Obtención de muestreos para estudios anatómo-histopatológicos e inmunohistoquímicos.....	79

b.2. Muestréos realizados para el monitoreo de VIA en maternidad.....	79
b.3. Muestréos realizados para el monitoreo de VIA en bioaerosoles.....	80
c. Evaluación clínica de la presencia de tos-estornudos.....	80
d. Recolección de muestras.....	80
d.1. Secreción nasal.....	80
d.2. Secreción orofaríngea.....	81
d.3. Fluido oral obtenido con cuerdas.....	81
d.4. Fluido oral y secreción nasal de lechones en maternidad obtenidos mediante empleo de gasas mamarias.....	83
d.5. Aire.....	83
d.6. Sangre.....	85
d.7. Necropsia y obtención de muestras para HP e IHQ.....	86
e. Acondicionamiento de muestras.....	86
e.1. Secreción nasal y secreción orofaríngea.....	86
e.2. Fluido oral obtenido con cuerdas.....	86
e.3. Fluido oral y secreción nasal de lechones en maternidad obtenidos con gasas mamarias.....	86
e.4. Aire.....	86
e.5. Sangre.....	87
e.6. Muestras de pulmón para HP e IHQ.....	87
f. Procesamiento de muestras.....	87
f.1. Técnicas de biología molecular.....	87
I. Extracción de ARN.....	87
II. RT-PCR para detección del gen matriz de VIA.....	88
f.2. Serología.....	89
f.3. Histopatología.....	89
f.4. Inmunohistoquímica para detección de NP de VIA.....	89
g. Análisis estadístico.....	90
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>92</b>
A. PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN DE VIA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS – UNR.....	92

a.	Evaluación de dos productos comerciales para la extracción de ARN a partir de una muestra con alta concentración viral y de muestras de fluido oral.....	92
b.	Evaluación del efecto de dilución del templado de ARN sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral.....	92
c.	Evaluación del efecto de dilución del templado de ARN y la concentración de la mezcla de enzimas en la RT-PCR sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral.....	93
<b>B.</b>	<b>EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE MONITOREO PARA DETECCIÓN DE VIA EN GRANJAS PORCINAS.....</b>	<b>94</b>
a.	Muestreos para el monitoreo de VIA en múltiples etapas de producción.....	94
a.1.	Manifestaciones clínicas.....	98
a.2.	RT-PCR/q RT-PCR de muestras de secreción nasal.....	98
a.3.	RT-PCR/q RT-PCR de muestras de fluido oral obtenido con cuerdas.....	101
a.4.	Serología (ELISA) .....	107
a.5.	Anatomía patológica, histopatología e inmunohistoquímica.....	109
b.	Muestreos realizados para el monitoreo de VIA en maternidad.....	114
c.	Muestreo realizado para el monitoreo de VIA en bioaerosoles.....	115
d.	Estación anual y año de detección de VIA en las granjas estudiadas.....	115
<b>7.</b>	<b>DISCUSION.....</b>	<b>117</b>
A.	PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN DE VIA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS – UNR.....	117
B.	EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE MONITOREO PARA DETECCIÓN DE VIA EN GRANJAS PORCINAS.....	119
a.	Muestreos para el monitoreo de VIA en múltiples etapas de producción.....	119
b.	Muestreos realizados para el monitoreo de VIA en maternidad.....	126
c.	Muestreos realizados para el monitoreo de VIA en bioaerosoles.....	127
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>132</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>148</b>
<b>11.</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS, IMÁGENES Y TABLAS</b>	
	Imagen 1: Esquema general de la dinámica individual de infección por VIA en cerdos.....	43
	Imagen 2: Elementos empleados para la recolección de muestras de fluido oral con cuerdas de algodón.....	82

Imagen 3: Recolección de muestras de fluido oral de cerdos con cuerda de algodón.....	82
Imagen 4: Colector ciclónico líquido.....	84
Imagen 5: Esquema del funcionamiento del colector ciclónico líquido.....	84
Imagen 6: Obtención de muestras de bioaerosol mediante colector ciclónico líquido (Cyclonic Midwest Micro Tek, Brookings, SD, EE. UU.) en cerdos de engorde.....	85
Imagen 7: Porcino, pulmón, 40 ddv, hallazgos anatomopatológicos en pulmón positivo a VIA mediante IHQ.....	112
Imagen 8: Porcino, pulmón, 45-60 ddv. Granja 2 - Muestreo 2. Animal 1.....	113
Imagen 9: Porcino, pulmón, Granja 9.....	113
Imagen 10: Porcino, pulmón, 117 ddv, Granja 4- Animal 3.....	114
Tabla 1: Resumen de las características generales de las granjas incluidas en el estudio.....	77
Tabla 2: Concordancia en los resultados de RT-PCR para detección de VIA realizada a partir de extractos de ARN de muestras de fluido oral obtenidos con dos productos de extracción de ARN comerciales.....	92
Tabla 3: Concordancia en los resultados de RT-PCR realizada a partir de los templados de ARN obtenidos de muestras de fluido oral, puros y diluidos al 50 % con agua libre de ARNasas.....	93
Tabla 4: Resultados RT-PCR de templados de ARN obtenidos de muestras de fluido oral, puros y diluidos, con la concentración de enzimas indicada por el fabricante y al doble de dicha concentración.....	94
Tabla 5: Eventos de recolección de muestras y resultados respecto a manifestaciones clínicas, identificación de VIA y/o detección de anticuerpos anti-VIA, de acuerdo con la granja, muestreo y edad de los cerdos estudiados.....	95
Tabla 6: Distribución de frecuencia de los eventos de muestreo con presencia de uno o más animales con signos clínicos, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los grupos de cerdos analizados en las 11 granjas estudiadas.....	98
Tabla 7: Frecuencia de detección de material genético de virus de Influenza A mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal de acuerdo con la edad o categoría estudiada, obtenidos en conjunto en -M1, G2-M1, G3, G4-M2, G5, G6 y G7.....	98
Tabla 8: Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los cerdos estudiados en muestreos a edades fijas (G1-M1, G2-M1 y G3).....	99
Tabla 9: Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los cerdos estudiados en base a la presencia de signos clínicos (G4-M2, G5, G6 y G7).....	100
Tabla 10: Tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de secreción nasal en cada evento de muestreo realizados en G1-M1, G2-M1, G3, G4-M2, G5, G6 y G7.....	100
Tabla 11: Tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de secreción nasal en cada evento	101

de muestreo, de acuerdo con cada granja estudiada.....	
Tabla 12: Frecuencia de detección de material genético de virus de Influenza A mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales obtenidas con cuerda, de acuerdo con la edad o categoría estudiada.....	101
Tabla 13: Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales, de acuerdo con la edad de los cerdos estudiados en muestreos a edades fijas....	102
Tabla 14: Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales, de acuerdo con la edad de los cerdos estudiados seleccionados en base a la presencia de signos clínicos.....	102
Tabla 15: Tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales en cada evento de muestreo, de acuerdo con la edad de los animales.....	103
Tabla 16: Tasa de acuerdo entre los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales y muestras individuales de secreción nasal en cada evento de muestreo, de acuerdo con la edad de los animales.....	104
Tabla 17: Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales, de acuerdo con la granja estudiada.....	106
Tabla 18: Tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales en cada evento de muestreo, de acuerdo con cada granja estudiada.....	106
Tabla 19: Tasa de acuerdo entre los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales y muestras individuales de secreción nasal en cada evento de muestreo, de acuerdo con la granja estudiada.....	107
Tabla 20: Seroprevalencia de anticuerpos anti -VIA mediante ELISA, signos clínicos y detección de VIA en eventos de muestreo.....	108
Tabla 21: Frecuencia de hallazgos histopatológicos según el resultado de IHQ en muestras de pulmón de cerdos con infección natural por VIA.....	109
Tabla 22: Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos en muestras de pulmón de cerdos con infección natural por VIA.....	110
Tabla 23: Detección de VIA mediante rRT-PCR de muestras agrupadas de secreción orofaríngea de lechones de maternidad.....	115
Tabla 24: Distribución de la estación anual y año de detección de VIA, de acuerdo con la granja estudiada y muestreo realizado en cada una.....	116
Gráfico 1: Distribución de frecuencia de eventos de muestreo con al menos un animal con manifestaciones clínicas respiratorias y detección de VIA en muestras de secreción nasal.....	99
Gráfico 2: Distribución de frecuencia de eventos de muestreo con al menos un animal con manifestaciones clínicas respiratorias y detección de VIA en una o dos muestras de fluido oral de corrales.....	103
Gráfico 3: Distribución de frecuencia de eventos de muestreo detección de VIA en al menos una muestra de secreción nasal y en una o dos muestras de fluido oral de corrales.....	104
Gráfico 4: Distribución de frecuencia de la estación de año de detección de VIA en las granjas estudiadas.....	116

## ABREVIATURAS

‰: porcentaje

<: menor

>: mayor

≥: mayor o igual

°C: grados Celsius

µg: microgramos

µm: micrómetros

µl: microlitro

4x: aumento de 40 veces

10x: aumento de 100 veces

40x: aumento de 400 veces

α: letra griega Alfa

β: letra griega Beta

δ: letra griega Delta

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ASB: albúmina sérica bovina

AV: aislamiento viral

Cat.: catálogo

CICVyA: Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas

cm: centímetros

CRP: Complejo Respiratorio Porcino

Ct: del inglés cycle threshold (umbral de detección)

CVM/UMN: College of Veterinary Medicine, University of Minnesota

CVP-2: Circovirus porcino tipo 2

CVRP: coronavirus respiratorio porcino

DAB: diamiobencidina

ddv: días de vida

DMEM: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco, de las siglas en inglés

Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO: densidad óptica

dpi: día post infección

DVPM: Department of Veterinary Population Medicine

Ed.: Edición

EE. UU.: Estados Unidos de América

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas  
Esp: especificidad  
etc.: etcétera  
F1: híbrido de primera generación  
FCV-UNR: Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Rosario  
Fig.: Figura  
FITC: isotiocianato de fluoresceína  
FO: fluido oral  
FTA: del inglés Flinders Technology Associates  
g: fuerza de gravedad  
gdp: ganancia diaria de peso  
H.  $\geq 1$  gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o multíparas  
H. rep: hembras de reposición;  
H1: hemaglutinina de influenza subtipo 1  
H1N1 pdm 2009: H1N1 pandémico 2009  
H2: hemaglutinina de influenza subtipo 2  
H2O2: peróxido de hidrógeno  
H3: hemaglutinina de influenza subtipo 3  
H7: hemaglutinina de influenza subtipo 7  
H16: hemaglutinina de influenza subtipo 16  
HA: hemaglutinina  
HP: histopatología  
h: horas  
IC: intervalo de confianza  
IFA: inmunofluorescencia  
IgG: Inmunoglobulina G  
IH: Inhibición de la hemoaglutinación  
IHQ: inmunohistoquímica  
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
K: Coeficiente Kappa  
LEyTH, FBCB/UNL Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes,  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral  
L/min: litros por minuto  
M/N: muestra/control negativo  
M1: proteína matriz 1  
M2: proteína matriz 2  
MDCK: del inglés Madin Darby Canine Kidney (células de riñón canino Madin-Darby)

min: minutos  
ml: mililitro  
mm: milímetro  
m: metro  
n: tamaño de la muestra  
NA: neuraminidasa  
N1: neuraminidasa de influenza subtipo 1  
N2: neuraminidasa de influenza subtipo 2  
N7: neuraminidasa de influenza subtipo 7  
N8: neuraminidasa de influenza subtipo 8  
N9: neuraminidasa de influenza subtipo 9  
nm: nanómetro  
NNP: neumonía necrótica y proliferativa  
NP: nucleoproteína  
Nro.: número  
NS1: proteína no estructural 1  
NS2: proteína no estructural 2  
OIE: Office International des Epizooties  
PA: proteína ácida de la polimerasa  
PB1: proteína básica 1 de la polimerasa  
PB2: proteína básica 2 de la polimerasa  
PBS: Buffer Fosfato Salino  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
pH: potencial de hidrógeno  
pi: post infección  
qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real  
RNP: complejo de ribonucleoproteína  
ROC: del inglés Receiver Operating Characteristic (Característica Operativa del Receptor)  
RT: retrotranscriptasa o transcriptasa reversa  
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa  
SBM-FCV/UNR: Servicio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario  
SC: signos clínicos  
S/D: sin dato  
Se: sensibilidad  
seg: segundo  
SN: secreción nasal

SNV: seroneutralización viral

SRRP: Síndrome respiratorio y reproductivo porcino

Sue: suero

Taq: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*

TCID<sub>50</sub>

TLAB: tejido linfoide asociado a los bronquios

UI: unidades internacionales

VIA: virus de Influenza A

VIA-P: virus de Influenza A porcinos

VPPC: virus de la Peste Porcina Clásica

VPR: virus de la Pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky

VSRRP: virus del Síndrome respiratorio reproductivo porcino

y col.: y colaboradores

## RESUMEN

En los cerdos, los virus de influenza A (VIA) provocan enfermedad respiratoria y tienen implicancias en Salud Pública. En nuestro país, la infección por VIA en las granjas porcinas es endémica y la vigilancia sanitaria resulta esencial para su detección y control. Para esto, se requieren herramientas de diagnóstico sensibles, técnica y económicamente convenientes para el sector productivo y respetuosas del bienestar animal. El objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad de diferentes métodos de monitoreo para el diagnóstico de la infección por VIA en criaderos porcinos intensivos confinados infectados naturalmente, bajo el manejo de los sistemas productivos argentinos y de acuerdo con las condiciones de procesamiento locales. Inicialmente se puso a punto una técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para detección de VIA. Se evaluaron dos productos comerciales para la extracción de ARN en una muestra control positivo con alta concentración viral y en muestras de fluido oral, el efecto de dilución del templado de ARN y la concentración de la mezcla de enzimas en la RT-PCR sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral. En granjas porcinas intensivas naturalmente infectadas por VIA se registró la presencia de signos clínicos y se recolectaron muestras de secreción nasal y fluido oral, en algunos casos se incluyeron muestras para histopatología e inmunohistoquímica (IHQ) y de sueros para detección de anticuerpos mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) comercial. Se evaluó el acuerdo entre la presencia de signos y detección de VIA mediante los diferentes métodos de muestreo, en forma global y estratificando por grupos etarios o categorías animales estudiadas y por granja analizada. En salas de maternidad de granjas con manifestaciones clínicas compatibles con infección por VIA en lechones pre-destete se recolectaron muestras de secreción orofaríngea de lechones y de la piel de la ubre de las cerdas mediante gasas mamarias. Además, en una granja con infección natural por influenza se llevó a cabo la recolección de muestras de bioaerosoles mediante un colector ciclónico líquido. Mediante la RT-PCR empleada se logró la detección de VIA en diferentes tipos de muestras, hubo concordancia excelente entre los dos productos comerciales empleados para la extracción de ARN. La dilución del templado de ARN y el uso del doble de concentración de enzimas de la mezcla de RT-PCR sobre el templado de ARN puro o diluido no mejoraron la sensibilidad de la RT-PCR. En la detección de VIA, las tasas de acuerdo entre signos clínicos y resultados de RT-PCR en muestras de secreción nasal y fluido oral fueron diferentes de acuerdo con el grupo etario o categoría y granja estudiada: máximas en cerdos de 21-34 ddd, algo menores en cerdos de 35-70 ddd y bajas o nulas en cerdos de 71-203 ddd. Si bien hubo acuerdo estadísticamente significativo entre la detección de ARN de VIA mediante RT-PCR de muestras de

secreción nasal y muestras de fluido oral, las muestras de fluido oral fueron comparativamente más sensibles, fáciles de obtener, no invasivas ni estresantes para los animales y más económicas que las muestras de secreción nasal. No hubo asociación estadísticamente significativa entre la detección de anticuerpos contra VIA por ELISA, presencia de signos clínicos y la detección de VIA por RT-PCR de muestras de secreción nasal y/o fluido oral. En las muestras de pulmón, la lesión histopatológica observada más frecuentemente fue el infiltrado mononuclear difuso peribronquial y la técnica de inmunohistoquímica, con una tasa de detección del 100%, permitió confirmar la presencia de VIA en cortes con lesiones histopatológicas inespecíficas e incluso con cierto grado de autólisis. En salas de maternidad, el hisopado orofaríngeo permitió la detección de VIA en lechones con y sin manifestaciones clínicas, aunque no detectamos ARN de VIA en muestras de gasa mamaria. Por otro lado, los muestreos de bioaerosoles no fueron útiles para la detección de ARN de VIA en el caso de una granja endémica y condiciones de crianza e instalaciones de nuestro país. Frente a la endemicidad de VIA en cerdos, sería necesario realizar estudios sistemáticos que permitan conocer su origen y evolución para producir inmunógenos de mayor eficacia para el control o eliminación de este agente de las granjas.

**Palabras clave:** CERDOS, INFLUENZA, DIAGNÓSTICO, RT-PCR, FLUIDO ORAL, SECRECIÓN NASAL, SECRECIÓN OROFARÍNGEA, GASAS MAMARIAS, IHQ, HISTOPATOLOGÍA, BIOAEROSOLES

## **SUMMARY**

Influenza A viruses (VIA) cause respiratory disease in pigs and have public health implications. In swine farms in Argentina, VIA infection is endemic and health surveillance programs for its detection and control are essential. In this sense, sensitive diagnostic tools are needed, where animal welfare and technical and economical suitability for the swine industry need to be considered. The aim of this study was to evaluate the usefulness of different monitoring methods for the diagnosis of VIA infection in naturally infected confined swine farms, under the Argentinian production systems management practices and according to the local processing conditions. Initially, an reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for VIA detection was developed. Two commercial products for RNA extraction were evaluated and compared using a positive control with high viral concentration sample and oral fluid samples. Moreover, an RNA template dilution and the RT-PCR enzyme mixture

concentration effects were also evaluated for the VIA detection from oral fluid samples. In intensive, naturally VIA infected swine farms, the presence of clinical signs was recorded, and nasal secretion and oral fluid samples were collected. In some cases, tissue samples and serum samples were included, for histopathology and immunohistochemistry (IHC) and for commercial ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) antibody detection, respectively. The concordance between the presence of clinical signs and VIA detection between the different sampling methods was evaluated; first globally and then stratifying by age, by animal categories and by farm. Oropharyngeal secretion samples from piglets and udder skin wipes from sows were collected from farrowing units where clinical signs consistent with VIA infection in pre-weaning piglets were detected. In addition, bioaerosol samples were collected from a naturally VIA infected farm using a liquid cyclonic collector. RT-PCR for VIA detection in different sample types was achieved. There was excellent concordance between the two commercial products used for RNA extraction. The RNA template dilution and the use of twice the enzyme concentration of the RT-PCR mixture on pure or diluted RNA template did not improve the RT-PCR sensitivity. The agreement rates between clinical signs records and results from RT-PCR for VIA detection in nasal secretions and oral fluid samples were different according to the age, category and farm studied: maximum in 21-34 day-old pigs, somewhat lower in 35-70 day-old pigs and low or none in 71-203 day-old pigs. While there was statistically significant agreement between VIA RNA detection by RT-PCR from nasal secretion and oral fluid samples, oral fluid samples were comparatively more sensitive, easier to obtain, non-invasive and non-stressful for animals, and less expensive than nasal secretion samples. There was no association between antibodies against VIA detection by ELISA, clinical signs presence and VIA detection by RT-PCR from nasal secretion and/or oral fluid samples. The most frequently detected histopathological lesion in lung samples was the peribronchial diffuse mononuclear infiltrate. The 100% detection rate of the immunohistochemistry technique allowed the confirmation of VIA antigen in samples with nonspecific histopathological lesions, and even with a certain degree of autolysis. In farrowing units, VIA RNA was detected in oropharyngeal swab samples from piglets with/without clinical signs, whereas it was not detected in sow udder skin wipes. On the other hand, VIA RNA detection was not possible in bioaerosol samples collected from an endemic Argentinian farm under the local particular breeding and facilities characteristics. Considering the endemicity of VIA in swine, it would be necessary to carry out systematic studies to know local VIA origin and evolution to produce more efficient immunogens for VIA farm control and/or elimination.

**Title:** Assessment of different monitoring methods for Influenza A viruses diagnosis in swine farms

**Key words:** PIGS, INFLUENZA, DIAGNOSIS, RT-PCR, ORAL FLUID, NASAL SWAB, OROPHARYNGEAL SWAB, UDDER WIPE, IHC, HISTOPATHOLOGY, BIOAEROSOLS

## 1. INTRODUCCIÓN

La infección por VIA en cerdos representa una problemática de importancia económica y de Salud Pública.

Desde el punto de vista económico, genera pérdidas productivas (menor ganancia de peso, mortandad, abortos) y gastos en insumos y mano de obra necesarios para su control y el control de las infecciones asociadas.

Por el otro lado, su implicancia en Salud Pública radica en que los cerdos son hospedadores donde pueden producirse eventos de recombinación de VIA de diferentes orígenes, además de mutaciones puntuales, que pueden dar lugar a la aparición de nuevos VIA recombinantes. Debido al contacto estrecho entre personas y cerdos en los sistemas de producción intensivos, estos nuevos VIA pueden transmitirse a la población humana y, eventualmente, derivar en nuevas pandemias. Para detectar y prevenir estos posibles eventos es esencial la vigilancia sanitaria de VIA en las granjas de cerdos.

La aceptación, adopción y mantenimiento de los protocolos de vigilancia sanitaria por parte del sector productivo se encuentra limitada a la factibilidad técnica y económica de los métodos de diagnóstico.

Debido a la limitada sensibilidad y especificidad de los signos clínicos y de las lesiones macroscópicas y microscópicas, el abordaje de la detección por VIA requiere de la selección y aplicación de métodos complementarios de diagnóstico.

En nuestro país, históricamente la detección del material genético de VIA en animales vivos se ha realizado a partir de muestras de secreción nasal recolectadas con hisopos. También se emplean técnicas serológicas para detectar los anticuerpos frente a VIA en suero. En animales muertos, se utiliza la inmunohistoquímica y la detección de material genético en muestras de pulmón.

Teniendo en cuenta las limitaciones técnicas, económicas y de bienestar animal que implica la recolección de muestras de secreción nasal, resulta necesario disponer de otras herramientas sensibles que permitan confirmar la presencia de VIA de manera sencilla, económica y respetuosa de los animales a estudiar. En este sentido, las muestras de fluido oral recolectadas con cuerdas permiten cumplir con los objetivos mencionados.

Si bien en otras partes del mundo las muestras de fluido oral se emplean para la detección de patógenos en cerdos desde hace alrededor de una década, hasta nuestro conocimiento, al momento del inicio de este estudio no existían reportes de experiencias sistemáticas previas a nivel nacional con esta técnica en cerdos.

Por otro lado, una de las limitaciones del empleo de las muestras de fluido oral radica en el desinterés de los lechones en maternidad en interactuar con la cuerda

empleada para su recolección. Por estos motivos, una herramienta alternativa para conocer el estatus sanitario en esta categoría es la recolección de muestras de secreciones orales y nasales de la piel de la glándula mamaria de las cerdas. Su reporte es relativamente reciente y, hasta nuestro conocimiento, su aplicación en nuestro contexto aún no había sido evaluada.

Finalmente, si bien se ha reportado la transmisión aérea de VIA dentro y entre granjas, no se han llevado a cabo estudios en nuestro país para determinar la aplicación práctica del muestreo de aire y valorar el rol de la transmisión aérea en nuestros sistemas de producción.

Optimizar y evaluar las aplicaciones y limitaciones de diferentes técnicas de monitoreo para acercarlas al sector productivo nacional podría promover la implementación de vigilancia sanitaria periódica y sostenida. Esto último permitiría ampliar la información epidemiológica obtenida, brindando la posibilidad de un entendimiento más cabal de la presentación de VIA en las granjas de nuestro país, ayudando a implementar prácticas efectivas para el control y/o prevención de la infección por VIA en las granjas de cerdos y aportando información de interés para los organismos de Salud Pública.

Desde 2016 el procesamiento de muestras mediante RT-PCR comenzó a emplearse como una nueva opción para el diagnóstico de Influenza en la FCV-UNR. Para la detección del ARN de VIA hemos procesado muestras de secreción nasal, secreción orofaríngea, fluido oral obtenido con cuerdas de algodón y muestras de secreción nasal y oral de lechones lactantes recolectadas mediante el empleo de gasas mamarias. Las muestras fueron obtenidas o remitidas por cerca de 20 granjas diferentes, ubicadas en las provincias de Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires, Entre Ríos, La Rioja, Chaco y Formosa.

## **2. HIPÓTESIS**

Para conocer la dinámica de infección de los virus de Influenza A en las granjas de producción porcina es necesario el estudio individual y poblacional mediante distintos métodos de muestreo y a través de la implementación de diferentes técnicas diagnósticas, considerando sus desempeños en función de los sistemas productivos y de las condiciones de procesamiento locales.

## **3. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar la utilidad de diferentes métodos de monitoreo para el diagnóstico de la infección por virus de Influenza A en criaderos porcinos intensivos confinados infectados naturalmente por este agente, bajo el manejo de los sistemas productivos argentinos y de acuerdo con las condiciones de procesamiento locales.

### **B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Poner a punto una técnica de RT-PCR para detección de VIA.
- Evaluar dos productos comerciales para la extracción de ARN en una muestra con alta concentración viral y en muestras de fluido oral.
- Evaluar el efecto de dilución del templado de ARN y la concentración de la mezcla de enzimas en la RT-PCR sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral.
- Evaluar la utilidad relativa de los signos clínicos, RT-PCR de muestras de secreción nasal y muestras de fluido oral, histopatología e inmunohistoquímica y estudios serológicos mediante ELISA para el estudio de VIA en granjas porcinas intensivas naturalmente infectadas.
- Evaluar la utilidad de las muestras de secreción orofaríngea de lechones obtenida con hisopos y de las muestras de secreción nasal y oral de lechones obtenidas de la piel de la ubre de la cerda mediante el empleo de gasas de algodón para la detección de material genético de VIA en lechones de maternidad.
- Implementar y evaluar la capacidad de detección de ARN de VIA en muestras de bioaerosoles de un criadero porcino con brote natural de infección por influenza.

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### A. VIRUS DE INFLUENZA A

#### a. Características generales

Los virus de influenza son los miembros más importantes de la familia *Orthomyxoviridae*, la cual comprende a los géneros Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Influenzavirus D, Thogotovirus, Isavirus y Quaranjavirus (MacLachlan y Dubovi, 2016; Van Reeth y Vincent, 2019). Los virus del género Influenzavirus A o virus de influenza A (VIA) son patógenos comunes de caballos, cerdos, humanos y aves domésticas en gran parte del mundo, aunque también pueden producir infecciones esporádicas en visones, focas, ballenas y perros (MacLachlan y Dubovi, 2016). Han sido responsables de epidemias graves en especies mamíferas (incluyendo personas) y aviáres, tanto salvajes como domésticas (Pleschka, 2013; MacLachlan y Dubovi, 2016).

Los VIA son pleomórficos, filamentosos, tienen un diámetro aproximado de 80-120 nm y están formados por una envoltura que rodea ocho nucleocápsides (MacLachlan y Dubovi, 2016; Van Reeth y Vincent, 2019). La envoltura viral está compuesta por una bicapa lipídica, derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora infectada y por proteínas virales estructurales incrustadas en ella. Las proteínas virales más abundantes en la envoltura son las glucoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), las cuales se proyectan como espículas sobre la superficie viral (Sandbulte y col., 2015; Van Reeth y Vincent, 2019).

La HA representa el 80% de las proteínas externas de la envoltura. Es un determinante importante de la especificidad de hospedadores y del tropismo tisular, la propagación viral y la patogenicidad (Pleschka, 2013; Sandbulte y col., 2015). A través de la HA los VIA se unen al ácido siálico que se encuentra unido mediante un enlace  $\alpha$ -glicosídico a los residuos terminales de galactosa de las cadenas de carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos. Mientras que los VIA aviar se unen al ácido siálico con enlace a la galactosa  $\alpha$ -2,3 (presente en las células epiteliales intestinales de aves), los VIA que infectan a mamíferos reconocen el enlace ácido siálico- galactosa  $\alpha$  -2,6 (presente en el tracto respiratorio de mamíferos) (Zell y col., 2013; Sandbulte y col., 2015).

A su vez, la HA es el blanco de los anticuerpos neutralizantes generados por el hospedador (Van Reeth y Vincent, 2019).

Además de la HA, otros factores determinantes de hospedador son la nucleoproteína (NP) y la subunidad PB2 (proteína básica 2) de la polimerasa (Zell y

col., 2013).

La NA es la proteína responsable de la liberación y dispersión de los nuevos viriones de la célula hospedadora, influyendo en la transmisión viral (Sandbulte y col., 2015). Además, previene la agregación de los viriones, participa en la apoptosis inducida por el virus y tiene efectos sobre la virulencia (Olsen, 2002). También facilita la llegada de los viriones a las células del tracto respiratorio al degradar el moco que recubre las vías aéreas (Matrosovich y col., 2004).

Otra proteína viral inserta en el espesor de la envoltura es la proteína matriz 2 (M2) que forma un canal de protones (Sandbulte y col., 2015).

Recubriendo internamente la envoltura viral se encuentra la proteína matriz 1 (M1), la cual interactúa con las NPs y con las colas citoplasmáticas de las HA y NA, asociando a las nucleocápsides con la envoltura viral y proporcionando un marco estructural a los viriones (Olsen, 2002; Zell y col., 2013; Sandbulte y col., 2015).

Por el otro lado, el núcleo de la partícula viral está constituido por ocho nucleocápsides, que son complejos de material genético y proteína viral (Zell y col., 2013). El material genético de los VIA consiste en ARN (ácido ribonucleico) monocatenario de orientación negativa dividido en ocho segmentos responsables de codificar 12 proteínas (Pleschka, 2013; Zell y col., 2013; MacLachlan y Dubovi, 2016). Cada uno de los ocho segmentos de ARN genómico está encerrado dentro de una cápside de NP viral que lo protege (Zell y col., 2013; Lou y col., 2018) y que, en uno de los extremos contiene tres proteínas que forman el complejo de ARN polimerasa viral (PB1: proteína básica 1, PB2 y PA: proteína ácida), responsables de la replicación del genoma viral y del secuestro de la maquinaria de la célula hospedadora (Sandbulte y col., 2015). La asociación de estas con el ARN genómico y la nucleoproteína (NP), da lugar a la formación del complejo de ribonucleoproteína (RNP) (Zell y col., 2013; Lou y col., 2018). Además, la NP es uno de los antígenos específicos de tipo viral que distingue entre los virus de influenza A, B, C y D (Jung y col., 2002). Si bien, la secuencia de nucleótidos del gen de la NP de VIA no es muy similar a la de otros tipos de virus de la influenza (aproximadamente 60% de homología), está altamente conservada entre las diferentes cepas VIA (aproximadamente 90% de homología) (Jung y col., 2002).

Finalmente, el virión cuenta con las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) que junto con las NP y las proteínas M, regulan la transcripción y replicación del ARN viral (Olsen, 2002). Además, la proteína no estructural 1 (NS1) interfiere con la señalización de la célula hospedadora, inhibiendo la producción de citocinas antivirales (Janke, 2014; Sandbulte y col., 2015).

Entre los virus de ARN, los virus de influenza presentan la particularidad de que la síntesis, transcripción y replicación del ARN se lleva a cabo en el núcleo de las células

infectadas por lo que el ARN y el antígeno viral pueden detectarse tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células infectadas (Jung y col., 2002).

## **b. Clasificación de los virus de Influenza A**

Los virus del género Influenza pueden clasificarse en tipos A, B, C y D en base a las diferencias genéticas y antigénicas de las proteínas estructurales internas, altamente conservadas: NP y M (Pleschka, 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

A su vez, los VIA se clasifican en subtipos y más recientemente, en genotipos (Van Reeth y Vincent, 2019). La clasificación de los VIA en subtipos se establece de acuerdo con la naturaleza antigénica y genética de las proteínas de superficie HA y NA (Zhang y col., 2016). Hasta el momento se han detectado 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA circulando en la naturaleza (Van Reeth y Vincent, 2019). En las aves acuáticas silvestres se identificaron la mayoría de los tipos de HA y NA de VIA que se conocen, mientras que solo ciertos subtipos se encuentran en determinadas especies mamíferas (Zhang y col., 2016; Van Reeth y Vincent, 2019). La combinación del tipo de HA y NA en un virus define su subtipo, por ejemplo: H1N1, H3N2. Entonces, los VIA se nombran de acuerdo con la siguiente convención: género (tipo), especie de origen (omitido si es la especie humana), lugar geográfico donde se produjo el aislamiento, número de aislamiento, año de aislamiento y el subtipo basado en la HA y NA, por ejemplo: A/porcino/lowa/A01477800/2014 (H1N1). Actualmente, los tres subtipos principales de VIA que co-circulan en cerdos son H1N1, H1N2 y H3N2, aunque ocasionalmente se identifican otras variantes (Van Reeth y Vincent, 2019).

Por otra parte, la genotipificación consiste en la determinación de las secuencias genéticas de cada segmento de ARN de los VIA. A través de los estudios de secuenciación genética pudo demostrarse que dentro de un mismo tipo de HA (y de cada uno de los demás segmentos genéticos de los VIA), existe una considerable diversidad genética y antigénica (Vincent y col., 2008). Esto ha llevado a la clasificación en clados, grupos o linajes filogenéticos dentro de un mismo subtipo viral y ha permitido ampliar la comprensión de la epidemiología y evolución de los VIA (Zhang y col., 2016). Si bien pueden pertenecer al mismo subtipo de HA, entre los diferentes grupos filogenéticos existe limitada reacción inmunológica cruzada (Vincent y col., 2008).

## **c. Epidemiología**

### *c.1. Hospedadores*

Los VIA tienen un amplio rango de especies hospedadoras (Zell y col., 2013; Van Reeth y Vincent, 2019). Sus principales reservorios naturales son las aves acuáticas, de

las cuales se han aislado la mayoría de los subtipos conocidos de VIA (H1 a H16 y N1 a N9) (Van Reeth y Vincent, 2019). De este modo, las aves actúan como un depósito global de VIA en la naturaleza y a partir de ellas se han aislado más de 110 tipos de VIA (Zell y col., 2013). Sin embargo, los VIA pueden infectar muchas otras especies de mamíferos, incluidos humanos, cerdos, caballos, hurones y mamíferos marinos (Trebien y col., 2011; Zell y col., 2013; Van Reeth y Vincent, 2019). A diferencia de las aves, en los mamíferos se observan cadenas de infección estables sólo para ciertos subtipos, por ejemplo, H1N1, H2N2 y H3N2 en humanos; H3N8 y H7N7 en caballos y H1N1, H3N2 y H1N2 en cerdos. Otras especies mamíferas donde eventualmente se detectó la infección por VIA se describieron como hospedadoras accidentales (Zell y col., 2013).

La ecología de los VIA está fuertemente influenciada por su adaptación a las especies hospedadoras (Zell y col., 2013). Habitualmente, los virus de la influenza humana circulan entre personas, los de la influenza porcina entre los cerdos, los de la influenza aviar entre aves y los de la influenza equina entre la familia *Equidae*. Si bien ocasionalmente los VIA pueden transmitirse de una especie a otra, la mayoría de las veces no logran generar cadenas de infección estables en la nueva población y pronto desaparecen. Sin embargo, algunos de estos virus logran adaptarse a la nueva especie causando brotes, epidemias o pandemias (Spickler, 2009).

El hecho de que las aves marinas sean los reservorios naturales y que, a su vez, muchas otras especies animales puedan infectarse, determina que la erradicación de los VIA no sea posible y que se produzcan reapariciones constantes de la enfermedad (Pleschka, 2013).

La restricción del rango de hospedadores entre los VIA es un rasgo poligénico (Olsen, 2002). No obstante, como se mencionó previamente, la unión de la HA al ácido siálico de la superficie de la célula hospedadora es uno de los principales determinantes del rango de hospedador y del tropismo tisular de los VIA (Zell y col., 2013). Hasta hace unos años se consideraba que las células epiteliales del tracto respiratorio superior de los cerdos expresaban los receptores de ácido siálico con enlace a la galactosa  $\alpha$ -2,3 y ácido siálico con enlace a galactosa  $\alpha$ -2,6 (Ito y col., 1998), determinado que los cerdos fueran susceptibles a los VIA adaptados a aves y a los humanos, y que, de este modo, actuaran como hospedadores intermediarios (Olsen, 2002 Van Reeth y Vincent, 2019). Por estos motivos, los cerdos han sido considerados como “recipientes de mezcla” o “vasos mezcladores” donde podrían tener lugar procesos de recombinación entre virus de influenza humana, aviar y/o porcina (Van Reeth y Vincent, 2019). La sucesiva recombinación entre los virus de influenza de estas especies en cerdos ha llevado a la aparición de una gran variedad de VIA porcinos con segmentos genéticos originados

en dos o más especies diferentes (Spickler, 2009). Además, estos eventos de recombinación de genes de VIA de diferentes orígenes, eventualmente puede dar lugar a la generación de un VIA con nuevas propiedades antigénicas y capaz de replicarse en personas que, potencialmente, puede ser la causa de un brote de influenza pandémico en humanos (Pleschka, 2013). Sin embargo, en los últimos años, hubo ejemplos de VIA que cruzaron la barrera de especies sin la participación de los cerdos. De este modo, la teoría del "cerdo como recipiente de mezcla" sería menos sustancial de lo que se pensaba y otras especies, como las aves de producción y la especie humana, podrían actuar como recipientes de mezcla (Trebbien y col., 2011). Esto ha llevado a que, si bien el potencial zoonótico de los virus de la influenza porcina es bien reconocido, y los cerdos han sido considerados los hospedadores responsables de la generación de los VIA reagrupados responsables de las pandemias de influenza humana de 1918 ("Gripe española"), 1957 ("Gripe asiática") y 1968 ("Gripe de Hong Kong"), debido a la falta de evidencia directa, se planteen dudas de que el reordenamiento de estos virus realmente ocurriera en cerdos (Weingartl y col., 2010).

Por otro lado, a partir de la aplicación de pruebas de diagnóstico de rutina en personas, se han identificado regularmente infecciones humanas con VIA porcinos. La mayoría de estos eventos zoonóticos ocurren cuando las personas y los cerdos están en contacto cercano y, generalmente, son eventos limitados con poca o ninguna propagación posterior entre la población humana (Zell y col., 2013). Del mismo modo, los virus de la gripe humana se transmiten esporádicamente a los cerdos como infecciones zoonóticas inversas, lo que puede llevar al establecimiento de linajes de VIA adaptados a esta especie, produciendo enfermedad clínica en cerdos (Olsen, 2002; MacLachlan y Dubovi, 2016). Pero, aun cuando clínicamente no se produzcan casos en porcinos, la infección de cerdos con VIA humanos influyen repetidamente en la diversidad genética de los VIA porcinos (VIA-P) (Olsen, 2002).

En el año 2009 se produjo una nueva pandemia de influenza en personas debido a la introducción en la población humana de un nuevo VIA de origen porcino, el H1N1 pdm 2009 (H1N1 pandémico 2009). El VIA H1N1 pdm 2009 es un VIA recombinante que contiene segmentos génicos de VIA humano y aviar y linajes de VIA de cerdos de América del Norte y Eurasia (Pleschka, 2013). A partir de su aparición, el VIA H1N1 pdm 2009 se ha introducido en la población de cerdos y se ha recombinado desde entonces con otros VIA de origen porcino (Ducatez y col., 2011; Lewis y col., 2016; Cappuccio y col., 2017). A su vez, la transmisión zoonótica de VIA de cerdos a personas ha sido documentada a niveles sin precedentes en los últimos años (Jhung y col., 2013).

Los análisis filogenéticos realizados han demostrado que cada segmento del VIA H1N1 pdm 2009 se agrupa con un linaje establecido de influenza porcina, lo que sugiere que los progenitores de este virus probablemente se originaron en cerdos (Weingartl y col., 2010). Por estos motivos, la dinámica de los VIA en cerdos representa un desafío, tanto para el sector productivo porcino, al tratarse de una enfermedad respiratoria recurrente, responsable de pérdidas económicas, y también para la Salud Pública como fuente de infección zoonótica (Zell y col., 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

### *c.2. Transmisión*

En mamíferos, los VIA se transmiten por vía aerógena a través del contacto directo con las secreciones nasales, por inhalación del virus aerosolizado en las gotitas generadas por la tos, el estornudo y la exhalación, o indirectamente a través de fómites contaminados con descargas nasales (Torremorell y col., 2012; Janke, 2013).

En los cerdos, la excreción de partículas virales en las secreciones nasales comienza a partir de 1 día post infección (dpi) y suele continuar durante 7 (Janke, 2013; Van Reeth y Vincent, 2019) a 10 días (Spickler, 2009).

El contacto directo y los ambientes cerrados favorecen la transmisión (Spickler, 2009). Además, los aerosoles infecciosos generados por los cerdos infectados con VIA son considerados una ruta importante de transmisión de VIA dentro y entre las granjas porcinas (Corzo y col., 2013a). VIA ha sido detectado en muestras de bioaerosoles porcinos, tanto en estudios experimentales como a campo (Hermann y col., 2006; Loeffen y col., 2011; Corzo y col., 2013a, 2013b, 2013c; Anderson y col., 2016; Neira y col., 2016; Neira y col., 2018; Garrido-Mantilla y col., 2019).

### *c.3. Mecanismos de evolución de los VIA*

Una propiedad que caracteriza a los virus de influenza es su gran variabilidad genética, producida mediante dos mecanismos: recombinación genética y deriva genética (Zell y col., 2013, Sandbulte y col., 2015; Van Reeth y Vincent, 2019).

Por un lado, la recombinación, reasociación o reordenamiento genético consiste en el intercambio de uno o más segmentos génicos entre dos o más VIA (Zell y col., 2013; Sandbulte y col., 2015). Este fenómeno es posible debido a la naturaleza segmentada del genoma de los VIA y se produce cuando dos o más VIA diferentes infectan una misma célula hospedadora e intercambian sus segmentos genómicos (Zhang y col., 2016). Dentro de los eventos de recombinación, aquellos en los cuales se produce el intercambio de genes HA y NA son de especial importancia ya que pueden conducir a un cambio antigénico, con baja reactividad cruzada de los anticuerpos preexistentes en un hospedador (Zell y col., 2013). Muchos de los VIA que circulan en los porcinos

se originan a partir del reordenamiento entre VIA humanos o aviares con VIA porcinos endémicos, que dan lugar a un virus nuevo, virulento, que puede transmitirse fácilmente en la población porcina si la inmunidad de protección cruzada es parcial o está ausente (Van Reeth y Vincent, 2019).

Por el otro lado, la deriva genética es la acumulación gradual de sustituciones de nucleótidos a lo largo del tiempo debido a la falta de actividad de corrección de la ARN polimerasa viral (Zhang y col., 2016). La alta tasa de mutación en combinación con la alta tasa de replicación determina que se acumulen en el genoma viral numerosas mutaciones, las cuales pueden traducirse en cambios en cualquiera de las proteínas virales. Entre estos, puede producirse la alteración conformacional de epítomos de HA y NA contra los cuales se generan los anticuerpos neutralizantes (Pleschka, 2013). Estas mutaciones que originan variantes de evasión inmune tienen una mayor probabilidad de infectar a los hospedadores con preinmunidad y a que las vacunas existentes sean menos o nada efectivas y determinan la necesidad de realizar actualizaciones periódicas en su composición antigénica (Pleschka, 2013; Zell y col., 2013).

Los procesos de recombinación y/o deriva genética permiten la evolución de los VIA. Aun cuando inicialmente se originen a partir de un mismo virus, barreras como la de las especies hospedadoras o el aislamiento geográfico determinan que los VIA generados en cada una de las poblaciones sea diferente, en mayor o menor medida, al VIA que les dio origen y entre sí (Zell y col., 2013). Entonces, si bien tanto en cerdos como en personas los subtipos de VIA que han formado linajes estables son los VIA H1 y H3, la naturaleza de estos virus difiere entre las dos especies hospedadoras e incluso son distintas en las poblaciones de cerdos y personas en diferentes regiones geográficas del mundo (Zell y col., 2013).

## **B. INFLUENZA PORCINA (INFLUENZA EN CERDOS)**

La primera descripción clínica de influenza en cerdos se produjo en 1918, coincidentemente con la aparición de la “Gripe española” en la población humana (Van Reeth y Vincent, 2019). Desde entonces, los VIA han sido asociados al Complejo Respiratorio Porcino (CRP), junto con otros agentes (Rajao y col., 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

En los cerdos, los VIA producen enfermedad respiratoria aguda y, por la similitud clínica con la influenza humana, fue nombrada como “gripe del cerdo”, “influenza porcina” o “gripe porcina” (Janke, 2013; Detmer y col., 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

## **a. Presentación clínica de la influenza en las granjas porcinas**

La infección de una granja porcina por VIA puede tener dos formas de presentación clínica (Olsen, 2002):

### **1. Presentación epidémica:**

Tiene lugar en las poblaciones de cerdos sin inmunidad previa contra el VIA actuante. En las granjas, la infección de los cerdos con VIA se manifiesta como brotes explosivos de enfermedad respiratoria y febril aguda con alta morbilidad (puede llegar al 100%) y baja mortalidad (Olsen, 2002; Janke, 2013).

El inicio de la enfermedad es brusco y la propagación dentro y entre los sitios y a través de cerdos de todas las edades es muy rápida (dentro de 2 a 3 semanas) (Olsen, 2002; Janke, 2013). Los animales tienen hipertermia (40.5 °C), letargo, anorexia, estornudos, tos, disnea y, a veces, secreción nasal u ocular (Olsen, 2002; Janke, 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

A nivel individual, el curso de la enfermedad es breve y autolimitada. En casos no complicados con neumonía bacteriana concurrente, la mayoría de los animales se recuperan por completo en 6 a 7 días (Olsen, 2002; Detmer y col., 2013; Janke, 2013). Sin embargo, puede haber algunos cerdos infectados secundariamente o afectados crónicamente (Janke, 2013).

### **2. Presentación endémica:**

Tiene lugar en aquellas granjas donde los cerdos tienen cierto grado de inmunidad previa contra los VIA. Debido a la amplia distribución de los VIA, esta es la forma de presentación más frecuente en la actualidad (Janke, 2013).

La enfermedad se presenta en forma crónica, la expresión clínica es menos evidente y suele estar combinada con la de otras infecciones respiratorias concurrentes (Janke, 2013). Los cerdos excretan virus, pero presentan escasos o nulos signos clínicos (Simon-Grifé y col., 2012; Corzo y col., 2013; Dibárbora y col., 2013; Panyasing y col., 2016; Cappuccio y col., 2017).

Las edades o categorías animales en las cuales se presentan los signos clínicos suelen estar vinculadas al estado inmune de los animales con relación a los VIA circulantes en la granja (Janke, 2013). Pueden presentarse varias olas de infección por VIA en bandas de animales a lo largo del tiempo (Simon-Grifé y col., 2012).

La dinámica de transmisión y las tasas de infección varían entre y dentro de las granjas como consecuencia de variaciones en las tasas de contacto, rotación e introducción de animales, edades de los grupos de cerdos mezclados, inmunidad preexistente, vacunación de las cerdas, estado de las cachorras para VIA,

estacionalidad, diferencias en los flujos y otros factores de manejo (Simon-Grifé y col., 2012; Ramirez y col., 2012; Corzo y col., 2013b; Dibárbora y col., 2013; Allerson y col., 2014; Panyasing y col., 2016; Cappuccio y col., 2017; Ryt-Hansen y col., 2019; Chamba Pardo y col., 2018, 2020).

Uno de los factores que permite la persistencia prolongada de VIA en las granjas porcinas es la disponibilidad recurrente de individuos susceptibles (Brown, 2000; Pitzer y col., 2016). En particular, dos categorías han sido implicadas en el mantenimiento y propagación de VIA dentro de las granjas: los lechones de maternidad y las cerdas de reposición y hembras reproductoras jóvenes.

Así, VIA se ha detectado en lechones en salas de maternidad con y sin signos clínicos aún en presencia de anticuerpos calostrales (Loeffen y col., 2003; Kitikoon y col., 2006; Corzo y col., 2012; Allerson y col., 2013, 2014; Panyasing y col., 2014; Diaz y col., 2015; Cappuccio y col., 2017; Chamba Pardo y col., 2018, 2020; Garrido-Mantilla y col., 2019; Ryt-Hansen y col., 2019).

En una granja, a partir de muestras de secreción nasal se detectó VIA en la mayoría de los muestreos realizados en cerdos neonatales, pero no se detectó en cerdas o cachorras (Allerson y col., 2014). La importancia de los cerdos neonatales como reservorio de VIA podría fluctuar con el tiempo y es afectada por las variaciones del estado inmunológico del plantel reproductor (Allerson y col., 2014; Chamba Pardo y col., 2018, 2020).

En granjas con infección endémica, se detectó VIA en cerdos desde los 3 ddv (días de vida) y se demostró que la mayoría de los cerdos positivos se habían infectado durante las primeras 5 semanas de vida, cuando todavía tenían anticuerpos calostrales (Ryt-Hansen y col., 2019). A su vez, en lechones predestete de granjas con infección natural por VIA, las tasas de detección y la carga viral (estimada a través de los valores de umbral de detección o Ct, de la qRT-PCR o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real) fueron mayores en comparación con cerdos de mayor edad (Garrido-Mantilla y col., 2019). Además, un virus genéticamente similar al detectado en lechones de maternidad se identificó en el sitio donde los cerdos fueron trasladados luego del destete, demostrando el riesgo de transporte de VIA entre sitios o granjas a través del movimiento de los cerdos destetados (Allerson y col., 2014).

Por otro lado, la población de cerdas también constituye un reservorio de VIA y la introducción de cachorras de reposición y la presencia de hembras jóvenes en la sala de maternidad podría desempeñar un papel importante en la persistencia de VIA en las granjas (Larsen y col., 2010; Fablet y col., 2011; Diaz y col., 2015; Chamba Pardo y col., 2018, 2020; Ryt-Hansen y col., 2019). Se ha propuesto que la fuente de infección más probable de los lechones en maternidad son las cerdas (Simon-Grifé y col., 2012;

Garrido-Mantilla y col., 2019). Recientemente se detectó y aisló por primera vez VIA de la piel de la ubre de las hembras en maternidad, probablemente derivado de las secreciones nasales y orales que dejan los cerdos durante la lactancia, y se especuló que el contacto con la piel contaminada de las cerdas puede ser una vía de transmisión de la influenza entre los lechones antes del destete (Garrido-Mantilla y col., 2019).

Por otro lado, se ha demostrado que diferentes VIA pueden co-circular en las granjas de cerdos con infección endémica por VIA, ampliando la complejidad epidemiológica de la enfermedad y predisponiendo a la aparición de nuevos VIA recombinantes (Simon-Grifé y col., 2012; Corzo y col., 2013b; Panyasing y col., 2016; Chamba Pardo y col., 2017).

De este modo, la persistencia de VIA en las granjas tiene efectos económicos significativos y amplias implicancias en Salud Pública por el riesgo de reordenamiento y/o deriva genética, aparición de nuevas cepas y su transmisión a la población humana (Brown, 2002; Olsen, 2002; Ducatez y col., 2011; Lewis y col., 2016; Cappuccio y col., 2017).

En Argentina, se considera que la forma endémica de infección por VIA es la presentación más frecuente en las granjas porcinas intensivas y que el VIA H1N1 pdm 2009 es el subtipo predominante (Dibárbora y col., 2013; Cappuccio y col., 2017).

#### **b. Distribución anual de las infecciones por VIA en las granjas porcinas**

Originalmente, la influenza porcina fue descrita como una enfermedad de presentación epidémica anual estacional durante los meses de otoño-invierno (Zell y col., 2013). Sin embargo, actualmente, el comportamiento anual de la influenza en cerdos parece variable (Kyriakis y col., 2011; Corzo y col., 2013b; Simon y col., 2014; Díaz y col., 2015; Kaplan y col., 2015; Chamba Pardo y col., 2017).

En algunas zonas, especialmente aquellas donde las temperaturas estacionales son muy divergentes (por ejemplo, en el centro-norte de los EE. UU.), aún bajo los sistemas de producción de confinamiento actuales, se observa un patrón estacional con incrementos en otoño y picos en invierno y finales de primavera, de manera similar al patrón de presentación de influenza en las personas (Detmer y col., 2013; Janke, 2013; Chamba Pardo y col., 2017, 2020).

Sin embargo, con los métodos de producción porcina contemporáneos que incluyen el confinamiento de los cerdos y el control del ambiente, en otras regiones la enfermedad puede presentarse durante todo el año (Kyriakis y col., 2011; Corzo y col., 2013b; Detmer y col., 2013; Simon y col., 2014; Van Reeth y Vincent, 2019) con brotes o incrementos en los casos más probablemente durante los últimos meses de otoño y primeros de invierno, cuando las temperaturas comienzan a disminuir (Díaz y col.,

2015; Kaplan y col., 2015), aunque también se han reportado mayores tasas de detección de VIA en cerdos en crecimiento durante primavera y verano, en comparación con los meses fríos (Corzo y col., 2013b).

En Argentina la presencia de signos clínicos compatibles con infección por VIA se ha reportado a lo largo de todo el año (Dibárbora y col., 2013; Pereda y col., 2011; Cappuccio y col., 2017), e incluso se han identificado y aislado VIA en granjas durante los meses de verano (Dibárbora y col., 2013; Cappuccio y col., 2017).

### **c. Virus de influenza A en las granjas porcinas argentinas**

El primer reporte de detección de anticuerpos contra VIA en cerdos de Argentina, surge de un estudio realizado entre los años 2000-2002 (Teodoroff y col., 2003). Posteriormente, VIA fue identificado por inmunohistoquímica en muestras de pulmón con lesiones de neumonía necrótica obtenidas de dos cerdos de una granja de ciclo completo (Piñeyro y col., 2006). Un estudio serológico retrospectivo que evaluó la prevalencia serológica de VIA durante el año 2002 sugirió que, al menos desde el año 2002, en las poblaciones porcinas argentinas circularon cepas virales H1 y H3 humanas o porcinas con gran proximidad filogenética a las cepas humanas utilizadas en el estudio. A pesar de la identificación de anticuerpos contra VIA, en ese momento no se reportó enfermedad clínica ni aislamiento viral en cerdos de nuestro país (Piñeyro y col., 2010).

El primer aislamiento reportado de un VIA en Argentina se obtuvo a partir de un brote de enfermedad respiratoria clínica en una granja porcina, en noviembre de 2008. El aislamiento obtenido fue un VIA H3N2 completamente humano (Cappuccio y col., 2011). En junio-julio de 2009 se produjo el primer brote reportado de infección por VIA H1N1 pdm 2009 en una granja porcina de Argentina, probablemente como debido a la transmisión directa de humanos a cerdos (Pereda y col., 2010). Desde entonces, el VIA H1N1 pdm se considera endémico en las granjas porcinas de nuestro país (Dibárbora y col., 2013; Cappuccio y col., 2017) y se han identificado eventos de recombinación en cerdos entre VIA H1N1 pdm 2009 y VIA porcinos H1N2, H1N1 y H3N2 de origen humano (Pereda y col., 2011; Dibárbora y col., 2013; Dibárbora y col., 2016; Cappuccio y col., 2017).

La infección por VIA en Argentina no se limita sólo a las granjas de producción intensiva. En un estudio serológico realizado en 55 criaderos de cerdos de menos de 100 madres ubicados en la región norte, centro y sur del país, el 80% de los establecimientos fueron positivos a VIA H1 pdm 2009 y el 11% al H3 clúster 2 (Dibárbora y col. 2017).

#### **d. Impacto económico y en Salud Pública**

Sin bien es una enfermedad de baja mortalidad, la infección por VIA en las granjas porcinas genera pérdidas económicas para el sector productivo. En forma directa, las pérdidas se deben a la menor ganancia diaria de peso (gdp) de los animales ocasionadas por el cuadro febril, retrasando el tiempo en que los cerdos alcanzan el peso de faena; a las muertes ocasionales y a los abortos en las hembras preñadas provocados por la fiebre (Olsen, 2002; Spickler, 2009; Dibárbora y col., 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

Por otro lado, los VIA son agentes primarios del CRP. Pueden actuar junto con otros virus y bacterias produciendo enfermedad respiratoria de mayor severidad y/o predisponer a infecciones bacterianas asociadas las cuales incrementan la tasa de mortalidad y/o aumentan los costos sanitarios por la necesidad de tratamientos con antibióticos (Olsen, 2002; Van Reeth y Vincent, 2019).

En relación con la Salud Pública, como se mencionó previamente, si bien el rol de “recipiente mezclador” de los cerdos en la generación de VIA recombinantes es menos sustancial de lo que se creía, aún es reconocido el potencial zoonótico de los VIA porcinos y la generación de VIA reagrupados en cerdos que, eventualmente, pueden transmitirse a la población humana (Pleschka, 2013; Jhung y col., 2013; Zell y col., 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

Tanto las consecuencias económicas para el sector productivo porcino como el riesgo para la Salud Pública por infecciones zoonóticas enfatizan la importancia de la vigilancia y control de la influenza porcina (Detmer y col., 2013).

### **C. ENFERMEDAD EN LOS CERDOS**

#### **a. Signos clínicos**

Se ha definido cierto patrón general de la evolución de la infección y manifestaciones clínicas de influenza en cerdos.

Luego de un período de incubación breve (24-48 h), los cerdos desarrollan los signos clínicos, que pueden durar entre 5-7 a 10 días (Brown, 2000; Janke, 2013; Rajao y col., 2013).

Uno a dos dpi puede presentarse hipertermia alta (40,5 ° C) con letargo y anorexia, secreción nasal y ocular serosa y estornudos (Janke, 2013; Rajao y col., 2013; Spickler, 2009; Van Reeth y Vincent, 2019). Además, si los cerdos son estimulados a moverse pueden desarrollar taquipnea y disnea espiratoria (respiración a contragolpe) notorias (Janke, 2013). Como consecuencia del cuadro febril, las hembras preñadas pueden abortar (Spickler, 2009; Van Reeth y Vincent, 2019).

Entre el 3-4 dpi, los cerdos comienzan a manifestar una tos profunda, de sonido grave que, si no hay infecciones asociadas con otros agentes, suele ser mínima, suave y ocasional. Esta tos se produce como resultado de la extensa bronquitis y bronquiolitis y es considerada el signo clínico distintivo de esta enfermedad (Janke, 2013).

Finalmente, dentro de las manifestaciones clínicas posibles, se ha reportado el desarrollo de diarrea entre los días 3 y 7 pi (post infección) en cerdos infectados con VIA H1N1 pdm 2009 (Lange y col., 2009).

Si bien la descripción anterior puede tomarse como parámetro de referencia en la descripción de las manifestaciones clínicas de influenza en cerdos, el patrón de comportamiento y las manifestaciones clínicas de infección por VIA no son constantes y hay variaciones entre cepas, granjas y/o cerdos afectados (Brookes y col., 2010; Detmer y col., 2013). Por ejemplo, luego de una infección experimental, los signos clínicos que consistieron en estornudos leves y aumento transitorio de la temperatura rectal duraron sólo 2 a 3 dpi (Weingartl y col., 2010). A su vez, hay VIA que cuando se presentan sin otras infecciones asociadas, producen enfermedad leve, con escasos o nulos signos clínicos (Spickler, 2009; Detmer y col., 2013; Zell y col., 2013; Corzo y col., 2014; Neira y col., 2016; Van Reeth y Vincent, 2019). En otras ocasiones, las infecciones por VIA pueden presentarse con manifestaciones clínicas más intensas (Detmer y col., 2013; Janke, 2013). Esto podría estar vinculado a cepas más virulentas (como por ejemplo los VIA triple recombinantes), o a la presencia de infecciones bacterianas o virales asociadas (Spickler, 2009; Ma y col., 2010; Janke, 2013; Rajao y col., 2013). Los virus más virulentos suelen presentarse con fiebre más alta o prolongada (Janke, 2013). Cabe mencionar que, si bien la presencia de infecciones concomitantes suele intensificar los signos y lesiones, no todas las infecciones por VIA asociadas a otros agentes tienen presentaciones más graves (Rajao y col., 2013).

Por otro lado, la infección por VIA no necesariamente se acompaña de todos los signos y las lesiones macroscópicas y microscópicas típicas (Vincent y col., 1997). En algunos estudios, si bien todos los cerdos infectados experimentalmente presentaron signos clínicos respiratorios, ninguno de ellos tuvo fiebre o sólo presentaron temperatura corporal levemente elevada (Sreta y col., 2009; Weingartl y col., 2010). Por el contrario, cerdos infectados con VIA pdm H1N1 presentaron una respuesta febril significativa, con letargo a las 24 y 48 h pi que disminuyó al 3 dpi, pero no desarrollaron tos ni disnea (Gauger y col., 2012).

A su vez, en condiciones de granja, otros patógenos respiratorios y/o condiciones ambientales pueden intensificar, enmascarar o producir signos clínicos y lesiones macroscópicas similares a las asociadas a influenza (Spickler, 2009; Detmer y col.,

2013; Janke, 2013; Rajao y col., 2013). En un estudio de brotes agudos de infección natural por influenza en granjas de producción porcina no hubo un patrón común en la presentación y evolución de los signos clínicos, lo cual podría estar relacionado con la presencia de infecciones concomitantes o con factores particulares de las granjas (Neira y col., 2016).

Aunque el uso de los signos clínicos y lesiones macroscópicas mejora la sensibilidad de detección de otras enfermedades porcinas (Detmer y col., 2013), los reportes de la correlación entre signos clínicos y detección de VIA son diferentes entre estudios.

En un estudio transversal realizado en una granja porcina de Argentina en 2011 y 2012 no hubo correlación entre los signos clínicos, el estado serológico y la detección de VIA (Cappuccio y col., 2017).

Por el contrario, en un trabajo de revisión de artículos científicos, se observó una asociación positiva entre la recolección de muestras de cerdos con manifestaciones clínicas de enfermedad respiratoria y la detección de ARN de VIA por técnicas moleculares y aislamiento viral, tanto en brotes agudos de infección (medias de 62,6 % y del 54,9 %, respectivamente) como en los muestreos de vigilancia sanitaria (medias de 20,7 % y 10,0 %, respectivamente). Las tasas de detección y aislamiento de VIA en muestreos de animales sin manifestaciones clínicas fueron significativamente más bajas (medias de 4,7 % y 4,1 %, respectivamente) (Baudon y col., 2017).

En granjas de producción porcina con brotes agudos de influenza se encontró una asociación entre la presencia de tos y los niveles de ARN de VIA en muestras de fluido oral de cerdos, pero no hubo asociación entre los signos clínicos y la detección de VIA en el aire o en las superficies (Neira y col., 2016). En otro estudio en granjas con infección natural en cerdos de 1 a 5 semanas de vida se encontró una asociación entre la presencia de signos clínicos respiratorios y la detección de VIA en muestras de secreción nasal, aunque el tipo de signo clínico y la edad de los cerdos asociados con la detección de VIA varió entre criaderos (Ryt Hansen y col., 2019). Hubo correlación estadísticamente significativa entre las camadas positivas para VIA y el aumento en el índice de tos a los 7 ddd en una de las granjas y la presencia de secreción nasal serosa en lechones de 1 y 5 semanas de vida en otra. En otra granja no pudo establecerse la existencia de asociación entre la detección viral y los signos clínicos (Ryt Hansen y col., 2019).

En granjas con infección endémica, las probabilidades de detección de ARN de VIA a partir de muestras de secreción nasal en cerdos de maternidad de 14-26 ddd fueron significativamente mayores en aquellos animales con al menos un signo clínico de enfermedad respiratoria (tos, estornudos, secreción nasal y/o disnea) en comparación con los lechones sin signos clínicos al momento del muestreo. Sin embargo, en los

lechones de <14 ddv se detectó VIA en baja prevalencia (2 %) en ausencia de manifestaciones clínicas compatibles con infección por este agente (Allerson y col.,2014).

Por otro lado, el uso de signos clínicos para detectar infecciones por VIA en los cerdos requiere de la observación de los animales, ya sea por un/a profesional veterinario/a o por las personas que trabajan en la granja, capacitadas para eso (Detmer y col., 2013). Cuando los signos clínicos son leves y se presentan en categorías donde los monitoreos son limitados, pueden pasar desapercibidos (Valheim y col., 2011). En cerdos de engorde con infección natural por virus H1N1 2009 pdm, a pesar de la presencia de lesiones pulmonares multifocales en animales sacrificados, en 3 de 4 granjas estudiadas no había antecedentes de observación de signos clínicos típicos asociados con influenza (Valheim y col., 2011).

Finalmente, la detección de VIA puede producirse aun cuando no se observen manifestaciones clínicas respiratorias en los cerdos, por lo que restringir los muestreos a animales con signos clínicos puede impedir la detección de VIA subclínicos dentro de la granja (Corzo y col., 2013b; Allerson y col., 2014; Baudon y col., 2017). Las infecciones subclínicas pueden dar lugar a eventos de recombinación y/o mutaciones virales que pasen desapercibidos para los programas de vigilancia que no contemplen el muestreo de animales asintomáticos. A su vez, el contacto con cerdos infectados aparentemente sanos puede constituir un riesgo para las personas y para otras poblaciones de cerdos (Corzo y col., 2013b; Baudon y col., 2017).

#### **b. Lesiones macroscópicas**

La manifestación macroscópica más constante de la infección por el VIA sin infecciones asociadas es la bronconeumonía de distribución craneoventral (Janke, 2013, 2014). Las lesiones tienen un patrón lobulillar y consisten en áreas atelectásicas, deprimidas, firmes, de color rojo oscuro a rojo púrpura (Spickler, 2009; Janke, 2013, 2014). La distribución de estas lesiones generalmente es multifocal, con las áreas de lesión adyacentes y bien delimitadas respecto al tejido no afectado, tanto a nivel macro como microscópico, aunque eventualmente pueden ser coalescentes (Janke, 2013). Esta presentación multifocal da al pulmón afectado un aspecto conocido como “pulmón en tablero de ajedrez” (Caswell y Williams, 2016). Los lobulillos adyacentes al tejido afectado pueden verse pálidos y enfisematosos (Spickler, 2009; Caswell y Williams, 2016). Ocasionalmente, pueden observarse escasas bullas enfisematosas hemorrágicas distendiendo los espacios interlobulillares (Janke, 2013).

La extensión de la lesión varía de acuerdo con la gravedad de la infección (Janke, 2013; Janke, 2014). En las infecciones más leves, las lesiones se localizan en

craneoventral de los lóbulos pulmonares craneal y medio y, ocasionalmente, en las porciones craneoventrales de los lóbulos caudal y accesorio (Valheim y col., 2011; Janke 2014; Caswell y Williams, 2016). En algunos cerdos, las lesiones pueden aparecer en la región hilar. En las infecciones más severas o extensas, la mayoría o la totalidad de los lóbulos pulmonares craneal y medio y las porciones craneoventrales de los lóbulos caudales aparecen afectados (Janke, 2014).

En infecciones agudas graves a campo se ha informado la presencia de un pulmón difusamente congestivo con marcado edema interlobulillar (que pueden esconder la consolidación lobulillar craneoventral) y abundante cantidad de espuma en la tráquea y vías respiratorias mayores (bronquios) (Janke, 2014).

En casos no complicados, dos semanas después de la infección, el virus se elimina y el tejido pulmonar se recupera (Janke, 2013).

Generalmente, la mucosa de la tráquea y los bronquios está hiperémica y edematosa (Caswell y Williams, 2016). Los ganglios linfáticos traqueobronquiales y mediastínicos pueden estar aumentados de tamaño y edematosos (Spickler, 2009; Janke, 2013; Caswell y Williams, 2016).

Las lesiones macroscópicas también pueden presentar variaciones respecto a lo mencionado anteriormente. Algunas cepas de VIA producen lesiones más severas que otras (Spickler, 2009; Sreta y col., 2009; Trebbien y col., 2011). Además, la magnitud de las lesiones varía con la progresión de la enfermedad (Sreta y col., 2009; Brookes y col., 2010; Gauger y col., 2012) y, en los casos a campo, el desarrollo de bronconeumonía bacteriana secundaria puede complicar o enmascarar las lesiones macroscópicas típicas de influenza porcina (Janke, 2013; Caswell y Williams, 2016). Por otro lado, algunas cepas producen lesiones menos típicas, como congestión severa, edema y neumonía intersticial (Olsen, 2002; Lange y col., 2009; Janke, 2014; Casanova y col., 2017).

Finalmente, otros agentes infecciosos pueden producir lesiones pulmonares similares a las ocasionadas por los VIA. Los principales diagnósticos diferenciales de neumonía lobulillar en los cerdos incluyen las neumonías causadas por *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare* y por Circovirus porcino tipo 2 (CVP-2) (Valheim y col., 2011).

### **c. Lesiones microscópicas**

En las infecciones por VIA sin complicaciones o infecciones asociadas, la lesión microscópica característica de la fase aguda (1-3 dpi) que se presenta de manera constante es la bronquiolitis y la bronquitis necrotizante (Janke, 2013, 2014; Schaefer y col., 2013; López y Martinson, 2017). En menor medida, también puede presentarse

necrosis del epitelio alveolar (Janke, 2013; Caswell y Williams, 2016). Esta necrosis epitelial se produce como consecuencia de la replicación viral en el interior de las células del epitelio respiratorio (Janke, 2013, 2014; Schaefer y col., 2013; López y Martinson, 2017). Si bien la bronquitis y bronquiolitis necrotizante es la lesión histopatológica característica de VIA, si al momento de obtención de la muestra ya había transcurrido la fase aguda de la infección, puede no estar presente en el examen histológico de los pulmones (Gauger y col., 2012; Rajao y col., 2013).

Recientemente, se informó el hallazgo histopatológico de hiperplasia en las glándulas submucosas bronquiales, con reacción positiva a VIA H1N1 mediante IHQ (inmunohistoquímica), sugiriendo que el virus podría replicarse también en estas células (Olaniyi y col., 2020).

La neumonía broncointersticial es el resultado, por un lado, del proceso inflamatorio que se desencadena en respuesta a la necrosis de las células epiteliales de los bronquios y bronquiolos (Oldstone y col., 2013), y por el otro, de la proliferación de los neumocitos tipo II que surge luego del daño de las paredes alveolares y de la infiltración de células mononucleares en el intersticio, particularmente en relación con las vías aéreas (López y Martinson, 2017). Inicialmente, se observa el desprendimiento de las células epiteliales bronquiales y bronquiolares necróticas y la presencia de restos necróticos y neutrófilos en la luz de los bronquiolos (bronquitis y bronquiolitis neutrofílica) y, en menor medida, en los alvéolos (Gauger y col., 2012; Schaefer y col., 2013; Caswell y Williams, 2016). La obliteración de la luz de los bronquiolos que se produce como consecuencia de la acumulación de células y restos celulares causa atelectasia de las porciones del parénquima pulmonar distales a ese bronquiolo (Schaefer y col., 2013). Por otro lado, a medida que se desarrolla la respuesta inmune se observan agregados, leves a moderados, peribronquiolares, perivasculares e intersticiales de linfocitos y células plasmáticas en una intensidad variable entre cerdos (Valheim y col., 2011; Janke, 2013; Schaefer y col., 2013; Rajao y col., 2013; Caswell y Williams, 2016). También se produce la acumulación de macrófagos y neutrófilos en los septos alveolares y los alvéolos adyacentes.

La distribución multifocal de las lesiones se caracteriza histológicamente por variación en el grado de lesión de los lobulillos y la presencia de lobulillos no afectados adyacentes a otros severamente dañados, dentro de una misma sección histopatológica pulmonar. Lo anterior podría reflejar la distribución irregular del virus inhalado a través de las ramas del tracto respiratorio o la progresión de la infección hacia distal y proximal de las vías respiratorias a lo largo del tiempo (Janke, 2013, 2014).

En muestras de pulmones de cerdos infectados naturalmente se encontró asociación entre el hallazgo de bronconeumonía supurativa y bronquiolitis necrotizante y los

resultados positivos a VIA mediante IHQ y/o qRT-PCR. A su vez, el grado de lesiones en bronquios, bronquiolos y alvéolos fue mayor en los pulmones positivos a VIA que en los negativos (Cappuccio y col., 2017).

En casos subagudos el epitelio bronquiolar necrótico es reemplazado por nuevas células epiteliales mediante la hiperplasia del epitelio de las vías respiratorias (bronquitis y bronquiolitis epitelial proliferativa) que, en algunos casos, puede llevar a bronquiolitis obliterantes (Schaefer y col., 2013; Caswell y Williams, 2016). En esta fase, puede observarse al infiltrado linfocítico organizado en un patrón folicular (Schaefer y col., 2013).

Se considera que las lesiones causadas por el virus de la influenza se pueden ver hasta dos semanas después de la infección y que desaparecen por completo dos a tres semanas post infección (Brookes y col., 2010; Janke 2013; Schaefer y col., 2013). Sin embargo, experimentalmente ya a los 12 dpi no se encontraron lesiones histopatológicas de infección por VIA (Sreta y col., 2009).

El tipo y magnitud de las lesiones encontradas histopatológicamente varía según el momento de infección (Valheim y col., 2011; Gauger y col., 2012; Rajao y col., 2013) y/o la cepa viral involucrada (Sreta y col., 2009; Trebbien y col., 2011).

Por un lado, la presencia de neumonía intersticial y necrosis de las vías respiratorias no es exclusiva de las infecciones por VIA; lesiones similares pueden ser provocadas por otros agentes etiológicos, como VPR (virus de la Pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky), CVRP (coronavirus respiratorio porcino), paramixovirus y ciertas bacterias (Vincent y col., 1997; Rajao y col., 2013).

Por otro lado, en infecciones naturales a campo, puede ser frecuente la presencia de coinfecciones con uno o más patógenos (Valheim y col., 2011; Rajao y col., 2013). Cuando se compararon los resultados obtenidos mediante el hallazgo histopatológico de lesiones microscópicas características de infección por VIA con otras técnicas de diagnóstico sobre 85 casos de enfermedad respiratoria porcina, se observó un acuerdo del 74 % entre IHQ e histopatología, un acuerdo de 70 % entre histopatología y el AV (aislamiento viral) y un acuerdo de 63 % entre la histopatología y la IFA (inmunofluorescencia). Los resultados negativos por IHQ, IFA o AV encontrados en muestras de pulmón que tenían lesiones histopatológicas características de VIA, podrían deberse a la ausencia de VIA en el momento de recolección de las muestras, ya que la replicación viral en el pulmón precede en varias horas al desarrollo de lesiones, las cuales persisten varios días (Vincent y col., 1997). También podría tratarse de muestras de cerdos que se encontraban cursando la etapa de resolución de la enfermedad clínica. Finalmente, podrían ser lesiones ocasionadas por otros agentes (Vincent y col., 1997; Rajao y col., 2013). Por otro lado, los cerdos positivos

por IHQ, IFA o AV en los que no se observaron lesiones microscópicas características, podrían representar casos peragudos (Vincent y col., 1997).

También se ha informado que además del virus del Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP), una variante antigénica del VIA porcino puede producir neumonía necrótica y proliferativa (NNP), caracterizada por la presencia de células necróticas libres, material proteináceo, macrófagos grandes en la luz alveolar, proliferación de neumocitos tipo II y lesiones de bronquiolitis necrotizante. En algunos casos también se pueden encontrar membranas hialinas en los alvéolos, células gigantes multinucleadas y engrosamiento de los tabiques alveolares por la infiltración de células mononucleares (Larochelle y col., 1994).

Por último, se ha sugerido realizar la evaluación microscópica de los pulmones en forma rutinaria, aun cuando no se observen lesiones macroscópicas, ya que en infecciones naturales se observaron lesiones histopatológicas de necrosis bronquial y bronquiolar moderadas a severas en pulmones y áreas pulmonares sin lesiones macroscópicas (Valheim y col., 2011).

#### **D. MÉTODOS DE MONITOREO Y DIAGNÓSTICO DE VIA EN CERDOS**

La selección e implementación de métodos de diagnóstico de VIA debe realizarse considerando el comportamiento de la infección por influenza en los cerdos y la información que se desea recabar (Detmer y col., 2013).

Como se mencionó anteriormente, se considera que en general, uno o dos días después de la infección con VIA, los cerdos desarrollan fiebre y comienzan a excretar virus (Detmer y col., 2013; Janke, 2013). La excreción viral nasal máxima sigue muy de cerca el pico de la fiebre (principalmente entre 1 y 4–5 dpi), suele durar 24 a 72 h y luego disminuye rápidamente (Detmer y col., 2013; Janke, 2013). El estrecho intervalo de tiempo durante el cual se produce la excreción nasal de VIA en los cerdos plantea uno de los desafíos más importantes en el diagnóstico de la influenza porcina (Janke, 2013).

Los anticuerpos comienzan a detectarse en suero a partir de los 10 a 14 dpi (Detmer y col., 2013).

De este modo, se puede observar que existe un intervalo de tiempo después de la infección en la que el virus fue eliminado, clínicamente el cerdo no parece infectado y los anticuerpos aún no se han desarrollado (Detmer y col., 2013).

Imagen 1

Esquema general de la dinámica individual de infección por VIA en cerdos.

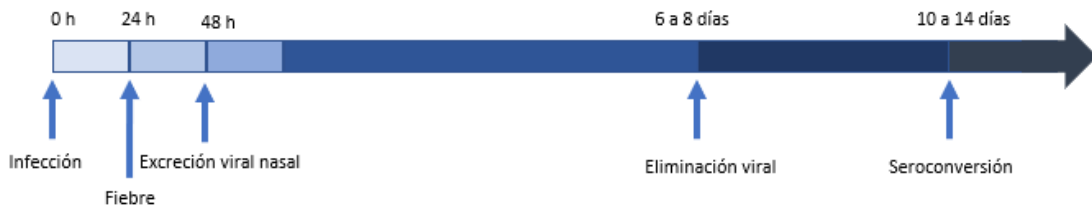


Imagen 1. Adaptado de Detmer y col. (2013).

Debido a que los hallazgos clínico-patológicos son presuntivos y no confirmatorios de la enfermedad, el diagnóstico definitivo de influenza requiere de análisis complementarios de laboratorio de las muestras recolectadas (Detmer y col., 2013).

Las pruebas de laboratorio complementarias comúnmente utilizadas para el diagnóstico de influenza A incluyen:

- pruebas para la detección de antígenos (proteínas) virales (IHQ, IFA),
- pruebas moleculares para la detección de material genético viral (RT-PCR),
- prueba para la detección de virus activo (aislamiento viral),
- pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos contra el virus (IH, ELISA).

#### a. Pruebas de diagnóstico que detectan antígenos virales

##### a.1. Inmunofluorescencia (IFA):

La inmunofluorescencia (IFA) se utiliza para detectar el antígeno de VIA en cortes congelados de pulmón, células epiteliales nasales o en lavados broncoalveolares empleando diferentes anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) (Spickler, 2009; Detmer y col., 2013). La prueba se puede completar en horas y, usando anticuerpos específicos, los VIA pueden subtipificarse (Haines y col., 1993; Sandbulte y col., 2015).

Si bien inicialmente se había demostrado que la IFA tenía una sensibilidad en la detección de VIA en muestras de cerdos comparable al aislamiento viral en huevos embrionados (Pensaert y col., 1986), en un estudio posterior, el AV fue más sensible que IFA directa empleando anticuerpos policlonales anti-VIA-P H1N1 en la detección de VIA-P. En el mismo estudio, la IHQ usando anticuerpos monoclonales contra la nucleoproteína viral presentó mayor sensibilidad que la IFA directa (Vincent y col., 1997).

Dentro de las limitaciones de la IFA se encuentran el breve tiempo después de la

infección durante el cual están presentes los antígenos de VIA en pulmón; la necesidad de contar con tejidos frescos con mínimos cambios autolíticos para los exámenes (la prueba es afectada por la autólisis); la extrema labilidad de la coloración, ya que la fluorescencia se desvanece rápidamente; la necesidad de contar con un microscopio ultravioleta y la imposibilidad de contrastar simultáneamente con las coloraciones convencionales utilizadas para la evaluación histológica, para estudiar los detalles morfológicos de los tejidos en asociación con la distribución del virus (Haines y col., 1993; Vincent y col., 1997).

#### a.2. Inmunohistoquímica (IHQ):

En la IHQ, se aprovecha la capacidad de los anticuerpos para unirse de manera específica con su antígeno. Mediante el empleo de anticuerpos específicos, la IHQ permite demostrar la presencia de antígenos de VIA en cortes histopatológicos (Haines y col., 1993; Vincent y col., 1997; Sreta y col., 2009; Watanabe y col., 2012; Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013; Olaniyi y col., 2020).

La IHQ es una técnica relativamente rápida, económica, fácil de realizar que puede llevarse a cabo en muestras de tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina (Haines y col., 1993; Vincent y col., 1997; Watanabe y col., 2012; Detmer y col., 2013; Olaniyi y col., 2020).

Como la formalina es el fijador utilizado de rutina para el examen histopatológico de los tejidos, se puede usar una misma muestra tanto para los estudios histopatológicos como para la IHQ. Además, la fijación de las muestras en formol permite que puedan ser transportadas para su procesamiento con un margen de tiempo mayor y sin la necesidad de mantener cadena de frío, lo que resulta especialmente útil en aquellos casos en que las granjas se encuentran a grandes distancias del laboratorio de diagnóstico. Por otro lado, si bien la fijación prolongada en formalina puede tener efectos adversos sobre la antigenicidad del tejido, el manejo rutinario de las muestras no parece tener efectos nocivos significativos (Haines y col., 1993). A su vez, una vez que los tejidos están incluidos en parafina, las muestras pueden examinarse después porque los antígenos que son detectados por este método han demostrado ser estables en parafina durante 10 años, lo que resulta útil para realizar estudios retrospectivos (Vincent y col., 1997; Haines y col., 1993). Además, las muestras fijadas en formalina son mucho más fáciles de trabajar que los materiales frescos o congelados (Watanabe y col., 2012).

Por otro lado, a diferencia del aislamiento viral, la IHQ no requiere la manipulación de virus activo, por lo que el proceso es más seguro (Watanabe y col., 2012). A su vez, en comparación con el aislamiento viral, la IHQ es más rápida y puede completarse en

uno o dos días (Haines y col., 1993; Schaefer y col., 2013). Sin embargo, al igual que con la IFA, los antígenos de VIA están presentes en el tejido pulmonar durante un corto tiempo después de la infección, lo que limita su capacidad de detección (Sandbulte y col., 2015).

Los inmunomarcajes producidos en la IHQ son más estables que los de la IFA. Además, en la IHQ los preparados pueden observarse con un microscopio óptico convencional y pueden ser contrastados con coloraciones convencionales como la hematoxilina. Esto permite identificar la ubicación del antígeno viral en las células infectadas y su asociación con las lesiones o detalles morfológicos de los tejidos (Haines y col., 1993; Vincent y col., 1997).

Con la IHQ, la presencia de antígenos virales puede demostrarse incluso cuando también hay neumonía bacteriana secundaria. Además, a través de la automatización de la técnica pueden procesarse grandes cantidades de muestras con relativamente poca mano de obra (Haines y col., 1993).

Se han empleado diferentes protocolos de IHQ basados en anticuerpos monoclonales y policlonales para la detección de VIA en muestras de pulmón de cerdos (Vincent y col., 1997; Jung y col., 2002; Janke, 2013; Olaniyi y col., 2020). Los anticuerpos anti-NP permiten detectar antígenos de VIA, independientemente del subtipo viral. En cambio, el empleo de anticuerpos anti-HA permite detectar subtipos de VIA específicos (Detmer y col., 2013). La NP puede detectarse en el núcleo y/o en el citoplasma de las células infectadas (Jung y col., 2002; Haines y col., 1993; Vincent et al. 1997, Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013), en tanto que el antígeno HA se ubica en el citoplasma y en la superficie de las células con infección viral (Detmer y col., 2013).

Mediante IHQ, los antígenos de VIA han sido detectados principalmente en las células epiteliales de los bronquios y bronquiolos, tanto unidas a la membrana basal epitelial como desprendidas, formando parte del exudado en la luz de las vías aéreas y en los macrófagos alveolares (Jung y col., 2002; Janke, 2013; Casanova y col., 2017). La tinción de macrófagos alveolares indica una fuerte captación de partículas virales, ya sea por fagocitosis directa del virus o por fagocitosis de células epiteliales infectadas (Jung y col., 2002; Sreta et al. 2009; Rajao y col., 2013; Casanova y col., 2017). Las diferencias entre cepas virales observadas mediante IHQ, especialmente en relación con la detección de antígeno viral en los macrófagos, podrían estar asociadas a las variaciones encontradas en la capacidad de obtener aislamientos virales infecciosos a partir de muestras del tracto respiratorio (Weingartl y col., 2010).

Con una frecuencia menor y variable según los autores, también se han detectado antígenos de VIA en los neumocitos tipo II de los tabiques alveolares y en los

macrófagos intersticiales (Vincent y col., 1997; Jung y col., 2002; Trebbien y col., 2011; Janke, 2013; Schaefer y col., 2013; Olaniyi y col., 2020). Además, se ha reportado la reacción positiva mediante IHQ en las células epiteliales de las glándulas bronquiales submucosas con cepas de VIA H1N1 (Sreta y col., 2009; Rajao y col., 2013; Olaniyi y col., 2020) y H3N2 (Cappuccio y col., 2017).

Las diferencias en los sitios, extensión y duración de la reacción a la IHQ podrían estar determinadas por las cepas virales involucradas en las infecciones y por el momento en el curso de infección en que se realiza la obtención de la muestra de pulmón (Weingartl y col., 2010; Trebbien y col., 2011; Capuccio y col., 2017).

Considerando la relación entre la detección de VIA por IHQ y los hallazgos histopatológicos, en infecciones naturales los casos positivos a VIA se asociaron positivamente con bronquiolitis necrotizante (93 %), atelectasia (85,2 %) y bronconeumonía purulenta (66,7 %), hiperemia (51,9 %) e hiperplasia de neumocitos tipo II (37 %). Las lesiones histológicas asociadas con menos frecuencia a IHQ positiva a VIA fueron pleuritis (11,1 %) y la hiperplasia del TLAB (tejido linfoide asociado a los bronquios) (7,4 %) (Watanabe y col., 2012).

En un estudio realizado por Vincent y col. (1997) a excepción de la histopatología, la IHQ con anticuerpos monoclonales contra la NP viral fue la técnica de diagnóstico que detectó la mayor proporción de muestras positivas a VIA, en comparación con la IFA (inmunofluorescencia directa empleando anticuerpos policlonales anti-SIV H1N1) y el AV (aislamiento viral en huevos embrionados). Se encontró un acuerdo del 74 % entre la IHQ e histopatología, del 78 % entre la IHQ y el AV y del 75 % entre la IHQ y IFA (Vincent y col., 1997).

Por el contrario, en muestras de cerdos con signos de infección respiratoria, a pesar de la presencia de lesiones histopatológicas de neumonía intersticial con bronquiolitis necrotizante características de VIA, en más de la mitad de los casos estudiados no se demostró inmunomarcación positiva para VIA. La mayoría de los casos donde la IHQ fue negativa, las principales lesiones histológicas observadas fueron sugerentes de lesión crónica (hiperplasia de neumocitos tipo II, estructuras similares a pólipos alveolares o bronquiolares, hiperplasia del TLAB y pleuritis) (Watanabe y col., 2012). De modo similar, en un estudio serológico e inmunohistoquímico realizado en Argentina, a pesar de la detección de anticuerpos contra VIA en cerdos de engorde y del hallazgo de lesiones pulmonares de bronquiolitis necrotizante en dos granjas estudiadas, la IHQ para VIA en estas muestras resultó negativa (Teodoroff y col. 2003).

En un estudio la sensibilidad de la IHQ fue similar al aislamiento viral en huevos embrionados y permitió la detección de casos clínica e histológicamente sospechosos a influenza que no habían sido identificados como positivos a VIA por aislamiento

(Haines y col., 1993). En muestras de cerdos infectados naturalmente, la IHQ fue más sensible que el aislamiento y, mientras que el VIA fue detectado por IHQ en el 93% de las muestras, el virus se aisló mediante cultivo celular en células MDCK sólo en el 33 % (Jung y col., 2002). A su vez, en muestras de cerdos infectados experimentalmente con VIA porcinos la IHQ con anticuerpos monoclonales específicos contra la NP y la RT-PCR fueron más sensibles que el aislamiento viral (Sreta y col., 2009).

En aquellos casos en los que se obtuvieron aislamientos de VIA de muestras de pulmones, pero no se detectó el antígeno viral mediante IHQ, se sospechó que las diferencias encontradas podrían deberse a variaciones entre las muestras procesadas con cada técnica dentro de un mismo caso debido a la distribución multifocal de las lesiones (Haines y col., 1993; Vincent y col., 1997) y al mayor volumen de muestra empleado y mayor sensibilidad del AV (Vincent y col., 1997).

En los tejidos en los que el antígeno es identificado por IHQ, pero de los cuales no logra aislarse el virus, uno de los factores que debe considerarse es el estado de conservación de la muestra. Generalmente las muestras para IHQ son recolectadas y fijadas en formalina poco después de la muerte o eutanasia del animal. En cambio, las muestras frescas obtenidas para AV y/o IFA pueden continuar autolizándose llegando al desprendimiento de las células epiteliales de las vías respiratorias o al deterioro de las proteínas virales (Vincent y col., 1997).

A diferencia de los estudios anteriores, Swenson y col. (2001) encontraron resultados contradictorios entre el AV y la IFA respecto a la IHQ, con pobre acuerdo y baja sensibilidad de la IHQ en relación con el AV y la IFA indirecta en cerdos infectados experimentalmente y eutanasiados el 5 dpi y consideraron que la fijación de las muestras en formalina durante más de 48 h usada en el estudio podría haber afectado los resultados de la IHQ.

En un estudio con cerdos infectados experimentalmente, la IHQ permitió la detección de VIA durante un intervalo postinfección mayor que la RT-PCR de hisopos nasales. El tiempo de detección del antígeno de VIA fue diferente de acuerdo con la cepa viral utilizada. En cerdos infectados con H1N1, la IHQ de muestras de pulmón permitió la detección de VIA en algunos animales hasta los 12 dpi, mientras que la RT-PCR para detección del material genético de VIA-P en los hisopos nasales fue positiva hasta los 4 dpi. En los cerdos infectados con VIA H3N2, la IHQ fue positiva hasta los 4 dpi en algunos animales y la RT-PCR de hisopos nasales fue positiva sólo a los 2 dpi (Sreta y col., 2009). Coincidentemente, en muestras de pulmón de brotes de enfermedad respiratoria, también se informó una mayor sensibilidad de la IHQ respecto a la qRT-PCR para la detección de VIA en muestras de pulmón (Rajao y col., 2013). Por el contrario, el examen por qRT-PCR de hisopos de la tráquea y un bronquio principal

detectó más cerdos infectados con el VIA que la IHQ de pulmón, tráquea y ganglio linfático traqueobronquial. En este último estudio, se consideró que la mayor sensibilidad observada mediante la qRT-PCR podría deberse al sitio de recolección de los hisopos, ya que en el tracto respiratorio superior (tráquea y un bronquio principal) drenarían y se acumularían células infectadas de todo el pulmón (Valheim y col., 2011).

La incapacidad para detectar el antígeno viral mediante IHQ en animales infectados por VIA, podría deberse al corto período de tiempo después de la infección durante el cual los antígenos son detectables en el pulmón (a veces, durante sólo 72 h después de la infección) (Watanabe y col., 2012) y/o a la labilidad del antígeno de VIA, el cual puede ser afectado, por ejemplo por la fijación prolongada en formalina que desnaturaliza los antígenos (Larochelle y col., 1994; Swenson y col., 2001; Jung y col., 2002; Watanabe y col., 2012).

Los antígenos de VIA podrían detectarse mejor por IHQ en la fase aguda de la enfermedad, durante las primeras horas o días de infección, mientras que, en la fase subaguda a crónica de la enfermedad, los resultados mediante IHQ generalmente son negativos ya que no hay suficiente antígeno viral para ser detectado por esta técnica (Watanabe y col., 2012; Schaefer y col., 2013). Para lograr mejores resultados, el tejido pulmonar debe recogerse al inicio de la aparición de signos clínicos y fijarse con formalina tamponada al 10% (Haines y col., 1993).

Sin embargo, si bien la detección de VIA mediante IHQ se asocia generalmente con la fase aguda de la enfermedad, la extensión de la detección de VIA mediante IHQ fue diferente de acuerdo con la cepa viral involucrada (Sreta y col., 2009). Generalmente, la detección se produce entre 1 a 5-7 dpi (Kitikoon y col., 2006; Weingartl y col., 2010; Gauger y col., 2012; Schaefer y col., 2013). Sin embargo, se ha observado inmunomarcaje de escasas células infectadas hasta 12 (Sreta y col., 2009) y 13 dpi (Weingartl y col., 2010). En cerdos infectados experimentalmente con VIA H1N1, no se detectó antígeno viral en ningún cerdo a los 21 dpi (Kitikoon y col., 2006; Gauger y col., 2012).

Cuando se comparan los hallazgos obtenidos de muestras de pulmón procesadas por diferentes técnicas, debe tenerse en cuenta que la distribución multifocal de las lesiones puede dar lugar a variaciones en los hallazgos entre muestras de un mismo caso, influir en la detección o no del VIA y contribuir a resultados discordantes entre las técnicas estudiadas, lo que enfatiza la necesidad de examinar múltiples muestras de tejido de cada caso (Haines y col., 1993; Vincent y col., 1997; Swenson y col., 2001, Brookes y col., 2010).

b. **Pruebas de diagnóstico que detectan ácido nucleico viral: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT- PCR):**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction) fue descrita por primera vez en 1985 (Detmer y col., 2013). Consiste en la amplificación enzimática in vitro de un segmento específico de ADN (ácido desoxirribonucleico). El nuevo ADN copiado en un ciclo sirve como molde para el ciclo siguiente de amplificación, por lo que el número de copias del segmento de ADN específico se incrementa en forma exponencial a través de ciclos sucesivos de copiado por la acción de la enzima ADN polimerasa. De este modo, la sensibilidad diagnóstica de la PCR es muy alta (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013).

En el caso de los agentes infecciosos cuyo material genético es ARN, como sucede con los VIA, la PCR requiere un paso enzimático previo, donde a través de la acción de una enzima transcriptasa reversa, el ARN es transcrito a una molécula de ADN complementario (ADNc). Este ADNc luego es usado como molde en la reacción de PCR. Por este motivo, el ensayo se denomina RT-PCR (del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (Detmer y col., 2013).

La RT-PCR convencional es una técnica cualitativa donde los segmentos de ADN obtenidos se asocian a un marcador fluorescente y se corren por electroforesis en un gel, que luego es observado mediante un transiluminador. Los resultados pueden obtenerse dentro de las 18 horas (Schaefer y col., 2013).

En 1992 surgió la PCR en tiempo real (qRT-PCR) (Higuchi et al. 1992), la cual posibilita la visualización de la detección del ARN a medida que el ácido nucleico viral se amplifica ("en tiempo real"). Esto permite obtener resultados más rápidos (aproximadamente en dos horas) y evita la manipulación posterior del material genético amplificado, disminuyendo los riesgos de contaminación. Además, la qRT-PCR permite cuantificar la carga viral en la muestra (Schaefer y col., 2013).

Si bien el aislamiento viral sigue siendo la prueba estándar de oro para los VIA, la RT-PCR y qRT-PCR son técnicas precisas, rápidas y sensibles que se pueden usar para analizar una gran cantidad y variedad de muestras en relativamente poco tiempo (Detmer y col., 2013). Sin embargo, la principal desventaja de las técnicas de biología molecular es que detectan la presencia de ARN viral pero no determinan si el virus es viable o no (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013).

Además de que la RT-PCR y qRT-PCR permiten establecer si una muestra es positiva/negativa para la presencia de ARN de VIA, también se pueden emplear para determinar el subtipo viral presente (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015). A su vez, a través de la RT-PCR se pueden secuenciar los

segmentos genéticos de los VIA los cuales luego pueden ser examinados y comparados con otras secuencias para conocer las relaciones evolutivas y geográficas de los virus de influenza a lo largo del tiempo (Detmer y col., 2013).

Para llevar a cabo las reacciones de PCR y RT-PCR, es necesario purificar previamente el material genético de las muestras que se desea analizar. Técnicamente, el proceso se denomina “extracción o purificación de ADN o ARN” y consiste en la liberación inicial del ácido nucleico del interior de las células u organismos en la muestra por lisis, la separación del material genético del resto de elementos de la muestra y su purificación (Thatcher, 2015).

Para la extracción pueden emplearse diferentes técnicas, como la extracción líquido-líquido o extracción orgánica y la extracción líquido-sólido o extracción en fase sólida (Thatcher, 2015).

En la extracción orgánica los ácidos nucleicos se separan de otras moléculas (lípidos, proteínas) por solubilidad diferencial en líquidos inmiscibles. La técnica desarrollada inicialmente utilizaba fenol mezclado con cloroformo y alcohol isoamílico. El fenol desnaturaliza las proteínas, que permanecen en la fase orgánica, mientras que los ácidos nucleicos están en la fase acuosa. Luego el ácido nucleico en la fase acuosa se precipita con etanol para eliminar el fenol residual y obtener un producto limpio y concentrado (Steward y Culley, 2010; Thatcher, 2015). Posteriormente, se desarrolló un procedimiento de extracción orgánica modificado que emplea una mezcla de fenol y tiocianato de guanidina para la extracción y recuperación de ARN, ADN y proteínas de la misma muestra a partir de una amplia variedad de tejidos (Chomczynski y Sacchi., 1987; 2006). En condiciones ácidas, el ARN total permanece en la fase acuosa superior, mientras que el ADN y la proteína se reparten en la interfase o en la fase orgánica inferior. Para recuperar el ARN, se extrae la fase acuosa y se lo precipita mediante la adición de isopropanol (Chomczynski y Sachi, 2006). La mezcla de reactivos para la extracción orgánica puede adquirirse comercialmente (TRIzol™ y TRIzol LS™, Invitrogen™; TRI Reagent®, Molecular Research Center, inc, entre otros) (Steward y Culley, 2010).

Por otra parte, los métodos de extracción en fase sólida aprovechan la unión selectiva de los ácidos nucleicos a la sílica en condiciones de alta concentración de sal y bajo pH. El material genético queda unido y otras sustancias (como lípidos y proteínas) que no se adhieren a la sílica son removidas por enjuagues sucesivos. Posteriormente, se realiza la elución y recuperación de los ácidos nucleicos a baja concentración de sales. Este fenómeno es la base de una amplia variedad de kits comerciales de extracción que utilizan una membrana impregnada de sílica (Steward y Culley, 2010; Thatcher, 2015).

Más recientemente se han desarrollado kits comerciales de extracción que utilizan perlas magnéticas, especialmente útiles para muestras de líquidos con baja concentración de material genético o que contienen inhibidores de la PCR (Detmer y col., 2013).

Se considera que los procedimientos de extracción orgánica producen ARN de alta calidad a partir de diferentes tipos de muestras, incluidos tejidos frescos y fijados en formol e incluidos en parafina y fluidos corporales. Sin embargo, son laboriosos, deben realizarse en una campana extractora y generan desechos químicos peligrosos (Detmer y col., 2013; Thatcher, 2015).

Por su parte, los métodos de extracción en fase sólida se han convertido en uno de los métodos más comunes de extracción y purificación de ácidos nucleicos debido a que incluyen relativamente pocos productos químicos peligrosos, requieren menor manipulación manual (lo que reduce en gran medida la posibilidad de contaminación), son rápidos de realizar, son más sensibles y tienen capacidad de automatización (Steward y Culley, 2010; Detmer y col., 2013; Dimitrov y col., 2014; Singh y col., 2015; Thatcher, 2015).

En muestras de sangre y tejidos porcinos procesadas para la detección de ARN de VPPC (virus de la Peste Porcina Clásica) mediante qRT-PCR y/o RT-PCR, la extracción orgánica con TRIzol LS™ (Invitrogen™) y TRI® reagent (Sigma-Aldrich) obtuvo constantemente el mayor rendimiento de ARN (Deng y col., 2005; Singh y col., 2015). En un estudio donde se evaluaron seis métodos de extracción de ARN en muestras de sangre y tejidos para detección de ARN del VPPC, todos los kits de extracción permitieron recuperar suficiente ARN para obtener resultados positivos mediante qRT-PCR, y todo el ARN, excepto el extraído de la sangre con el reactivo TRIzol LS™, arrojó también resultados positivos para VPPC por RT-PCR convencional (Deng y col., 2005). Recientemente, Nirmala y col. (2021) lograron detectar ARN de VIA y VSRRP (Virus del Síndrome respiratorio reproductivo porcino) en muestras de filtros de aire de granjas de cerdos mediante qRT-PCR con el uso de TRIzol LS™, en comparación con la extracción con MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), que usa la tecnología de perlas magnéticas. En muestras de líquido alantoideo de huevos de gallina embrionados infectados con virus de la enfermedad de Newcastle, hubo una diferencia significativa en los valores de Ct entre TRIzol LS™ y el kit Qiagen® RNeasy Mini Kit en comparación con el kit de aislamiento de ARN viral MagMAX™ pero no hubo diferencia significativa en la sensibilidad entre Qiagen® RNeasy Mini Kit y TRIzol LS™ (Dimitrov y col., 2014).

Los kits de extracción de fase sólida parecen tener ventajas respecto a los métodos orgánicos en la pureza del ARN obtenido (relación A260/A280), la menor

contaminación con ADN genómico y menor concentración de sustancias inhibitoras, las cuales pueden tener efectos en el resultado final de la RT-PCR (Deng y col., 2005; Singh y col., 2015). En muestras de sangre y tejidos porcinos procesadas para la detección de ARN de VPPC mediante qRT-PCR y RT-PCR, la extracción con TRIzol LS™ (Invitrogen™) obtuvo constantemente el mayor rendimiento de ARN, mientras que el kit RNAqueous™ (Ambion™) presentó la mayor relación A260/A280 para la mayoría de las muestras y con los kits NucleoSpin® RNA II (BD Biosciences) y GenElute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) el ARN obtenido tenía probablemente menor contaminación con ADN genómico (Deng y col., 2005). En muestras de tejido de cerdos, la extracción de ARN para detección de VPPC con TRI® reagent (Sigma-Aldrich) produjo el mayor rendimiento de ARN, mientras que la pureza media del ARN (A260 / A280) fue superior empleando el kit de membrana RNeasy® mini kit (Qiagen®). Sin embargo, según el rendimiento de la amplificación por RT-PCR, el ARN que se extrajo con High pure RNA tissue kit (Roche) produjo los mejores resultados, mostrando las mayores intensidades de amplificación en la RT-PCR en todos los grupos de muestras, lo que indicaría pureza del ARN y un nivel reducido de inhibidores de PCR (Singh y col., 2015).

En el mercado hay disponibles diferentes técnicas y kit comerciales para la extracción de material genético (Detmer y col., 2013; Thatcher, 2015). La selección del método más apropiado depende del tipo de muestra, del tipo de material genético que se desea extraer (ADN o ARN) y de la pureza del ácido nucleico requerida (Steward y Culley, 2010; Detmer y col., 2013).

Si bien la PCR y RT-PCR son técnicas altamente sensibles, pueden presentarse resultados falsos negativos como consecuencia de mutaciones en el ácido nucleico viral, degradación del material genético viral en las muestras clínicas y/o presencia de compuestos que afectan la reacción de PCR o RT-PCR, conocidos como inhibidores de PCR (Chittick, 2012).

Los inhibidores de la PCR son sustancias que afectan las reacciones enzimáticas de la PCR y RT-PCR, impidiendo que estos ensayos alcancen su potencial de amplificación y que el producto final obtenido sea proporcional a la cantidad inicial de ADN o ARN en la muestra (Chittick, 2012). Las sustancias inhibitoras de la PCR a menudo consisten en elementos propios de la muestra que no logran ser removidos o neutralizados durante el proceso de extracción. Cada tipo de muestra tiene inhibidores endógenos únicos, lo que se conoce como el "efecto de muestra" (Chittick, 2012; Thatcher, 2015). En el caso particular de las muestras de fluido oral porcino, aunque no se conoce con exactitud el tipo y origen de los inhibidores de la PCR presentes, estas sustancias podrían representar un peligro importante para la sensibilidad de la

técnica, ya que se trata de una matriz donde se encuentran restos de saliva, heces y alimento, entre otras sustancias, y cada una de ellas tiene sus propias sustancias inhibidoras de la PCR (Chittick, 2012).

El control de las sustancias inhibidoras es un prerrequisito para lograr una PCR o RT-PCR eficaz. Algunas de estas sustancias son removidas durante el proceso de extracción de ARN. Sin embargo, luego de la extracción aún pueden quedar restos de sustancias inhibidoras e incluso, algunas pueden llegar concentrarse durante la extracción por coprecipitación con los ácidos nucleicos (Chittick, 2012). En un estudio realizado con muestras de sangre para la detección de VPPC mediante qRT-PCR en cerdos infectados experimentalmente, ninguno de los ocho kits comerciales de extracción de ARN, seis de los cuales estaban basados en columnas de sílica y 2 eran kits basados en perlas magnéticas, pudo eliminar completamente los inhibidores de la PCR de la sangre (Das y col., 2011). Por estos motivos, se ha sugerido diluir el producto final de la extracción (templado) antes de realizar la RT-PCR (Deng y col., 2005; Chittick, 2012). El ARN extraído a partir de muestras de sangre con TRIzol LS™ sólo resultó positivo en la RT-PCR para detección del VPPC cuando se diluyó a concentraciones de 1: 2, 1: 4 o hasta 1:64 en agua libre de nucleasas, indicando que la solución de ARN original contenía sustancias inhibidoras de la RT-PCR (Deng y col., 2005). Para los templados obtenidos de cada tipo de muestra, debe determinarse el nivel de dilución apropiado, buscando el equilibrio óptimo entre la dilución del templado y la dilución de los inhibidores (Chittick, 2012).

Por otro lado, debido a que la causa más común de inhibición general de la RT-PCR sería la inhibición de las enzimas ADN polimerasa y retrotranscriptasa, se ha sugerido incrementar la concentración de las enzimas empleadas en dicha reacción para superar los efectos de las sustancias inhibidoras. En un estudio con muestras de fluido oral para detección de ARN de VSRRP, la extracción de un volumen mayor de muestra junto con un incremento de los volúmenes de los reactivos de purificación de ARN en la extracción, seguida de un aumento de la concentración de enzima en la RT-PCR mejoró significativamente la detección de VSRRP (Chittick, W. 2012).

Además, las diferencias en la resistencia al efecto de los inhibidores de las diferentes ADN polimerasas empleadas serían responsables de las variaciones en los resultados obtenidos luego de la qRT-PCR y RT-PCR (Deng y col., 2005).

La detección del material genético (ARN) de VIA mediante RT-PCR y qRT-PCR puede realizarse a partir de diferentes muestras, recolectadas en animales vivos y/o cadáveres, como: secreción nasal, secreción traquebronquial, cortes de pulmón, fluido oral, etc. (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015).

### b.1. Hisopos nasales

El tipo de muestra empleada más frecuentemente para el diagnóstico *ante mortem* de VIA, ha sido la muestra de secreción nasal obtenida mediante el empleo de hisopos nasales de individuos con infección aguda (Detmer y col., 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

El hisopo es introducido y rotado suavemente dentro de cada una de las fosas nasales para recoger las secreciones y el epitelio superficial de la mucosa de las fosas. La maniobra debe realizarse con cierto cuidado ya que, si el hisopo se introduce a demasiada profundidad o la rotación es demasiado agresiva puede producir sangrado. Además de la lesión provocada a los cerdos, la sangre puede interferir con las pruebas de detección de VIA (Sandbulte y col., 2015).

Las muestras de secreción nasal permiten detectar la excreción nasal de VIA que tiene lugar durante la fase aguda de la infección o período febril de la enfermedad, principalmente entre 1 y 4–5 dpi (Janke, 2013). El acotado tiempo de detección plantea uno de los desafíos más importantes en el diagnóstico de VIA en este tipo de muestras (Janke, 2013; Van Reeth y Vincent, 2019).

A su vez, el tiempo de detección del ARN de los VIA en muestras de secreción nasal varía entre estudios, con intervalos de detección de hasta 2, 4 (Sreta y col., 2009), 6 (Decorte y col., 2015), 7 (Van Reeth y Vincent, 2019), 9 (Weingartl y col., 2010, Loeffen y col., 2011) o 14 dpi (Loeffen y col., 2011). Esto podría estar asociado a diferencias en la duración del período de excreción entre cepas virales de influenza (Sreta y col., 2009). Sin embargo, también se han observado diferencias entre animales infectados con la misma cepa, aun entre cerdos sin inmunidad previa contra VIA (Brookes y col., 2010). Finalmente, también podría estar vinculado con variaciones en las capacidades técnicas de los diferentes grupos de investigación para detectar el ARN de VIA en las muestras analizadas (Baudon y col., 2017).

Además, incluso en animales infectados experimentalmente, la detección de ARN viral mediante qRT-PCR de muestras de secreción nasal puede ser intermitente, con algún día sin detección, precedido y seguido por detecciones (Vincent y col., 2010; Loeffen y col., 2011).

También la inmunidad de los cerdos al momento de la infección influye en los niveles de detección de VIA en muestras de secreción nasal. En cerdos con inmunidad previa por vacunación la excreción viral es de menor magnitud y duración que en cerdos sin vacunación y se observan diferencias entre los animales vacunados según el nivel de inmunidad alcanzado (Romagosa y col., 2012).

Un estudio permitió determinar que la qRT-PCR en muestras de hisopos nasales procesadas en grupos era altamente específica (100 %) y la sensibilidad oscilaba entre

el 88 % y el 100 %, en comparación con el aislamiento viral de muestras individuales de hisopos nasales (Landolt y col., 2005).

En otra investigación, la tasa de detección de VIA mediante qRT-PCR de muestras de secreción nasal fue de 13,2 %, lo que correspondió a 43 % de corrales con al menos un animal positivo en un día de recolección determinado (Romagosa y col., 2012).

En un estudio transversal en lechones de maternidad, usando un tamaño de muestra de 60, las tasas de detección de ARN de VIA en muestras de secreción nasal variaron según la edad de los cerdos y la presencia o no de manifestaciones clínicas. En cerdos <14 ddv VIA las tasas de detección fueron del 2 % y 0 % en el primer y segundo evento de muestreo, respectivamente. En lechones de 14 a 26 ddv las tasas de detección fueron del 10 %, 7 % y 0 % en el primer, segundo y tercer evento de muestreo, respectivamente (Allerson y col., 2014). A partir de muestras de secreción nasal recolectadas de lechones próximos al destete (17 a 24 ddv) VIA se detectó en el 25 % (75/305) de los eventos de muestreo y las probabilidades de que los grupos de cerdos dieran positivo fueron significativamente menores en aquellas granjas donde se aplicaba vacunación contra VIA (16 %) en comparación con aquellas donde no se realizaba vacunación (40 %) (Chamba Pardo y col., 2020).

Mediante muestras de secreción nasal obtenidas de cerdos de cuatro lotes de cada una de tres granjas con infección endémica por VIA a los 7, 21, 35 y 70-84 ddv, se observaron diferencias en las tasas de detección totales y por edades encontradas en cada granja, así como también en las tasas de detección en los distintos momentos de muestreo entre diferentes lotes dentro de una misma granja. En las tres granjas, de los 16 grupos de 5 muestras de secreción nasal resultaron positivos para VIA el 25 %, 20 y 50 % a los 7 ddv; el 50 %, 33 % y 37,5 % a los 21 ddv; el 18,7 %, 46,7 % y 62,5 % a los 35 ddv, respectivamente, mientras que a los 70-84 ddv solo fue positivo un grupo de hisopos nasales (6,6 %) de una granja (granja 2). El porcentaje de grupos de hisopos nasales positivos a VIA por granja fue de 69 %, 80 % y 87,5 %. Además, en la granja 1 el valor promedio de Ct de las muestras positivas aumentó con la edad. Por el contrario, en las otras dos granjas, a los 35 ddv, coincidentemente con el pico de individuos infectados, se detectaron los valores medios de Ct más bajos (Ryt-Hansen y col., 2019).

En otro estudio, el ARN de VIA se detectó en muestras de secreción nasal de cerdos de 4 hasta 30 a 32 semanas de edad. La edad promedio en los grupos positivos fue de  $12,4 \pm 5,2$  semanas y en los grupos negativos fue de  $13,9 \pm 5,8$  semanas. Sin embargo, la edad no fue un predictor estadísticamente significativo del resultado para VIA en las muestras de secreción nasal. El número de grupos positivos por granja osciló entre 1 y 18 con un promedio de 31% (Corzo y col., 2013b).

Al tratarse de muestras obtenidas a partir de cerdos individuales, cuando la prevalencia de la enfermedad dentro de las granjas es baja, es necesario recolectar y procesar un número elevado de muestras. Esto puede representar una limitación técnica y económica, restringiendo la realización de programas de vigilancia sanitaria dentro de las granjas (Romagosa y col., 2012; Detmer y col., 2013; Garrido-Mantilla y col., 2019).

### b.2. Hisopos orofaríngeos

Los hisopos orofaríngeos son una alternativa a los hisopos nasales. Se recolectan introduciendo un hisopo desde la cavidad oral hasta la faringe de los lechones (Garrido-Mantilla y col., 2019).

Empleando hisopos orofaríngeos el ARN de VIA se detectó 10 (Loeffen y col., 2011) a 11 dpi. En este último caso, en algunos animales la detección fue intermitente (Lange y col., 2009). Por otro lado, a través de un estudio experimental con cepas de VIA H1N1 pdm 2009 se ha reportado el mismo intervalo de detección entre hisopos orofaríngeos e hisopos nasales, pero con niveles de detección de VIA menores con los hisopos orofaríngeos que con las muestras de secreción nasal (Weingartl y col., 2010).

En cerdos vacunados con una vacuna comercial e infectados experimentalmente la detección de ARN viral mediante hisopos orofaríngeos fue afectada significativamente, con un nivel e intervalo de detección menor que en animales no vacunados, mientras que en muestras de secreción nasal la tendencia de la vacunación a afectar la detección viral fue menor y no significativa (Loeffen y col., 2011).

Recientemente, al evaluar diferentes estrategias para el monitoreo de VIA en lechones predestete de granjas porcinas, la proporción de muestras positivas a qRT-PCR fue mayor para los hisopos orofaríngeos en comparación con los hisopos o toallitas nasales, con tasas de detección de 78 %, 55 % y 53 %, respectivamente. La concordancia entre hisopos orofaríngeos e hisopos nasales fue moderada (K= 0,597) (Garrido-Mantilla y col., 2019).

Si bien son más fáciles de obtener, especialmente en lechones, al igual que con los hisopos nasales, una de las limitaciones de las muestras de hisopos orofaríngeos es la necesidad de recolectar muestras individuales, lo que implica la manipulación de los cerdos y el procesamiento de un número elevado de muestras, especialmente si la prevalencia esperada en la granja es baja (Garrido-Mantilla y col., 2019).

### b.3. Fluido oral con cuerda

Las muestras de fluido oral están constituidas por saliva y otros componentes de origen no salival, como trasudación de la mucosa oral y de plasma, componentes inflamatorios, anticuerpos, secreciones bronquiales y nasales, bacterias y virus y

células epiteliales (Romagosa y col., 2012; Detmer y col., 2013; Hernandez-Garcia y col., 2017). También contienen otros materiales como restos de alimento, contaminación ambiental y heces. Resulta una muestra muy interesante para el diagnóstico, ya que, en determinadas circunstancias, se pueden detectar anticuerpos y/o patógenos producidos localmente o derivados del sistema circulatorio (Prickett y Zimmerman, 2010). Sin embargo, la diversidad de su composición, si bien amplía su alcance para la detección de agentes infecciosos, implica algunos desafíos en su procesamiento de laboratorio (Hernandez-Garcia y col., 2017).

Prickett y col. (2008) describieron un método para recolectar de manera eficiente muestras de fluidos orales de cerdos en corrales usando cuerdas de algodón. La técnica descrita consiste en atar las cuerdas en el corral, a la altura del hombro (articulación escapulohumeral) de los cerdos, en un área limpia y lejos del alimento y el agua. Se permite que los cerdos mastiquen la cuerda durante aproximadamente 30 minutos para que depositen el fluido oral en ella. Luego, el fluido se extrae exprimiendo la cuerda en una bolsa de recolección. Posteriormente, el líquido obtenido es colocado en tubos de transporte para su remisión al laboratorio.

Si bien el algodón ha demostrado ser el material que absorbe el mayor volumen de fluido oral, también se han empleado exitosamente cuerdas de poliéster (Decorte y col., 2015).

Los porcinos investigan y mastican naturalmente los objetos nuevos introducidos en los corrales (Prickett y col., 2008). La obtención de muestras de fluidos orales mediante el empleo de cuerdas aprovecha ese comportamiento exploratorio natural de los cerdos, quienes, al interactuar y jugar con la soga, la muerden y humedecen con los fluidos orales (Prickett y col., 2008; Romagosa y col., 2012; Decorte y col., 2015). Además, tiene la ventaja adicional de mantener la bioseguridad dentro de las granjas, ya que puede ser recolectada por personal del criadero capacitado previamente, eliminando el riesgo de trasladar virus entre sitios y entre granjas durante el proceso de recolección de muestras (Prickett y col. 2008; Detmer y col., 2011; Ramirez y col., 2012).

Si bien las muestras de fluido oral se pueden recolectar en base a un animal individual (Goodell y col., 2013), generalmente se permite que todos los cerdos del corral accedan a las cuerdas suspendidas, por lo que representan la situación del grupo de animales (Prickett y col. 2008; Romagosa y col., 2012; Goodell y col., 2013; Decorte y col., 2015; Garrido-Mantilla y col., 2019).

En algunos países, los fluidos orales se han convertido en un método popular para el monitoreo sanitario en los cerdos, ya que permiten la detección de anticuerpos y ácidos nucleicos de patógenos importantes en la producción porcina (Prickett y col.

2008; Prickett y Zimmerman, 2010; Ramirez y col., 2012; Detmer y col., 2013; Strutzberg-ftinder y col., 2015).

Se han empleado con éxito para la detección de VIA por qRT-PCR (Detmer y col., 2011; Ramirez y col., 2012; Romagosa y col., 2012; Goodell col., 2013; Panyasing col., 2016; Decorte y col., 2015; Hernandez-Garcia y col., 2017; Garrido-Mantilla y col., 2019), la detección de anticuerpos anti-VIA mediante ELISA comercial (Panyasing y col., 2013, 2016; Hughes y col., 2015; Strutzberg-ftinder y col., 2015) y la subtipificación y secuenciación mediante qRT-PCR (Detmer y col., 2011; Goodell y col., 2013; Panyasing y col., 2016; Garrido-Mantilla y col., 2019).

El primer reporte de detección de VIA en fluido oral fue en cerdos sin inmunidad previa contra influenza y con infección aguda experimental. El VIA pudo detectarse mediante qRT-PCR de fluidos orales en el 94 % (15/16) de las muestras recolectadas entre los 3-6 dpi, mientras el porcentaje de detección por aislamiento viral y qRT-PCR de muestras de secreción nasal a los 3 y 7 dpi fue del 71 % (34/48) (Detmer y col., 2011).

Posteriormente, al evaluar la sensibilidad de la qRT-PCR para la detección de VIA en cerdos vacunados y no vacunados, si bien la detección de VIA mediante qRT-PCR de hisopos nasales fue superior que mediante qRT-PCR de muestras de fluidos orales, el uso de fluidos orales demostró ser un método sensible para detectar VIA, incluso cuando la prevalencia dentro del corral fue baja y cuando los cerdos habían sido vacunados previo a la infección experimental. La sensibilidad general de los fluidos orales fue del 80 %, pero varió entre el 99% cuando la prevalencia dentro del corral era superior al 18 % y disminuyó a 69 % cuando la prevalencia dentro del corral era del 9 %. La especificidad de los fluidos orales fue del 100 %. La concordancia general entre los fluidos orales y los hisopos nasales en la detección de ARN viral fue excelente (Coeficiente Kappa  $K = 0,82$ ). Sin embargo, varió entre los diferentes tratamientos. La mayor concordancia se produjo en el grupo de cerdos control, no vacunados y desafiados con VIA ( $K = 1$ ). En los animales que recibieron vacunación homóloga antes del desafío la concordancia fue muy buena ( $K = 0,76$ ) mientras que la concordancia más baja se observó en el grupo de animales que habían recibido una vacuna comercial heteróloga previo al desafío ( $K = 0,74$ ), aunque las diferencias entre estos dos últimos grupos no fueron significativas. La menor concordancia en la detección de VIA entre los fluidos orales e hisopos nasales ocurrió cuando la prevalencia dentro del corral fue del 10 % o menos, es decir, la mayoría de los fluidos orales negativos fueron aquellos recolectados en los corrales de animales vacunados cuando sólo se detectó un cerdo positivo mediante hisopo nasal (Romagosa y col., 2012).

Contrariamente, en otro estudio donde se recolectaron muestras de secreción nasal individuales y de fluido oral de corrales hasta 16 dpi en cerdos sin vacunar y cerdos vacunados con la misma vacuna comercial multivalente que Romagosa y col. (2012), e inoculados con VIA H1N1 o H3N2, la probabilidad de detectar una muestra positiva a VIA mediante qRT-PCR fue mayor con las muestras de fluido oral que con las muestras individuales de secreción nasal para la mayoría de los dpi (Goodell y col., 2013). Al igual que en el trabajo de Romagosa y col. (2012), la probabilidad de detectar una muestra de fluido oral positiva a VIA mediante qRT-PCR, en relación con el total de muestras recolectadas, aumentó a medida que aumentaba el número de cerdos con hisopo nasal positivo dentro del corral. Así, la tasa de detección en fluidos orales fue mayor al 70 % cuando en el corral había un cerdo positivo a VIA por qRT-PCR de secreción nasal, mayor al 90 % con dos cerdos positivos y entre 98-100 % cuando en el corral 3 o más cerdos fueron positivos, e incluso, más del 30 % de las muestras de fluido oral recolectadas fueron positivas aun cuando no se detectó ningún cerdo con hisopo nasal positivo (Goodell y col., 2013). Sin embargo, un aspecto que debe tenerse en cuenta al considerar estos resultados es el bajo número de cerdos alojados por corral (3-4 cerdos por corral).

La vacunación y el aumento de los dpi redujeron significativamente la probabilidad de detección de VIA, tanto en fluido oral como en secreción nasal (Goodell y col., 2013). En los animales no vacunados, la probabilidad de detectar VIA fue similar entre las muestras de fluido oral y secreción nasal hasta los 6 dpi y luego, fue mayor en los fluidos orales hasta el 16 dpi. En cambio, a diferencia de lo observado por Romagosa y col., (2012), en los animales vacunados, la tasa de detección de VIA (muestras positivas/muestras recolectadas) fue mayor en los fluidos orales que en las muestras de secreción nasal, incluso en los primeros dpi. Por ejemplo, en animales vacunados, la probabilidad de detección de una muestra positiva a VIA por qRT-PCR 1 dpi fue del 70 % para los fluidos orales de corrales y del 11 % para los hisopos nasales, mientras que, en los animales sin vacunar, el mismo día, la probabilidad de detectar una muestra positiva a VIA fue del 98 % para los fluidos orales y 88 % para las muestras de secreción nasal (Goodell y col., 2013).

En cerdos alojados individualmente e infectados secuencialmente con VIA H1N1 y H3N2, llamativamente el ARN de VIA se detectó hasta al menos 21 dpi en el 25 % de las muestras de fluidos orales, mientras que todos los hisopos nasales se volvieron negativos a los 7 dpi. Entre 1 y 3 dpi con la cepa H1N1, todas las muestras de hisopado nasal y de fluidos orales fueron positivas para VIA mediante qRT-PCR. Sin embargo, a los 5 y 7 dpi significativamente más muestras de fluidos orales fueron positivas para VIA H1N1 que las muestras de hisopos nasales. A los 5 dpi, fueron positivas solo 10 % de

los hisopos nasales contra el 80 % de muestras de fluidos orales. De 7 a 21 dpi, ninguna de las muestras de hisopos nasales fue positiva, mientras que el 100 %, 50 %, 43 % y 25 % de las muestras de fluido oral fueron positivas a los 7, 10, 14 y 21 dpi, respectivamente. Luego de la inoculación con una cepa H3N2, 21 días después de la infección por H1N1, el ARN viral se detectó en el 80 % de los hisopos nasales recolectados entre 1-3 dpi y en el 20 % de los hisopos nasales recolectados a los 5 dpi. La detección con los fluidos orales fue de 83,3 % a 1 dpi, 100 % a los 2 y 3 dpi y de 80 % a los 5 dpi (Decorte y col., 2015).

La identificación más alta y prolongada de ARN viral en los fluidos orales probablemente se deba a la detección de ARN viral en el esputo expectorado, más que a la detección de VIA derivado de la replicación local del virus en la mucosa nasal (Goodell y col., 2013; Decorte y col., 2015). El esputo contiene restos de células epiteliales del tracto respiratorio inferior y macrófagos intersticiales y alveolares, que pueden contener altas cantidades de ARN y antígeno viral. El largo tiempo de recambio de estas células, podría estar vinculada con la detección más prolongada de VIA en el fluido oral (Decorte y col., 2015).

El subtipo viral no tuvo efecto significativo en la detección de VIA en muestras de fluido oral (Goodell y col., 2013).

En cerdos de 35- 45 ddv de granjas con infección endémica, la tasa de detección de VIA mediante qRT-PCR fue del 30 % para las muestras de secreción nasal recolectadas individualmente y procesadas en grupos de tres y del 50 % para las muestras de fluidos orales (Garrido-Mantilla y col., 2019).

A su vez, en granjas con infección natural, el monitoreo con muestras de fluido oral permitió detectar infecciones clínicas y subclínicas intermitentes por VIA en cerdos pre y post destete (Ramirez y col., 2012; Panyasing y col., 2016; Hernandez-Garcia y col., 2017; Chamba Pardo y col., 2018, Garrido-Mantilla y col., 2019).

Se observó buena consistencia de los fluidos orales para la detección de casos clínicos y subclínicos de VIA entre los corrales de un mismo lote muestreados en el mismo momento, siendo posible la detección de VIA durante períodos de 2-4 semanas (Hernandez-Garcia y col., 2017), confirmando la excreción prolongada de VIA en fluidos orales (Decorte y col., 2015).

En brotes agudos de infección natural por influenza, se encontró correlación positiva significativa entre la cantidad de VIA en fluido oral y tos (Neira y col., 2016).

En granjas con antecedentes de enfermedad respiratoria, se detectó ácido nucleico de VIA en muestras de fluido oral en tres de seis lotes de cerdos estudiados desde las 5 a 21 semanas de vida. De los tres lotes positivos a VIA, sólo en uno de ellos la detección de ARN de VIA coincidió con la presencia de manifestaciones clínicas. Sin

embargo, los signos clínicos estuvieron presentes a lo largo de todo el estudio y VIA se detectó sólo a las 9 y 11 semanas de vida en asociación con PCV-2. En otro lote, VIA se detectó en dos momentos de muestro consecutivos y en uno de ellos también se detectó PCV-2. Sin embargo, no se observaron signos clínicos respiratorios a lo largo del estudio. En el lote positivo restante, VIA se detectó en tres momentos de muestreo consecutivos (5, 7 y 9 semanas de vida), pero los signos clínicos se presentaron desde las 9 semanas hasta la terminación. Otros dos lotes fueron negativos para la detección de VIA, pero presentaron manifestaciones clínicas respiratorias y hubo detección de otros agentes del Complejo Respiratorio Porcino. Finalmente, un lote presentó signos clínicos respiratorios leves a partir de la semana 11, pero no se detectó ninguno de los agentes estudiados (Hernandez-Garcia y col., 2017).

El porcentaje de muestras de fluido oral recolectadas en granjas con infección natural que fueron positivas mediante qRT-PCR (tasa de detección) fue variable entre estudios. Detmer y col. (2011) detectaron 42 % (382/910) de muestras de fluidos orales positivas, mientras que Ramirez y col. (2012) encontraron sólo el 8 % (46/600) de muestras positivas y sospecharon de un número desconocido de resultados falsos negativos por errores de muestreo o de análisis de las muestras. En granjas de cría donde las cerdas recibían vacunación contra VIA, 4,2 % (25/600) de las muestras de fluidos orales de camadas de lechones antes del destete fueron positivas para VIA por qRT-PCR (Panyasing y col., 2014). Por su parte, en un estudio donde se procesaron muestras de fluido oral recolectadas de cerdos en jaulas de maternidad de 34 granjas diferentes, el 28 % (424/1.523) de las remisiones, con una mediana de 4 muestras cada una, tuvo al menos un resultado positivo para ARN de VIA. Además, a partir de las muestras de fluido oral pudieron obtenerse aislamientos de VIA (Chamba Pardo y col., 2017). Por otro lado, si bien en salas de maternidad sólo se pudieron recolectar 7/40 muestras debido a la renuencia de los lechones a masticar la cuerda, de éstas, el 86 % (6/7) dio positivo (Garrido-Mantilla y col., 2019).

En un estudio longitudinal a campo en lotes de cerdos con enfermedad respiratoria, 13 % (7/54) de los eventos de muestreo realizados fueron positivos para VIA. Usando una muestra de fluido oral cada 25 cerdos en seis corrales, la prevalencia de corrales positivos por qRT-PCR para VIA osciló entre uno y cinco. VIA se detectó en un solo corral en el 14 % de los casos, mientras que en el 71 % de los casos tres o más corrales en un galpón dieron positivo para VIA en el mismo momento de muestreo. La estrecha correlación de los valores de Ct entre dos muestras de fluido oral positivas del mismo corral y la baja proporción de corrales positivos detectables en un evento de muestreo determinado, señaló la conveniencia de recolectar muestras de tantos corrales como sea posible y en múltiples ocasiones, en lugar de tomar múltiples muestras de pocos

corrales (Hernandez-Garcia y col., 2017). Por otro lado, la probabilidad de detección de PRRS dentro de un sitio aumentó a medida que aumentaba el número de galpones de los cuales se recolectaron muestras de fluido oral. Estos hallazgos podrían ser aplicables a otros patógenos, como VIA (Rotolo y col., 2017).

Hubo estudios que evaluaron la relación entre la detección de ARN viral de VIA en muestras de fluido oral y la detección de anticuerpos anti VIA en muestras de suero por ELISA. En uno de ellos, una semana después de la detección inicial (a las 15 semanas de vida) de VIA en muestras de fluidos orales mediante qRT-PCR, se detectaron anticuerpos contra la NP de VIA mediante ELISA tanto en fluidos orales como en suero, y las muestras de suero permanecieron positivas hasta 9 semanas después de la detección del ARN viral en fluido oral (Strutzberg-ftinder y col., 2015). En otro estudio, los resultados de anticuerpos séricos contra VIA y los resultados de RT-PCR para detección de ARN viral en fluidos orales mostraron un acuerdo general en el estado de infección de la granja. Sin embargo, en tres galpones donde se observó un aumento de la seroprevalencia de VIA entre el inicio y finalización del estudio no se obtuvieron muestras de fluidos orales positivas para VIA por RT-PCR, sospechándose de resultados falsos negativos (Ramirez y col., 2012).

Los fluidos orales de corrales proporcionan un método de recolección de muestras fácil, eficaz, seguro, no invasivo y su aplicación ha crecido considerablemente en los últimos años debido a las ventajas prácticas, económicas y de bienestar (Prickett y Zimmerman, 2010; Romagosa y col., 2012; Detmer y col., 2013; Strutzberg-ftinder y col., 2015; Hernandez-Garcia y col., 2017; Garrido-Mantilla y col., 2019). Sin embargo, presentan algunas limitaciones. Por un lado, las tasas de aislamiento viral a partir de fluidos orales en cerdos pueden ser bajas o nulas (Detmer y col., 2011; Panyasing y col., 2012, 2016; Romagosa y col., 2012; Goodell y col., 2013; Decorte y col., 2015; Chamba Pardo y col., 2017; Garrido-Mantilla y col., 2019). Por el otro, generalmente se presenta una baja tasa de éxito en la recolección de fluidos orales en corrales o camadas de lechones en maternidad, los cuales muestran poco interés por la soga, por lo que obtener un volumen suficiente de fluido oral en esta categoría puede no ser posible, demandar varias horas y/o requerir el entrenamiento previo de los lechones (Prickett y Zimmerman, 2010; Panyasing y col., 2016; Decorte y col., 2015; Chamba Pardo y col., 2017; Hernandez-Garcia y col., 2017; Garrido-Mantilla y col., 2019; Almeida y col., 2020; Boulbria y col., 2020). En camadas de lechones de 21 y 28 ddv sin entrenamiento previo y camadas de 21 ddv previamente expuestas a una cuerda, los porcentajes de éxito de la recolección de fluido oral durante 30 min fueron del 62 %, 82 % y 100 %, respectivamente (Boulbria y col., 2020). De todas maneras, si bien la recolección puede resultar desafiante, la sensibilidad intragranja de la detección de ARN viral mediante

qRT-PCR a partir de muestras de fluido oral recolectadas en camadas de lechones de maternidad, tuvo una mediana del 93 % y varió de 87 a 99 % e incluso fue posible obtener aislamientos de VIA (Chamba Pardo y col., 2017).

Además, el interés de los cerdos por la sogá parece estar influenciado por las condiciones individuales de comportamiento y alojamiento (Decorte y col., 2015; Hernandez-Garcia y col., 2017). En un estudio, si bien el número medio de muestras recolectadas por lechón no difirió significativamente entre lechones infectados con VIA y lechones no infectados, las muestras individuales de fluidos orales de lechones infectados fueron más difíciles de obtener a los 3 dpi, momento que se correspondió con los picos de excreción viral (Decorte y col., 2015).

Finalmente, tal como describimos previamente, un aspecto importante en el procesamiento de las muestras de fluido oral es el potencial de degradación del ARN viral y la presencia de inhibidores de las reacciones de PCR de este tipo de muestra (Chittick, 2012; Hernandez-Garcia y col., 2017). Sin embargo, el conocimiento y la optimización en torno a las técnicas de diagnóstico de laboratorio basadas en fluidos orales ha aumentado notablemente desde 2010 (Hernandez-Garcia y col., 2017).

#### b.4. Gasas mamarias

Recientemente se propuso la recolección de “gasas mamarias” de cerdas como un tipo de muestra novedoso que permite evaluar el estado de las camadas de lechones antes del destete. La técnica consiste en frotar la piel de la ubre de la cerda con una gasa embebida en medio de transporte viral, con el objetivo de recolectar las secreciones nasales y orales de los lechones depositados en la piel de la glándula mamaria. De esta manera, cada muestra representa al grupo de lechones amamantados por la cerda estudiada (Garrido-Mantilla y col., 2019).

La técnica resultó ser eficaz, sencilla y práctica para detectar y aislar el VIA en los cerdos antes del destete (Garrido-Mantilla y col., 2019, 2021; de Lara y col., 2022). Las tasas de detección y aislamiento de VIA a partir de gasas mamarias fueron de 75 %, casi tan altas como las obtenidas con hisopos orofaríngeos (78 %) y estos dos métodos fueron considerados óptimos para detectar y aislar VIA de lechones lactantes (Garrido-Mantilla y col., 2019).

En un estudio, las tasas de detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en muestras de gasas mamarias de cerdas con lechones de 5-7 ddv fueron del 76 % (69/91) para las cerdas nodrizas y de 23 % (21/92) para las cerdas que amamantaban sus propias camadas (Garrido-Mantilla y col., 2021).

Además, se demostró que es posible agrupar hasta 3 muestras de gasas mamarias para su procesamiento sin afectar significativamente la sensibilidad de la detección de VIA (de Lara y col., 2022).

#### b.5. Bioaerosoles

El primer reporte de optimización de la detección de VIA en muestras de bioaerosoles de cerdos fue publicado en 2006 (Hermann y col., 2006).

Mediante muestras de bioaerosoles de animales inmunológicamente ingenuos e infectados experimentalmente, el ARN de VIA comenzó a detectarse 1 dpi, alcanzó los niveles máximos de detección a los 4 dpi y luego descendió hasta dejar de detectarse el 7° dpi. En las muestras de bioaerosoles de los animales vacunados con una de las vacunas comerciales, el material genético de VIA se detectó en niveles similares a los de animales no vacunados hasta el 7° dpi, mientras que en las muestras de cerdos vacunados con otra vacuna comercial VIA se detectó en niveles bajos, sólo el 2° o 3° dpi (Loeffen y col., 2011).

Corzo y col. (2013c) validaron experimentalmente un colector ciclónico líquido (Cyclonic; Midwest Micro-Tek, Brookings, SD, EE. UU.) para la detección de ARN de VIA en bioaerosoles y demostraron que el muestreo de bioaerosoles es un método sensible para detectar influenza en el aire. De acuerdo con lo reportado por el grupo investigador, en las condiciones del estudio, la probabilidad de detectar una muestra de aire positiva durante el curso de una infección aguda aumentaba más de 2 veces por cada cerdo del grupo con hisopo nasal positivo para VIA, sugiriendo que el riesgo de aerosolización, y probablemente, de transmisión aérea, aumenta a medida que el número de cerdos infectados de forma aguda aumenta. Además, la cantidad de virus detectado en las muestras de bioaerosoles estuvo relacionada con la cantidad de virus excretada por los cerdos individuales, pero era menor que la encontrada en las secreciones nasales.

En un estudio en granjas porcinas con brote de infección aguda natural por influenza se aisló VIA a partir de muestras de bioaerosoles recolectadas dentro y en el lugar de salida del aire de los galpones. Además, se detectó el ARN de VIA en muestras de bioaerosoles recolectadas hasta 2 km de una granja con cerdos infectados. Sin embargo, VIA dejó de detectarse en las muestras de bioaerosoles recolectadas en una granja luego de que los signos clínicos de infección aguda desaparecieron (Corzo y col., 2013a).

En muestras de bioaerosoles de cerdos no vacunados e infectados experimentalmente el ARN de VIA se detectó el 1°, 2° y 3° dpi en niveles bajos, probablemente debido a la elevada temperatura ambiental en el interior de las salas al momento del estudio. Por otro lado, en las muestras de bioaerosoles de animales

previamente vacunados no hubo detección de VIA, posiblemente debido a la disminución de la descarga nasal viral generada por la inmunidad vacunal y también a las elevadas temperaturas ambientales (Neira y col., 2018).

Durante los brotes agudos de infección natural por influenza, la detección del ARN de VIA en muestras de bioaerosoles se sostuvo por períodos de 20 días, con niveles máximos estimados entre el 7° y 11° día del inicio del brote. Además, hubo correlación positiva significativa entre el número de muestras de fluido oral y de bioaerosoles positivas a VIA (Neira y col., 2016).

Los niveles de ARN de VIA detectados en diferentes tipos de muestras, incluidas las de bioaerosoles, variaron entre granjas, lo que podría deberse a niveles variables de infección e inmunidad en los cerdos, tipo de VIA, número de cerdos en el galpón, volumen del galpón, tasas de ventilación y características de manejo de la granja (Neira y col., 2016).

En granjas con infección natural, un valor de temperatura ambiental  $< 20$  °C fue un predictor significativo de positividad a VIA en muestras de bioaerosoles. Así, durante el verano todas las muestras de bioaerosoles fueron negativas aun cuando se detectó VIA en el 25% de las muestras de fluido oral. Por el contrario, durante el otoño-invierno, cerca del 10 % de las muestras de aire y 18,6 % de las muestras de fluido oral fueron positivas. Si bien la descarga de VIA tuvo lugar tanto en meses de bajas y altas temperaturas, probablemente la detección de VIA en muestras de bioaerosoles puede ser afectada por factores como las prácticas de manejo (cierre o protección de los galpones con plástico, apagado de extractores) y/o factores climáticos. Adicionalmente, la corta duración de los períodos de muestreo puede haber resultado en una subestimación de la carga viral, especialmente durante el verano (Anderson y col., 2016).

En otro estudio no se encontró asociación entre la cantidad de VIA en las muestras de bioaerosoles y la humedad relativa o la temperatura. Esto podría deberse a que las condiciones en el interior de las granjas fueron relativamente estables a lo largo del estudio (Neira y col., 2016).

Por otro lado, la detección experimental de VIA en muestras de bioaerosoles en condiciones cálidas, aunque se produjo a baja frecuencia, podría indicar la transmisión aérea de influenza en climas cálidos, particularmente cuando los cerdos están en contacto cercano (Neira y col., 2018).

En granjas porcinas con infección natural las muestras de bioaerosoles tuvieron mejores tasas de detección de ARN de VIA mediante qRT-PCR que las muestras de hisopos nasales recolectadas a nivel individual y procesadas en grupos. Sin embargo,

la tasa de aislamiento viral fue menor que con otro tipo de muestras (Garrido-Mantilla y col., 2019).

En un estudio experimental que evaluó la capacidad de seis muestreadores de bioaerosoles de detectar y cuantificar VIA-P, se concluyó que en general, los muestreadores capaces de procesar alto caudal de aire generalmente recolectan mayores cantidades de virus que los muestreadores de bajo flujo. El SpinCon II, el AGI-30 impinger y el BioSampler fueron los muestreadores que recuperaron mayores concentraciones de ARN de VIA-P. Por su parte, el colector ciclónico líquido es extremadamente fácil de usar y está incluido dentro de los muestreadores de alto caudal ya que tiene un flujo de muestreo de aproximadamente 200 L/min. Sin embargo, en el mencionado estudio en general, recuperó menos virus que otros muestreadores de alto caudal e incluso menos que algunos muestreadores con caudales más bajos (Raynor y col., 2021).

### **c. Prueba para la detección de virus activo: aislamiento viral**

El aislamiento viral (AV) se usa para la multiplicación e identificación de virus a partir de diferentes tipos de muestras e indica la presencia de partículas virales viables, capaces de replicarse (Spickler, 2009; Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015).

El aislamiento de VIA se puede realizar en cultivos de células susceptibles (por ejemplo, células de riñón canino Madin-Darby, MDCK) o huevos embrionarios de gallina (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013).

Si bien es un método sensible y es considerado el estándar de oro (o de referencia) para el diagnóstico de infección por VIA, los cerdos deben estar excretando virus al momento de recolección de las muestras (Jung y col., 2002; Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013). Debido a que el período de excreción viral es breve, si las muestras no son obtenidas durante ese tiempo, los intentos de aislamiento pueden fracasar (Spickler, 2009; Sandbulte y col., 2015). Además, una vez obtenida la muestra, debe garantizarse el correcto acondicionamiento, conservación y procesamiento para mantener la viabilidad viral (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015)

A su vez, se trata de un método laborioso y costoso y, dado que son necesarios múltiples pasajes antes de que una muestra pueda considerarse negativa, puede llevar dos o más semanas obtener resultados definitivos. Además, es necesario contar con equipamiento especializado, personal capacitado y reactivos de alta calidad (Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015).

Por otro lado, la propagación de este virus representa un riesgo para la salud del personal de laboratorio, ya que los VIA porcinos pueden ser patógenos para las personas (Haines y col., 1993; Jung y col., 2002).

Por estos motivos, el aislamiento viral generalmente se realiza cuando interesa multiplicar los virus presentes en la muestra para contar con una cantidad suficiente para otros análisis (como la secuenciación genética) o para la producción de vacunas autógenas, más que para el diagnóstico de rutina (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015).

Se han obtenido aislamientos de VIA a partir de muestras de secreción nasal (Detmer et al. 2013; Decorte y col., 2015; Garrido-Mantilla y col., 2019; Van Reeth et al., 2012 citado por Goodell y col., 2013), hisopos orofaríngeos y toallitas nasales (Garrido-Mantilla y col., 2019). También ha sido posible el aislamiento viral a partir de muestras de bioaerosoles (Corzo y col., 2014; Neira y col., 2016; Garrido-Mantilla y col., 2019) y superficies (Neira y col., 2016; Garrido-Mantilla y col., 2019).

El aislamiento a partir de muestras de fluido oral, en algunos estudios no tuvo éxito (Detmer y col., 2011; Panyasing y col., 2016), mientras que en otros, la tasa de aislamiento viral fue baja o en una proporción significativamente menor que en otro tipo de muestras (Panyasing y col., 2012; Romagosa y col., 2012; Goodell y col., 2013; Decorte y col., 2015; Chamba Pardo y col., 2017; Garrido-Mantilla y col., 2019).

#### **d. Pruebas serológicas para la demostración de anticuerpos específicos contra el virus**

El diagnóstico de VIA por aislamiento viral, detección de antígenos mediante IHQ e IFA o por la identificación del ARN con técnicas de biología molecular requiere que los cerdos se encuentren cursando una infección activa y aguda (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013; Janke y col., 2014; Van Reeth y Vincent, 2019). Esto limita la utilidad de estas técnicas, ya que, por un lado, la duración de la infección por influenza es corta (entre 7 a 10 días, aproximadamente), y, por el otro, el período de excreción del virus es todavía más estrecho (generalmente 3 a 5 días) (Janke, 2013; Sandbulte y col., 2015).

Las pruebas serológicas se basan en la detección de anticuerpos específicos contra VIA. Los anticuerpos detectados pueden ser aquellos generados por infección natural y/o vacunación o adquiridos pasivamente a través del calostro y no es posible diferenciarlos entre sí (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013; Carlson, 2017).

Los ensayos serológicos no están tan limitados por la duración de la infección y pueden realizarse mucho tiempo después de ésta debido a que la respuesta inmune suele durar varias semanas (Carlson, 2017). Por estos motivos, cuando se sospecha la

presencia de VIA en las granjas, pero finalizó la fase aguda de la infección, se puede realizar la detección de inmunoglobulinas específicas (Detmer y col., 2013).

Las pruebas serológicas permiten diagnosticar la enfermedad clínica, detectar la exposición previa a nivel individual, determinar la prevalencia de exposición dentro de una población y también definir el perfil inmunológico del plantel, lo que, a su vez, ayuda a establecer el momento óptimo de vacunación y/o a evaluar el cumplimiento y eficacia de la vacunación (Ciacci-Zanella y col., 2010; Carlson, 2017).

En cerdos infectados con VIA la producción de anticuerpos (predominantemente IgG) alcanza niveles detectables desde 1-2 semanas posteriores a la infección (Detmer y col., 2013; Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015). Alcanzan los niveles máximos entre 2-3 (Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015) o 4 a 7 semanas postinfección (Detmer y col., 2013) y disminuyen en 8-10 semanas (Schaefer y col., 2013). Sin embargo, las cerdas infectadas pueden ser serológicamente positivas hasta por 24 meses (Poljak y col., 2008).

Cuando se desea identificar una infección reciente por VIA mediante serología, se deben recolectar muestras de suero en el momento aparente de la infección aguda y después de 3-4 semanas del inicio de los signos clínicos (fase de convalecencia) para identificar la seroconversión (Schaefer y col., 2013; Detmer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015).

Para la obtención de las muestras de suero es necesaria la extracción de sangre de cerdos individuales, que puede ser dificultosa y demandar mucho tiempo. Además, requiere la presencia de personal capacitado para el manejo e inmovilización transitoria de los animales y genera estrés en los animales (Detmer y col., 2013).

Las pruebas serológicas utilizadas para la detección de anticuerpos contra VIA en cerdos incluyen: inhibición de la hemaglutinación (IH), seroneutralización viral (SN) y los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) (Detmer y col., 2013).

#### d.1. Inhibición de la hemoaglutinación (IH)

La IH fue considerada por la OIE (Office International des Epizooties) como la principal prueba serológica para la detección de anticuerpos contra VIA (Yoon y col., 2004; Detmer y col., 2013).

Es una prueba cuantitativa que detecta y mide títulos de anticuerpos. Por lo tanto, es la técnica de referencia para la cuantificación de la respuesta de anticuerpos protectores frente a una cepa específica de VIA, ya que los títulos de anticuerpos IH parecen correlacionarse con el nivel de protección de los animales contra el subtipo utilizado en la prueba (Yoon y col., 2004; Detmer y col., 2013; Carlson, 2017).

La prueba de IH se basa en la capacidad de la HA de VIA de unirse a receptores de ácido siálico en la superficie de los eritrocitos, causando hemaglutinación. Se utilizan diluciones seriadas del suero en estudio, una cantidad estándar del virus de referencia y eritrocitos de pollo o pavo (Schaefer y col., 2013). Si en la muestra de suero hay anticuerpos homólogos al virus de referencia, los anticuerpos se unen a la HA viral, por lo cual esta no está disponible para interactuar y aglutinar los glóbulos rojos (es decir, hay inhibición de la hemaglutinación), los cuales, al no aglutinarse, sedimentan (Detmer y cl., 2013; Schaefer y col., 2013).

Es una técnica relativamente económica y sencilla (Detmer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015). Sin embargo, el éxito depende de que la cepa de VIA de referencia utilizada en la prueba y la cepa de campo sean antigénicamente similares. Por lo tanto, los laboratorios necesitan analizar las muestras contra un panel de cepas que representen a los subtipos de VIA más prevalentes a nivel regional y, además, la técnica no es capaz de detectar nuevos virus (Detmer y cl., 2013; Schaefer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015). Por estos motivos, un panel de virus limitado o mal elegido puede subestimar la verdadera seroprevalencia, lo que es particularmente relevante cuando hay escasez de datos virológicos, como sucede, por ejemplo, en muchas partes de Asia, África y América del Sur (Tse y col., 2012).

Los títulos de anticuerpos IH detectados en suero pueden ser afectados e incluso pueden obtenerse resultados falsos negativos por factores como el grado de homología entre el virus que indujo la producción de anticuerpos en el cerdo y el virus de la prueba, interferencia de anticuerpos contra otros subtipos de VIA, presencia de inhibidores inespecíficos de la hemoaglutinación en el suero, diferencias en la capacidad de los VIA para aglutinar eritrocitos, diferencias en las propiedades de aglutinación de los eritrocitos entre distintas especies e incluso entre animales de una misma especie y la subjetividad del operador (Schaefer y col., 2013; Panyasing y col., 2016).

El tiempo promedio para obtener el resultado es de 48 horas (Schaefer y col., 2013) y la complejidad técnica puede limitar su uso a gran escala (Yoon y col., 2004).

#### d.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

En la técnica de ELISA se utiliza una placa de 96 pocillos recubierta con antígeno de VIA, donde se incuba la muestra de suero para que se produzca la unión del anticuerpo (en el suero) y el antígeno de VIA (en la placa). Luego, se elimina el material no unido por lavado y se agrega un anticuerpo monoclonal anti-VIA conjugado con una enzima y dirigido contra el mismo antígeno de VIA de la placa. El conjugado antígeno-anticuerpo no unido se elimina por lavado y se añade el sustrato de la enzima, el cual ante la presencia de ésta produce un cambio de color. La reacción de cambio de color se

detiene después de un tiempo determinado y la cantidad de color producida se lee como densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro. La DO es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-VIA presentes en la muestra de suero analizada (Detmer y col., 2013).

Los ELISA comerciales son pruebas rápidas y fáciles de realizar, que permiten procesar gran cantidad de muestras a la vez (Yoon y col., 2004). El tiempo promedio para obtener el resultado es de tres horas (Schaefer y col., 2013).

Los primeros kits ELISA disponibles comercialmente eran específicos de subtipo y permitían la detección separada de anticuerpos contra los subtipos H1N1 y H3N2 de VIA-P (Detmer y col., 2013; Sandbulte y col., 2015). Tenían baja sensibilidad, lo que podría haber sido consecuencia tanto de una baja sensibilidad de las pruebas en sí mismas, como resultado de las diferencias antigénicas entre el antígeno del ensayo y los anticuerpos inducidos por los VIA circulantes en las poblaciones porcinas o por una combinación de ambas (Barbé y col., 2009; Pascu y col., 2012; Detmer y col., 2013; Goodell y col., 2016).

Más tarde, apareció un kit ELISA comercial desarrollado para la detección en aves de anticuerpos séricos dirigidos contra un epítipo altamente conservado y no dependiente de subtipo de la NP del VIA (Ciacci-Zanella y col., 2010; Detmer y col., 2013). La NP está muy conservada genéticamente, y la identidad de aminoácidos en mamíferos es generalmente > 90 % (Goodell y col., 2016). Si bien, estimula la inmunidad humoral y mediada por células (Goodell y col., 2016), los anticuerpos anti-NP no son una medida de la capacidad neutralizante, por lo que no se correlacionan con protección inmunológica (Carlson, 2017).

La infección natural y la vacunación con virus completo típicamente inducen el desarrollo de anticuerpos anti-NP en los cerdos (Ciacci-Zanella y col., 2010). Por lo tanto, el ELISA NP es capaz de detectar anticuerpos anti-NP de infección natural, vacunación con virus completo y anticuerpos calostrales (Ciacci-Zanella y col., 2010; Carlson, 2017). Como no proporciona información sobre el subtipo viral, luego de analizar las muestras por ELISA NP se pueden emplear pruebas más específicas, como la IH para determinar el subtipo viral (Detmer y col., 2013).

Usando muestras de suero de cerdos infectados experimentalmente y realizando ajustes en el corte de la relación muestra/control negativo (M/N) por referencia a la curva (ROC), la prueba IDEXX AI MultiS-Screen Ab presentó una sensibilidad y especificidad de diagnóstico optimizadas de 96,6 % y 99,3 %, respectivamente (Ciacci-Zanella y col., 2010). Barbé y col. (2009), determinaron que el ELISA NP tenía una especificidad del 97 % al 99 % y un valor predictivo positivo del 92 % al 99 % (Pascu y col., 2012). Con un límite de  $M/N \leq 0,60$ , la sensibilidad y especificidad del ELISA de bloqueo NP ELISA

Multi-Screen NP (IDEXX, Westbrook, ME) fue estimada en 95,5 % y 99,6 %, respectivamente, un nivel de rendimiento equivalente a las pruebas de IH homólogas y mejores que los resultados obtenidos con las pruebas de IH heterólogas (Goodell y col., 2016).

El ELISA NP (FlockChek® Avian Influenza MultiS-Screen Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME) detectó anticuerpos anti-influenza en muestras de suero de algunos de los cerdos infectados experimentalmente con VIA H1N1 pdm 2009 a partir de los 5 días post exposición. Sin embargo, recién a los 14 días posinfección se detectaron anticuerpos en todos los cerdos infectados (Ciacci-Zanella y col., 2010). Por otro lado, usando el kit comercial de ELISA ID Screen Influenza A Antibody Competition ELISA (ID-Vet) los primeros anticuerpos anti-NP en muestras de suero de cerdos infectados con VIA H1N1 pdm 2009 se detectaron en algunos animales el 7° dpi y en las muestras de todos los cerdos estudiados el 10° dpi (Lange y col., 2009).

Se ha sugerido que el ELISA podría ser útil para monitorear la respuesta inmunológica frente a la vacuna (Ciacci-Zanella y col., 2010). Sin embargo, en otro estudio, la vacunación afectó la relación M/N pero los datos no respaldaron el uso del NP ELISA para monitorear el desempeño de la vacuna o para diferenciar entre animales infectados con VIA y animales infectados y vacunados contra VIA (Goodell y col., 2016).

En muestras de suero de cerdos inoculados con vacunas experimentales monovalentes inactivadas de virus completo (H1N1, H1N2 o H3N2) y no desafiados con infección viral, los valores de ROC optimizado, sensibilidad y especificidad fueron diferentes que para los animales con infección experimental ( $\geq 0,853$  versus un valor de corte de 0,60 para animales infectados) (Se, Esp: 92,3; 83,5). Además, las muestras de suero de cerdos vacunados comenzaron a ser positivas en algunos animales 14 días después de la primera dosis y de manera más constante después de la dosis de refuerzo (28 días posteriores a la primera aplicación). La respuesta tardía de anticuerpos frente a la NP viral en animales vacunados podría deberse a la presencia limitada de NP en la vacuna inactivada (Ciacci-Zanella y col., 2010).

Usando ELISA NP (IDEXX AI MultiSScreen Ab; IDEXX Laboratories, Inc.) en muestras de suero de cerdos vacunados con una vacuna comercial trivalente inactivada, 21 días después de la dosis de refuerzo (42 días de la primera dosis) se detectaron anticuerpos en el 25 % de las muestras. Con el mismo kit, después de la infección experimental, se detectaron anticuerpos a partir del 7° dpi en muestras de suero de animales con y sin vacunación previa, aunque hasta los 14 dpi la relación M/N fue menor en las muestras de animales previamente vacunados. Entre los 21° a 35° dpi, las muestras de animales vacunados y las de los animales sin vacunación presentaron relaciones M/N medias equivalentes. Sin embargo, a los 42 dpi, la relación M/N fue

significativamente mayor en los cerdos vacunados e infectados respecto a los infectados sin vacunación (Goodell y col., 2016).

Por otro lado, en muestras de suero de animales no infectados prácticamente no hubo diferencia en los niveles de anticuerpos detectados entre el suero de cerdos vacunados y sin vacunación. Ambos grupos fueron serológicamente negativos, al menos hasta 63 días post vacunación (Goodell y col., 2016). Una investigación previa también había reportado que parte de los cerdos vacunados habían dado negativo mediante un ELISA NP comercial (Barbé y col., 2009).

En un brote de infección natural por VIA pdm 2009, 29% de los sueros recolectados 10-14 dpi fueron positivos para anticuerpos contra la NP de VIA por ELISA de competición, con un aumento de la proporción de muestras seropositivas a medida que aumentaban los días desde la infección de los cerdos. Por otro lado, a los 10 a 14 dpi también se detectó VIA mediante aislamiento viral en cuatro muestras de hisopos nasales (Weingartl y col., 2010).

En un estudio de evaluación y optimización del rendimiento de tres ensayos de ELISA NP comerciales (IDEXX Influenza A Ab, IDEXX AI MultiS-Screen Ab, e IDVet ID Screen Influenza A) para la detección de anticuerpos anti-NP de VIA en muestras de suero de cerdos infectados naturalmente, después de optimizar los valores de corte mediante curvas ROC, los valores de Se y Esp fueron superiores a los obtenidos usando los valores de cortes indicados en las instrucciones de los kits. Para ambos ensayos IDEXX el valor optimizado fue 0.56, con una sensibilidad y especificidad de 86 % y 89 %, respectivamente para la prueba IDEXX Influenza A Ab y de 91 % y 87 %, respectivamente para IDEXX AI MultiS-Screen Ab. El valor de corte optimizado para la prueba IDVet Screen influenza A fue 0.71 y la sensibilidad y especificidad fueron de 95 % y 79 %, respectivamente. La relación M/N de corte seleccionada en función de una curva ROC generada mediante el uso de sueros porcinos optimizaría los resultados de los ensayos. Probablemente la relación M/N de corte subóptima indicada por los fabricantes sea consecuencia de que las pruebas fueron diseñadas y validadas principalmente con sueros de aves. La correlación excelente entre IDEXX Influenza A Ab y IDEXX AI MultiS-Screen Ab probablemente se deba a que los componentes utilizados en la fabricación son los mismos, pero son empaquetados y distribuidos en países diferentes (Tse y col., 2012).

Al comparar tres kits de ELISA para la detección de anticuerpos contra VIA disponibles comercialmente (Influenza A test kit, IDEXX, Países Bajos; CIVTEST Suis Influenza, HIPRA, España; ELISA ID Screen Influenza A Antibody Competition Kit, IDVet Montpellier, Francia) en 88 muestras de suero de cerdos de granjas porcinas de Argentina, la concordancia por pares entre los kits serológicos evaluados fue moderada.

La proporción de resultados positivos varió entre 43-56 %, según el kit. La proporción de resultados positivos fue mayor para el kit IDEXX (56 %) y menor para el kit HIPRA (43 %) (Sarradell y col., 2014).

En un estudio donde se analizaron 2151 muestras de suero obtenidas de cerdos de España y procesadas mediante un ELISA indirecto anti-NP comercial (CIVTEST-Suis, Influenza, Laboratorios Hipra, Amer, España), siguiendo las instrucciones del fabricante y considerando las muestras positivas cuando la relación muestra/control positivo fue  $> 0.2$ , y por IH usando VIA H1N1, H1N2 y H3N2, la concordancia entre los resultados obtenidos por ambas pruebas fue moderada ( $K = 0,45$ ; IC95 %: 0,41–0,49;  $p < 0,05$ ). El 76 % de las muestras de suero analizadas se clasificaron como positivas o negativas simultáneamente mediante ELISA y al menos una de las pruebas de IH; el 18,6 % fueron positivas por IH, pero negativas por ELISA y el 5,4 % fueron negativas por IH pero positivas por ELISA. La detección de anticuerpos por ELISA en ausencia de detección por IH puede ser consecuencia de una falta de sensibilidad de la IH debido al empleo de cepas virales antigénicamente diferentes de las cepas circulantes contra las cuales los cerdos desarrollan inmunidad. Por otro lado, las muestras negativas por ELISA y positivas mediante IH podrían indicar una falta de sensibilidad del ELISA (Simon-Grifé y col., 2011). A pesar de la alta especificidad (100 %) del ELISA indirecto (CIVTEST-Suis, Laboratorios Hipra SA, Amer, España), al menos para las cepas circulantes en España, la sensibilidad parece ser mejor para el subtipo H1N1 que para los subtipos H1N2 y H3N2 ( $Se = 100 \%$ , 86,9 % y 73,4 %, respectivamente) (Maldonado, 2007 citado por Simon-Grifé y col., 2011).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN DE VIA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS – UNR

Una pasantía teórico-práctica en el Department of Veterinary Population Medicine (VPM) del College of Veterinary Medicine, University of Minnesota (CVM/UMN) permitió recibir formación en técnicas de biología molecular (qRT-PCR, RT-PCR) y poner a punto una RT-PCR para la identificación de ARN de VIA.

Posteriormente, en el Servicio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario (SBM-FCV/UNR), fue necesario realizar algunas modificaciones al protocolo de procesamiento de las muestras respecto al empleado en el CVM/UMN, especialmente en relación con el proceso de extracción del ARN. En el CVM/UMN la extracción del ARN se realiza de manera automática empleando un kit de perlas magnéticas de difícil acceso y aplicación en nuestro contexto. Por tal motivo se seleccionaron y evaluaron otros kits de extracción disponibles en Argentina, accesibles a nuestro presupuesto y capaces de ser empleados con los equipos del SBM-FCV/UNR.

#### a. Evaluación de dos productos comerciales para la extracción de ARN a partir de una muestra con alta concentración viral y de muestras de fluido oral

Como muestra con alta concentración viral se empleó el sobrenadante de un aislamiento de VIA H1N1 pdm 09 en cultivo de células MDCK cedido por el Instituto de Virología del CICVyA INTA Castelar. El mismo se utilizó puro y en tres diluciones seriadas ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ) con PBS estéril. Como control negativo se usó PBS estéril.

La extracción del ARN se realizó con los kits comerciales: Trizol LS Reagent (Cat. Nro. 10296-010, Invitrogen™) (anexo 1) (Trizol LS™) y High Pure Viral RNA (Cat. Nro. 11858882001, Roche™) (anexo 2) (High Pure Roche™), siguiendo las indicaciones de sus fabricantes.

En todos los casos, los ensayos se hicieron por duplicado.

Por otro lado, se realizó la extracción de ARN de 21 muestras de fluido oral obtenidas de corrales de cerdos con aparente infección natural por VIA, utilizando los mismos kits comerciales mencionados anteriormente de acuerdo con las indicaciones de cada fabricante.

Con los extractos obtenidos se llevó a cabo una RT-PCR para detección del gen matriz de VIA utilizando el kit comercial SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen™, Cat. Nro. 12574018) (anexo 3), siguiendo las indicaciones del fabricante y se utilizaron los siguientes

cebadores: 5´- AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG- 3´ y 5´- AGGATCACT TGA ATC GCT GCA TCT- 3´. Se empleó el termociclador MultiGene™ Mini Personal Thermal Cycler (Labnet International, Inc.) con las condiciones de termociclado detalladas a continuación: 42 °C por 60 min, 94 °C por 2 min, luego 40 ciclos de 94 °C por 15 seg, 49 °C por 30 seg y 68 °C por 1 min. Finalmente 68 °C por 5 min.

El producto obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1 %, usando como agente intercalante SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, Cat. Nro. S33111) (anexo 4) y se observó bajo luz ultravioleta.

Se realizó la evaluación subjetiva del rendimiento de cada kit de extracción en base a la presencia/ausencia de bandas en el gel de agarosa. Para las extracciones a partir de las muestras de aislamiento viral también se valoró subjetivamente la intensidad de las bandas observadas en el gel.

#### b. Evaluación del efecto de dilución del templado de ARN sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral

Se extrajo el ARN de 29 muestras de fluido oral usando Trizol LS™, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los extractos obtenidos se emplearon puros y diluidos con el mismo volumen de agua libre de ARNasas (dilución al 50 %) en una RT-PCR, de la misma manera que en el ensayo anterior.

Se realizó la evaluación subjetiva del efecto de la dilución del templado en el producto final de RT-PCR en base a la presencia/ausencia de bandas en un gel de agarosa al 1%, como se describió previamente.

En los dos primeros ensayos, el grado de concordancia se determinó a partir del cálculo del coeficiente Kappa de Cohen corregido por los acuerdos atribuibles al azar (Sheskin, 2011). La interpretación de los valores del coeficiente Kappa se realizó de acuerdo con la escala de seis categorías mencionada por Landis y Koch (1997).

#### c. Evaluación del efecto de dilución del templado de ARN y la concentración de la mezcla de enzimas en la RT-PCR sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral

Mediante el empleo de Trizol LS™ y de acuerdo con las indicaciones del fabricante se obtuvieron templados de ARN de cinco muestras de fluido oral recolectadas de corrales de cerdos con aparente infección natural por VIA.

Un mismo templado se usó puro y diluido al 50% con agua libre de ARNasas.

Para cada templado puro y diluido, por un lado, se realizó la RT-PCR de acuerdo con las indicaciones del fabricante tal como se describió en los ensayos anteriores.

Por el otro lado, todos los templados se procesaron por RT-PCR duplicando la concentración enzimática respecto a la indicada.

Se realizó la evaluación subjetiva del efecto de la dilución del templado y la concentración enzimática en el producto final de RT-PCR en base a la presencia/ausencia de bandas en el gel de agarosa al 1 %.

## **B. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE MONITOREO PARA DETECCIÓN DE VIA EN GRANJAS PORCINAS**

### **a. Características generales de las granjas incluidas en el estudio**

El estudio se llevó a cabo entre noviembre de 2014 y julio de 2019, en 12 granjas porcinas intensivas, confinadas, de ciclo completo (Tabla 1).

En la mayoría de las granjas, la producción se desarrollaba en un único sitio (monositio). En las tres granjas restantes (Granja 2, 7 y 10) el sistema de producción estaba distribuido en tres sitios, separados entre sí.

El tamaño de los criaderos varió entre 350 y 4500 cerdas en producción.

Con excepción de las Granjas 1 y 2, en ninguna otra granja se realizaba vacunación de cerdos contra VIA durante el desarrollo del estudio. En las Granjas 1 y 2 se aplicaba una vacuna comercial a virus inactivado, con 5 cepas, indicada como ayuda en el control de la enfermedad asociada a los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 de VIA en hembras de 60 y 90 días de gestación.

Las Granjas 1 y 2 pertenecen a una misma empresa, se encuentran separadas entre sí por 2 a 2,5 km y tenían manejos sanitarios similares.

Al momento del estudio, en todas las granjas, con excepción de la Granja 8, la reposición de las hembras reproductoras F1 era interna. En la mayoría de los criaderos la reposición de abuelas era externa y en sólo tres de ellos (Granja 1, 2 y 10) era interna.

Las granjas incluidas en el estudio fueron seleccionadas debido a que presentaban manifestaciones clínicas y/o lesiones anatomo e histopatológicas compatibles con infección por VIA o antecedentes de diagnósticos previos mediante inmunohistoquímica, ELISA y/o RT-PCR o qRT-PCR.

Tabla 1

*Resumen de las características generales de las granjas incluidas en el estudio.*

Granja	Flujo de producción	Nro. hembras	Localización (provincia)	Reposición abuelas	Reposición F1
1	Monositio	500	Córdoba	Interna	Interna
2	Multisitio	2.500	Córdoba	Interna	Interna
3	Monositio	1000	Córdoba	Externa	Interna
4	Monositio	1000	Buenos Aires	Externa	Interna
5	Monositio	550	Córdoba	Externa	Interna
6	Monositio	1.600	Chaco	Externa	Interna
7	Multisitio	500	Santa Fe	Externa	Interna
8	Monositio	350	Santa Fe	Externa	Externa
9	Monositio	400	Santa Fe	Externa	Interna
10	Multisitio	4500	Santa Fe	Interna	Interna
11	Monositio	1000	Santa Fe	Externa	Interna
12	Monositio	420	Buenos Aires	Interna	Interna

## **b. Muestreos:**

### ***b.1. Muestreos para el monitoreo de VIA en múltiples etapas de producción***

#### **I. Muestreos serológicos y moleculares en edades establecidas previamente a la visita de la granja**

El primer muestreo de las Granjas 1 y 2 se realizó con el objetivo de llevar a cabo un análisis serológico-molecular del estado sanitario para VIA en cada granja, en aparente ausencia de signos clínicos evidentes de infección por influenza.

Se recolectaron alrededor de 30 muestras individuales de sangre y secreción nasal de cerdos de 21-28, 42-49, 67-70 y 105-118 ddv y hembras (subdivididas en hembras de primera gestación y hembras de dos o más partos).

Un muestreo similar se realizó en la Granja 3 debido a antecedentes clínicos compatibles con infección por VIA. Se recolectaron muestras individuales de sangre y secreción nasal de 10 animales y dos muestras de fluido oral con cuerda en corrales de cerdos de 44, 68, 90, 120, 150 ddv; 10 muestras de sangre y secreción nasal de lechones de recría de 24 ddv y hembras (cinco hembras de reposición y cinco multíparas).

En la Granja 3 también se recolectaron muestras de secreción nasal de diez animales y dos muestras de fluido oral con cuerda en corrales de cerdos de 51 ddv. Además, se registró la sintomatología en las edades en las cuales se observaron animales con tos o estornudos en reposo durante el muestreo.

#### **II. Recolección de muestras de secreción nasal y fluido oral para estudios moleculares y muestreos serológicos en edades seleccionadas en base a la presencia de signos clínicos**

En el muestreo 2 de la Granja 4 y en las Granjas 5, 6 y 7, las edades estudiadas fueron seleccionadas en base a la presencia de manifestaciones clínicas. En cada una de ellas, se recolectaron diez muestras individuales de secreción nasal, una (Granjas 5 y 7) o dos (Granjas 4 y 6) muestras de fluido oral de corral y se llevó a cabo la estimación del porcentaje de animales/corral con tos-estornudos.

Adicionalmente, de la Granja 4, la semana posterior al muestreo molecular se recibieron muestras de sangre de cinco animales de 20, 40, 70, 90, 120 y 150 ddv y de hembras (incluyendo cachorra y hembras de 1 a 5 partos) para estudios serológicos (Granja 4/muestreo 3).

### III. Recolección de muestras de fluido oral para estudios moleculares en edades seleccionadas en base a la presencia de signos clínicos

Frente a la presencia de brotes agudos o subagudos con incremento en la tasa de manifestaciones clínicas respiratorias se realizaron estudios moleculares recolectando una o dos muestras de fluido oral con cuerda de corral (Granja 1/muestreo 2; Granja 9/muestreo 2 y Granjas 7, 8, 10 y 11) de animales con manifestaciones clínicas, con el objetivo de confirmar la presencia de VIA en las categorías clínicamente afectadas dentro de la granja.

### IV. Obtención de muestreos para estudios anatomo-histopatológicos e inmunohistoquímicos

En algunos eventos de muestreo (Granja 1/muestreo 2; Granja 2/muestreo 2; Granja 4/muestreo 1 y Granja 9/muestreo 1), los estudios moleculares fueron complementados con muestras de pulmones para estudios anatomo-histopatológicos e inmunohistoquímicos recolectadas de animales encontrados muertos a los que se les realizó la necropsia. Las muestras fueron recolectadas simultáneamente a los muestreos moleculares o remitidas por las granjas en plazos de tiempo estrechos, previa o posteriormente a los muestreos moleculares.

#### ***b.2. Muestreos realizados para el monitoreo de VIA en maternidad***

Para evaluar la detección de VIA en lechones pre-destete se realizaron estudios en granjas con manifestaciones clínicas compatibles con infección por VIA en las salas de maternidad.

En la Granja 10 se recolectaron 30 muestras de gasas mamarias de cerdas que se encontraban amamantando lechones de 15-21 ddv. Del total de muestras recolectadas, se incluyeron 10 muestras de cada una de las siguientes categorías: hembras lactantes primíparas, hembras lactantes múltiparas y hembras lactantes nodrizas (con lechones reagrupados, hijos de otras cerdas).

En la Granja 12 se tomaron muestras de gasa mamaria de cuatro cerdas (cerdas a, b, c y d) que se encontraban amamantando lechones con manifestaciones clínicas. Tres de las camadas muestreadas (camadas correspondientes a las cerdas a, b y c) eran de lechones de 6 a 8 ddv y una de ella (camada correspondiente a la cerda d), era de lechones de 17 a 21 ddv. A su vez, se recolectaron muestras individuales de hisopos orofaríngeos de cada uno de los lechones pertenecientes a la camada de las cerdas muestreadas, identificando aquellos hisopos pertenecientes a lechones con tos y/o estornudos al momento del muestreo. De una camada con signos clínicos (camada

correspondiente a la cerda e) se tomaron muestras con hisopos de secreción orofaríngea de los lechones, pero no fue posible la obtención de muestra de gusa mamaria debido al traslado de la cerda a otra sala mientras se realizaba el muestreo.

### ***b.3. Muestréos realizados para el monitoreo de VIA en bioaerosoles***

En la Granja 1, dos semanas después del segundo muestreo (alrededor de cuatro meses del inicio aparente del brote clínico), luego de confirmar la presencia de VIA mediante detección de material genético e IHQ, se recolectaron muestras de bioaerosoles (Granja 1/muestreo 3) en los sitios que alojaban a las categorías con manifestaciones clínicas compatibles con infección con VIA más evidentes (40-45 ddv y 100-120 ddv).

Se recolectó una muestra de aire en cada una de tres salas de recría. En los galpones de desarrollo se recolectaron cinco muestras de aire en corrales seleccionados al azar, siguiendo una distribución en guarda griega.

### ***c. Evaluación clínica de la presencia de tos-estornudos:***

Se registró la presencia o no de animales con tos y/o estornudos de la mayoría de los grupos o corrales de cerdos estudiados. Para esto, primero se observó a los animales antes de inducirlos a moverse y luego se los estimuló a moverse caminando 3 vueltas alrededor del perímetro interno del corral y haciendo palmadas. Luego, se contó la cantidad de animales que estornudaban y/o tosían en un lapso de 5 minutos. El conteo se intentó hacer por animal y no por acceso de tos-estornudo. Es decir, si un mismo animal tosía en tres oportunidades, se contaba como un único evento.

### ***d. Recolección de muestras:***

#### ***d.1. Secreción nasal***

Para la recolección de las muestras de secreción nasal se emplearon hisopos de dacrón. Cada cerdo seleccionado fue sujetado e inmovilizado transitoriamente para introducir el hisopo en cada una de las fosas nasales, rotando suavemente.

Para el caso del primer muestreo realizado en las Granjas 1 y 2, los hisopos se introdujeron secos en las fosas nasales de los cerdos seleccionados, y luego, la punta fue colocada en un criotubo rotulado, con medio de transporte viral (constituido por 1 ml de solución Buffer Fosfato Salino (PBS) con penicilina 10,000 UI/ml, estreptomina 10,000 µg/ml y albumina 25 mg/ml). Las muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio.

En el resto de los muestreos, inmediatamente antes de tomar la muestra, los hisopos se embebieron en el medio de transporte viral (DMEM: Medio de Cultivo Eagle

Modificado de Dulbecco suplementado con albúmina fetal bovina, tripsina, antibióticos y antimicóticos) y luego se introdujeron en las fosas nasales de los cerdos. Posteriormente se rotularon y refrigeraron hasta su traslado al Servicio de Biología Molecular (FCV-UNR).

Siempre que fue posible, las muestras se recolectaron de aquellos cerdos que presentaban manifestaciones clínicas compatibles de infección por VIA (estornudos, tos, secreción nasal serosa, decaimiento). Cuando no se observaron suficientes animales con signos clínicos, se eligieron cerdos al azar hasta completar el tamaño muestral establecido.

#### d.2. Secreción orofaríngea:

Las muestras individuales de secreciones orofaríngeas se obtuvieron mediante la apertura manual de la boca del cerdo y la introducción de un hisopo de dacrón seco por la cavidad oral hasta llegar a la faringe, girándolo suavemente para recolectar las secreciones orofaríngeas.

Las muestras se rotularon identificando la camada a la que correspondía el animal muestreado y si presentaba o no signos clínicos al momento del muestreo.

#### d.3. Fluido oral obtenido con cuerdas:

Al momento de los muestreos, en cada granja estudiada, se identificaron las edades de los cerdos que aparentaban estar cursando la enfermedad en base a la presencia de manifestaciones clínicas y/o antecedentes de hallazgos de lesiones compatibles con infección por VIA en necropsias previas.

En cada edad seleccionada ("grupo"), de acuerdo con el tamaño de las salas o galpones y disposición de los corrales, se recolectaron una o dos muestras de fluido oral con cuerda.

Para la obtención de las muestras se siguió la técnica descrita por Prickett y col. (2008). Se utilizaron cuerdas de algodón neutro de 15 mm de espesor y entre 70-90 cm de largo. Las cuerdas se ataron en la división de los corrales y se dejaron al alcance de los cerdos para que los mismos pudieran masticarlas y embeberlas con fluido oral. Las sogas se colocaron alejadas de bebederos y comederos, con los cabos a la altura de la articulación del hombro (escapulohumeral) de los cerdos y se dejaron al acceso de los animales durante 30 minutos (Imagen 2 y 3). Transcurrido el tiempo establecido, las cuerdas se escurrieron en bolsas de plástico y el fluido oral obtenido fue colocado en tubos de centrífuga plásticos estériles con tapa a rosca (tipo Falcon) de 15 o 50 ml. Los tubos fueron rotulados y se mantuvieron refrigerados y en posición vertical hasta su acondicionamiento en el Servicio de Biología Molecular (FCV-UNR).

Imagen 2

*Elementos empleados para la recolección de muestras de fluido oral con cuerdas de algodón.*



Imagen 2. Guantes descartables, bolsa de polietileno, tubo de centrifuga plástico estéril con tapa a rosca (tipo Falcon) y cuerda de algodón neutro.

Imagen 3

*Recolección de muestras de fluido oral de cerdos con cuerda de algodón.*



Imagen 3. Cerdos de corrales contiguos mordiendo una cuerda de algodón atada en la división de corrales.

#### d.4. Fluido oral y secreción nasal de lechones en maternidad obtenidos mediante empleo de gasas mamarias:

Para la obtención de muestras de fluido oral y secreción nasal de lechones en maternidad con gasas mamarias se utilizó la técnica descrita por Garrido-Mantilla y col. (2019).

Se emplearon gasas de algodón estéril de 10 cm x 10 cm, embebidas en medio de transporte viral (DMEM suplementado con albúmina fetal bovina, tripsina, antibióticos y antimicóticos).

Cada gasa se pasó por la piel de la ubre de la cerda que se encontraba amamantando a los lechones que se deseaban estudiar y posteriormente se colocó en una bolsa plástica estéril con cierre a presión, la cual contenía 10 ml del mismo medio de transporte viral. La bolsa fue identificada individualmente, registrando el número de parto de la cerda; si la camada era propia, adoptada o reagrupada; tamaño de la camada y número de lechones que presentaban manifestaciones clínicas.

Las muestras se trasladaron refrigeradas al Servicio de Biología Molecular (FCV-UNR).

#### d.5. Aire:

Para la obtención de muestras de aire se utilizó un colector ciclónico líquido (Midwest Micro Tek, Brookings, SD, EE. UU.) cedido por el College of Veterinary Medicine, University of Minnesota (CVM/UMN).

El aparato fue validado previamente para la detección de VIA aerosolizado en el CVM/UMN por Corzo y col. (2012), quienes informaron un límite de detección estimado en  $10^1$  TCID<sub>50</sub>/ml.

El colector ciclónico líquido (Imagen 4) es un aparato que está formado por una base plana y cuadrada de aluminio con orificios dispuestos en forma de círculo en su parte central y cuatro pequeñas patas al cual se unen: a) una fuente de energía eléctrica, b) una turbina plástica alimentada por un motor eléctrico y cubierta por el recipiente de recolección, y c) un recipiente de recolección extraíble, con forma de cuenco y abierto en la parte inferior central, donde se coloca un medio líquido para la recolección de muestras.

Cuando el colector está funcionando, el aire es aspirado desde abajo del recipiente de recolección hacia el interior de este, donde está el medio líquido. La turbulencia crea un efecto de mezcla entre el aire y el líquido. Luego, el aire sale a través de los orificios superiores de la estructura de aluminio. Como resultado, las partículas presentes en el aire se mezclan con el medio líquido (Imagen 5) (Corzo y col., 2014).

Imagen 4  
*Colector ciclónico líquido.*

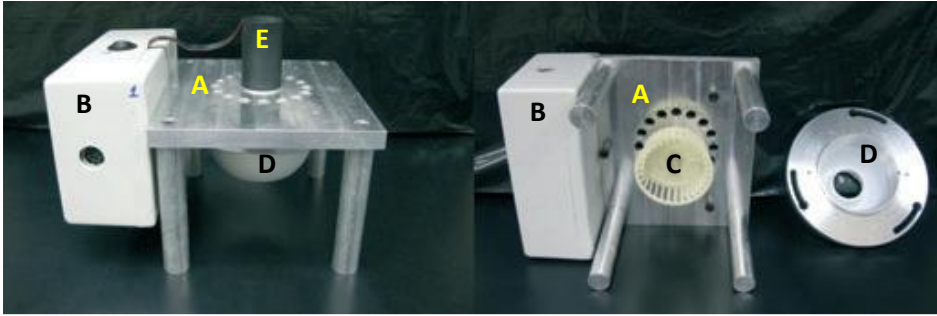


Imagen 4. Fuente: Corzo y col. (2014). A. Base de aluminio con orificios; B. Fuente de energía eléctrica; C. Turbina plástica; D. Recipiente de recolección; E. Motor.

Imagen 5  
*Esquema del funcionamiento del colector ciclónico líquido.*

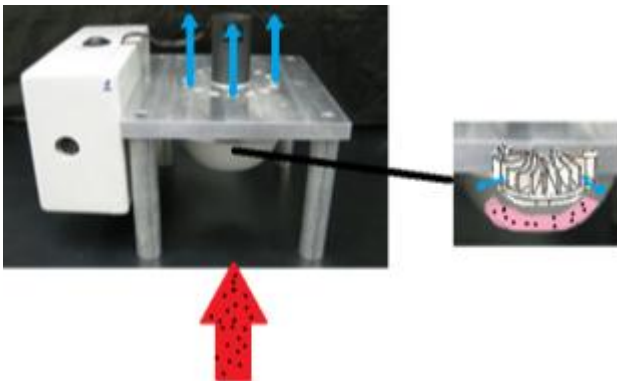


Imagen 5. Adaptada de Corzo y col. (2014).

La técnica empleada para la obtención de muestras fue similar a la descrita por Corzo y col. (2014). En el recipiente de recolección se colocaron 10 ml de un medio líquido a base de DMEM, suplementado con albúmina sérica bovina (ASB) al 4 %, antibióticos, antimicóticos y tripsina. El aparato se suspendió a 1,5 m del suelo y se dejó funcionando durante 30 minutos (Imagen 6). El medio líquido obtenido en cada muestreo se recolectó con una jeringa estéril y se colocó en un tubo de centrifuga de plástico estéril con tapa a rosca (tipo Falcon) de 15 ml.

Luego de la obtención de cada muestra el aparato se lavó, desinfectó y se recolectaron controles para verificar la limpieza del equipo pasando un hisopo estéril por el recipiente recolector, cuyo extremo se colocó en un criovial con medio de transporte viral estéril.

También, entre las diferentes recolecciones, se procedió al cambio de los guantes de la persona que operaba el equipo para evitar contaminaciones cruzadas.

En cada una de las tres salas de cría de la granja estudiada, el colector se colocó en el centro de la sala, aproximadamente. En los galpones de desarrollo se recolectaron cinco muestras de aire en el centro de corrales seleccionados en una distribución al azar en guarda griega.

Las muestras y controles fueron rotuladas y trasladadas refrigerados al laboratorio para su acondicionamiento.

Imagen 6

*Obtención de muestras de bioaerosol mediante colector ciclónico líquido (Ciclonic Midwest Micro Tek, Brookings, SD, EE. UU.) en cerdos de engorde.*



#### d.6. Sangre:

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena cava craneal y/o venas yugulares. Cada muestra se colocó en un tubo de ensayo de plástico de 5 ml con tapa (tipo Khan), rotulado y sin anticoagulante. Luego se transportaron refrigeradas al laboratorio del Servicio de Asesoramiento Sanitario en Porcinos (FCV-UNR).

#### d.7. Necropsia y obtención de muestras para HP e IHQ

Se realizó la necropsia de los cerdos encontrados muertos durante las visitas a las granjas. Cuando las lesiones fueron compatibles con infección por VIA se llevó a cabo la recolección de muestras de pulmón, las cuales se colocaron en recipientes con formol bufferado al 10 % y se trasladaron al Servicio de Anatomía Patológica e histopatología (FCV-UNR).

#### **e. Acondicionamiento de muestras:**

##### e.1. Secreción nasal y secreción orofaríngea:

El extremo de cada hisopo se cortó y colocó dentro de un microtubo de centrifuga (tipo eppendorf) de 2 ml rotulado y con 1,5 ml de medio de transporte viral. Se agitaron con vórtex durante 15 segundos y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

##### e.2. Fluido oral obtenido con cuerdas:

En el SBM-FCV/UNR, las muestras de fluido oral se mantuvieron refrigeradas en posición vertical durante un período máximo de 24 h desde el momento de su recolección en la granja para favorecer la sedimentación de partículas de polvo, restos de alimento, materia fecal, etc.

A partir del sobrenadante se obtuvieron alícuotas de 1,5 ml que se colocaron en microtubos de centrifuga (tipo eppendorf) de 2 ml rotulados y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

##### e.3. Fluido oral y secreción nasal de lechones en maternidad obtenidos con gasas mamarias:

Para favorecer el desprendimiento de las partículas virales, la gasa que estaba dentro de la bolsa con medio de transporte se frotó sobre sí varias veces y luego se escurrió desde el exterior para liberar el líquido absorbido. Posteriormente, se obtuvieron alícuotas de 1,5 ml del medio líquido que fueron colocadas en microtubos de centrifuga (tipo eppendorf) de 2 ml rotulados. Se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

##### e.4. Aire:

A partir de las muestras de aire se obtuvieron alícuotas de 1,5 ml que fueron colocadas en criotubos con tapa a rosca de 2 ml. Se rotularon y almacenaron a -196 °C, en termo de nitrógeno líquido, hasta su procesamiento.

#### e.5. Sangre:

Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 g – 1600 g durante 10-15 minutos a temperatura ambiente para la obtención del suero, del cual se obtuvieron alícuotas de 1,5 ml que fueron colocadas en microtubos de centrifuga (tipo eppendorf) de 2 ml rotulados y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

#### e.6. Muestras de pulmón para HP e IHQ:

Las muestras obtenidas en las necropsias durante las visitas a las granjas o las muestras refrigeradas de pulmones remitidas por el personal a cargo de las granjas se colocaron en formol bufferado al 10 % durante 24 h para su fijación y posterior procesamiento.

#### **f. Procesamiento de muestras:**

##### **f.1. Técnicas de biología molecular:**

Las muestras de secreción nasal, secreción orofaríngea, fluido oral y secreción nasal de lechones en maternidad obtenidos mediante empleo de gasas mamarias, fluido oral obtenido con cuerdas y aire fueron procesadas mediante técnicas de biología molecular.

##### l. Extracción de ARN:

En todos los casos, con excepción de las muestras obtenidas en las Granjas 1 y 2, y en los muestreos realizados para el monitoreo de VIA en maternidad (Granjas 10 y 12), la extracción del ARN se llevó a cabo en el SBM-FCV/UNR. Se realizó la extracción individual del ARN de cada muestra con TRIzol LS™, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

*Granjas 1 y 2- muestreo 1:* las muestras de secreción nasal se procesaron en el Laboratorio de aves y porcinos del Instituto de virología del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar. Se armaron grupos de hasta cinco muestras de animales de la misma categoría. La extracción del ARN del grupo de hisopos se hizo empleando el kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

*Granja 1- muestreo 2 y 3 y Granja 2- muestreo 2:* la extracción del ARN de cada muestra individual se realizó en el SBM-FCV/UNR empleando el kit comercial RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) (anexo 5), según las indicaciones del fabricante. El extracto de ARN obtenido se colocó en tarjetas FTA (Ambion® Whatman® FTA® Cards), se dejaron secar al aire y almacenaron a temperatura ambiente, protegidas de

la luz solar, hasta su procesamiento por qRT-PCR en el Department of Veterinary Population Medicine (VPM) del College of Veterinary Medicine, University of Minnesota (CVM/UMN).

*Granja 10:* la extracción de ARN de cada muestra se realizó en el Servicio de Biología Molecular (FCV-UNR) empleando el kit comercial High Pure Viral RNA (Cat. Nro. 11858882001, Roche™) (anexo 2), según las indicaciones del fabricante y se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento.

*Granja 12:* las muestras de gasas mamarias se procesaron en el Laboratorio de diagnóstico en enfermedades virales y bacterianas en cerdos – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Marcos Juárez. Cada una de las muestras de gasas mamarias se procesó individualmente. Las muestras de secreción orofaríngea se procesaron en grupos de entre 2 y 4 muestras de lechones de la misma camada, y subdivididos de acuerdo con la presencia o ausencia de signos clínicos.

#### II. RT-PCR para detección del gen matriz de VIA:

Con excepción de las muestras obtenidas en los muestreos 1 y 2 de las Granjas 1 y 2, y en el muestreo en maternidad de la Granjas 12, para la RT-PCR para detección del gen matriz de VIA del resto de las muestras se utilizó el kit comercial SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen™) (anexo 3) con los cebadores: 5'- AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG- 3' y 5'- AGGATCACT TGA ATC GCT GCA TCT- 3'. Se empleó el termociclador MultiGene™ Mini Personal Thermal Cycler (Labnet International, Inc.) con las siguientes condiciones de termociclado: 42 °C por 60 min, 94 °C por 2 min, luego 40 ciclos de 94 °C por 15 seg, 49 °C por 30 seg y 68 °C por 1 min. Finalmente 68 °C por 5 min. El producto obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1 % usando como agente intercalante de ADN el SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™) (anexo 4) y se observó bajo luz ultravioleta.

*Granjas 1 y 2, muestreo 1:* para la qRT-PCR se emplearon los siguientes cebadores: InfAfw (5'-GACCRATCCTGTACCTCTGAC-3') y InfArv (5'-AGGGCATTYTGACAAKCGTCTA-3') y la sonda InfA TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG. El producto amplificado consistió en un segmento de 60 pares de bases del gen matriz (M). Se usó el equipo ABIPrism® 7500 SDS (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA).

*Granja 1, muestreo 2 y 3; Granja 2 muestreo 2:* en el Department of Veterinary

Population Medicine DVPM del CVM/UMN para recuperar el extracto de ARN de las tarjetas se empleó la solución comercial RNA Rapid Extraction Solution (Ambion®, Applied Biosystems, Foster City, CA) (anexo 6) siguiendo las indicaciones del fabricante. El producto obtenido se usó como templado para realizar la qRT-PCR.

Para la qRT-PCR para detección del gen matriz de VIA se usaron el kit comercial AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems™ Cat. No. 4387391) (anexo 7), los siguientes cebadores: M+25 Forward Primer 5' → 3': AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG; M-124 Reverse Primer 5' → 3': TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG y la sonda M+64 Probe 5' → 3': FAM/TCA GGC CCC /ZEN/CTC AAA GCC GA / IABk®FQ. La qRT-PCR se corrió en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™) a 45 °C durante 10 minutos, seguido de 95 °C durante 10 minutos y 45 ciclos a 94 °C durante 1 segundo y 60 °C durante 30 segundos. Una muestra fue considerada positiva cuando del valor del Ct fue ≤ 35. Las muestras con un valor Ct entre 35 y 40 se consideraron sospechosas y aquellas con un Ct > 40, negativas.

*Granja 12:* las muestras de gasas mamarias se procesaron mediante qRT-PCR para detección del gen matriz de VIA en el Laboratorio de diagnóstico en enfermedades virales y bacterianas en cerdos del INTA Marcos Juárez.

#### f.2. Serología:

Las muestras de suero se analizaron mediante ELISA indirecto, empleando el kit comercial para detección de anticuerpos contra la NP de VIA "CIVTEST® SUI INFLUENZA" (Laboratorios Hipra S.A., España) (anexo 8), siguiendo las indicaciones del fabricante. La densidad óptica se midió en un lector de ELISA a 405 nm de longitud de onda (Labsystems Multiskan EX, Finlandia).

#### f.3. Histopatología:

Las muestras fijadas en formol al 10 % se procesaron para histopatología por métodos de rutina, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron con microscopio óptico. En cada corte histológico se analizaron la pleura, el tejido conjuntivo, bronquios, bronquiolos y alvéolos a una magnificación de 4x a 40x.

#### f.4. Inmunohistoquímica para detección de NP de VIA:

A partir de las muestras de pulmón fijadas en formol al 10 % durante 24-48 h y posteriormente incluidas en parafina por métodos histológicos de rutina, se realizaron cortes de 4 µm, los cuales fueron montados sobre portaobjetos xilanizados. Para el

bloqueo de la peroxidasa se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La recuperación antigénica se llevó a cabo con proteinasa K (Promega, Cat. Nro. V3021) (anexo 9) durante 25 min a 37 °C.

El bloqueo de las uniones inespecíficas se hizo con 25 mg de leche descremada en polvo/ml de PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente.

Se utilizó el anticuerpo primario monoclonal anti-influenza A (Mouse Anti-Influenza A, Millipore Corporation) en dilución 1:500 a 4 °C durante toda la noche y el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón conjugado con biotina, Código AM-B1 (Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral: LEyTH, FBCB/UNL) en dilución 1:100 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Como sistema de detección se empleó el Sistema de revelado Código AB-P1 (LEyTH, FBCB/UNL), según indicaciones del fabricante y el sustrato cromogénico diaminiobencidina (DAB) (Liquid DAB + Substrate. Dako Cytomation, Cat Nro. k3468) (anexo 10) para el revelado final. Como control negativo de tejido se utilizó pulmón de lechones nacidos muertos no calostrados y como control positivo se emplearon cortes cedidos por Servicio de Anatomía Patológica, FCV de la Universidad Nacional de La Plata. Además, como control negativo de la técnica (para descartar marcajes inespecíficos) se procesó un control positivo, pero se exceptuó de la técnica la incubación con el anticuerpo primario y en su lugar se incubó con PBS.

#### ***g. Análisis estadístico:***

Un tamaño de muestra de 30 permite detectar, con un 95 % de confianza al menos un animal positivo si la prevalencia dentro de cada categoría es del 10% o más (Diaz y col., 2015).

Un tamaño de muestra de 10 permite detectar, con un 95 % de confianza, al menos un animal positivo cuando la prevalencia es mayor o igual a 26 % en una población de entre 40 y 2100 individuos ([www.winepi.net](http://www.winepi.net)).

Un tamaño de muestra de 5 permite detectar, con un nivel de confianza del 95 %, al menos un animal positivo, en una población de 20 o más individuos, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 50 % ([www.winepi.net](http://www.winepi.net)).

Si bien se emplearon técnicas de RT-PCR y qRT-PCR, para el cálculo del tamaño de muestras no se realizaron estudios probabilísticos que tuvieran en cuenta la sensibilidad de cada técnica.

La información obtenida en relación con la presencia de signos clínicos y detección de VIA mediante RT-PCR de muestras de secreción nasal y fluido oral con cuerdas se

analizó considerando como detección o no de VIA en el evento de muestreo.

Definimos como evento de muestreo al conjunto de animales de una edad determinada, dentro de una granja, de la cual se recolectaron muestras en un momento específico. Cuando al menos una muestra de fluido oral y/o secreción nasal de un evento fueron positivos, se consideró al evento de muestreo positivo, con detección de VIA para esa edad dentro de la granja en estudio. Los casos sospechosos fueron considerados negativos.

Para el análisis, los datos de los muestreos de todas las granjas en conjunto y de cada granja individualmente se agruparon de acuerdo con la edad o categoría de los animales: menores de 34 ddv, animales entre 35 a 70 ddv y entre 71 y 205 ddv, hembras de reposición y cerdas reproductoras.

La asociación entre variables se realizó a través del cálculo del estadístico Test de Fisher.

## 6. RESULTADOS

### 6. A. PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN DE VIA EN LA FACULTAD DE CS. VETERINARIAS – UNR

#### a. Evaluación de dos productos comerciales para la extracción de ARN a partir de una muestra con alta concentración viral y de muestras de fluido oral

En las extracciones realizadas a partir del sobrenadante del aislamiento viral, si bien ambos productos comerciales permitieron extraer ARN suficiente para la detección de VIA, las bandas observadas en el gel de agarosa fueron más intensas para los productos de RT-PCR de los extractos de ARN obtenidos mediante el empleo de Trizol LS™.

Por otra parte, del total de muestras de fluido oral analizadas, los resultados de la RT-PCR realizada a partir de los templados obtenidos con los dos kits de extracción coincidieron para todas las muestras, excepto una que resultó negativa mediante el empleo de Trizol LS™ y positiva con el empleo de High Pure Roche™ (Tabla 2).

El valor del Índice Kappa de Cohen como medida de la concordancia entre los dos kits de extracción para las muestras de fluido oral fue de  $K = 0,897$ , lo que se interpreta como un grado de acuerdo excelente.

Tabla 2

*Concordancia en los resultados de RT-PCR para detección de VIA realizada a partir de extractos de ARN de muestras de fluido oral obtenidos con dos productos de extracción de ARN comerciales.*

	RT-PCR Trizol LS (+)	RT-PCR Trizol LS (-)	Total
RT-PCR High Pure Viral RNA (+)	7	1	8
RT-PCR High Pure Viral RNA (-)	0	13	13
Total	7	14	21

**Nota.** RT-PCR Trizol LS (+): detección de ARN de VIA por RT-PCR de templados obtenidos con Trizol LS Reagent, Invitrogen™; RT-PCR Trizol LS (-): ausencia de detección de ARN de VIA por RT-PCR de templados obtenidos con Trizol LS Reagent, Invitrogen™; RT-PCR High Pure Viral RNA (+): detección de ARN de VIA por RT-PCR de templados obtenidos con High Pure Viral RNA, Roche™; RT-PCR High Pure Viral RNA (-): ausencia de detección de ARN de VIA por RT-PCR de templados obtenidos con High Pure Viral RNA, Roche™

#### b. Evaluación del efecto de dilución del templado de ARN sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral

Los resultados de la RT-PCR realizada a partir de los extractos de ARN obtenidos con Trizol LS™ puros y diluidos al 50 % coincidieron para la mayoría de los casos.

En su mayoría, las bandas visualizadas en el gel de agarosa del producto de RT-PCR al usar el templado puro eran más intensas. Para una muestra, la RT-PCR del

templado puro fue negativa, mientras que la del mismo templado diluido al 50 % fue positiva (Tabla 3).

El valor del Índice kappa de Cohen como medida de la concordancia entre el uso del templado de ARN puro y el uso del templado de ARN diluido al 50 % en agua libre de ARNasas fue de  $K = 0,917$ , lo que se interpreta como un grado de acuerdo excelente.

Tabla 3

*Concordancia en los resultados de RT-PCR realizada a partir de los templados de ARN obtenidos de muestras de fluido oral puros y diluidos al 50% con agua libre de ARNasas.*

	RT-PCR ARN <sub>1</sub> (+)	RT-PCR ARN <sub>1</sub> (-)	Total
RT-PCR ARN 0.5 (+)	8	1	9
RT-PCR ARN 0.5 (-)	0	20	20
Total	8	21	29

**Nota.** RT-PCR ARN puro: RT-PCR sobre los templados de ARN obtenidos de muestras de fluido oral puros (ARN<sub>1</sub>); RT-PCR ARN 0.5: RT-PCR sobre los templados de ARN obtenidos de muestras de fluido oral, diluidos al 50% con agua libre de ARNasas (ARN<sub>0.5</sub>); (+): detección de ARN de VIA; (-): ausencia de detección de ARN de VIA.

### **c. Evaluación del efecto de dilución del templado de ARN y la concentración de la mezcla de enzimas en la RT-PCR sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral**

No hubo diferencias entre ensayos en los resultados de RT-PCR observados en el gel de agarosa (Tabla 4).

Tabla 4

*Resultados RT-PCR de templados de ARN obtenidos de muestras de fluido oral, puros y diluidos, con la concentración de enzimas indicada por el fabricante y al doble de dicha concentración.*

Muestra	ARN <sub>1</sub> , E <sub>1x</sub>	ARN <sub>0.5</sub> , E <sub>1x</sub>	ARN <sub>1</sub> , E <sub>2x</sub>	ARN <sub>0.5</sub> , E <sub>2x</sub>
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	+	+	+	+

**Nota.** RT-PCR sobre los templados de ARN obtenidos de muestras de fluido oral, puros (ARN<sub>1</sub>) y diluidos al 50% con agua libre de ARNasas (ARN<sub>0.5</sub>), empleando la mezcla de enzimas de acuerdo con las indicaciones del fabricante (E<sub>1x</sub>) y al doble de dicha concentración (E<sub>2x</sub>).

## **6.B. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE MONITOREO PARA DETECCIÓN DE VIA EN GRANJAS PORCINAS**

### ***a. Muestreos para el monitoreo de VIA en múltiples etapas de producción***

En la tabla 5 se presentan resumidos los eventos de recolección de muestras, detallando la situación respecto a manifestaciones clínicas, el tipo de muestra recolectada y su resultado para la detección de VIA, de acuerdo con la granja, muestreo y edad de los cerdos.

Tabla 5

Eventos de recolección de muestras y resultados respecto a manifestaciones clínicas, identificación de VIA y/o detección de anticuerpos anti-VIA, de acuerdo con la granja, muestreo y edad de los cerdos estudiados.

Granja- muestreo		21-34	35-70			71-203			H. rep	H. 1°gest.	H. mult.
G1-M1		21-28	42-49		67-70	105-118				H. 1°gest.	H. mult.
SC		(-)	(+)		(+)	(-)				(-)	(-)
SN (n=30) (*)		(-) (0/6)	(-) (0/6)		(+) (1/6)	(-) (0/6)				(+) (1/3)	(-) (1/3)
Sue (n=30)		(+)	(+)		(+)	(+)				(+)	(+)
G1-M2			44			100	120				
SC			(+)			(+)	(+)				
FO			(+)			(-)	(-)				
IHQ					(+)		(+)				
G2-M1		21-28	42-49		67-70	105-118				H. 1°gest.	H. mult.
SC		(-)	(+)		(-)	(+)				(-)	(-)
SN (n=30) (*)		(-) (0/6)	(+) (1/6)		(-) (0/6)	(+) (1/6)				(-) (0/3)	(-) (0/3)
Sue (n=30)		(+)	(-)		(+)	(+)				(+)	(+)
G2 - M2				45-60	45-60	103	130	145			
IHQ				(+)	(+)	(+)	(+)	(+)			
G3		24	44	51	68	90	120	150		H. 1°gest.	H. mult.
SC		(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)		(-)	(-)
SN (n=10)		(+) (n=10)	(-) (n=10)	(-) (n=10)	(-) (n=10)	(-) (n=10)	(-) (n=10)	(-) (n=10)		(-) (n=5)	(-) (n=5)
FO (n=2)			(-) (n=2)	(+) (n=2)	(-) (n=2)	(-) (n=2)	(+) (n=2)	(-) (n=2)			
Sue (n=10)		(+) (n=10)	(+) (n=10)		(+) (n=10)	(+) (n=10)	(+) (n=10)	(-) (n=10)		(+) (n=5)	(+) (n=5)

**Nota.** SC (signos clínicos) (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo. SC (-): ausencia de animales con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SN (secreción nasal) (+): detección de VIA en una o más muestras de secreción nasal de los cerdos del evento de muestreo mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) para detección del gen matriz de virus de Influenza A (VIA). FO (fluido oral) (+): detección de VIA en una o dos muestras de fluido oral de corrales dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR; IHQ: inmunohistoquímica; H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o múltiparas; S/D: sin datos. (\*): muestras procesadas por qRT-PCR en grupos de cinco. Para cada

Tabla 5 (continuación)

Eventos de recolección de muestras y resultados respecto a manifestaciones clínicas, identificación de VIA y/o detección de anticuerpos anti-VIA, de acuerdo con la granja, muestreo y edad de los cerdos estudiados.

Granja- muestreo	21-34	35-70				71-203			Hembras
G4 - M1		61				107	117	158	
IHQ		(+) (1/1)				(+) (1/1)	(+) (1/1)	(+) (1/1)	
G4- M2	22	36	43	61		124		152	
SC	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)	(+)		
SN	(+) (1/10)	(-) (0/10)	(+) (8/10)	(-) (0/10)		(-) (0/10)	(-) (0/10)		
FO	(+) (2/2)	(+) (1/2)	(+) (1/2)	(-) (0/2)		(-) (0/2)	(+) (1/2)		
G4- M3	21	40	70		90	120	150		
5 n/edad	(-) (0/5)	(-) (0/5)	(-) (0/5)		(-) (0/5)	(-) (0/5)	(+) (2/5)	(-) (0/5)	
G5		35	42	56		77	112	203	
SC		(+)	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)	
SN		(-) (0/10)	(-) (0/10)	(-) (0/10)		(-) (0/10)	(-) (0/10)	(-) (0/10)	
FO		(+) (1/1)	(-) (0/1)	(-) (0/1)		(-) (0/1)	(-) (0/1)	(-) (0/1)	
G6		37	58		98	106			
SC		(+)	(+)		(+)	(+)			
SN		(-) (0/10)	(+) (1/10)		(-) (0/10)	(-) (0/10)			
FO		(+) (2/2)	(+) (2/2)		(-) (0/2)	(+) (1/2)			
G7		35	42	49	56	63			
SC		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)			
SN		(-) (0/10)	(-) (0/10)		(+) (1/10)				
FO		(-) (0/1)	(-) (0/1)	(-) (0/1)	(-) (0/1)	(+) (1/1)			

**Nota.** SC (signos clínicos) (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo. SC (-): ausencia de animales con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SN (secreción nasal) (+): detección de VIA en una o más muestras de secreción nasal de los cerdos del evento de muestreo mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) para detección del gen matriz de virus de Influenza A (VIA). FO (fluido oral) (+): detección de VIA en una o dos muestras de fluido oral de corrales dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR; IHQ: inmunohistoquímica; H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o múltiparas; S/D: sin datos.

Tabla 5 (continuación)

Eventos de recolección de muestras y resultados respecto a manifestaciones clínicas, identificación de VIA y/o detección de anticuerpos anti-VIA, de acuerdo con la granja, muestreo y edad de los cerdos estudiados.

Granja-muestreo	21-34			35-70		71-203			H. rep	H. 1°gest. H.mult.
G8	28	35	42							
SC	(+)	(+)	(+)							
FO	(+) (1/1)	(+) (1/1)	(+) (1/1)							
G9- M1	S/D									
IHQ	(+)									
G9- M2	27	33	40	48	55	100	120			
SC	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)			
FO	(+) (1/1)	(+) (1/1)	(-) (0/1)	(-) (0/1)	(-) (1/1)	(-) (1/1)	(-) (1/1)			
G10 - Sitio 1		35			63-70		125	150	180	H. rep (200 ddv)
SC		(+)			(+)		(+)	(+)	(+)	(+)
FO		(-) (0/2)			(-) (0/1)		(-) (0/1)	(-) (0/1)	(-) (0/1)	(-) (0/1)
G10 - Sitio 2	25	35-40		60						
SC	(+)	(+)		(+)						
FO	(+) (2/2)	(+) (2/2)		(-) (0/2)						
G11						102	109	116		H. rep
SC						(+)	(+)	(+)		(+)
FO						(+) (2/2)	(-) (0/2)	(-) (0/2)		(+) (1/2)

**Nota.** SC (signos clínicos) (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo. SC (-): ausencia de animales con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SN (secreción nasal) (+): detección de VIA en una o más muestras de secreción nasal de los cerdos del evento de muestreo mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) para detección del gen matriz de virus de Influenza A (VIA). FO (fluido oral) (+): detección de VIA en una o dos muestras de fluido oral de corrales dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR; IHQ: inmunohistoquímica; H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o multíparas; S/D: sin datos.

### a.1. Manifestaciones clínicas

Excepto en el caso del muestreo 1 de las Granjas 1 y 2, todas las visitas a las granjas estudiadas para la recolección de muestras se realizaron debido al reporte de manifestaciones clínicas compatibles con infección por VIA. Incluso, si bien el muestreo 1 de las Granjas 1 y 2 fue programado sin considerar la presencia de signos clínicos por parte del personal de las granjas en cuestión, al momento de la visita, en cada uno de estos dos criaderos había corrales con cerdos con manifestaciones clínicas respiratorias compatibles con infección por VIA.

En la tabla 6 se resume la distribución de frecuencia de los eventos de muestreo con presencia de uno o más animales con signos clínicos, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los grupos de cerdos analizados en las 11 granjas estudiadas.

Tabla 6

*Distribución de frecuencia de los eventos de muestreo con presencia de uno o más animales con signos clínicos, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los grupos de cerdos analizados en las 11 granjas estudiadas.*

Eventos SC (+)	Edad (días de vida) o categoría					Total
	21-34	35-70	71-205	H. rep	H. ≥ 1 gest.	
Número	5	28	20	2	0	55
Porcentaje (%)	9,09	50,91	36,36	3,64	0,00	100,00

**Nota.** SC (+): eventos de muestreo, para un rango de edad o categoría estudiada, con presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas. H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o múltiparas.

### a.2. RT-PCR/q RT-PCR de muestras de secreción nasal

La tabla 7 y el gráfico 1 resumen la frecuencia general de detección de material genético de virus de Influenza A mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal de acuerdo con la edad o categoría estudiada, obtenidos en siete muestreos (G1-M1, G2-M1, G3, G4-M2, G5, G6 y G7).

Tabla 7

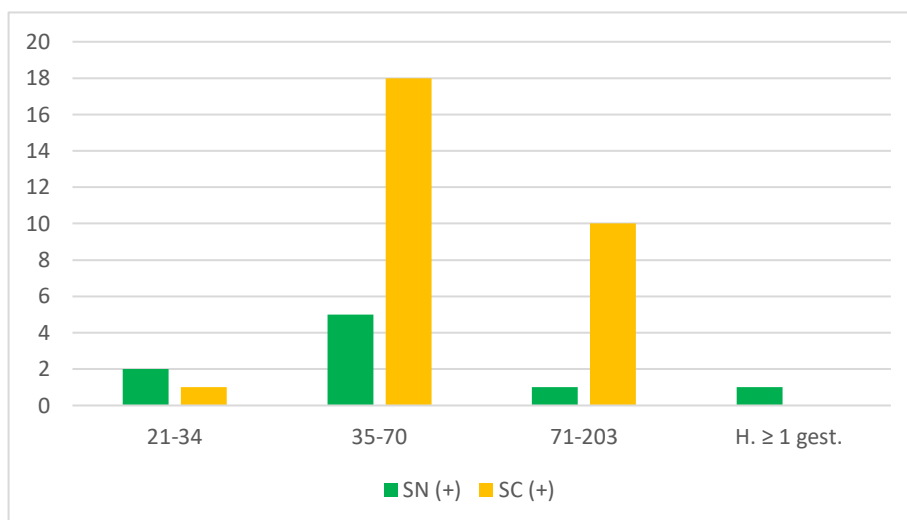
*Frecuencia de detección de material genético de virus de Influenza A mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal de acuerdo con la edad o categoría estudiada, obtenidos en conjunto en -M1, G2-M1, G3, G4-M2, G5, G6 y G7.*

Eventos SN RT-PCR (+)	Edad (días de vida) o categoría					Total
	21-34	35-70	71-205	H. rep	H. ≥ 1 gest.	
Número	2	5	1	0	1	9
Porcentaje (%)	22,22	55,56	11,11	0,00	11,11	100,00

**Nota.** Eventos SN RT-PCR (+): detección de VIA en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR. H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o múltiparas.

Gráfico 1

Distribución de frecuencia de eventos de muestreo con al menos un animal con manifestaciones clínicas respiratorias y eventos con detección de VIA en muestras de secreción nasal, obtenidos en G1-M1, G2-M1, G3, G4-M2, G5, G6 y G7.



**Nota.** SC (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SN (+): detección de VIA en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR; ddd: días de vida.

La tabla 8 muestra la tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los cerdos estudiados en muestreos a edades fijas (G1-M1, G2-M1 y G3). Como puede observarse, la tasa general de detección fue de 23,80 % y varió entre 0 y 33,33 %.

Tabla 8

Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los cerdos estudiados en muestreos a edades fijas (G1-M1, G2-M1 y G3).

RT-PCR	Edad (días de vida) o categoría					Total
	21-34	35-70	71-203	H. 1°gest.	H. mult.	
Positiva	1	2	1	1	0	5
Total	3	7	5	3	3	21
Tasa detección (%)	33,33	28,57	20	33,33	0,00	23,80

**Nota.** RT-PCR positiva: detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo. H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o multíparas.

La tabla 9 muestra la tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los cerdos estudiados en base a la presencia de signos clínicos (G4-M2, G5, G6 y G7). La tasa de detección global fue de 21,05 %, pero osciló entre 0 y 100 %.

Tabla 9

*Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras individuales de secreción nasal, de acuerdo con el rango de edad o categoría de los cerdos estudiados en base a la presencia de signos clínicos (G4-M2, G5, G6 y G7).*

RT-PCR	Edad (días de vida) o categoría					
	21-34	35-70	71-203	H. rep	H. ≥ 1 gest.	Total
Positiva	1	3	0	S/D	S/D	4
Total	1	11	7	S/D	S/D	19
Tasa detección (%)	100	27,27	0,00	S/D	S/D	21,05

**Nota.** RT-PCR positiva: detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo. H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o múltiparas. S/D: sin datos

En la tabla 10 se presentan resumidas las tasas de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de secreción nasal. En conjunto, en 7 eventos, los animales presentaban signos clínicos y se detectó material genético de VIA en una o más muestras de secreción nasal. En dos eventos, a pesar de que no se observaron manifestaciones clínicas respiratorias, el ARN de VIA fue detectado en uno o más cerdos estudiados.

La asociación entre los signos clínicos y la detección de VIA en muestras de secreción nasal no fue significativa ( $p = 1$ ).

Tabla 10

*Tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de secreción nasal en cada evento de muestreo realizados en G1-M1, G2-M1, G3, G4-M2, G5, G6 y G7.*

Signos clínicos, RT-PCR	Edad (días de vida)					
	21-34	35-70	71-203	H. rep	H. ≥ 1 gest	Total
SC (+), SN (+)	1	5	1	S/D	0	7
SC (+), SN (-)	0	11	9	S/D	0	20
SC (-), SN (+)	1	0	0	S/D	1	2
SC (-), SN (-)	2	2	2	S/D	5	11
Total	4	18	12	S/D	6	40
Tasa de acuerdo	75,00	38,89	25,00	S/D	83,33	45,00

**Nota.** SC (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SC (-): ausencia de animales con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SN (+): detección de ANR de VIA en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR. SN (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en las muestras de secreción nasal recolectadas dentro del evento de muestreo. H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o múltiparas; S/D: sin datos.

Al evaluar la tasa de acuerdo general entre la presencia de signos clínicos y la detección de ARN de VIA dentro de cada granja, la misma osciló entre 0 (Granja 5) y 100 % (G2-M1) (Tabla 11).

No hubo asociación significativa entre los signos clínicos y la detección de VIA en muestras de secreción nasal dentro de cada granja ( $p = 0,0667$  para G2-M1 y  $p = 1$  para el resto de las granjas).

Tabla 11

*Tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de secreción nasal en cada evento de muestreo, de acuerdo con cada granja estudiada.*

Signos clínicos, RT-PCR	Granja							Total
	G1-M1	G2-M1	G3	G4- M2	G5	G6	G7	
SC (+), SN (+)	1	2	0	2	0	1	1	7
SC (+), SN (-)	1	0	4	4	6	3	2	20
SC (-), SN (+)	1	0	1	0	0	0	0	2
SC (-), SN (-)	3	4	4	0	0	0	0	11
Total	6	6	9	6	6	4	3	40
Tasa de acuerdo (%)	66,70	100,00	44,44	33,33	0,00	25,00	33,33	45,00

**Nota.** SC (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SC (-): ausencia de animales con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SN (+): detección de ANR de VIA en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR. SN (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en las muestras de secreción nasal recolectadas dentro del evento de muestreo. G: Granja; M: muestreo.

### a. 3 RT-PCR/q RT-PCR de muestras de fluido oral obtenido con cuerdas

Del total de eventos con detección de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral, la mayor proporción se produjo en animales de 35-70 ddd (52,38 %), seguida de los animales de 21-34 ddd (23,81 %) (Tabla 12).

Tabla 2

*Frecuencia de detección de material genético de virus de Influenza A mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales obtenidas con cuerda, de acuerdo con la edad o categoría estudiada (G1-M2, G3, G4-M2, G5, G6, G7, G8, G9-M2, G10 - Sitio 1, G10 - Sitio 2 y G11).*

Eventos FO RT-PCR (+)	Edad (días de vida) o categoría					Total
	21-34	35-70	71-203	H. rep	H. $\geq 1$ gest.	
Número	5	11	4	1	S/D	21
Porcentaje (%)	23,81	52,38	19,05	4,76	S/D	100,00

**Nota.** Eventos FO RT-PCR (+): detección de ANR de VIA en una o dos muestras de fluido oral de corrales dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR. H. rep: hembras de reposición; H.  $\geq 1$  gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o multiparas; S/D: sin datos

Las tablas 13 y 14 muestran las tasas de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales, de acuerdo con la edad de los cerdos estudiados en muestreos a edades fijas (G3, sin considerar las muestras adicionales recolectadas en corrales de cerdos de 51 y 90 ddv debido a la presencia de signos clínicos) y en grupos de cerdos seleccionados en base a la presencia de signos clínicos (G1-M2, G3: 51 ddv y 90 ddv, G4-M2, G5, G6, G7, G8, G9-M2, G10 - Sitio 1, G10 - Sitio 2 y G11), respectivamente.

Tabla 3

*Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales, de acuerdo con la edad de los cerdos estudiados en muestreos a edades fijas (G3).*

RT-PCR	Edad (días de vida) o categoría		
	35-70	71-203	Total
Positiva	0	1	1
Negativa	2	1	3
Total	2	2	4
Tasa de detección (%)	0	50	25

**Nota.** RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa para detección del gen matriz de virus de Influenza A. Positiva: detección de VIA en al menos una muestra de fluido oral dentro del evento de muestreo. Negativa: ausencia de detección de VIA en las muestras de fluido oral del evento de muestreo.

Tabla 4

*Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales, de acuerdo con la edad de los cerdos estudiados seleccionados en base a la presencia de signos clínicos (G1-M2, G3: 51 ddv y 90 ddv, G4-M2, G5, G6, G7, G8, G9-M2, G10 - Sitio 1, G10 - Sitio 2 y G11)*

RT-PCR	Edad (días de vida) o categoría					Total
	21-34	35-70	71-203	H. rep	H. ≥ 1 gest.	
Positiva	5	11	3	1	S/D	20
Negativa	0	13	15	1	S/D	29
Total	5	24	18	2	S/D	49
Tasa de detección (%)	100,00	45,83	16,67	50,00	S/D	40,82

**Nota.** RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa para detección del gen matriz de virus de Influenza A. Positiva: detección de VIA en al menos una muestra de fluido oral dentro del evento de muestreo. Negativa: ausencia de detección de VIA en las muestras de fluido oral del evento de muestreo. H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o multiparas. S/D: sin datos

En la tabla 15 y gráfico 2 se resumen las tasas de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral.

No hubo asociación significativa entre los signos clínicos y la detección de VIA en muestras

de fluido oral de corrales ( $p = 0,51$ ).

Tabla 5

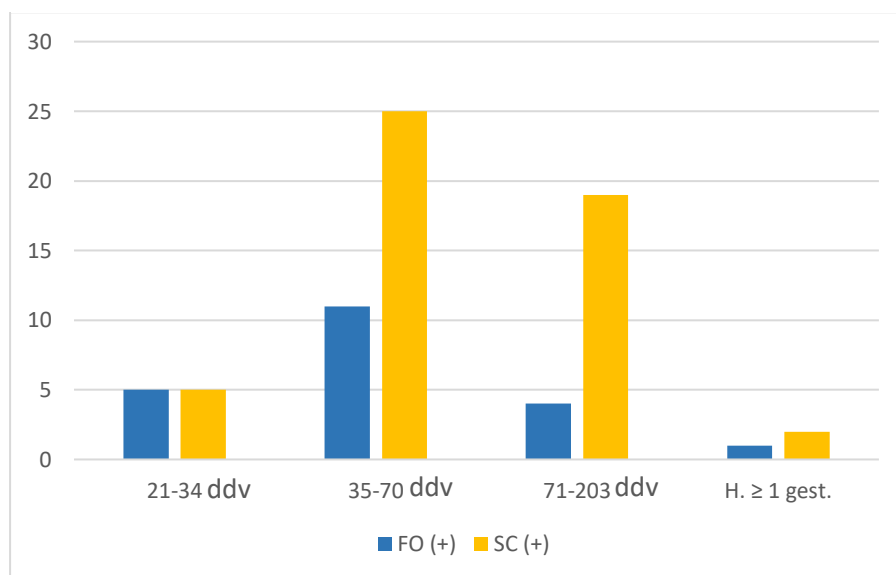
*Tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales en cada evento de muestreo, de acuerdo con la edad de los animales.*

Signos clínicos, RT-PCR	Edad (días de vida) o categoría					Total
	21-34	35-70	71-203	H. rep	H. $\geq 1$ gest.	
SC (+), FO (+)	5	11	4	1	S/D	21
SC (+), FO (-)	0	14	15	1	S/D	30
SC (-), FO (+)	0	0	0	0	S/D	0
SC (-), FO (-)	0	1	1	0	S/D	2
Total	5	26	20	2	S/D	53
Tasa de acuerdo (%)	100,00	46,15	25,00	50	S/D	43,40

**Nota.** SC (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SC (-): ausencia de animales con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; FO (+): detección de ANR de VIA en al menos una muestra de fluido oral de corrales dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR. FO (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en muestras de fluido oral de corrales recolectadas dentro del evento de muestreo. H. rep: hembras de reposición; H.  $\geq 1$  gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o multiparas; S/D: sin datos.

Gráfico 2

*Distribución de frecuencia de eventos de muestreo con al menos un animal con manifestaciones clínicas respiratorias y detección de VIA en una o dos muestras de fluido oral de corrales*



**Nota.** SC (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; FO (+): detección de VIA en una o dos muestras de fluido oral de corrales obtenida con cuerda dentro del evento de muestreo mediante RT-PCR; ddv: días de vida.

En la tabla 16 y gráfico 3 se resumen las tasas de acuerdo entre la detección de VIA mediante RT-PCR de muestras de secreción nasal y fluido oral recolectadas en cada evento de muestreo, de acuerdo con la edad de los animales.

**Hubo asociación significativa entre la detección de material genético de VIA mediante RT-PCR en muestras de fluido oral y en muestras de secreción nasal ( $p = 0,026$ ).**

Tabla 6

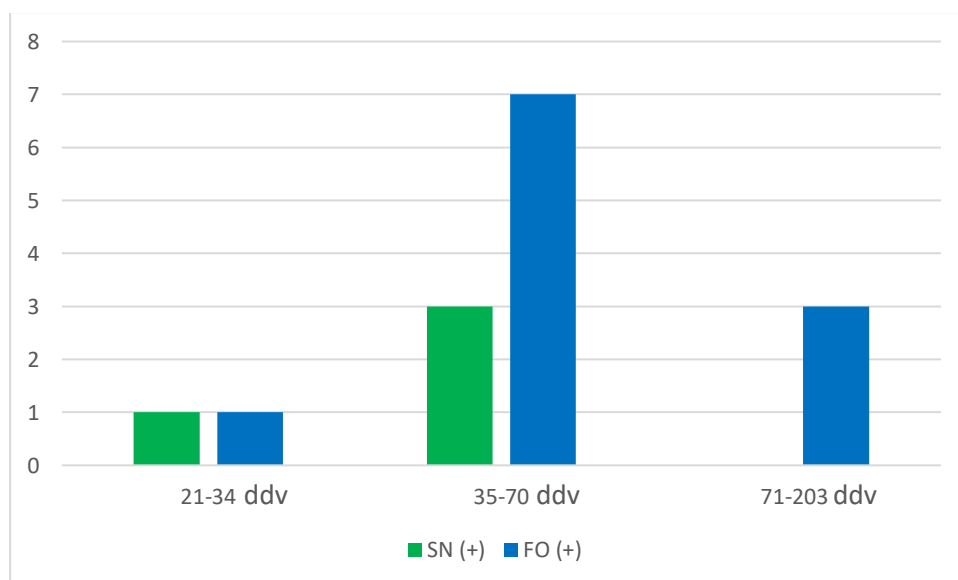
*Tasa de acuerdo entre los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales y muestras individuales de secreción nasal en cada evento de muestreo, de acuerdo con la edad de los animales*

RT-PCR	Edad (días de vida) o categoría					
	21-34	35-70	71-203	H. rep	H. $\geq 1$ gest.	Total
SN (+), FO (+)	1	3	0	S/D	S/D	4
SN (+), FO (-)	0	0	0	S/D	S/D	0
SN (-), FO (+)	0	4	3	S/D	S/D	7
SN (-), FO (-)	0	7	7	S/D	S/D	14
Total	1	14	10	S/D	S/D	25
Tasa de acuerdo (%)	100,00	71,43	70	S/D	S/D	72,00

**Nota.** SN (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en al menos una muestra de secreción nasal dentro del evento de muestreo. SN (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en las muestras de secreción nasal dentro del evento de muestreo. FO (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en al menos una muestra de fluido oral de corrales dentro del evento de muestreo; FO (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en muestras de fluido oral de corrales recolectadas dentro del evento de muestreo. H. rep: hembras de reposición; H.  $\geq 1$  gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o múltiparas; S/D: sin datos

Gráfico 3

*Distribución de frecuencia de eventos de muestreo detección de VIA en al menos una muestra de secreción nasal y en una o dos muestras de fluido oral de corrales*



**Nota.** SN (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo; FO (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en una o dos muestras de fluido oral de corrales obtenida con cuerda dentro del evento de muestreo; ddv: días de vida.

Las tablas 17 y 18 resumen los datos de la tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales y la tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales en cada evento de muestreo, de acuerdo con la granja estudiada. Los valores de las tablas son idénticos, excepto para la G3, que fue la única en la cual se realizó la recolección de muestras de fluido oral en eventos de muestreo en ausencia de manifestaciones clínicas.

Tabla 17

Tasa de detección de material genético de VIA mediante RT-PCR de muestras de fluido oral de corrales, de acuerdo con la granja estudiada.

RT-PCR	Granja											Total
	G1-M2	G3	G4- M2	G5	G6	G7	G8	G9- M2	G10 - Sitio 1	G10 - Sitio 2	G11	
Positiva	1	2	4	1	3	1	3	2	0	2	2	21
Negativa	2	4	2	5	1	4	0	5	6	1	2	32
Total	3	6	6	6	4	5	3	7	6	3	4	53
Tasa de detección (%)	33,33	33,33	66,67	16,67	75,00	20,00	100,00	28,57	0,00	66,67	50	39,62

**Nota.** RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa para detección del gen matriz de virus de Influenza A. RT-PCR positiva: detección de al menos una muestra de fluido oral de corrales positiva dentro del evento de muestreo. G: Granja; M: muestreo.

Tabla 7

Tasa de acuerdo entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales en cada evento de muestreo, de acuerdo con cada granja estudiada

Signos clínicos, RT-PCR	Granja											Total
	G1-M2	G3	G4- M2	G5	G6	G7	G8	G9- M2	G10 - Sitio 1	G10 - Sitio 2	G11	
SC (+), FO (+)	1	2	4	1	3	1	3	2	0	2	2	21
SC (+), FO (-)	2	2	2	5	1	4	0	5	6	1	2	30
SC (-), FO (+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SC (-), FO (-)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Total	3	6	6	6	4	5	3	7	6	3	4	53
Tasa de acuerdo (%)	33,33	66,67	66,67	16,67	75,00	20,00	100,00	28,57	0,00	66,67	50,00	43,40

**Nota.** SC (+): presencia de al menos un animal con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; SC (-): ausencia de animales con manifestaciones clínicas en el evento de muestreo; FO (+): FO (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en una o dos muestras de fluido oral de corrales obtenida con cuerda dentro del evento de muestreo. FO (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en muestras de fluido oral de corrales recolectadas dentro del evento de muestreo. G: Granja; M: muestreo.

La tabla 19 muestra la tasa de acuerdo entre los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales y muestras individuales de secreción nasal en cada evento de muestreo, de acuerdo con la granja estudiada.

Tabla 19

*Tasa de acuerdo entre los resultados de RT-PCR para detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales y muestras individuales de secreción nasal en cada evento de muestreo, de acuerdo con la granja estudiada*

RT-PCR	Granja					Total
	G3	G4- M2	G5	G6	G7	
SN (+), FO (+)	0	2	0	1	1	4
SN (+), FO (-)	0	0	0	0	0	0
SN (-), FO (+)	2	2	1	2	0	7
SN (-), FO (-)	4	2	5	1	2	14
Total	6	6	6	4	3	25
Tasa de acuerdo (%)	66,67	66,67	83,33	50,00	100,00	72,00

**Nota.** SN (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo. SN (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en las muestras de secreción nasal recolectadas dentro del evento de muestreo. FO (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en una o dos muestras de fluido oral de corrales obtenida con cuerda dentro del evento de muestreo; FO (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en muestras de fluido oral de corrales recolectadas dentro del evento de muestreo; G: Granja; M: muestreo.

Considerando a cada granja en particular, no hubo asociación significativa entre el registro de signos clínicos compatibles con infección por VIA y los resultados de RT-PCR para la detección de VIA en muestras de fluido oral de corrales ( $p = 0,47$  para G3 y  $p = 1$  para el resto de las granjas) ni entre la detección de VIA en muestras de fluido oral y en muestras de secreción nasal ( $p = 0,33$  para G7;  $p = 0,47$  para G4- M2 y  $p = 1$  para el resto de las granjas).

#### a.4. Serología (ELISA)

La tabla 20 resume los eventos de recolección de muestras de suero, detallando número y porcentaje de muestras positivas a anticuerpos anti-VIA mediante ELISA (CIVTEST® SUI INFLUENZA”, Laboratorios Hipra S.A., España), situación clínica de los animales y resultado de RT-PCR de muestras de secreción nasal y fluido oral y/o detección de antígenos de VIA mediante IHQ.

La seroprevalencia promedio más baja se encontró en la Granja 4 (5,7 %). Sin embargo, en esta última, el número de muestras recolectadas por edad fue entre 5 y 15.

Tabla 20

Seroprevalencia de anticuerpos anti -VIA mediante ELISA, signos clínicos y detección de VIA en eventos de muestreo

Granja	Edad (días de vida) o categoría					
	21-34	35-70	71-203	H. rep	H. 1° gest.	H. mult.
<b>G1-M1</b>						
Sue (+/total) - %	9/30 (30%)	7/60 (11,67%)	4 (13,3%)	S/D	4/15 (26,67%)	12/15 (80%)
SC	(-)	(+)	(-)	S/D	(-)	(-)
SN	(-)	(+)	(-)	S/D	(+)	(-)
<b>G2-M1</b>						
Sue (+/total) - %	10/29 (34,48%)	7/60 (11,67%)	6 (20%)	S/D	2/13 (15,38%)	9/12 (75%)
SC	(-)	(+)	(+)	S/D	(-)	(-)
SN	(-)	(+)	(+)	S/D	(-)	(-)
<b>G3</b>						
Sue (+/total) - %	4/10 (40%)	2/20 (10%)	9/30 (30%)	S/D	5/5 (100%)	4/5 (80%)
SC	(-)	(+)	(+)	S/D	(-)	(-)
SN	(+)	(-)	(-)	S/D	(-)	(-)
FO	S/D	(-)	(+)	S/D	S/D	S/D
<b>G4 - M1</b>						
IHQ	S/D	(+)	(+)	S/D	S/D	S/D
<b>G4- M2</b>						
SC	(+)	(+)	(+)	S/D	S/D	S/D
SN	(+)	(+)	(-)	S/D	S/D	S/D
FO	(+)	(+)	(+)	S/D	S/D	S/D
<b>G4- M3</b>				H. rep, 1° gest y mult.		
Sue (+/total) - %	0/5 (0%)	0/10 (0%)	2/15 (13,33%)	0/5 (0%)		

**Nota.** Sue (+): detección de anticuerpos anti -VIA mediante ELISA; SN (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en al menos una muestra individual de secreción nasal dentro del evento de muestreo; SN (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en las muestras de secreción nasal recolectadas dentro del evento de muestreo. FO (+): detección de ARN de VIA mediante RT-PCR en una o dos muestras de fluido oral de corrales obtenida con cuerda dentro del evento de muestreo; FO (-): ausencia de detección de VIA mediante RT-PCR en muestras de fluido oral de corrales recolectadas dentro del evento de muestreo. IHQ (+): detección de antígenos de VIA mediante inmunohistoquímica; H. rep: hembras de reposición; H. ≥ 1 gest.: hembras reproductoras de primer parto y/o múltiparas; S/D: sin datos; G: Granja; M: muestreo.

#### a.5. Anatomía patológica, histopatología e inmunohistoquímica

Se obtuvieron muestras de 17 animales de las Granjas 1, 2, 4 y 9.

Macroscópicamente se observaron desde pulmones con cambios macroscópicos leves a pulmones con lesiones de pleuritis fibrinosa, fibrino-purulenta e inflamación supurativa-abscedativa. En algunos casos, se observó el patrón de lesión en “tablero de ajedrez” (Imagen 7). La extensión de las lesiones también varió desde pulmones con bajo porcentaje de tejido afectado a pulmones con lesiones extensas.

Cuando fue posible, se procesaron más de un segmento de pulmón de un mismo caso, dando en total, 22 preparados.

Como se observa en las tablas 21 y 22, la lesión característica de bronquitis-bronquiolitis necrotizante se observó en 5 casos (Imagen 8). La lesión más frecuentemente observada fue el infiltrado difuso por células mononucleares asociado a los bronquios sin formación de folículos linfoides.

En todos los cortes, con excepción de uno, la IHQ fue positiva para detección de VIA. Si bien hubo cortes que presentaron inmunomarcaje en las células epiteliales, el antígeno de VIA se detectó más frecuentemente en las células del intersticio (Imágenes 9 y 10).

La tasa de detección de casos positivos a VIA mediante IHQ fue de 100 %. Al considerar la tasa de detección en base a los cortes procesados (incluyendo varios cortes de un mismo caso), la misma fue de 95,45 %.

No hubo asociación entre los diferentes tipos de lesiones y la detección de VIA mediante IHQ.

Tabla 21

*Frecuencia de hallazgos histopatológicos según el resultado de IHQ en muestras de pulmón de cerdos con infección natural por VIA*

	Histopatología									
	Pleu	Bronquitis			Bronquiolitis			Compromiso alveolar		
		M-P	P	N	M-P	N	IMDPB	Int	Ex	Atel
IHQ (+)	10	6	2	1	5	5	18	16	9	6
IHQ (-)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0

**Nota.** IHQ (+): detección de antígeno de VIA mediante inmunohistoquímica (IHQ); IHQ (-): ausencia de detección de antígeno de VIA mediante IHQ; Pleu: pleuritis; M-P: mucopurulenta; P: purulenta; N: necrótica; IMDPB: infiltrado mononuclear difuso peribronquial; Int: intersticial; Ex: exudativo; Atel: atelectasia; Hiper: hiperemia; Aut: Autólisis; Interés: intersticio; E. bronquio: células epiteliales de recubrimiento de bronquios; Glánd: células epiteliales de glándulas bronquiales; E. bronquiolo: células epiteliales de recubrimiento de bronquiolos.

Tabla 8

*Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos en muestras de pulmón de cerdos con infección natural por VIA*

Identificación	Edad (ddv)	Histopatología											Inmunohistoquímica					
		Pleu	Bronquitis			Bronquiolitis			Compromiso alveolar			Cambios circulatorios		Neg	Inters	E. bronquio	Glánd	E. bronquiolo
			M-P	P	N	M-P	N	IMDPB	Int	Ex	Atel	Hiper	Edema					
G1-M2 - A1	72						x	x			x				x			
G1-M2 - A2	120	x	x		x	x	x		x			x	X		x			
G2-M2 - A1	45-60		x				x	x		x	x	x	X		x		x	
G2-M2 - A1	45-60	x				x				x		x	X	x				
G2-M2 - A2	45-60	x					x	x			x	x			x		x	
G2-M2 - A3	103	x					x	x			x	x	X		x			
G2-M2 - A4	130	x		x		x	x	x	x			x				x	x	x
G2-M2 - A5	145			x	x		x	x	x	x		x		x	x		x	
G4- A1	61	x					x	x						x	x		x	
G4- A2	107	x					x	x			x	x	X		x	x	x	
G4- A2	107	x					x					x	X		x			
G4- A2	107						x	x				x	X		x			

Tabla 9 (continuación)

*Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos en muestras de pulmón de cerdos con infección natural por VIA*

G4- A3	117		x			x		x	x		x	X			x	x	x		
G4- A3	117						x		x		x	X			x	x	x		
G4- A4	158						x	x		x					x	x	x		
G9-M1 - A1	S/D		x			x		x						x	x				
G9-M1 - A2	S/D	x					x	x						x	x	x	x		
G9-M1 - A3	S/D	x	x			x		x	x					x	x	x		x	
G9-M1 - A3	S/D													x	x				
G9-M1 - A4	S/D	x				x	¿		x	x				x	x	x		x	
G9-M1 - A5	S/D		x			x		x	x					x	x	x		x	
G9-M1 - A6	S/D							x		x				x	x	x	x	x	
Total		11	6	2	1	5	5	18	16	10	6	12	9	9	1	20	10	11	5

**Nota.** G: número de Granja; M: número de muestreo; A: animal; Pleu: pleuritis; M-P: mucopurulenta; P. purulenta; N: necrótica; IMDPB: infiltrado mononuclear difuso peribronquial; Int: intersticial; Ex: exudativo; Atel: atelectasia; Hiper: hiperemia; Aut: Autólisis; Interés: intersticio; E. bronquio: células epiteliales de recubrimiento de bronquios; Glánd: células epiteliales de glándulas bronquiales; E. bronquiolo: células epiteliales de recubrimiento de bronquiolos; x: positivo; ¿: dudoso; G: Granja; M: muestreo; ddv: días de vida.

Imagen 7

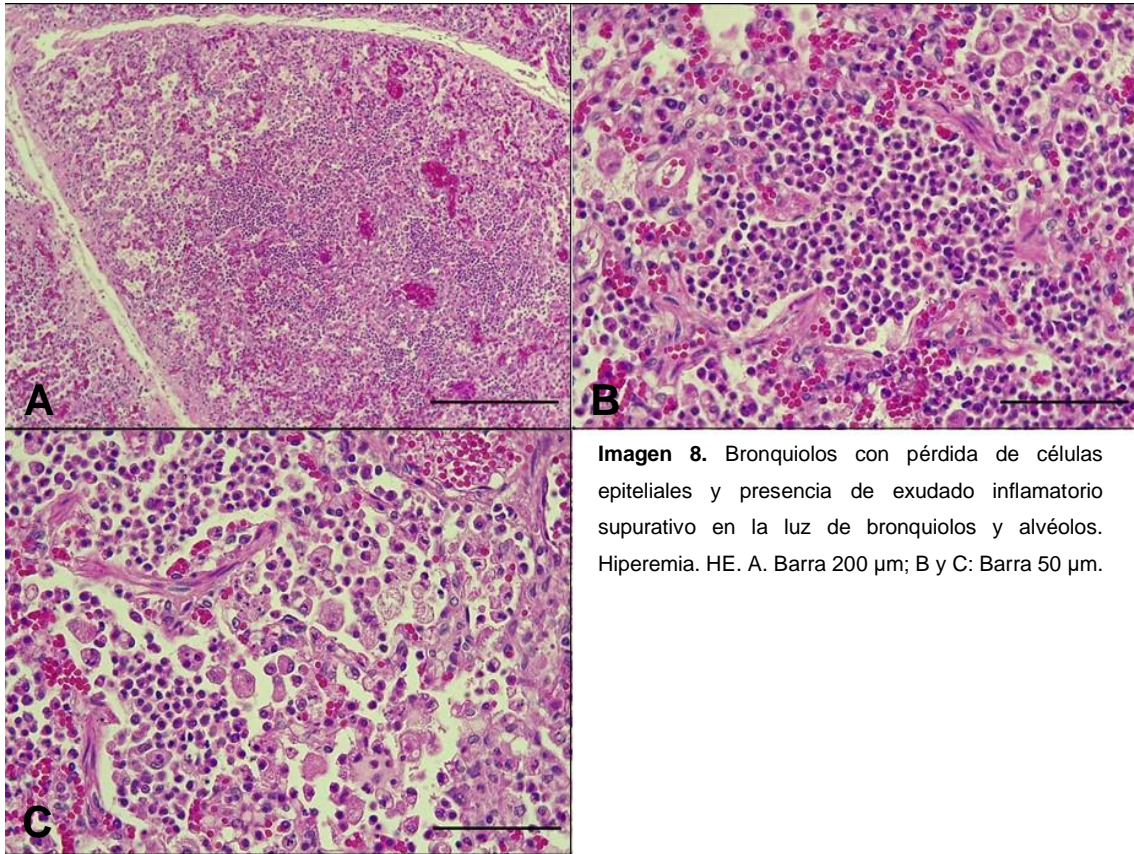
*Porcino, pulmón, 40 ddv, hallazgos anatomopatológicos en pulmón positivo a VIA mediante IHQ.*



**Imagen 7.** Pulmones con áreas focales de consolidación en patrón lobullilar con distribución cráneo ventral y dorso caudal. Barra 1 cm.

Imagen 8

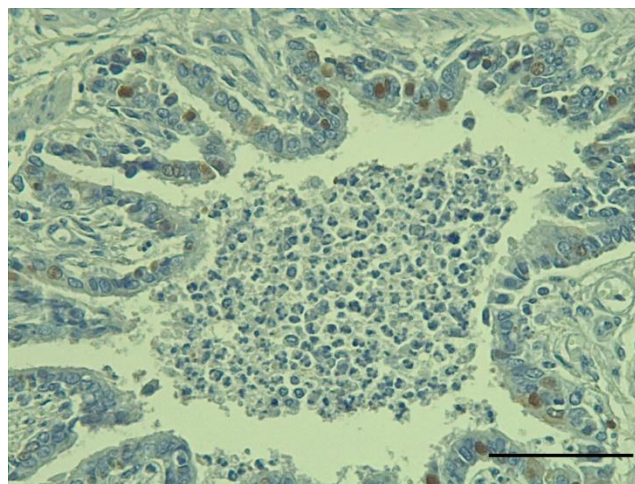
Porcino, pulmón, 45-60 ddv. Granja 2 - Muestreo 2. Animal 1.



**Imagen 8.** Bronquiolos con pérdida de células epiteliales y presencia de exudado inflamatorio supurativo en la luz de bronquiolos y alvéolos. Hiperemia. HE. A. Barra 200  $\mu\text{m}$ ; B y C: Barra 50  $\mu\text{m}$ .

Imagen 9

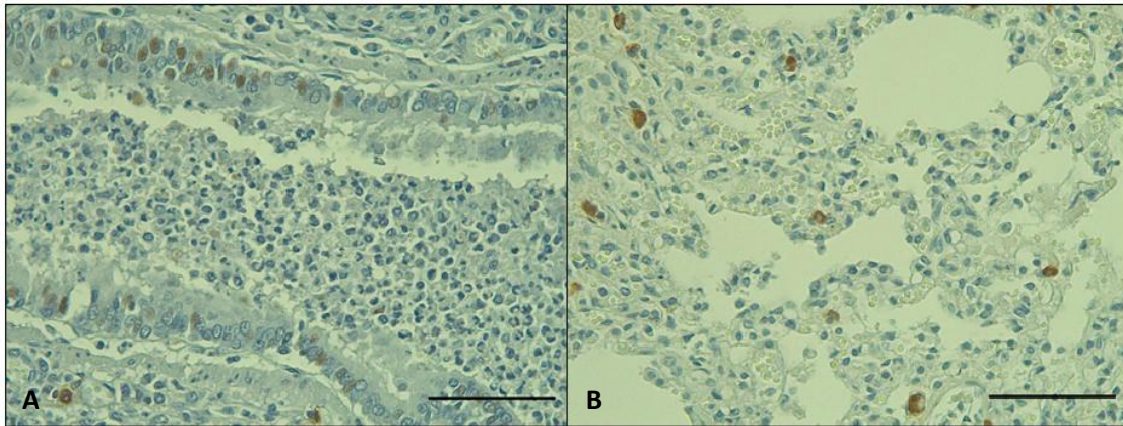
Porcino, pulmón, Granja 9



**Imagen 9.** Bronquiolo con inmunomarcaje positivo a antígenos de VIA en células epiteliales y exudado supurativo en la luz. IHQ. 40x. Barra 50  $\mu\text{m}$ .

Imagen 10

*Porcino, pulmón, 117 ddv, Granja 4- Animal 3*



**Imagen 10.** A. Bronquiolo con inmunomarcaje positivo a antígenos de VIA en células epiteliales y exudado supurativo en la luz. B. Células con inmunomarcaje positivo a antígenos de VIA en septos interalveolares. IHQ. 40x. Barra 50  $\mu$ m.

#### ***b. Muestras realizadas para el monitoreo de VIA en maternidad***

Cuando se recolectaron muestras en la Granja 10 había manifestaciones clínicas respiratorias en lechones de maternidad, además de en otras edades de la línea de producción (detallado previamente). Sin embargo, las 30 muestras de gasas mamarias fueron negativas para VIA por RT-PCR.

Al momento de la recolección de muestras en la Granja 12, se observaron manifestaciones clínicas compatibles con infección por VIA en camadas de lechones de 6 a 8 ddv y 17 a 21 ddv de las salas de maternidad. Las cuatro muestras de gasa mamaria recolectadas fueron negativas para detección de VIA mediante RT-PCR. Sin embargo, la técnica del hisopo orofaríngeo permitió detectar VIA en tres grupos de muestras, dos grupos correspondientes a lechones de 6 a 8 ddv con y sin signos clínicos y un grupo de lechones de 17 a 21 ddv sin signos clínicos. Tres grupos de muestras fueron sospechosas por qRT-PCR (Tabla 23).

La tasa de detección de los grupos de muestras de secreción orofaríngea fue de 15 %.

Tabla 10

*Detección de VIA mediante qRT-PCR de muestras agrupadas de secreción orofaríngea de lechones de maternidad*

Camada	6 a 8 ddv				17 a 21 ddv				Total		
	Hembra a		Hembra b		Hembra c		Hembra d			Hembra e	
SC	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
SOF (+)	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
SOF dudosa	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	3
SOF (-)	1	2	0	1	0	1	1	6	1	1	14
Total	1	2	1	2	1	2	1	6	1	3	20

**Nota.** SC (+): grupo de muestras recolectadas de lechones de una misma camada con signos clínicos; SC (-): grupo de muestras recolectadas de lechones de una misma camada sin signos clínicos al momento del muestreo; SOF (+): detección de VIA mediante qRT-PCR en el grupo de muestras; SOF (-): ausencia de detección de VIA mediante qRT-PCR en el grupo de muestras; SOF (dudosa); ddv: días de vida.

### **c. Muestreo realizado para el monitoreo de VIA en bioaerosoles**

El muestreo 3 de la Granja 1 se realizó más de tres meses después del inicio de la aparición de signos clínicos compatibles con infección por VIA en la granja. Al momento de la visita y recolección de muestras se observaron manifestaciones clínicas respiratorias principalmente en los cerdos de 40-45 ddv y 100-120 ddv, categorías de las cuales se recolectaron muestras de bioaerosoles.

Mediante los estudios de qRT-PCR de las muestras de bioaerosoles analizadas no logró identificarse ARN de VIA.

### **d. Estación anual y año de detección de VIA en las granjas estudiadas**

En la tabla 24 se presenta la información resumida sobre la estación y año en los cuales se detectó VIA en las granjas estudiadas mediante RT-PCR y/o IHQ.

La mayor proporción de eventos con detección de VIA se produjo durante los meses de invierno, seguido por el otoño. También se detectó VIA, en una baja proporción, en eventos de recolección de muestras durante el verano (Gráfico 4).

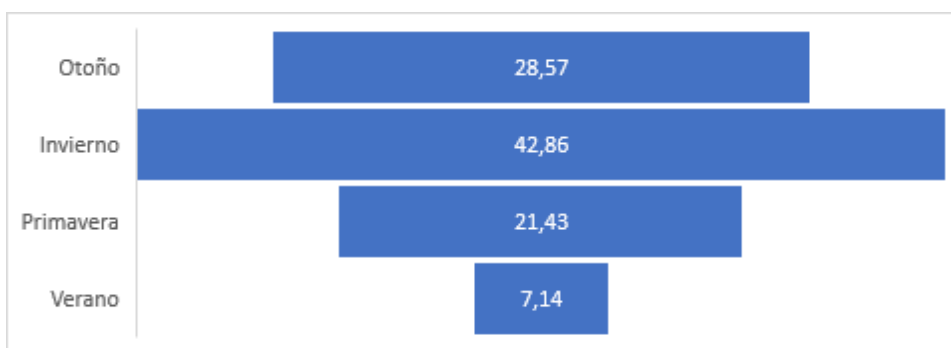
Tabla 24

Frecuencia de detección de VIA en las granjas estudiadas, de acuerdo con la estación y el año

Año	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Total granjas positivas a VIA
2014			G2-M1 (10/11/2014)	G1-M1 (22/12/2014)	2
2015	G1-M2 (27/04/2015) G2-M2 (27/04/2015)				2
2016	G-8 (01/06/2016)	G3 (06/09/2016) G4-M2 (25/07/2016); G4-M3 (01/08/2016) G6 (28/07/2016) G7 (12/08/2016)	G10-M1 (28/09/2016); G10-M2 (05/10/2016)		6
2017			G5 (14/12/2017)		1
2018		G12 (27/08/2018)			1
2019	G11 (08/04/2019)	G9 (02/07/2019)			2
Total granjas positivas a VIA	4 (28,57%)	6 (42,86%)	3 (21,43%)	1 (7,14)	14 (100,00%)

Gráfico 2

Distribución de frecuencia de la estación de año de detección de VIA en las granjas estudiadas



## 7. DISCUSION

### 7.A. PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN DE VIA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS – UNR

La extracción de ARN viral de las muestras que se desean analizar puede realizarse mediante diferentes métodos y opciones comerciales (Thatcher, 2015). En general, se considera que los métodos de extracción orgánica permiten obtener ARN de alta calidad (Detmer y col., 2013; Thatcher, 2015). Por otro lado, el ARN obtenido empleando kits de extracción de fase sólida puede tener mayor pureza y menor concentración de sustancias inhibidoras de la PCR (Deng y col., 2005; Singh y col., 2015). En nuestro estudio, cuando comparamos un método de extracción de ARN orgánico y un método de extracción de fase sólida usando una muestra con alta concentración viral (sobrenadante de aislamiento viral), subjetivamente obtuvimos los mayores rendimientos (bandas de mayor intensidad en el gel de agarosa) a través de la RT-PCR de los extractos obtenidos mediante Trizol LS™. Nuestros resultados son similares a los observados en estudios donde los métodos de extracción orgánica de ARN en muestras de sangre, tejidos, medio viral y líquido alantoideo de huevos de gallina embrionados permitieron obtener mayores rendimientos de ARN en comparación con métodos de extracción de membranas de sílice y/o perlas magnéticas (Deng y col., 2005; Dimitrov y col., 2014; Singh y col., 2015; Nirmala y col., 2021). Sin embargo, cuando consideramos el desempeño de ambos métodos en base a los resultados de la RT-PCR para la detección de VIA (muestra positiva/negativa a VIA), los resultados coincidieron en todos los casos. Estos resultados concuerdan con un estudio donde no se encontraron diferencias significativas en la sensibilidad entre Trizol LS™ y un kit de membrana (Dimitrov y col., 2014).

Cuando comparamos el desempeño de los mismos kits de extracción de ARN sobre muestras de fluido oral a través de los resultados de la RT-PCR, la concordancia entre ambos fue excelente ( $k = 0,897$ ). Los resultados de la RT-PCR realizada con los templados obtenidos con los dos kits de extracción coincidieron para la mayoría de las muestras, excepto una, cuya RT-PCR fue positiva mediante el kit de extracción de membrana y negativa mediante la extracción orgánica. La clasificación de muestras para la detección de VPPC por RT-PCR convencional como negativas con Trizol LS™ y positivas con otros kits de extracción fue reportada previamente con ARN extraído de muestras de sangre (Deng y col., 2005). Este resultado podría explicarse por la mayor pureza y menor concentración de sustancias inhibidoras de la PCR obtenidas con el uso de kits de extracción de fase sólida (Deng y col., 2005; Singh y col., 2015). Alternativamente, teniendo en cuenta que la extracción orgánica es comparativamente

más laboriosa (Detmer y col., 2013; Thatcher, 2015), la diferencia encontrada podría tratarse de un error técnico en el proceso de extracción o de RT-PCR de esa muestra particular. Por último, el ARN podría haber sufrido degradación en el intervalo entre su extracción y la RT-PCR. Dentro de las limitaciones de este ensayo se encuentra la falta de mediciones sobre rendimiento y pureza del extracto de ARN obtenido. Sin embargo, nuestro interés estaba centrado en conocer el desempeño de cada producto de extracción en combinación con la reacción de RT-PCR para la detección de ARN de VIA. Otra limitante del ensayo es no haber realizado réplicas, lo cual permitiría identificar la presencia de errores operativos en el procesamiento de las muestras.

La disponibilidad de productos comerciales para la extracción de ARN es muy amplia. Si bien la elección debe estar basada en el tipo de muestra, tipo de material genético y pureza requerida (Steward y Culley, 2010; Detmer y col., 2013), cuando la concordancia entre los productos analizados resulta excelente, la selección final también puede estar determinada por el costo, la facilidad de compra y la constancia en la oferta comercial que permitan sostener los métodos empleados a lo largo del estudio para obtener resultados comparables.

En estudios previos, la dilución del templado de ARN tuvo efectos positivos en los resultados de la RT-PCR por disminución de la concentración de sustancias inhibitoras (Deng y col., 2005; Chittick, 2012). Cuando evaluamos el efecto de la dilución del templado de ARN obtenido a partir de muestras de fluido oral sobre la capacidad de detección de VIA, la concordancia entre el uso del templado de ARN puro y el uso del templado de ARN diluido al 50 % en agua libre de ARNasas fue excelente ( $k = 0,917$ ). Sin embargo, las bandas observadas en el gel de agarosa eran más intensas cuando el templado se usó puro en la RT-PCR. Esto podría indicar que el impacto de la dilución del templado es mayor que el efecto de las sustancias inhibitoras de PCR en el templado obtenido mediante el método de extracción utilizado en este ensayo (Chittick, 2012) o que la ADN polimerasa que empleamos en la RT-PCR es altamente resistente al efecto de las sustancias inhibitoras (Deng y col., 2005). Si bien, una muestra que fue negativa cuando se usó el templado puro, resultó positiva al usar el templado diluido, sospechamos que esta diferencia podría deberse a algún tipo de error técnico de manipulación de ese templado o de su producto luego de la RT-PCR. Por otro lado, en este estudio hemos evaluado el efecto de una única dilución. Diluciones mayores o menores del templado podrían presentar resultados diferentes al aquí observado (Chittick, 2012).

Si bien se ha sugerido incrementar la concentración de las enzimas empleadas en la RT-PCR permitiría superar los efectos de las sustancias inhibitoras (Chittick, 2012), cuando evaluamos en forma combinada el efecto de dilución del templado de ARN y

la concentración de la mezcla de enzimas en la RT-PCR sobre la capacidad de detección de VIA en muestras de fluido oral, aunque el número de muestras evaluadas fue limitado, no observamos diferencias entre ensayos en los resultados de RT-PCR. El costo que representa emplear el doble de la mezcla de enzimas encarecería notoriamente el procesamiento de las muestras sin obtener mejoras aparentes en la sensibilidad diagnóstica de la RT-PCR para detección de ARN de VIA a partir de muestras de fluido oral de corrales obtenidas con cuerdas de algodón. Para obtener valores más objetivos sería deseable poder medir la concentración del ADN obtenido luego de la RT-PCR en cada caso, mediante el empleo de un espectrofotómetro.

## **7.B. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE MONITOREO PARA DETECCIÓN DE VIA EN GRANJAS PORCINAS**

### ***a. Muestreos para el monitoreo de VIA en múltiples etapas de producción***

La selección de animales a muestrear en base a la presencia de signos clínicos puede mejorar la sensibilidad de detección de enfermedades (Detmer y col., 2013). En un estudio previo la edad no fue un predictor estadísticamente significativo del resultado para VIA en las muestras de secreción nasal (Corzo y col., 2013b). Sin embargo, en nuestro estudio, la tasa de acuerdo entre la presencia de signos clínicos y la detección de ARN de VIA mediante RT-PCR de muestras de secreción nasal o fluido oral y la tasa de detección por RT-PCR para cada tipo de muestra fue diferente de acuerdo con el grupo etario o categoría y granja estudiada.

En una investigación previa, las mayores tasas de detección de VIA en muestras de secreción nasal se encontraron en cerdos de 21 y 35 ddv y hubo una asociación entre la presencia de secreción nasal serosa y la detección de VIA a los 35 ddv, mientras que los cerdos de 70-84 ddv tuvieron las menores tasas de detección (Ryt-Hansen y col., 2019). De manera similar, en nuestro estudio, las tasas de detección en muestras de secreción nasal y fluido oral fueron máximas en cerdos de 21-34 ddv con detección del ARN de VIA en todos los eventos de muestreo donde había cerdos con signos clínicos. Sin embargo, el número de muestreos llevados a cabo en este rango etario fue bajo (especialmente para las muestras de secreción nasal), por lo que las tasas de detección podrían estar sobreestimadas. En cerdos de 35-70 ddv, las tasas de detección de ARN de VIA mediante RT-PCR de muestras de secreción nasal y fluido oral fueron menores que en cerdos de 21-34 ddv y mayores que en los cerdos de 71-203 ddv y fueron algo inferiores a las encontradas previamente en cerdos de 35- 45 ddv de granjas con infección endémica (Garrido-Mantilla y col., 2019). En este rango etario

encontramos las frecuencias más altas de detección de VIA en muestras de secreción nasal y fluido oral debido a que fue el grupo con mayor cantidad de eventos de recolección de muestras por la mayor frecuencia de cerdos con signos clínicos respiratorios durante las visitas a las granjas. En los cerdos de 71-203 ddv se encontraron las tasas de detección con muestras de secreción nasal y fluido oral más bajas. En este rango etario no se detectó VIA en ninguno de los eventos de muestreo de secreción nasal usando un tamaño de muestras de 10 y la detección de VIA sólo fue posible a partir de las muestras de fluido oral o de secreción nasal usando un tamaño de muestra de 30. La nula o baja tasa de detección de ARN de VIA mediante RT-PCR de muestras de secreción nasal y fluido oral encontrada en los cerdos de 71-203 ddv podría deberse a una excreción viral en niveles inferiores a los detectables, por ejemplo, por tratarse de cepas de baja excreción o por el efecto de la inmunidad contra VIA en los cerdos (Sreta y col., 2009; Simon-Grifé y col., 2012; Detmer y col., 2013) o a la presencia de otros factores que provocan signos clínicos respiratorios similares (amoníaco, polvo, otros agentes infecciosos que produzcan cuadros respiratorios) dando lugar al muestreo de cerdos no infectados por influenza (Spickler, 2009; Detmer y col., 2013; Janke, 2013; Rajao y col., 2013). Entre los agentes infecciosos, *Mycoplasma hyopneumoniae* puede tener un rol importante en la generación de signos respiratorios en esta categoría, teniendo en cuenta que todas las granjas estudiadas eran positivas a este agente.

En un estudio, en la mayoría de los grupos que fueron positivos a VIA la detección se produjo en una única muestra de secreción nasal sobre un total de 30 (Corzo y col., 2013b). De manera similar, en estudios experimentales, la probabilidad de detectar una muestra de fluido oral positiva a VIA mediante qRT-PCR, aumentó a medida que aumentaba la prevalencia de cerdos excretando VIA dentro del corral (Romagosa y col., 2012; Goodell y col., 2013) y la mayoría de los fluidos orales negativos fueron aquellos recolectados en los corrales con una prevalencia de excreción viral del 10 % o menos (Romagosa y col., 2012). En los grupos negativos a VIA de nuestro estudio, la circulación viral pudo ser de una prevalencia menor a la capaz de ser detectada con el tamaño de muestras usado y no puede descartarse la infección por VIA en ellos. En relación con lo anterior, si bien la tasa general de detección de ARN de VIA en muestras de secreción nasal mediante RT-PCR fue levemente mayor en los eventos correspondientes a muestreos a edades fijas en comparación con los eventos de muestreos dirigidos por la presencia de signos clínicos, el tamaño de muestra usado en cada evento de muestreo de las Granjas 1 y 2 (G1 y G2) fue de 30, en comparación con el resto de los eventos de muestreos donde el n fue de 10. El mayor n usado en las G1 y G2 podría sobreestimar la tasa de detección en muestreos a edades fijas en

comparación con los muestreos dirigidos por signos clínicos, especialmente si la prevalencia de VIA en los grupos estudiados usando un tamaño de muestra de 10 es de 10 % a 26 %. Por otro lado, una limitación del presente estudio es el uso de RT-PCR y qRT-PCR para el procesamiento de muestras de distintos muestreos sin realizar estudios que determinaran la sensibilidad de cada técnica y la comparación de los resultados asumiendo sensibilidades similares entre ellas.

La tasa de detección en muestras individuales de fluido oral encontrada en nuestro estudio ha sido cercana a la hallada por Detmer y col. (2011) (42 %) y muy superior a la obtenida por Ramírez y col. (2012) (8 %), quienes sospecharon de cierto número de resultados falsos negativos. A su vez, la tasa de detección mediante la recolección de 1 a 2 muestras de fluido oral fue mayor que la encontrada por Hernandez-Garcia y col. (2017) en granjas con enfermedad respiratoria usando 6 cuerdas por evento de muestreo. Si bien el uso de los signos clínicos en nuestro caso pudo ayudar a incrementar las tasas de detección, la recolección de muestras de secreción nasal en grupos sin signos clínicos y con un tamaño de muestra de 10 y 30 permitió la detección de VIA en grupos asintomáticos, como los cerdos de 21-34 ddv y hembras de primera gestación, respectivamente, demostrando la necesidad de incluir categorías de relevancia epidemiológica en los muestreos aún en ausencia de manifestaciones clínicas (Corzo y col., 2013b; Allerson y col., 2014; Baudon y col., 2017).

Por otro lado, coincidiendo con estudios donde se hallaron diferencias entre y dentro de las granjas (Simon-Grifé y col., 2012; Ramirez y col., 2012; Corzo y col., 2013b; Dibárbora y col., 2013; Allerson y col., 2014; Panyasing y col., 2016; Cappuccio y col., 2017; Ryt-Hansen y col., 2019; Chamba Pardo y col., 2018, 2020), en nuestro estudio hubo variación entre las tasas de detecciones y de acuerdo entre la presencia de signos clínicos y detección de VIA en muestras de secreción nasal y fluido oral entre las granjas estudiadas. Mediante RT-PCR, VIA se detectó en las granjas en hasta dos eventos de muestreo en muestras de secreción nasal, similar a lo encontrado por Dibárbora y col. (2013) y Cappuccio y col. (2017) usando tamaños de muestra de 30, mientras que, empleando muestras de fluido oral, se detectó en hasta cuatro eventos de muestreo.

Romagosa y col, (2012) encontraron una concordancia excelente entre las muestras de secreción nasal y fluido oral en la detección de ARN de VIA mediante RT-PCR. En nuestra investigación, hubo acuerdo estadísticamente significativo entre la detección de ARN de VIA mediante RT-PCR de muestras de secreción nasal y muestras de fluido oral. Sin embargo, la tasa general de detección de VIA mediante las muestras de fluido oral fue superior (prácticamente del doble) a la obtenida mediante el uso de muestras de secreción nasal y no hubo detección de VIA en muestras de secreción nasal en ausencia de detección en fluido oral. Estos resultados acuerdan con los reportados por

Goodell y col. (2013) quienes encontraron una mayor probabilidad de detectar una muestra positiva a VIA mediante qRT-PCR de muestras de fluido oral que de secreción nasal para la mayoría de los dpi y más del 30 % de las muestras de fluido oral positivas en ausencia de detección de VIA en las muestras individuales de secreción nasal (Goodell y col., 2013). A su vez, difieren de otro estudio donde mediante la recolección de muestras de secreción nasal en la totalidad de los cerdos infectados experimentalmente la detección de VIA mediante qRT-PCR de hisopos nasales fue superior que en las muestras de fluidos orales (Romagosa y col., 2012).

La relación de muestras de secreción nasal recolectadas y procesadas con respecto a las muestras de fluido oral en un mismo evento fue de 10:1 o 10:2. Por lo tanto, además de ser comparativamente menos sensible, la detección de VIA a partir de las muestras de secreción nasal fue más laboriosa, invasiva y estresante para los animales estudiados y más costosa que mediante las muestras de fluido oral de corrales.

La menor tasa de detección observada en las muestras de secreción nasal en comparación con las muestras de fluido oral podría reafirmar la necesidad de la selección minuciosa de los animales para recolectar las muestras durante el período de excreción viral, lo cual puede resultar desafiante en situaciones de circulación endémica de la infección, donde las manifestaciones clínicas son escasas o nulas y pueden estar asociadas a los signos provocados por otras afecciones respiratorias concurrentes (Simon-Grifé y col., 2012; Corzo y col., 2013; Dibárbora y col., 2013; Janke, 2013; Panyasing y col., 2016; Cappuccio y col., 2017). En este sentido, si bien no medimos la temperatura corporal, no observamos otros signos indicativos de cuadro febril (decaimiento y renuencia al movimiento, inapetencia) en los cerdos de ninguna de las granjas estudiadas y las manifestaciones clínicas fueron leves a moderadas, por lo que, en algunos casos, la selección individual de los animales a muestrear resultó dificultosa. Además, el desarrollo de inmunidad reduce significativamente la probabilidad de detección de VIA (Romagosa y col., 2012; Goodell y col., 2013) especialmente en las muestras de secreción nasal en comparación con las muestras de fluido oral (Goodell y col., 2013). Considerando que las granjas estudiadas tienen infección endémica y que, en algunas de ellas se detectó simultáneamente la presencia de anticuerpos y VIA en muestras de secreción nasal y/o fluido oral, es probable que existan niveles de excreción relativamente bajos. A su vez, debido al estrecho tiempo y la intermitencia de la excreción viral nasal, puede que los animales infectados no se encontraran excretando VIA al momento de obtención de las muestras con hisopos (Corzo y col., 2013b; Allerson y col., 2014; Baudon y col., 2017). Además, se ha demostrado que el tiempo postinfección durante el cual puede detectarse ARN de VIA mediante fluido oral es mayor que con las muestras de secreción nasal (Goodell

y col., 2013; Decorte y col., 2015). Por otro lado, las muestras de secreción nasal son muestras individuales, por lo que, cuando la prevalencia dentro de las granjas es baja, se requiere obtener un número elevado de estas para detectar la presencia del agente (Romagosa y col., 2012; Detmer y col., 2013; Garrido-Mantilla y col., 2019). Por el contrario, las muestras de fluido oral son una muestra grupal (Prickett y col. 2008; Romagosa y col., 2012; Goodell y col., 2013; Decorte y col., 2015; Garrido-Mantilla y col., 2019), que incluye varios animales dentro del corral y donde, además, no es necesario la selección individual de cerdos que pudieran estar excretando virus. Un tamaño de muestra de 10 permite detectar al menos un animal positivo cuando la prevalencia es mayor o igual a 26 % en una población de entre 40 y 2100 individuos, con un 95 % de confianza. En las categorías donde se detectó VIA en muestras de fluido oral y las muestras de secreción nasal fueron negativas, también pudo ocurrir que la prevalencia de animales excretando virus dentro del corral haya sido menor a 26 %. En nuestro estudio, dependiendo de las características del lugar donde estaban alojados los animales y de la densidad animal, en cada evento de muestreo se recolectaron una o dos muestras de fluido oral. Una medida que permitiría mejorar las tasas de detección de VIA tanto mediante secreción nasal como por fluido oral en casos de baja prevalencia es incrementar el número de muestras recolectadas en cada edad o categoría seleccionada. Sin embargo, esto implica mayor labor de muestreo y un aumento de los costos de monitoreo de la enfermedad, especialmente para el caso de las muestras de secreción nasal.

De manera similar a otros estudios (Simon-Grifé y col., 2011; Dibárbora y col., 2013) el comportamiento serológico fue diferente entre los criaderos estudiados y, de acuerdo con investigaciones previas (Dibárbora y col., 2013; Cappuccio y col., 2017), independientemente del tamaño de muestra utilizado, no hubo asociación entre la detección de anticuerpos contra VIA en suero y la presencia de signos clínicos, detección de ARN de VIA en muestras de secreción nasal y detección de ARN de VIA en muestras de fluido oral. Sin embargo, el número de granjas y muestras analizadas en nuestro estudio fue limitado.

Coincidiendo con otras investigaciones que encontraron detección de VIA en muestras de secreción nasal en presencia de anticuerpos (Simon-Grifé y col., 2012, Allerson y col., 2014; Cappuccio y col., 2017), en cuatro eventos de muestreo (21-34 ddv en G3; 35-70 ddv en G1 y G2; hembras de primera gestación de G 1) hubo detección simultánea de anticuerpos contra VIA y ARN de VIA en muestras de secreción nasal y en un evento (cerdos de 71-203 ddv de G2), se detectaron anticuerpos contra influenza y también ARN de VIA en muestras de fluido oral obtenidas con cuerdas. La detección de VIA en muestras de secreción nasal y fluido oral se produjo en eventos de muestreo

donde la seroprevalencia del grupo estudiado fue menor al 40 %. Debido a que la presencia de anticuerpos no necesariamente previene la infección ni evita la excreción viral (Allerson y col., 2013; Van Reeth y Ma, 2013), la identificación de animales serológicamente positivos no indica protección frente a la infección, especialmente si la seroprevalencia es baja.

En las Granjas 1 y 2 las cerdas se vacunaban con una vacuna comercial a virus inactivado, con 5 cepas, indicada como ayuda en el control de la enfermedad asociada a los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 de VIA. Si bien las pruebas serológicas no diferencian entre anticuerpos generados por infección natural de los generados por la vacunación (Schaefer y col., 2013; Carlson, 2017) y la vacunación con virus completo induciría el desarrollo de anticuerpos anti-NP en los cerdos (Ciacci-Zanella y col., 2010), debido a la baja tasa de hembras de primera gestación serológicamente positivas (G1-M1 y G2-M1), creemos que es probable que la prueba de ELISA empleada no detecte o detecte en baja proporción a los anticuerpos vacunales. Por otro lado, se identificó ARN de VIA en muestras de secreción nasal en hembras de primera gestación de la Granja 1 por lo que los anticuerpos detectados podrían ser anticuerpos generados en respuesta a la infección natural. Alternativamente, la baja detección de anticuerpos vacunales podría deberse a la inducción de una baja respuesta inmune por la vacuna empleada, a la interferencia de anticuerpos naturales en la inmunidad vacunal (Van Reeth y Ma, 2013) y/o a errores sistemáticos en la aplicación de la vacuna. Por su parte, en la Granja 3, donde no se realizaba vacunación, las hembras de primera gestación y las hembras multíparas tuvieron tasas de cerdas seropositivas mucho más altas.

Si bien la secuencia de nucleótidos del gen de la NP de VIA está altamente conservada entre las diferentes cepas VIA (Jung y col., 2002), se ha informado que la sensibilidad del ELISA NP indirecto usado en nuestro estudio, parece ser mejor para el subtipo H1N1 que para los subtipos H1N2 y H3N2 (Simon-Grifé y col., 2012). A su vez, en un estudio previo donde se compararon tres kits de ELISA disponibles comercialmente para la detección de anticuerpos contra VIA, la tasa de detección de anticuerpos con el kit empleado en nuestra investigación fue menor en comparación con otros dos kits comerciales (Sarradell y col., 2014). Cuando las pruebas de diagnóstico tienen menor sensibilidad, los tamaños de muestra bajos limitan aún más la capacidad de detección de anticuerpos en situaciones de baja prevalencia (Detmer y col., 2013). Por estos motivos, la seroprevalencia detectada en nuestro estudio podría ser menor a la real dependiendo del tipo subtipo viral circulante.

En cuanto a los hallazgos pulmonares, los mismos variaron desde pulmones con cambios macroscópicos leves a pulmones con pleuritis e inflamación supurativa-abscedativa. En algunos casos, se observó el patrón de lesión en “tablero de ajedrez”.

La lesión histopatológica observada más frecuentemente fue el infiltrado mononuclear difuso peribronquial, seguida por el engrosamiento de los septos alveolares por infiltrados celulares mononucleares. Estos hallazgos microscópicos corresponden a lesiones observadas en los casos subagudos a crónicos de influenza y otros agentes (Valheim y col., 2011; Gauger y col., 2012). Por el contrario, la lesión de bronquitis-bronquiolitis necrotizante, característica de la fase aguda de la enfermedad (Janke, 2013; Janke, 2014; Schaefer y col., 2013; López y Martinson 2017), fue poco frecuente.

La IHQ permitió la detección de VIA en granjas donde previa o posteriormente también detectamos ARN de VIA mediante RT-PCR, con una tasa de detección de casos positivos a VIA mediante IHQ de 100 %. Al considerar la tasa de detección de los cortes procesados, la misma fue de 95,45 % ya que uno de dos cortes histológicos de un caso positivo a VIA fue negativo mediante IHQ. Nuestros hallazgos son similares a los encontrados en cerdos infectados naturalmente, donde los antígenos de VIA fueron detectados por IHQ en el 93 % (14/15) de las muestras (Jung y col., 2002). Por el contrario, nuestra tasa de detección es superior respecto a otras informadas previamente (Vincent y col., 1997; Watanabe y col., 2012; Dibárbora y col., 2013; Rajao y col., 2013; Cappuccio y col., 2017). Si bien no encontramos asociación entre los diferentes tipos de lesiones y la detección de VIA mediante IHQ, el hallazgo predominante de lesiones sugerentes de infecciones por VIA subagudas a crónicas positivas a IHQ, difiere de un estudio previo donde la hiperplasia de neumocitos tipo II e hiperplasia del TLAB y pleuritis se asociaron a casos donde la IHQ fue negativa (Watanabe y col., 2012). Los hallazgos histológicos encontrados en nuestro estudio también podrían corresponder a aquellas provocadas por otros agentes, como *Mycoplasma hyopneumoniae* en animales mayores a 120 ddv, por ejemplo (Valheim y col., 2011; Rajao y col., 2013). Sin embargo, los resultados positivos por IHQ indican que, al menos, también VIA está involucrado en tales lesiones. Por otro lado, incluso cuando algunas muestras presentaban cambios autolíticos que dificultaron la identificación de lesiones mediante HP, la IHQ no parece haber sido afectada por estos procesos.

Aun cuando se considera que los antígenos de VIA se detectan mediante IHQ principalmente en las células epiteliales de los bronquios y bronquiolos y en los macrófagos alveolares (Jung y col., 2002; Watanabe y col., 2012; Janke, 2013; Casanova y col., 2017), en nuestra investigación el antígeno se detectó en las células epiteliales de bronquiolos en sólo cinco casos, cuatro de los cuales eran muestras de animales de recría – terminación encontrados muertos que pertenecían a la misma granja. Por otro lado, si bien se ha reportado la identificación de antígeno de VIA con menor frecuencia en los neumocitos tipo II, macrófagos intersticiales (Vincent y col.,

1997; Jung y col., 2002; Trebbien y col., 2011; Janke, 2013; Schaefer y col., 2013; Olaniyi y col., 2020) y células epiteliales de las glándulas bronquiales (Sreta y col., 2009; Rajao y col., 2013; Cappuccio y col., 2017; Olaniyi y col., 2020), en nuestro estudio el lugar más frecuente de observación de inmunomarcaje fueron células que pudieran corresponder con macrófagos intersticiales, seguido por el epitelio de las glándulas asociadas a bronquios, epitelio de revestimiento bronquial y epitelio bronquiolar, solos o en combinaciones. Para poder determinar si los sitios de inmunomarcaje observados en nuestra investigación representan afinidades específicas de las cepas de VIA involucradas o si están determinadas por el período transcurrido desde el inicio de la infección, serían necesarios nuevos estudios que permitan la identificación de los VIA actuantes.

La distribución multifocal de las lesiones puede dar lugar a variaciones entre muestras de un mismo caso e influir en la detección o no del VIA (Haines y col., 1993; Vincent y col., 1997; Swenson y col., 2001). En concordancia con lo anterior, encontramos variaciones en las lesiones histopatológicas y los sitios de marcaje de la IHQ entre preparados de un mismo animal. Esto enfatiza la necesidad de examinar múltiples muestras de tejido de cada caso (Haines y col., 1993), así como cierta precaución al realizar conclusiones sobre los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos, especialmente cuando se analizan un número limitado de lobulillos.

#### ***b. Muestras realizados para el monitoreo de VIA en maternidad***

En el presente estudio, la tasa de detección de hisopos orofaríngeos procesados en grupos de 2 a 4 muestras fue mucho menor que la tasa de 15 % encontrada previamente (Garrido-Mantilla y col., 2019), aun cuando fuimos capaces de detectar grupos de muestras positivas en lechones de 6 a 8 ddv y de 17-21 ddv. A diferencia de un estudio previo donde las probabilidades de detección de ARN de VIA en muestras de secreción nasal fueron significativamente mayores en aquellos animales con al menos un signo clínico de enfermedad respiratoria (Allerson y col., 2014), en nuestro estudio la identificación de signos clínicos en los animales no se asoció a mayor tasa de detección de VIA. Por el contrario, dos de los tres grupos positivos eran de animales sin manifestaciones clínicas aparentes al momento del muestreo. La detección de la excreción de VIA en lechones de maternidad coincide con lo reportado por otros autores y apoya la necesidad de realizar monitoreos en esta categoría (Loeffen y col., 2003; Kitikoon y col., 2006; Corzo y col., 2012; Allerson y col., 2013; Panyasing y col., 2014; Diaz y col., 2015; Cappuccio y col., 2017; Garrido-Mantilla y col., 2019; Ryt-Hansen y col., 2019).

La técnica de la gasa mamaria para la detección de ARN de VIA en la piel de las cerdas fue descrita recientemente por Garrido Mantilla y col. (2019) con una tasa de detección del 75 %. Sin embargo, en las condiciones empleadas en nuestro estudio no logramos detectar ARN de VIA en ninguna de las muestras de gasa mamaria, incluso cuando lechones de la camada correspondiente estaban excretando VIA. La ausencia de detección en nuestro estudio puede deberse a una baja prevalencia de circulación viral dentro de las camadas y/o a errores técnicos en la recolección, acondicionamiento y/o procesamiento de las muestras que afectaron la sensibilidad del método empleado. Estos resultados alertan sobre el riesgo de posibles resultados falsos negativos si se utilizara únicamente esta técnica de muestreo como herramienta de monitoreo de lechones en maternidad sin estudios de validación previos.

### ***c. Muestras realizados para el monitoreo de VIA en bioaerosoles***

En nuestro estudio no fuimos capaces de identificar ARN de VIA en muestras de bioaerosoles recolectadas en una granja con infección natural. Una posible explicación podría vincularse al momento en el cual se realizó el estudio. En muestreos a campo VIA se ha detectado en muestras de bioaerosoles durante la fase aguda de la infección (Corzo y col., 2013a; Neira y col., 2016; Garrido-Mantilla y col., 2019) y Corzo y col., (2013a) no lograron detectar ARN de VIA en bioaerosoles cuando los signos clínicos de infección aguda desaparecieron. Por otro lado, en un estudio previo en granjas porcinas con brotes agudos de infección natural por influenza, la detección del ARN de VIA en muestras de bioaerosoles se sostuvo por períodos de 20 días, con niveles máximos estimados entre el séptimo y el onceavo día del inicio del brote (Neira y col., 2016). En nuestro caso, si bien los animales estudiados tenían signos clínicos respiratorios, las muestras fueron recolectadas al menos tres meses después del inicio del brote agudo de infección por influenza. Además, la ausencia de detección de ARN de VIA en las muestras de bioaerosoles puede estar vinculada a una baja prevalencia de cerdos infectados, ya que se ha demostrado que la probabilidad de detección de VIA en el aire aumenta a medida que aumenta el número de cerdos infectados (Corzo y col., 2013c; Neira y col., 2016) y el virus pudo estar en el aire, pero en niveles inferiores a los detectables por el colector ciclónico líquido utilizado.

Se reportó efectos de la temperatura ambiental en la tasa de detección (Anderson y col., 2016; Neira y col., 2018) y se ha especulado que las prácticas de manejo realizadas en las granjas cuando bajan las temperaturas ambientales (como el cierre de galpones, y el apagado de extractores), podrían generar una mayor concentración de aerosoles virales dentro de los galpones (Anderson y col. 2016; Corzo y col., 2013a). En granjas con infección natural, un valor de temperatura ambiental por debajo de 20 °C fue un

predictor significativo de positividad a VIA en muestras de bioaerosoles (Anderson y col. 2016). En nuestro estudio, las condiciones ambientales pueden haber tenido implicancias especialmente en el caso de las muestras recolectadas en los animales de engorde, donde no se realiza control artificial de la temperatura y la ventilación es natural. Si bien no se midió la temperatura en el criadero el día del muestreo, para el mes de mayo de 2015, en la localidad donde se encuentra la granja se reportaron Temperaturas Mínimas Medias Mensuales de 10 °C, Temperaturas Máximas Medias Mensuales de 21 °C y Temperaturas Medias Mensuales de 15 °C (Fuente: Anuario Meteorológico 2015 Red de estaciones Meteorológicas -Departamento de Información Agroeconómica, Bolsa de Cereales de Córdoba). Si bien las temperaturas fueron menores a 20 °C, a diferencia de las prácticas observadas en las granjas estudiadas por Anderson y col. (2016), en nuestro estudio, el efecto de las tasas de ventilación pudo generar un efecto de remoción de las partículas virales y/o disminución de la concentración viral. A su vez, las muestras de bioaerosoles obtenidas en el presente estudio fueron impregnadas en tarjetas FTA para su transporte, lo que puede haber disminuido la sensibilidad de detección de la qRT-PCR (Linhares y col, 2012).

Finalmente, aun cuando el dispositivo y la técnica que empleamos fue similar a la descrita por otros autores que tuvieron éxito para detectar VIA incluso hasta 2 km de la granja infectada (Corzo y col., 2013a), no podemos descartar que pudieron ocurrir errores técnicos de muestreo y se deberían repetir experiencias similares para lograr mayor consistencia de resultados. Hasta nuestro conocimiento, éste es el único estudio que ha intentado la detección de VIA en muestras de bioaerosoles en nuestro país, por lo que son necesarias más investigaciones para poder dilucidar parte de estos interrogantes. Pese a que la técnica de muestreo es relativamente fácil de aplicar, una limitación de este tipo de monitoreo es la necesidad de contar con colector ciclónico líquido. Además, si el número de dispositivos es limitado, el muestreo demanda un tiempo considerable. Si bien el tiempo de funcionamiento del aparato para la obtención de cada muestra es de 30 minutos, el proceso de limpieza, desinfección, enjuague y reacondicionamiento que se requiere para garantizar la ausencia de contaminación cruzada entre muestreos, extiende el plazo entre muestreos.

## 8. CONCLUSIONES

- Mediante la puesta a punto de una técnica de RT-PCR se logró la detección de VIA en diferentes tipos de muestras.
- Hubo concordancia excelente entre los templados obtenidos con distintas marcas comerciales para la extracción de ARN (Trizol LS™ y con High Pure Roche™), en los resultados de RT-PCR de muestras de fluido oral
- La dilución del templado de ARN obtenido a partir de muestras de fluido oral al 50 % en agua libre de ARNasas no mejoró la sensibilidad de la RT-PCR.
- El uso del doble de concentración de enzimas de la mezcla de RT-PCR sobre el templado de ARN obtenido a partir de muestras de fluido oral, puro o diluido al 50 % en agua libre de ARNasas, no mejoró la sensibilidad de la RT-PCR.
- Las tasas de acuerdo entre signos clínicos y resultados de RT-PCR y de detección de VIA mediante RT-PCR en muestras de secreción nasal y fluido oral fueron diferentes de acuerdo con el grupo etario o categoría y granja estudiada.
- Las tasas de detección en muestras de secreción nasal y fluido oral fueron máximas en cerdos de 21-34 ddv, algo menores en cerdos de 35-70 ddv y bajas o nulas en cerdos de 71-203 ddv.
- En cerdos de 35-70 ddv las frecuencias más altas de detección de VIA en muestras de secreción nasal y fluido oral fueron consecuencia del mayor número de eventos de recolección de muestras por la presencia de cerdos con signos clínicos respiratorios.
- En animales de 71-203 ddv la detección de material genético de VIA en base a los signos clínicos puede ser dificultosa y resultó útil el empleo de muestras de fluido oral en lugar de muestras de secreción nasal.
- El uso de signos clínicos permitió obtener tasas de detección de VIA en muestras de secreción nasal similares a las tasas obtenidas en los muestreos fijos, pero usando un tamaño de muestras menor.
- En ausencia de signos clínicos se detectó VIA en muestras de secreción nasal.
- A nivel de granja, la RT-PCR de muestras de fluido oral también fue más sensible y permitió detectar VIA en un mayor número de eventos de muestreo que las muestras de secreción nasal.
- Hubo acuerdo estadísticamente significativo entre la detección de ARN de VIA mediante RT-PCR de muestras de secreción nasal y muestras de fluido oral.

- Las muestras de fluido oral fueron comparativamente más sensibles, fáciles de obtener, no invasivas ni estresantes para los animales y más económicas que las muestras de secreción nasal.
- No hubo asociación entre la detección de anticuerpos contra VIA por ELISA, presencia de signos clínicos y la detección de VIA por RT-PCR de muestras de secreción nasal y/o fluido oral.
- Tanto en presencia como en la ausencia de animales con anticuerpos contra VIA se detectó ARN de VIA y/o signos clínicos compatibles con infección por VIA en al menos una muestra dentro del evento de muestreo.
- El kit de ELISA NP comercial utilizado en nuestro estudio no detectaría o detectaría en baja proporción los anticuerpos vacunales.
- La ausencia de lesiones macro y/o microscópicas típicas de infección por VIA no necesariamente indica la ausencia de infección por influenza.
- La lesión histopatológica más frecuentemente observada en nuestro estudio fue el infiltrado mononuclear difuso peribronquial, indicando infecciones subagudas.
- La técnica de inmunohistoquímica presentó una tasa de detección del 100% y permitió confirmar la presencia de VIA en cortes con lesiones histopatológicas inespecíficas y aun en presencia de autólisis.
- El lugar más frecuente de observación de inmunomarcaje fueron células que pudieran corresponder con macrófagos intersticiales, seguido por el epitelio de las glándulas asociadas a bronquios. En menor frecuencia se observó inmunomarcaje en el epitelio de revestimiento bronquial y bronquiolar.
- Cuando se realizan estudios histopatológicos e IHQ de VIA deben analizarse múltiples cortes histológicos de un mismo caso.
- La técnica del hisopo orofaríngeo permitió la detección de VIA en cerdos de maternidad, aunque con tasas menores a las reportadas previamente y la identificación de signos clínicos en los animales no se asoció a mayor tasa de detección.
- No se detectó ARN de VIA en muestras de gasa mamaria. Son necesarios mayores estudios que nos permitan identificar y superar los factores que pudieron estar implicados en la ausencia de detección de VIA mediante la técnica de gasa mamaria.
- No se identificó material genético de VIA en muestras de bioaerosoles en una granja con infección subaguda por influenza.
- La ausencia de muestras de bioaerosoles positivas a VIA no permite descartar la circulación viral en las condiciones de nuestro estudio, instalaciones y ventilación de la granja estudiada.

- Si bien la recolección de muestras de bioaerosoles es una técnica simple, requiere contar con colectores de bioaerosoles específicos, fuentes de energía en las locaciones de la granja donde conectarlos y puede demandar tiempo considerable en comparación con otras técnicas.
- En los criaderos incluidos en nuestro estudio, el comportamiento serológico y/o virológico de VIA se corresponde con la presentación endémica de la enfermedad.
- Si bien son útiles diferentes técnicas de monitoreo, cuando se desea identificar la presencia de VIA, la detección mediante RT-PCR de muestras de fluido oral constituye una herramienta de monitoreo sensible, de gran aceptación y fácil implementación en las granjas porcinas, económica y que resguarda el bienestar de los animales y personas implicadas en la recolección de muestras.
- Frente a la realidad de infecciones endémicas, el riesgo de eventos de reordenamiento y mutación genéticas y las posibles implicancias en Salud Pública, sería necesario realizar estudios sistemáticos de aislamiento y genotipificación viral, que permitan conocer el origen y evolución de los VIA para producir inmunógenos de mayor eficacia para el control o eliminación de este agente de las granjas.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allerson, M. W., Davies, P. R., Gramer, M. R., & Torremorell, M. (2014). Infection dynamics of pandemic 2009 H1N1 influenza virus in a two-site swine herd. *Transboundary and emerging diseases*, 61(6), 490–499. <https://doi.org/10.1111/tbed.12053>
2. Allerson, M., Deen, J., Detmer, S. E., Gramer, M. R., Joo, H. S., Romagosa, A., & Torremorell, M. (2013). The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. *Vaccine*, 31(3), 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.023>
3. Almeida, M. N., Rotto, H., Schneider, P., Robb, C., Zimmerman, J. J., Holtkamp, D. J., Rademacher, C. J., & Linhares, D. (2020). Collecting oral fluid samples from due-to-wean litters. *Preventive veterinary medicine*, 174, 104810. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104810>
4. Balasuriya U. B. R. (2020). RNA Extraction from Equine Samples for Equine Influenza Virus. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2123, 369–382. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_28)
5. Barbé, F., Labarque, G., Pensaert, M., & Van Reeth, K. (2009). Performance of a commercial Swine influenza virus H1N1 and H3N2 antibody enzyme-linked immunosorbent assay in pigs experimentally infected with European influenza viruses. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 21(1), 88–96. <https://doi.org/10.1177/104063870902100113>
6. Baudon, E., Peyre, M., Peiris, M., & Cowling, B. J. (2017). Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 12(6), e0179044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179044>
7. Boulbria, G., Normand, V., Leblanc-Maridor, M., Belloc, C., Berton, P., Bouchet, F., & Lebret, A. (2020). Feasibility of pooled oral fluid collection from pre-weaning piglets using cotton ropes. *Veterinary and animal science*, 9, 100099. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100099>
8. Brookes, S. M., Núñez, A., Choudhury, B., Matrosovich, M., Essen, S. C., Clifford, D., Slomka, M. J., Kuntz-Simon, G., Garcon, F., Nash, B., Hanna, A., Heegaard, P. M., Quéguiner, S., Chiapponi, C., Bublot, M., Garcia, J. M., Gardner, R., Foni, E., Loeffen, W., Larsen, L., ... Brown, I. H. (2010). Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs. *PloS one*, 5(2), e9068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009068>

9. Brown I. H. (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary microbiology*, 74(1-2), 29–46. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00164-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00164-4)
10. Cappuccio JA, Pena L, Dibarbora M, Rimondi A, Piñeyro P, Insarralde L, Quiroga MA, Machuca M, Craig MI, Olivera V, Chockalingam A, Perfumo CJ, Perez DR, Pereda A. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. *The Journal of general virology*, 92(Pt 12), 2871–2878. <https://doi.org/10.1099/vir.0.036590-0>
11. Cappuccio, J., Dibarbora, M., Lozada, I., Quiroga, A., Olivera, V., Dángelo, M., Pérez, E., Barrales, H., Perfumo, C., Pereda, A., & Pérez, D. R. (2017). Two years of surveillance of influenza A virus infection in a swine herd. Results of virological, serological, and pathological studies. *Comparative immunology, microbiology, and infectious diseases*, 50, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.12.005>
12. Casanova, T., Rojas, D., Baeza, C., & Ruiz, Á. (2017). Immunohistochemistry: A Rapid and Specific Diagnostic Tool for Influenza Virus Infection in Pigs. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00163>
13. Caswell, J.L., Williams, K.J. (2016). Chapter 5 - Respiratory System. Editor(s): M. Grant Maxie, Jubb, Kennedy & Palmer's. *Pathology of Domestic Animals: Volume 2* (6th Edition), Elsevier, Inc, St Louis Missouri, Pages 465-591.e4, ISBN 9780702053184, <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5318-4.00011-5>.
14. Chamba Pardo, F. O., Alba-Casals, A., Nerem, J., Morrison, R. B., Puig, P., & Torremorell, M. (2017). Influenza Herd-Level Prevalence and Seasonality in Breed-to-Wean Pig Farms in the Midwestern United States. *Frontiers in veterinary science*, 4, 167. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00167>
15. Chamba Pardo, F. O., Allerson, M., R Culhane, M., B Morrison, R., R Davies, P., Perez, A., & Torremorell, M. (2021). Effect of influenza A virus sow vaccination on infection in pigs at weaning: A prospective longitudinal study. *Transboundary and emerging diseases*, 68(1), 183–193. <https://doi.org/10.1111/tbed.13688>
16. Chamba Pardo, F. O., Schelkopf, A., Allerson, M., Morrison, R., Culhane, M., Perez, A., & Torremorell, M. (2018). Breed-to-wean farm factors associated with influenza A virus infection in piglets at weaning. *Preventive veterinary medicine*, 161, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.008>
17. Chittick, W. A. (2012). Optimizing molecular detection and sequencing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in clinical oral fluid specimens. *Iowa State University of Science and Technology Graduate Theses and Dissertations*.

- Paper 12885. <https://doi.org/10.31274/etd-180810-1883>
18. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
  19. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
  20. Corzo, C. A., Gramer, M., Lauer, D., & Davies, P. R. (2012). Prevalence and risk factors for H1N1 and H3N2 influenza A virus infections in Minnesota turkey premises. *Avian diseases*, 56(3), 488–493. <https://doi.org/10.1637/10037-121211-Reg.1>
  21. Corzo, C. A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R. B., & Torremorell, M. (2013a). Airborne detection and quantification of swine influenza a virus in air samples collected inside, outside and downwind from swine barns. *PloS one*, 8(8), e71444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071444>
  22. Corzo, C. A., Culhane, M., Juleen, K., Stigger-Rosser, E., Ducatez, M. F., Webby, R. J., & Lowe, J. F. (2013b). Active surveillance for influenza A virus among swine, midwestern United States, 2009-2011. *Emerging infectious diseases*, 19(6), 954–960. <https://doi.org/10.3201/eid1906.121637>
  23. Corzo, C. A., Romagosa, A., Dee, S. A., Gramer, M. R., Morrison, R. B., & Torremorell, M. (2013c). Relationship between airborne detection of influenza A virus and the number of infected pigs. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 196(2), 171–175. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.024>
  24. Corzo, C.A., Allerson, M., Gramer, M., Morrison, R.B. and Torremorell, M. (2014), Detection of Airborne Influenza A Virus in Experimentally Infected Pigs with Maternally Derived Antibodies. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61: 28-36. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01367.x>
  25. Das, A., Beckham, T. R., & McIntosh, M. T. (2011). Comparison of methods for improved RNA extraction from blood for early detection of Classical swine fever virus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 727–735. <https://doi.org/10.1177/1040638711407685>
  26. de Lara, A. C., Garrido-Mantilla, J., Lopez-Moreno, G., Yang, M., Barcellos, D., & Torremorell, M. (2022). Effect of pooling udder skin wipes on the detection of influenza A virus in preweaning pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 34(1), 133–135. <https://doi.org/10.1177/10406387211039462>

27. Deng, M. Y., Wang, H., Ward, G. B., Beckham, T. R., & McKenna, T. S. (2005). Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 17(6), 574–578. <https://doi.org/10.1177/104063870501700609>
28. Decorte, I., Steensels, M., Lambrecht, B., Cay, A. B., & 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), e0139586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139586>
29. Desrosiers R, Boutin R, Broes A. (2004). Persistence of antibodies after natural infection with swine influenza virus and epidemiology of the infection in a herd previously considered influenzanegative. *J Swine Health Prod*, 12(2):78-81. <http://www.aasv.org/shap.html>.
30. Detmer, S. E., Patnayak, D. P., Jiang, Y., Gramer, M. R., & Goyal, S. M. (2011). Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 23(2), 241–247. <https://doi.org/10.1177/104063871102300207>
31. Detmer, S., Gramer, M., Goyal, S., Torremorell, M., & Torrison, J. (2013). Diagnostics and surveillance for Swine influenza. *Current topics in microbiology and immunology*, 370, 85–112. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_220](https://doi.org/10.1007/82_2012_220)
32. Diaz, A., Perez, A., Sreevatsan, S., Davies, P., Culhane, M., & Torremorell, M. (2015). Association between Influenza A Virus Infection and Pigs Subpopulations in Endemically Infected Breeding Herds. *PLoS one*, 10(6), e0129213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129213>
33. Dibárbora, M., Cappuccio, J., Olivera, V., Quiroga, M., Machuca, M., Perfumo, C., Pérez, D., & Pereda, A. (2013). Swine influenza: clinical, serological, pathological, and virological cross-sectional studies in nine farms in Argentina. *Influenza and other respiratory viruses*, 7 (Suppl 4), 10–15. <https://doi.org/10.1111/irv.12200>
34. Dibarbora M, Cappuccio J, Aznar MN, Bessone FA, Piscitelli H, Pereda AJ, Perez DR. (2017). Detección serológica de Brucella suis, virus de influenza y virus de la enfermedad de Aujeszky en criaderos porcinos familiares de menos de 100 madres en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2):158-165. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.010>
35. Dimitrov, K.M., Clavijo, A., Sneed, L. (2014). RNA extraction for molecular

- detection of Newcastle disease virus—comparative study of three methods. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 165(5-6):172-175
36. Ducatez, M. F., Hause, B., Stigger-Rosser, E., Darnell, D., Corzo, C., Juleen, K....Webby, R. J. (2011). Multiple Reassortment between Pandemic (H1N1) 2009 and Endemic Influenza Viruses in Pigs, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 17(9), 1624-1629. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1709.110338>.
  37. Fablet, C., Marois, C., Kuntz-Simon, G., Rose, N., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J. P., Le Devendec, L., Tocqueville, V., Quéguiner, S., Gorin, S., Kobisch, M., & Madec, F. (2011). Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Veterinary microbiology*, 147(3-4), 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.005>
  38. Garrido-Mantilla, J., Alvarez, J., Culhane, M., Nirmala, J., Cano, J. P., & Torremorell, M. (2019). Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. *BMC veterinary research*, 15(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1805-0>
  39. Garrido-Mantilla, J., Sanhueza, J.; Alvarez, J., Culhane, M., Davies, P.; Allerson, M.; Torremorell, M. (2021). Impact of nurse sows on influenza A virus transmission in pigs under field conditions, *Preventive Veterinary Medicine*, vol 188 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105257>
  40. Gauger, P. C., Vincent, A. L., Loving, C. L., Henningson, J. N., Lager, K. M., Janke, B. H., Kehrli, M. E., Jr, & Roth, J. A. (2012). Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. *Veterinary pathology*, 49(6), 900–912. <https://doi.org/10.1177/0300985812439724>
  41. Goodell, C. K., Prickett, J., Kittawornrat, A., Zhou, F., Rauh, R., Nelson, W., O'Connell, C., Burrell, A., Wang, C., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2013). Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. *Veterinary microbiology*, 166(3-4), 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.029>
  42. Goodell, C. K., Prickett, J., Kittawornrat, A., Johnson, J., Zhang, J., Wang, C., & Zimmerman, J. J. (2016). Evaluation of Screening Assays for the Detection of Influenza A Virus Serum Antibodies in Swine. *Transboundary and emerging diseases*, 63(1), 24–35. <https://doi.org/10.1111/tbed.12214>
  43. Fablet, C., Marois, C., Kuntz-Simon, G., Rose, N., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J. P., Le Devendec, L., Tocqueville, V., Quéguiner, S., Gorin, S., Kobisch, M., & Madec, F. (2011). Longitudinal study of respiratory infection patterns of

- breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Veterinary microbiology*, 147(3-4), 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.005>
44. Haines, D. M., Waters, E. H., & Clark, E. G. (1993). Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 57(1), 33–36.
45. Hermann, J. R., Hoff, S. J., Yoon, K. J., Burkhardt, A. C., Evans, R. B., & Zimmerman, J. J. (2006). Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 4811–4818. <https://doi.org/10.1128/AEM.00472-06>
46. Hernandez-Garcia, J., Robben, N., Magnée, D., Eley, T., Dennis, I., Kayes, S. M., Thomson, J. R., & Tucker, A. W. (2017). The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine health management*, 3, 7. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0055-4>
47. Hughes, H. R., Vincent, A. L., Brockmeier, S. L., Gauger, P. C., Pena, L., Santos, J., Braucher, D. R., Perez, D. R., & Loving, C. L. (2015). Oral Fluids as a Live-Animal Sample Source for Evaluating Cross-Reactivity and Cross-Protection following Intranasal Influenza A Virus Vaccination in Pigs. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 22(10), 1109–1120. <https://doi.org/10.1128/CVI.00358-15>
48. Ito, T., Couceiro, J. N., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G., & Kawaoka, Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Journal of virology*, 72(9), 7367–7373. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7367-7373.1998>
49. Janke B. H. (2013). Clinicopathological features of Swine influenza. *Current topics in microbiology and immunology*, 370, 69–83. [https://doi.org/10.1007/82\\_2013\\_308](https://doi.org/10.1007/82_2013_308)
50. Jung, M. A., Epperson, S., Biggerstaff, M., Allen, D., Balish, A., Barnes, N., Beaudoin, A., Berman, L., Bidol, S., Blanton, L., Blythe, D., Brammer, L., D'Mello, T., Danila, R., Davis, W., de Fijter, S., Diorio, M., Durand, L. O., Emery, S., Fowler, B., ... Finelli, L. (2013). Outbreak of variant influenza A(H3N2) virus in the United States. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(12), 1703–1712. <https://doi.org/10.1093/cid/cit649>
51. Jung, T., Choi, C., & Chae, C. (2002). Localization of swine influenza virus in naturally infected pigs. *Veterinary pathology*, 39(1), 10–16. <https://doi.org/10.1354/vp.39-1-10>
52. Kaplan, B. S., DeBeauchamp, J., Stigger-Rosser, E., Franks, J., Crumpton, J. C.,

- Turner, J., Darnell, D., Jeevan, T., Kayali, G., Harding, A., Webby, R. J., & Lowe, J. F. (2015). Influenza Virus Surveillance in Coordinated Swine Production Systems, United States. *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1834–1836. <https://doi.org/10.3201/eid2110.140633>
53. Kittawornrat, A., Prickett, J., Wang, C., Olsen, C., Irwin, C., Panyasing, Y., Ballagi, A., Rice, A., Main, R., Johnson, J., Rademacher, C., Hoogland, M., Rowland, R., & Zimmerman, J. (2012). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 24(2), 262–269. <https://doi.org/10.1177/104063871143567>
54. Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B. J., Janke, B. H., Hoover, T. C., Sornsen, S. A., & Thacker, E. L. (2006). The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology*, 112(3-4), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.02.008>
55. Kyriakis, C. S., Brown, I. H., Foni, E., Kuntz-Simon, G., Maldonado, J., Madec, F., Essen, S. C., Chiapponi, C., & Van Reeth, K. (2011). Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. *Zoonoses and public health*, 58(2), 93–101. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01301.x>
56. Landis, J.; Koch, G. (1977). The measurement of Observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174, 2
57. Landolt, G. A., Karasin, A. I., Hofer, C., Mahaney, J., Svaren, J., & Olsen, C. W. (2005). Use of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay and cell culture methods for detection of swine influenza A viruses. *American journal of veterinary research*, 66(1), 119–124. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.119>
58. Lange, E., Kalthoff, D., Blohm, U., Teifke, J. P., Breithaupt, A., Maresch, C., Starick, E., Fereidouni, S., Hoffmann, B., Mettenleiter, T. C., Beer, M., & Vahlenkamp, T. W. (2009). Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *The Journal of general virology*, 90(Pt 9), 2119–2123. <https://doi.org/10.1099/vir.0.014480-0>
59. Larochelle, R., Sauvageau, R., & Magar, R. (1994). Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Québec. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 35(8), 513–515.

60. Larsen, L. E., Nielsen, C. K., Aakerblom, S., Hjulsgaard, C. K., Nielsen, J. P., Stege, H. H., Kristensen, C. S., Elvstrom, A., & Lau, L. (2010). Dynamics of swine influenza infections in the farrowing unit of a Danish sow herd. In *Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress* (pp. O.042)
61. Lee, J. H., Gramer, M. R., & Joo, H. S. (2007). Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 71(3), 207–212.
62. Lewis, N. S., Russell, C. A., Langat, P., Anderson, T. K., Berger, K., Bielejec, F., Burke, D. F., Dudas, G., Fonville, J. M., Fouchier, R. A., Kellam, P., Koel, B. F., Lemey, P., Nguyen, T., Nuansrichy, B., Peiris, J. M., Saito, T., Simon, G., Skepner, E., Takemae, N., ... Vincent, A. L. (2016). The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *eLife*, 5, e12217. <https://doi.org/10.7554/eLife.12217>
63. Linhares, D. C., Rovira, A., & Torremorell, M. (2012). Evaluation of Flinders Technology Associates cards for collection and transport of samples for detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 24(2), 328–332. <https://doi.org/10.1177/1040638711429492>
64. Loeffen, W. L., Heinen, P. P., Bianchi, A. T., Hunneman, W. A., & Verheijden, J. H. (2003). Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 92(1-2), 23–35. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(03\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(03)00019-9)
65. Loeffen, W. L., Stockhofe, N., Weesendorp, E., van Zoelen-Bos, D., Heutink, R., Quak, S., Goovaerts, D., Heldens, J. G., Maas, R., Moormann, R. J., & Koch, G. (2011). Efficacy of a pandemic (H1N1) 2009 virus vaccine in pigs against the pandemic influenza virus is superior to commercially available swine influenza vaccines. *Veterinary microbiology*, 152(3-4), 304–314. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.027>
66. López, A., Martinson, S.A. (2017) Chapter 9 - Respiratory System, Mediastinum, and Pleurae, Editor(s): James F. Zachary, *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (Sixth Edition), Mosby, , Pages 471-560.e1, ISBN 9780323357753, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00009-6>.
67. Lou Z. (2018). A Structural View of Negative-Sense RNA Virus Nucleocapsid Protein and Its Functions Beyond. *Sub-cellular biochemistry*, 88, 19–37. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_2)
68. Ma, W., Lager, K. M., Lekcharoensuk, P., Ulery, E. S., Janke, B. H., Solórzano, A.,

- Webby, R. J., García-Sastre, A., & Richt, J. A. (2010). Viral reassortment and transmission after co-infection of pigs with classical H1N1 and triple-reassortant H3N2 swine influenza viruses. *The Journal of general virology*, 91(Pt 9), 2314–2321. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021402-0>
69. MacLachlan, N.J., Dubovi E.J. (2016). *Fenner's veterinary virology*. 5ta Edición. London; Boston: Academic Press. ISBN: 978-0-12-800946-8. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-06921-6>
70. Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., & de Kruif, A. (2000). Herd factors associated with the seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Veterinary research*, 31(3), 313–327. <https://doi.org/10.1051/vetres:2000122>
71. Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., & Klenk, H. D. (2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of virology*, 78(22), 12665–12667. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004>
72. Miurhead, M., Alexander, T. (2001). *Manejo Sanitario y tratamiento de las enfermedades del cerdo*. 1ra. Ed. Editorial InterMédica
73. Neira, V., Rabinowitz, P., Rendahl, A., Paccha, B., Gibbs, S. G., & 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), e0146616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146616>
74. Neira, V., Allerson, M., Corzo, C., Culhane, M., Rendahl, A., & Torremorell, M. (2018). Detection of influenza A virus in aerosols of vaccinated and non-vaccinated pigs in a warm environment. *PloS one*, 13(5), e0197600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197600>
75. Nirmala, J., Alves, G., Vilalta, C., Yang, M., Rendahl, A., Olson, B., & Torremorell, M. (2021). Evaluation of viral RNA extraction methods to detect porcine reproductive and respiratory syndrome and influenza A viruses from used commercial HVAC air filters from swine farms. *Journal of Aerosol Science*, 151, [105624]. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2020.105624>
76. Olaniyi, M.O., Adebisi, A.A., Ajayi, O.L., Alaka, O.O. Akpavie, S.O. (2020). Localization and immunohistochemical detection of swine influenza A virus subtype H1N1 antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues from naturally infected pigs. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9, 16. <https://doi.org/10.1186/s43088-020-0039-3>
77. Idstone, M. B., Teijaro, J. R., Walsh, K. B., & Rosen, H. (2013). Dissecting influenza virus pathogenesis uncovers a novel chemical approach to combat the infection.

- Virology*, 435(1), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.039>
78. Olsen C. W. (2002). The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus research*, 85(2), 199–210. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00027-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00027-8)
79. Olsen, C., Wang, C., Christopher-Hennings, J., Doolittle, K., Harmon, K. M., Abate, S., Kittawornrat, A., Lizano, S., Main, R., Nelson, E. A., Otterson, T., Panyasing, Y., Rademacher, C., Rauh, R., Shah, R., & Zimmerman, J. (2013). Probability of detecting Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection using pen-based swine oral fluid specimens as a function of within-pen prevalence. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 25(3), 328–335. <https://doi.org/10.1177/1040638713481471>
80. Panyasing, Y., Goodell, C., Kittawornrat, A., Wang, C., Levis, I., Desfresne, L., Rauh, R., Gauger, P. C., Zhang, J., Lin, X., Azeem, S., Ghorbani-Nezami, S., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. (2016). Influenza A Virus Surveillance Based on Pre-Weaning Piglet Oral Fluid Samples. *Transboundary and emerging diseases*, 63(5), e328–e338. <https://doi.org/10.1111/tbed.12307>
81. Panyasing, Y., Goodell, C. K., Giménez-Lirola, L., Kittawornrat, A., Wang, C., Schwartz, K. J., & Zimmerman, J. J. (2013). Kinetics of influenza A virus nucleoprotein antibody (IgM, IgA, and IgG) in serum and oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions. *Vaccine*, 31(52), 6210–6215. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.040>
82. Panyasing, Y., Goodell, C. K., Wang, C., Kittawornrat, A., Prickett, J. R., Schwartz, K. J., Ballagi, A., Lizano, S., & Zimmerman, J. J. (2014). Detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies in oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions using a blocking ELISA. *Transboundary and emerging diseases*, 61(2), 177–184. <https://doi.org/10.1111/tbed.12019>
83. Pascu, C., Costinar, L., Herman, V. (2012) Enzyme-linked immunosorbent assay detection of antibodies against swine influenza virus in western Romania. *Journal of Swine Health and Production*, 20(2):87–90. [aasv.org/shap.html](http://aasv.org/shap.html).
84. Pensaert, M., Haesebrouck, F., & Castryck, F. (1986). Usefulness of the direct fluorescent antibody technique for diagnosis of influenza in swine. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 33 5, 379-82.
85. Pereda, A., Cappuccio, J., Quiroga, M. A., Baumeister, E., Insarralde, L., Ibar, M., Sanguinetti, R., Cannilla, M. L., Franzese, D., Escobar Cabrera, O. E., Craig, M. I., Rimondi, A., Machuca, M., Debenedetti, R. T., Zenobi, C., Barral, L., Balzano, R., Capalbo, S., Risso, A., & Perfumo, C. J. (2010). Pandemic (H1N1) 2009 outbreak

- on pig farm, Argentina. *Emerging infectious diseases*, 16(2), 304–307. <https://doi.org/10.3201/eid1602.091230>
86. Pereda A, Rimondi A, Cappuccio J, Sanguinetti R, Angel M, Ye J, Sutton T, Dibárbora M, Olivera V, Craig MI, Quiroga M, Machuca M, Ferrero A, Perfumo C, Perez DR. (2011). Evidence of reassortment of pandemic H1N1 influenza virus in swine in Argentina: are we facing the expansion of potential epicenters of influenza emergence? *Influenza and other respiratory viruses*, 5(6), 409–412. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00246.x>
  87. Piñeyro PE, Quiroga MA, Cappuccio JA, Machuca MA, Ramos Vara J, Perfumo CJ. (2006). Neumonía necrótica proliferativa: descripción de un caso e identificación de los agentes etiológicos. *Memorias del Quinto Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR*, p. 286.
  88. Piñeyro, P.E., Baumeister, E., Capuccio, J.A., Machuca, M.A., Quiroga, M.A., Tedoroff, T., Perfumo, C.J. (2010). Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002: evaluación mediante inhibición de la hemaglutinación y ELISA. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2):98-101. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412010000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412010000200006&lng=es&tlng=es).
  89. Pitzer, V. E., Aguas, R., Riley, S., Loeffen, W. L., Wood, J. L., & Grenfell, B. T. (2016). High turnover drives prolonged persistence of influenza in managed pig herds. *Journal of the Royal Society, Interface*, 13(119), 20160138. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0138>
  90. Pleschka S. (2013). Overview of influenza viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 370, 1–20. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_272](https://doi.org/10.1007/82_2012_272)
  91. Poljak, Z., Dewey, C. E., Martin, S. W., Christensen, J., Carman, S., & Friendship, R. M. (2008). Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 72(1), 7–17.
  92. Prickett, J., Simer, R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K. J., Evans, R. B., & Zimmerman, J. J. (2008). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 20(2), 156–163. <https://doi.org/10.1177/104063870802000203>
  93. Prickett, J. R., & Zimmerman, J. J. (2010). The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Animal health research reviews*, 11(2), 207–216. <https://doi.org/10.1017/S1466252310000010>

94. Prickett, J. R., Johnson, J., Murtaugh, M. P., Puvanendiran, S., Wang, C., Zimmerman, J. J., & Opriessnig, T. (2011). Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. *Transboundary and emerging diseases*, 58(2), 121–127. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01189.x>
95. Rajão, Daniela S., Couto, Diego H., Gasparini, Marcela R., Costa, Adrienny T.R., Reis, Jenner K.P., Lobato, Zélia I.P., Guedes, Roberto M.C., & Leite, Rômulo C. (2013). Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus infection in Brazilian pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(1), 30-36. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000100006>
96. Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J. R., Pogranichniy, R., Yoon, K. J., Main, R., Johnson, J. K., Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E., & Zimmerman, J. (2012). Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Preventive veterinary medicine*, 104(3-4), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.11.008>
97. Raynor, P. C., Adesina, A., Aboubakr, H. A., Yang, M., Torremorell, M., & Goyal, S. M. (2021). Comparison of samplers collecting airborne influenza viruses: 1. Primarily impingers and cyclones. *PloS one*, 16(1), e0244977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244977>
98. 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 and other respiratory viruses*, 6(2), 110–118. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00276.x>
99. Rotolo, M. L., Sun, Y., Wang, C., Giménez-Lirola, L., Baum, D. H., Gauger, P. C., Harmon, K. M., Hoogland, M., Main, R., & Zimmerman, J. J. (2017). Sampling guidelines for oral fluid-based surveys of group-housed animals. *Veterinary microbiology*, 209, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.004>
100. Ryt-Hansen, P., Larsen, I., Kristensen, C.S. Krog, J.S., Wacheck, S., Larsen, L.E. (2019) Longitudinal field studies reveal early infection and persistence of influenza A virus in piglets despite the presence of maternally derived antibodies. *Veterinary Research*, 50, 36. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0655-x>
101. Sandbulte, M. R., Spickler, A. R., Zaabel, P. K., & Roth, J. A. (2015). Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines*, 3(1), 22–73. <https://doi.org/10.3390/vaccines3010022>
102. Sarradell, J., Biscia, M., Di Masso, R., Anthony, L., Garófolo, F., Perez, A. (2014). Comparison of three commercially available ELISA kits for detection of anti-influenza A antibodies in Argentine swine farms. *Proceedings of the 23rd IPVS*

- Congress, (2), 575.
103. Schaefer, R., Rech, R.R., Silva, M.C., Gava, D., Ciacci-Zanella, J.R. (2013). Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(1), 61-73. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000100012>
  104. Sheskin, D.J. (2011) Handbook of parametric and nonparametric statistical procederes. CRC Press, 5th Edition, USA.
  105. Simon, G., Larsen, L. E., Dürrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., Markowska-Daniel, I., Reid, S. M., Dan, A., Maldonado, J., Huovilainen, A., Billinis, C., Davidson, I., Agüero, M., Vila, T., Hervé, S., Breum, S. Ø., Chiapponi, C., Urbaniak, K., Kyriakis, C. S., ... Loeffen, W. (2014). European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PloS one*, 9(12), e115815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115815>
  106. Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G. E., Vilar, M. J., García-Bocanegra, I., Mora, M., Martín, M., Mateu, E., & Casal, J. (2011). Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Veterinary microbiology*, 149(1-2), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.015>
  107. Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G. E., Vilar, M. J., Busquets, N., Mora-Salvatierra, M., Bestebroer, T. M., Fouchier, R. A., Martín, M., Mateu, E., & Casal, J. (2012). Swine influenza virus infection dynamics in two pig farms; results of a longitudinal assessment. *Veterinary research*, 43(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-24>
  108. Singh, V.K., Bhadouriya, S., Kumar, R., Rajak, K.K. (2015) Comparison of RNA isolation methods for detection of Classical swine fevevirus from tissue samples. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol.Infect. Dis*, 36(2):71–5. <https://doi.org/10.5958/0974-0147.2015.00016.1>
  109. Spickler, Anna Rovid, "Influenza" (2009). *Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets*. En [cfsph.iastate.edu/es/enfermedades/factsheets/](http://cfsph.iastate.edu/es/enfermedades/factsheets/)
  110. Sreta, D., Kedkovid, R., Tuamsang, S., Kitikoon, P., Thanawongnuwech, R. (2009). Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. *Virology journal*, 6, 34. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-34>
  111. Steward, G. F., Culley, A. I. (2010). Extraction and purification of nucleic acids from viruses, (16): 154–165. En S. W. Wilhelm, M. G. Weinbauer, and C. A. Suttle [eds.], *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO. <https://doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.154>
  112. Strutzberg-ftinder K, Boehmer J, Fischer S, Homuth, M., Gomez-Duran, O., Finger, G., Genzow, M. (2015). Moonitoring influenza A virus infection in pigs by using

- a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect virus antibodies in pen-based oral-fluid specimens. *J Swine Health Prod*, 23(3):126–131. <http://www.aasv.org/shap.html>.
113. Suriya, R., Hassan, L., Omar, A. R., Aini, I., Tan, C. G., Lim, Y. S., & Kamaruddin, M. I. (2008). Seroprevalence and risk factors for influenza A viruses in pigs in Peninsular Malaysia. *Zoonoses and public health*, 55(7), 342–351. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01138.x>
  114. Swenson, S. L., Vincent, L. L., Lute, B. M., Janke, B. H., Lechtenberg, K. E., Landgraf, J. G., Schmitt, B. J., Kinker, D. R., & McMillen, J. K. (2001). A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 13(1), 36–42. <https://doi.org/10.1177/104063870101300108>
  115. Thatcher S. A. (2015). DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clinical chemistry*, 61(1), 89–99. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221374>
  116. Teodoroff, T.A., Pecoraro, M.R., Baumeister, E., Janke, B.H., Machuca, M., Cappuccio, J.A. (2003). Serological and immunohistochemical studies of influenza virus in fattening pigs in Argentina. *4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases* (pp. 262-63).
  117. Torremorell, M., Allerson, M., Corzo, C., Diaz, A., & Gramer, M. (2012). Transmission of influenza A virus in pigs. *Transboundary and emerging diseases*, 59 Suppl 1, 68–84. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01300.x>
  118. Trebbien, R., Larsen, L. E., & Viuff, B. M. (2011). Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virology journal*, 8, 434. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-434>
  119. Tse, M., Kim, M., Chan, C. H., Ho, P. L., Ma, S. K., Guan, Y., & Peiris, J. S. (2012). Evaluation of three commercially available influenza A type-specific blocking enzyme-linked immunosorbent assays for seroepidemiological studies of influenza A virus infection in pigs. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 19(3), 334–337. <https://doi.org/10.1128/CVI.05358-11>
  120. Valheim, M., Gamlem, H., Gjerset, B., Germundsson, A., & Lium, B. (2011). Pathological Findings and Distribution of Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Virus in Lungs from Naturally Infected Fattening Pigs in Norway. *Influenza research and treatment*, 2011, 565787. <https://doi.org/10.1155/2011/565787>
  121. Van Reeth, K., & Ma, W. (2013). Swine influenza virus vaccines: to change or not to change-that's the question. *Current topics in microbiology and immunology*, 370, 173–200. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_266](https://doi.org/10.1007/82_2012_266)

122. Van Reeth, K., Vincent A. L. (2019). Influenza viruses. En: J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson, J. Zhang (Ed). *Diseases of Swine* (11 ed., pp. 576–593). John Wiley & Sons, Inc., Ames, IA. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch36>
123. Vincent, L. L., Janke, B. H., Paul, P. S., & Halbur, P. G. (1997). A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 9(2), 191–195. <https://doi.org/10.1177/104063879700900214>
124. 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 and other respiratory viruses*, 4(2), 53–60. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00121.x>
125. Vincent, A. L., Ma, W., Lager, K. M., Janke, B. H., & Richt, J. A. (2008). Swine influenza viruses a North American perspective. *Advances in virus research*, 72, 127–154. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00403-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00403-X)
126. Watanabe, Tatiane T.N., Almeida, Laura L. de, Wouters, Flademir, Wouters, Angelica T.B., Zlotowski, Priscila, & Driemeier, David. (2012). Histopathological and immunohistochemical findings of swine with spontaneous influenza A infection in Brazil, 2009-2010. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(11), 1148-1154. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100013>
127. Weingartl, H. M., Berhane, Y., Hisanaga, T., Neufeld, J., Kehler, H., Emburry-Hyatt, C., Hooper-McGreevy, K., Kasloff, S., Dalman, B., Bystrom, J., Alexandersen, S., Li, Y., & Pasick, J. (2010). Genetic and pathobiologic characterization of pandemic H1N1 2009 influenza viruses from a naturally infected swine herd. *Journal of virology*, 84(5), 2245–2256. <https://doi.org/10.1128/JVI.02118-09>
128. Yaeger, M.J. and Van Alstine, W.G. (2019). Respiratory System. En: J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson, J. Zhang (Ed). *Diseases of Swine* (11 ed., pp. 393-407) <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch21>
129. Yoon, K. J., Janke, B. H., Swalla, R. W., & Erickson, G. (2004). Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American*

*Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 16(3), 197–201.  
<https://doi.org/10.1177/104063870401600304>

130. Zell, R., Scholtissek, C., & Ludwig, S. (2013). Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, vol 370, 29–55. Springer, Berlin, Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_267](https://doi.org/10.1007/82_2012_267)
131. Zhang, J., Gauger, P., Harmon, K. (2016). Swine Influenza A Virus. En: Dongyou Liu Editor. *Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*. Boca Raton Chapman and Hall/CRC Ann Arbor, Michigan ProQuest

## 10. ANEXOS

## Procedural guidelines

- Perform all steps at room temperature (20–25°C) unless otherwise noted.
- Use cold TRIzol™ LS Reagent if the starting material contains high levels of RNase, such as spleen or pancreas samples.
- Use disposable, individually wrapped, sterile plastic ware and sterile, disposable RNase-free pipettes, pipette tips, and tubes.
- Wear disposable gloves while handling reagents and RNA samples to prevent RNase contamination from the surface of the skin; change gloves frequently, particularly as the protocol progresses from crude extracts to more purified materials.
- Always use proper microbiological aseptic techniques when working with RNA.
- Use RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Cat. no. AM9780) to remove RNase contamination from work surfaces and non-disposable items such as centrifuges and pipettes used during purification.
- Always maintain a ratio of 3:1 between the volume of TRIzol™ LS Reagent and the sample.
- To facilitate isolation of RNA from small quantities of samples (<10<sup>6</sup> cells or <10 mg of tissue) or for sample volumes <0.25 mL, adjust the sample volume to 0.25 mL with RNase-free water.

3. (Optional) If samples have a high fat content, centrifuge the lysate for 5 minutes at 12,000 × g at 4–10°C, then transfer the clear supernatant to a new tube.
4. Incubate for 5 minutes to permit complete dissociation of the nucleoproteins complex.
5. Add 0.2 mL of chloroform per 0.75 mL of TRIzol™ LS Reagent used for lysis, then securely cap the tube.
6. Incubate for 2–3 minutes.
7. Centrifuge the sample for 15 minutes at 12,000 × g at 4°C. The mixture separates into a lower red phenol-chloroform, and interphase, and a colorless upper aqueous phase.
8. Transfer the aqueous phase containing the RNA to a new tube.
9. Transfer the aqueous phase containing the RNA to a new tube by angling the tube at 45° and pipetting the solution out.

---

**IMPORTANT!** Avoid transferring any of the interphase or organic layer into the pipette when removing the aqueous phase.

---

Proceed directly to “Isolate RNA” on page 2.

Save the interphase and organic phase if you want to isolate DNA or protein. See “Isolate DNA” on page 3 or “Isolate proteins” on page 4 for detailed procedures. The organic phase can be stored at 4°C overnight.

## Lyse samples and separate phases

1. Add 0.75 mL of TRIzol™ LS Reagent per 0.25 mL of sample volume.
2. Homogenize the sample by pipetting up and down several times.

**Note:** The sample volume should not exceed 10% of the volume of TRIzol™ LS Reagent used for lysis.

---

**STOPPING POINT** Samples can be stored at 4°C overnight or at –20°C for up to a year.

---

## Isolate RNA

- 
- |          |                            |  |
|----------|----------------------------|--|
| <b>1</b> | <b>Precipitate the RNA</b> | <ol style="list-style-type: none"><li>a. Add 0.5 mL of isopropanol to the aqueous phase, per 0.75 mL of TRIzol™ LS Reagent used for lysis.</li><li>b. Incubate for 10 minutes.</li><li>c. Centrifuge for 10 minutes at 12,000 × g at 4°C. Total RNA precipitate forms a white gel-like pellet at the bottom of the tube.</li><li>d. Discard the supernatant with a micropipettor.</li></ol>  |
| <hr/>    |                            |  |
| <b>2</b> | <b>Wash the RNA</b>        | <ol style="list-style-type: none"><li>a. Resuspend the pellet in 1 mL of 75% ethanol per 0.75 mL of TRIzol™ LS Reagent used for lysis. <b>Note:</b> The RNA can be stored in 75% ethanol for at least 1 year at –20°C, or at least 1 week at 4°C.</li><li>b. Vortex the sample briefly, then centrifuge for 5 minutes at 7500 × g at 4°C.</li><li>c. Discard the supernatant with a micropipettor.</li><li>d. Vacuum or air dry the RNA pellet for 5–10 minutes.</li></ol> <hr/> <p><b>IMPORTANT!</b> Do not dry the pellet by vacuum centrifuge. Do not let the RNA pellet dry, to ensure total solubilization of the RNA. Partially dissolved RNA samples have an A<sub>230/280</sub> ratio &lt;1.6.</p> <hr/> |
| <b>3</b> | <b>Solubilize the RNA</b>  | <ol style="list-style-type: none"><li>a. Resuspend the pellet in 20–50 µL of RNase-free water, 0.1 mM EDTA, or 0.5% SDS solution by pipetting up and down. <hr/><b>IMPORTANT!</b> Do not dissolve the RNA in 0.5% SDS if the RNA is to be used in subsequent enzymatic reactions. <hr/></li><li>b. Incubate in a water bath or heat block set at 55–60°C for 10–15 minutes. Proceed to downstream applications, or store the RNA at –70°C.</li></ol>   |
-

### Isolation Protocol

#### Protocol for Preparing Viral RNA from 200 µl Serum or Plasma Sample.

**⚠** *If larger sample volumes (up to 600 µl) are to be used increase all components accordingly and load to the Filter Tubes multiple times. The number of total reactions of the kit decreases when larger samples volumes are processed.*

**1** To a nuclease free 1.5 ml microcentrifuge tube:

- Add 200 µl serum or plasma.
- Add 400 µl Working solution [Carrier RNA supplemented Binding Buffer] and mix well.

**i** *The RNA yield can be increased twofold by an optional incubation step, thus resulting in higher sensitivity. After adding the Binding Buffer to the sample, simply incubate the mixture at +15 to +25°C for 10 min. This incubation step can be omitted when time to result is critical.*

---

**2** To transfer the sample to a High Pure Filter Tube:

- Insert one High Pure Filter Tube in one Collection Tube.
- Pipette entire sample into the upper reservoir of the Filter Tube

---

**3** – Insert the entire High Pure Filter Tube assembly into a standard tabletop centrifuge.

- Centrifuge the tube assembly 15 sec at 8,000 × *g*.

---

**4** After centrifugation:

- Remove the Filter Tube from the Collection Tube, discard the flowthrough liquid, and the Collection Tube.
- Insert the Filter Tube into a new Collection Tube.

---

**5** After re-inserting the Filter Tube:

- Add 500 µl Inhibitor Removal Buffer to the upper reservoir of the Filter Tube assembly and centrifuge 1 min at 8,000 × *g*.
- Discard flowthrough and combine Filter Tube with a new Collection Tube.

---

**6** After removal of inhibitors:

- Add 450 µl Wash Buffer to the upper reservoir of the Filter Tube.
- Centrifuge 1 min at 8,000 × *g* and discard the flowthrough.

---

**7** After the first wash and centrifugation:

- Remove the Filter Tube from the Collection Tube, discard the flowthrough liquid, and the Collection Tube.
- Insert the Filter Tube into a new Collection Tube.
- Add 450 µl Wash Buffer to the upper reservoir of the Filter Tube.
- Centrifuge 1 min at 8,000 × *g*.
- Leave the Filter Tube–Collection Tube assembly in the centrifuge and spin it for 10 sec at maximum speed (approximately 13,000 × *g*) to remove any residual Wash Buffer.

**i** *The extra centrifugation time ensures removal of residual Wash Buffer.*

---

**8** Discard the Collection Tube and insert the Filter Tube into a clean, sterile 1.5 ml microcentrifuge tube.

---

**9** To elute the viral RNA:

- Add 50 µl Elution Buffer to the upper reservoir of the Filter Tube.
- Centrifuge the tube assembly for 1 min at 8,000 × *g*.

---

**10** The microcentrifuge tube now contains the eluted viral RNA.

Either use the eluted RNA directly in RT-PCR or store the eluted RNA at –80°C for later analysis.

**i** *Use 3.5 – 6 µl of the eluate for the reverse transcription reaction.*

# SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ *Taq* DNA Polymerase

Catalog Numbers 12574-018 and 12574-026

Doc. Part No. 12574.pps Pub. No. MAN0001094 Rev. A.0

**WARNING!** Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

## Product description

The Invitrogen™ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ *Taq* DNA Polymerase is designed for the sensitive, reproducible, end-point detection and analysis of RNA molecules by RT-PCR. Using this convenient one-step formulation, you can perform both cDNA synthesis and PCR amplification in a single tube using gene-specific primers, and target RNAs from either total RNA or mRNA. The system uses a mixture of SuperScript™ III Reverse Transcriptase and Platinum™ *Taq* DNA Polymerase in an optimized reaction buffer, and it can detect a wide range of RNA targets, from 200 bp to 4.5 kb. The amount of starting material can range from 0.01 pg to 1 µg of total RNA.

SuperScript™ III Reverse Transcriptase is a version of M-MLV RT that has been engineered to reduce RNase H activity and provide increased thermal stability. The enzyme can synthesize cDNA at a temperature range of 45–60°C, providing increased specificity, higher yields of cDNA, and more full-length product than other reverse transcriptases. Because SuperScript™ III RT is not significantly inhibited by ribosomal and transfer RNA, it can be used to synthesize cDNA from total RNA.

Platinum™ *Taq* DNA Polymerase is recombinant *Taq* DNA polymerase complexed with a proprietary antibody that blocks polymerase activity at ambient temperatures. Activity is restored after the denaturation step in PCR cycling at 94°C, providing an automatic “hot start” in PCR for increased sensitivity, specificity, and yield.

The 2X Reaction Mix included in the kit consists of a proprietary buffer system that has been optimized for reverse transcription and PCR, Mg<sup>2+</sup>, dNTPs, and stabilizers. The convenient 2X format allows you to add template and primer at any desired concentration. A tube of 5 mM MgSO<sub>4</sub> is included in the kit for further optimization of the Mg<sup>2+</sup> concentration. Sufficient reagents are provided for 25 or 100 amplification reactions of 50 µL each.

Note: This kit has been optimized for end-point RT-PCR. For quantitative real-time RT-PCR, use the SuperScript™ III Platinum™ One-Step Quantitative RT-PCR System (see “Ordering information” on page 3).

## Contents and storage

Contents	Cat. No. 12574-018 (25 reactions)	Cat. No. 12574-026 (100 reactions)	Storage
SuperScript™ III RT/Platinum™ <i>Taq</i> Mix	50 µL	200 µL	Store all components at -30°C to -10°C.
2X Reaction Mix (a buffer containing 0.4 mM of each dNTP, 3.2 mM MgSO <sub>4</sub> )	1 mL	3 × 1 mL	
5 mM Magnesium Sulfate	500 µL	500 µL	

## Procedural guidelines

### Guidelines for RNA

- High-quality, intact RNA is essential for successful full-length cDNA synthesis.
- For low copy-number genes or longer targets, use more starting material (>10 ng total RNA).
- RNA should be devoid of any RNase contamination and aseptic conditions should be maintained.
- We recommend TRIzol™ Reagent for isolation of total RNA. See “Ordering information” on page 3. Oligo(dT) selection for poly(A)+ RNA is typically not necessary, although it may improve the yield of specific cDNAs.

### Guidelines for primers

- We recommend using gene-specific primers (GSPs). We do not recommend using oligo(dT) or random primers, because they can generate nonspecific products in the one-step procedure and the amount of RT-PCR product may be reduced.
- A final primer concentration of 0.2 µM for each primer is generally optimal. However, for best results, we recommend performing a primer titration of 0.15–0.5 µM.
- Design primers that anneal to the mRNA sequence in exons on both sides of an intron or exon/exon boundary, to allow differentiation between the amplified cDNA and potential contaminating genomic DNA.
- Primers should not be self-complementary or complementary to each other at the 3' ends.

## Guidelines for magnesium and dNTP concentration

- MgSO<sub>4</sub> is included in the 2X Reaction Mix at a final concentration of 1.6 mM, which works well for most targets. If needed, the magnesium concentration can further be optimized (usually between 1.4 and 2 mM) with the 5 mM MgSO<sub>4</sub> provided in the kit.
- dNTPs are included in the 2X Reaction Mix at a final concentration of 200 μM, which is optimal for most reactions.

## Guidelines for PCR

- Program the thermal cycler before setting up the reaction. The thermal cycler should be preheated to 45–60°C, depending on the temperature selected for cDNA synthesis.
- For difficult or high GC-content templates, use a 55–60°C cDNA synthesis temperature.
- Keep all components, reaction mixes, and samples on ice. After preparation of the samples, transfer them to the preheated thermal cycler and immediately start the RT-PCR program.
- Efficient cDNA synthesis can be accomplished in a 15–30-minute incubation at 45–60°C. For small targets, an incubation time of 5 minutes may be sufficient.
- SuperScript™ III RT is inactivated, Platinum™ Taq DNA Polymerase is reactivated, and the RNA/cDNA hybrid is denatured during the 2-minute incubation at 94°C.
- The annealing temperature should be 10°C below the melting temperature of the primers used.
- The extension time varies with the size of the amplicon (approximately 1 minute per 1 kb of amplicon).
- For all targets up to 4.5 kb, 2 μL of SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix is sufficient.

## Methods

The following cycling conditions were established and tested using a GeneAmp™ PCR System 9600 and 2400 and a DNA Engine Opticon™ PTC-200. You may need to adjust these conditions for other thermal cyclers. Efficient cDNA synthesis can be achieved in a 15–30-minute incubation at 45–60°C. We recommend a 30-minute incubation at 55°C as a general starting point. The optimal temperature for reverse transcription depends on primer and target sequences. Cycling conditions may have to be further optimized for different sequences. Three-step cycling (separate annealing and extension steps) is required.

1. Program the thermal cycler so that cDNA synthesis is followed immediately by PCR amplification, as follows:

cDNA synthesis and pre-denaturation		Denature	Anneal	Extend	Final extension (optional)
1 CYCLE		40 CYCLES			1 CYCLE
45–60°C	94°C	94°C	55–66°C	68°C	68°C
15–30 minutes	2 minutes	15 seconds	30 seconds	1 minute/kb	5 minutes

2. Add the following to a 0.2-mL, nuclease-free, thin-walled PCR tube on ice. For multiple reactions, you can prepare a master mix to minimize reagent loss and enable accurate pipetting.

Component	Volume
2X Reaction Mix	25 μL
Template RNA (.01 pg to 1 μg)	x μL
Sense primer (10 μM)	1 μL
Anti-sense primer (10 μM)	1 μL
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix <sup>[1]</sup>	2 μL
Autoclaved distilled water	to 50 μL

<sup>[1]</sup> You can verify the absence of genomic DNA in RNA preparations by omitting the SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix and substituting 2 units of Platinum™ Taq DNA Polymerase in the reaction.

3. Gently mix and make sure that all the components are at the bottom of the amplification tube. Centrifuge briefly if needed. Depending on the thermal cycler used, overlay with silicone oil if necessary.
4. Place the reaction in the preheated thermal cycler programmed as described above. Collect the data and analyze the results.

## Experimental protocols

---

### Staining nucleic acids after electrophoresis

- 1.1 Soak the gel in SYBR™ Safe stain. If using SYBR™ Safe gel stain concentrate, dilute 10,000X in TAE or TBE buffer (as appropriate) prior to use. Place the gel in a plastic container, such as a pipet-tip box lid or a household food-storage container. Do not use a glass container, because the dye in the staining solution may adsorb to the walls of the container, resulting in poor gel staining. Add sufficient SYBR™ Safe DNA gel stain to cover the gel. A 50 mL volume is sufficient for staining most standard minigels. To stain larger gels, increase the volume of staining solution in proportion to the increased gel volume, and ensure that the gel is fully immersed during staining.
- 1.2 Incubate for 30 minutes. Cover the gel and the staining solution with aluminum foil or place them in the dark to protect from light. Continuously agitate the gel on an orbital shaker at 50 rpm. No destaining is required.

### Precasting SYBR™ Safe Stain in agarose gels

- 2.1 Prepare the agarose gel directly in SYBR™ Safe DNA gel stain. SYBR™ Safe stain is provided in buffer; simply substitute SYBR™ Safe stain for the buffer when preparing the molten agarose. If using the 10,000X SYBR™ Safe stain concentrate, dilute the concentrated stain 1:10,000 in agarose gel buffer (e.g., 1X TBE or 1X TAE) and add the buffer plus stain mixture to the powdered agarose. For example if you run TBE gels and require 30 mL of molten agarose for your tray, add 3 µL of 10,000X SYBR™ Safe stain concentrate to 30 mL of 1X TBE, mix well, and add to the powdered agarose.

**Note:** You can heat the agarose/SYBR™ Safe stain mixture in the microwave. As with precasting gels with ethidium bromide, the mobility of nucleic acid fragments in the gel may be somewhat slower when run in these gels compared to their mobility in the gel without stain.

- 2.2 Run the gel. Use a running buffer appropriate to the SYBR™ Safe gel stain formulation. No post-staining or destaining is needed.

### Viewing and photographing the gel

You can view stained gels using a standard 300 nm transilluminator, a 254 nm epi- or transilluminator, or a blue-light transilluminator such as the Safe Imager™ 2.0 Blue-Light transilluminator (Cat. no. G6600). DNA stained with SYBR™ Safe stain can also be visualized and analyzed using imaging systems equipped with an excitation source in the UV range or between 470–530 nm. Refer to Table 5 on page 5 to determine the optimal filter sets to use, or contact the instrument manufacturer for advice.

**Note:** If bands from the SYBR™ Safe stained gel are to be excised and used in a ligation reaction, we recommend that the gel is illuminated using blue-light source (i.e., Safe Imager™ 2.0 Blue-Light transilluminator) and not a UV light source. In some instances, UV light sources in combination with SYBR™ Safe stain can lead to reduced cloning efficiencies.

You can photograph stained gels using Polaroid™ 667 black-and-white print film and SYBR™ Safe photographic filter (Cat. no. S37100). SYPRO™ photographic filter (Cat. no. S6656) or a Kodak™ Wratten #9 filter also work well. Using this film and one of these filters, SYBR™ Safe DNA gel stain provides the same detection sensitivity as ethidium bromide and an appropriate filter. Do not use a standard ethidium bromide photographic filter with SYBR™ Safe DNA gel stain. Gels stained with SYBR™ Safe stain can also be imaged using a CCD camera or a laser-based scanner.

# Protocol: Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology

This protocol requires the RNeasy Mini Kit.

## Determining the correct amount of starting material

It is essential to use the correct amount of starting material in order to obtain optimal RNA yield and purity. The minimum amount is generally 100 cells, while the maximum amount depends on:

- The RNA content of the cell type
- The RNA binding capacity of the RNeasy spin column (100 µg RNA)
- The volume of Buffer RLT required for efficient lysis (the maximum volume of Buffer RLT that can be used limits the maximum amount of starting material to  $1 \times 10^7$  cells)

RNA content can vary greatly between cell types. The following examples illustrate how to determine the maximum amount of starting material:

- COS cells have high RNA content (approximately 35 µg RNA per  $10^6$  cells). Do not use more than  $3 \times 10^6$  cells, otherwise the RNA binding capacity of the RNeasy spin column will be exceeded.
- HeLa cells have average RNA content (approximately 15 µg RNA per  $10^6$  cells). Do not use more than  $7 \times 10^6$  cells, otherwise the RNA binding capacity of the RNeasy spin column will be exceeded.
- NIH/3T3 cells have low RNA content (approximately 10 µg RNA per  $10^6$  cells). The maximum amount of starting material ( $1 \times 10^7$  cells) can be used.

If processing a cell type not listed in Table 2 (page 21) and if there is no information about its RNA content, we recommend starting with no more than  $3\text{--}4 \times 10^6$  cells. Depending on RNA yield and purity, it may be possible to increase the cell number in subsequent preparations.

**Do not overload the RNeasy spin column, as this will significantly reduce RNA yield and purity.**

Counting cells is the most accurate way to quantitate the amount of starting material. As a guide, the number of HeLa cells obtained in various culture vessels after confluent growth is given in Table 4.

**Table 4. Growth area and number of HeLa cells in various culture vessels**

Cell-culture vessel	Growth area (cm <sup>2</sup> )*	Number of cells <sup>†</sup>
<b>Multiwell-plates</b>		
96-well	0.32–0.6	4–5 × 10 <sup>4</sup>
48-well	1	1 × 10 <sup>5</sup>
24-well	2	2.5 × 10 <sup>5</sup>
12-well	4	5 × 10 <sup>5</sup>
6-well	9.5	1 × 10 <sup>6</sup>
<b>Dishes</b>		
35 mm	8	1 × 10 <sup>6</sup>
60 mm	21	2.5 × 10 <sup>6</sup>
100 mm	56	7 × 10 <sup>6</sup>
145–150 mm	145	2 × 10 <sup>7</sup>
<b>Flasks</b>		
40–50 ml	25	3 × 10 <sup>6</sup>
250–300 ml	75	1 × 10 <sup>7</sup>
650–750 ml	162–175	2 × 10 <sup>7</sup>

\* Per well, if multiwell plates are used; varies slightly depending on the supplier.

<sup>†</sup> Cell numbers are given for HeLa cells (approximate length = 15 μm), assuming confluent growth. Cell numbers will vary for different kinds of animal cells, which vary in length from 10 to 30 μm.

## Important points before starting

- If using the RNeasy Kit for the first time, read “Important Notes” (page 19).
- If working with RNA for the first time, read Appendix A (page 73).

- Cell pellets can be stored at  $-90$  to  $-65^{\circ}\text{C}$  for later use or used directly in the procedure. Determine the number of cells before freezing. Frozen cell pellets should be thawed slightly so that they can be dislodged by flicking the tube in step 2. Homogenized cell lysates from step 3 can be stored at  $-90$  to  $-65^{\circ}\text{C}$  for several months. Frozen lysates should be incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a water bath until completely thawed and salts are dissolved. Avoid prolonged incubation, which may compromise RNA integrity. If any insoluble material is visible, centrifuge for 5 min at  $3000\text{--}5000 \times g$ . Transfer supernatant to a new RNase-free glass or polypropylene tube, and continue with step 4. Buffer RLT may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature.
- Buffer RLT and Buffer RW1 contain a guanidine salt and are therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 7 for safety information.
- Perform all steps of the procedure at room temperature. During the procedure, work quickly.
- Perform all centrifugation steps at  $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$  in a standard microcentrifuge. Ensure that the centrifuge does not cool below  $20^{\circ}\text{C}$ .

### Things to do before starting

- If purifying RNA from cell lines rich in RNAses, we recommend adding  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) to Buffer RLT before use. Add  $10 \mu\text{l}$   $\beta$ -ME per 1 ml Buffer RLT. Dispense in a fume hood and wear appropriate protective clothing. Buffer RLT containing  $\beta$ -ME can be stored at room temperature for up to 1 month.
- Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- If performing optional on-column DNase digestion, prepare DNase I stock solution as described in Appendix D (page 82).

### Procedure

1. Harvest cells according to step 1a or 1b.

- 1a. Cells grown in suspension (do not use more than  $1 \times 10^7$  cells):  
Determine the number of cells. Pellet the appropriate number of cells by centrifuging for 5 min at  $300 \times g$  in a centrifuge tube (not supplied). Carefully remove all supernatant by aspiration, and proceed to step 2.

**Note:** Incomplete removal of cell-culture medium will inhibit lysis and dilute the lysate, affecting the conditions for binding of RNA to the RNeasy membrane. Both effects may reduce RNA yield.

- 1b. Cells grown in a monolayer (do not use more than  $1 \times 10^7$  cells):  
Cells can be either lysed directly in the cell-culture vessel (up to 10 cm diameter) or trypsinized and collected as a cell pellet prior to lysis. Cells grown in cell-culture flasks should always be trypsinized.

**To lyse cells directly:**

Determine the number of cells. Completely aspirate the cell-culture medium, and proceed immediately to step 2.

**Note:** Incomplete removal of cell-culture medium will inhibit lysis and dilute the lysate, affecting the conditions for binding of RNA to the RNeasy membrane. Both effects may reduce RNA yield.

**To trypsinize and collect cells:**

Determine the number of cells. Aspirate the medium, and wash the cells with PBS. Aspirate the PBS, and add 0.1–0.25% trypsin in PBS. After the cells detach from the dish or flask, add medium (containing serum to inactivate the trypsin), transfer the cells to an RNase-free glass or polypropylene centrifuge tube (not supplied), and centrifuge at  $300 \times g$  for 5 min. Completely aspirate the supernatant, and proceed to step 2.

**Note:** Incomplete removal of cell-culture medium will inhibit lysis and dilute the lysate, affecting the conditions for binding of RNA to the RNeasy membrane. Both effects may reduce RNA yield.

## 2. Disrupt the cells by adding Buffer RLT.

For pelleted cells, loosen the cell pellet thoroughly by flicking the tube. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 5). Vortex or pipet to mix, and proceed to step 3.

**Note:** Incomplete loosening of the cell pellet may lead to inefficient lysis and reduced RNA yields.

**Table 5. Volumes of Buffer RLT for lysing pelleted cells**

Number of pelleted cells	Volume of Buffer RLT ( $\mu$ l)
$<5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

For direct lysis of cells grown in a monolayer, add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 6) to the cell-culture dish. Collect the lysate with a rubber policeman. Pipet the lysate into a microcentrifuge tube (not supplied). Vortex or pipet to mix, and ensure that no cell clumps are visible before proceeding to step 3.

**Table 6. Volumes of Buffer RLT for direct cell lysis**

Dish diameter (cm)	Volume of Buffer RLT ( $\mu$ l)*
$<6$	350
6–10	600

\* Regardless of the cell number, use the buffer volumes indicated to completely cover the surface of the dish.

## 3. Homogenize the lysate according to step 3a, 3b, or 3c.

See “Disrupting and homogenizing starting material”, page 22, for more details on homogenization. If processing  $\leq 1 \times 10^5$  cells, homogenize by vortexing for 1 min. After homogenization, proceed to step 4.

**Note:** Incomplete homogenization leads to significantly reduced RNA yields and can cause clogging of the RNeasy spin column. Homogenization with a rotor–stator or QIAshredder homogenizer generally results in higher RNA yields than with a syringe and needle.

- 3a. Pipet the lysate directly into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at full speed. Proceed to step 4.
  - 3b. Homogenize the lysate for 30 s using a rotor–stator homogenizer. Proceed to step 4.
  - 3c. Pass the lysate at least 5 times through a blunt 20-gauge needle (0.9 mm diameter) fitted to an RNase-free syringe. Proceed to step 4.
4. Add 1 volume of 70% ethanol to the homogenized lysate, and mix well by pipetting.

**Important:** Do not centrifuge.

**Note:** The volume of lysate may be less than 350  $\mu$ l or 600  $\mu$ l due to loss during homogenization.

**Note:** When purifying RNA from certain cell lines, precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.

5. Transfer up to 700  $\mu$ l of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm). Discard the flow-through.\* Reuse the collection tube in step 6.

If the sample volume exceeds 700  $\mu$ l, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.\*

**Optional:** If performing optional on-column DNase digestion (see “Eliminating genomic DNA contamination”, page 26), follow Appendix D (page 82), steps 1–4, after performing this step.

\* Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

6. Add 700  $\mu\text{l}$  Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.\*

Reuse the collection tube in step 7.

**Note:** After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Skip this step if performing optional on-column DNase digestion (page 82).

7. Add 500  $\mu\text{l}$  Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.

Reuse the collection tube in step 8.

**Note:** Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Things to do before starting”).

8. Add 500  $\mu\text{l}$  Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane.

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

**Note:** After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

9. **Optional:** Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min.

Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 8.

\* Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

- 
10. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50  $\mu$ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to elute the RNA.
  11. If the expected RNA yield is  $>30 \mu\text{g}$ , repeat step 10 using another 30–50  $\mu$ l RNase-free water, or using the eluate from step 10 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 10.  
If using the eluate from step 10, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

---

## F. Sample Extraction Procedure



### IMPORTANT

*Check the RNA Rapid Extraction Solution for precipitation. If precipitated material is visible (as may happen at low temperatures), heat the solution at 37°C for 5 min and invert the bottle a few times to bring the precipitate back into solution.*

### 1. Punch disks from the card and place in a well of a 96-well plate

Punch one to three 2 mm disks from the sample spot on the FTA Card and place the disks into a well of a U-bottom 96-well plate.

### 2. Add 60–100 $\mu\text{L}$ RNA Rapid Extraction Solution and shake 5 min

Add 60–100  $\mu\text{L}$  of RNA Rapid Extraction Solution to each sample and shake for 5 min at moderate speed. On a Barnstead/Labline model 4625, this is setting 6. On other model shakers, use the maximum speed that does not risk spilling sample.

Alternatively, if a shaker is not available, use 100  $\mu\text{L}$  of RNA Rapid Extraction Solution and let the samples soak for 20 min at room temperature.

### 3. Transfer 50 $\mu\text{L}$ of the solution to a 96-well plate provided with the MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit

Transfer 50  $\mu\text{L}$  of the RNA Rapid Extraction Solution into a U-bottom plate provided with MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit.

If the samples were not shaken during the previous step, pipette up and down to mix well before transferring the 50  $\mu\text{L}$ .



### NOTE

*If you used 60  $\mu\text{L}$  of RNA Rapid Extraction Solution to recover sample from the FTA Card, you can transfer all of the solution to the MagMAX plate.*

For RNA isolation, follow the procedure in the Protocol provided with the MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit (available at [www.ambion.com/catalog/CatNum.php?1836](http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?1836)).

## Program the real-time PCR instrument

Use the thermal cycling conditions shown in the following table.

- ROX™ passive reference dye is included in the RT-PCR Buffer.
- Reaction volume is 25 µL.

Step	Stage	Reps	96-well machines‡		SmartCycler II	
			Temp	Time	Temp	Time
Reverse transcription	1	1	45°C	10 min	45°C§	10 min
RT inactiv./initial denaturation	2	1	95°C	10 min	95°C	15 min
Amplification	3	40	95°C	15 sec	95°C	15 sec
Set ramp rates to 1.6°C/sec for SmartCycler†			60°C	45 sec	60°C	60 sec

† It is critically important to set the ramp rates (heating and cooling) to 1.6°C/sec for SmartCycler II reactions, otherwise amplification may fail.

‡ Settings for Applied Biosystems® 7500 and 7900HT, and Stratagene Mx3000P.

§ 50°C may be a more effective RT temperature for some PCR primer sets.

## Assemble RT-PCRs

Follow the instructions to assemble RT-PCRs:

1. Prepare RT-PCR master mix(es) on ice (25 µL final).
  - Prepare 5–10% extra master mix.
  - Negative controls: Include duplicate no-template controls using nuclease-free water in place of sample.
2. Distribute RT-PCR master mix to a PCR plate or to tubes.
3. Add sample to each reaction.

Component		Volume
RT-PCR master mix	2X RT-PCR Buffer	12.5 µL
	Forward and reverse PCR primers	__ µL
	TaqMan® probes	__ µL
	25X RT-PCR Enzyme Mix	1 µL
	(Optional) Detection Enhancer†	(1.67 µL)

Component	Volume
RNA sample (Nuclease-free Water for NTCs)	___ $\mu\text{L}$
Total volume per reaction	25 $\mu\text{L}$

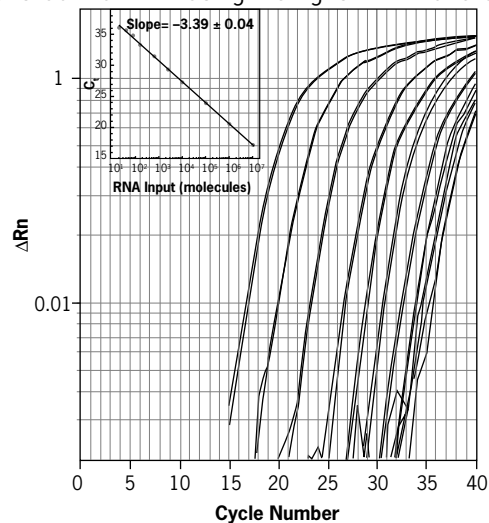
† Try reactions without Detection Enhancer first. Detection Enhancer is recommended only for targets with high GC content and/or persistent secondary structure, and will compromise sensitivity for other targets.

## Perform thermal cycling and analyze the data

Run the thermal cycle and analyze RT-PCR data according to the PCR instrument manufacturer's instructions.

The following figure shows amplification of a dilution series of a control RNA sequence using the AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents.

Figure 1 Amplification of a Control RNA Using the AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents



5  $\mu\text{L}$  of Xeno™ RNA-01 Control dilutions containing  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ , 2500, 640, 160, 80, 40, and 20 RNA molecules were amplified using the kit on an Applied Biosystems® 7900HT Fast Real-Time PCR System. The amplification plots are shown with an inset showing the linear relationship between  $C_T$  and RNA input; the slope is  $\sim 3.39$  indicating  $\sim 100\%$  amplification efficiency.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

El **CIVTEST<sup>®</sup> SUIS INFLUENZA** es un test basado en un enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto. El antígeno, específico del Virus de la Influenza Porcina (IPV) Grupo A, se halla tapizando los 96 pocillos de la microplaca. Durante la incubación inicial de la muestra diluida en el pocillo, los anticuerpos específicos de IPV se unen al antígeno adsorbido al pocillo quedando retenidos en el mismo durante el proceso de lavado. A continuación, se añade una solución de conjugado que se une a los anticuerpos porcinos retenidos en el pocillo. Posteriormente, se lava el exceso de conjugado que no haya quedado retenido y se añade un sustrato cromogénico específico de la peroxidasa. La consiguiente aparición de color en cada pocillo es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos de IPV presentes en la muestra.

## COMPOSICIÓN DEL KIT (SUFICIENTE PARA UN MÁXIMO DE 460 ENSAYOS)

PRODUCTO	CANTIDAD
Microplacas de 96 pocillos (divididas en tiras de 8 pocillos) tapizadas con antígeno específico de IPV.	5
Vial N°0: Solución de Lavado (10x).	2x100 ml
Vial N°1: Solución Diluyente de Muestras (3x) con colorante verde.	100 ml
Vial N°2: Solución de Conjugado: Solución de MAb anti IgGs porcinas /HRPO lista para su uso con colorante rojo.	30 ml
Vial N°3: Solución de Sustrato: Solución de ABTS. Lista para su uso.	30 ml
Vial N°4: Solución de Paro: Solución de Ácido Oxálico. Lista para su uso.	30 ml
Vial N°5: Control Positivo: Suero Control Positivo pre-diluido, con colorante amarillo. Listo para su uso.	2,2 ml
Vial N°6: Control Negativo: Suero Control Negativo pre-diluido, con colorante azul. Listo para su uso.	2,2 ml
Cubierta adhesiva para microplaca.	5
Instrucciones de uso.	1
Certificado de análisis.	1

*El conservante empleado en los reactivos líquidos es una mezcla de metilisotiazolona y bromonitrodioxano.*

### Material necesario no suministrado:

Incubador a +37 °C, pipetas de precisión (mono o multicanal) con sus correspondientes puntas, tubos y placas de fondo en U para diluir las muestras, lector de placas de ELISA, agua destilada o desionizada y lavador de placas.

## PRECAUCIONES

Leer atentamente el manual de instrucciones. Conservar los reactivos entre +2 y +8 °C (no congelarlos). Conservar las placas no utilizadas entre +2° y +8 °C con su cubierta adhesiva y dentro de la bolsa de plástico con el saquito anti-humedad. A pesar de que el antígeno ha sido inactivado durante el proceso de fabricación, las placas tapizadas deben ser consideradas una fuente potencial de IPV. No exponer la Solución de Sustrato a la luz intensa o a agentes oxidantes. **El ABTS es muy sensible a cualquier mezcla o contaminación, por lo tanto no debe devolverse a la botella una vez sacado de ella. Se proporciona un 25% de exceso de este reactivo para permitir tomar un pequeño exceso cada vez que se utilice.** No utilizar los kits después de su fecha de caducidad ni mezclar los reactivos o las instrucciones de diferentes lotes de kit. Para mantener la precisión es necesario efectuar un pipeteado y unos lavados cuidadosos. No pipetear nunca los reactivos con la boca. Utilizar guantes durante todo el proceso. La Solución de Paro contiene un ácido orgánico que es tóxico y puede resultar corrosivo, manipularla con cuidado. Descontaminar todo el material antes de su eliminación. Kit para uso veterinario.

**Los reactivos, sin abrir y convenientemente conservados, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta exterior de la caja.**

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

### A. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente antes de comenzar el procedimiento del ensayo.

**Solución de Lavado (10x) (Vial N° 0):** Para reconstituirla añadir 1 volumen de Solución de Lavado (10x) a 9 volúmenes de **agua destilada o desionizada** (Ej. Para preparar 200 ml de Solución de Lavado diluida mezclar 20 ml de la solución concentrada (10x) con 180 ml de **agua destilada o desionizada**). La solución diluida es estable durante 7 días.

**Solución Diluyente de Muestras (3x) (Vial N° 1):** Para reconstituirla añadir 1 volumen de Solución Diluyente de Muestras (3x) a 2 volúmenes de **agua destilada o desionizada** (Ej. Para preparar 60 ml de Solución Diluyente de Muestras diluida, mezclar 20 ml de solución concentrada (3x) con 40 ml de **agua destilada o desionizada**). La solución diluida es estable durante 2 días.

**NOTA:** En su forma concentrada es posible que después de periodos prolongados de almacenamiento a +4 °C se formen cristales tanto en Solución de Lavado (10x) como en la Solución Diluyente de Muestras (3x). Si se pretende reconstituir todo el volumen suministrado de una sola vez, simplemente agitando por inversión el frasco varias veces será suficiente para reconstituirlo. Si sólo se reconstituye una parte del volumen (el que se vaya a utilizar para el ensayo) es preciso asegurarse de que los cristales hayan quedado totalmente redisueltos antes de preparar la dilución. Para acelerar el proceso se puede sumergir el frasco en un baño a +28 – +37 °C durante 10 – 15 min. Para evitar la aparición de cristales en la solución de lavado concentrada, ésta puede almacenarse a temperatura ambiente durante toda la vida del kit.

### B. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

**Los controles positivo y negativo están listos para su uso y no requieren dilución.** El resto de las muestras deben diluirse **1/200** en Solución Diluyente de Muestras diluida.

Si se dispone de placas de serología de 96 pocillos con fondo en U y de pipeta multicanal capaz de dispensar con precisión volúmenes de 5 µl, se recomienda **realizar la dilución 1/200 en dos pasos** del siguiente modo: Diluir inicialmente, en la placa de serología, 5 µl de muestra en 95 µl de Solución Diluyente de Muestras diluida y, a continuación, transferir 5 µl de esta dilución 1/20 de la muestra a un pocillo de la placa de ELISA que ya contenga 45 µl de Solución Diluyente de Muestras diluida.

### C. DESARROLLO DEL ENSAYO

A. Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente y asegurarse de que estén bien mezclados realizando una inversión suave del frasco.

B. Preparar una hoja de datos para identificar los pocillos individuales para cada muestra y control. Los controles positivo y negativo deben siempre analizarse por duplicado.

1. Despegar la cubierta adhesiva de plástico y añadir **50 µl de controles y 50 µl de las muestras diluidas 1/200** a los pocillos apropiados en la placa.
2. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar **60 minutos a +37 °C**.
3. Retirar el adhesivo y realizar **3 lavados** de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
4. Añadir **50 µl de Solución de Conjugado** (Vial N°2) a cada pocillo.
5. Cubrir la placa con una cubierta adhesiva e incubar **60 minutos a +37 °C**.
6. Retirar el adhesivo y realizar **3 lavados** de cada pocillo con 300 µl de Solución de Lavado diluida. Al final, invertir la placa y golpearla firmemente sobre papel absorbente.
7. Dispensar en cada pocillo **50 µl de Solución de Sustrato** (Vial N°3). Agitar suavemente la placa durante 2 segundos.
8. Dejar desarrollar la reacción cromogénica a **Temperatura Ambiente (+20 - +25 °C)** en la oscuridad **durante 15 minutos**.
9. Dispensar en cada pocillo **50 µl de Solución de Paro** (Vial N°4). Agitar golpeando ligeramente el flanco de la microplaca.
10. Limpiar la superficie inferior de la placa con un papel absorbente. **Leer** la placa utilizando un lector de ELISA equipado con un filtro de **405 nm**. Realizar previamente el blanco con el aire. Registrar los resultados.

## LECTURA DE LOS RESULTADOS

### A. VALIDACIÓN DEL ENSAYO

El test es válido si la DO<sub>405</sub> media del Control Positivo es **> 0,7** y la relación **(DO<sub>405</sub> media del Control Positivo / DO<sub>405</sub> media del Control Negativo)** es **> 5,5**.

### B. INTERPRETACIÓN DEL ENSAYO

Para la interpretación de los resultados es preciso obtener el valor de **IRPC (Índice Relativo x 100)** de cada muestra. Para obtener el valor de IRPC de cada muestra hay que aplicar la siguiente relación (en ella se utilizan los valores medios de DO<sub>405</sub> obtenidos con las 2 réplicas de los controles):

$$\text{IRPC} = \left[ \frac{\text{DO}_{405} \text{ Muestra} - \text{Media DO}_{405} \text{ Control Negativo}}{\text{Media DO}_{405} \text{ Control Positivo} - \text{Media DO}_{405} \text{ Control Negativo}} \right] \times 100$$

VALOR DE IRPC	INTERPRETACIÓN
<b>&gt; 20,0</b>	Muestra POSITIVA
<b>≤ 20,0</b>	Muestra NEGATIVA



## 1. Reaction Conditions

**Protein Denaturation:** In general, proteins require denaturation and disulfide bond cleavage before enzymatic digestion can go to completion. Proteinase K displays strong proteolytic activity on denatured proteins and on native proteins as well (1).

1. Dissolve 1–10mg of the target protein in 6M guanidine-HCl (or 6–8M urea), 50mM Tris-HCl (pH 8), 2–5mM DTT (or  $\beta$ -mercaptoethanol) in a reaction volume of up to 1ml (25 $\mu$ l minimum).
2. Heat at 95°C for 15–20 minutes or at 60°C for 45–60 minutes. If smaller amounts of protein are to be digested, the recommended conditions given can be scaled down proportionally. However, under no conditions should less than 25 $\mu$ l of the dissolving agent be used.
3. After denaturation, allow the reaction to cool and add 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM CaCl<sub>2</sub> until the guanidine-HCl or urea concentration is below 2M.

**Protease Digestion:** Add Proteinase K to the reaction to a final concentration of 50–100 $\mu$ g/ml. Incubate at 37–56°C for at least 1 hour. Reducing the temperature to below 37°C will decrease the digestion rate. Longer incubations of up to 24 hours may be required, depending on the protein. If using longer incubations, one must be very careful to avoid bacterial contamination.

To terminate the reaction, add an inhibitor of Proteinase K such as PMSF (1) or DFP. The reaction can also be terminated by the addition of EGTA (pH 8.0) to a final concentration of 2mM or by TCA precipitation. Proteinase K may not be completely inactivated by EGTA, as this enzyme retains partial activity in the absence of calcium (7). Heat treatment (10–15 minutes at 65°C) only partially inactivates Proteinase K (inhibition by no more than 20–25%).

**Protein Cleavage and Nuclease Removal:** Proteinase K can be used to cleave native proteins and to remove nucleases from DNA (5) or RNA (6,7) preparations. If digestion of a non-denatured (native) protein is desired, incubate the protein with Proteinase K at a concentration of 50–100 $\mu$ g/ml at 37–56°C in 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM CaCl<sub>2</sub> or another buffer that is compatible with the stability of the target protein.

To remove nucleases from DNA/RNA preparations, incubate the nucleic acid with Proteinase K at a concentration of 50 $\mu$ g/ml at 37°C in 0.01M Tris (pH 7.8), 5mM EDTA, 0.5% SDS (7).

**Inhibitors:** Phenylmethylsulfonyl fluoride (5mM PMSF; 1,8), Diisopropyl phosphorofluoridate (DFP), EGTA. Proteinase K is not inhibited by EDTA, iodoacetic acid, TLCK or TPCK.

**Stability:** Proteinase K is a very stable protease, active in wide pH and temperature ranges. The protease is active in a pH range of 4.3–12.0, with optimal activity at pH 8.0. Proteinase K has a broad temperature profile, retaining >80% of its activity at temperatures of 20–60°C (8). The protease is active in SDS concentrations as high as 0.5%. Calcium is a stabilizer of Proteinase K; however, when Ca<sup>2+</sup> is removed from the enzyme, 20% of the catalytic activity may still remain (7). This may be enough activity to degrade proteins commonly found in nucleic acid preparations. The enzyme is also active in 1% (w/v) Triton® X-100 (8).

## 2. References

1. Ebeling, W. *et al.* (1974) Proteinase K from *Tritiachium album* Limber. *Eur. J. Biochem.* **47**, 91–7.
2. Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67–75.
3. Cleveland, D.W. *et al.* (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **252**, 1102–6.
4. Hames, B.D. (1981) Peptide mapping by limited proteolysis using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach*, B.D. Hames and D. Rickwood, eds., IRL Press, Oxford, 219.
5. Herrmann, B.G. and Frischauf, A.M. (1987) Isolation of genomic DNA. *Meth. Enzymol.* **152**, 180–3.
6. Lee, J.J. and Costlow, N.A. (1987) A molecular titration assay to measure transcript prevalence levels. *Meth. Enzymol.* **152**, 633–48.
7. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, B.16.
8. Sweeney, P.J. and Walker, J.M. (1993) Enzymes of molecular biology. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 16, M.M. Burrell, ed., Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 305.

## 9. DAB+ Substrate Buffer



### Danger

**Contains:** Imidazole.

H360	May damage the unborn child.
P201	Obtain special instructions before use.
P202	Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
P280	Wear protective gloves. Wear eye or face protection. Wear protective clothing.
P308 + P313	IF exposed or concerned: Get medical attention.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

### Storage

Store DAB Substrate-Chromogen system in original container at 2–8 °C.

There are no obvious signs to indicate instability of these products. Therefore, positive and negative controls should be tested simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variation in laboratory procedures and a problem with the kit is suspected, contact Dako Technical Support.

### Reagent preparation

Add 1 drop (or 20 µL) of the DAB Chromogen per mL of Substrate Buffer.

Use the provided graduated tube to measure the amount of Substrate Buffer needed. Mix well and apply solution using the provided transfer pipette. After use, rinse graduated test tube and pipette thoroughly with distilled water. The prepared Substrate Working Solution (CHROM) should be stored at 2–8 °C and used within 5 days.

### Procedure

For IHC and ISH staining, following incubation with the HRP reagent, place specimens in buffer bath. Tap off excess buffer and carefully wipe slide around specimen.

1. Cover specimen with the DAB solution. Incubate for 5–30 minutes. If desired, the incubation with the DAB Substrate-Chromogen can be carried out at higher temperatures than room temperature.
2. Rinse gently with distilled water.
3. Counterstain, if desired.
4. Coverslip with aqueous-based or permanent mounting media.

For capillary gap slide method, please observe the following recommendations:

1. There is no need to add detergents to this substrate-chromogen system to reduce surface tension.
2. Draw up the DAB Substrate-Chromogen for 20–30 seconds and blot the solution at least twice before incubating for 5–30 minutes.

### Results

In IHC and ISH procedures, the DAB Substrate-Chromogen yields a brown reaction end-product at the site of the target antigen or nucleic acid.

For proper interpretation, positive and negative controls should accompany each staining run. Positive controls serve as indicators that specimen processing and handling were carried out correctly. Negative controls are useful for assessing nonspecific staining. Nonspecific staining, if present, is rather diffuse in appearance.

### Limitations

Endogenous peroxidase or pseudoperoxidase activity, found in hemoproteins such as hemoglobin, myoglobin, cytochrome and catalase, as well as in eosinophils, may yield false-positive results.<sup>2,3</sup> In formalin-fixed tissue this activity can be inhibited by incubating the tissue in 3% hydrogen peroxide for five minutes prior to the application of primary antibody or probe. Blood, bone marrow smears and frozen tissue sections can be treated with Peroxidase Blocking Reagent (code S2001). However, this procedure does not abolish the reddish-brown pigment of hemoproteins. A solution of methanol-hydrogen peroxide can also be used; however, some antigens may become denatured with this procedure.