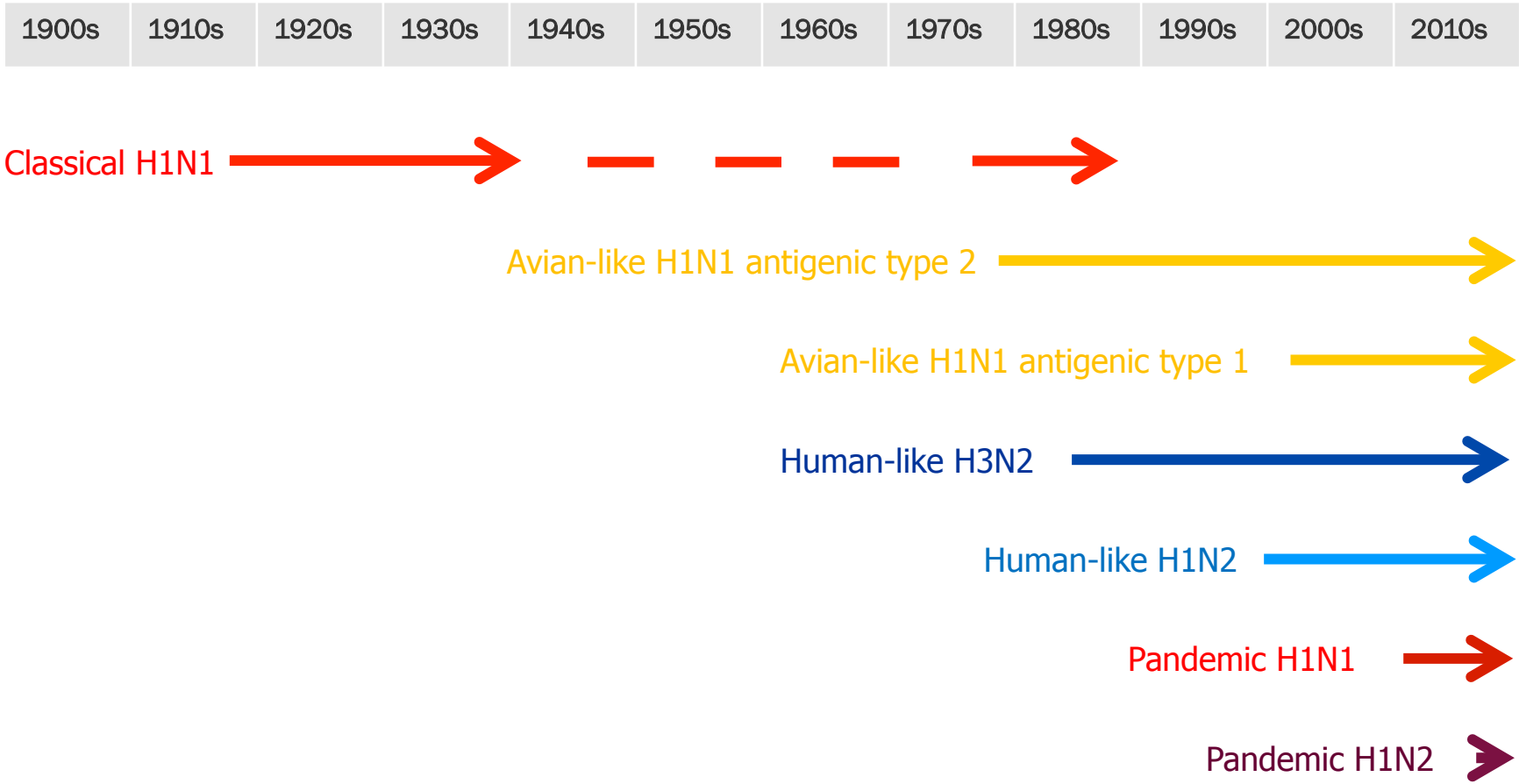
# Guía práctica para el diagnóstico de Influenza porcina

Sergio Barrabes, Veterinario

# CRONOLOGIA aparición SUBTIPOS en PORCINO

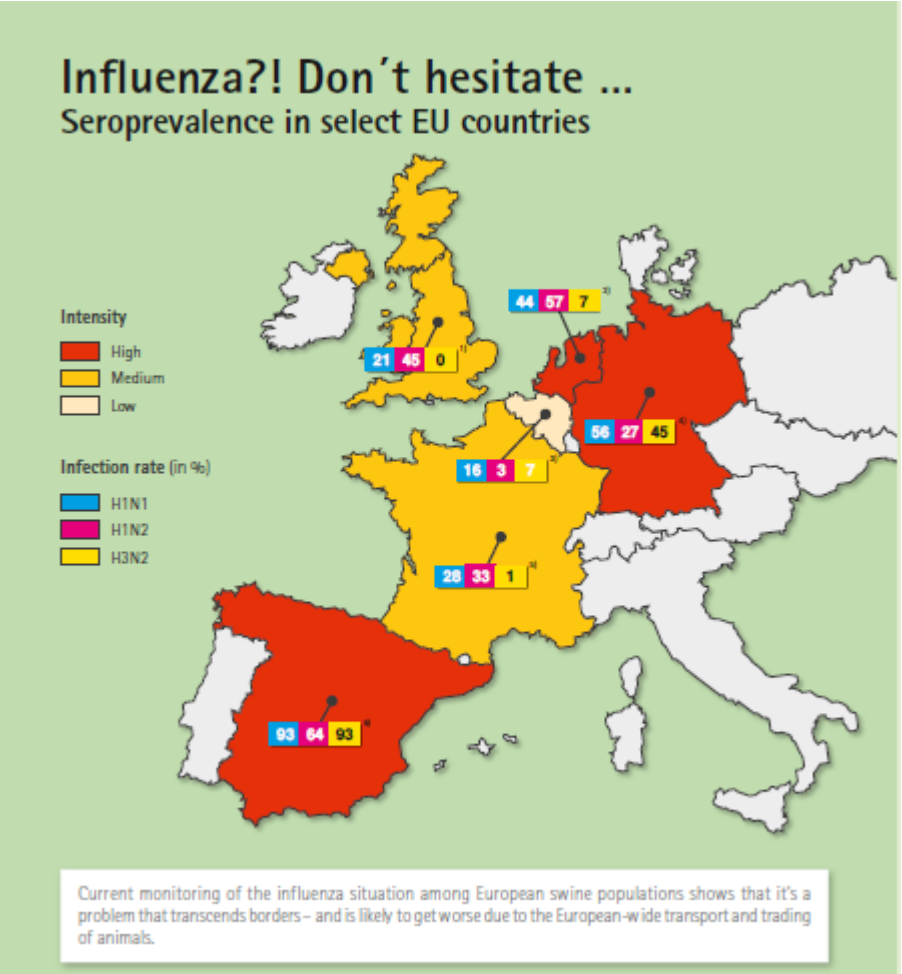
## Europa




Dürrwald/Köchling/Schlegel 2014

# SEROPREVALENCIA en EUROPA

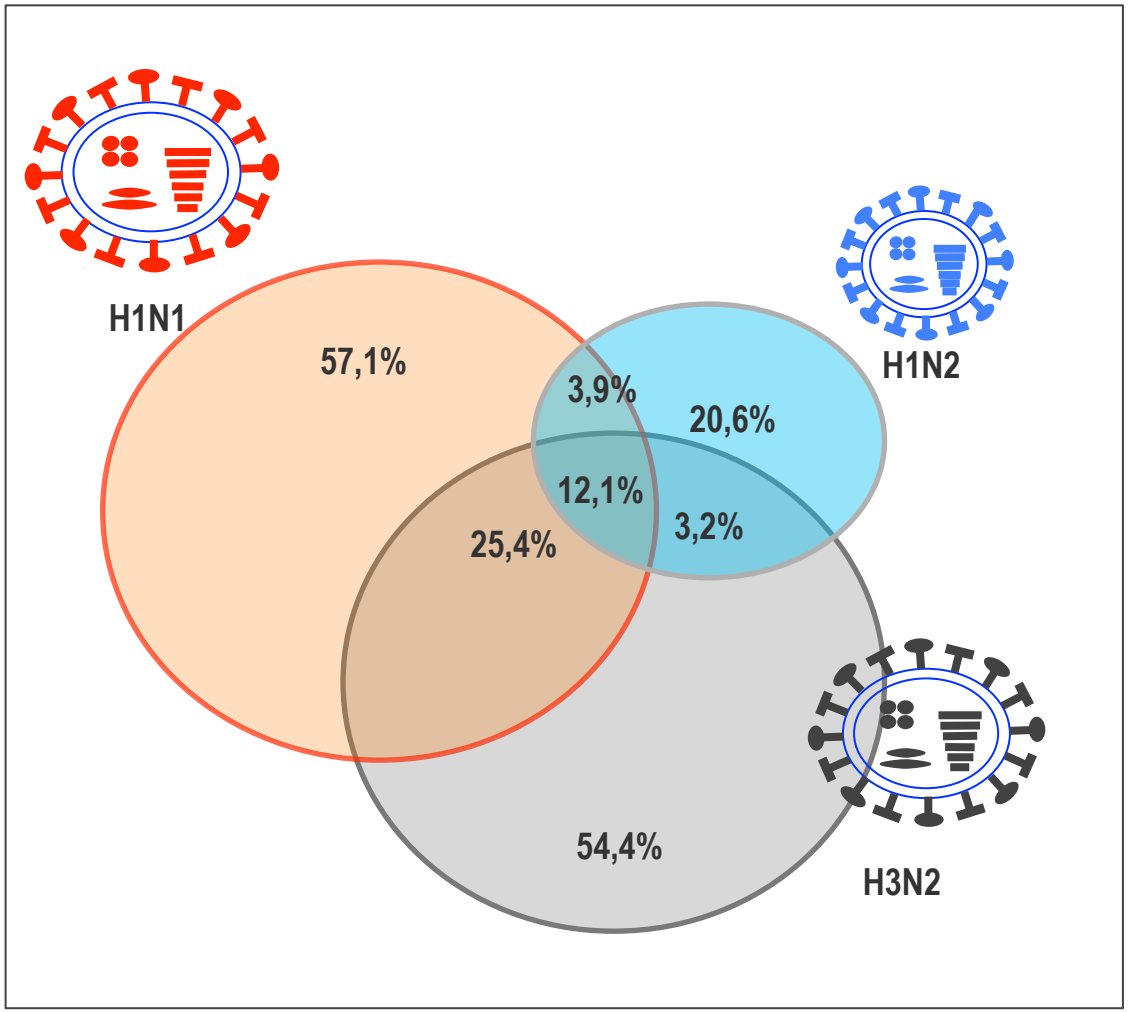
- Principales subtipos en porcino :
  - H1N1 / H1N2 / H3N2.



# ¿Y en ESPAÑA?

1. 98 Granjas: muestra representativa país.
2. 2,151 muestras sangre
   a. 1,302 Cerdas
   b. 849 cerdos engorde

- 94% Granjas +
- 75% Animales +
- 90% cerdas + al menos a 1 subtipo
- 56% cerdos + en 20 semanas




**Simon-Grifé M, Martín-Valls GE, Vilar MJ, García-Bocanegra I, Mora M, Martín M, Mateu E, Casal J.** 2011. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Vet Microbiol*, 149: 56-63.

## Producción moderna : FLUJO constante animales SUSCEPTIBLES

Virus muy cambiante + gran población + alto nº animales susceptibles (alta renovación) + altísima densidad + introducción "nuevos" SIV periódicamente

Virus cambiante:

- Problema control SIV: Circulación simultánea de subtipos y/o cepas genéticamente diferentes → Aparición de la **forma endémica, persistente o recurrente. Aparecen nuevas cepas** debido a re-ordenamientos genéticos (Shift).
- La deriva (drift) antigénica en HA es más lenta en cerdos que humanos. Los **SIV porcinos parece que mutan en regiones menos importantes** para la respuesta inmune.

# Producción moderna : FLUJO constante animales SUSCEPTIBLES

## Subpoblaciones del virus de la influenza en explotaciones porcinas

Gerard Eduard Martín Valls

Imágenes cedidas por el autor

**Resumen**

La circulación del virus de la influenza porcina en las explotaciones porcinas se ha considerado tradicionalmente epidémica, y en un principio creador de una inmunidad que tenderá a limitar su infección. Por el contrario, la dinámica observada en las explotaciones porcinas, con una elevada prevalencia, indica que en la mayoría de los casos los virus de la influenza porcina persisten de forma enzoótica. Este fenómeno se podría explicar por la creación de subpoblaciones de animales susceptibles, con diferentes niveles de protección, que explicaría la persistencia de los virus de la influenza porcina. En este artículo se analizan las causas, el papel de la inmunidad y los posibles abordajes de dicha problemática.

Palabras clave: influenza, prevalencia, subpoblaciones

**Summary**

**Subpopulations of influenza virus in pig farms**

Swine influenza virus (SIV) circulation in swine farms has been traditionally considered epidemical, thus, the creation of immunity into the herd would tend to limit the infection. However, the dynamics observed in modern farms, with a high prevalence, indicate that in the great part of the cases, SIV persist in an enzootic model. This phenomenon could be explained by the creation of subpopulations of suitable animals, with different levels of protection, that could explain the persistence of swine influenza viruses. In this article the causes, role of immunity, and potential control strategies for enzootic SIV infections are described.

Keywords: influenza, prevalence, subpopulations

**Contacto con el autor:** CReSA. Edifici CReSA. Campus UAB. 08193 Bellaterra. Email: gerard.martin@cresa.uab.cat

# Producción moderna : FLUJO constante animales SUSCEPTIBLES

## Poblaciones susceptibles :

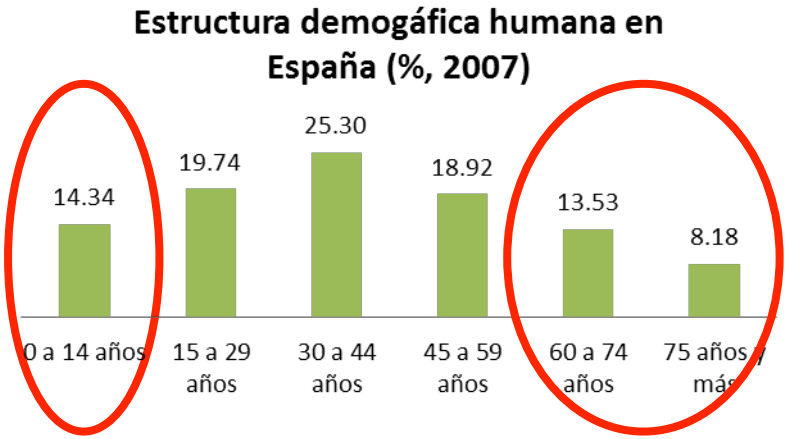
- Alta presencia animales susceptibles:
  - Reemplazos primerizas: ±50%
  - Lechones en maternidad y transición:
    - Granja 1000 cerdas, destete 21d: ±2000 lechones lactando + ±3600 transición

- Los individuos dentro de las poblaciones se infectan en diferentes momentos y llegan a re-infectarse con el mismo virus o cepas diferentes a lo largo de la etapa de producción.

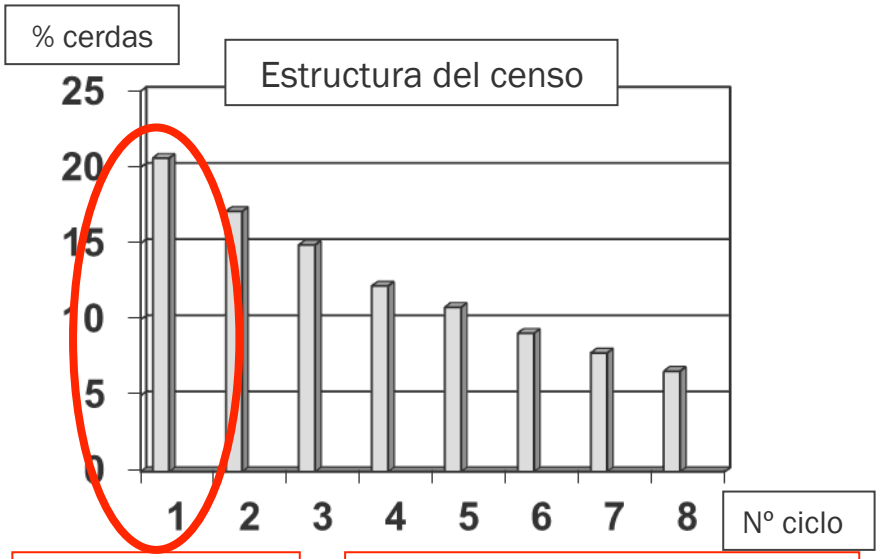
# Circulación ENDEMICA es mas frecuente que EPIDEMICA

Poblaciones susceptibles :

- = 6500 individuos distinta edad / nivel inmunitario / Alojados en espacio muy reducido:
- **Población de elevado riesgo:** 200 primerizas + 5600 lechones = **±90%!!!**
- Granja 3000 cerdas + sitio 2: ± el mismo nº habitantes de Manlleu / Alhama de Murcia / Calatayud / Medina del Campo.




±35% población de elevado riesgo




±20 % primerizas

±90% población de elevado riesgo

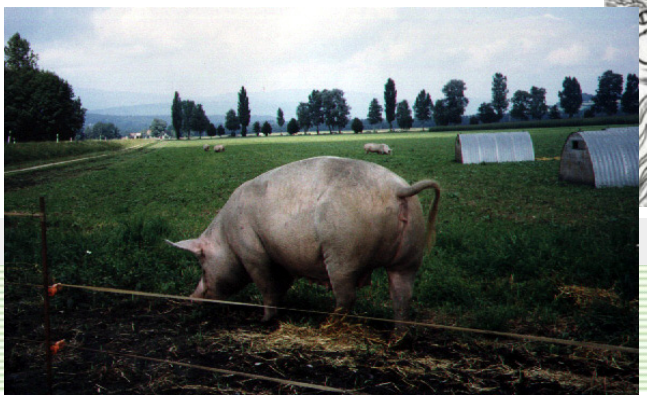
# Circulación ENDEMICA es mas frecuente que EPIDEMICA

Virus muy cambiante + gran población + alto nº animales susceptibles (alta renovación) + altísima densidad + introducción "nuevos" SIV periódicamente

Múltiples fuentes introducción nuevos SIV:

- Contacto con especie humana:
  - Responsable de gran parte de la diversidad genética de SIV en porcino.
- Introducción de cerdas reemplazo
- Aves que acceden a granjas y/o contaminan el agua (papel aves migratorias)
- Transmisión aerógena

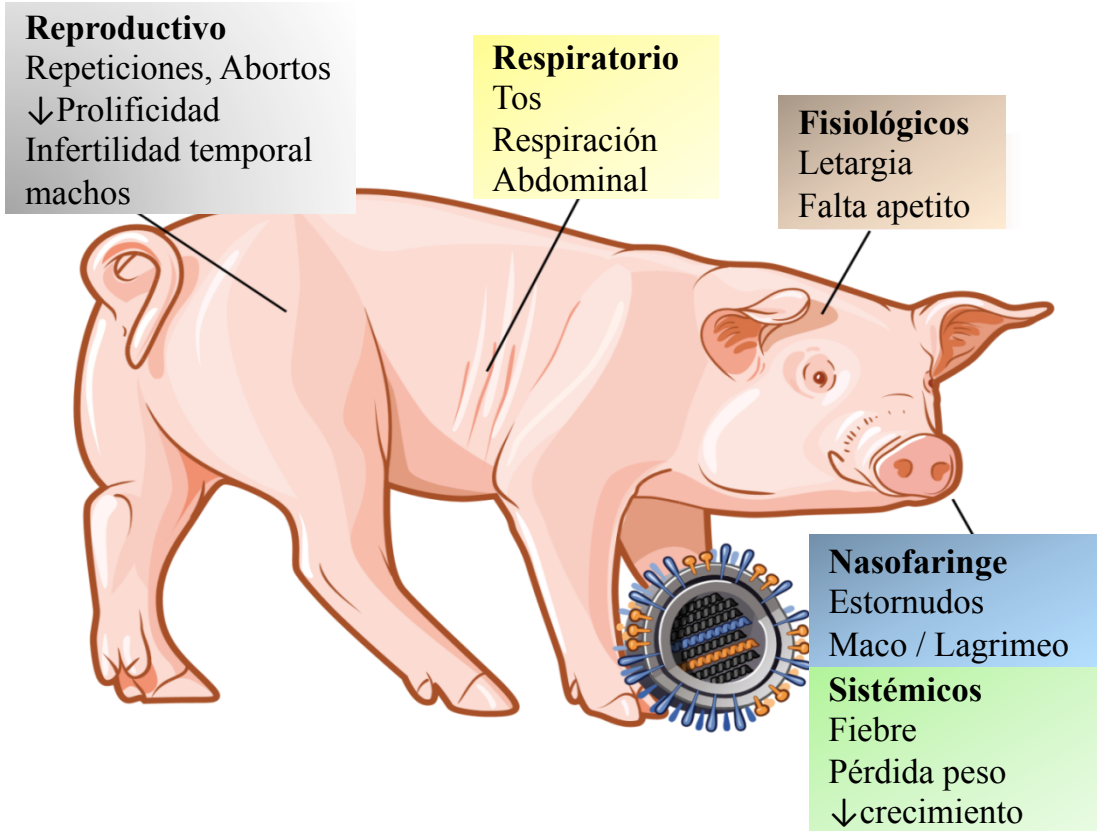
Foto: Razas porcinas.com



# SÍNTOMAS Y PRESENTACIONES: Generalmente INESPECIFICOS

- Forma clásica (epidémica)
  - Todas edades afectadas
  - Fiebre alta (>39.5ºC)
  - Letargia y tos
  - Periódica: otoño-invierno

- Forma persistente (endémica)
  - Signos clínicos poco claros
  - Con o sin fiebre, fallo repoductivo, tos esporádica
  - Problema respiratorio grave en lechones (6-7 semanas vida)
  - Cerdas muertas, abortos; distribución isidiosa en toda la granja
  - Problemas de producción de leche



# Reto DIAGNOSTICO : DETECCIÓN DE VIRUS (PCR)

- PCR permite identificar subtipos
- En Alemania (Friedrich Löffer Institut) también el origen de la HA (humana o aviar)

| Nº BIOFAR | Muestra[1] | Hemaglutinina | | Neuraminidasa | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | H1 | H3 | N1 | N2 |
| 1108001 | s/n | + | - | + | - |

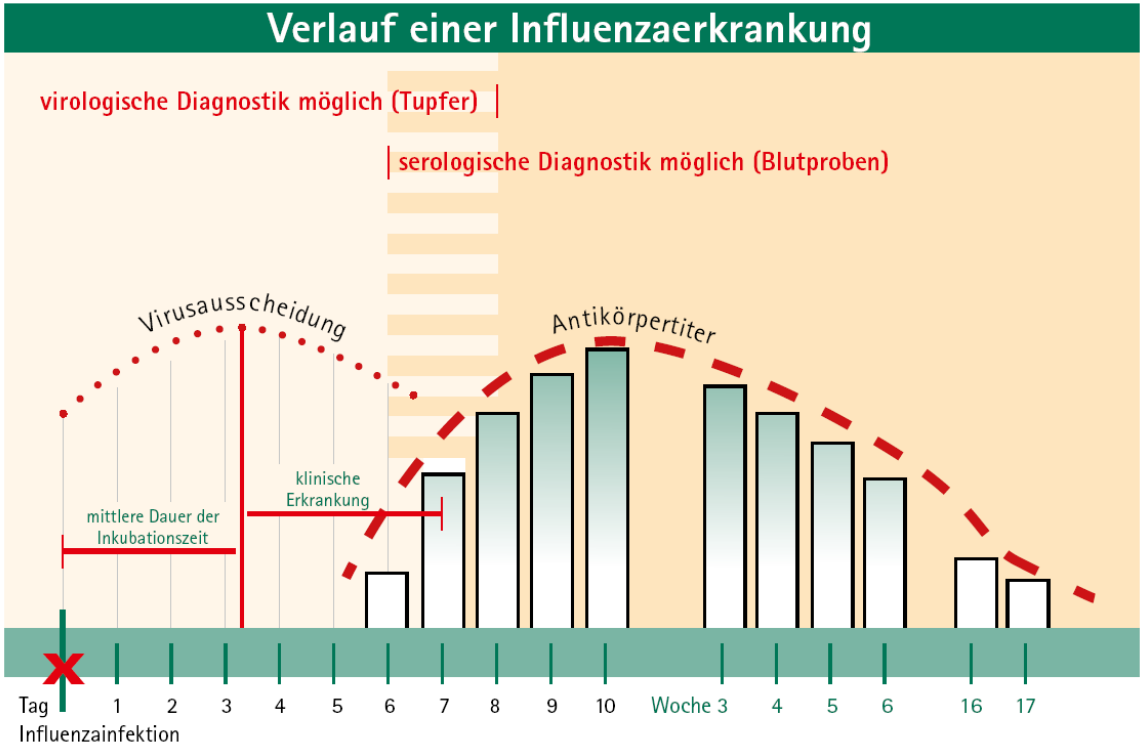
| Specimen | M/NP | H1av | H1pdm | H1[N2] | H3 | N1 | N2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Swab | +++ | ++ | neg | neg | neg | neg | ++ |
| Swab | ++ | ++ | neg | neg | neg | neg | + |
| Swab | +++ | +++ | neg | neg | neg | neg | +++ |
| Swab | +++ | +++ | neg | neg | neg | neg | +++ |
| Swab | ++ | ++ | neg | neg | neg | neg | ++ |

Ej: Caso de H1avN2 que con otras PCR habría sido identificado

# Reto DIAGNOSTICO : DETECCIÓN DE VIRUS (PCR)

<u>En hisopos nasales</u>: Vincula sintomatología - enfermedad.

- Otras muestras: Lavados traqueobronquiales y muestras de pulmón.
- Animales con síntomas agudos (ideal con fiebre: >39.5ºC).
- A >3 días post infección es difícil detectar el virus.



# Reto DIAGNOSTICO : DETECCIÓN DE VIRUS (PCR)

<u>En hisopos nasales</u>: Vincula sintomatología - enfermedad.
Otras muestras: Lavados traqueobronquiales y muestras de pulmón.

- Hisopos con medio especial para virus: tamaño pequeño para <6 Kg / tamaño grande para >6 Kg.
- El mismo escobillón en ambos orificios, introducir profundamente y esperar unos 10 segundos. Si la nariz está muy sucia, limpiar con toallitas.
- Agitar el tubo una vez recogida la muestra.
- Mantener en refrigeración (4ºC).

# Reto DIAGNOSTICO : DETECCIÓN DE VIRUS (PCR)

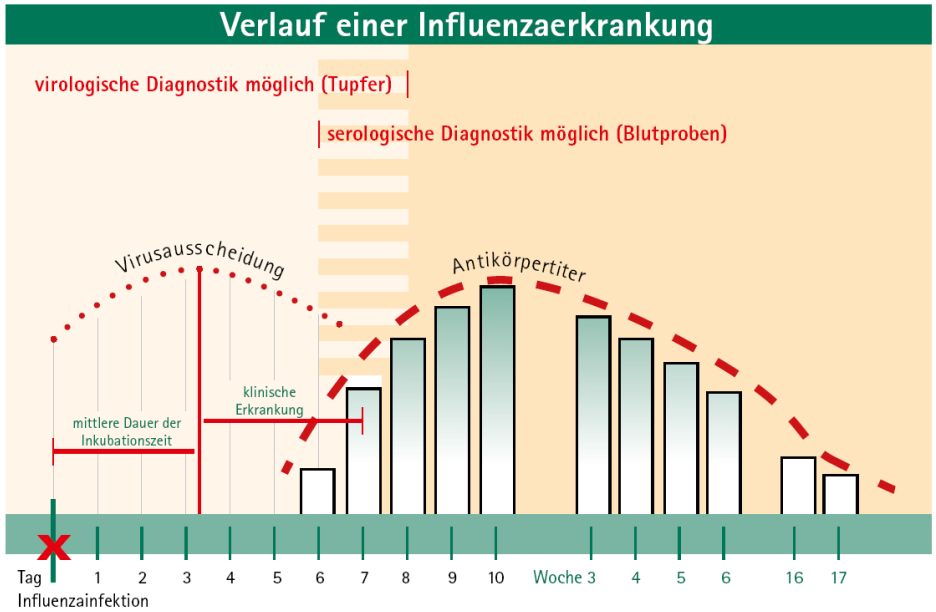
<u>En fluídos orales:</u> Para monitorizar, no siempre vincula síntomas - enfermedad.

- A nivel de la espalda, lejos del comedero y bebedero. Durante 20 - 30 minutos.
- Entreno: Cuerdas con zumo de manzana.
- Muestra más frágil:
  - Contiene inhibidores (Sales / Enzimas / Bacterias) que pueden afectar a la detección por RT-PCR
  - La presencia de baja cantidad de virus puede dificultar la secuenciación o el aislamiento vírico.
  - Refrigerar desde el momento de la obtención. Centifugar o dejar precipitar (en la nevera) y decantar. Envío muy rápido a laboratorio.

# Reto DIAGNOSTICO: Detección de ANTICUERPOS (ELISA)

En transición y lechón lactante es mejor emplear hisopos, porque los resultados de anticuerpos pueden ser muy variables.

**Complementar aislamiento** para acabar de entender qué pasa realmente.




1.ELISA:

- No detecta subtipos presentes, pero es muy sensible a la detección de Ac virales.
- Resultados muy rápidos, (IDEXX 3,5 €)

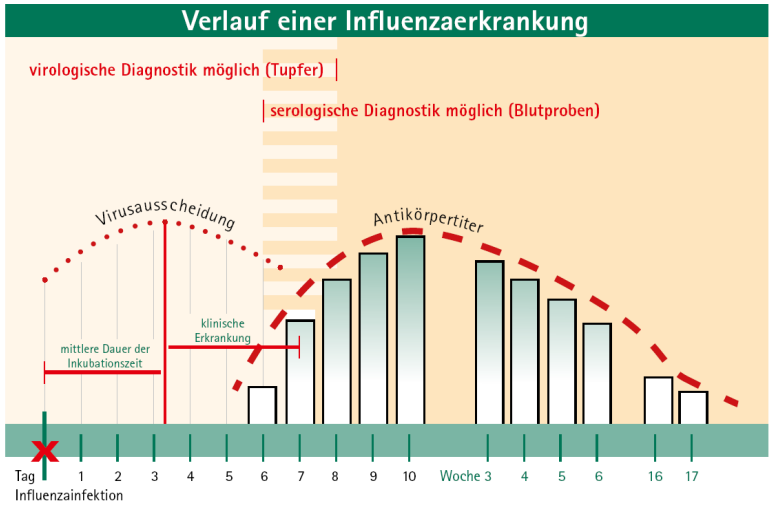
# Reto DIAGNOSTICO: Detección de ANTICUERPOS (IH)

## 2. INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN:

- Determina los subtipos H1N1 tipo 1, H1N1 tipo 2, H1N2, H3N2, H1panN2 y H1panN2.
- 20 Euros en IVD

**Interpretación resultados IH:**

- **Títulos más altos** a mayor concentración Ac, pero también a **mayor homología** cepa presente – empleada en HI.
- **Hay animales más reactivos:** Títulos más altos en todos subtipos a la vez.
- **Muchos animales jóvenes no seroconvierten** tras la contacto / vacunación (los adultos si): Hacer serología lechones de más 56 días.




7-12 días PI: Anticuerpos detectados:
**1 semana: 1:80**
**2-3 semanas: 1:320 – 1:640**
**3-4 meses: Desaparición**

# Reto DIAGNOSTICO: Detección de ANTICUERPOS (HI)

## 2. INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN:

### Interpretación resultados IH:

- **Títulos 1:40** y solo pocos animales con títulos bajos: Rx no específica
  - Inmunidad pasiva se pierde alrededor 6 semanas: Títulos habitualmente bajos (20-40).
- **Títulos 1:80** o más (positivos y específicos):
  - Infección reciente: ≥ 1:320-2560 en mayoría.
- **Títulos ≤1:80**
  - Infección hace tiempo / cepa menos virulenta / cepa que genera menor reacción cruzada con HI.
  - Inmunidad pasiva: Desaparece ±6 semanas; en cerdas vacunadas preparto puede alargar hasta 16 semanas.

| no | Animal ID | Reciprocal titer | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | H1N1 | H1N2 | H3N2 | H1N1 pan. |
| 45 | SV 125 -1 | 0 | 320 | 0 | 20 |
| 46 | -2 | 0 | 320 | 0 | 0 |
| 47 | -3 | 0 | 640 | 0 | 20 |
| 48 | -4 | 0 | 320 | 0 | 0 |
| 49 | -5 | 0 | 640 | 0 | 0 |
| 50 | -6 | 0 | 320 | 0 | 20 |
| 51 | -7 | 40 | 2560 | 0 | 20 |
| 52 | -8 | 80 | 2560 | 20 | 40 |
| 53 | -9 | 40 | 1280 | 0 | 20 |
| 54 | SV125 -10 | 20 | 640 | 0 | 40 |

# Reto DIAGNOSTICO: Detección de ANTICUERPOS (HI)

## 2. INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN:

Interpretación resultados IH: Muestras pareadas

- Seroconversión en muestras pareadas
  - 7-21 d tras exposición: Muy útil sobretodo en cerdas con síntomas.
  - Congelar sangre una vez desuerada y enviar ambas muestras a la vez.
- Elevados títulos 2-3 semanas post síntomas: Muy concluyente.

First sample (20/3/15)

| Examination No. | Identification of animal | avH1N1 antigen type 2 | av H1N1 antigen type 1 | huH1N2 | huH3N2 | panH1N1 | panH1N2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 15/7880-1 | v. 20-3-15 5063 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 15/7880-2 | v. 20-3-15 4836 | 80 | 40 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 15/7880-3 | v. 20-3-15 4789 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 15/7880-4 | v. 20-3-15 4783 | <20 | 20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 15/7880-5 | v. 20-3-15 4705 | <20 | 20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 15/7880-6 | v. 20-3-15 921 | 40 | 80 | <20 | 80 | <20 | 20 |
| 15/7880-7 | v. 20-3-15 1548 | <20 | 20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 15/7880-8 | v. 20-3-15 1549 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 15/7880-9 | v. 20-3-15 1571 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |
| 15/7880-10 | v. 20-3-15 S/N | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |

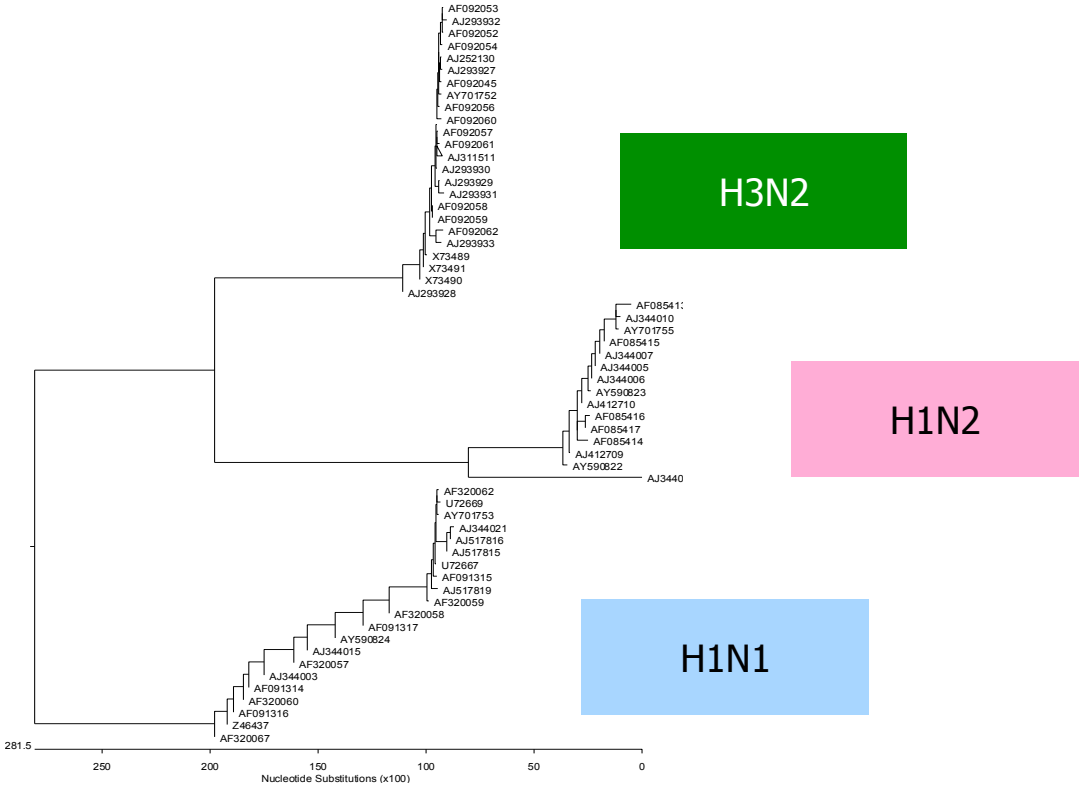
Second sample (13/4/15)

| Examination No. | Identification of animal | avH1N1 antigen type 2 | av H1N1 antigen type 1 | huH1N2 | huH3N2 | panH1N1 | panH1N2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 15/7880-11 | v. 13-4-15 5063 | 40 | 40 | 80 | 40 | <20 | <20 |
| 15/7880-12 | v. 13-4-15 4836 | 160 | 320 | 40 | 160 | <20 | 40 |
| 15/7880-13 | v. 13-4-15 4789 | 20 | <20 | 40 | 20 | <20 | <20 |
| 15/7880-14 | v. 13-4-15 4783 | 160 | 1280 | 160 | 80 | 40 | 40 |
| 15/7880-15 | v. 13-4-15 4705 | 80 | 160 | 80 | 80 | <20 | 40 |
| 15/7880-16 | v. 13-4-15 921 | 40 | 160 | 40 | 160 | <20 | 20 |
| 15/7880-17 | v. 13-4-15 1548 | 40 | 80 | 320 | 80 | <20 | 20 |
| 15/7880-18 | v. 13-4-15 1549 | 20 | 80 | 80 | 40 | <20 | 20 |
| 15/7880-19 | v. 13-4-15 1571 | 20 | 80 | 80 | 40 | <20 | <20 |
| 15/7880-20 | v. 13-4-15 S/N | 80 | 640 | 320 | 80 | 20 | 80 |

| Nº BIOFAR | Muestra(1) | Hemaglutinina | | Neuraminidasa | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | H1 | H3 | N1 | N2 |
| 0817002 | 2-1 | + | - | - | + |

# ANÁLISIS: SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

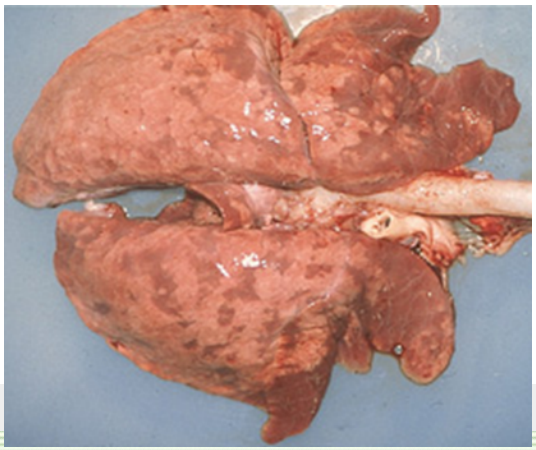
- Determinar la secuencia genética para realizar un análisis filogenético y determinar la evolución del virus / introducción de nuevos virus.
- 200 Euros



# ANÁLISIS: HISTOPATOLOGÍA

HISTOPATOLOGÍA (pulmón):

- En muestras fijadas o frescas.
- Lesiones macroscópicas:
  - Áreas poligonales (lóbulos hundidos), de color rojo oscuro, y firmes al tacto.
  - Exudado inflamatorio + células necróticas: Bloquean las vías respiratorias menores: Colapso de los alveolos que rodean a los bronquiolos: **Atelectasia lobular, enfisema**,
- Determinación de lesiones características (necrosis del epitelio de las vías respiratorias: **bronquiolitis necropurulenta / neumonía broncointersticial**).



1. ¿Existen animales con síntomas clínicos claros? (fiebre, disnea, tos, descarga nasal, inapetencia, aborto, repeticiones acíclicas)

NO

SI

SEROLOGÍA (IH)
1 Kit tubos

Escobillón nasal o pulmón 1 kit swabs

ANATOMÍA PATOLÓGICA
Pulmón: Si se sospechan otros patógenos

2. ¿Desea una imagen o una evolución del status inmunitario?

SIMPLE

PAREADA

Da información sobre subtipos presentes y homogeneidad inmunidad.
±3 semanas después de síntomatología: títulos altos.
Precaución en animales jóvenes, En lechones muestreos transversales en lechones da información sobre la duración de la inmunidad maternal y momento de infección)??

Da información sobre subtipos y relaciona la aparición de un problema con la observación de seroconversión. Muy útil en reproductoras para relacionar problemas reproductivos. También puede practicarse en lechones en crecimiento.
•*Primera muestra hasta 1 semana después de inicio sintomatología
Desuerar y congelar a -20ºC
•* Nueva toma mismos animales a los 15-21 días y enviar juntas para analizar al mismo tiempo

## Hoja de remisión de muestras para determinación de Virus Influenza/Gripe porcina

*Por favor, envíe esta hoja rellenada con las muestras para su correcta determinación*

**Destinatario**

Prof. Dr. Timm Harder

Institut für Virusdiagnostik,
Friedrich-Loeffler-Institute

Federal Research Institute
for Animal Health

Suedufer 10
17493 Greifswald-Insel Riems

GERMANY

**Veterinario**

Dirección o sello

País

E-mail

**Granja**

Dirección o sello

País

E-mail

**Muestras**

| No. | Número Animal | Tipo de muestra* |
|---|---|---|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | | |
| 7 | | |
| 8 | | |
| 9 | | |
| 10 | | |

| No. | Número Animal | Tipo de muestra* |
|---|---|---|
| 11 | | |
| 12 | | |
| 13 | | |
| 14 | | |
| 15 | | |
| 16 | | |
| 17 | | |
| 18 | | |

*Por favor, indique el tipo y edad de cada animal

**Descripción del Caso** (indicar si procede)

| | Fiebre | Tos | Anorexia |
|---|---|---|---|
| Cerdas/Primerizas | | | |
| Transición/Destete | | | |
| Engorde | | | |

Vale N.º IVDI_001_ES

## Vale diagnóstico Serológico

por un valor de 200,00 € para el diagnóstico de la Influenza porcina

Determinación de anticuerpos en el suero contra los subtipos de influenza
H1N1, H1N2, H3N2 y pan H1N1 mediante HAH [1]

**Destinatario:**

IVD GmbH
Heisterbergallee 12
30435 Hannover
GERMANY

**Remitente (veterinario):**

Dirección o sello

**Población:**

Dirección o sello

Fecha de la toma de la muestra de sangre: _____

**Muestras** [2]

| N.º | Datos del grupo de edad muestreada* |
|---|---|
| 1 | |
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |

*Cerda (primeriza o multípara), lechón (lactante o transición), lechón de engorde (fase inicial, media o final)

**Situación de la población** (márquese con una X el cuadro que corresponda)

| | Fiebre | Tos | Pérdida de apetito | Cerdas vacías | Abortos | Lechones débiles | Otros |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cerdas | | | | | | | |
| Lechón de transición | | | | – | – | – | |
| Engorde | | | | – | – | – | |

Tenga en cuenta las explicaciones/indicaciones en el dorso.

Lugar y fecha

Firma veterinario [3]

IDT

# !Muchas Gracias por su Atención!