



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA PORCINA EN UN COMPLEJO PORCINO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor Guía

Cristian Fernando Cárdenas Aguilera

Autora

Diana Carolina Vargas Gallo

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Cristian Fernando Cárdenas Aguilera

Médico Veterinario Zootecnista

CI: 1718185778

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Diana Carolina Vargas Gallo

CI: 1718619875

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser los pilares principales de mi vida, quienes me han guiado con tanto cariño y amor.

Al Dr. Alejandro Torres por su tiempo, enseñanzas y apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. Cristian Cárdenas por su orientación y estar siempre dispuesto a ayudarme.

DEDICATORIA

A mi padre Oswaldo quien realmente ha sido mi inspiración a lo largo de toda mi formación profesional; sé que para ti es un momento tan bonito como lo es para mí.

A mi madre Ligia quien ha sabido aconsejarme y darme esa fortaleza para salir adelante.

A mi hermano Alejandro por ser mi compañía y siempre estar pendiente de mí.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue realizar la identificación del virus de la Influenza Porcina en un complejo porcino ubicado en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. El muestreo se llevó a cabo en 6 granjas de diferentes categorías y en cada una de ellas se tomaron 35 hisopados nasales, debido a la claridad de los signos clínicos compatibles con la enfermedad se hizo un reingreso a dos de las granjas, completando de esta manera un total de 280 muestras, las cuales además fueron tomadas bajo criterios de inclusión y exclusión. El aislamiento viral se lo realizó en embriones de pollo de 9 días y con el líquido alantoideo cosechado se llevó a cabo la prueba de Hemaglutinación (HA) en placa, para posterior prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) en tiempo real con cebadores específicos de Influenza Tipo A. Como pruebas complementarias en las muestras de ciertas granjas, se realizó HA en microplaca para obtener la titulación del virus aislado y además la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI), utilizando sueros porcinos con anticuerpos específicos contra H1N1 y H3N2. Como resultado se logró el aislamiento viral en 5 de las 6 granjas, y en la prueba de RT-PCR tiempo real se obtuvo un resultado positivo para Influenza tipo A H1N1 en la granja 1. En la prueba HI se obtuvo resultados positivos para la granja 3 y 4 para H1N1 y negativo para H3N2. Como conclusión se establece que es factible realizar el aislamiento del virus de la Influenza Porcina y su tipificación, trabajo que nos permite conocer la presencia del virus dentro de las granjas porcinas y de esta manera elaborar y continuar con planes de prevención y control de la enfermedad.

Palabras clave: Aislamiento viral, Influenza Porcina, Hemaglutinación, RT-PCR Tiempo Real.

ABSTRACT

The objective of this study was to identify Swine Influenza Virus in a set of pig farms located in Santo Domingo de los Tsáchilas. The sampling was carried out in 6 farms with animals of different age categories, in each farm 35 nasal swabs were taken, but because of the clearness of clinical respiratory signs of the disease, 35 more samples were taken in two of the six farms, ending up with a total of 280 samples, which were considered under inclusion and exclusion criteria. Virus isolation was made in 9 days-old chicken embryos, and the allantoic fluid was used to perform the plate Hemagglutination (HA) test and the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in Real Time with specific primers for Type A Influenza. Additional tests were performed in certain samples of some farms, micro HA test was held for titration of the isolated virus and Hemagglutination Inhibition (HI) test was also carried out using pig serum with specific antibodies against H1N1 and H3N2. As a result, the virus isolation was achieved in 5 of the 6 farms, and Real Time RT-PCR resulted positive for Influenza Type A H1N1 for farm 1. For farms 3 and 4 HI ended up with positive results for H1N1 and negative for H3N2. In conclusion, it is possible to make the isolation of swine influenza virus and its subtyping, diagnose that allows us to recognize the existence of the virus in pig farms and therefore improve and continue with plans to prevent and control the disease.

Key words: Virus isolation, Swine Influenza, Hemagglutination, RT-PCR Real Time.

ÍNDICE

1.	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Objetivo General	2
1.2.	Objetivos Específicos	2
1.3.	El Problema.....	2
1.4.	Hipótesis	3
2.	CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Características del virus Influenza tipo A	4
2.2.	Replicación viral	5
2.3.	Transmisión.....	6
2.4.	Diagnóstico clínico	7
2.4.1.	Signos clínicos.....	7
2.4.2.	Hallazgos anatomopatológicos	8
2.5.	Diagnóstico de Laboratorio	9
2.6.	Prevención y Control.....	11
3.	CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.	Ubicación	13
3.2.	Materiales y Equipos.....	13
3.2.1.	Materiales de Campo	13
3.2.2.	Materiales y equipos de análisis (Laboratorio)	14
3.3.	Metodología	15
3.3.1.	Técnica para toma de muestras.....	15
3.3.2.	Técnica de análisis de Inoculación de embriones	16
3.3.3.	Prueba Hemaglutinación (HA) en placa.....	16
3.3.4.	Prueba Hemaglutinación (HA) en microplaca.....	17
3.3.5.	Prueba Inhibición de Hemaglutinación (HI)	17
3.3.6.	RT-PCR Real Time Influenza A/H1N1	18
3.4.	Diseño experimental.....	19

3.4.1.	Población y Tamaño de muestra	19
3.4.2.	Variables de estudio	21
3.4.3.	Análisis estadístico.....	22
4.	CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1.	Resultados	23
4.1.1.	Animales muestreados por granja.....	23
4.1.2.	Animales muestreados por categoría	24
4.1.3.	Edad de animales muestreados.....	25
4.1.4.	Sexo de los animales muestreados.....	27
4.1.5.	Asociación de signos clínicos con categorías de edad.....	30
4.1.6.	Asociación de signos clínicos con granjas	36
4.1.7.	Resultados de las Pruebas de Laboratorio	43
4.2.	Discusión.....	44
5.	Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones.....	47
5.1.	Conclusiones.....	47
5.2.	Recomendaciones	47
	REFERENCIAS.....	48
	ANEXOS.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de animales muestreados por granja.	24
Figura 2. Distribución del número de animales muestreados por categoría.....	25
Figura 3. Edades de los animales muestreados, con curva de distribución.	27
Figura 4. Sexo del total de animales muestreados.....	28
Figura 5. Relación de hembras y machos muestreados por categoría.	29
Figura 6. Distribución de animales muestreados con signo clínico de tos por categoría.	31
Figura 7. Animales muestreados con signo clínico de secreción nasal por categoría.	32
Figura 8. Animales muestreados con signo clínico de decaimiento por categoría.	34
Figura 9. Animales muestreados con signo clínico de fiebre por categoría.	35
Figura 10. Distribución de animales muestreados con signo clínico de tos por granja.	37
Figura 11. Distribución de animales muestreados con signo clínico de secreción nasal por granja.	38
Figura 12. Animales muestreados con signo clínico de decaimiento por granja.	40

Índice de tablas

Tabla 1. Censo Porcícola Santo Domingo de los Tsáchilas 2010	19
Tabla 2. Criterios de Inclusión y Exclusión	20
Tabla 3. Número total de animales por granja.....	21
Tabla 4. Número de animales muestreados por granja.....	23
Tabla 5. Número de animales muestreados por categoría.....	25
Tabla 6. Rango de Edades de los animales muestreados	26
Tabla 7. Medidas de tendencia central en base a edades	26
Tabla 8. Sexo de animales muestreados	27
Tabla 9. Relación de hembras y machos muestreados por categoría.....	29
Tabla 10. Animales muestreados con signo clínico de tos por categoría	30
Tabla 11. Animales muestreados con signo clínico de secreción nasal por categoría	32
Tabla 12. : Animales muestreados con signo clínico de decaimiento por categoría	33
Tabla 13. Animales muestreados con signo clínico de fiebre por categoría.....	35
Tabla 14. Animales muestreados con signo clínico de tos por granja.....	36
Tabla 15. Animales muestreados con signo clínico de secreción nasal por granja	38
Tabla 16. Animales muestreados con signo clínico de decaimiento por granja	39
Tabla 17. Presencia de signos clínicos por categoría de edad	42
Tabla 18. Resultado Pruebas de Laboratorio.....	44

1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Zell, Scholtissek y Ludwig (2012) citan a Koen (1919), e indican que la Influenza Porcina (IP) o también llamada SIV (Swine Influenza Virus) por sus siglas en inglés, fue reconocida por primera vez en el año de 1918 por el inspector de cólera porcino de la Oficina de Industria Animal de EE.UU-Iowa, John S. Koen, quien observó la gran similitud de presentación de signos clínicos entre los seres humanos y cerdos, pero no fue sino hasta 1931 en Estados Unidos, en el cual se aisló y logró identificar el agente causal por el Doctor Richard Shope. El virus pertenece a la familia Orthomixoviridae que se clasifica en: Influenza A, Influenza B e Influenza C; así, la IP es una infección altamente contagiosa de los cerdos y está causada por el virus de Influenza tipo A (Stanchi, 2007, p. 236), la cual clínicamente es la más importante y responsable de graves epidemias en seres humanos y animales (Pleschka, 2012).

Si bien es una enfermedad que no presenta alta mortalidad, su morbilidad si es elevada, pudiendo llegar al 100% de la piara, provocando en los animales pérdida de peso y un aumento en el número de días para alcanzar el peso adecuado (Bruguera, 2004), además las hembras pueden presentar fallos reproductivos debido a la fiebre alta que se manifiesta por la enfermedad (Van Reeth, Ma, 2012). Debido a esto, si se toma en cuenta la cantidad de kilogramos por animal que se pierden en explotaciones o granjas porcinas, el impacto económico es altamente significativo para productores y criadores (Duarte y Moreno, 2005).

IP también forma parte de problemas más crónicos y multifactoriales como es el Complejo Respiratorio Porcino, en donde se une al virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino y *Mycoplasma hyopneumoniae*. (Van Reeth, Ma, 2012).

Los virus de la Influenza tipo A tienen como reservorio principal aves acuáticas, en especial patos, gansos y gaviotas, pero con el pasar de los años el virus se

ha adaptado a diferentes hospedadores como, mamíferos marinos, humanos, porcinos y otros; pero la peculiaridad que existe en los cerdos, es que éstos tienen los receptores celulares apropiados para recibir a los virus de la Influenza tanto aviar como humana (Corzo, Gramer, Lowe y Webby, 2011), es decir, pueden darse casos de antroppo-zoonosis y de zoonosis con especial interés en salud pública (Allerson, Gramer y Torremorell, 2012).

1.1. Objetivo General

- Identificar al virus de la Influenza Porcina en un complejo de producción porcina ubicado en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, mediante la toma de hisopados nasales.

1.2. Objetivos Específicos

- Aislar el agente etiológico de la Influenza Porcina, por medio de la inoculación en embriones de pollo y la prueba de hemaglutinación para comprobar la presencia del virus.
- Tipificar el virus circulante del material positivo mediante la prueba RT-PCR con cebadores específicos para AH1N1 y realizar técnica de HI con sueros porcinos con anticuerpos conocidos.

1.3. El Problema

Dentro de los protocolos para el control de enfermedades está la vacunación, la cual sin duda es una herramienta base para mantener una explotación estable. Las vacunas pretenden aumentar el nivel de inmunidad de los animales hacia un patógeno específico para que cuando éste ingrese, la infección no progrese, ayudando así a disminuir la morbilidad y mortalidad en las explotaciones y mejorar el bienestar animal. En la IP para la implementación de la autovacuna contra la IP es fundamental en primera instancia realizar el aislamiento viral y su posterior tipificación, para de ésta manera elaborar una vacuna para la cepa circulante.

1.4. Hipótesis

H0: No es posible realizar el aislamiento para la identificación del virus de la Influenza Porcina en un complejo de producción porcino.

H1: Es posible realizar el aislamiento para la identificación del virus de la Influenza Porcina en un complejo de producción porcino.

2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Características del virus Influenza tipo A

El virus de Influenza posee un genoma ARN de polaridad negativa que se encuentra encerrado por una cubierta glicoprotéica, su replicación es nuclear, sus viriones tienen simetría helicoidal y están rodeados por una capa lipídica proveniente de las células del huésped, lo cual los hace susceptibles a detergentes y a la mayor parte de desinfectantes (Hattwick, O'Brien, Hoke y Dowdle, 1977). Son virus esféricos (50-120 nm de diámetro) aunque al microscopio electrónico también se pueden observar formas filamentosas (20 nm de diámetro y 200-300 nm largo) (Stanchi, 2007, p. 237). Poseen un genoma ARN con ocho segmentos los cuales varían de tamaño de 890 a 2341 nucleótidos y codifica para 11 proteínas (Zell, Scholtissek y Ludwig 2012).

Los virus de Influenza presentan antígenos de superficie, las hemoaglutininas (HA), proteínas encargadas del reconocimiento entre el virus y la célula diana, fijan el virus a la membrana de la célula hospedadora permitiendo la entrada del material viral; y las neuraminidasas (NA) que se encargan de la salida del material genético viral una vez que ha infectado la célula (Hattwick, O'Brien, Hoke y Dowdle, 1977). Actualmente se conoce que existen 16 HA y 9 NA (Duarte y Moreno, 2005). En su membrana además poseen el canal de protones M2 el cual se encarga de la actividad iónica y de proteger la conformación de las HA, la superficie interior de la envoltura está recubierta con la matriz de la proteína M1. En su material genético existen nucleoproteínas las cuales encapsulan el genoma viral (Zell, Scholtissek y Ludwig 2012).

De acuerdo a la dos proteínas de superficie que presenta el virus de Influenza tipo A, existen varios subtipos, como son H1N1 y H3N2 las cuales están circulando actualmente en mayor cantidad, H1N2 predominante en el cerdo, H7N7 y H3N8 que afectan al caballo, H3N8 en perros, entre otras (CDC, 2014b).

El virus de la IP sufre cambios por dos mecanismos principales, el primero de ellos es mediante deriva antigénica en la cual los nucleótidos de las proteínas de superficie (HA y NA) pueden sufrir mutaciones, sustituciones, supresiones o inserciones. Al segundo mecanismo se lo conoce como redistribución, la cual se basa en el intercambio de genes entre dos o más virus de la gripe, dando lugar así a virus reordenados (Grammer y Rossow, 2004). Es por la redistribución que se da lugar a nuevos subtipos dentro de la Influenza A; por ejemplo en el cerdo se sabe que el subtipo H1N2 resultó de la recombinación de los virus H1N1 y H3N2 (Robertson, 2014).

El reordenamiento genético entre cepas animales y humanas también se da, lo cual hace que el problema sea aún mayor (Talledo y Zumaeta, 2010). Su genoma segmentado le permite recombinar segmentos, lo que eventualmente puede dar a la generación de un virus con la capacidad para replicarse en el ser humano y desarrollar ciertas características antigénicas capaces de causar un brote pandémico. Es un virus que debido a su capacidad de mutación y replicación se adapta fácilmente a los cambios en el medio ambiente, y es de este modo que desarrollan su resistencia a fármacos (Pleschka, 2012).

2.2. Replicación viral

La replicación viral se restringe generalmente al tracto respiratorio del cerdo, la replicación primaria toma lugar en el epitelio respiratorio que recubre las vías respiratorias (Fenner, Bachmann, Gibbs, Murphy, Studdert y White 1987). La inmunidad a la infección se desarrolla muy rápidamente y es detectable por la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) alrededor de 6-7 días post infección (Allerson, Gramer y Torremorell, 2012).

El virus también se extiende al epitelio alveolar y macrófagos alveolares, dando lugar a un exudado serofibrinoso (Fenner, Bachmann, Gibbs, Murphy, Studdert y White 1987). El daño al aparato muco-ciliar junto a la alteración de la función de los macrófagos alveolares predispone a los cerdos a la aparición de infecciones bacterianas secundarias (OIE, 2014).

Zell, Scholtissek y Ludwig (2012) citan a Ito y colaboradores (1998) mencionando que la relación del virus está influenciada por la adaptación que posee con su hospedador, un determinante principal es la molécula receptora de superficie de la célula huésped. La influenza tipo A se une al ácido N-acetilneuramínico o también conocido como ácido siálico, es decir que éste es el receptor del virus de la influenza, así los virus de influenza aviar se unen al receptor α 2,3 ácido siálico, mientras que el virus de la influenza estacional humana reconoce al α 2,6 ácido siálico. Zell, Scholtissek y Ludwig (2012) citan a Scholtissek y colaboradores (1985) quienes mencionan que el aparato respiratorio superior del cerdo expresa ambos receptores, por lo que se lo ha catalogado al cerdo como un recipiente de mezcla para la recombinación de los virus de la gripe humana y aviar.

Cuando el virus de la IP ingresa al hospedador, las HA se unen a sus receptores (ácido siálico), permitiendo así que el virus ingrese por endocitosis, al darse este proceso se forma una membrana alrededor del virus la cual proviene de la célula huésped. Una vez que ha ingresado, las NA permiten que el material genético se libere en el citoplasma y se dirija al núcleo celular del huésped, lugar en el cual se empiezan a formar copias del material genético del virus, una vez listas, éstas salen nuevamente al citoplasma en donde se unen a los ribosomas, los cuales reconocen dicho material genético y fabrica las proteínas del virus como son las HA y NA que son proteínas indispensables para la nueva creación de moléculas víricas. Cuando todos los componentes están listos el paso final es migrar cerca de la membrana celular del hospedador, la cual sirve como envoltura, y de esta manera la replicación del virus se ha dado (Scientific Animations, 2015).

2.3. Transmisión

La vía de transmisión más usual es la nasofaríngea, entre cerdos. Tras la entrada, el virus se adhiere a los cilios y se replica en el epitelio del tracto respiratorio anterior, luego progresa hacia los bronquios y bronquiolos, provocando daños en el aparato mucociliar. La excreción viral se da en las

primeras 24 horas post-infección y diseminan el virus entre un periodo de 7 a 10 días (OIE, 2014).

La transmisión del virus entre cerdos se puede producir de dos formas:

- Directa: el virus se disemina rápidamente en la granja por contacto directo entre animales.
- Indirecta: a través de aerosoles entre granjas, sobre todo en regiones de alta densidad porcina (OIE, 2014).

Si bien el virus de la influenza porcina se limita al tracto respiratorio, algunos estudios han encontrado al virus en linfonodos mediastínicos mediante inmunohistoquímica y por medio de PCR-RT en bazo, íleon y colon aunque no así por aislamiento viral (Janke, 2013)

2.4. Diagnóstico clínico

2.4.1. Signos clínicos

Los signos clínicos de Influenza en los cerdos aparecen alrededor de las 24 horas después de la infección, donde se presenta un pico inicial de fiebre de 40.5 °C acompañado de letargia y anorexia, a las 48 horas se da la excreción máxima del virus y se presentan signos como depresión, secreción nasal y ocular, estornudos, disnea, enrojecimiento de los ojos, inflamación respiratoria y falta de apetito. Dentro del tercer y cuarto día los cerdos empiezan con el signo clínico más característico de la enfermedad la cual es una tos fuerte y profunda (Janke, 2013). En cerdas en gestación, puede ocasionar abortos, nacidos muertos y momificados; la conjuntivitis sin embargo no suele ser un signo clínico común. No obstante pueden existir cerdos asintomáticos (CDC, 2014a). El grado de los signos clínicos dependerá de la edad del animal, su sistema inmune y la cepa viral que esté presente (Merchant, Packer, 1980, p.688).

Por lo general los cerdos con IP detienen su crecimiento alrededor de 5 a 8 días, presentando una pérdida de hasta 6 kg de peso vivo, razón por la cual demoran en llegar a su peso de sacrificio (Bruguera, 2004).

La mayor parte de los animales se recuperan dentro de los 5 a 7 días después si no existen infecciones ni complicaciones secundarias, en ocasiones se observa bronconeumonía secundaria de carácter grave, la cual la mayor parte de los casos suele ser fatal (OIE, 2014). No todos los animales dentro de la piara se enferman al mismo tiempo por lo que la enfermedad cursará por alrededor de dos semanas hasta que los signos clínicos transcurran y los animales regresen a su condición normal (Janke, 2013).

2.4.2. Hallazgos anatomopatológicos

A partir de la 24 horas ya empiezan a observarse lesiones; la lesión macroscópica más común por la infección del virus de la IP es la bronconeumonía cráneo-ventral que afecta a una porción variable del pulmón, aunque en infecciones más extensas la parte ventral, lóbulos medios y lóbulo caudal pueden estar afectados, es decir un 40 % del volumen total del pulmón. En ocasiones se encuentran linfonodos traqueobronqueales inflamados y congestionados, pulmones edematosos y tráquea con espuma en su interior (Janke, 2013).

La respuesta inicial por parte del organismo ante la infección es una infiltración de neutrófilos los cuales emigran a través de las capas del epitelio y se acumulan en el lumen de los capilares alveolares. Además existe un ensanchamiento por parte de las paredes alveolares debido a la congestión y dilatación linfática. Microscópicamente se puede ver neumonía intersticial, atelectasia alveolar, enfisema, extensos necróticos del epitelio de bronquios y bronquiolos, exudado en la luz de bronquios, bronquiolos y alveolos con monocitos y neutrófilos (Janke, 2013). Microscópicamente la lesión principal que se encuentra es una bronquitis y bronquiolitis necrotizante (Detmer, 2015).

Dependiendo del grado de afección también se puede encontrar neumonía intersticial (Janke, 2013).

2.5. Diagnóstico de Laboratorio

El diagnóstico para IP en el siglo XXI se ha vuelto algo más complicado, debido a la presencia de diferentes cepas de virus circulantes, sus recombinaciones y cambios en su comportamiento (Detmer, Gramer, Goyal, Torremorell y Torrison, 2012). Las infecciones por dicho virus se pueden diagnosticar en base a una combinación de signos clínicos, lesiones macro y microscópicas, detección del virus viable o a su ácido nucleico, pruebas de antígenos y de serología (Swenson, Erickson, 1999).

Los métodos de diagnóstico se dividen en directos e indirectos, los directos se basan en la identificación del agente etiológico de la infección viral, mientras que los indirectos identifican la respuesta inmune específica por parte del hospedador (Detmer, Gramer, Goyal, Torremorell y Torrison, 2012).

Dentro de los métodos de diagnóstico directos, Detmer, Gramer, Goyal, Torremorell y Torrison (2012) citan a Guarner y colaboradores (2000), Haines y colaboradores (1993), Larochelle y colaboradores (1994), Onno y colaboradores (1990) y Vincent y colaboradores (1997), mencionan que se puede hacer uso de la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en tejidos congelados o fijados en formalina para lograr identificar el antígeno del virus haciendo uso de diferentes anticuerpos, si bien son métodos que dan buenos resultados no se los utiliza con mucha continuidad dado que existen otras pruebas más rápidas y fáciles de realizar, con resultados en menor tiempo.

Otro método directo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR), es una prueba muy confiable, puesto que es capaz de detectar pequeñas cantidades de ARN. Para correr dicha prueba se pueden usar fluidos alantoideos infectados, sobrenadantes de cultivos celulares, lavados bronco-alveolares y líquidos orales (Detmer, Gramer, Goyal,

Torremorell y Torrison, 2012). RT-PCR es una prueba que además puede ser usada para subtipificar al virus de la Influenza y así establecer si es H1N1, H3N2 o H1N2, es una prueba sensible, específica y rápida pero no siempre indica la viabilidad del mismo o su continua replicación (Gauger, 2014).

Para la identificación del agente el aislamiento del virus es considerada la prueba de oro para la IP, según la OIE, se recomienda usar tejido pulmonar o hisopados nasales para luego ser aislado en huevos de pollo embrionados de 9 días, y el líquido alantoideo enfrentarlo a glóbulos rojos, produciendo hemaglutinación positiva por la propiedad hemoaglutinante del virus de la influenza porcina (el virus aglutina eritrocitos de pollo) (OIE, 2008). Con los virus aislados se puede determinar la H y N componentes, lo cual es importante para definir el tipo de vacuna a usar y controlar la enfermedad (Simon, 2012).

La capacidad de hemaglutinación que posee el virus de la IP fue descrito en 1941 por Hirst, quien se encontraba realizando la inoculación del virus en el líquido alantoideo en un embrión de pollo, donde observó la aglutinación de glóbulos rojos en un vaso sanguíneo roto. La hemaglutinación es la capacidad que poseen algunos virus para aglutinar o unir glóbulos rojos de ciertos mamíferos y aves puesto que poseen proteínas específicas en su conformación externa (Villa, 2016).

El virus de la IP puede hemoaglutinar eritrocitos de pollo, pavo o humano, puesto que éstos en su capa externa contienen los receptores para dicho virus. Es una prueba que frecuentemente utilizada ya que permite la identificación de un virus aislado y su titulación, es una prueba rápida y de bajo costo por lo cual puede ser adaptada fácilmente al laboratorio (Villa, 2016).

Dentro de los métodos indirectos están diagnósticos como ELISA indirecto, utilizado como método rápido para la detección de anticuerpos frente al virus de la influenza A. Los resultados positivos que se obtengan pueden ser a

anticuerpos resultado de vacunación o bien de anticuerpos frente al virus de campo, por lo que es de suma importancia el conocer si los animales han sido o no vacunados frente a la enfermedad (Detmer, Gramer, Goyal, Torremorrel y Torrinson, 2012).

En cuanto a la detección de anticuerpos contra la IP, la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación es la prueba de elección (OIE, 2008), la misma es la destrucción de la hemoaglutinación de un virus al estar presente el complejo antígeno-anticuerpo. Es una reacción natural que ocurre cuando hay la proteína HA, que se inhibe por los anticuerpos contra la influenza, aquí el virus al unirse a los anticuerpos específicos, los glóbulos rojos no tienen donde unirse, formando así un sedimento en el fondo del pocillo en forma de botón. (Detmer, Gramer, Goyal, Torremorrel y Torrinson, 2012).

2.6. Prevención y Control

Sin lugar a duda, la prevención es primordial en cualquier explotación, puesto que es la manera más efectiva para evitar enfermedades. Un conjunto de reglas y normas de bioseguridad son esenciales para evitar la transmisión por vectores y fómites, puesto que una vez que el virus logra entrar a la granja puede permanecer ahí y ocasionar brotes periódicos. Si bien aun cuando las normas de bioseguridad son llevadas a cabo de la mejor manera posible, la enfermedad en ocasiones ingresa vía aérea, la cual es una vía difícil de controlar, por lo que es necesario tomar acciones contra ello (Govorkova y McCullers, 2012).

Como método de control una vez que la enfermedad ha ingresado a la granja es el uso de vacunas inactivadas que se inyectan de manera intramuscular anualmente, el problema radica en que en los últimos 10 años nuevas cepas virales han aparecido, y las cepas pueden variar en regiones, por lo cual lo más acertado es que cada granja logre aislar el virus y en base a éste se elabore la vacuna (Van Reeth, Ma, 2012).

Van Reeth y Ma, (2012) citan a Heinen y colaboradores (2000), Larsen y colaboradores (2000) y Van Reeth y colaboradores (2006), e indican que lo que se pretende mediante la vacunación es que el animal tenga respuesta inmunitaria para próximos desafíos, una vez inyectada la vacuna a partir del séptimo día, ya existen anticuerpos detectables en el suero sanguíneo. Se trata de un virus en constante proceso de recombinación y mutaciones por lo que es necesario realizar el aislamiento del virus de manera continua e identificar la cepa circulante y en caso que haya cambiado, elaborar una vacuna para la cepa presente.

En establecimientos porcinos como método de prevención se evita que personal de trabajo con episodio de influenza ingrese, para así evitar casos de antropozoonosis (Krueger y Gray, 2012).

3. CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

La presente investigación se realizó en granjas porcinas industriales ubicadas en Santo Domingo de los Tsáchilas, provincia ubicada a 133 km de Quito.

- Extensión: 3.523 km²
- Altitud: 655 msnm
- Temperatura: 22,9 °C.
- Clima: Tropical Húmedo
- Población: 450.000 habitantes
(GAD, 2014).

El GAD Municipal de Santo Domingo de los Tsáchilas (2014), menciona que: “Por su ubicación geográfica, tiene un comercio muy activo ya que se ha convertido en un puerto terrestre de intercambio entre regiones. La actividad más importante es la Ganadera, pues es aquí en donde se desarrolla el mayor mercado ganadero del país.”

3.2. Materiales y Equipos

3.2.1. Materiales de Campo

- Medios de transporte Quick Swab 3M®
- Termo con gel refrigerante
- Guantes de examinación
- Mascarillas
- Moquillo
- Registros
- Fichas clínicas
- Marcadores permanentes
- Esferos

3.2.2. Materiales y equipos de análisis (Laboratorio)

Materiales

- Solución buffer fosfato salino (PBS) con pH 6.8-7.2
- Glóbulos rojos de pollo al 5%
- Glóbulos rojos de pollo al 1%
- Frascos estériles de 50 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Jeringuillas de insulina de 1 ml
- Estilete de Punción
- Pegamento líquido
- Hisopos estériles
- Embriones viables de 9 días de edad
- Pipetas manuales de vidrio de 10 ml
- Pipeta automática Unicanal de hasta 100 ul
- Pipeta automática Unicanal de 200 a 1000 ul
- Lámina de vidrio cuadrículada
- Micro placas de fondo en U
- Palillos
- Microtubos Eppendorf ® 3810X
- Etanol al 70%
- Real Time ready Influenza A/H1N1 Detection Set Roche

Equipos

- Incubadora de huevos fértiles
- Centrífuga (IEC Centra CL2, 4.770 x g)
- Cabina de flujo laminar
- Mechero Bunsen
- Ovoscopio

3.3. Metodología

Para el inicio del muestreo fue necesario sujetar a los animales de manera adecuada e introducir el hisopo (Quick Swab 3M) por una de las fosas nasales paralelamente al paladar, realizando movimientos de rotación por alrededor de 6 segundos, retirarlo suavemente y repetir el procedimiento en la otra fosa nasal. Se asignó una codificación a las muestras y se las colocó en un termo con gel refrigerante.

Seguido a la toma de muestras, se trasladaron las mismas al laboratorio para realizar el aislamiento del virus mediante inoculación en la cavidad alantoidea en embriones de pollo de 9 días de edad, posterior a 3 días de incubación se realizó la prueba de hemaglutinación (HA), es decir el enfrentamiento de eritrocitos de pollo con el líquido alantoideo cosechado, en los casos de muestras positivas se cosechó el líquido alantoideo en tubos eppendorf esterilizados. Es importante mencionar que el transporte de las muestras en todo momento se lo realizó en un triple empaque puesto que se trataba de material infeccioso. Los líquidos cosechados fueron entregados a Los laboratorios de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro Tumbaco (AGROCALIDAD), donde se llevó a cabo la prueba de RT-PCR con cebadores específicos para Influenza tipo A H1N1, además se corrieron pruebas adicionales como son prueba HA en micro-placa y prueba de Inhibición de la hemaglutinación (HI). Las muestras de 3 granjas se las procedió a liofilizar para mantenerlas almacenadas. Todas las pruebas y manipulación de las muestras se realizaron en un laboratorio con bioseguridad nivel 2.

3.3.1. Técnica para toma de muestras

1. Identificar aquellos animales que presenten al menos dos de los signos clínicos compatibles con la enfermedad.

2. Sujetar al animal de manera adecuada dependiendo de su edad, de ser animales mayores a 50 días utilizar moquillo (Anexo 1).
3. Introducir el hisopo por las fosas nasales realizando movimientos de rotación.
4. Identificar cada hisopo con marcador permanente y guardar en termo con gel refrigerante (Anexo 2).

3.3.2. Técnica de análisis de Inoculación de embriones

1. Clasificar las muestras y realizar pool (1 pool de trabajo por cada 35 muestras por granja).
2. Rotular los frascos con la edad y granja a la cual corresponden.
3. Colocar 10 ml de PBS en frascos estériles y escurrir el hisopado correspondiente.
4. Colocar en tubos de ensayo 10 ml de la solución antes preparada.
5. Centrifugar los tubos a 1500 revoluciones por 5 minutos.
6. Trasladar el sobrenadante a tubos rotulados y añadir 100 µl de penicilina más estreptomina en cada tubo y refrigerar.
7. Observar la viabilidad y sitio de inoculación de los embriones.
8. Hacer dos punciones en cada embrión viable, uno en la cámara de aire y otro en el líquido alantoideo.
9. Inocular a los embriones con la solución antes refrigerada con diferentes jeringuillas estériles.
10. Sellar los orificios con pega.
11. Llevar a incubadora a 37 grados y 90% de humedad por 3 días.
12. Verificar durante los 3 días post inoculación la viabilidad de los embriones (Swayne, Senne, Beard, 1998, p. 151), (Anexo 3).

3.3.3. Prueba Hemaglutinación (HA) en placa

1. Utilizando una pipeta automática, extraer 100 ul de líquido alantoideo y colocar en una placa de vidrio limpia.
2. Colocar 100 ul de glóbulos rojos al 5% en la muestra.

3. Mezclar con un palillo.
4. Levantar la placa y realizar movimientos circulares para asegurar una buena mezcla.
5. Observar resultados, en HA positivo se observará la aglutinación de glóbulos rojos (University of Georgia, 2006), (Anexo 4).

3.3.4. Prueba Hemaglutinación (HA) en microplaca

1. Colocar 25 ul de PBS en todos los pocillos de las filas a utilizarse.
2. Colocar 25 ul del líquido alantoideo cosechado solamente en la primera columna.
3. Homogenizar la mezcla de la primera columna, tomar 25 ul y diluir en serie para las columnas 1 a la 12.
4. Adicionar 50 ul de glóbulos rojos de pollo al 1% en todos los pocillos.
5. Colocar glóbulos rojos de pollo control en dos pocillos aparte.
6. Agitar suavemente la micro placa y dejarla incubar por 45 minutos a temperatura ambiente.
7. Leer la placa y determinar el título del virus (University of Georgia, 2006), (Anexo 5).

3.3.5. Prueba Inhibición de Hemaglutinación (HI)

1. Colocar 25 ul de PBS en todos los pocillos de las filas a utilizarse.
2. Colocar 25 ul del suero en la columna 1.
3. Homogenizar la mezcla de la primera columna, tomar 25 ul y diluir en serie para las columnas 1 a la 12.
4. Dejar incubar de 15-30 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicionar 50 ul de glóbulos rojos de pollo al 1% en todos los pocillos.
6. Colocar en dos pocillos aparte el control del antígeno y en otros dos pocillos los controles de los glóbulos rojos de pollo al 1%.
7. Agitar suavemente la placa y dejarla reposar por 45 minutos a temperatura ambiente.

8. Leer la placa y determinar el título del suero (University of Georgia, 2006), (Anexo 6).

3.3.6. RT-PCR Real Time Influenza A/H1N1

- Extracción ARN
 - a) Identificar tubos eppendorf (uno por muestra).
 - b) Preparar solución de trabajo Poly A.
 - c) Colocar 300 ul del binding buffer en cada tubo eppendorf.
 - d) Colocar 4 ul de Poly A en cada tubo eppendorf.
 - e) Colocar 200 ul de cada muestra de líquido alantoideo previamente cosechado utilizando una punta con filtro por muestra y homogenizar.
 - f) Cambiar la muestra homogenizada a columnas con tubo colector.
 - g) Centrifugar a 8000 revoluciones por 1 minuto.
 - h) Cambiar a nuevo tubo colector.
 - i) Colocar 500 ul del buffer inhibidor en cada columna.
 - j) Centrifugar a 8000 revoluciones por 1 minuto.
 - k) Cambiar a nuevos tubos colectores.
 - l) Colocar 500 ul de etanol en cada columna.
 - m) Centrifugar a 8000 revoluciones por 1 minuto.
 - n) Cambiar a nuevos tubos colectores.
 - o) Colocar 500 ul de etanol en cada columna.
 - p) Centrifugar a 8000 revoluciones por 1 minuto.
 - q) Identificar tubos eppendorf.
 - r) Pasar columnas a tubos eppendorf.
 - s) Colocar 50 ul de buffer dilución en cada tubo eppendorf.
 - t) Centrifugar a 8000 revoluciones por 1 minuto.
 - u) Descartar columna y cerrar tubo eppendorf.

- Cuantificación
 - a) Limpiar y blanquear Nanodrop 8000.
 - b) Colocar 2 ul de cada muestra en el lector Nanodrop.
 - c) Cuantificar.

- RT-PCR Real Time Influenza A/H1N1
 - a) Configurar datos de muestras en lector.
 - b) Reconstituir Sonda Influenza A en 300 ul H₂O (vial 5).
 - c) Reconstituir Sonda Influenza H1N1 en 300 ul H₂O (vial 5).
 - d) Calentar ambas sondas a 85°C por 10 minutos.
 - e) Añadir 7.6 ul por muestra de H₂O (vial 5) en cada mix.
 - f) Añadir 4 ul por muestra de Reaction buffer en cada mix.
 - g) Añadir 0.4 ul por muestra de Ezyme blend en cada mix.
 - h) Agregar 3 ul por muestra de cada sonda.
 - i) Colocar en cada pocillo de la placa 15 ul del mix Influenza A anteriormente preparado más 5 ul del ácido nucleico de cada muestra.
 - j) Colocar en cada pocillo de la placa 15 ul del mix Influenza H1N1 anteriormente preparado más 5 ul del ácido nucleico de cada muestra.
 - k) Colocar controles positivos y negativos.
 - l) Cubrir placa con film.
 - m) Ingresar placa a lector LightCycler®.
 - n) Interpretar resultados (Roche, s.f) (Anexo 7).

3.4. Diseño experimental

3.4.1. Población y Tamaño de muestra

Como se puede observar en la tabla 1, según el censo porcícola realizado en el año 2012 por la Asociación de Porcicultores del Ecuador (ASPE), MAGAP y AGROCALIDAD, en el Ecuador hay un total de 1.737 granjas porcícolas y 310.606 cerdos (ASPE, 2010).

Tabla 1. Censo Porcícola Santo Domingo de los Tsáchilas 2010

Madres	Verracos	Chanchillas	Lechones	Levante	Engorde	Total
10.700	227	3.594	19.691	35.063	61.000	130.275

(Tomado de ASPE, 2010)

Para el presente trabajo se consideró un total de 35 muestras (hisopados nasales) por granja, éste es un número sugerido por el área de Virología y Sanidad en cerdos de la Universidad de Chile donde existe un área de trabajo principalmente destinada para Influenza A en porcinos, quienes mencionan que si se toman 30 muestras de manera perfecta, se debería obtener al menos 1 positivo tomando en cuenta que la población al menos tiene un 10% de prevalencia; para el presente trabajo se consideró 5 muestras más, tomando en cuenta muestras mal tomadas y algunas que pudieron haberse estropeado en camino al laboratorio (Neira, 2016). Las 35 muestras fueron tomadas únicamente a aquellos animales que presentaron signos respiratorios compatibles con la enfermedad como: tos, secreción nasal transparente y decaimiento; para lo cual se elaboró una ficha con dichos signos clínicos. Para completar las 35 muestras por granja se tomaron en cuenta criterios de inclusión y de exclusión expuestos en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios de Inclusión y Exclusión

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
Cerdos de engorde (mayores a 70 días) con signos respiratorios compatibles con la enfermedad.	Cerdos que no presenten ningún tipo de signo respiratorio compatible con la enfermedad.
Cerdas en gestación y maternidad con signos respiratorios compatibles con la enfermedad.	Cerdos que se encuentren cursando otra enfermedad.
Cerdos en recría con signos respiratorios compatibles con la enfermedad.	Cerdos que por alguna razón hayan sido aislados.
Chanchillas mayores a 70 días con signos respiratorios compatibles con la enfermedad.	Cerdas que estén en labor de parto.

Se trabajó en 6 granjas y en cada una se muestrearon 35 animales, es decir en total 210 muestras de hisopados nasales, pero dada la clara y marcada aparición de signos clínicos respiratorios en dos de las seis granjas, se dio la oportunidad de realizar un reingreso a la mismas, en donde se muestrearon a animales de diferente edad, por lo que en total fueron muestreados 280 animales. Los 35 animales a ser muestreados fueron seleccionados del total de número de animales por granja, la población total de cada una de ellas se puede observar en la tabla 3. Es importante mencionar que por cada ingreso a cada granja se realizó un (1) pool de muestras, por lo que en total se obtuvieron 8 pooles de trabajo. El motivo por el cual se realiza un pool de trabajo por granja es para aumentar la carga viral y de ésta manera sea factible su aislamiento.

Tabla 3. Número total de animales por granja

Granja	Número total de animales
1	16.200
2	4.907
3	4.430
4	4.802
5	12.500
6	12.178

El presente trabajo fue un estudio observacional, pues para realizar el muestreo se basó en los signos clínicos respiratorios compatibles con la enfermedad, transversal, dado que solo se tomó una sola muestra por animal y prospectivo ya que el trabajo inició en un tiempo cero hacia adelante.

3.4.2. Variables de estudio

Dentro de las variables independientes tenemos a las categorías por edad, y en las variables dependientes están los signos clínicos compatibles con la enfermedad, como son: tos, secreción nasal y decaimiento.

3.4.3. Análisis estadístico

En el trabajo se utilizó estadística descriptiva en base a análisis porcentual, para ordenar y analizar el conjunto de datos obtenidos. Se realizaron tablas y gráficos en barras en donde se plasmaron las variables tanto independientes como dependientes y la relación entre las mismas.

4. CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

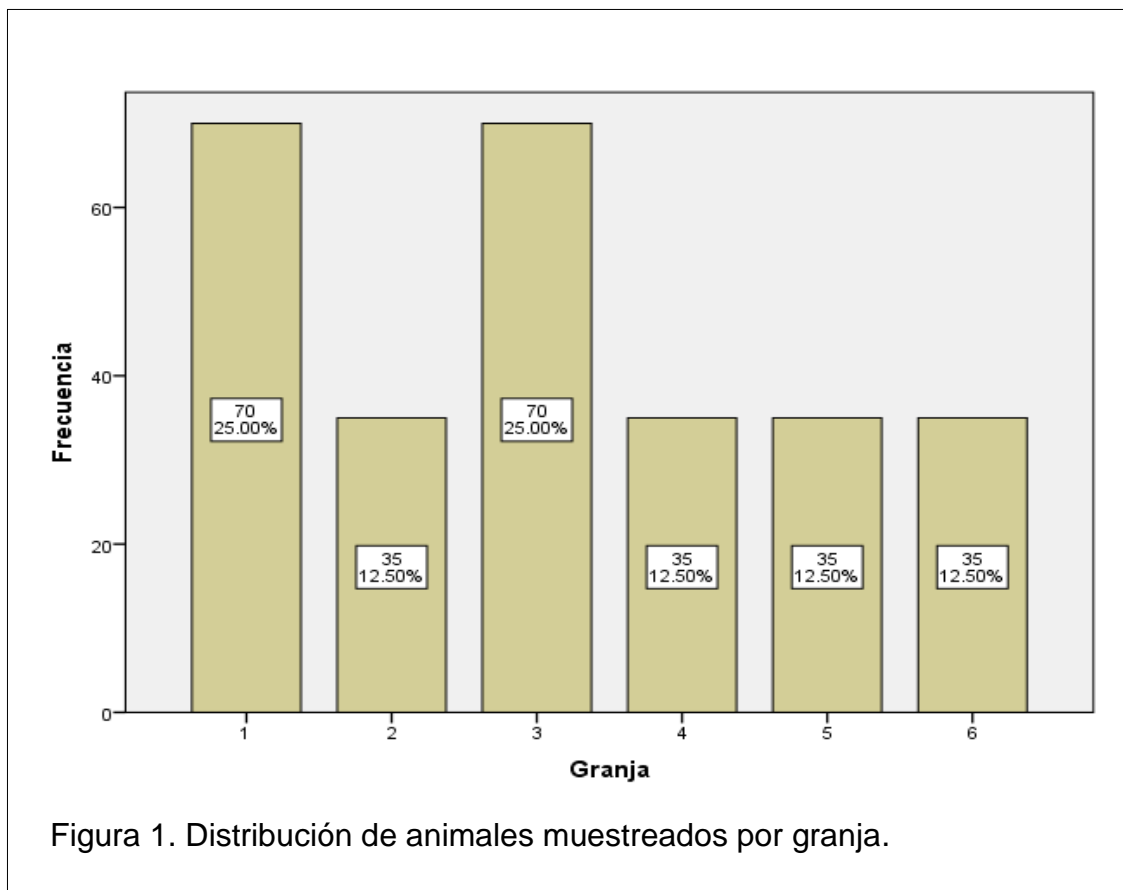
4.1. Resultados

4.1.1. Animales muestreados por granja

Como se puede observar en la tabla 4, se ingresó a 6 granjas para realizar los respectivos hisopados nasales; en cada una de ellas se tomó un total de 35 muestras, excepto las granjas 1 y 3, lugares donde se realizó un re-ingreso debido a la claridad de signos respiratorios; completando de tal forma un total de 280 animales muestreados. En la figura 1 se observa la cantidad total de animales muestreados por granja; la granja 1 corresponde exclusivamente a recría (animales de 21 a 70 días), la granja número dos a engorde (animales de 71 días hasta el saque), la granja número 3 es un lugar de recría conjuntamente con reproductoras (madres con lechones hasta los 21 días), y finalmente las granjas 4, 5 y 6 corresponden a granjas de reproducción.

Tabla 4. Número de animales muestreados por granja

Granja	Frecuencia	Porcentaje (%)
1	70	25.0
2	35	12.5
3	70	25.0
4	35	12.5
5	35	12.5
6	35	12.5
Total	280	100.0

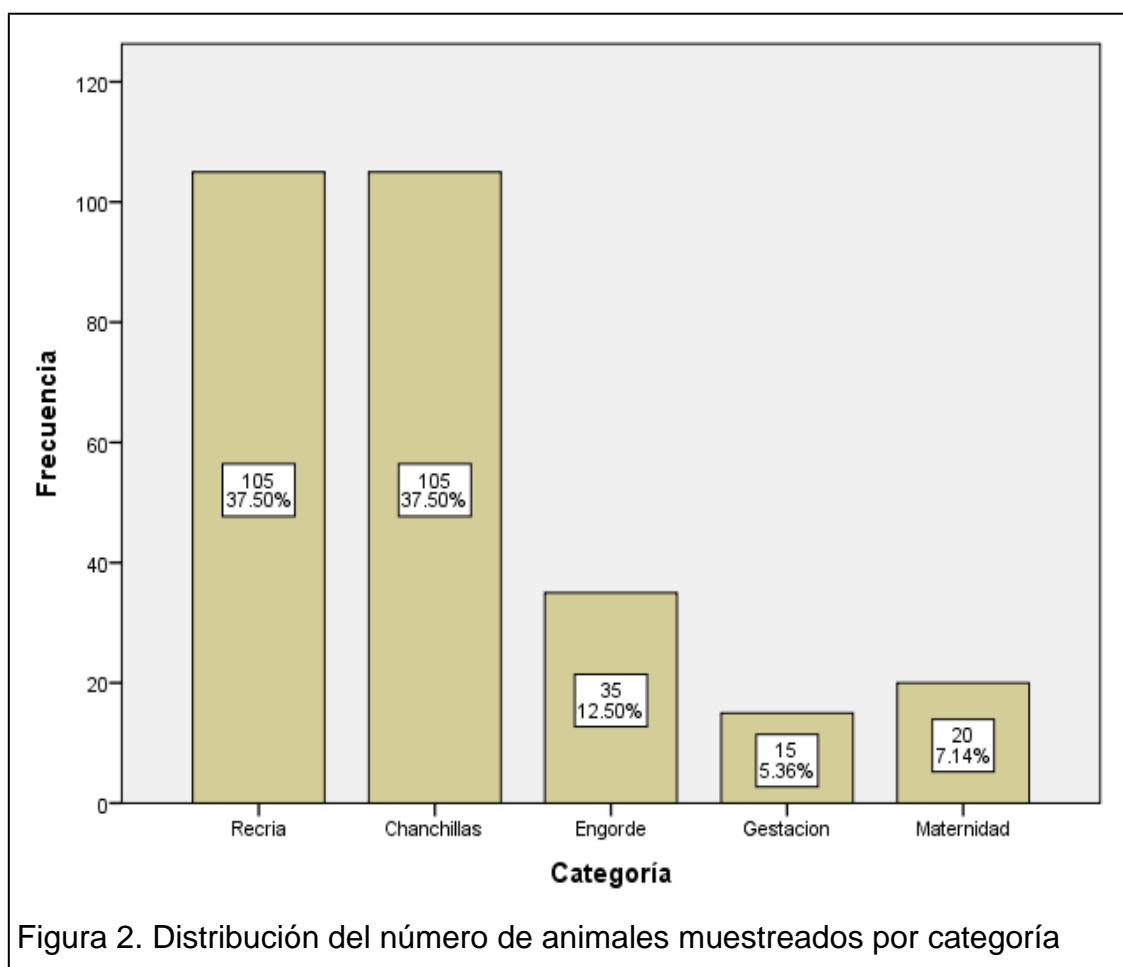


4.1.2. Animales muestreados por categoría

Dentro del trabajo se realizó el muestreo a animales de 5 categorías distintas, tal como se puede observar en la tabla 5, la mayor cantidad de animales muestreados corresponden a la categoría de recría con el 37.5% (105 animales) y chanchillas con un 37.5% (105 cerdas), seguido de animales de engorde con un 12.5% (35 animales), maternidad con el 7.1% (20 cerdas) y finalmente madres en gestación con un 5.4% (15 cerdas). En la figura 2 se observa la distribución de los animales muestreados por categoría y con mayor cantidad de animales muestreados dentro de la categoría de recría y chanchillas.

Tabla 5. Número de animales muestreados por categoría.

Categoría	Frecuencia	Porcentaje (%)
Recría	105	37.5
Chanchillas	105	37.5
Engorde	35	12.5
Gestación	15	5.4
Maternidad	20	7.1
Total	280	100.0



4.1.3. Edad de animales muestreados

Como se puede ver en la tabla 6, el muestreo se efectuó en cerdos de un rango de edad que va desde animales de 28 días, hasta cerdos que pasan los 190

días. Dentro del rango de edad de 28-70 días se muestreó un 37.5% (105 cerdos) del total de animales, dentro de los 71-190 días se encuentra el 50% (140 cerdos) y los animales mayores a los 190 días corresponden al 12.5% (35 animales) del total de cerdos muestreados. Como se aprecia en la figura 3, existe la formación de dos colas, una a cada extremo; la cola que se extiende hacia el lado izquierdo corresponde al muestreo de los animales más jóvenes, comprendidos alrededor de los 28 y 190 días, por otra parte la cola que se forma en el lado derecho corresponde a aquellos animales de mayor edad que sobrepasan los 400 días, es decir son aquellas cerdas de la categoría de reproducción, que se encuentran en la etapa de gestación o maternidad.

En la tabla 7 se pueden ver las medidas de tendencia central, existe una media de edad de 132.26 días, una mediana de 81, una moda de 43 días la cual corresponde a cerdos dentro de la categoría de recría, una edad mínima de 28 días que pertenece a recría y una edad máxima de 560 que es parte de las cerdas de reproducción.

Tabla 6. Rango de Edades de los animales muestreados

Rango de Edad (Días)	Frecuencia	Porcentaje (%)
28-70	105	37.5
71-190	140	50
> 190	35	12.5
Total	280	100%

Tabla 7. Medidas de tendencia central en base a edades

Medidas de tendencia central	
Media	132.26
Mediana	81
Moda	43
Mínimo	28
Máximo	560

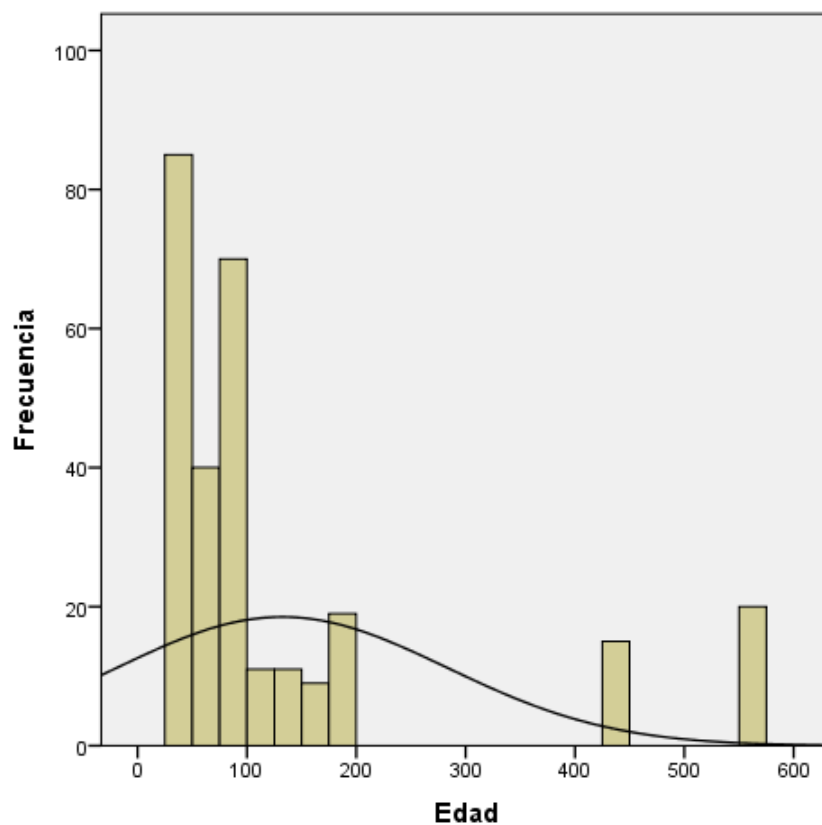


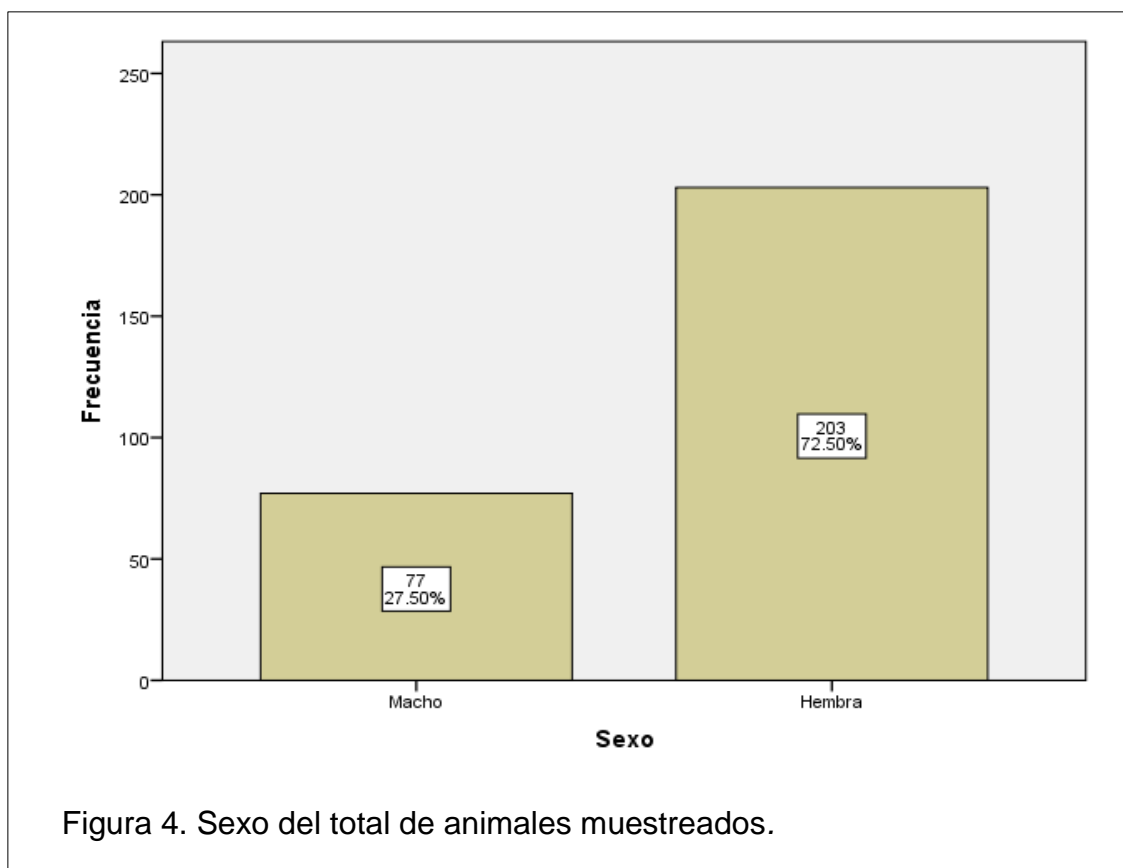
Figura 3. Edades de los animales muestreados, con curva de distribución.

4.1.4. Sexo de los animales muestreados

En la tabla 8 se puede apreciar que se muestreó a un 27.5% de machos (77 animales) y 72.5% hembras (203 animales). En la figura 4 se observa la cantidad de animales muestreados por sexo, es necesario tener en cuenta que el muestreo se realizó en 4 granjas de reproductoras, razón por la cual existe mayor cantidad de hembras que machos muestreados.

Tabla 8. Sexo de animales muestreados

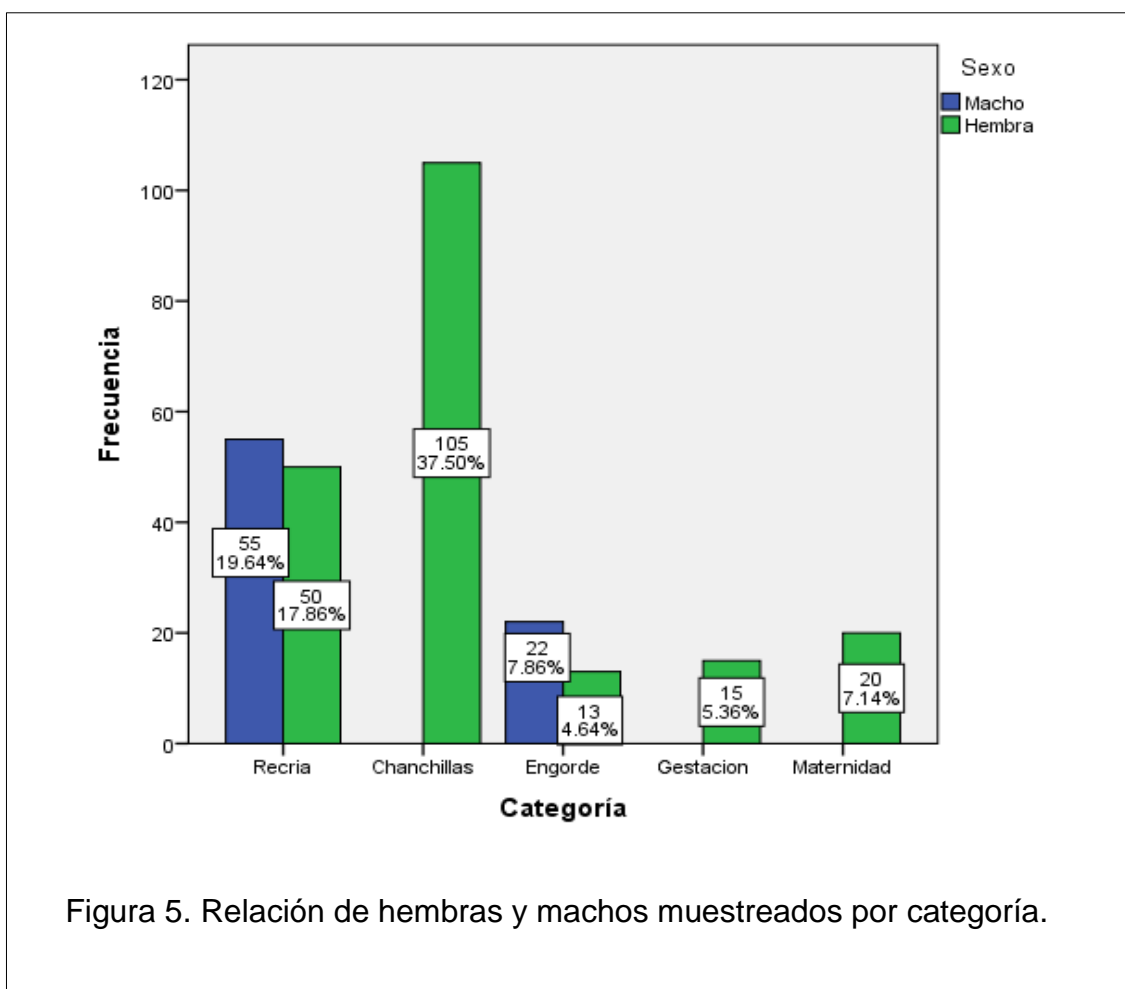
	Frecuencia	Porcentaje (%)
Macho	77	27.5
Hembra	203	72.5
Total	280	100.0



Como se indica en la tabla 9, de los 280 animales muestreados, 77 corresponden a machos y 203 hembras, pero solamente en las categorías de recría y engorde existió un muestreo de ambos sexos. En recría se muestrearon 55 machos y 50 hembras, por otro lado en la categoría de engorde existieron 22 machos y 15 hembras muestreadas. Se aprecia además que en las categorías de chanchillas, gestación y maternidad solamente hembras fueron muestreadas, debido a la conformación de las granjas. En la figura 5 se observa la distribución de machos y hembras muestreados por categoría, y como existen machos muestreados solamente en las categoría de recría y engorde.

Tabla 9. Relación de hembras y machos muestreados por categoría

		Categoría					Total
Sexo		Recría	Chanchillas	Engorde	Gestación	Maternidad	
Macho	Frecuencia	55	0	22	0	0	77
	% Sexo	71.4%	0.0%	28.6%	0.0%	0.0%	100.0%
Hembra	Frecuencia	50	105	13	15	20	203
	% Sexo	24.6%	51.7%	6.4%	7.4%	9.9%	100.0%
Total	Frecuencia	105	105	35	15	20	280
	% Sexo	37.5%	37.5%	12.5%	5.4%	7.1%	100.0%



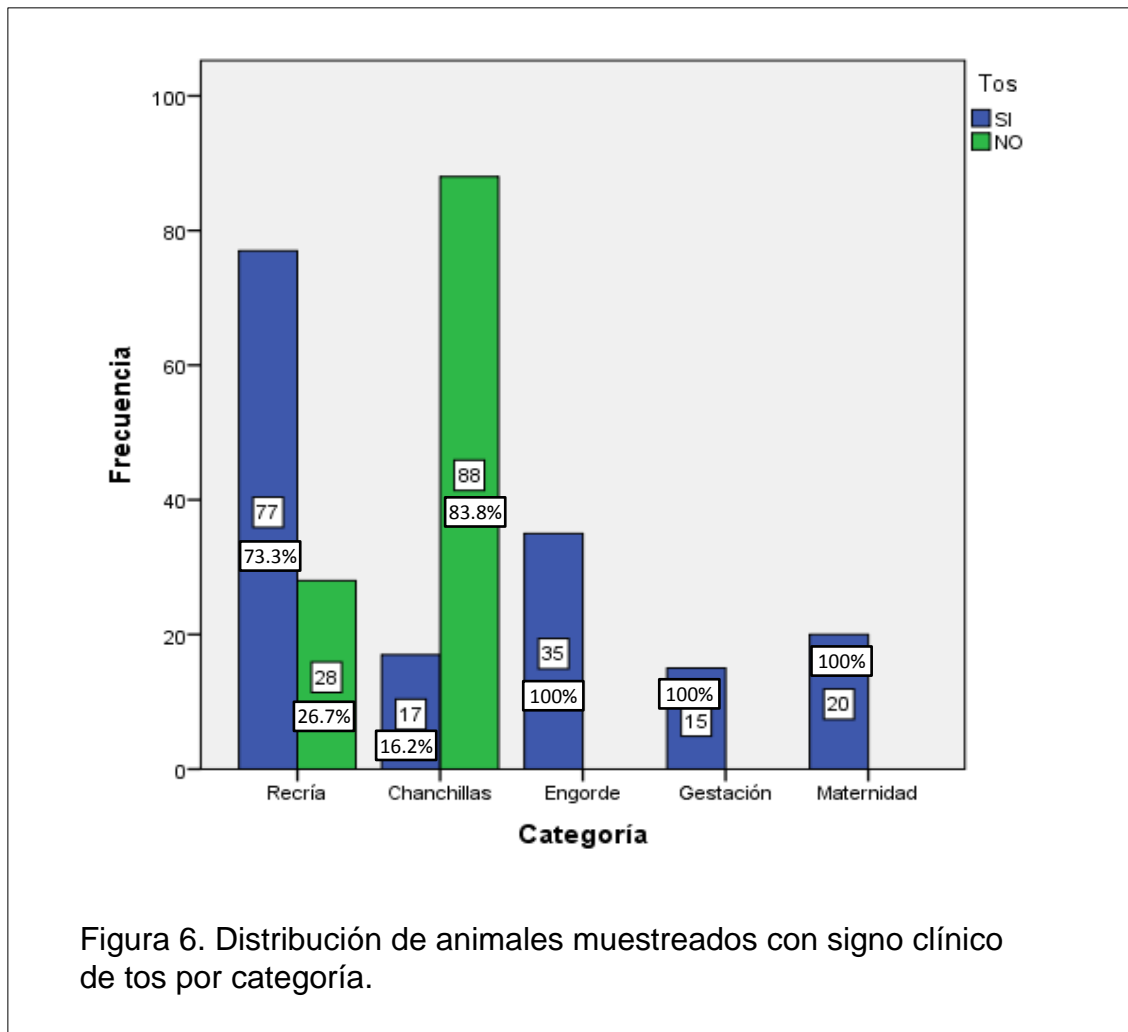
4.1.5. Asociación de signos clínicos con categorías de edad

- **Tos**

Como se puede evidenciar en la tabla 10, el 58.6% (164 cerdos) del total de los animales muestreados presentaron el signo clínico de tos. En las categorías de engorde, gestación y maternidad, todos los animales muestreados presentaron tos, por otro lado en recría, el 73.3% (77 animales) presentaron este signo clínico. Los animales dentro de la categoría de chanchillas fueron los que en menor cantidad presentaron tos, puesto que solamente el 6.1% (17 animales) de los 105 muestreados lo presentaron. En la figura 6 se puede observar la distribución por categoría de los animales muestreados con tos.

Tabla 10. Animales muestreados con signo clínico de tos por categoría

		Tos			
			SI	NO	Total
Categoría	Recría	Frecuencia	77	28	105
		% del Total	27.5%	10.0%	37.5%
	Chanchillas	Frecuencia	17	88	105
		% del Total	6.1%	31.4%	37.5%
	Engorde	Frecuencia	35	0	35
		% del Total	12.5%	0.0%	12.5%
	Gestación	Frecuencia	15	0	15
		% del Total	5.4%	0.0%	5.4%
	Maternidad	Frecuencia	20	0	20
		% del Total	7.1%	0.0%	7.1%
Total		Frecuencia	164	116	280
		% del Total	58.6%	41.4%	100.0%

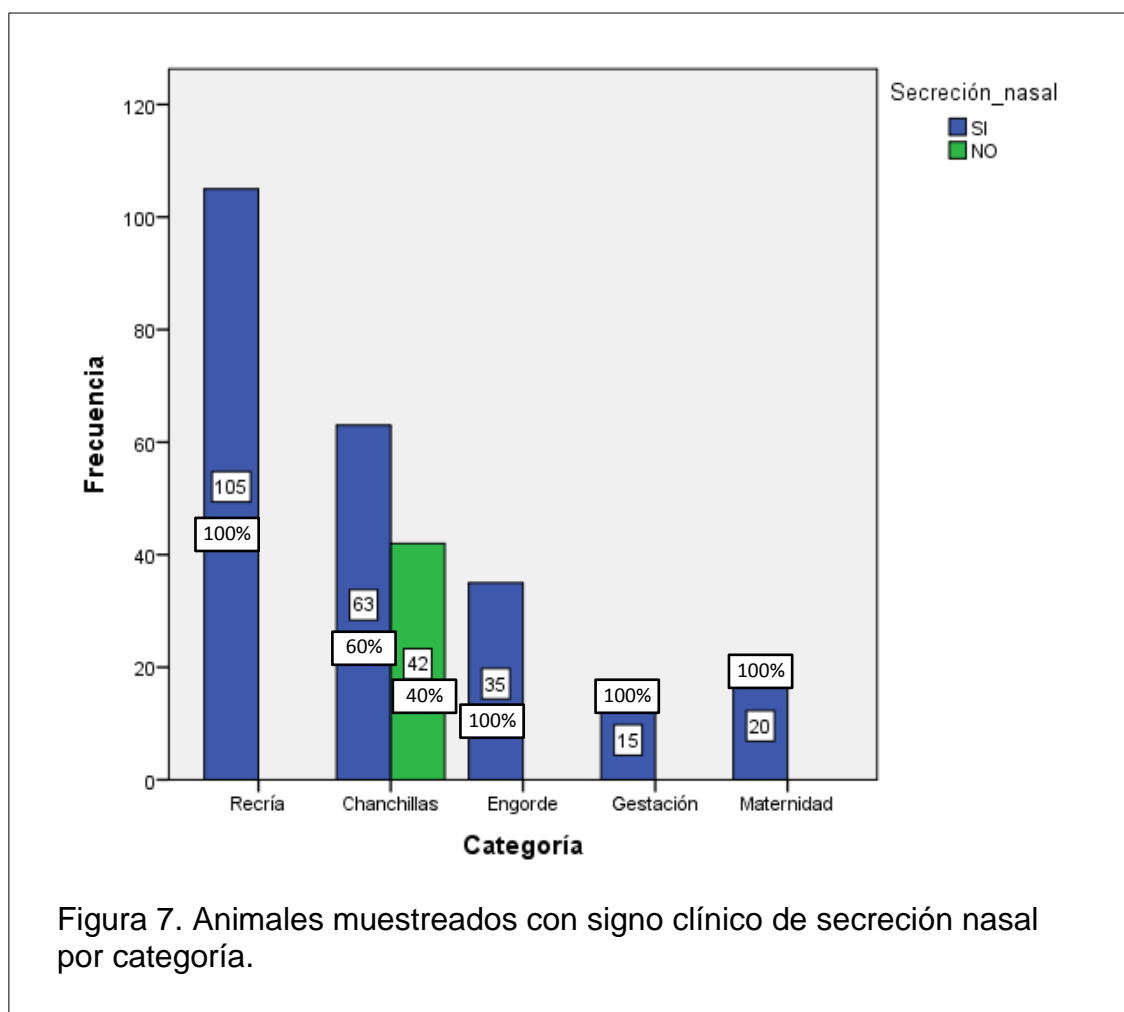


- **Secreción nasal**

Se puede observar en la tabla 11, que el 85% (238 cerdos) de los animales muestreados presentaron secreción nasal. Los animales muestreados dentro de las categorías de recría, engorde, gestación y maternidad presentaron en su totalidad este signo clínico, por otro lado en el grupo de chanchillas el 60% (63 cerdas) presentaron secreción nasal. La figura 7 ilustra la distribución de los cerdos muestreados con secreción nasal, se puede observar que en todas las categorías a excepción de chanchillas estuvo presente este signo clínico.

Tabla 11. Animales muestreados con signo clínico de secreción nasal por categoría

Categoría	Recría	Frecuencia	Secreción nasal		Total
			SI	NO	
		105	105	0	105
		% del Total	37.5%	0.0%	37.5%
	Chanchillas	Frecuencia	63	42	105
		% del Total	22.5%	15.0%	37.5%
	Engorde	Frecuencia	35	0	35
		% del Total	12.5%	0.0%	12.5%
	Gestación	Frecuencia	15	0	15
		% del Total	5.4%	0.0%	5.4%
	Maternidad	Frecuencia	20	0	20
		% del Total	7.1%	0.0%	7.1%
Total		Frecuencia	238	42	280
		% del Total	85.0%	15.0%	100.0%

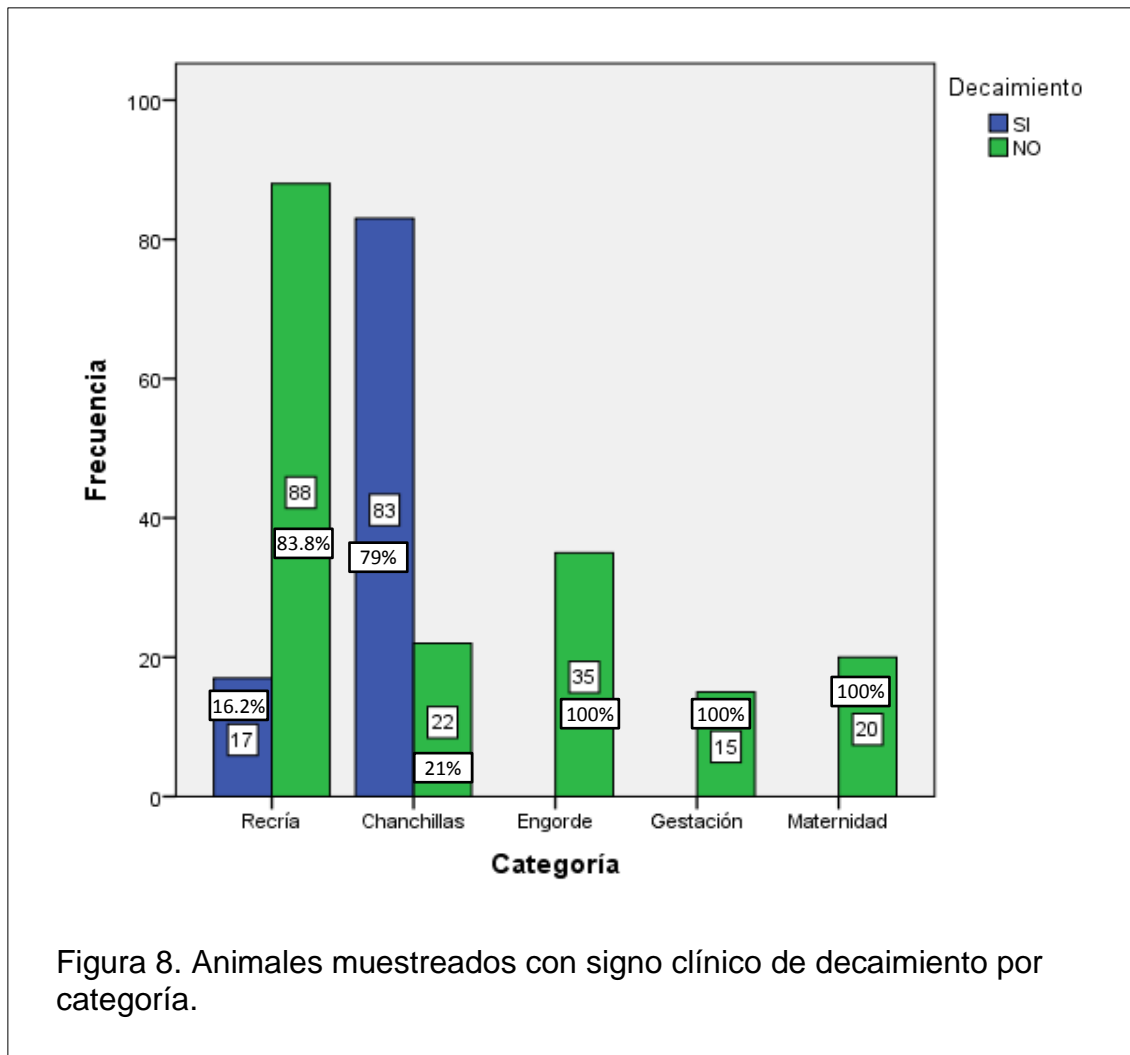


- **Decaimiento**

Como se aprecia en la tabla 12, el signo clínico de decaimiento fue observado en el 35.7% (100 cerdos) del total de los animales muestreados y solamente pertenecen a la categoría de recria con el 6.1% (17 cerdos) y chanchillas con el 29.6% (83 animales). En la figura 8 se puede ver como el signo clínico de decaimiento no estuvo presente en las categorías de engorde, gestación y maternidad, mientras que en el grupo de chanchillas fue en donde más se expresó con el 79% (83 cerdas), seguido de la categoría de recria con el 16.2% (17 animales).

Tabla 12. Animales muestreados con signo clínico de decaimiento por categoría

			Decaimiento		
			SI	NO	Total
Categoría	Recria	Frecuencia	17	88	105
		% del Total	6.1%	31.4%	37.5%
	Chanchillas	Frecuencia	83	22	105
		% del Total	29.6%	7.9%	37.5%
	Engorde	Frecuencia	0	35	35
		% del Total	0.0%	12.5%	12.5%
	Gestación	Frecuencia	0	15	15
		% del Total	0.0%	5.4%	5.4%
	Maternidad	Frecuencia	0	20	20
		% del Total	0.0%	7.1%	7.1%
Total	Frecuencia		100	180	280
	% del Total		35.7%	64.3%	100.0%



- **Fiebre**

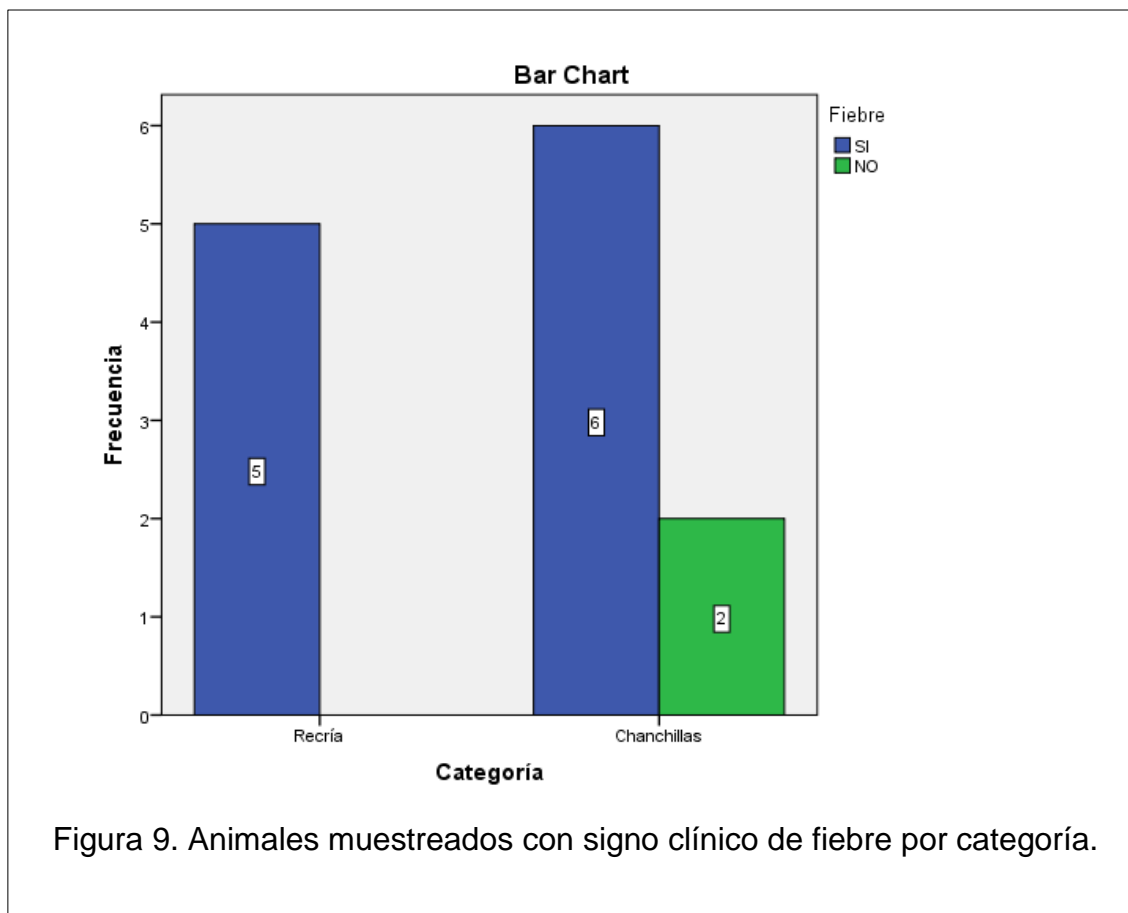
Como se puede apreciar en la tabla 13, a un total de 13 animales se les tomó la temperatura, de los cuales el 84.6% (11 cerdos) presentaron fiebre. Este signo clínico fue tomado en dos categorías, en la de recría se tomaron a 5 animales de los cuales todos presentaron fiebre, por otro lado en la categoría de chanchillas se tomó la temperatura a 8 cerdas, de las cuales 6 presentaron fiebre. En la figura 9 se puede observar la presentación de este signo clínico en recría y chanchillas.

Es importante mencionar que fue un signo clínico que no fue medido en los 280 animales muestreados, dado a su demanda de tiempo, estrés en los animales

que están sujetos esperando a ser realizado el hisopado nasal y sobretodo las muestras ya obtenidas debían ser procesadas lo más rápido posible. Sin embargo la toma de temperatura fue hecha en aquellos animales que al tacto rápido se identificó un alza en la temperatura y sirvió como un signo clínico guía, que sugiere la posible presencia del virus, puesto que el mismo ocasiona un pico de fiebre a las 24 horas post infección.

Tabla 13. Animales muestreados con signo clínico de fiebre por categoría

		Fiebre			
		SI	NO	Total	
Categoría	Recría	Frecuencia	5	0	5
		% del Total	38.5%	0.0%	38.5%
	Chanchillas	Frecuencia	6	2	8
		% del Total	46.2%	15.4%	61.5%
Total		Frecuencia	11	2	13
		% del Total	84.6%	15.4%	100.0%



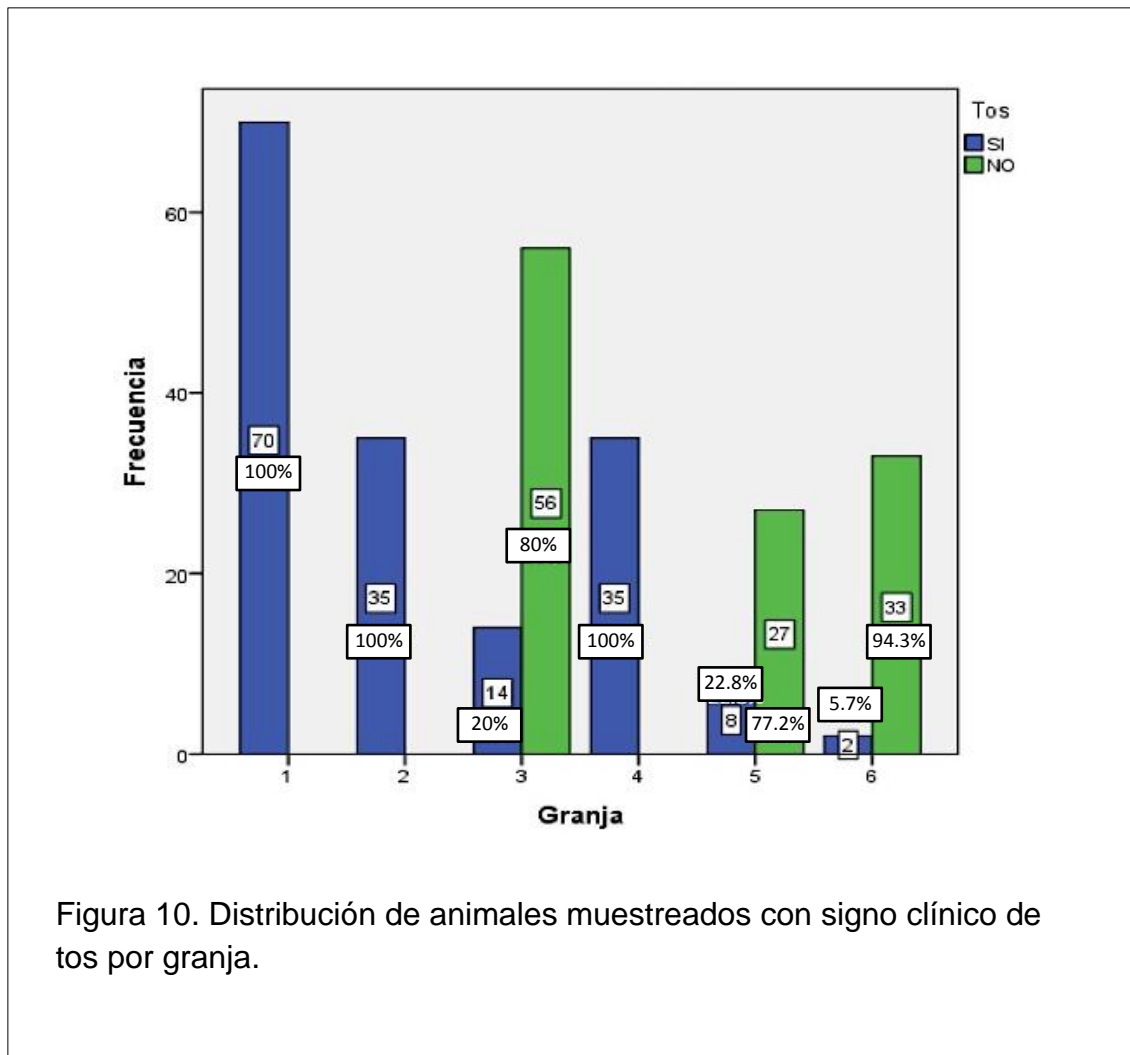
4.1.6. Asociación de signos clínicos con granjas

- **Tos**

Como se puede observar en la tabla 14, el signo clínico tos estuvo presente en todas las granjas donde se realizó el muestreo, el 58.6% (164 cerdos) del total de los animales muestreados lo presentó. En la figura 10 se aprecia la distribución de tos en las 6 granjas muestreadas; en la granja 1, 2 y 4 el 100% de los cerdos muestreados presentaron dicho signo clínico, por otro lado en la granja 3 solamente el 20% (14 animales) lo presentaron, en la granja 5 el 22.8% (8) presentaron tos y finalmente en la granja 6 el 5.7% (2 animales) presentaron este signo clínico.

Tabla 14. Animales muestreados con signo clínico de tos por granja

			Tos		
			SI	NO	Total
Granja 1	Frecuencia		70	0	70
	% del Total		25.0%	0.0%	25.0%
Granja 2	Frecuencia		35	0	35
	% del Total		12.5%	0.0%	12.5%
Granja 3	Frecuencia		14	56	70
	% del Total		5.0%	20.0%	25.0%
Granja 4	Frecuencia		35	0	35
	% del Total		12.5%	0.0%	12.5%
Granja 5	Frecuencia		8	27	35
	% del Total		2.9%	9.6%	12.5%
Granja 6	Frecuencia		2	33	35
	% del Total		0.7%	11.8%	12.5%
Total	Frecuencia		164	116	280
	% del Total		58.6%	41.4%	100.0%

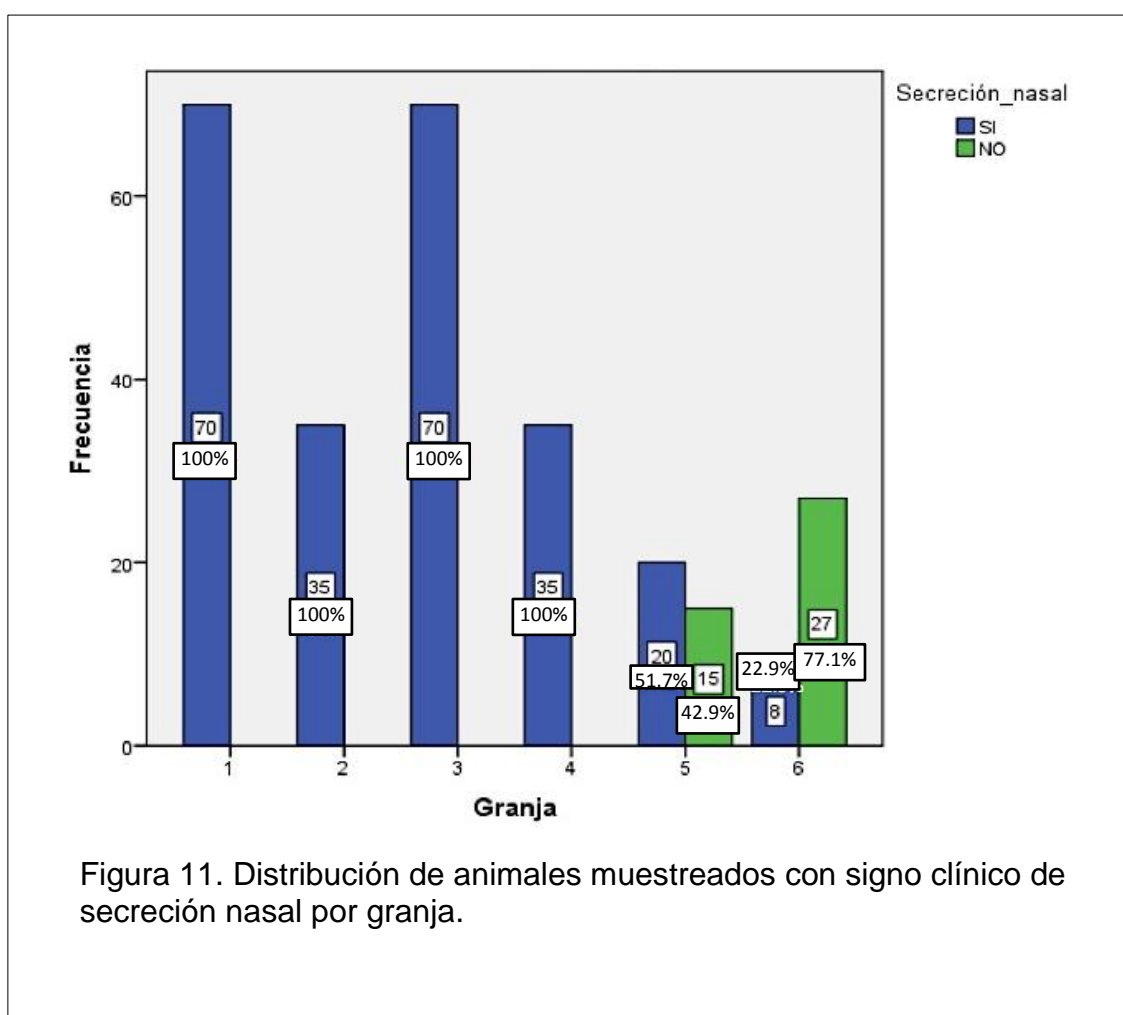


- **Secreción nasal**

En la tabla 15, se puede ver que en las 6 granjas estuvo presente el signo clínico de secreción nasal, así el 85% (238 animales) del total de los cerdos muestreados presentaron dicho signo. En las granjas 1, 2, 3 y 4 el 100% de los animales muestreados presentaron secreción nasal, por otro lado como se observa en la figura 11, en la granja 5 solamente el 57.1% (20 animales) presentaron secreción nasal y en la granja 6 el 22.9% (8 animales).

Tabla 15. Animales muestreados con signo clínico de secreción nasal por granja

Granja		Secreción Nasal		Total
		SI	NO	
1	Frecuencia	70	0	70
	% del Total	25.0%	0.0%	25.0%
2	Frecuencia	35	0	35
	% del Total	12.5%	0.0%	12.5%
3	Frecuencia	70	0	70
	% del Total	25.0%	0.0%	25.0%
4	Frecuencia	35	0	35
	% del Total	12.5%	0.0%	12.5%
5	Frecuencia	20	15	35
	% del Total	7.1%	5.4%	12.5%
6	Frecuencia	8	27	35
	% del Total	2.9%	9.6%	12.5%
Total	Frecuencia	238	42	280
	% del Total	85.0%	15.0%	100.0%

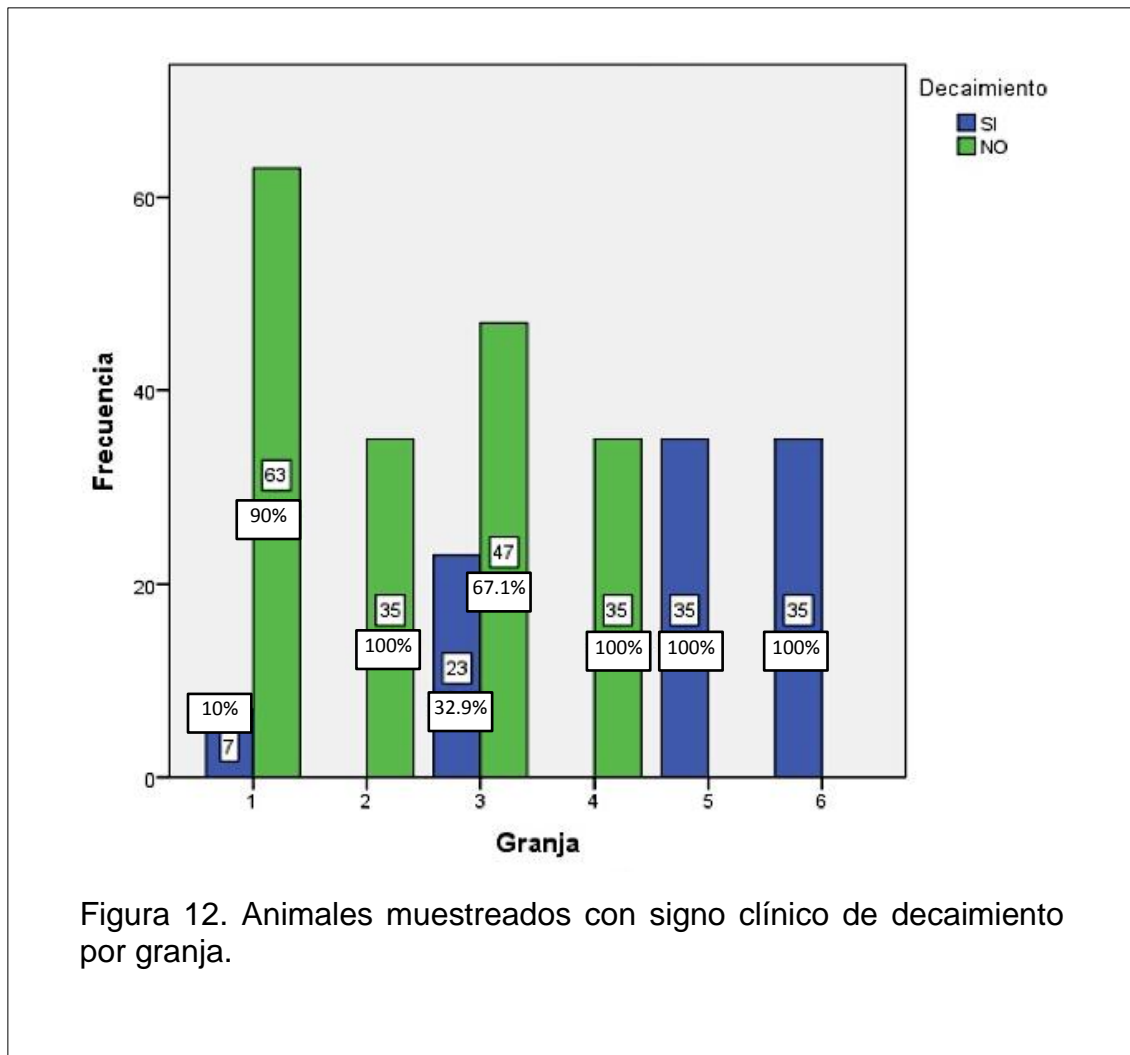


- **Decaimiento**

En la tabla 16 se puede observar que el 37.5% (100 animales) de los cerdos muestreados presentaron decaimiento y fue un signo clínico que solamente estuvo presente en las granjas 1, 3, 5 y 6. La figura 12 muestra que en la granja 1 el decaimiento estuvo presente en el 10% (7 cerdos), en la granja 3 el 32.9% (23 animales), por otro lado en las granjas 5 y 6 el 100% de los animales muestreados presentaron estar decaídos, mientras que las granjas 2 y 4 no presentaron este signo clínico.

Tabla 16. Animales muestreados con signo clínico de decaimiento por granja

			Decaimiento		
			SI	NO	Total
Granja 1	Frecuencia		7	63	70
	% del Total		2.5%	22.5%	25.0%
2	Frecuencia		0	35	35
	% del Total		0.0%	12.5%	12.5%
3	Frecuencia		23	47	70
	% del Total		8.2%	16.8%	25.0%
4	Frecuencia		0	35	35
	% del Total		0.0%	12.5%	12.5%
5	Frecuencia		35	0	35
	% del Total		12.5%	0.0%	12.5%
6	Frecuencia		35	0	35
	% del Total		12.5%	0.0%	12.5%
Total	Frecuencia		100	180	280
	% del Total		35.7%	64.3%	100.0%



Como se puede observar en la tabla 17, la aparición de signos clínicos fue diferente en cada categoría. En recría en la granja 1 el 100 % (70 cerdos) de los animales muestreados presentaron tos y secreción nasal, y el 10% (7 animales) mostraron el signo clínico de decaimiento. En recría de la granja 2 el 100 % (35 animales) de los cerdos fueron muestreados con secreción nasal, el 20% (7 animales) a demás presentó tos y el 28.6% (10 cerdos) indicaron estar decaídos. La categoría de chanchillas de la granja 3 el 100% (35 animales) mostraron tener secreción nasal, el 20% (7 cerdas) tos y un 37.1% (13 animales) fueron muestreadas con decaimiento. El 100 % (35) de las chanchillas de la granja 5 presentaron estar decaídas, el 57.1% (20 cerdas) estuvo con secreción nasal y el 22.9% (8 animales) presentó tener tos. En la granja 6 las chanchillas el 100 % (35 cerdas) fueron muestreadas con

decaimiento, el 77.1% (27 animales) estuvieron con secreción nasal y el 5.7% (2 cerdas) manifestaron tos. Las categorías de engorde, gestación y maternidad el 100% de los animales fueron muestreados con tos y secreción nasal.

Tabla 17. Presencia de signos clínicos por categoría de edad

Categoría	Tos			Secreción nasal			Decaimiento		
	SI	NO	Total	SI	NO	Total	SI	NO	Total
	Frecuencia y Porcentaje (%)	Frecuencia y Porcentaje (%)		Frecuencia y Porcentaje (%)	Frecuencia y Porcentaje (%)		Frecuencia y Porcentaje (%)	Frecuencia y Porcentaje (%)	
Recría (G1)	70 (100%)	0	70	70 (100%)	0	70	7 (10%)	63 (90%)	70
Recría (G3)	7 (20%)	28 (80%)	35	35 (100%)	0	35	10 (28.6%)	25 (71.4%)	35
Chanchillas (G3)	7 (20%)	28 (80%)	35	35 (100%)	0	35	13 (37.1%)	22 (62.9%)	35
Chanchillas (G5)	8 (22.9%)	27 (77.1%)	35	20 (57.1%)	15 (42.9%)	35	35 (100%)	0	35
Chanchillas (G6)	2 (5.7%)	33 (94.3%)	35	8 (22.9%)	27 (77.1%)	35	35 (100%)	0	35
Engorde (G2)	35 (100%)	0	35	35 (100%)	0	35	0	35 (100%)	35
Gestación (G4)	15 (100%)	0	15	15 (100%)	0	15	0	15 (100%)	15
Maternidad (G4)	20 (100%)	0	20	20 (100%)	0	20	0	20 (100%)	20
TOTAL	164	116	280	238	42	280	100	180	280

4.1.7. Resultados de las Pruebas de Laboratorio

En la tabla 18, se pueden apreciar los resultados de laboratorio en las 6 granjas donde se realizó el muestreo. Es importante recordar que se realizó un pool de trabajo por cada 35 muestras tomadas por cada ingreso a granja, para de esta manera lograr aumentar la carga viral y el aislamiento sea posible. La prueba de HA fue la primera en realizarse a partir del líquido alantoideo cosechado, para ésta prueba las 5 primeras granjas resultaron HA positivo, la granja número 6 fue HA negativo.

Como prueba alterna para la identificación del virus aislado y la subtipificación del mismo se llevó a cabo la prueba RT-PCR en Tiempo Real con cebadores específicos. Dicha prueba fue corrida con líquidos alantoideos positivos a HA, es decir de las 5 primeras granjas. El resultado fue la amplificación para la granja 1, es decir positivo a Influenza Tipo A H1N1, para el resto de granjas no se obtuvo amplificación.

Como prueba complementaria en las granjas 1, 3 y 4 se realizó HA en microplaca para de esta manera poder titular-cuantificar el virus aislado, en las granjas 3 y 4 se obtuvieron títulos altos (1024), es importante mencionar que la prueba fue llevada a cabo inmediatamente después de haber sido cosechado el líquido alantoideo. En la granja 1 el título HA fue de 2, probablemente porque la prueba se corrió 2 días después de haber cosechado el líquido, y que tal vez hizo que el título inicial del virus disminuya.

En las granjas 1, 3 y 4 por tener sueros porcinos con anticuerpos específicos para H1N1 y H3N2, se corrió HI como prueba extra. Las tres granjas fueron positivo a H1N1 y negativo para H3N2.

Las pruebas complementarias se llevaron a cabo únicamente en tres granjas porque eran de las cuales se tenía líquido alantoideo positivo para HA recién cosechado, el líquido alantoideo de las granjas 2 y 5 se encontraba

almacenado ya por más de una semana, razón por la que no era factible realizar dichas pruebas (Anexo 9).

Tabla 18. Resultado Pruebas de Laboratorio

Número de Granja	Prueba HA en placa	RT-PCR Tiempo Real	Prueba HA micro-placa (Título)	Prueba HI (H1N1)	Prueba HI (H3N2)
1	Positivo	Influenza Tipo A/H1N1	Positivo (1:2)**	Positivo	Negativo
2	Positivo	No amplifica	No Aplica*	No Aplica*	No Aplica*
3	Positivo	No amplifica	Positivo (1:1024)	Positivo	Negativo
4	Positivo	No amplifica	Positivo (1:1024)	Positivo	Negativo
5	Positivo	No amplifica	No Aplica*	No Aplica*	No Aplica*
6	Negativo	No amplifica	No Aplica*	No Aplica*	No Aplica*

* Al ser pruebas complementarias al estudio, solamente se las llevó a cabo en muestras de líquido alantoideo recién cosechado y cuando se contaba con los materiales.

** La prueba para granja 1 se a realiza 2 días después de haber cosechado el líquido alantoideo.

4.2. Discusión

Pleschka (2012), menciona que la aparición de signos clínicos para la IP se da a partir de las 48 horas post infección hasta alrededor de los 7 a 10 días, en el estudio realizado en las granjas en las cuales fue posible el aislamiento viral el 57.9% (162 cerdos) presentaron el signo clínico de tos, 82.1% (230 cerdos) fueron muestreados con secreción nasal y 23.2% (65 cerdos) con presencia de

decaimiento, lo cual sugiere que la toma de muestra fue llevada a cabo en el periodo en el cual se da la aparición de signos clínicos. Detmer y colaboradores (2012), mencionan que existe un pico de fiebre a las 24 horas de haber ingresado el virus al organismo, en el presente trabajo se tomó de manera alterna la temperatura a 13 animales, de los cuales 11 presentaron tener fiebre.

El virus de la IP afecta a cerdos de todas las edades, desde lechones hasta cerdas maduras (Janke, 2013). Se logró realizar el aislamiento viral mediante la inoculación en embriones de pollo en 5 de la 6 granjas muestreadas, en las categorías de recría, chanchillas, engorde y cerdas reproductoras, lo cual comprueba que el virus puede afectar a todos los cerdos sin importar su edad. El aislamiento del virus de la Influenza es conocido como la prueba gold estándar y el mismo se puede llevar a cabo en cultivos celulares o embriones de pollo de 9 a 11 días. (Detmer, Gramer, Goyal, Torremorrel y Torrinson, 2012).

Actualmente el uso de embriones de pollo es el método de elección para realizar dicho aislamiento. Cunningham (1973) menciona: “El embrión de pollo es un medio valioso y ampliamente utilizado para el aislamiento inicial y pasajes posteriores de replicación-purificación para obtener cultivos de reserva y producción de vacunas. Embriones de pollo se utilizan casi exclusivamente debido a su disponibilidad, economía, tamaño adecuado, están exentos relativamente de infecciones y no contienen anticuerpos contra el inóculo viral.”

El sitio de inoculación es la cavidad alantoidea del embrión, la cual en las primeras etapas de desarrollo está formada principalmente por soluciones de sales fisiológicas, y es la cavidad de salida de los riñones del embrión; razón por la cual a partir de los 12 días el fluido toma un aspecto turbio dada la presencia de uratos, lo cual es un factor sustancial al momento de decidir el día de lectura de los embriones. Para evitar falsos positivos en la lectura de la prueba HA, es importante que al cosechar el líquido alantoideo se lo realice de manera cuidadosa impidiendo la ruptura de vasos, sin uratos, evitando tocar la

yema y demás medidas preventivas. (Cunningham, 1973), no obstante cuando existe la presencia de uratos con algo de observación y atención es fácil diferenciarlo de un HA positivo. (Anexo 8)

La OIE (2008b) menciona que: “cuando se aprecia actividad HA en fluidos estériles de los embriones inoculados es debida, muy probablemente, a un virus de la Influenza tipo A o a un paramixovirus aviar”, en el trabajo realizado la opción de aislar a un paramixovirus aviar quedó descartado puesto que afecta solo a aves.

De manera paralela, según la OIE la presencia del virus de la Influenza puede ser confirmada mediante la prueba RT-PCR, además actualmente se la puede utilizar también para subtipificar al virus, ya que existen cebadores específicos HA y NA para la detección de los subtipos de virus Influenza tipo A (OIE, 2015).

En el presente estudio se llevó a cabo la RT-PCR Influenza A H1N1 en Tiempo real, se logró la amplificación de muestras de la granja número 1, pero no del resto de granjas. La presencia de posibles falsos negativos en dicha prueba pueden deberse en gran parte a efectos inhibidores, errores de pipeteo además del inadecuado manejo de las muestras y su almacenamiento inapropiado (OIE, 2008a).

Como prueba complementaria en 3 de las granjas se realizó la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI), utilizando sueros porcinos conocidos H1N1 y H3N2, los cuales permitieron la subtipificación del virus. Se obtuvo como resultado para las granjas 1, 3 y 4 reacción HI positiva para H1N1 y negativa para H3N2. Al ser sueros con anticuerpos específicos para H1N1 y H3N2, el virus aislado de las 3 granjas se formó una unión con los anticuerpos para H1N1.

5. Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Es posible realizar el aislamiento del virus de la IP en embriones de pollo de 9 días, muestreando aquellos animales con signos respiratorios compatibles con la enfermedad.
- Los resultados de éste confirman la circulación del virus de la IP en granjas de producción industrial porcinas sujetas a estudio ubicadas en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.
- RT-PCR en tiempo real sugiere que el virus de la IP tipo A H1N1 es positivo para la granja 1 y la técnica HI indica resultado positivo para las granjas 3 y 4, resultado que permite continuar con la vacunación de los animales con ésta cepa viral.
- La técnica de HI por medio de sueros con anticuerpo específicos también son útiles para realizar la subtipificación viral y resultaría ser una prueba más sencilla de realizar en relación con PCR.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar estudios similares en explotaciones porcícolas permanentemente para determinar el tipo de virus circulante y en base a ello elaborar la vacuna autógena.
- Es importante implementar un plan de vacunación de acuerdo a las medidas de bioseguridad, el status sanitario y la magnitud del desafío.
- Se puede tipificar el virus circulante por medio de RT-PCR en tiempo real con cebadores específicos siempre y cuando la prueba esté totalmente estandarizada y se proporcione un adecuado manejo y almacenamiento de las muestras a ser analizadas.
- A futuro mediante el uso de la ingeniería genética se podría llegar al uso de vacunas vectorizadas para la IP, las cuales darían excelente protección sin el riesgo de diseminar la enfermedad.

REFERENCIAS

- Allerson, M., Gramer, M., Torremorell, M. (2011). The disease ecology of influenza virus in swine breeding farms. Recuperado el 19 de mayo del 2015 de https://www.pig333.com/swine_abstracts/the-disease-ecology-of-influenza-virus-in-swine-breeding-farms_4645/
- Asociación Porcicultores Ecuador (ASPE). (2010). Mapas censo porcícolas. Recuperado el 28 de octubre del 2014. Obtenido de <http://www.aspe.org.ec/index.php/informacion/estadisticas/censo-georeferenciado>
- Bruguera, S. (2004). Control de la Influenza Porcina. Recuperado el 14 de octubre del 2015 de https://www.hipra.com/wps/wcm/connect/350ccd004325b96ebf18bfeda4ed4bac/Control_Influenza_porcina.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=350ccd004325b96ebf18bfeda4ed4bac
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014a). Key Facts about Swine Influenza (Swine Flu) in Pigs. Recuperado el 29 de octubre del 2014. Obtenido de http://www.cdc.gov/flu/swineflu/keyfacts_pigs.htm
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014b). Tipos de virus de influenza. Recuperado el 9 de abril del 2016 de <http://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/viruses/types.htm>
- Corzo, C., Gramer, M., Lowe, J. y Webby, R. (2011). Swine influenza active surveillance in the United States. Recuperado el 18 de mayo de 2015 de https://www.pig333.com/swine_abstracts/swine-influenza-active-surveillance-in-the-united-states_5874/
- Cunningham, C. (1973). A Laboratory Guide in Virology. 7.^a ed. Minneapolis: Burgee Publishing Co.
- Detmer, S. (2015). Patogenia de la infección por el virus de la influenza A en cerdos. Recuperado el 16 de abril del 2016 de https://www.3tres3.com/gripe/patogenia-de-la-infeccion-por-el-virus-de-la-influenza-a-en-cerdos_34670/

- Detmer, S., Gramer, M., Goyal, S., Torremorell, M., Torrison, J. (2012).
Diagnostics and Surveillance for Swine Influenza.
0.1007/82_2012_220
- Duarte, L., Moreno, O. (2005). Prevalencia serológica de los virus (H1N1) y
(H3N2) en cerdos de precebo y pie de cría, en granjas intensivas de la
provincia de Soto, departamento de Santander. Colombia: Selecciones.
- Fenner, F., Bachmann, P., Gibbs, E., Murphy, F., Studdert, M., White, D.
(1987). Orthomyxoviridae. Veterinary Virology. San Diego, CA:
Academic Press Inc.
- Gauger, P. (2014). Detección y diagnóstico del virus de la Influenza A: infección
y enfermedad clínica en cerdos. Recuperado el 17 de abril del 2016 de
[https://www.3tres3.com/gripe/deteccion-y-diagnostico-del-virus-de-la-
influenza-a_34440/](https://www.3tres3.com/gripe/deteccion-y-diagnostico-del-virus-de-la-influenza-a_34440/)
- Gobierno Autónomo Descentralizado Santo Domingo de los Tsáchilas. (2015).
Situación. Recuperado el 17 de abril del 2016 de
<http://www.santodomingo.gob.ec/index.php/la-ciudad/situacion.html>
- Govorkova, E., McCullers, J. (2012). Therapeutics Against Influenza.
10.1007/82_2011_198
- Grammer, M. y Rossow, K. (2004). Epidemiology of swine influenza and
implications of reassortment. Recuperado el 18 de mayo del 2015 de
[https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/144272/Gramer.p
df?sequence=](https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/144272/Gramer.pdf?sequence=)
- Hattwick, M., O'Brien, R., Hoke, C. y Dowdle. (1977). La influenza pandémica y
el virus de influenza porcina. Recuperado el 18 de mayo del 2015 de
[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/bmn/la_influenza_pandemica_y_el_
virus_de.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/bmn/la_influenza_pandemica_y_el_virus_de.pdf)
- Janke, B. (2013). Clinicopathological Features of Swine Influenza.
10.1007/82_2013_308
- Kruger, S., Gray, G. (2012). Swine Influenza Virus Infections in Man.
10.1007/82_2012_268
- Merchant, I., Packer, R. (1980). Bacteriología y Virología Veterinarias.
Zaragoza: ACRIBIA. P. 688

- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2008a). Manual de la OIE sobre animales terrestres: Validación y control de la calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Recuperado el 11 de mayo del 2016 de http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.05.%20Validación%20y%20control%20de%20calidad.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2008b). Manual de la OIE sobre animales terrestres: Influenza Aviar. Recuperado el 12 de mayo del 2016 de http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.04.%20Influenza_aviar.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2014). SWINE INFLUENZA. Recuperado el 5 de noviembre del 2014. Obtenido de http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/SI-EN.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2015). Manual de la OIE sobre animales terrestres: Influenza Porcina. Recuperado el 12 de mayo del 2016 de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.08.08_SWINE_INFLUENZA.pdf
- Pleschka, S. (2012). Overview of Influenza Viruses. 10.1007/82_2012_272
- Robertson, S. (2014). ¿Cuál es la Gripe H1N2? Recuperado el 29 de abril del 2016 de [http://www.news-medical.net/health/What-is-Influenza-H1N2-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-Influenza-H1N2-(Spanish).aspx)
- Roche. (s.f). Real Time ready Influenza A/H1N1 Detection Set. Recuperado el 11 de mayo del 2016 de http://www.molecularlab.it/public/data/Leilaa/201056184547_Roche%20protocol%20h1n1.pdf
- Scientific Animations. (2015). SwineFlu Influenza H1N1 Mechanism of Action MOA Animation. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=NPr-i-lbA7s>

- Simon, G. (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. Recuperado el 20 de enero del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25542013>
- Stanchi, O. (2007). Microbiología Veterinaria. Argentina: INTER-médica. P. 236-237.
- Swayne, D., Senne, D., Beard, C. (1998). A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Florida: Rose Printing. P. 151.
- Swenson, S., Erickson, G. (1999). Swine influenza virus. Recuperado el 15 de enero del 2015. Obtenido de <https://www.aasv.org/public/InfluenzaFactSheet.pdf>
- Talledo, M., Zumaeta, K. (2010). Los virus Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. Recuperado el 24 de Abril del 2016 de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v16n2/a18v16n2.pdf>
- University of Georgia. (2006). Avian Virus Diseases Laboratory Manual: Poultry Diagnostic and Research Center. Recuperado el 12 de mayo del 2016 de http://vet.uga.edu/images/uploads/pdrc/Villegas_Lab_Manual.pdf
- Van Reeth, K., Ma, W. (2012). Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change-That's the Question. 10.1007/82_2012_266
- Villa, S. (2016). Copy of Reacciones de Hemaglutinación. Recuperado el 21 de abril del 2016 de <https://prezi.com/m8vh5box20es/copy-of-reacciones-de-hemaglutinacion/>
- Zell, R., Scholtissek, C., Ludwig, S. (2012). Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. 10.1007/82_2012_267

ANEXOS

Anexo 1: Toma de muestra



a.



b.



c.

- a. Sujeción para toma de muestra.
- b. Toma de muestra (Hisopado nasal).
- c. Almacenamiento hisopo con muestra tomada.

Fotos tomadas por: López, 2016

Anexo 2: Codificación de muestras



a.

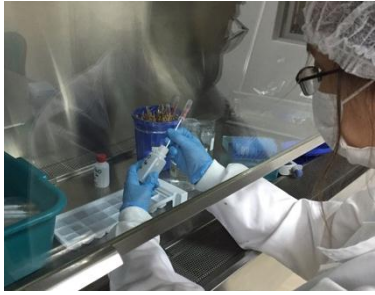


b.

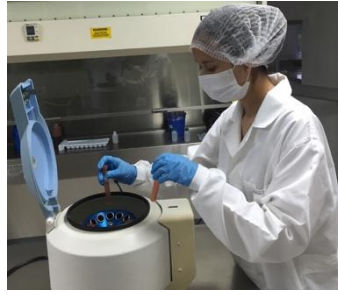
- a. Identificación hisopos nasales.
- b. Llegada de muestras a Laboratorio para ser procesadas.

Fotos tomadas por: Autora

Anexo 3: Inoculación de embriones



a.



b.



c.



d.



e.

- a. Elaboración de pool de trabajo, escurriendo hisopos con muestras en PBS.
- b. Centrifugación de tubos con muestras.
- c. Punción de embriones en lugar de inoculación.
- d. Inoculación de embriones.
- e. Sellar orificios de punción con pega.

Fotos tomadas por: Autora

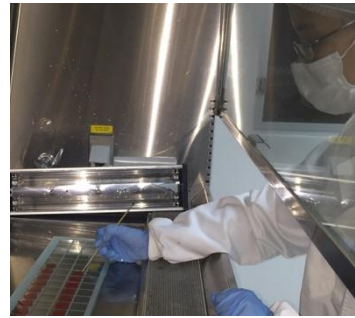
Anexo 4: Prueba de HA



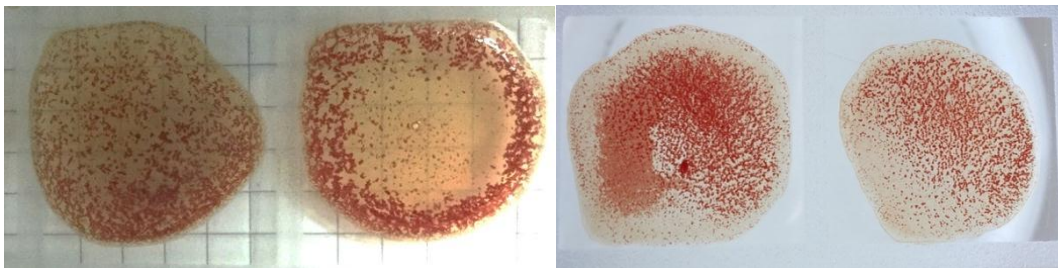
a.



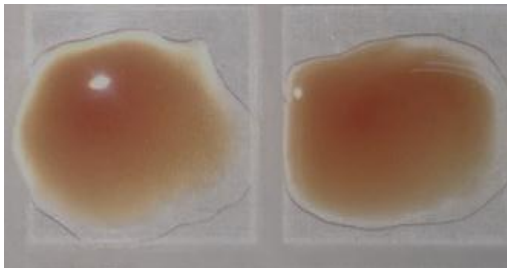
b.



c.



d.



e.

- a. Ingreso de embriones a congelador.
- b. Extracción de líquido alantoideo.
- c. Enfrentamiento líquido alantoideo con glóbulos rojos de pollo en placa.
- d. Muestras HA positivas.
- e. Muestras HA negativas.

Fotos tomadas por: Autora

Anexo 5: Prueba HA en micro placa, título 1024



Foto tomada por: Autora

Anexo 6: Prueba HI, positivo para H1N1

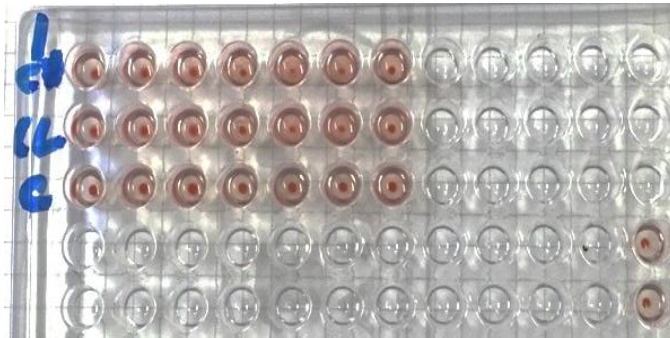


Foto tomada por: Autora

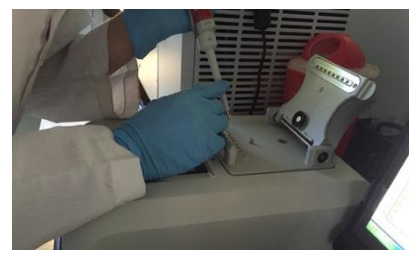
Anexo 7: RT-PCR Tiempo Real



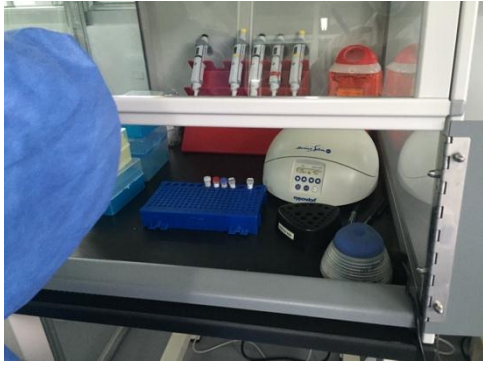
a.



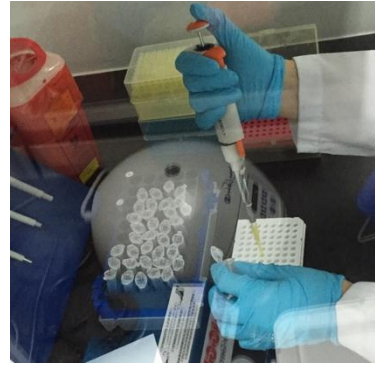
b.



c.



d.



e.

- a. Kit para extracción de material genético Influenza.
- b. Procesamiento de muestras para extracción material genético.
- c. Cuantificación muestras.
- d. Preparación de sondas para PCR.
- e. Ensamblaje de placa para ingresa a lector.

Fotos tomadas por: Autora

Anexo 8: Muestras HA negativas, con presencia de uratos.

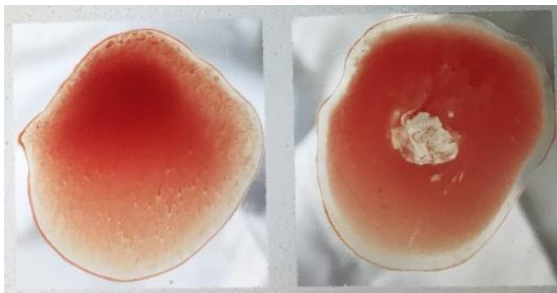


Foto tomada por: Autora

Anexo 9: Informes Pruebas de Laboratorio



AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA
DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DEL AGRO

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO ANIMAL

Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP,
Tumbaco - Quito
Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845

PGT/DA/09-FO01

Rev. 2

INFORME DE ANÁLISIS

Hoja 1 de 1

Informe N°: LN-CV-lp16-001

Fecha emisión Informe: 28/01/2016

DATOS DEL CLIENTE

Cliente:	Dirección: EL PARAÍSO
Propietario: DIANA VARGAS -	N° de Orden de Trabajo: DA-65-CGLS-0245
Nombre del predio:	Quipux o Factura: 15 M
Provincia: TSÁCHILAS	Dirección del predio: PARAÍSO
Parroquia:	Cantón: SANTO DOMINGO
Motivo del análisis: CONVENIO	Especie: PORCINO
Fecha de recepción de la muestra: 26/01/2016	N° y Tipo de Muestras: 04 LÍQUIDOS ALANTOIDEOS
Fecha de muestreo: 13/01/2016	Muestreado por: DIANA VARGAS
Fecha de inicio del análisis: 26/01/2016	Diagnóstico solicitado: HI - HA
	Fecha de inicio del análisis: 26/01/2016

RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO

TÉCNICAS: HEMAGLUTINACIÓN, INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

MÉTODOS: PEE/CV/03; PEE/V/09

CÓDIGO MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA (ID/ANIMAL/RAZA)	EDAD (DÍAS)	SEXO	SINTOMAS	TEMPERATURA AL MOMENTO DE MUESTREO °C	DIAGNÓSTICO			
						HEMAGLUTINACIÓN		INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN	
						ÚLTIMA DILUCIÓN	RESULTADO	ÚLTIMA DILUCIÓN	RESULTADO
CV-p1601-001	4	28	N/D	SI	40.0	NEGATIVO	NEGATIVO	--	NA
CV-p1601-002	7	28	N/D	SI	41.0	NEGATIVO	NEGATIVO	--	NA
CV-p1601-003	5	28	N/D	SI	40.0	1/2	POSITIVO	--	Sin determinación de Serotipo
CV-p1601-004	6	28	N/D	SI	41.0	1/2	POSITIVO	--	Sin determinación de Serotipo

Límites de Referencia:

VALOR DE REFERENCIA HEMAGLUTINACIÓN	
RESULTADO	VALOR DE ÚLTIMA DILUCIÓN
POSITIVO	HEMAGLUTINACIÓN EN LA ÚLTIMA DILUCIÓN
NEGATIVO	SIN HEMAGLUTINACIÓN

VALOR DE REFERENCIA INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN	
RESULTADO	VALOR DE ÚLTIMA DILUCIÓN
POSITIVO	INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN EN LA ÚLTIMA DILUCIÓN
NEGATIVO	SIN INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

Analizado por: Lic. Margoth Barrionuevo

Observaciones: Las muestras serán analizadas a través de PCR.

Para HI se analizaron los Serotipos H3N8 y H1N1.

Anexo Gráficos o Anexo Documentos:

Lic. Margoth Barrionuevo

**Responsable de Laboratorio de Control de Calidad de Vacunas
Diagnóstico Animal**

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.





AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA
DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DEL AGRO

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP,
Tumbaco - Quito
Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845

PGT/BM/09-FO01

Rev. 4

INFORME DE ANÁLISIS

Hoja 1 de 3

Informe N°: LN-BM-116-334

Fecha emisión Informe: 06/05/2016

DATOS GENERALES

Cliente:		Dirección: NO INFORMA
Propietario: Diana Vargas		N° de Orden de Trabajo: BM-16-CGLS-1205
		Quipux o Factura: 000015-M
Nombre del predio:		Dirección Predio: Varias
Provincia: Tsachilas		Cantón: Sto. Domingo
Parroquia: Varias		Especie: Porcinos
Motivo del Análisis: Tesis		N° y Tipo de muestra: 35 muestras de líquido alantoideo
Fecha de recepción de la muestra: 02/05/2016		Muestreado por: Diana Vargas
Fecha de muestreo: 02/05/2016		Diagnóstico solicitado: Influenza A-H1N1 – PCR
Fecha de inicio del análisis: 03/05/2016		Fecha finalización del análisis: 06/05/2016

Identificación del Animal (si aplica): NA

RESULTADOS DEL ANÁLISIS

Código o Identificación de la muestra/Método/Técnica/Resultados/Unidades (si aplica):

INFLUENZA A:

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	MÉTODO	PARÁMETROS ANALIZADOS	RESULTADOS
BM-16-576	1P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-577	2P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-578	3P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-579	4P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-580	5P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-581	6P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-582	7P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-583	8P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-584	9P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-585	10P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-586	11P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-587	12P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	POSITIVO
BM-16-588	13P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	POSITIVO
BM-16-589	14P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	POSITIVO
BM-16-590	1PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-591	2PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-592	3PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-593	4PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-594	5PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-595	6PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-596	7PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-597	8PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-598	1CL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-599	2CL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha.

Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.

AG



Informe N°: LN-BM-I16-334

Fecha emisión Informe: 06/05/2016

BM-16-600	3CL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-601	1C	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-602	2C	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-603	1T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-604	2T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-605	3T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-606	4T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-607	5T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-608	6T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-609	7T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-610	CV-1601-001	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	POSITIVO

H1N1:

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	MÉTODO	PARÁMETROS ANALIZADOS	RESULTADOS
BM-16-576	1P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-577	2P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-578	3P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-579	4P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-580	5P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-581	6P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-582	7P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-583	8P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-584	9P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-585	10P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-586	11P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-587	12P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	POSITIVO
BM-16-588	13P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	POSITIVO
BM-16-589	14P	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	POSITIVO
BM-16-590	1PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-591	2PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-592	3PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-593	4PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-594	5PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-595	6PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-596	7PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-597	8PL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-598	1CL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha.
Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.

Ab



Informe N°: LN-BM-116-334
Fecha emisión Informe: 06/05/2016

BM-16-599	2CL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-600	3CL	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-601	1C	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-602	2C	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-603	1T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-604	2T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-605	3T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-606	4T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-607	5T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-608	6T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-609	7T	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-610	CV-1601-001	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	POSITIVO

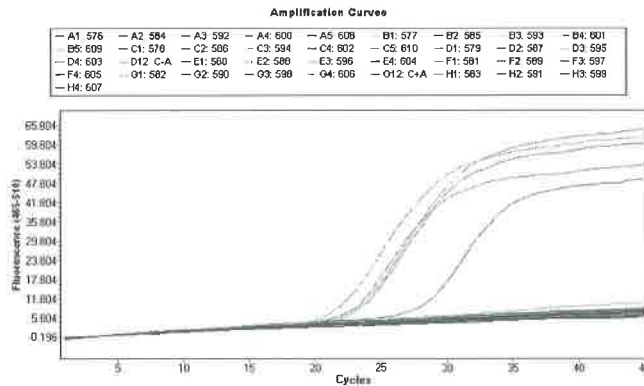
Límites de referencia (si aplica): NA

Analizado por: María Sol Vaca

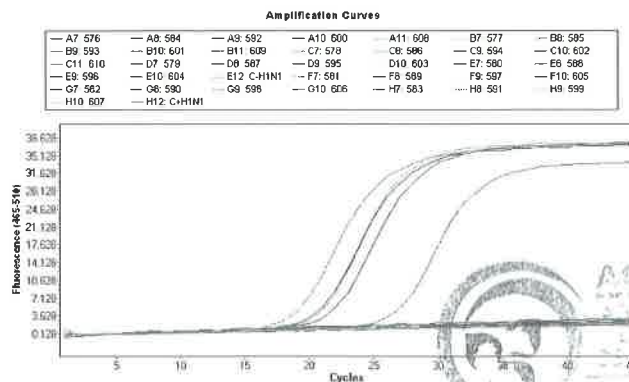
Observaciones: NA

Anexo Gráficos o Anexo Documentos (si aplica):

INFLUENZA A:

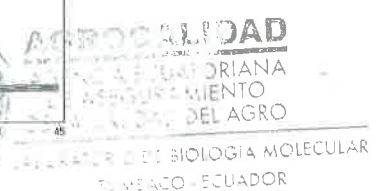


H1N1:



[Handwritten Signature]

Ing. Ana Garrido
Responsable Técnico
Laboratorio de Biología Molecular



Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.



Informe N°: LN-BM-116-371

Fecha emisión Informe: 17/05/2016

DATOS GENERALES

Cliente:		Dirección: Santo Domingo
Propietario: Diana Vargas		N° de Orden de Trabajo: BM-16-CGLS-1370
Nombre del predio:		Quipux o Factura: 000015-M
Provincia: Tsáchilas		Dirección Predio: Santo Domingo
Parroquia: Santo Domingo		Cantón: Santo Domingo
Motivo del Análisis: Tesis		Especie: Porcinos
Fecha de recepción de la muestra: 16/05/2016		N° y Tipo de muestra: 8 muestras de líquido alantoideo liofilizado
Fecha de muestreo: 30/03/2016		Muestreado por: Diana Vargas
Fecha de inicio del análisis: 17/05/2016		Diagnóstico solicitado: Influenza A- H1N1 – PCR
		Fecha finalización del análisis: 17/05/2016

Identificación del Animal (si aplica): NA

RESULTADOS DEL ANÁLISIS

Código o Identificación de la muestra/Método/Técnica/Resultados/Unidades (si aplica):

INFLUENZA A:

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	MÉTODO	PARÁMETROS ANALIZADOS	RESULTADOS
BM-16-651	1	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-652	2	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-653	3	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-654	4	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-655	5	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-656	6	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-657	7	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO
BM-16-658	8	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A	NEGATIVO

H1N1:

CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	MÉTODO	PARÁMETROS ANALIZADOS	RESULTADOS
BM-16-651	1	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-652	2	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-653	3	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-654	4	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-655	5	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-656	6	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-657	7	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO
BM-16-658	8	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	H1N1	NEGATIVO

Límites de referencia (si aplica): NA

Analizado por: María Sol Vaca

Observaciones: NA

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.





AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA
DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DEL AGRO

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP,
Tumbaco - Quito
Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845

PGT/BM/09-FO01

Rev. 4

INFORME DE ANÁLISIS

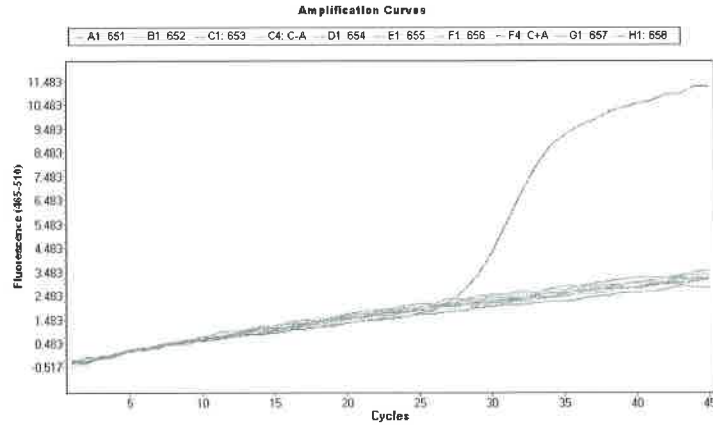
Hoja 2 de 2

Informe N°: LN-BM-116-371

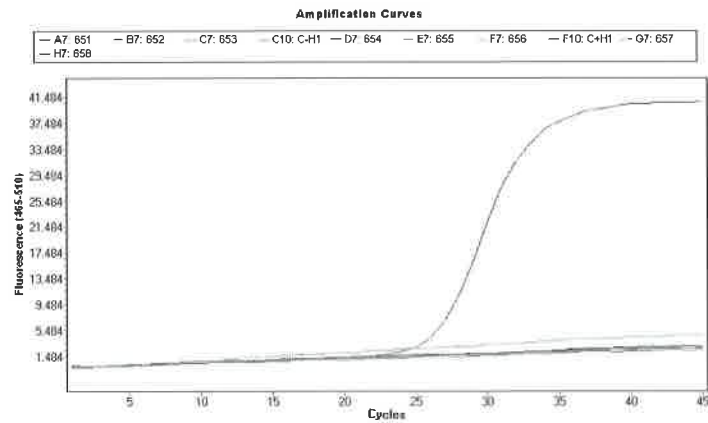
Fecha emisión Informe: 17/05/2016

Anexo Gráficos o Anexo Documentos (si aplica):

INFLUENZA A:



H1N1:



Ing. Ana Garrido
Responsable Técnico
Laboratorio de Biología Molecular



AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA
DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DEL AGRO

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR
TUMBAO - ECUADOR



AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA
DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DEL AGRO

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO ANIMAL

Vía Interoceánica Km. 14½ y Eloy Alfaro, Granja del MAGAP,
Tumbaco - Quito
Teléf.: 02-2372-842/2372-844/2372-845

PGT/DA/09-FO01

Rev. 2

INFORME DE ANÁLISIS

Hoja 1 de 1

Informe N°: LN-CV-lp16-07
Fecha emisión Informe: 24/05/2016

DATOS DEL CLIENTE

Cliente:		Dirección: SANTO DOMINGO
Propietario: DIANA VARGAS		N° de Orden de Trabajo: DA-16-CG1S-1455
Nombre del predio:		Quipux o Factura: 15 M
		Dirección del predio: SANTO DOMINGO
Provincia: TSACHILAS		Cantón: SANTO DOMINGO
Parroquia: SANTO DOMINGO		Especie: PORCINOS
Motivo del análisis: CONVENIO		N° y Tipo de Muestras: 2 LÍQUIDOS ALANTOIDEOS
Fecha de recepción de la muestra: 23/05/2016		Muestreado por: DIANA VARGAS
Fecha de muestreo: 13/01/2016 al 20/05/2016		Diagnóstico solicitado: Hemaglutinación (HA) e Inhibición de la Hemaglutinación (HI)
Fecha de inicio del análisis: 24/05/2016		Fecha de inicio del análisis: 24/05/2016

RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO

TÉCNICAS: HEMAGLUTINACIÓN; INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

MÉTODOS: PEE/CV/03 - PEE/V/09

CÓDIGO MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	EDAD (SEM)	SINTOMATOLOGÍA	RESULTADOS HA INFLUENZA PORCINA		RESULTADOS HI INFLUENZA PORCINA				OBSERVACIONES
				DILUCIÓN	RESULTADO	DILUCIÓN	RESULTADO H1	DILUCIÓN	RESULTADO H3	
CV-p1605-189	CH	ND	ND	1/4096	POSITIVO	1/1024	POSITIVO	SIN HI	NEGATIVO	
CV-p1605-190	CL	ND	ND	1/4096	POSITIVO	1/1024	POSITIVO	SIN HI	NEGATIVO	

Límites de Referencia:

INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (HI)	
DILUCIÓN	RESULTADO
SIN HI	NEGATIVO
CON HI (CUALQUIER DILUCIÓN)	POSITIVO

HEMAGLUTINACIÓN (HA)	
DILUCIÓN	RESULTADO
SIN HA	NEGATIVO
CON HA (CUALQUIER DILUCIÓN)	POSITIVO

Analizado por: Lic. Margoth Barrionuevo

Observaciones:

Anexo Gráficos o Anexo Documentos;

Lic. Margoth Barrionuevo

**Responsable de Laboratorio de Control de Calidad de Vacunas
Diagnóstico Animal**



AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA
DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DEL AGRO
CENTRO TÉCNICO DE SANIDAD ANIMAL
NARRAJO, ECUADOR

24 MAY 2016



AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA
DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DEL AGRO
RECIBIDO
TUMBACO - ECUADOR

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.



Informe N°: LN-BM-I16-035

Fecha emisión Informe: 29/01/2016

DATOS GENERALES

Cliente:		Dirección: NO INFORMA
Propietario: Diana Vargas -		N° de Orden de Trabajo: BM-16-CGLS-0244
Nombre del predio: I		Quipux o Factura: 000015-M
Provincia: Tsachilas		Dirección Predio: El Paraíso
Parroquia: Paraíso		Cantón: Santo Domingo
Motivo del Análisis: Otro		Especie: Porcinos
Fecha de recepción de la muestra: 26/01/2016		N° y Tipo de muestra: 4 muestras de líquido alantoideo
Fecha de muestreo: 13/01/2016		Muestreado por: Diana Vargas
Fecha de inicio del análisis: 26/01/2016		Diagnóstico solicitado: Influenza A-H1N1 – PCR
Identificación del Animal (si aplica): NA		Fecha finalización del análisis: 28/01/2016

RESULTADOS DEL ANÁLISIS

Código o Identificación de la muestra/Método/Técnica/Resultados/Unidades (si aplica):

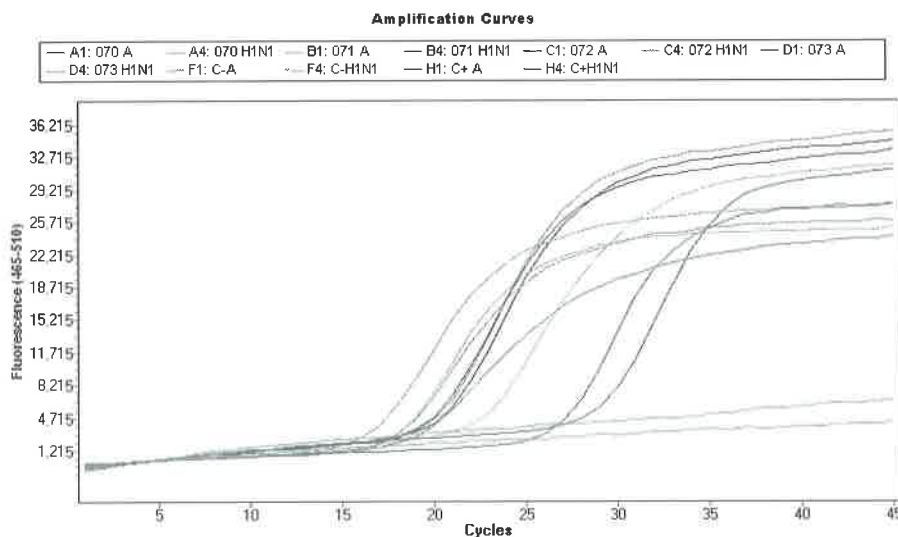
CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	MÉTODO	PARÁMETROS ANALIZADOS	RESULTADOS
BM-16-070	CV-1601-01	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A-H1N1	POSITIVO
BM-16-071	CV-1601-02	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A-H1N1	POSITIVO
BM-16-072	CV-1601-03	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A-H1N1	POSITIVO
BM-16-073	CV-1601-04	Líquido Alantoideo	PEE/BM/04	INFLUENZA A-H1N1	POSITIVO

Límites de referencia (si aplica): NA

Analizado por: María Sol Vaca

Observaciones: No se realizó el análisis para Influenza H3N8, debido a la obtención de resultados positivos para el diagnóstico de Influenza A-H1N1.

Anexo Gráficos o Anexo Documentos (si aplica):



AGROCALIDAD
AGENCIA ECUATORIANA
DE ASEGURAMIENTO
DE LA CALIDAD DEL AGRO
Ing. Ana Garrido
Responsable Técnico
Laboratorio de Biología Molecular

Nota: El resultado corresponde únicamente a la muestra entregada por el cliente en esta fecha. Está prohibida la reproducción parcial o total de este informe sin autorización del laboratorio.