



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**TITULO DEL TRABAJO: INFECCIÓN POR VIRUS DE INFLUENZA EN EL CERDO:
ESTUDIOS SEROEPIDEMIOLÓGICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS E
INMUNOHISTOQUÍMICOS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

AUTOR: PIÑEYRO PIÑEIRO, Pablo Enrique

DIRECTOR: PERFUMO, Carlos Juan

CO – DIRECTOR: QUIROGA, María Alejandra

LUGAR DE TRABAJO

**Instituto de Patología Dr. Bernardo Epstein, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata**

MIEMBROS DEL JURADO

GIMENO, Eduardo

SPÄTH, Ernesto

GALOSI, Cecilia

2012

Este trabajo de tesis esta dedicado a mi familia:

A mi esposa María Matilde, sin tu apoyo y dedicación este trabajo no hubiese sido posible. Gracias por tu sacrificio, y por ser mi compañera en este camino.

A mi madre y hermanas: Susana, Camila y Soledad. Gracias por su sacrificio y amor.

Este trabajo esta dedicado a la memoria de viejo, José Piñeyro

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis es la culminación del esfuerzo de mucha gente. Circunstancialmente soy el responsable de la recopilación de los datos y de plasmarlos en este manuscrito, pero este no hubiese sido posible sin la colaboración y el esfuerzo de muchísima gente de la cual voy a estar eternamente agradecido. Durante el desarrollo de esta tesis he tenido la suerte de encontrarme con mucha gente generosa que ha sabido compartir con migo su tiempo y sus conocimientos, para todos ellos es este trabajo de tesis.

Quisiera agradecer enormemente a mis directores los Dres. Profesor Carlos Perfumo y Profesora María Alejandra Quiroga. Sin su apoyo, consejos y su dirección esto no hubiese sido posible. Gracias por toda su paciencia y por haber depositado su confianza en mí.

A los miembros del jurado, Dres. Gimeno, Späth, y Galosi, los cuales desde el desarrollo del plan de tesis me dedicaron su tiempo, su conocimiento y me aconsejaron para enriquecer este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Julio Idiart el cual me permitió formar parte de su grupo de trabajo, por brindarme el ambiente necesario para el desarrollar esta tesis, y por su apoyo en mi carrera como patólogo.

A todos mis compañeros del Instituto de Patología, por soportar, y hasta incluso animarse a acompañarme a realizar algunas de mis locas ideas, especialmente a Mónica Diessler, Javier Cappuccio, y Mariana Machuca.

Los Dres. Héctor Patullo y Gerardo Leotta han sido una parte importante en el desarrollo de este trabajo. Agradezco, no solo su gran aporte intelectual y técnico en el diseño, desarrollo y planificación del mismo, sino también por brindarme su amistad. Gracias Hetitor y Leotus sin ustedes nunca me hubiese encontrado hoy escribiendo estos agradecimientos.

A las dos personas que me mostraron desde muy temprano en mi carrera de grado el camino de la docencia y de la investigación, a mi primera Profesora Dra. Negra Alonso, y a la Dra. Sara Williams.

Mucha gente que sin darse cuenta ha colaborado en este trabajo, muchas veces tan solo compartiendo su tiempo y escuchándome hablar de mi sueño. A mis grandes amigos de la vida, Gonzalo, Víctor, Mauro, Federico, y Héctor.

Numerosos laboratorios me han abierto sus puertas durante mi trabajo de tesis y no puedo dejar de agradecer a los responsables de cada unos de ellos. Dra. Cecilia Venturini (Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP), Dra. Gabriela Giacoboni, Dr. German Vigo, Dra. Fabiana Moredo (Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, FCV, UNLP), Dra. Susana Jurado (Servicio Central de Microscopia Electrónica, FCV, UNLP), Dra. Lucila Venturini (Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, FCV, UNLP), Dra. Elsa Baumeister (Servicio Virosis Respiratorias. Inst. Nac. de Enf. Infecciosas - ANLIS "C. G. Malbrán"), Dra. Rosa de Benedetti, Dr. Ramón Sanguinetti (GELAB-SENASA). Quisiera agradecer muy especialmente al Dr. Ariel Pereda (Instituto de Virología, CNIA *INTA*, Castelar) el cual no solo me abrió las puertas y me cedió un espacio para poder desarrollar este trabajo en su laboratorio, sino por confiar en este proyecto desde el principio.

Quisiera agradecer a las personas que me ayudaron con los distintos análisis estadísticos, Sahra Lilina Burns (Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP), y Gabriela Carolina Marquez Betz (Animal and Poultry Sciences, Virginia Tech University).

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin la colaboración de numerosos Veterinarios clínicos, consultores y especialmente dueños de establecimientos los cuales me

permitieron ingresar a sus establecimientos. Quisiera agradecer al Ingeniero Claudio López Chaparro y al Dr. Carlos de la Torre los cuales apoyaron este proyecto. No tengo suficientes palabras de agradecimiento para con el Dr. Santiago Capalbo, por los miles de km que hemos compartido durante este trabajo, los cuales me dieron la oportunidad de conocer un excelente Veterinario y una excelente persona.

Finalmente un agradecimiento especial a mi familia la cual siempre me soportó, toleró y acompañó durante este largo camino. A mis hermanas, Camila y Soledad por su incondicional cariño. Agradecimiento a mis viejos que me enseñaron que con trabajo duro, no hay sueños imposibles.

Gracias a María Matilde, por acompañarme y muchas veces empujarme para llegar al objetivo. Gracias por tu aguante ya que gran parte del tiempo dedicado a este trabajo debió ser tuyo.

**CITAS BIBLIOGRAFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES
PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS**

TRABAJOS PUBLICADOS

1. Cappuccio J, Pena L, Dibárbora M, Rimondi A, **Piñeyro P**, Insarralde L, Quiroga MA, Machuca M, Craig MI, Olivera V, Chockalingam A, Perfumo CJ, Pérez DR, Pereda A. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a noncontemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. J Gen Virol. 2011 Aug 17. [Epub ahead of print]
2. A Pereda, **P Piñeyro**, A Bratanich, MA Quiroga, D Bucafusco, MI Craig, J Cappuccio, MA Machuca, A Rimondi, M Dibárbora, HR Sanguinetti, CJ Pefumo. Genetic Characterization of Porcine Circovirus Type 2 from Pigs with Porcine Circovirus Associated Diseases in Argentina. ISRN Veterinary Science, vol. 2011, Article ID 560905, 6 pages, 2011. doi:10.5402/2011/560905
3. **P.E. Piñeyro**, E. Baumeister, J.A. Capuccio, M.A. Machuca, M.A. Quiroga, T. Tedoroff, C.J. Perfumo. Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002: evaluación mediante inhibición de la hemaglutinación y ELISA. Revista Argentina de Microbiología 2010, **42**(2):98-101.
4. **Piñeyro PE**, Quiroga MA, Perfumo CJ. Infección por el virus de influenza en el cerdo: una actualización. Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria. Argentina. 2007, **88** (1): 14-24.

TRABAJOS ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION

1. **PE. Piñeyro**, JA. Cappuccio, SL. Burns, MA. Quiroga, MF. Arturi, MA. Machuca, CJ. Perfumo. Frequency of clinical signs, gross and microscopic lesions in postweaning multisystemic wasting syndrome/porcine circovirus-associated diseases: A logistic regression model for the selection of predictive histopathological lesions. *Pesquisa Veterinária Brasileira (Brazilian Journal of Veterinary Research)*. 2011.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTIFICAS

1. Pereda A, **Piñeyro P**, Bratanich A, Quiroga M, Craig MI, Cappuccio J, Machuca M, Rimondi A, Sanguinetti R, Perfumo C. Genotipificación de circovirus tipo 2 a partir de muestras de cerdos con cuadros de enfermedades asociadas a circovirus. *Memorias del X congreso nacional de producción porcina*. 2010. Mendoza Argentina. pp 251.
2. **Pablo E Piñeyro**, Santiago Capalbo, Javier Cappuccio, Hector Patullo, Ariel Pereda, Maria A Quiroga, Mariana A Machuca, Carlos J Perfumo. An Assessment of Clinical and Subclinical Infections in 10 Argentinean Farms. *Proceeding of 20th International Pig Veterinary Science Congress (IPVS)*. 2008. Durban, South Africa. P05.005
3. **Piñeyro P E**, Burns S, Capalbo S, Cappuccio J, Patullo H, Quiroga M A, Machuca M A, Perfumo C J. Estudio de la correlación entre los perfiles serológicos contra cuatro agentes que producen infecciones respiratorias con las lesiones en frigorífico y la ganancia diaria de peso. *IX Congreso Nacional de Producción Porcina*. 2008. San Luis, Argentina. pp 195.

4. **Piñeyro P**, Pereda A, Quiroga MA, Cappuccio JA, Machuca MA, Perfumo CJ. Comparación entre las técnicas de inmunohistoquímica y PCR para la detección de circo virus porcino tipo 2 en linfonódulos. VI° Reunión Argentina de Patología Veterinaria (RAPAVE) y II° Seminario de la Subdivisión Argentina de la Fundación Charles Louis Davis. 2008. Corrientes, Argentina.
5. Pereda A, **Piñeyro P**, Quiroga MA, Cappuccio JA, Machuca MA, Perfumo CJ. Estudio de epidemiología molecular de casos de campo de Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Post-destete (SMAP). IX Congreso Argentino de Virología. 2008. Buenos Aires, Argentina.
6. **PE Piñeyro**, JA Capuccio, SL Burns, MA Machuca, MA Quiroga, CJ Perfumo. Frequency of clinical signs, gross and microscopic lesions in PCV-2 associated diseases. A multivariate discriminant function for the election of predictive microscopic lesions. 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease. 2007. Cracovia, Polonia. pp 97.
7. **PE Piñeyro**, JA Capuccio, MA Machuca, MA Quiroga, E Baumeister, CJ Perfumo. Seroprevalence in fattener pigs in Argentina, evaluated by inhibition of hemagglutination (HI) test and ELISA test. 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease. 2007. Cracovia, Polonia. pp 252.

8. **Piñeyro, P.** Influenza Porcina: Técnicas para su diagnóstico. XVI Reunión científico técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios Diagnóstico. 2006. Mar del Plata, Argentina. pp 28-30.
9. **Piñeyro, P.E.**; Capuccio, J. A.; Machuca, M.A Quiroga, M. A.; Baumeister, E. Perfumo, C. J. Influenza Virus Surveillance in Fattening Pigs in Argentina. Statistical Comparison of Hemagglutination Inhibition Test and ELISA Results Using Different Antigen Sources. Proceeding 19th International Pig Veterinary Science (IPVS). 2006. Copenhagen, Dinamarca. Vol 2 pp 128.
10. **Piñeyro, PE.** Quiroga, MA. Cappuccio, JA. Machuca, MA. Ramos Vara, J. Perfumo, CJ. Neumonía Necrótica Proliferativa: Patología e identificación de virus por técnicas de inmunohistoquímica y microscopía electrónica. V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. 2006. Córdoba, Argentina. pp 286.
11. **Piñeyro, PE.** Cappuccio, JA. Quiroga, MA. Machuca, MA. Teodoroff, TA. Baumeister, E. Perfumo, CJ. Prevalencia serológica del virus de influenza en Argentina en cerdos de engorde mediante las pruebas de ELISA e inhibición de la hemaglutinación. V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. 2006. Córdoba, Argentina. pp 287.
12. Cappuccio, JA, **Piñeyro, PE**, Quiroga, MA, Machuca, MA, Perfumo, CJ. Frecuencia de lesiones macro y microscópicas asociadas a cuadros de síndrome multisistémico de adelgazamiento post-destete. V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. 2006. Córdoba, Argentina. pp 289.

13. Quiroga, MA. Cappuccio, JA. **Piñeyro, PE**. Machuca, MA, Perfumo, CJ. Identificación de circovirus porcino tipo 2 asociado a cuadros de neumonía. V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. 2006. Córdoba, Argentina. pp 288.

14. Teodoroff, TA.; **Piñeyro, P.**; Pecoraro, MR; Baumeister, E.; Cappuccio, J.; Perfumo, CJ. Seroprevalence of H1 and H3 influenza virus in fattening pigs from Argentina. II Congreso Latinoamericano de Suinicultura, Foz do Iguaçu. 2004. PR Brasil. pp.502.

INDICE DE CONTENIDOS

Resumen	1
Summary	3
1. INTRODUCCION	5
1.1.1. Clasificación y estructura del genoma	8
1.1.2. Ciclo de replicación viral	11
1.1.3. Reservorios	13
1.1.4. El rol de los hospedadores intermediarios en el desarrollo de la infección	14
1.1.5. Epidemiología en el cerdo	21
1.1.6. Signos clínicos y lesiones	22
1.1.7. Respuesta inmune y cinética de los anticuerpos	26
1.1.8. Diagnóstico	27
1.2. Brote de influenza porcina causado por una cepa de influenza humana H3N2 no contemporánea	35
2. OBJETIVOS	38
2.1. OBJETIVOS GENERALES	39
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	39
2.3. HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES	40
3. MATERIALES Y METODOS	42
3.1. Estudio retrospectivo: Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante el año 2002. Estudio etiológico en pulmones con lesiones compatibles con neumonía necrótica porcina	43
3.1.1. Estudio serológico.	43
3.1.2. Estudio etiológico	43

3.1.3. Prueba de IHA _____	44
3.1.4. Prueba de ELISA _____	44
3.1.5. Análisis estadístico _____	45
3.1.6. Estudios histopatológico, inmunohistoquímico y de microscopía electrónica _____	45
3.1.7. Estudio bacteriológico _____	46
3.2. Estudio longitudinal prospectivo para la determinación de agentes causales de enfermedades respiratorias en 10 establecimientos porcinos de producción intensiva ____	47
3.2.1. Estudio epidemiológico _____	47
3.2.2. Diseño experimental _____	48
3.2.3. Estudios serológicos _____	49
3.2.4. Estudios anatomopatológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos _____	50
3.2.5. Estudios bacteriológicos _____	53
3.2.6. Estudios moleculares _____	54
3.2.7. Análisis estadístico _____	56
3.3. Brote de influenza porcina causado por una cepa de influenza humana H3N2 no contemporánea _____	57
3.3.1. Descripción del establecimiento _____	57
3.3.2. Descripción clínica _____	58
3.3.3. Estudios anatomopatológicos, histopatológicos y etiológicos _____	58
3.3.4. Identificación viral _____	60
3.3.5. Aislamiento viral _____	61
3.3.6. Análisis genético y caracterización filogenética _____	61
3.3.7. Estudios serológicos _____	62
4. RESULTADOS _____	63
4.1. Estudio retrospectivo: prevalencia serológica del virus de Influenza A en cerdos en Argentina durante el año 2002 _____	64

4.2. Estudio retrospectivo: estudio etiológico en pulmones con lesiones compatibles con neumonía necrótica porcina	64
4.3. Estudio longitudinal prospectivo para la determinación de agentes causales de enfermedades respiratorias en 10 establecimientos porcinos de producción intensiva	66
4.3.1. Estudio epidemiológico	66
4.3.2. Estudio anatomopatológico	69
4.3.3. Estudio serológico	70
4.3.4. Estudios inmunohistoquímicos y bacteriológicos	71
4.3.5. Análisis de factores de riesgo y estudio de la correlación entre los perfiles serológicos, contra cuatro agentes que producen infecciones respiratorias, con las lesiones en frigorífico y la ganancia diaria de peso	71
4.4. Brote de influenza porcina causado por una cepa de influenza humana H3N2 no contemporánea	73
4.4.1. Hallazgos anatomopatológicos histopatológicos y de inmunohistoquímica	73
4.4.2. Aislamiento en cerdos y caracterización de una cepa humana de influenza A subtipo H3N2 no contemporánea	75
4.4.3. Estudios serológicos	75
5. DISCUSION	77
5.1. Estudio retrospectivo: Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante el año 2002. Estudio etiológico en pulmones con lesiones compatibles con neumonía necrótica porcina	78
5.2. Estudio longitudinal prospectivo para la determinación de agentes causales de enfermedades respiratorias en 10 establecimientos porcinos de producción intensiva	82
5.3. Brote de influenza porcina causado por una cepa de influenza humana H3N2 no contemporánea	95

6. CONCLUSIONES	101
7. BIBLIOGRAFIA	112

TABLAS

Tabla 1. Proporción de sueros positivos por las pruebas de IHA y ELISA para los subtipos H1, H3 y H1 + H3	136
Tabla 2. Proporción de granjas positivas por las pruebas de IHA y ELISA para los subtipos H1; H3; H1 + H3	136
Tabla 3. Correlación de Kappa para ambas pruebas a nivel individual y a nivel de granja para H1 y H3	136
Tabla 4. Frecuencia de establecimientos según distintas características de producción	137
Tabla 5. Frecuencia, distribución y cronicidad de signos clínicos respiratorios compatibles con infección por el virus de influenza y de signos sistémicos compatibles con síndrome de adelgazamiento posdestete	138
Tabla 6. Frecuencia de lesiones histopatológicas pulmonares observadas en cada establecimiento	139
Tabla 7. Frecuencia de lesiones histopatológicas en cada establecimiento	140
Tabla 8. Lesiones en frigorífico: número de animales afectados, tipo y extensión de lesiones pulmonares	141
Tabla 9. Estudio inmunohistoquímico para influenza porcina y PCV-2	142
Tabla 10. Agentes bacterianos aislados de pulmones con lesión	142
Tabla 11. Asociación entre variables cualitativas de manejo y seroconversión frente a tres agentes patógenos respiratorios. Modelo univariado	143

Tabla 12. Asociación entre factores de manejo y seroconversión para tres agentes patógenos respiratorios. Modelo lineal generalizado_____	144
Tabla 13. Correlación entre ganancia diaria de peso y edades de seroconversión para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> . Correlación entre lesiones tipo BNC observadas en frigorífico y ganancia diaria de peso_____	144
Tabla 14. Resumen de los hallazgos clínicos, macroscópicos, rRT-PCR y diagnóstico presuntivo en función de los hallazgos macroscópico_____	145
Tabla 15. Resumen de los hallazgos microscópicos y los resultados de la técnica de IHQ_____	145
Tabla 16. Análisis de similitud nucleotídica (BLAST) para los segmentos completos de los genes PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1 y NS y las cepas de influenza A con estrecha relación nucleotídica para cada unos de los genes estudiados_____	146

FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de animales positivos por establecimiento, para los subtipos H1N1 y H3N2 detectados mediante la técnica de IHA _____	148
Figura 2. Distribución intra-granja de TGM observados en animales detectados positivos mediante la técnica de IHA para el subtipo H1N1 _____	148
Figura 3. Distribución intra-granja de TGM observados en animales detectados positivos por la técnica de IHA para el subtipo H3N2 _____	149
Figura 4. Porcentaje de animales positivos por establecimiento, para los subtipos H1N1 y H3N2 detectados mediante la técnica de ELISA _____	149
Figura 5. Hallazgos histopatológicos, neumonía necrótica porcina. Hematoxilina y eosina. Pulmón _____	150
Figura 6A. Hallazgos histopatológicos, neumonía necrótica porcina. Hematoxilina y eosina. Pulmón _____	150
Figura 6B. Hallazgos histopatológicos, neumonía necrótica porcina. Hematoxilina y eosina. Pulmón _____	151
Figura 7. IHQ anti SIV. Pulmón _____	151
Figura 8. IHQ anti PCV2. Pulmón _____	152
Figura 9. IHQ anti PCV2 . Pulmón _____	152
Figura 10. ME Partículas virales. Pulmón _____	153
Figura 11. Esquema de muestreo longitudinal para la determinación de agentes compatibles con infección del virus de influenza _____	154
Figura 12. Distribución de parámetros productivos por establecimiento _____	155
Figura 13. Porcentaje de mortalidad global y para cada etapa de producción a lo largo de un	

año _____	156
Figura 14. Control estadístico de proceso aplicado a valores mensuales de mortalidad en, un ciclo de producción (6 meses) _____	157
Figura 15. Seroprevalencia para <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (A), <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (B) y circovirus porcino tipo 2 (C), por establecimiento, en distintas etapas de producción _____	158
Figura 16A. Hallazgos macroscópicos en cerdos naturalmente infectados con SIV H3N2 _____	159
Figura 16B. Hallazgos macroscópicos en cerdos naturalmente infectados con SIV H3N2 _____	159
Figura 17A. Hallazgos histopatológicos en cerdos naturalmente infectados con SIV H3N2. Hematoxilina y eosina. Pulmón _____	160
Figura 17B. Hallazgos histopatológicos en cerdos naturalmente infectados con SIV H3N2. Hematoxilina y eosina. Pulmón _____	160
Figura 18A. IHQ anti SIV en cerdo naturalmente infectados con SIV H3N2. Pulmón _____	161
Figura 18B. IHQ anti SIV en cerdo naturalmente infectados con SIV H3N2. Pulmón _____	161

PLANILLAS

Planilla 1 _____ 162

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

‰: porcentaje

-: negativo

+: positivo

<: menor a

>: mayor a

±: más/menos

≤: igual o menor a

≥: igual o mayor a

μl: microlitro

μm: micrometro

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: análisis de varianza

App: Actinobacillus pleuropneumoniae

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

ARNv: ácido ribonucleico viral

ATB: antimicrobiano

AV: alveolitis

Avg: promedio

BB: bronquitis/bronquiolitis

BNCS (BNC): bronconeumonía catarral/supurativa

CC: cambios circulatorios

cc: centímetros cúbicos

CDC: Center for Disease Control and Prevention

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CICVyA: Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas

CO₂: dióxido de carbono

dNTP: dinucleótido trifosfato

DO: densidad óptica

dpi: días post infección

DS: desvío standard

EE.UU.: Estados Unidos de Norte América

EID₅₀: Egg Infective Dosage₅₀

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

F: fisuras

FCV: Facultad de Ciencias Veterinarias

g: gramo

GalNAc: *N*-Acetyl-D-galactosamine

gARN: ácido ribonucleico genómico viral

GDP: ganancia diaria de peso

h: hora

HA: hemaglutinina

HE: hematoxilina y eosina

HIS: hibridación *in situ*

IC: intervalo de confianza

IF: inmunofluorescencia directa

IFN- α : Interferón- α :

Ig: inmunoglobulina

IgA: inmunoglobulina A

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

IHA: inhibición de la hemaglutinación

IHQ: inmunohistoquímica

IL-1: interleuquina-1

IL-6: interleuquina-6

IL-8: interleuquina-8

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IP: influenza porcina

k: coeficiente de Choen's Kappa

kg: kilogramo

LCL: límite de control inferior

M: molar

M1: proteína de matriz 1

m²: metro cuadrado

M2: proteína de matriz 2

MC: neumonía catarral complicada

MDCK: Madin Darby canine kidney

mg: miligramo

M. hyopneumoniae (Mh): Mycoplasma hyopneumoniae

min: minuto

ml: mililitro

mm: milímetro

N/D: no determinado

NA: neuraminidasa

NAD: nicotinamida adenina dinucleotido

NEP: neumonía enzoótica porcina

nM: nanomol

nm: nanómetro

NNP: neumonía necrótica proliferativa

NS1: proteína no estructural 1

NS2: proteína no estructural 2

nt: nucleótido

°C: grado centígrado

OIE: Oficina Internacional de Epizootia

OR: *Odds ratio*

ORF: Marco abierto de lectura "Open readign frame"

P. m. multocida: Pasteurella multocida multocida

P. multocida: Pasteurella multocida

PA: polimerasa A

pb: par de bases

PB1: polimerasa B1

PB2: polimerasa B2

PBS: solución de buffer fosfato

PCR/ RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa/transcripción reversa de la PCR

PCV-2: circovirus porcino tipo 2

PL (PLC): pleuroneumonía

PLF: pleuritis Fibrinosa

PMSA: agar selectivo para el aislamiento de *P. multocida*

PPLO: pleuro pneumonia-like organisms

PRDC: complejo respiratorio porcino

PRRS: síndrome respiratorio y reproductivo porcino

PRRSv: virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

r: Spearman Correlation Coefficient

rpm: revoluciones por minuto

rRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SENASA-DILACOT: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

Dirección de Laboratorios de Control Técnico.

SIV: virus de influenza porcina

SMAP: síndrome de adelgazamiento multisistémico post destete

spp.: especies

TDTF: todo dentro todo afuera

TGM: título geométrico medio

TNF: factor de necrosis tumoral

TTV: Torque Teno virus

U: unidades

UCL: límite de control superior

UE: Unión Europea

UNLP: Universidad Nacional de La Plata

VI: virus de influenza

X^2 : Chi cuadrado

σ : sigma

INFECCIÓN POR VIRUS DE INFLUENZA EN EL CERDO: ESTUDIOS SEROEPIDEMIOLÓGICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Palabras claves: Influenza porcina, neumonía, inmunohistoquímica, serología, PCR, epidemiología

Resumen

Con el fin de determinar la presencia del virus de influenza en piaras de producción porcina intensivas, de mediana y gran escala, se llevaron a cabo tres estudios independientes. Se realizó un estudio serológico retrospectivo en un grupo de muestras provenientes de 17 establecimientos. Se determinó la presencia de anticuerpos contra influenza serotipos H1N1 y N3N2 a través de las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IHA) y la prueba de ELISA. La prueba de IHA utilizó antígenos contra los serotipos circulantes en la población humana durante el año 2002 y la prueba de ELISA antígenos de subtipos porcinos circulantes en Norte America. Los sueros evaluados a través de la técnica de IHA mostraron un alto porcentaje de establecimientos y animales seropositivos a H3N2 y H1N1. A pesar del bajo porcentaje de sueros positivos detectados con la prueba de ELISA, esta detectó por lo menos un animal positivo por granja. Muestras de pulmón, obtenidas en plantas de faena con lesiones compatibles con bronconeumonía necróticas fueron evaluadas por IHQ y microscopia electrónica. Se observó inmuno marcación en macrófagos alveolares y epitelio respiratorio en cortes por congelación. En los mismos tejidos se pudo observar partículas virales intracitoplasmáticas compatibles con virus de influenza. Se realizó un estudio longitudinal prospectivo en 10 establecimientos de producción intensiva. Se evaluó seroconversion así como la eliminación del agente y la presencia de lesiones

pulmonares compatibles con la infección por el virus de influenza durante un ciclo completo de producción. No se detectaron anticuerpos y no se observó la circulación del virus de influenza durante el periodo en estudio. Sumado a la evaluación de influenza se evaluó la presencia de múltiples agentes que afectan al aparato respiratorio y factores de riesgo que pueden afectar parámetros productivos. La seroconversión contra *Mycoplasma hyopneumoniae* durante la última etapa de producción mostró tener una alta correlación con una alta prevalencia de lesiones pulmonares durante la faena. Sumado a esto se observó que la presencia de estas lesiones tiene un impacto negativo en la ganancia diaria de peso durante la etapa de desarrollo. Se determinaron numerosos factores de riesgo asociados a la presencia de animales seropositivos a PCV-2. Finalmente se realizó un estudio de brote en una piara que presentó un cuadro respiratorio agudo con alta morbilidad y baja mortalidad. A través de estudios anatomopatológicos se observaron lesiones características en patrón de tablero de ajedrez. La marcación con anticuerpos anti-nucleoproteína de influenza mostraron tinción positiva en células epiteliales y macrófagos alveolares. Finalmente las muestras procesadas por rRT-PCR mostraron señal positiva con marcadores universales contra influenza. La eliminación viral fue determinada por la presencia de efecto citopático e infección en embriones de pollo con muestras obtenidas por hisopados traqueales y muestras pulmón de cerdos clínicamente afectados. Se realizó la secuenciación viral observándose que el brote fue debido a la circulación e infección de una cepa H3N2 humana no contemporánea.

SWINE INFLUENZA VIRUS INFECTION: SEROEPIDEMIOLOGICAL STUDIES, ANATOMOPATHOLOGY, IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY.

Key words: Swine influenza, pneumonia, immunohistochemistry, serology, PCR, epidemiology.

Summary

In order to determine the presence of influenza virus in swine intensive production herds of medium and large scale, three independent studies were carried out. A retrospective serological study was performed on samples from 17 farms. The presence of antibodies against H1N1 and H3N2 serotypes was determined by hemagglutination inhibition (HI) test and ELISA test. The HI test used antigens prevalent in the human population during 2002 and the commercial ELISA had swine antigens prevalent in North America. Serum evaluated by HI test showed a high percentage of farms and individual animals positive to H3N2 and H1N1. Even though a low percentage of serums were positive by ELISA test; this test was able to detect at least one positive animal per farm. Those lung samples obtained in slaughterhouses that presented lesions consistent with necrotic bronchopneumonia were evaluated by IHC and electron microscopy. Positive staining was observed in alveolar macrophages and respiratory epithelium. The same specimens showed intracytoplasmic viral particles consistent with influenza virus. A prospective longitudinal study was performed in 10 swine herds. The presence of antibodies, viral shedding and lesions consistent with SIV infection were evaluated for a period of six months. No influenza antibodies or viral shedding was observed during the period of study. In addition to SIV surveillance, the presence of multiple agents causing respiratory disease and multiple risk factors that might affect the production performance, were evaluated. The seroconversion against *Mycoplasma*

hyopneumoniae in the late production stage had high correlation with high prevalence of pulmonary lesion during slaughter. Moreover, the presence of these lesions seems to have a negative effect in average daily gain during the grower period. Several risk factors, associated with the presence of PCV-2 seropositive animals, were determined. Finally, an outbreak of acute respiratory disease with high morbidity but low mortality was evaluated. Gross anatomy showed animals with typical checkerboard pneumonic pattern. Bronchiolar epithelium and alveolar macrophages showed positive immunolabeling against anti-influenza nucleoprotein. Samples evaluated by rRT-PCR with universal primers of influenza showed positive signal. Viral shedding was also determined by the presence of cytopathic effect and infection of chicken embryo after inoculation of tracheal swab and lung samples from affected pigs. The sequence of the isolated virus showed that the outbreak was due to circulation and infection of a non-contemporary human H3N2 strain.

1. INTRODUCCION

1.1. Infección por el virus de influenza en el cerdo: una actualización

La influenza porcina (IP) es una entidad producida por el virus de influenza tipo A, perteneciente a la familia *Orthomixoviridae* y se clasifica en subtipos de acuerdo a las características de dos glicoproteínas superficiales: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). En la actualidad se conocen 16 subtipos distintos de HA y 9 subtipos de NA (Kim y col., 2006).

El virus de influenza A ha sido aislado de aves y mamíferos, siendo su principal reservorio las aves acuáticas.

La primera descripción de IP data de 1918 en Illinois, EEUU (Lewis y Shope, 1931; Shope, 1934). El brote se presentó simultáneamente con la pandemia de influenza humana responsable de la muerte de 50 millones de personas (Brown, 2000; Krause, 2006; Olsen, 2002; Zhou y col., 1999). Doce años después se comprobó que ambos cuadros, humano y porcino, fueron causados por el virus de influenza (Rekik y col., 1994) y aún hoy se sigue debatiendo si esta pandemia tuvo origen en un virus proveniente de aves o de cerdos, si bien estudios recientes le asignan a las aves el origen de este virus (Webster, 1999). Los cerdos, a diferencia de los humanos, pueden ser infectados con cepas de múltiples orígenes. Así se han descrito brotes en piaras causadas por cepas humanas y cepas aviarias. Esta susceptibilidad del cerdo se debe a la presencia de receptores en el epitelio traqueal para ambos linajes virales (Webster y col., 1992; Zhou y col., 1999).

No sólo se ha observado una continua variación en las glicoproteínas de superficie del virus sino también en cada uno de los 8 segmentos que componen el ARN viral (ARNv). Esta variación puede deberse básicamente a dos mecanismos: (I) mutaciones acumuladas a través del

tiempo, principalmente para el gen que codifica para la proteína HA (*drift* antigénico) (Olsen, 2002), (II) intercambio de segmentos completos (*shift* genético) dado por la infección concomitante de una misma célula por dos subtipos o genotipos distintos pudiéndose producir el intercambio de segmentos genómicos de los virus parentales (Mitnaul y col., 2000; Rao, 2003; Shaw y col., 1992). Otro mecanismo ampliamente estudiado y de suma importancia en la epidemiología de influenza es la transmisión completa de subtipos virales entre especies, lo que hace que el nuevo hospedador sea susceptible al nuevo subtipo o genotipo (Choi y col., 2004; Rao, 2003; Webby y Webster, 2001). A pesar que los mecanismos descritos son los de mayor importancia biológica en la variación antigénica, se han descrito otros que, aunque parecen jugar un papel menos relevante, han cobrado importancia en el entendimiento del mecanismo de mutación viral y la emergencia de nuevos genotipos. Así, se cree que la interferencia de partículas defectuosas o la recombinación de segmentos del ARNv pueden jugar un papel en la generación de nuevas variables. Todos los mecanismos con los que cuenta el virus para establecer un nuevo subtipo son de importancia no sólo en la transmisión inter-especie sino también en la ocurrencia de los brotes pandémicos, debido a la falta de inmunidad contra las nuevas variantes (Webby y col., 2004).

Se han desarrollado métodos para el aislamiento e identificación del virus de influenza A tales como: aislamiento viral, inmunofluorescencia directa o indirecta, ELISA de captura y PCR, así como secuenciación génica para estudios de epidemiología molecular. Otras técnicas diagnósticas buscan demostrar la presencia de antígenos o ARN viral en los tejidos: inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia (IF) e hibridación *in situ* (HIS). Como pruebas indirectas, las técnicas serológicas de inhibición de la hemaglutinación (IHA) y el ELISA son de utilidad para estudios epidemiológicos (Janke, 2000).

Se presenta aquí una actualización sobre aspectos relacionados con las características del virus de influenza, el comportamiento epizootiológico de la infección, la respuesta clínica, anatomopatológica y serológica del hospedador y los métodos de diagnóstico.

1.1.1. Clasificación y estructura del genoma

El virus de influenza A, es un virus envuelto, con genoma ARN de polaridad negativa y formado por 8 segmentos independientes, los cuales codifican 11 proteínas virales: las polimerasas PB1, PB2 y PA, las proteínas HA, NA, NP (nucleoproteína), M1 (matriz 1) y M2 (matriz 2) y las proteínas no estructurales NS1 y NS2 (Geiss y col., 2002). El virus de influenza posee un tamaño de 80 a 120 nm de diámetro y presenta espículas pleomórficas en la membrana y que generalmente se vuelven esféricas. Estas derivan de la bicapa lipídica de las células huésped, y en su interior se encuentran inmersas las glicoproteínas (HA, NA y M2) codificadas por el virus (Webster y col., 1992).

PB1 polimerasa: Esta proteína se aloja en el núcleo de la célula infectada y es codificada por el segmento 2 del ARNv. Funciona, en el complejo de polimerasas virales, como proteína encargada de la elongación del nuevo ARNv (Webster y col., 1992).

PB2 polimerasa: Es codificada por el segmento 1 del ARNv. Participa en el comienzo de la transcripción del ARNm viral como una proteína que reconoce y se une al extremo 5' capI del ARNm de las células del hospedador, porción que utiliza como un iniciador para la transcripción del ARNm viral (Webster y col., 1992).

PA polimerasa: Es codificada por el segmento 3 del ARNv y se localiza en el núcleo de las células infectadas formando parte del complejo ARN polimerasa, junto con PB1 y PB2 (Webster y col., 1992).

Hemaglutinina (HA): Es codificada por el segmento 4 del ARNv. Es una proteína de

membrana y constituye el mayor antígeno de superficie del virus (Suzuki y Nei, 2002). Es de naturaleza glicoproteica (N-ligando) y se proyecta como trímeros desde la envoltura viral (Olsen, 2002). Es responsable de la unión del virus a los receptores de la célula del huésped y favorece la fusión entre la envoltura viral y la célula del hospedador (Atassi y Webster, 1983). Se conocen 16 subtipos diferentes que se designan H1 a H16 (Karasin y col., 2002). La HA no escindida (no activada) se denomina HA0. La acción de proteasas sobre HA0 da origen a las porciones HA1 y HA2, activas (Reid y col., 2001). La porción HA1 de alrededor de 320 aminoácidos, contiene la cabeza globular de la proteína que presenta el sitio de unión para el receptor (Shaw y col., 1992; Suzuki y Nei, 2002) y constituye el determinante antigénico más importante hacia donde se dirigen los anticuerpos neutralizantes (Olsen y col., 2002). La porción HA2, de 220 aminoácidos, es la encargada de la fusión de la envoltura del virión al endosoma celular (Suzuki y Nei, 2002). Cada subtipo presenta, al menos, un 30% de diferencia en la secuencia de aminoácidos de la porción HA1 respecto de otros subtipos, no observándose actividad serológica cruzada (Webster y col., 1992).

Nucleoproteína (NP): Es codificada por el segmento 5 del ARNv. Esta proteína es transportada al núcleo de la célula infectada, donde se une y encapsula el RNA viral. La NP junto con la proteína de matriz M1, interactúan con la cola citoplasmática de la HA y de la NA para proveer la estructura del virión. Las proteínas M y NP son específicas de especie y diferencian los tipos A, B y C. Además de esta función estructural, se cree que la NP juega un rol importante en el cambio de la actividad de la ARN polimerasa viral en la síntesis del ARNm a ARNt y ARNv. La NP se sintetiza en las células infectadas y es la segunda proteína en abundancia del virión. Esta proteína es, a su vez, el blanco de los linfocitos T citotóxicos en la respuesta inmune del hospedador (Webster y col., 1992).

Neuraminidasa (NA): Es una glicoproteína de membrana codificada por el segmento 6 del genoma viral. Es la segunda en superficie antigénica del virión. Esta proteína tetramérica cataliza la separación del ácido siálico de los residuos hidrocarbonados de las glicoproteínas y de los glicolípidos de las células del hospedador, permitiendo su liberación y facilitando la diseminación viral (Shaw y col., 1992). Al presente han sido identificados 9 subtipos, entre los cuales no se ha observado reacción cruzada (Webster y col., 1992).

Proteína M1: Esta porción es codificada por el segmento 7 del ARNv y es la proteína más abundante del virión. La proteína de matriz forma un caparazón alrededor de la nucleocápside del virión debajo de su envoltura (Shaw y col., 1992). En las células infectadas está presente tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Proteína M2: Es una proteína de membrana codificada a partir del segmento 7 del ARNv y está presente como un tetrámero en grandes cantidades en la superficie de la célula y en menor cantidad en el virión (Shaw y col., 1992; Suzuki y col., 2000; Suzuki y Nei, 2002). Se cree que actúa como un canal de protones para controlar el pH del aparato de Golgi durante la síntesis de HA y permite la acidificación en el interior del virión durante la desensvoladura del mismo (Webster y col., 1992).

Proteínas no estructurales NS1 y NS2: Son codificadas por el segmento 8 del ARNv. La proteína NS1 se almacena en el núcleo y aparece en la fase tardía de la replicación mientras que la proteína NS2 es almacenada en el citoplasma y aparece en la fase temprana de la replicación viral (Shaw y col., 1992). Ninguna de las dos proteínas es incorporada en la progenie. La NS2 parece modular la síntesis de las proteínas no estructurales (Webster y col., 1992).

1.1.2. Ciclo de replicación viral

Inicialmente la porción HA0 de la partícula viral necesita activarse a través de su clivaje, una vez que ha sido escindida-activada se une a la célula del hospedador, mediante la interacción entre el sitio de unión del receptor de la HA1 y el ácido siálico terminal del receptor glicoproteico o glicolipídico de la superficie de la célula (Olsen, 2002). Después de la unión, el virión es endocitado y el bajo pH de la vesícula endocítica activa cambios en la conformación que facilitan la inserción del extremo aminoterminal de la porción hidrofóbica de la HA2 en la membrana vesicular. De esta manera se inicia la fusión entre el virus y la vesícula de membrana, liberando así el contenido del virión al citoplasma de la célula (Shaw y col., 1992).

La proteína HA previene la agregación del virión y aumenta la liberación de las partículas virales. Evidencias recientes sugieren que la fuerza relativa de adhesión de HA y la acción enzimática de NA, actúan en conjunto para optimizar la replicación viral (Mitnaul y col., 2000). Sumado a esto, se cree que la NA induce apoptosis. La apoptosis, funciona como un factor de virulencia a través de la unión y activación del plasminógeno, el que favorece el clivaje de la HA (Brydon y col., 2003; Takizawa y col., 1993).

Otro mecanismo por el cual el virus de influenza A puede manejar y evitar los mecanismos de defensa del hospedador incluye un ORF alternativo en el segmento PB1. Este segmento alternativo codifica para la proteína PB1-F2 la cual se ha observado en algunas cepas de influenza A y parece jugar un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedador, aumentando los mecanismos de patogenicidad *in vivo* (Zamarin y col., 2006). Esta proteína, induce la apoptosis en macrófagos reduciendo su capacidad de participar en la respuesta inmune (Zamarin y col., 2005). Previamente se ha propuesto que la proteína PB1-F2 contribuye a la

patogenicidad inhibiendo la eliminación viral, así pudiendo incrementar la citotoxicidad (Zamarin y col., 2006). Sin embargo, es posible que PB1-F2 ataque y destruya células presentadoras de antígeno lo que también puede contribuir en la patogenicidad de influenza A, aumentando la probabilidad de infecciones secundarias.

La nucleocápside del virus migra al núcleo de la célula del hospedador y así, su complejo de polimerasas asociadas, resulta fundamental para la transcripción del ARNm. Las primeras transcripciones son utilizadas para trasladar las proteínas virales al núcleo celular, predominantemente NP y NS1 en los primeros estadios de la infección. Se bloquea la traslación del ARN del hospedador. Se cree que las concentraciones crecientes de NP libre activan el cambio de la síntesis de ARNm a la síntesis de ARNt y ARNv por el genoma infectante del virus. El nuevo ARNv es encapsulado dentro del núcleo como plantilla para una segunda transcripción del ARNm. Tardíamente en la infección, los principales productos de traducción son las proteínas M1, HA y NA. Las proteínas HA y NA son procesadas postraducción y transportadas a la superficie de la célula, donde se integran a la membrana celular (Shaw y col., 1992).

Se conocen pocos detalles del ensamble citoplasmático. Generalmente el centro viral de la nucleocápside es recubierto por un caparazón formado por la proteína M1. Luego, este complejo brota al exterior dentro de una vesícula de membrana celular, y se completa con las glicoproteínas virales de membrana. La proteína NA de la progenie facilita la liberación de los viriones de la célula hospedadora (Shaw y col., 1992).

El paso final para la maduración del virus es extracelular y consiste en el clivaje de la HA0 en HA1 y HA2 por las proteasas extracelulares del tracto respiratorio del hospedador original o nuevo (Webster y col., 1992).

1.1.3. Reservorios

El virus de influenza A ha sido aislado de un gran número de especies animales hospedadoras incluyendo humanos, aves, ballenas, focas, visones y cerdos. Numerosas evidencias sugieren que el reservorio primario de influenza A son las aves acuáticas, las aves costeras y los gansos, especies en las cuales el virus es considerado avirulento. A pesar de su frecuente presentación en aves, algunas especies de producción, como pollos y pavos, siguen siendo consideradas hospedadores aberrantes (Suarez, 2000). Se han realizado aislamientos de cepas de influenza porcina en granjas de pavos ubicadas en zonas de producción porcina, detectándose también anticuerpos contra las mismas. El grado de similitud ($> 97\%$) entre los virus aislados de pavos y de cerdos indicaría que ha ocurrido la transmisión entre especies (Choi y col., 2004). En los patos salvajes la replicación viral ocurre preferentemente en las células intestinales (Webster, 2002) mientras que en el hombre y cerdos ocurre en el tracto respiratorio y está asociada a signos clínicos. Se ha demostrado que, de los 16 subtipos de HA encontrados en aves, sólo unos pocos han podido transmitirse a los mamíferos (H1, H3, H7). Algo similar ocurre con los distintos subtipos de NA, observándose en mamíferos sólo los subtipos N1, N2, N7 y N8 (Reid y col., 2001). El virus de influenza presenta la capacidad de transferirse de una especie a otra, observándose en estos casos, un incremento de la tasa de mutación viral, que forma parte del proceso de adaptación del virus al nuevo huésped (Brown, 2000; Brown y col., 1997). Así, como resultado, se ha observado que la evolución del virus en las aves es mucho más lenta que en humanos y cerdos (Stech y col., 1999; Suzuki y Nei, 2002).

El virus de las aves acuáticas y de los humanos presenta una pobre replicación en su huésped heterólogo (Brown, 2000; Brown, 2001). Resultados obtenidos del análisis filogenético y de estudios epidemiológicos mostraron que los virus de influenza humano y porcino tienen un

antecesor aviar común (Webster, 2002). En este sentido, el cerdo puede ser infectado tanto por virus humanos como aviares y estos últimos, ya adaptados a mamíferos, pueden transmitirse al hombre. De este modo los cerdos actuarían como “vaso comunicante” entre ambas especies (humana y aviar). (Ito y col., 1998). El virus de influenza aviar se une preferentemente a las terminaciones GalNAc 2,3 presentes en los receptores de membrana, mientras que la mayoría de las terminaciones de los receptores del epitelio respiratorio de los humanos son del tipo GalNAc 2,6 (Webby y col., 2004; Webster, 1999; Webster y col., 1992). El análisis molecular del ácido siálico de la tráquea del cerdo reveló que ambos tipos de azúcares (GalNAc 2,3 y GalNAc 2,6) están presentes en los receptores de membrana celular (Ito y col., 1998; Olsen, 2002; Suzuki y col., 2000), lo que explica la capacidad del cerdo de actuar como receptor para cepas de origen aviar y humano (Jung y col., 2002; Webby y Webster, 2001). Sin embargo se ha demostrado la transmisión de algunos subtipos de virus de influenza aviar (H5N1; H9N2) directamente al humano, observándose que no es necesario otro mamífero para el proceso de adaptación de estos virus aviares debido a que han aumentado su afinidad por los gangliósidos de cadena larga (NeuA α 2,6 Gal) (Russell y col., 2004; Seo y col., 2001).

1.1.4. El rol de los hospedadores intermediarios en el desarrollo de la infección

Las pandemias de influenza han sido el resultado de la acción de variantes del virus surgidas a partir de hospedadores que poseen la capacidad de replicar virus de ambos orígenes. Así, virus recombinantes conteniendo genes de virus humanos y aviares fueron los causales de por lo menos, dos de las pandemias del siglo XX (Reid y col., 2001). En el año 1957 (H2N2) y en el año 1968 (H3N2) se observaron brotes pandémicos; pero en ninguno de ellos estuvo involucrada la variable H1N1, responsable de la primer gran pandemia de 1918. En el año 1977 la variable

H1N1 reapareció en las poblaciones humanas, co-circulando con la cepa H3N2 descrita en 1968 como cepa estacional (Girard y col., 2010). Recientemente, una nueva variante del virus de influenza A (A/H1N1/2009) de origen porcino, fue descrita en el año 2009 a partir de casos humanos aparecidos en México, dando lugar, en un breve periodo, al desarrollo de una pandemia (SchnitzlerySchnitzler, 2009).

Históricamente, sólo un limitado número de subtipos de virus de influenza han sido aislados de distintas especies de mamíferos, por ej: H1N1, H2N2 y H3N2 de humanos, H3N8 y H7N7 de equinos y H1N1, H3N2 y H1N2 en porcinos (Webby y col., 2000; WebbyWebster, 2001). Por el contrario, las aves acuáticas pueden ser infectadas en forma subclínica en su tracto intestinal por los 16 subtipos de HA y los 9 subtipos de NA (Olsen, 2002).

El gran potencial de estos virus para cruzar la barrera de especie es el resultado de la interacción entre humanos, cerdos, aves y otros mamíferos. Los cerdos son los únicos mamíferos criados en confinamiento con una alta densidad animal por metro cuadrado, lo cual aumenta la posibilidad de replicación de virus de distintos orígenes en numerosos ciclos y en cortos periodos de tiempo (Brown, 2001). Es así como Asia ha sido propuesta como epicentro para las pandemias del virus de influenza, debido a que las prácticas de agricultura típicas, (cría familiar de cerdos y patos) están siendo reemplazadas por crianza en granjas de gran escala como consecuencia del aumento de la demanda de carne (Rao, 2003; WebbyWebster, 2001). Por otro lado, en Europa se ha observado, una alta tasa de mutación de la porción HA1 de la variante que afecta al hombre, que supera la tasa de mutación de todas las cepas porcinas (Ludwig y col., 1995). Luego de la transmisión y diseminación del virus de influenza A humano o aviar al cerdo, las variedades del virus original se denominan “human-like” o “avian-like”, recordando así su hospedador original (Brown, 2000). Actualmente los cuadros endémicos en el cerdo en todo el mundo son causados

por un número limitado de subtipos (pero ilimitado de genotipos): H1N1, H3N2 y H1N2 (Olsen, 2002; Webster y col., 1992), para los cuales esta especie es el mayor reservorio (Brown, 2001). Otros subtipos como H9N2, H4N7 y H1N7 han sido aislados esporádicamente pero no se han establecido como linajes permanentes. Sin embargo, las poblaciones de cerdos de distintas partes del mundo son reservorio de un creciente número de linajes virales. Así el subtipo H1N1 clásico, que está filogenéticamente relacionado con el virus responsable de la pandemia de 1918, circula predominantemente en Norteamérica y Asia (Ito y col., 1998; Russell y col., 2004; Seo y col., 2001) y hasta 1998, todos los brotes en América del Norte fueron atribuidos a este subtipo (Schnitzler y Schnitzler, 2009; Webby y col., 2004; Webster y col., 1992). En Europa, la primera descripción de este subtipo data de 1976, a partir de un cuadro respiratorio en cerdos importados desde Estados Unidos a Italia (Brown y col., 1997). En el año 1979, este linaje comenzó a ser reemplazado por otra cepa H1N1 introducida por las aves en la población porcina (Ludwig y col., 1995). Durante la década del 80 y de los 90 ambos subtipos circularon conjuntamente, observándose que el subtipo “avian-like” reemplazó casi completamente al subtipo clásico. Esta variable “avian-like” del subtipo H1N1 también fue descrita en estudios epidemiológicos realizados en China (Webby y Webster, 2001). Sin embargo, estudios serológicos demostraron que al menos desde el año 2003 en Europa del Este, las cepas H1N1, H3N2, y H2N1 son endémicas en las poblaciones porcinas, demostrándose un cambio en el patrón tradicional para la cepa avian-like H1N1 (Van Reeth y col., 2008).

A partir de la aparición de la cepa A H1N1 pdm se han profundizado los estudios para determinar la relación filogenética de esta cepa con las cepas H1N1 de origen porcino o H1N1 de origen aviar. Se ha podido demostrar que esta variable es antigénicamente diferente de la cepa estacional preexistente y que se originó a partir de múltiples recombinaciones, considerándose

que todos los segmentos virales han estado circulando en la población porcina mundial por más de 10 años (Garten y col., 2009; Smith y col., 2009) anteriores a la pandemia sin haber sido detectados debido a la ausencia de relevamientos epidemiológicos activos. A H1N1 pdm presenta similitud antigénica y alta similitud en su secuencia genómica (94-97% para diferentes segmentos genómicos) con cepas porcinas ya establecidas. Análisis filogenéticos demostraron que los genes que codifican para la neuraminidasa y para proteínas de matriz tienen su origen en las cepas europeas avian-like H1N1 de influenza porcina (ForrestyWebster, 2010). Los otros seis segmentos del genoma han derivado de las cepas porcinas circulantes en Norteamérica con triple recombinación H1N1/H1N2/H3N2 (2009; ForrestyWebster, 2010; Smith y col., 2009). Esto demuestra que la nueva variable A H1N1 pdm deriva de tres cepas que circulan en dos continentes (Brockwell-Staats y col., 2009; Garten y col., 2009).

La infección en los cerdos por el subtipo H3N2 humano puede ocurrir en condiciones de campo. Si bien existían evidencias serológicas de la transmisión del virus de humanos al cerdo no fue sino hasta el año 1970 que se aisló el virus, poco después de la emergencia de un virus similar en humanos en Taiwán (Brown, 2000). Desde este momento, el subtipo H3N2 “human-like” ha sido aislado de cerdos de Europa y Asia donde co-circula con el subtipo H1N1. Cuadros clínicos de influenza han sido observados en toda Europa desde 1984, producidos por una cepa relacionada antigénicamente con la cepa humana circulante entre principios y mediados de la década del 70 (Brown, 2000). En el año 1993 el subtipo H3N2 fue aislado en Gran Bretaña, donde se vio, que provenía de un cruzamiento humano-aviar, conteniendo genes para la codificación de las porciones HA y NA de la cepa humana y, los restantes seis genes, para la codificación de todas las proteínas internas provenientes de cepas aviares H1N1 (Reeth y col., 2004). En el año 1998 se detectaron brotes de una enfermedad respiratoria en todos los estados productores de

cerdos de Estados Unidos, donde el agente causal identificado fue el subtipo H3N2 de influenza A (Karasin y col., 2002; Takizawa y col., 1993; Webby y col., 2004). Los primeros aislamientos mostraron que, al menos, dos genotipos estuvieron involucrados. Por un lado se observó, un doble entrecruzamiento con segmentos humanos (HA, NA, PB1) y segmentos de influenza porcina clásica (NS, NP, M, PB2, PA). El segundo genotipo observado, se caracterizó por un triple entrecruzamiento conteniendo genes humanos (HA, NA, PB1), porcinos (NS, NP, M) y aviares (PB2, PA). Hacia fines del año 1999 este virus con triple entrecruzamiento se distribuyó en toda la población porcina de los Estados Unidos (Karasin y col., 2002; Russell y col., 2004; van Riel y col., 2006; Webby y col., 2004; Zhou y col., 1999). Las dos variables mencionadas del tipo H3N2 se denominaron sobre la base de las características descriptas: North Carolina (SW/NC/98) y Midwest (SW/TX/98; SW/IA/98; SW/MN/98) para el doble y triple cruzamiento respectivamente (Zhou y col., 1999; Zhou y col., 2000). Un relevamiento serológico, a través de todos los estados productores de cerdos de Estados Unidos, evidenció que la prevalencia para la cepa Midwest fue del 48,8 % mientras que para la North Carolina fue sólo del 8,3%. Esto indica que, los subtipos con triple cruzamiento, se encuentran mejor adaptados y no dan reacción cruzada con el subtipo H1N1. Se observó que en los animales infectados con cepas H3N2 humanas, había una pobre replicación y diseminación del virión, a diferencia de los animales infectados con la cepa H3N2 con triple recombinación (Landolt y col., 2003).

El subtipo H1N2 recombinante, que contiene genes de cepas humanas, porcinas y aviares constituye un problema significativo en Inglaterra y se ha diseminado a Europa continental (Marozin y col., 2002). Este subtipo recombinante deriva de los subtipos H1N1 clásico y del H3N2 “human-like”. En Japón, tras su aislamiento en los años 1978-1980 y 1989-1992, se vio que el subtipo H1N2 estaba asociado a cuadros respiratorios de presentación epidémica en la

población porcina (Brown, 2000). Este mismo subtipo fue descrito en Gran Bretaña en el año 1994, y luego se diseminó por Europa continental afectando Francia, Italia y Bélgica (Van Reeth, 2000). El origen de este subtipo en Europa es resultado de un doble cruzamiento con genes de tres distintos virus progenitores. La porción HA del virus está emparentada con la cepa humana H1N1 circulante en 1980, la porción NA deriva de la cepa H3N2 porcina y las proteínas internas son de origen aviar. En el año 1999 en Estados Unidos se observó un síndrome respiratorio influenza-*like* que afectó un amplio rango de edades, desde animales de 2 semanas de edad hasta de 7 meses, provocando además cuadros de abortos en cerdas (Karasin y col., 2002). Los primeros estudios de aislamiento viral realizados durante el brote mostraron que estos cuadros fueron producidos por el subtipo H1N1 (Olsen y col., 2002). Sin embargo el análisis filogenético, demostró que la cepa H1N2 actuante fue el resultado de la recombinación entre la cepa H1N1 porcina clásica, que aportó la porción HA, y el subtipo H3N2 con triple recombinación, que proveyó los restantes segmentos del ARN (Karasin y col., 2002).

Numerosos países han documentado la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza. Así es como India (Rao, 2003) y China (Li y col., 2004) muestran serología positiva desde el año 1968 contra el subtipo H3N2 humano. En España hay evidencias serológicas y virológicas de la circulación simultánea de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 (Maldonado y col., 2006). La información acerca de la prevalencia serológica de Centro y Sudamérica, al momento, es escasa. Se han reportado casos con serología positiva en México, habiéndose observado además, casos humanos positivos con cepas porcinas (Ayora-Talavera G Fau - Cadavieco-Burgos y col., 2005). Otros países latinoamericanos como Venezuela (Boulangier y col., 2004; Ramirez y col., 2005), Brasil (Mancini y col., 2006) y Argentina han reportado casos aislados de serología con resultados positivos para ambos subtipos de IP sin aislamiento de virus (Teodoroff y col.,

2003; Teodoroff y col., 2004) .

A pesar que A/H5N1 es considerado predominantemente aviar, este subtipo ha podido traspasar la barrera de especie. Así desde 2003 se han realizado aislamientos en más de 400 casos de humanos, siendo aproximadamente el 60% de ellos fatales (Schnitzler y Schnitzler, 2009). El papel del cerdo en este salto interespecie, no está claro hasta el momento. Estudios realizados en China demostraron que el cerdo puede infectarse naturalmente con el subtipo H5N1, aunque la tasa de replicación viral, y el periodo de eliminación son más bajos en esta especie que en la infección con las cepas estacionales que afectan a humanos. Considerando que el cerdo es el único mamífero que posee receptores para subtipos aviáres, no se puede descartar la importancia de esta especie en la diseminación del subtipo A/H5N1 a humanos (Liu y col., 2009). Durante la última década se han realizado estudios para determinar la variabilidad genética de las nuevas cepas emergentes que afectan a las poblaciones porcinas a nivel mundial (Girard y col., 2010). Así se ha determinado que las cepas circulantes no tienen el mismo origen en las distintas regiones geográficas. En base a los numerosos estudios epidemiológicos realizados en Europa y Estados Unidos se puede concluir que las cepas predominantes en Europa provienen mayormente de la recombinación con subtipos aviáres o cepas provenientes de mamíferos co-circulantes en Europa con un reordenamiento genómico local (Takemae y col., 2008), mientras que en los Estados Unidos la cepa más prevalente está asociada a una triple recombinación entre cepas humanas, aviáres y porcinas con previa circulación local (Smith y col., 2009). Desafortunadamente no se dispone de abundante información en los bancos genómicos de cepas porcinas provenientes de África, Oceanía y Sudamérica (Brockwell-Staats y col., 2009). Debido a la falta de relevamientos serológicos y virológicos constantes en las poblaciones porcinas a nivel mundial, se ha generado una brecha de aproximadamente 15 años en la trazabilidad genética del

virus. Esto dificulta un adecuado seguimiento retrospectivo de las cepas parentales en caso de apariciones de nuevas variables como la ocurrida en 2009 (Gibbs y col., 2009).

1.1.5. Epidemiología en el cerdo

Se ha observado que la IP se comporta desde el punto de vista epidemiológico, de modo distinto dependiendo de la región geográfica donde se presente. En su presentación epidémica, afecta a varias granjas de un área o región en forma simultánea asociada al movimiento o reemplazo de reproductores de granjas infectadas o susceptibles. En los Estados Unidos se observó que el virus persiste en la población de cerdos en forma endémica y que reingresa a los establecimientos a través de los animales de reemplazo, observándose episodios anuales de enfermedad respiratoria de curso agudo. Por el contrario, en Europa, el virus persiste en forma subclínica (Brown, 2000).

Las principales vías de transmisión son el contacto directo entre cerdos y la vía aerógena. El virus se elimina por las secreciones nasales y se disemina a través de gotas y aerosoles. La sobrepoblación, el estrés, y algunos factores meteorológicos y ambientales, resultan propicios para la diseminación del virus (Rao, 2003). Si bien no se ha comprobado que exista replicación viral en el tracto gastrointestinal del cerdo, se ha observado que el virus presenta cierta supervivencia en materia fecal variable, según la temperatura, entre 2,5 horas a 50°C y 9 semanas a 5°C. Este parece ser un factor de importancia, principalmente en aquellos lugares donde la materia fecal se utiliza como abono, observándose la infección de granjas libres a través de la diseminación en el aire de materia fecal con virus en forma de aerosol (Desrosiers y col., 2004).

Si bien a todo lo largo del año pueden presentarse cuadros clínicos, usualmente los signos clínicos se ven exacerbados durante los meses fríos en el hemisferio norte (Choi y col., 2003). La

infección por el subtipo H1N1 es generalmente asintomática pero si hay signos, los mismos sólo se observan en el 25-30% de las granjas (Brown, 2000) y se caracterizan por alta morbilidad (>80%), baja mortalidad (<5%) y con valores \leq al 1% si no es acompañada de infecciones secundarias. El periodo de eliminación del virus es de 7 a 10 días, si bien se han descrito períodos de más de 4 meses (EasterdayyVan Reeth, 1999).

Una vez que el cerdo se infecta, puede actuar como diseminador por un corto periodo. A los 3-5 días post infección (dpi) el virus se puede recuperar de la cavidad nasal en el 100% de los animales inoculados, mientras que a los 11 dpi, sólo en el 50% (Desrosiers y col., 2004). La supervivencia interepidémica tiene lugar a través de la recirculación del virus en cerdos no inmunes que constituyen subpoblaciones susceptibles (Brown, 2000).

1.1.6. Signos clínicos y lesiones

Las descripciones iniciales de los cuadros de influenza porcina se caracterizaron por su curso agudo y por la alta morbilidad y baja mortalidad (Lewis y Shope, 1931; Shope, 1934). Las pérdidas directas son retardo en el crecimiento y baja transitoria en la conversión alimenticia. También hay que tener en cuenta la predispone a infecciones bacterianas secundarias (Thacker y col., 2001). La severidad de los signos clínicos y de las lesiones depende de numerosos factores, incluyendo hospedador, edad, cepa viral e infecciones secundarias (Russell y col., 2004). La infección tiene un período de incubación corto y se manifiesta en forma explosiva cursando con un cuadro respiratorio agudo. Se consignan estornudos, episodios de tos paroxística, respiración forzada abdominal, así como descarga nasal no purulenta que puede llegar a ser copiosa. También se observan descarga ocular y epífora, los animales deambulan o presentan letargia, postración, fiebre, vómitos, decoloración de la piel, pérdida de la condición corporal y pérdida del apetito que

pueden durar alrededor de 4-5 días (Done y col., 1994; Olsen, 2002).

Los signos clínicos y las lesiones producidas se corresponden con la fase de la replicación viral. La anorexia, fiebre y la depresión presentes durante el breve transcurso de la enfermedad son el resultado de la liberación bronquioloalveolar de citoquinas proinflamatorias tales como interferón- α (IFN- α) factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) interleuquina-1(IL-1) α y β , interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) (Van Reeth, 2000).

El hallazgo macroscópico más común es la consolidación de los lóbulos pulmonares intermedios, en los que se observa un moteado color rojo-violáceo. En general, el lóbulo caudal resulta menos comprometido (Russell y col., 2004). El virus se multiplica en las células epiteliales de revestimiento de la cavidad nasal, tráquea, bronquios y bronquiólos produciendo bronquitis y bronquiolitis (Olsen, 2002; Olsen y col., 2002). Dos a tres dpi, la luz de bronquios, bronquiólos y alvéolos se encuentra ocupada por un exudado rico en células epiteliales necrosadas y descamadas, neutrófilos y monocitos (Vincent, 1998) con la consecuente irritación del tracto respiratorio, lo que resulta en una tos seca característica (Jung y col., 2005). Estas lesiones persisten hasta 2 semanas posinfección, produciéndose la recuperación completa a las 3 semanas (Janke, 2000). Estudios realizados por las técnicas de hibridación *in situ* e IHQ comprobaron que el virus también se multiplica en los macrófagos alveolares e intersticiales, causando necrosis de los mismos, lo que afecta los mecanismos de defensa pulmonar y favorece la infección bacteriana secundaria (Jung y col., 2005). La mayor causa de mortalidad asociada con la infección por influenza A es el resultado, justamente, de estas infecciones bacterianas secundarias (Brockmeier y col., 2002).

En primíparas y cerdas gestantes pueden ocurrir abortos tardíos debido al pico febril o secundario a infecciones bacterianas por lo que la influenza es considerada una enfermedad

reproductiva secundaria (Clark, 1996; Wesley, 2004). No se ha podido realizar aislamiento viral de los fetos ni de las madres abortadas (Janke, 2000).

Se ha descrito en Canadá un tipo de bronconeumonía necrótica y proliferativa producida por una variante de la cepa clásica H1N1 del virus de influenza (A/SW/QC/192/91), (Larochelle y col., 1994) emparentada con un subtipo H3N2 (EasterdayyVan Reeth, 1999) y no relacionada con las cepas conocidas en Estados Unidos (Li y col., 2004; Rekik y col., 1994). Los signos respiratorios se presentaron en animales de destete y terminación y previamente a la presentación respiratoria, se observaron fallas reproductivas (nacidos muertos, abortos tardíos y lechones nacidos débiles) (Morin y col., 1990). Los signos clínicos fueron fiebre (41,5°C), anorexia, letargia, descarga nasal y ocular y tos de variable intensidad (Dea y col., 1992). Macroscópicamente se observó una marcada palidez de los animales, linfadenopatía generalizada, congestión hepática y consolidación pulmonar (Dea y col., 1992). Las lesiones histológicas consistieron en una infiltración del septo alveolar por células mononucleares, abundantes macrófagos en el parénquima pulmonar, proliferación de neumocitos tipo II y presencia de células necróticas en la luz alveolar, con un abundante material proteináceo con tendencia a formar membranas hialinas (Dea y col., 1992). También se ha descrito bronquiolitis necrótica, viéndose afectadas principalmente las pequeñas vías aéreas (Morin y col., 1990). No está claro cuál o cuáles son los factores responsables de este patrón de lesión distinto de la IP clásica (Olsen y col., 2002). En brotes similares, el virus de influenza fue detectado en 1 de cada 60 casos mediante estudios de hibridación *in situ* e IHQ (Drolet y col., 2003). En la mayoría de los casos se pudo identificar la presencia de antígeno del virus de PRRS a través de la técnica de IHQ. La baja o nula marcación del virus de influenza puede deberse al corto tiempo posinfección durante el que este virus puede ser detectado (Larochelle y col., 1994).

Durante los últimos años y con la emergencia de nuevos agentes que afectan el aparato respiratorio, ha adquirido mayor relevancia el estudio de los patógenos respiratorios en forma conjunta y como parte del complejo respiratorio porcino (PRDC), más que su estudio en forma individual. Entre los microorganismos involucrados se encuentran el virus de influenza (SIV), el virus del complejo respiratorio y reproductivo porcino (PRRSv), *Circovirus porcino tipo 2* (PCV-2), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y *Pasteurella multocida* (Brockmeier y col., 2002). La influencia que las características ambientales y los factores de manejo propios de cada sistema de producción ejercen sobre el modo de presentación de estos cuadros respiratorios, hacen de este complejo una entidad multifactorial. (Brockmeier y col., 2002).

En el estudio del PRDC la evaluación de lesiones pulmonares en planta de faena se ha vuelto una práctica de rutina a través de la cual, se categorizan el tipo y la extensión de las lesiones pulmonares como base para la estimación de pérdidas económicas (Fraile y col., 2010; Martínez y col., 2009; Miller y col., 2001; Ostanello y col., 2007; Wilson y col., 1986). La evaluación de la circulación de estos agentes por métodos indirectos como los estudios serológicos de estos agentes, es otra práctica común. Los estudios serológicos transversales si bien resultan más rápidos y económicos, no brindan una completa información acerca de la dinámica de los agentes dentro del plantel. En cambio, los estudios serológicos longitudinales permiten precisar la declinación de los anticuerpos maternos y la seroconversión pero requieren un tiempo más largo para su desarrollo, por lo cual se convierten en estudios más costosos (Andreasen y col., 2001; Andreasen y col., 2000). Estos estudios se complementan con la realización de necropsias periódicas que permiten caracterizar las lesiones pulmonares macroscópicas y obtener muestras para estudios etiológicos (bacteriológicos y virológicos),

histopatológicos e inmunohistoquímicos (Hansen y col., 2010). Estos últimos, han adquirido gran importancia en el campo de la patología diagnóstica, debido a una mayor disponibilidad de anticuerpos comerciales contra los agentes responsables del PRDC y son de suma importancia para determinar la presencia del agente *in situ* (Drolet y col., 2003; Haines y col., 1993; Morandi y col., 2010). Sumado a esto, el uso de técnicas moleculares ha cobrado relevancia aumentando la sensibilidad diagnóstica y reduciendo el tiempo para la identificación final de estos agentes (Hansen y col., 2010; Ogawa y col., 2009).

1.1.7. Respuesta inmune y cinética de los anticuerpos

Los anticuerpos desarrollados tras el contacto con el virus de campo son del tipo IgG e IgM específicos. La respuesta de Ig contra HA es subtipo específica y, debido a los puntos de mutación del virus, este puede escapar a la destrucción mediada por anticuerpos (Desrosiers y col., 2004; Thacker y col., 1998). Los anticuerpos pueden ser detectados con la técnica de IHA a los 5-7 dpi y alcanzan títulos de 1:80, con valores máximos de 1:320 – 1:640 o mayores, a las 2 a 3 semanas PI. Ambas inmunoglobulinas comienzan a elevar su concentración sérica a partir del tercer día PI. Mediante la técnica de ELISA, el incremento de la IgM puede detectarse a partir del quinto día PI indicando una infección reciente (Larsen y col., 2000; Lee y col., 1995).

Los anticuerpos calostrales van declinando hasta las 6 semanas de vida, edad en que ya no se detectan (Gillespie, 1999). Sin embargo, títulos elevados en la hembra al comienzo de la lactancia, así como la vacunación de la cerda pre-parto prolongan la vida media de los anticuerpos hasta las 12 - 16 semanas de edad (Desrosiers y col., 2004; Thacker y col., 2004). La respuesta humoral durante la infección, en presencia de anticuerpos calostrales o vacunales, es menor (Thacker y col., 1998), observándose una interferencia más marcada para el subtipo H1N1 que

para el H3N2 (Van Reeth, 2000).

Se ha identificado IgA secretoria específica a nivel de la mucosa nasal a los 5 días PI (Lee y col., 1995). Teniendo en cuenta que el sitio inicial de infección es el tracto respiratorio superior, la IgA se uniría al virión e impediría su entrada al hospedador (Larsen y col., 2000; Lee y col., 1995).

La producción de anticuerpos en la primoinfección no evita la diseminación viral ya que se ha observado una alta tasa de diseminación 5 días PI. En cambio, sí previene la manifestación de signos clínicos frente a posteriores infecciones con la misma cepa (Larsen y col., 2000; Reid y col., 2001).

1.1.8. Diagnóstico

Para la identificación del virus de influenza han sido desarrolladas numerosas pruebas, desde el aislamiento viral a aquéllas que detectan la presencia de antígeno viral en distintos tipos de muestras como tejidos o exudados de las vías aéreas (Swenson y col., 2001; Takimoto y col., 1991). Entre estas pruebas se incluyen las técnicas de IHQ, ELISA-antígeno de captura, inmunofluorescencia indirecta y PCR (Desrosiers y col., 2004; Janke, 2000; Takemae y col., 2008). El momento en que se obtiene la muestra, así como la posibilidad de utilizar pruebas combinadas aumenta la sensibilidad de los métodos diagnósticos (Takimoto y col., 1991).

La detección de anticuerpos producidos por la infección por influenza A se ha realizado tradicionalmente a través de la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación (IHA), y en la actualidad, por la prueba de ELISA (Choi y col., 2002). Sin embargo, entre los problemas observados debido a la co-circulación de numerosas cepas dentro de una misma región e inclusive dentro de un mismo establecimiento, se encuentra la necesidad de desarrollar un test diagnóstico,

sensible y rápido. Algunos métodos de diagnóstico se han basado en la especificidad de anticuerpos monoclonales contra la hemaglutinina específica para cada subtipo. También, se han desarrollado pseudo-virus con el esqueleto del virus de influenza A lo que permite detectar antígeno de diferentes variables del virus. Si bien no se encuentran disponibles en medicina veterinaria, permitirían realizar el diagnóstico en laboratorios con menos requerimientos de los convencionales nivel 3, necesarios para influenza A (Du y col., 2010).

Aislamiento viral

Para el aislamiento viral se deberán seleccionar cerdos en la fase aguda de la infección, que manifiesten fiebre y descarga nasal no purulenta. Se deben obtener muestras de exudado nasal por medio de hisopos de fibra sintética (rayón o dacrón) (Swenson y col., 2001), no de algodón, evitando producir lesiones hemorrágicas (Janke, 2000). Los mismos se deben remitir refrigerados en medio de transporte adecuado (solución fisiológica o medios de cultivo). El medio de transporte utilizado puede interferir con la sensibilidad de las pruebas para la detección del virus (Dunn y col., 2003). Para que esto no suceda los medios deben tener un pH 7, un amplio espectro de antibióticos y deben carecer de suero (que contiene inhibidores inespecíficos de la porción HA). Una vez obtenida la muestra, esta puede ser mantenida a 4°C por 3 días. Cuando se desea conservarlos por periodos más prolongados se deben congelar a -70°C (Shaw y col., 1992).

El aislamiento viral es considerado la prueba “*gold standard*” para el diagnóstico de influenza y se realiza en huevos embrionados con 10 días de edad (Pensaert y col., 1986) a partir de exudado nasal u homogeneizado de tejido pulmonar (JankeyYoon, 1999). La multiplicación del virus es comprobada por la actividad de las HA, a los 5 días PI. Las líneas celulares de riñón porcino (PK15), riñón de mono (Vero), riñón de pollo, o canino (MDCK) han demostrado tener

gran utilidad convirtiéndose en el método de aislamiento más utilizado (Shaw y col., 1992). Se comprobó que las células MDCK presentan los dos tipos de ácido siálico (GalNac 2,3 y GalNac 2,6) en su superficie, con lo cual permiten la unión de las variables humanas, aviarias y porcinas (Seo y col., 2001). El aislamiento y la caracterización viral demora entre 1 a 2 semanas (Janke, 2000).

Se recomienda enviar al laboratorio varias muestras por animal y no menos de cinco cerdos, debido a la naturaleza focal de las lesiones y a la variación entre cerdos del momento de la infección, especialmente en casos de enfermedad respiratoria de carácter endémico. Las muestras de pulmón refrigeradas provenientes de las áreas de consolidación se utilizan para aislamiento viral e inmunofluorescencia. Estudios experimentales han detectado el virus en el tejido pulmonar 24 horas antes de que comience el desarrollo de las lesiones y hasta 24-48 horas PI (Janke, 2000).

Prueba de Inmunofluorescencia directa (IF)

Para esta prueba se pueden utilizar tejidos frescos refrigerados (no congelados) a partir de los que se obtienen cortes de 5 a 8 μm (Pensaert y col., 1986). Se utiliza suero hiperinmune producido en cerdo y dirigido contra todas las partículas virales (proteínas internas y externas) o sueros monoclonales (contra proteínas específicas) de los subtipos H1N1 y H3N2. Estos anticuerpos van a detectar ambos subtipos, aunque se ha descrito una marcación menos intensa en pulmones infectados con el subtipo H3N2 (JankeyYoon, 1999).

Se puede realizar la prueba de IF en extendidos en portaobjetos a partir de hisopados profundos de ambos ollares de animales en la fase aguda de la enfermedad, que presenten fiebre, inapetencia, letargia y secreciones nasales (EasterdayyVan Reeth, 1999). La sensibilidad y especificidad es similar a la descrita para la técnica de IHQ (Janke, 2000; JankeyYoon, 1999).

Pruebas de inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación *in situ* (HIS)

En el examen histopatológico pueden observarse lesiones orientativas de IP hasta las 2 semanas PI, ocurriendo la recuperación completa a las 3 semanas PI (Janke, 2000).

La técnica de IHQ permite la detección de antígeno viral y puede ser utilizada para la confirmación de infecciones recientes o para estudios retrospectivos (Swenson y col., 2001) de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Haines y Chelack, 1991). Para la marcación del virus de influenza se han desarrollado anticuerpos policlonales (Jung y col., 2002) y monoclonales dirigidos contra las nucleoproteínas del tipo A, pudiendo detectar indistintamente los subtipos H1N1 y H3N2 (Drolet y col., 2003). Debido a que ambos subtipos poseen la nucleoproteína y las proteínas de matriz en común, ambas pueden ser utilizadas como antígeno para la inmunomarcación (Swenson y col., 2001). A fin de disminuir la tinción de fondo, que puede interferir con el diagnóstico, los antisueros de tipo monoclonal son los de preferencia (Janke, 2000). La técnica de la HIS con marcadores no radiactivos, evalúa la expresión del ARN en tejidos y células (Jung y col., 2002).

Ambas técnicas, además de facilitar la realización de estudios retrospectivos (Larochelle y col., 1994), ofrecen la ventaja que no es necesario que el agente se encuentre viable para que sea detectado, (Haines y col., 1993) permitiendo identificar el agente *in situ* y realizar, conjuntamente, el estudio morfológico microscópico de los tejidos (Haines y Chelack, 1991). Por otro lado, el manejo de material fijado en formol es menos riesgoso para el contagio de los operadores que el de materiales frescos, dado el carácter zoonótico de esta infección (Jung y col., 2002). Los tejidos procesados mediante la técnica de IHQ presentan gran estabilidad en el tiempo y permiten la reconfirmación de los casos (Haines y Clark, 1991; Haines y col., 1993).

La fijación del pulmón con el formol tiene la desventaja de producir, en cierto grado, la

desnaturalización del antígeno dando falsos resultados negativos. En contraposición con la IHQ, la HIS es menos susceptible a cambios estructurales causados por la fijación (Jung y col., 2002).

Mediante el uso de ambas técnicas se observa una fuerte marcación en las células del epitelio bronquial y bronquiolar, macrófagos alveolares y macrófagos intersticiales. Las células positivas generalmente son de núcleo grande y ovalado con abundante citoplasma, observándose marcaciones positivas (gránulos pardos) en núcleo y citoplasma (Haines y col., 1993; Jung y col., 2002; Larochelle y col., 1994). Otro factor importante para la realización de la técnica de IHQ es el número y la representatividad de las muestras, debido a la distribución focal del virus en el tejido, el examen de una única muestra proveniente de casos sospechosos puede arrojar resultados negativos (Haines y col., 1993).

Elisa de antígeno de captura

Se ha desarrollado una prueba de ELISA de captura de tipo comercial para la detección de virus de influenza A y B (Directogen™; Becton Dickinson Microbiology Systems; Sparks, Maryland) (Denka-seiken INLFU A•B quick). Ambos kits se utilizan para el diagnóstico rápido de la infección en humanos, a partir de lavados nasofaríngeos, lavados bronquioalveolares e hisopados traqueales. Igual que la prueba de IHQ los kits de ELISA de captura utilizan un anticuerpo contra la nucleoproteína la que permite diferenciar influenza tipo A del tipo B (Vincent, 1998). Si bien es escaso el tiempo que toma la realización de la prueba, su sensibilidad varía de 54 al 96% (Dunn y col., 2003). Otra desventaja es que no se pueden detectar subtipos, por lo cual es necesario realizar otros estudios complementarios (JankeyYoon, 1999). Cuando estos kits fueron utilizados para detectar cepas que normalmente no afectan a mamíferos (H5N1), su tasa de detección fue muy baja (Hurt y col., 2009). En medicina veterinaria esta baja sensibilidad puede ser mejorada mediante la toma de muestras directamente de las vías aéreas

pequeñas durante la necropsia y no de nariz, ya que el exceso de mucus o sangre en las muestras pueden interferir con los resultados. El material así obtenido puede también utilizarse para la detección de ARNv por la técnica de RT-PCR (Janke, 2000).

Trascrición reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (*RT-PCR*)

La *RT-PCR* constituye un método altamente específico y sensible que garantiza la amplificación de un número bajo de copias del genoma viral, pudiendo ser aplicada directamente a muestras clínicas para la identificación de los distintos subtipos del virus (Fouchier y col., 2000). Los primeros estudios utilizaron *primers* dirigidos contra las nucleoproteínas internas del virión, los cuales mostraron tener un 100% de correlación con el aislamiento viral (Janke, 2000). A partir de la necesidad de subtipificar el virus, se han desarrollado *primers* para la identificación de los subtipos específicos, que son regiones complementarias altamente conservadas del gen que codifica para la porción HA1 tanto para la amplificación de H1 (H1F, H1R) como de H3 (H3F, H3R). Con la utilización de estos 2 grupos de oligonucleótidos y a través de una *Multiplex RT-PCR* se ha podido detectar e identificar los 2 tipos de HA (H1, H3) de IP de distintos tipos de muestras (Choi y col., 2002).

En la identificación de H1N2 en 1999, se dificultó la tarea de tipificación mediante la técnica de *RT-PCR* debido a que los *primers* utilizados estaban dirigidos solamente contra los genes que codifican para la HA. Para suplir esta deficiencia, se desarrolló la *Multiplex RT-PCR* que utiliza dos pares de primers H1 (H1F, H1R), H3 (H3F, H3R) y N1 (N1F, N1R), N2 (N2F, N2R). Esta prueba puede diferenciar los subtipos H1N1, H1N2 y el subtipo H3N2. Se observó que hay un 100% de correlación entre esta prueba y el aislamiento viral en muestras obtenidas de casos clínicos (Choi y col., 2002). Al presente, las pruebas de *RT-PCR* y *Multiplex RT-PCR*, que incluyen secuencias no sólo de las cepas porcinas sino también de H5N1, de cepas provenientes

de equinos y de otras cepas aviarias hasta ahora no observadas en humanos, son las técnicas de elección para la determinación rápida del virus en casos humanos (SchnitzlerySchnitzler, 2009).

Pruebas diagnósticas para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza

Prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IHA)

La IHA es la prueba clásica para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza (Kim y col., 2006). Los anticuerpos circulantes están dirigidos a la HA de membrana de la superficie del virus y previenen la unión del virus con los eritrocitos y la formación del entramado visible (hemaglutinación) (Loeffen y col., 2003). El título del suero a estudiar se corresponde con la máxima dilución en la que no hay suficiente concentración de anticuerpos para prevenir o inhibir la hemaglutinación (Janke, 2000).

La habilidad de la prueba para detectar anticuerpos contra una cepa particular del virus depende de la relación antigénica entre el virus de campo, que indujo la formación de los anticuerpos, y la cepa del virus que fue utilizada en la prueba (Janke, 2000). Debido a la existencia de variantes antigénicas del tipo A subtipo H1N1, existe reacción cruzada entre ellas, considerándose a la variante que obtuvo el mayor título como la cepa infectante contra quién van dirigidos los anticuerpos. Títulos de 1:40 o menores podrían indicar reacción inespecífica; títulos de 1:80 o mayores son considerados positivos y específicos. A pesar que se han reportado casos donde se observaron anticuerpos inclusive en forma tan temprana como 5-7 dpi, la seroconversión no es detectable hasta las 2-3 semanas posinfección, donde se encuentran normalmente los valores de IHA más elevados (1:320-1:640) (Janke, 2000).

Debido a las nuevas variables del virus y a la capacidad de cruzar de especie, se han investigado nuevas alternativas para el diagnóstico serológico. La prueba de IHA no sería la adecuada para la detección de anticuerpos originados por virus aviarios en mamíferos (Lu y col.,

1982). Para obviar esto, pruebas combinadas de IHA (para la detección de las proteínas de superficie) y hemólisis radial simple (para la detección de las proteínas internas del virión) están siendo utilizadas en la actualidad (Russell y col., 2004).

Prueba de ELISA

Se han desarrollado pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos inducidos por el virus de influenza de los subtipos H3N2 y H1N1. Su sensibilidad es del 85% y su especificidad es del 92,5%. En granjas positivas en las que se utilizó el aislamiento como técnica *gold standard*, la prueba de ELISA demostró una sensibilidad del 82,4% y una especificidad del 100% (Cornaglia y col., 1998).

La comparación de los resultados obtenidos mediante la utilización de kits comerciales de ELISA contra los subtipos H3N2 y H1N1 y la prueba de IHA, utilizando como antígeno cepas porcinas H3N2 y H1N1, demostraron la existencia de una correlación positiva entre ambas pruebas para la detección de ambos subtipos. Se observó que el *S/P ratio* aumenta en relación directa con el aumento de título obtenido mediante la prueba de IHA (Jackson y col., 2004).

Finalmente y sobre la base de toda la información presentada, se concluye que es necesario un constante relevamiento debido a la gran y rápida variabilidad del virus. El cambio de hospedadores específicos observado durante las últimas dos décadas demuestra que las mutaciones puntuales que el virus ha acumulado por más de siete décadas han dado sus resultados. De este modo, el virus de influenza se ha adaptado a nuevos hospedadores que no pueden ejercer ningún tipo de presión inmunológica, favoreciendo el desarrollo de cuadros clínicos más severos, una rápida diseminación y fallas en las vacunas existentes. Un mayor entendimiento de la patogenia y de los mecanismos que el virus ha desarrollado para adaptarse permitiría la aplicación de medidas terapéuticas más adecuadas. En este sentido, los organismos

del estado que administran los planes de salud animal deberían presentar políticas activas de relevamiento epidemiológico que favorezcan la detección de cualquier variación en las cepas locales circulantes en cerdos. Por último, teniendo en cuenta las características zoonóticas de este agente y sumado a la potencialidad patógena que este virus tiene al adaptarse a nuevos hospedadores específicos, resulta necesario el desarrollo de planes conjuntos que comprendan no sólo a la población humana sino a las especies domésticas más susceptibles.

1.2. Brote de influenza porcina causado por una cepa de influenza humana H3N2 no contemporánea

Los virus de influenza A, subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 son endémicos en las poblaciones de cerdos comerciales en todo el mundo (Brown, 2000; Olsen y col., 2006). Estos subtipos están representados por múltiples linajes que se diferencian antigénicamente y genéticamente como resultado de múltiples mutaciones puntuales (*drift* antigénico) y de recombinación genética (*shift* antigénico) (Brown, 2000; Olsen y col., 2006). Numerosos brotes en poblaciones porcinas, producidas por la transmisión *in toto* de los subtipos H3N2 de influenza humana, han sido descritos en Asia, Europa y América del Norte, desde el principios de la década del '70 (de Jong y col., 2007; Karasin y col., 2000; Song y col., 2003; Yu y col., 2008). En 1984 en Europa, se observó que una variable de doble recombinación, conteniendo los genes de superficie H3N2 “human-like” y genes internos de la cepa H1N1 de origen aviar, se introdujo en poblaciones porcinas causando signos clínicos y reemplazando la cepa previamente circulante de origen humano, A/Hong Kong/68-like H3N2 (Van Reeth y col., 2008). Desde 1977 hasta 1995, la mayoría de las cepas del virus H3N2, aisladas de cerdos en Europa, Hong Kong y Canadá estuvieron estrechamente relacionadas entre sí y con las cepas humanas contemporáneas

(de Jong y col., 2007). Desde finales de 1990, sin embargo, la complejidad de los virus de influenza porcina que afectan a poblaciones de cerdos en sistemas comerciales ha aumentado dramáticamente. En China, por ejemplo, se ha observado que variables exclusivamente humanas, con doble recombinación (humana y aviar) y triple recombinación (humana, porcina y aviar) del subtipo H3N2 han circulado en las poblaciones porcinas (Yu y col., 2008). En los Estados Unidos, las cepas porcinas H3N2 emergieron entre los años 1997 y 1998 como virus con doble y triple recombinación, las cuales contienen segmentos del genoma de cepas aviarias (PB2 y PA), humanas (PB1, HA y NA), y de origen porcino (NP, M y NS), y fueron la base del establecimiento y amplia difusión de H3N2 de triple recombinación en América del Norte (Zhou y col., 2000). Evidencias epidemiológicas sugieren que la constelación de genes internos del virus con triple recombinación, conocida como casete con triple recombinación o TRIG, posee ventaja para intercambiar los genes de HA y NA de otros orígenes. Desde 1998, se han producido múltiples introducciones de los subtipos H1N1 y H3N2 de influenza humana, en las poblaciones porcinas en América del Norte, siempre asociadas con la presencia de TRIG. Más importante aún, el virus TRIG estuvo involucrado con la aparición del virus H1N1 pdm, el que contiene genes derivados de cepas aviarias (PB2 y PA), humanas (PB1) y porcinas circulantes en América del Norte (HA, NP y NS) y en Eurasia (NA y M) (Donaldson y col., 2009). Las cepas porcinas H1N1 y H3N2 con triple recombinación, circulantes en América del Norte, han mostrado tener una amplia diversidad genética y antigénica. Así el virus de influenza porcina H3N2 se divide en tres grupos (*clusters*) filogenéticamente distintos (I, II y III), basados en el gen de la HA. En concordancia con su filogenia, estos grupos genéticos son antigénicamente diferentes observándose que la mayoría de los aislamientos pueden ser incluidos en alguno de los tres serogrupos. Sin embargo, numerosos aislamientos del grupo III no producen reacciones cruzadas

con antisueros del mismo grupo, lo que sugiere que estos virus sufren mutaciones puntuales en forma constante (Gramer y col., 2007; Richt y col., 2003).

A pesar de la enorme cantidad de información, todavía no se comprende completamente qué papel juegan la ecología, los factores ambientales, antropológicos y moleculares que contribuyen a la transmisión bidireccional entre los cerdos y los seres humanos del virus de influenza porcina. En América del Sur, la información relacionada con la actividad del virus de influenza en el cerdo es limitada. Escasos estudios serológicos llevados a cabo en Venezuela, Colombia y Brasil han demostrado la circulación de los subtipos de influenza H3N2 y H1N1 (Perfumo, 2010). Sin embargo, como no se han reportado aislamientos virales, se desconocen los genotipos y el comportamiento biológico. En Argentina, un estudio serológico retrospectivo realizado en 13 granjas demostró que cepas de influenza A humanas y/o porcinas con estrecha relación antigénica con cepas humanas han circulado en las poblaciones porcinas, al menos desde el año 2002 (Pineyro y col., 2010). Curiosamente, a pesar de la presencia de anticuerpos, no se observó enfermedad clínica ni hubo aislamiento viral en los establecimientos evaluados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

Determinar la presencia y prevalencia de la infección por el virus de la influenza porcina (IP) tipo A en granjas porcinas en confinamiento mediante estudios seroepidemiológicos, anatomopatológicos, inmunohistoquímicos y por técnicas de biología molecular (PCR), así como evaluar los factores de riesgo asociados a la presencia de la entidad.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la prevalencia serológica mediante visitas y toma de muestras en piaras en confinamiento. Correlacionar los resultados con los signos clínicos y la presencia de lesiones neumónicas a la inspección *post mortem* en la granja o en el frigorífico.
2. Estudiar microscópicamente las lesiones pulmonares mediante técnicas histopatológicas.
3. Identificar la presencia de antígeno viral en cortes de tejidos por técnicas inmunohistoquímicas. Establecer el diagnóstico diferencial con otros posibles agentes causales de las lesiones pulmonares tales como virus de la enfermedad de Aujeszky, *M. hyopneumoniae* y PCV-2.
4. Confirmar la presencia de ARNv en tejido pulmonar o exudado tráqueobronquial por medio de RT-PCR. Comparar las secuencias de nucleótidos de los amplicones obtenidos con las secuencias conocidas de virus de influenza de otros orígenes.
5. Estimar la prevalencia serológica mediante pruebas en agar gel precipitación (AGP) y ELISA

comerciales. Evaluar la evolución de la infección mediante estudios longitudinales y transversales.

6. Determinar los posibles factores de riesgo asociados a la infección.
7. Evaluar la presencia de infecciones bacterianas intercurrentes mediante estudios bacteriológicos, en particular *P. multocida.*, *A. pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* y *Escherichia coli*.

2.3. HIPÓTESIS MÁS RELEVANTES

1. En la República Argentina existe un alto porcentaje de granjas porcinas de cría intensiva en confinamiento con infección clínica o subclínica por virus de influenza.
2. La prevalencia serológica (mediante la prueba de ELISA) de una granja positiva está en correspondencia con la prevalencia de lesiones de neumonía observadas en el examen *post mortem*.
3. Las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y de inmunohistoquímica permitirán la identificación de las lesiones producidas por el virus de influenza y su diferenciación de las producidas por otros agentes.
4. Las características de las instalaciones, los factores de manejo y humanos definen, en cada granja, el comportamiento epizootológico de la infección y su impacto productivo.

5. Los tipos y subtipos de virus de influenza presentes en las granjas de la República Argentina están relacionados con los tipos y subtipos circulantes en humanos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Estudio retrospectivo: Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante el año 2002. Estudio etiológico en pulmones con lesiones compatibles con neumonía necrótica porcina

3.1.1. Estudio serológico.

Muestras: Las mismas provinieron de 13 granjas de ciclo completo. Las granjas estudiadas estaban ubicadas en las provincias de Buenos Aires (n =7), Santa Fe (n=3) y Córdoba (n=3). Las muestras se obtuvieron de cerdos de las etapas de engorde-terminación (16 a 23 semanas) en un promedio de 26 sueros por granja. Se realizó la evaluación serológica de 693 sueros por la técnica de IHA, 685 sueros por la técnica de ELISA y 680 por ambas técnicas.

3.1.2. Estudio etiológico

Muestras: correspondieron a dos casos compatibles con NNP.

Caso 1: se detectó durante la inspección en frigorífico de animales provenientes de un establecimiento de cría intensiva con aproximadamente 2000 cerdos en la etapa de engorde-terminación. En esta categoría se observó un cuadro respiratorio leve a moderado identificándose, al momento de la evaluación en la planta de faena, que el 3,7 % (95% IC, 1,03- 9,38) de los pulmones (n=106) presentaron lesiones compatibles con NNP.

Caso 2: provino de un establecimiento de cría semi-intensiva con alrededor de 500 animales en el engorde. Aproximadamente un 5 % de los animales presentaban signos de fiebre, letargia, apatía y retraso en el crecimiento. Debido a razones presupuestarias y por decisión del propietario del establecimiento, se realizó el sacrificio de sólo un animal de aproximadamente 70 días, el cual presentaba los signos antes descriptos.

3.1.3. Prueba de IHA

Antígenos: Se utilizaron como antígenos 2 cepas de influenza A humana: A/Sydney/5/97 H3N2 (H3) y A/Bayern/7/95 H1N1 (H1) de circulación en el país.

Tratamiento de los sueros: Los sueros fueron tratados con una enzima destructora de receptores (Denka Seiken, Tokio, Japón) y luego adsorbidos con glóbulos rojos de pavo para remover los inhibidores inespecíficos.

Técnica de IHA: Cada suero se sembró en microplacas de 96 pocillos con fondo en V, realizándose diluciones seriadas en base 2 partiendo de una dilución inicial 1:10. Se adicionó un volumen del antígeno viral ajustado a 4 Unidades Hemaglutinantes (UHA). Las placas se incubaron por 30 min. a temperatura ambiente. Finalmente, se agregó una suspensión de glóbulos rojos de pavo al 0,5% en PBS 0,01 M pH 7,2. Se realizó una segunda incubación por 30 min. a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de los resultados. Las placas fueron colocadas en posición vertical permitiendo que los botones de sedimentación se deslicen desde el fondo de las placas. Para la determinación del título de anticuerpos se consideró la inversa de la dilución más alta en la que se observó IHA. Para muestras individuales, títulos de IHA de 1:10 a 1:20 fueron considerados sospechosos y títulos de 1:40 o superiores fueron considerados positivos. El establecimiento se consideró positivo cuando presentaba, al menos, un suero positivo. De cada granja se calculó el título geométrico medio (TGM) que expresó la media de los títulos de los sueros considerados positivos, sospechosos y negativos.

3.1.4. Prueba de ELISA

Se utilizó un ELISA indirecto comercial con un 99,8 % de sensibilidad y un 99,7 % de especificidad en relación con la prueba de IHA considerada como la prueba de referencia (*gold*

standard) (IDEXX Laboratorios SIV H1N1 y H3N2 Maine, EE.UU.) (9). La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro a 650 nm de longitud de onda (DO: 650nm) (Labsystems Multiskan MS, Finlandia). Las muestras se consideraron negativas o positivas sobre la base del cálculo del S/P *ratio* con un valor de corte de 0,4 (<0,4 negativo, ≥0,4 positivo).

3.1.5. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por la prueba de homogeneidad de Chi cuadrado sobre las proporciones de casos individuales y la proporción de establecimientos positivos con un nivel de confianza del 95 % ($p = < 0,05$). Para establecer la concordancia entre las pruebas de IHA y ELISA tanto a nivel individual como a nivel de establecimiento se calculó el coeficiente de Choen's Kappa (k). El grado de concordancia de las pruebas se evaluó de la siguiente manera: **a)** (0,00 – 0,20) concordancia nula, **b)** (0,21 – 0,40) concordancia escasa, **c)** (0,41 – 0,60) concordancia buena, **d)** (0,61 – 0,80) concordancia muy buena y **e)** (0,80 - 1) concordancia excelente.

3.1.6. Estudios histopatológico, inmunohistoquímico y de microscopía electrónica

Las muestras de pulmón se fijaron en formol neutro al 10 %, se incluyeron en una mezcla de parafina con histoplast (Biopack) y se colorearon con hematoxilina y eosina.

Para la identificación IHQ del virus de influenza se utilizaron muestras frescas incluidas en un medio para cortes por congelación (Tissue-Tek, Miles Inc, USA). Sobre cortes de 4µm, se aplicó un anticuerpo primario monoclonal anti influenza A (Anti-Influenza A, Argene, Variheles-Francia) dilución 1:100. En cortes incluidos en parafina, se realizó la recuperación antigénica con proteinasa K (Dako Corp.) y se utilizó como suero primario un anticuerpo monoclonal

(C65331M, Biodesign), dilución 1:100. En ambos casos, se utilizó LSAB2 (DAKO, Corp) como sistema de detección.

Para la inmunomarcación de PCV-2 se realizó recuperación antigénica enzimática a través de digestión con proteasa XIV (Sigma-Aldrich, Co). Se utilizó un anticuerpo primario policlonal (VMRD, Inc. USA) en dilución 1:500. Como anticuerpo secundario, se utilizó proteína G biotilada. Como sistema de detección se utilizó LSAB (DakoCytomation, USA) y una solución de diaminobencidina como cromógeno. Para ambos virus se utilizaron controles positivos y negativos.

La inmunomarcación para el virus de PRRS fue realizada en Animal Disease Diagnostic Laboratory, School of Veterinary Medicine, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA. La recuperación antigénica sobre los tejidos parafinados se realizó con proteinasa K (Dako Corp.). Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal (Dako Corp.) en dilución 1:800. Como sistema de detección se utilizó EnVision + TM, DAKO una solución de diaminobencidina como cromógeno. En todos los casos se incluyeron controles positivos y negativos.

Microscopía electrónica: las muestras fijadas en formol de ambos casos fueron reprocesadas según las técnicas de rutina para este procedimiento. Se realizó la observación con un microscopio JEOL JEM- 1200 EX.

3.1.7. Estudio bacteriológico

En ambos casos se realizaron estudios bacteriológicos complementarios, con el fin de determinar infecciones bacterianas concomitantes. Se realizó la siembra en agar selectivo para aislamiento de *P. multocida* (PMSA) (Moore y col., 1994) en agar base sangre (Difco, Becton

Dickinson, Le Pont de Claix, France) adicionado con 5% de sangre de carnero, incubándose a 37°C durante 48 h. Se realizó la coloración de Gram (Britania, Buenos Aires, Argentina) y las siguientes determinaciones: hemólisis (agar base sangre [Difco] adicionado con 5% de sangre de carnero), catalasa (Difco), citocromo oxidasa (MacFaddin, 1980), crecimiento en agar MacConkey (Difco), nitrato (MacFaddin, 1980), indol (agar sulfuro indol movilidad, Difco), ornitina decarboxilasa (Difco) y urea (Difco).

El aislamiento de *A. pleuropneumoniae* se realizó en medio de cultivo conteniendo agar PPLO (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) suplementado con 0,1 % glucosa, 0,002 % de NAD (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) y adicionado con 5 % de sangre ovina. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C en atmósfera enriquecida con 10 % de CO₂. Para la identificación de especie se consideraron las características morfológicas y tintoriales del microorganismo aislado así como la producción de β -hemólisis, y las características morfológicas de las colonias. Para la caracterización bioquímica y fisiológica se determinó la producción de oxidasa, catalasa, factor CAMP, ureasa, y dependencia de factor V (GottschalkyTaylor, 2006).

3.2. Estudio longitudinal prospectivo para la determinación de agentes causales de enfermedades respiratorias en 10 establecimientos porcinos de producción intensiva

3.2.1. Estudio epidemiológico

Se evaluaron 11 establecimientos (10 en la Provincia de Buenos Aires, 1 en la Provincia de Santa Fe) durante los meses de abril y julio de 2007. Los establecimientos se visitaron periódicamente con un intervalo aproximado de tres semanas, realizándose una inspección final de las tropas en frigorífico, al momento de la faena.

El criterio de selección de las granjas se basó en el número de madres, (> 100 cerdas en producción) y la presencia de problemas respiratorios (tos, estornudos). Durante el relevamiento se recogieron datos de tipo productivo, mediante una planilla *ad-hoc* (planilla 1). Las encuestas epidemiológicas fueron completadas a través de entrevistas personales con el productor y sus veterinarios asesores e incluyeron preguntas de tipo cerrada o semi-cerradas. En las granjas incorporadas se evaluó la presencia de signos clínicos tales como tos, estornudo y secreciones nasales. Se registró el porcentaje de mortalidad en cada categoría, no sólo durante el periodo que comprendió el relevamiento, sino también durante el año previo al comienzo de este estudio. Para tal fin se utilizaron los registros productivos de cada uno de los establecimientos, estableciéndose tres categorías en producción: maternidad (desde el nacimiento al destete 21 ± 3 días de vida), recría (desde el destete 21 ± 3 días hasta los 70 ± 7 días de vida) y terminación (desde los 70 ± 7 días de vida hasta 195 días -peso de faena- $DS \pm 13.6$).

3.2.2. Diseño experimental

Se seleccionaron al azar, 30 animales de cada establecimiento, con una edad de 21 ± 3 días. Cada uno fue identificado con doble caravana plástica, para su posterior seguimiento. Los animales en estudio se mantuvieron en las mismas condiciones sanitarias, nutricionales y ambientales que el resto de la piara. En cada visita, en los animales previamente identificados, se evaluó la temperatura corporal, se extrajeron muestras de sangre para estudios serológicos y se realizaron hisopados nasales para la detección del virus de influenza. La obtención de muestras para la identificación de otros agentes patógenos diferenciales en el diagnóstico de infección por el virus de influenza, se realizó en los animales previamente seleccionados, a los 21, 56, 86 y 105 días de vida. Por otro lado, cada visita incluyó la realización de estudios *post mortem* de los

animales muertos dentro de los 3 días previos a la misma, obteniéndose muestras para estudios anatomopatológicos y bacteriológicos.

Se realizó la determinación de la ganancia diaria de peso (GDP), mediante el registro del peso individual de los animales en estudio a los 56, 86 y 105 días de vida.

Finalmente, al momento de la faena, se colectaron muestras de sangre y se realizaron hisopados nasales en la planta de faena, además de la inspección de múltiples órganos en el total de la tropa de animales. Debido a cuestiones de manejo de los establecimientos de faena, no en todos se pudo obtener el peso individual de los animales, por lo cual se decidió trabajar con el peso promedio de la tropa para determinar el peso final. En la Figura 11 se presenta un esquema del diseño experimental.

3.2.3. Estudios serológicos

Se obtuvieron muestras de sangre mediante venopunción directa de la vena cava craneal de los animales seleccionados, a los 21, 56, 86 y 105 días de edad y al momento de la faena. Se utilizaron agujas 21G x 1", jeringas de 12 cc. y tubos colectores de vidrio de 20 cc. Las muestras se conservaron a 4° C, hasta su centrifugación (3 minutos a 3000 rpm). El suero obtenido se colocó en tubos de polipropileno de 2 cc, con identificación individual, conservándose a -20° C hasta la realización de las pruebas serológicas correspondientes.

Las muestras se procesaron para la detección de anticuerpos contra virus de influenza porcina H1N1 y H3N2, PCV-2, *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* mediante el método de ELISA. En el caso de la serología para PCV-2 no se procesaron las muestras provenientes de animales de 195 días dada dificultades económicas. Se utilizaron los siguientes kit comerciales: Influenza porcina H1N1 y H3N2 (HerdChek* SIV H1N1 y H3N2, IDEXX Laboratories, Inc,

Maine, USA), *M. hyopneumoniae*, (HerdChek* *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories, Inc, Maine, USA), *A. pleuropneumoniae* (CHEKIT-APP-ApxIV ELISA Test Kit, IDEXX Laboratories, Inc, Maine, USA). Las muestras se consideraron negativas o positivas sobre la base del cálculo del S/P *ratio* con un valor de corte de 0,4 (<0,4 negativo, ≥0,4 positivo). Para esta evaluación se utilizó un software específico (xChek™ Assay Management System version 3.3, IDEXX Laboratories), provisto por el laboratorio productor de la prueba. La detección de anticuerpos contra PCV-2 se realizó con un kit de ELISA de bloqueo (SERELISA® PCV2 Ab Mono Blocking, Lyon, Francia). Las muestras fueron consideradas positivas o negativas sobre la base del cálculo del S/P *ratio* con un valor de corte de 0,5 (<0,5 negativo, ≥0,5 positivo). La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro a 650 nm de longitud de onda (DO: 650nm) (Labsystems Multiskan MS, Finlandia).

3.2.4. Estudios anatomopatológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos

Muestreo: Debido a cuestiones de manejo de cada establecimiento y por razones económicas, no se pudieron sacrificar animales del grupo en estudio cuando presentaron signos respiratorios, por lo que sólo se realizaron exámenes *post mortem* en aquellos animales muertos de forma natural. Por lo tanto la categorización de las lesiones pulmonares se realizó sobre un número variable de animales en cada establecimiento. Así, se analizaron todos los animales muertos dentro de la misma categoría (rango etario) de los animales en estudio que se encontraban en el mismo corral o galpón.

Registro de datos y toma de muestras específicas: Los hallazgos de necropsia se registraron en un formulario estándar, utilizado en el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Se tomaron muestras para estudios histopatológicos e

inmunohistoquímicos de los órganos que evidenciaron cambios macroscópicos. Las muestras se colocaron en una solución de formol neutro al 10%.

Criterio de clasificación: Se determinó la frecuencia total para los distintos tipos de lesiones microscópicas pulmonares, así como la frecuencia de dichas lesiones dentro y para cada uno de los establecimientos. Para su clasificación, y teniendo en cuenta el área anatómica afectada (bronquios, alvéolos, intersticio, y pleura), el tipo de exudado (catarral, fibrinoso, supurativo), el probable agente causal y la presencia de cambios circulatorios, se establecieron siete categorías: 1) Bronconeumonía compatible con neumonía enzoótica porcina (NEP); 2) Bronconeumonía catarral/supurativa (BNCS), 3) Pleuroneumonía (PL), 4) Pleuritis Fibrinosa (PLF), 5) Alveolitis (AV), 6) Bronquitis/bronquiolitis (BB) y 7) Cambios circulatorios (CC).

En la planta de faena, todos los animales de cada tropa fueron inspeccionados. Se realizó la evaluación macroscópica de los pulmones, categorizándose las lesiones sobre la base del porcentaje de a) parénquima afectado, b) cronicidad de la lesión, c) tejido afectado (pleura y parénquima) y d) presencia de adherencias pleurales. Se determinó la frecuencia de animales afectados y el tipo de lesiones prevalentes, así como el porcentaje de parénquima comprometido para cada tipo de lesión. Para tal fin, se inspeccionó un total de 649 animales provenientes de 10 establecimientos con un promedio de 64,9 kg (DS \pm 39,65) por establecimiento. Las lesiones se incluyeron dentro de cuatro categorías según su aspecto macroscópico: 1) neumonía catarral compatible con infección por *M. hyopneumoniae* (M), 2) neumonía catarral complicada (MC), 3) pleuroneumonía (PLC) y 4) fisuras (F).

Las muestras de pulmón obtenidas de aquellos animales que presentaron lesiones macroscópicas se fijaron en formol neutro al 10 %, se incluyeron en una mezcla de parafina con Histoplast (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y se colorearon con hematoxilina y eosina.

IHQ para detección del virus de influenza: se utilizaron cortes parafinados de pulmón de 4µm de espesor que se procesaron mediante el método de inmunoperoxidasa. Se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de H₂O₂ al 3% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Para la recuperación antigénica los cortes se incubaron con una solución de proteasa XIV al 1% (Sigma-Aldrich, Montana, USA), durante 40 minutos a 37°C. Las muestras fueron lavadas por 5 minutos con una solución de PBS-Tween 20. El bloqueo de uniones inespecíficas se realizó cubriendo las muestras con una solución conteniendo 0.5g de leche descremada deshidratada en 20 ml de PBS, por 40 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó un anticuerpo primario, monoclonal anti nucleoproteína (NP) de virus de influenza A MSIg2a (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) en una dilución 1:100 durante 60 minutos a 37°C. Como sistema de detección se utilizó el kit de LSAB (DakoCytomation, USA) y una solución de diaminobencidina como cromógeno. La muestra control positivo fue gentilmente cedida por el Dr. Joaquín Segalés, Universidad Autónoma de Barcelona, España. Por otro lado, secciones del bloque control positivo se incubaron con solución de PBS reemplazando el anticuerpo primario, como control negativo de la técnica.

Inmunomarcación de PCV-2: se realizó recuperación antigénica enzimática con proteasa XIV (Sigma-Aldrich, Montana, USA) al 1%. Se utilizó un anticuerpo primario policlonal (VMRD, Inc, Pullman, USA) en dilución 1:500 y como anticuerpo secundario, proteína G biotinilada en dilución 1:500. Posteriormente los cortes se incubaron con la solución de streptavidina-peroxidasa del kit de LSAB (DakoCytomation, California, USA) y con una solución de diaminobencidina para el revelado. Se utilizaron controles positivos y, en el caso del control negativo, se reemplazó el anticuerpo primario con una solución de PBS.

3.2.5. Estudios bacteriológicos

Durante las necropsias en las granjas se obtuvieron muestras de pulmón en aquellos casos en que se observó lesión macroscópica, a fin de evaluar la presencia de *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae*. Las muestras se colectaron con instrumentos estériles, se colocaron en recipientes plásticos estériles de 50 ml y se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento.

Se realizó la siembra en agar selectivo para aislamiento de *P. multocida* (PMSA) (Moore y col., 1994) en agar base sangre (Difco, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) adicionado con 5% de sangre de carnero, incubándose a 37°C durante 48 h. Los aislamientos de *P. multocida* fueron identificados mediante la utilización del micrométodo comercial API20E (BioMerieux, St. Louis, Missouri, EE.UU.). La identificación de especie y subespecie fue confirmada por las características tintoriales, morfológicas y bioquímicas de los aislamientos (Koneman y col., 1999). La clasificación taxonómica se realizó mediante la secuenciación del gen 16S ARNr según la técnica previamente descrita (Dewhurst y col., 1993).

Se realizó la coloración de Gram (Britania, Buenos Aires, Argentina) y las siguientes determinaciones: hemólisis (agar base sangre [Difco] adicionado con 5% de sangre de carnero), catalasa (Difco), citocromo oxidasa (MacFaddin, 1980), crecimiento en agar MacConkey (Difco), nitrato (MacFaddin, 1980), indol (agar sulfuro indol movilidad, Difco), ornitina decarboxilasa (Difco) y urea (Difco). Cada aislamiento fue inoculado en caldo base rojo de fenol (Difco), conteniendo 1% de los siguientes carbohidratos (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, EE.UU.): glucosa, manosa, arabinosa, dulcitol, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, trehalosa, sorbitol y xilosa. Los caldos inoculados fueron incubados a 37 °C y examinados a las 24 h, 48 h, y a los 7 días. El biotipo se determinó basado en descripciones previas (Fegan y col., 1995; Mutters y col.,

1985). Las cepas fueron conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caldo cerebro corazón (Difco, Detroit, Michigan, EE.UU.) adicionado con 30% de glicerol (ICN), y almacenadas en el Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas (FCV-UNLP).

El aislamiento de *A. pleuropneumoniae* se realizó en medio de cultivo conteniendo agar PPLO (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) suplementado con 0,1 % glucosa, 0,002 % de NAD (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) y adicionado con 5 % de sangre ovina. Las placas se incubaron por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera enriquecida con 10 % de CO_2 . Para la identificación de especie se consideraron las características morfológicas y tintoriales del microorganismo aislado así como la producción de β -hemólisis, y las características morfológicas de las colonias. Para la caracterización bioquímica y fisiológica se determinó la producción de oxidasa, catalasa, factor CAMP, ureasa, y dependencia de factor V (GottschalkyTaylor, 2006).

3.2.6. Estudios moleculares

Muestras: En cada visita se obtuvieron muestras de secreciones nasales para la identificación de virus de influenza porcina mediante rRT-PCR. Previa sujeción de los animales, mediante lazo nasal, se lavó la región del morro con agua corriente y se secó con toallas de papel descartable. En cada animal el hisopado se realizó introduciendo en la cavidad nasal profunda de ambos ollares, un hisopo de dacrón estéril (Eurotubo®, Deltalab, España) el que luego se colocó en crioviales con 1,5 cc de medio de transporte para virología (50% glicerol en una solución de buffer fosfato [PBS] conteniendo 1000 unidades de penicilina G, 200 mg de estreptomicina, 50 unidades de nistatina y 40 mg de gentamicina por ml). Las muestras se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Para el análisis molecular las muestras individuales se reunieron en grupos correspondientes a diez animales, y de cada grupo se obtuvieron 50 µl de la solución de transporte.

Extracción del ARN genómico viral (ARNv) y síntesis del cDNA: el gARN fue extraído del sobrenadante de cada uno de los grupos (QIAamp RNA extraction kit, Qiagen GmbH, Hilden, USA) y seguidamente, se realizó la síntesis del cDNA (High Capacity cDNA archive kit, Applied Biosystems cod. 4322171), utilizando kits comerciales y de acuerdo a los protocolos provistos por las compañías productoras. La síntesis de cDNA se realizó con un volumen final de 30 µl por reacción (3 µl-RT-Buffer 10X, 1.2 µl dNTP mixture 25X, 3 µl ambos primers 10X, 1,5 µl enzima MultiScribe RT 50U/µl, 6.3 µl agua bidestilada, 15µl gARN), bajo las siguientes condiciones de ciclado: 25°C 10 min, 37°C 45 min.

rRT-PCR para detección de influenza tipo A: se evaluó , la detección del gen codificante de la proteína de matriz (M) según descripciones previas (Spackman y col., 2002). Resumidamente, se utilizó un volumen final de 25 µl por reacción (12,5 µl TaqMan UNIVERSAL PCR Master Mix -Applied Biosystems Cod.4304437-, 300 nM de cada primer, 100 nM probe, 2 µl agua bidestilada, 5 µl cDNA) bajo las siguientes condiciones de ciclado: 40 ciclos a 50°C, 2 min; 95°C, 10 min; 95°C, 15 segundos y 60°C, 1 min. Las secuencias de *primers* utilizadas (forward **M+25** : AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG; reverse **M-124** : TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG) así como la secuencia de la sonda (FAM **M+64** : FAM-5'-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-3' -TAMRA) fueron previamente publicadas (Spackman y col., 2002).

3.2.7. Análisis estadístico

Las diferencias entre las frecuencias de mortalidad entre los periodos y los establecimientos estudiados, se analizaron a través de la prueba de ANOVA para datos no paramétricos (Kruskal-Wallis), con un valor de significancia de $P < 0.05$. El análisis post-hoc para determinar qué grupos tuvieron diferencias significativas, se realizó con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's ($P < 0.05$), utilizando el programa Graph Pad Prism 5.01, (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). El intervalo de confianza (IC) para la distribución de las muestras se calculó con la prueba-t para intervalo de confianza, y la diferencia en la frecuencia observada en los signos clínicos entre los establecimientos se evaluó mediante la prueba de ANOVA, considerándose el nivel de significancia $P < 0.05$ con Minitab version 14 (Minitab Inc. 2000, versión 14 para Windows, State College, Pennsylvania). El control estadístico de proceso para la mortalidad mensual en los establecimientos se realizó mediante Xbar-r chart (SPC para Excel, BPI Consulting, LLC, Texas, USA), con el objetivo de detectar valores de mortalidad superiores al promedio histórico. Los parámetros para determinar las variaciones entre grupos se establecieron de la siguiente manera, $> 1 \sigma$ por 5 periodos, 2σ por dos periodos o $>3 \sigma$ en al menos un periodo.

Para el análisis de riesgo de infecciones respiratorias se evaluó la presencia de seroconversión en distintas etapas de la producción y su asociación con variables ambientales y de manejo, consideradas potenciales factores de riesgo. Sólo aquellas variables que presentaron un valor significativo menor a $P = 0,2$ fueron incluidas en el modelo de asociación (Tabla 11). A tal fin se realizó un análisis univariado para determinar la asociación entre ausencia y presencia de seroconversión y factores individuales de manejo. La prueba de Chi –cuadrado fue utilizada para tablas de contingencia de 2×2 , y en aquellas tablas con menos de 5 entradas por celda se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para tal fin se aplicó el procedimiento FREQ procedure, (SAS Inst.

Inc., Cary, NC, Estados Unidos). A posteriori, con aquellas variables obtenidas en el análisis univariado con un valor de $P < 0,2$, se realizó un análisis multivariado. Cuando se consideró necesario, se incluyó un procedimiento de eliminación retrógrada de las variables que finalmente integraron el modelo y se evaluaron las interacciones en ambas direcciones. El modelo de medidas repetidas fue ejecutado, considerando los periodos como medidas repetidas y utilizando una estructura de correlación de auto-regresión. El efecto aleatorio fueron los animales con los residuos para cada grupo. El modelo de regresión se realizó con el procedimiento, GLIMMIX Procedure, (SAS Inst. Inc., Cary, NC, Estados Unidos).

3.3. Brote de influenza porcina causado por una cepa de influenza humana H3N2 no contemporánea

3.3.1. Descripción del establecimiento

El relevamiento se llevó a cabo en un establecimiento ubicado en la Provincia de Buenos Aires, de ciclo completo, dividido en tres sitios de producción: maternidad (sitio I), recría (sitio II), y desarrollo y terminación (sitio III). El mismo contaba con 6000 hembras en producción, con una reposición propia de las reproductoras, que alcanzaba el 28% del plantel al momento de la presentación del cuadro. El sitio II estaba constituido por 10 galpones para alojar a los animales en la etapa de recría. Cada galpón tiene capacidad para alojar una semana de producción con un promedio de 3019 animales. Los animales arriban con un promedio de 21 días de vida, y permanecen en dichos galpones hasta el comienzo de la etapa de engorde/terminación (75 ± 7 días de vida). Al momento de la presentación del cuadro clínico, la población estable en la etapa de recría fue de 24154 animales (población de riesgo). La tasa de mortalidad promedio total del

establecimiento, durante el período previo al brote fue calculada en un 9,5%.

3.3.2. Descripción clínica

En noviembre del año 2008 se observó un cuadro respiratorio agudo con signos clínicos compatibles con infección viral. El cuadro clínico se observó inicialmente en la etapa de recría, donde persistió por un período de 8 semanas y se diseminó a un ritmo de un galpón por semana afectando, al final del brote, ocho galpones sobre un total de nueve. Los signos clínicos incluyeron tos, disnea, estornudos, exudados óculo-nasal, letargia, anorexia y fiebre. Inicialmente el cuadro afectó un 2% de los cerdos de 40 días de vida. La morbilidad se incrementó rápidamente alcanzando hasta un 40% en animales de 48-55 días de edad. Los signos clínicos desaparecieron de forma súbita antes de que estos animales fueran trasladados al sitio III (70-75 días de vida). La comparación de los parámetros productivos (ganancia diaria de peso, consumo de alimentos y mortalidad) de 8 galpones afectados, entre un período de producción previo y el periodo donde se observaron los signos clínicos, no arrojó diferencias significativas.

3.3.3. Estudios anatomopatológicos, histopatológicos y etiológicos

Durante el transcurso del cuadro clínico, un total de 10 animales presentando los signos clínicos previamente descriptos fueron remitidos al Servicio de Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, para su evaluación *post mortem*. Previo a la eutanasia los animales fueron pesados y se registró la temperatura corporal (38,5-39,0 °C normal). Los hallazgos de necropsia se registraron en un formulario estándar, utilizado en el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Muestras: Se tomaron muestras para estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y

microbiológicos (virología y bacteriología) de los órganos que evidenciaron cambios macroscópicos. Las muestras se colectaron con instrumentos estériles, se colocaron en recipientes plásticos estériles de 50 ml y se mantuvieron refrigeradas a 4°C y/o congeladas a -70 °C hasta su procesamiento. Se tomaron múltiples hisopados de bronquios, bronquiolos y pulmón los que se remitieron y procesaron en el laboratorio de Virología de Aves y Cerdos de CICV, INTA Castelar para el aislamiento y posterior identificación del virus de influenza.

Estudio histopatológico: las muestras de pulmón fueron fijadas en formol neutro al 10 %, se incluyeron en una mezcla de parafina con histoplast (Biopack, Buenos Aires, Argentina) y se colorearon con hematoxilina y eosina.

IHQ para la identificación del virus de influenza: se utilizaron cortes parafinados de pulmón de 4µm de espesor, con lesiones orientativas de infección viral los que se procesaron mediante la técnica LSAB2 system (Dako, CA, USA). Se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de H₂O₂ al 3% en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Para la recuperación antigénica los cortes se incubaron con una solución de proteasa XIV al 1% (Sigma-Aldrich, Montana, USA), durante 40 min a 37°C. Las muestras fueron lavadas por 5 min con una solución de PBS-Tween 20. El bloqueo de uniones inespecíficas se realizó cubriendo las muestras con una solución conteniendo 0.5g de leche descremada deshidratada en 20 ml de PBS, por 40 min a temperatura ambiente. Se aplicó un anticuerpo primario monoclonal NP anti-influenza A MSIg2a; IgG1 (Millipore, Temecula, CA, USA) en una dilución 1:500 durante 12 hs a 4°C. Como sistema de detección se utilizó el kit de LSAB (DakoCytomation, CA, USA) y una solución de diaminobencidina como cromógeno. La muestra control positivo fue gentilmente cedida por el Dr. Joaquín Segalés, Universidad Autónoma de Barcelona, España. Como control negativo las muestras se incubaron con PBS en reemplazo del anticuerpo primario.

3.3.4. Identificación viral

Muestras: las muestras de las vías aéreas se colectaron con un hisopo de dacrón estéril (Eurotubo®, Deltalab, España) el que luego se colocó en crioviales con 1,5 cc de medio de transporte para virología (50% glicerol en una solución de buffer fosfato [PBS] conteniendo 1000 unidades de penicilina G, 200 mg de estreptomicina, 50 unidades de nistatina y 40 mg de gentamicina por ml). Las muestras se mantuvieron a -70 C° hasta su procesamiento.

El ARN genómico viral (ARN_v) fue extraído de una alícuota de 50 µl del sobrenadante del medio de transporte (QIAamp RNA extraction kit, Qiagen GmbH, Hilden, USA) y seguidamente se realizó la síntesis del cDNA (High Capacity cDNA archive kit, Applied Biosystems cod. 4322171), para lo cual se utilizaron kits comerciales y se siguió los protocolos provistos por las compañías productoras. La síntesis de cDNA se realizó con un volumen final de 30 µl por reacción (3 µl-RT-Buffer 10X, 1.2 µl dNTP mixture 25X, 3 µl ambos primers 10X, 1,5 µl enzima MultiScribe RT 50U/µl, 6.3 µl agua bidestilada, 15µl gARN), bajo las siguientes condiciones de ciclado: 25 °C 10 min, 37 °C 45 min.

El cDNA extraído de las muestras sospechosas de influenza porcina se evaluó con la técnica de rRT-PCR, dirigida contra el gen codificante de la proteína de matriz (M) como se ha descrito previamente (Spackman y col., 2002). Brevemente, se utilizó un volumen final de 25 µl por reacción (12,5 µl TaqMan UNIVERSAL PCR Master Mix (Applied Biosystems Cod.4304437), 300 nM de cada primer, 100 nM probe, 2 µl agua bidestilada, 5 µl cDNA) bajo las siguientes condiciones de ciclado: 40 ciclos a 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 95 °C 15 segundos, y 60 °C 1 min. Las secuencias de *primers* utilizadas (forward **M+25** : AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG; reverse **M-124** : TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG) así como la secuencia

de la sonda (FAM **M+64** : FAM-5'-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-3' –TAMRA) fueron previamente publicadas (Spackman y col., 2002).

3.3.5. Aislamiento viral

Las muestras positivas por la técnica de rRT-PCR fueron procesadas para el aislamiento viral en células MDCK. Se utilizaron 200 µl de una suspensión al 10% de PBS de homogenizado de tejido pulmonar y/o hisopado nasal. La suspensión fue clarificada por centrifugación a 3000 x g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue inoculado en células MDCK según el protocolo descrito por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) (2000). Se constató la replicación viral sobre la base de la identificación de efecto citopático y la confirmación por rRT-PCR.

3.3.6. Análisis genético y caracterización filogenética

A partir del aislamiento en células MDCK se obtuvo el virus denominado A/swine/Argentina/CIP051-A2/08 (H3N2) -de aquí en adelante A2/08-. El genoma viral fue amplificado por la técnica de RT-PCR como fuera previamente descrito (Hoffmann y col., 2001). La secuenciación se realizó con el kit BigDye Terminator (Applied Biosystems TM, Foster City, CA, EE.UU.) en un equipo ABI 3730 (Applied Biosystems TM, Foster City, CA, EE.UU.). La información genómica se obtuvo a partir de secuencias superpuestas cubiertas por *forward* y *reverse primers*. Para la secuenciación se realizaron al menos dos reacciones independientes de RT-PCR para cada gen. Las secuencias fueron ensambladas, editadas y analizadas con Lasergene 8.1 (DNASTAR). Para determinar la proximidad genética del virus con otras cepas circulantes, se realizó el análisis nucleotídico en BLAST (en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) de

cada uno de los segmento genómicos del virus asilado.

3.3.7. Estudios serológicos

Se realizó un estudio serológico transversal en cerdos contemporáneos a aquellos que sufrieron el brote de enfermedad respiratoria (56 días de vida) 30 y 50 días posteriores a la desaparición de los signos clínicos.

Muestras: se obtuvieron mediante venopunción directa de la vena cava craneal de 10 animales, de cada grupo etario. Se utilizaron agujas 21G x 1", jeringas de 12 cc., y tubos colectores de vidrio de 20 cc. Las muestras se conservaron a 4° C, hasta su centrifugación durante 3 minutos a 3000 rpm. El suero obtenido se colocó en tubos de polipropileno de 2 cc, con identificación individual, conservándose a -20° C hasta la realización de las pruebas serológicas correspondientes.

Detección de anticuerpos por ELISA: Las muestras se procesaron para la detección de anticuerpos contra influenza porcina H1N1 y H3N2, mediante el método de ELISA (HerdChek* SIV H1N1 y H3N2, IDEXX Laboratories, Inc, Maine, USA). Las muestras se consideraron negativas o positivas sobre la base del cálculo del S/P *ratio* con un valor de corte de 0,4 (<0,4 negativo, ≥0,4 positivo) mediante un software específico (xChek™ Assay Management System version 3.3, IDEXX Laboratories), provisto por el laboratorio productor de la prueba. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro a 650 nm de longitud de onda (DO: 650nm) (Labsystems Multiskan MS, Finlandia).

4. RESULTADOS

4.1. Estudio retrospectivo: prevalencia serológica del virus de Influenza A en cerdos en Argentina durante el año 2002

La prevalencia serológica intra-granja fue variable dependiendo de la técnica utilizada. Así, por la técnica de IHA se observó una variación de entre el 38,5 % y el 100 % para el subtipo H1 y de entre el 7,7 % y el 100 % para el subtipo H3 (Figura 1). Asimismo, en aquellos establecimientos detectados positivos por la técnica de IHA, se observó una amplia distribución del TGM en los animales positivos tanto para los subtipos H1N1 y H3N2, yendo desde títulos de 1:40 y alcanzando valores de 1:1280 (Figura 2-3). Por otro lado, mediante la técnica de ELISA, los valores de prevalencia oscilaron entre el 2,3 % y el 6,9 % para el subtipo H1 y entre el 9,6 % y el 48 % para el subtipo H3 (Figura 4). En la tabla 1, se indica la prevalencia total para los subtipos H1 y H3 así como las muestras con reacción positiva para ambos subtipos. El análisis estadístico de la prevalencia intra-granja obtenida por las pruebas de IHA y ELISA arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p = < 0,001$).

A nivel establecimiento no se observaron diferencias significativas entre ambas técnicas utilizadas (H1: $p = 0,20$; H3: $p = 0,11$). La prevalencia a nivel granja para los subtipos H1 y H3, así como la prevalencia para ambos subtipos, se expresan en la tabla 2.

La concordancia observada entre las pruebas a nivel individual fue nula, mientras que a nivel de granja, fue escasa (Tabla 3).

4.2. Estudio retrospectivo: estudio etiológico en pulmones con lesiones compatibles con neumonía necrótica porcina

En el estudio etiológico de casos compatibles con NNP, los hallazgos macroscópicos correspondieron a un cuadro de bronconeumonía con localización en los lóbulos anteriores y sin

compromiso pleural. Se observaron bronquiolitis necrótica e hiperplasia del epitelio bronquiolar con presencia de células necróticas y polimorfonucleares en la luz de los bronquios y bronquiolos e infiltrado de células linfoides peribronquilar y perivascular (Figura 5).

En los alvéolos las lesiones fueron de tipo exudativo y proliferativo (Figura 6A- 6B). Las primeras consistieron en alvéolos con exudado serofibrinoso y proliferación e infiltración de macrófagos en el septo y en la luz alveolar. Las lesiones proliferativas se caracterizaron por hiperplasia de neumocitos tipo II y proliferación de tejido conjuntivo en la pared alveolar.

La inmunomarcación del virus de influenza resultó positiva solamente en las muestras procesadas mediante la técnica de congelación y se localizó en las células descamadas en la luz de los bronquios y bronquiolos así como en los macrófagos intersticiales (Figura 7).

La inmunomarcación de PCV-2 consistió en una fuerte reacción positiva en los macrófagos alveolares e intersticiales y moderada en las células de la lámina propia de las vías áreas, bronquios, bronquiolos y en histiocitos intersticiales (Figura: 8-9). Ninguna de las muestras procesadas para la detección del virus de PRRS evidenció señal positiva.

Durante el análisis morfológico de las muestras mediante microscopía electrónica, se observaron abundantes estructuras intracitoplasmáticas de forma redonda a poligonal, de aproximadamente 80-100 nm. Dichas estructuras se caracterizaron por la presencia de una corona de espículas periféricas y resultaron compatibles con partículas virales de la familia *Orthomyxoviridae* (Figura 10).

De ambos casos se aisló e identificó *P. multocida*.

4.3. Estudio longitudinal prospectivo para la determinación de agentes causales de enfermedades respiratorias en 10 establecimientos porcinos de producción intensiva

4.3.1. Estudio epidemiológico

El promedio de madres por establecimiento fue de 225 (DS±110). El *stock* promedio durante el periodo de estudio fue de 789 (DS± 386) y 1690 (DS± 827) para las etapas de recría y engorde-terminación respectivamente. Los establecimientos se caracterizaron como de cría intensiva confinada con múltiples sitios dentro del mismo predio. La frecuencia observada de establecimientos para cada una de las características de producción, así como los factores considerados de riesgo se expresan en la tabla 4. La edad promedio en que los animales alcanzaron el peso de faena fue de 195 días (DS±13,6) (Figura 12A) con un peso promedio de 104,6 kg (DS± 6,06) (Figura 12B). La ganancia de peso promedio observada en las granjas para los periodos entre los 56-82 días fue de 529 g (95% IC 383-675) (n = 6), entre los 82-105 días, 594 g (95% IC 435-753) (n = 7) y para el periodo comprendido entre los 105 días y la faena fue de 620 g (95% IC 524-717) (n = 9). La ganancia diaria global desde los 56 días hasta la faena fue de 632 g (95% IC 596-669) (n = 9) (Figura 12C). Debido a la falta de registro en uno de los establecimientos, la mortalidad se calculó en 10 establecimientos excluyendo así a G5 del análisis. La mortalidad global a lo largo de toda etapa de producción, evaluada durante un periodo de 12 meses incluyendo los 4 meses del relevamiento epidemiológico, fue de 18,24% (95% IC 16,8-19,6). Cuando se evaluó la mortalidad promedio para cada una de las categorías de producción, se observó que en la maternidad fue de 10,19% (95% IC 9,5-10,8), en la recría fue de 3,88% (95% IC 3,1-4,6) y en la etapa de terminación fue de 4,3% (95% IC 3,7-4,8). Sin embargo, no sólo se observaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el promedio de mortalidad

global entre establecimientos (Figura 13A), sino que un número variable de establecimientos mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a su promedio de mortalidad por etapa de producción a lo largo de un año (Figura 13B, 13C, 13D). Todos los establecimientos evidenciaron, al menos, un periodo con aumento significativo de la mortalidad global (Figura 14A). En todos los establecimientos, excepto en G1, se observó al menos un periodo que superó el control estadístico de proceso durante los meses en que se llevó a cabo este relevamiento. El mismo análisis fue realizado en las distintas etapas de producción observándose la misma tendencia que para la mortalidad global (Figura 14B, 14C, 14D).

Debido a la falta de registros de prevalencia para cada uno de los signos clínicos evaluados, estos se categorizaron como presentes o ausentes sobre la base de las entrevistas a los veterinarios asesores y lo observado en cada una de las visitas a los establecimientos. Así, los establecimientos fueron considerados positivos cuando cada una de las variables fue reportada u observada afectando a más del 50% del plantel. Dado que la presencia de signos respiratorios fue uno de los requisitos para que los establecimientos entraran en este relevamiento, estos se agruparon por subcategorías, teniendo en cuenta la edad afectada (recría, desarrollo-terminación) y el tipo de signo clínico observado (tos, estornudo, descarga óculo-nasal, distribución del cuadro, duración del cuadro), estimándose la frecuencia de establecimientos afectados. También se registró la frecuencia de establecimientos que presentaron signos sistémicos compatibles con síndrome de adelgazamiento multisistémico posdestete. Para tal fin se evaluó la presencia de animales con adelgazamiento, palidez, disparidad en los pesos dentro de los lotes y disminución del consumo de alimento (Tabla 5).

En la etapa de recría, se observaron tos y estornudos, en un 63% de los establecimientos (95% IC; 30,0-89,0). No se identificaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la frecuencia de

establecimientos con respecto a la presencia de descargas óculo-nasales 36,3% (95% IC; 10,9-69,2) y postración e inactividad 45,4% (95% IC; 16,7-76,6). Se observó que la frecuencia para la distribución aleatoria de los signos clínicos, 72,2% (95% IC, 39,0-93,9), fue significativamente mayor (P 0,001) que el resto de las distribuciones. Finalmente, no se observaron diferencias significativas (P 0,25) entre la frecuencia de establecimientos con diferente duración de los cuadros respiratorios. Así, la frecuencia de establecimientos que mostraron signos clínicos por un periodo de entre 1-7 días, fue del 18,1% (95% IC, 22,8-51,7), entre 7-21 días, 27,2 % (95% IC, 6,0-60,9), hasta dos meses, 9,0% (95% IC, 0,2-41,9) y con presentación persistente, 45,4 % (95% IC, 10,9-69,2).

En la etapa de desarrollo-terminación se observó la misma tendencia, con diferencias estadísticamente significativas con respecto a la frecuencia de establecimientos que presentaron tos, 81,8% (95% IC, 42,8-97,7) y estornudos, 72,7% (95% IC, 39,0-93,9) (P 0,035). No se observaron diferencias (P 0,635) en la frecuencia de establecimientos que presentaron descarga óculo-nasal, 36,3% (95% IC, 10,9-69,2) o postración e inactividad, 45,5% (95% IC, 16,7-77,6). En el 100% de los establecimientos se observó una distribución aleatoria de los cuadros respiratorios. En la etapa de desarrollo-terminación, la frecuencia de establecimientos que presentaron una duración de los signos clínicos entre 1-7 días (18,1%) y de forma persistente (45,5%) (95% IC, 16,7-77,7), fue significativamente mayor (P 0,015) que la observada para el intervalo 7-21 días (0%) (95% IC, 0,0-23,8), y hasta dos meses (9,0%) (95% IC, 0,22-41,2).

Referente a los signos clínicos sistémicos, se observó una diferencia significativa (P 0,01) en la frecuencia de establecimientos con signos de adelgazamiento (81,8%) (95% IC, 48,2-97,7), mientras que no se observaron diferencias en el porcentaje de establecimientos donde los lotes presentaban palidez (63%) (95% IC, 30,7-89,0) y diarrea (63%) (95% IC, 30,7-89,0). La

disminución del consumo se vió afectada sólo en un 18,18% (95% IC, 2,2-54,7) de los establecimientos durante el periodo en estudio. La frecuencia de establecimientos para cada una de las categorías en producción y los signos clínicos evaluados se expresa en la Tabla 5.

4.3.2. Estudio anatomopatológico

Sobre un total de 42 muestras analizadas provenientes de 10 establecimientos, el 38,1% (95% IC, 0,06-12,5) presentó lesiones compatibles con BNCS, el 23,8% (95% IC, 9,73-37,8) con CC, el 14,2% (95% IC, 2,51-26,05) con PLF, el 11,9 % (95% IC, 3,98-25,6) con BB, el 9,5% (95% IC, 2,65-22,62) con PL. Sólo un bajo porcentaje presentó lesiones compatibles con NEP 2,4% (95% IC, 0,06-12,5). No se observaron lesiones compatibles con AV. Los establecimientos se consideraron positivos para los distintos tipos de lesiones pulmonares, cuando al menos un animal presentó lesiones con las características previamente descritas. Así, lesiones de tipo BNCS fueron observadas en 7/10 establecimientos, CC en 5/10, PLF en 4/10, PL 3/10, BB 2/10, y NEP en 1/10. En la Tabla 6 se presenta en detalle la frecuencia de lesiones histopatológicas por establecimiento y tipo de lesión.

Sumado a las lesiones pulmonares también se evaluó la presencia de lesiones histopatológicas en otros órganos. Así, en todos aquellos animales de quienes se obtuvieron muestras para evaluar lesiones pulmonares se colectaron muestras de linfonodos superficiales y profundos, tonsilas, riñones, corazón, hígado e intestino delgado y grueso. La frecuencia y tipo de lesiones observadas sobre el total de animales analizados por establecimiento se expresa en la Tabla 7.

La evaluación de los pulmones en frigorífico evidenció que sobre un total de 649 animales evaluados, 392 (60,5 %) presentaron algún tipo de lesión pulmonar. La frecuencia con la que se

observaron lesiones de tipo M varió entre el 16,6 % y el 90% entre establecimientos. Mientras que la frecuencia de animales que presentaron lesiones de tipo MC, F y PLC varió entre 0-66,7%, 0-36,1% y 0-25% respectivamente. La distribución total de lesiones por establecimiento se describe en la tabla 8. El porcentaje de parénquima afectado según tipo de lesión varió para cada establecimiento desde 4,2-16,2% para lesiones de tipo M, 0-21,7% para MC, 0-13,1% para F y 0-41,7% para lesiones de tipo PLC (Tabla 8).

4.3.3. Estudio serológico

Mediante la evaluación serológica, a los 56, 85, 105 y 193 días de vida, no se detectaron anticuerpos contra los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza. La frecuencia de animales seropositivos a *M. hyopneumoniae* varió a lo largo del período de estudio. Así, la prevalencia promedio intra-granja fue de 58% (95% IC 30,6-85,35) a los 21 días de vida, 48% (95% IC 14,3-81,7) a los 35 días de vida, 41% (95% IC 15,8-66,1) a los 56 días de vida, 41 % (95% IC 20,1-61,9) a los 86 días de vida, 46 % (95% 18,7-73,2) a los 105 días de vida y 63 % (95% IC 36,0-89,9) a los 195 (DS±13,6) días de vida. A los 21 días solamente G1 fue negativa contra *M. hyopneumoniae* y permaneció con este perfil serológico hasta los 86 días. El porcentaje por etapa para cada establecimiento está representado en la Figura 15A. Todas las granjas fueron positivas para *A. pleuropneumoniae* a los 21, 35 y 56 días. A los 105 días de vida sólo G8 y G9 fueron negativas volviendo a mostrar seroconversión a los 165 días. La prevalencia intra-granja fue del 100% (95% IC 100,0-100,0) a los 21 días de vida, 97% (95% IC 92,2-101,8) a los 35 días de vida, 71% (95% IC 58,2- 83,8) a los 56 días de vida, 27 % (95% IC 7,3-46,6) a los 86 días de vida, 33 % (95% 7,9-58,0) a los 105 días de vida y 39 % (95% IC 7,9-58,0) a los 195 (DS±13,6) días de vida. El porcentaje de animales afectados por etapa para cada establecimiento

se representa en la Figura 15B. Por razones económicas sólo 10 granjas fueron evaluadas para determinar la presencia de anticuerpos contra PCV-2. A los 21 y 35 días de edad todas las granjas fueron seropositivas a PCV-2. Sin embargo G4, G6 y G7 fueron negativas a los 56, 86 y 105 días respectivamente. La prevalencia intra-granja fue del 80% (95% IC 63,5-96,4) a los 21 días de vida, 77,5% (95% IC 59,7-95,3) a los 35 días de vida, 32 % (95% IC 8,5- 56,4) a los 56 días de vida, 20 % (95% IC 3,5-36,43) a los 86 días de vida, y 20 % (95% 0,3-40,3) a los 105 días de vida. El porcentaje de animales seropositivos por etapa, para cada establecimiento, se representa en la Figura 15C.

4.3.4. Estudios inmunohistoquímicos y bacteriológicos

Se observó inmunomarcación contra PCV-2 en lesiones pulmonares en un 72 % de los establecimientos evaluados (8/11). Sobre un total de 40 muestras con lesiones pulmonares, se observó inmunomarcación contra PCV-2 en un 40 % (16/40) de los animales (Tabla 9). En ninguna de las secciones pulmonares se detectó virus de influenza porcina (Tabla 9). En todos los animales evaluados en granja las muestras de pulmón fueron procesadas para la determinación de los agentes bacterianos más comunes causales de enfermedades respiratorias. Así, los hallazgos más prevalentes fueron *P. multocida* biovar 3, *P. multocida* biovar 2, y *A. pleuropneumoniae*. La distribución de dichos agentes, por establecimientos, se expresa en la Tabla 10.

4.3.5. Análisis de factores de riesgo y estudio de la correlación entre los perfiles serológicos, contra cuatro agentes que producen infecciones respiratorias, con las lesiones en frigorífico y la ganancia diaria de peso

El perfil serológico contra *M. hyopneumoniae* presentó diferencias significativas entre los periodos de maternidad y recría $P = 0,001$ (OR 0.243; 95% IC 0,089-0,665) y entre el periodo de recría y terminación $P = 0,01$ (OR 0,23; 95%IC 0,072- 0,751). La prevalencia serológica contra *A. pleuropneumoniae* mostró diferencias significativas entre las etapas de maternidad y recría $P < 0,001$ (OR 27,1; 95% IC 9,29-79,1) pero no se observaron diferencias entre las etapas de recría y terminación $P = 0,27$ (OR 1.28; 95%IC 0,75-2,19). Las etapas de maternidad y recría mostraron diferencias con respecto al porcentaje de animales positivos contra PCV-2, $P < 0,001$ (OR 2,65; 95% IC 1,66- 4,24). Sin embargo no se observaron diferencias entre las etapas de recría y terminación $P = 0,94$ (OR 1,07; 95% IC 0,65-1,78).

En relación a la asociación de factores de riesgo, se observó que el manejo todo adentro/todo afuera, la limpieza de los corrales con agua caliente y el tamaño del establecimiento fueron variables con menor probabilidad (factores protectores) de favorecer la seroconversión contra *M. hyopneumoniae*. Por el contrario, el tratamiento profiláctico así como el tratamiento con antibióticos fueron considerados factores de riesgo para la presencia de animales seropositivos contra *M. hyopneumoniae*. Las variables manejo todo adentro/todo afuera, la presencia de pisos enrejados (o emparrillados), así como tratamientos antibióticos fueron considerados factores de riesgo para la presentación de animales seropositivos contra *A. pleuropneumoniae*. Las variables manejo de limpieza y desinfección, así como el tamaño de granja no parecen ser factores de riesgo asociados a la seroconversión contra *A. pleuropneumoniae*. El uso de mediación profiláctica presentó una menor probabilidad de favorecer la seroconversión contra *A. pleuropneumoniae*.

El tamaño del establecimiento, sumado al factor limpieza y desinfección tuvieron un papel importante como factores de riesgo en la presencia de animales seropositivos contra PCV-

2. No se observó asociación entre el manejo todo afuera/todo adentro, la presencia de pisos semi-sólidos y el manejo profiláctico de rutina, con la presencia de animales seropositivos contra PCV-2. Por último, el uso de tratamiento antibiótico parece tener muy baja asociación causal en la presencia de seroconversión contra PCV-2 (Tabla 12).

Cuando se determinó el porcentaje y tipo de lesiones que los animales presentaban en la planta de faena para establecer su correlación con el perfil serológico del establecimiento, se observó que el porcentaje promedio de cerdos con lesiones pulmonares en frigorífico fue 51% (DS±19,2). El tipo de lesión, en porcentaje, fue: M 24.6% (DS±14,17), F 13.37% (DS±11,93), MC 13,03% (DS ±9,45) y PLC 1.87% (DS ±2,87). El promedio de edad a faena fue 195 días (DS±13,6). El peso promedio de faena fue 104kg (DS±6) y la GDP 602g/día (DS±92).

Se observó una correlación negativa entre la GDP a los 82-105 días y el porcentaje de animales seropositivos a *A. pleuropneumoniae* a los 165 días ($r = -0,786$, $P = 0,036$).

La correlación entre la GDP 82-105, GDP 105-faena y el porcentaje de seropositivos a *M. hyopneumoniae* a los 86 y 165 días respectivamente fue de carácter negativo ($r = -0,778$, $P = 0,023$); ($r = -0,821$, $P = 0,007$). La < GDP entre los 82-105 días mostró correlación con el porcentaje de cerdos con lesiones de tipo MC ($r = -0,714$, $P = 0,023$) (Tabla 13).

4.4. Brote de influenza porcina causado por una cepa de influenza humana H3N2 no contemporánea

4.4.1. Hallazgos anatomopatológicos histopatológicos y de inmunohistoquímica

Los 10 animales enviados para su evaluación *post mortem* pertenecían a la etapa de recría con una edad promedio de 49 días (rango 45-51 días) y presentaron un peso promedio de 11.92

kg (SD± 3,17). La temperatura corporal fue variable, observándose 4 animales dentro de los valores normales para esta etapa, dos de ellos estaban hipotérmicos, y solamente en 3 casos se consideró que los animales presentaban un cuadro febril (tabla 14).

El 90% (9/10) de los cerdos evaluados presentaron consolidación pulmonar cráneo-ventral la cual comprometió desde el 5 al 60% del parénquima pulmonar. Dos de los cerdos evaluados presentaron múltiples focos diseminados de consolidación pulmonar de color rojo oscuro (lesión en tablero de ajedrez) (Figura 16A, B), y en tres de ellos se observó pleuritis de tipo fibrinosa. El 40% de los animales (4/10) presentó algún grado de compromiso de los cornetes nasales, variando las lesiones de rinitis atrófica desde grado 2 a 4. Un solo animal presentó lesiones en tracto gastrointestinal, caracterizadas por abundante ingesta sin digerir y contenido intestinal líquido y de color amarillo. Los hallazgos macroscópicos se resumen en la tabla 14. El diagnóstico presuntivo, sobre la base del examen anatomopatológico, fue neumonía de tipo viral en siete cerdos y de tipo bacteriana en dos de los cerdos examinados.

Durante la evaluación histológica se observó que el 70% (7/10) de los cerdos presentaron severa bronquiolitis necrótica. Los bronquiolos estaban ocluidos por neutrófilos y células necróticas descamadas. Las vías aéreas afectadas presentaron descamación epitelial y/o revestimiento de epitelio plano (Figura 17A,B). Las paredes alveolares se observaron engrosadas y con infiltración de células mononucleares, formando un patrón de tipo lobulillar. Un animal presentó la luz alveolar ocupada por macrófagos, neutrófilos y exudado fibrinoso. En el 20% (2/10) se observó bronconeumonía. Uno de los casos presentó hiperplasia del epitelio bronquiolar y severa infiltración de polimorfonucleares en la luz de las vías aéreas; el otro evidenció una bronconeumonía supurativa y pleuritis. En un animal, la mucosa nasal presentó severa infiltración de linfocitos y neutrófilos, con cuerpos de inclusión en las células epiteliales de las

glándulas túbuloalveolares de la mucosa nasal. En un caso se observaron lesiones intestinales caracterizadas por colitis y cecitis catarral. En dos casos no se observaron lesiones de carácter diagnóstico.

En el 40% de los casos evaluados por IHQ se observó que las células epiteliales bronquiales y bronquiolares presentaron una fuerte marcación citoplasmática y nuclear contra el antígeno NP, asociada a mínimos cambios inflamatorios caracterizados por escasas células mononucleares intra-alveolares (Figura 18A, B). Los cambios histológicos e inmunohistoquímicos se resumen en la tabla 15.

4.4.2. Aislamiento en cerdos y caracterización de una cepa humana de influenza A subtipo H3N2 no contemporánea

Todas las muestras analizadas, con diagnóstico presuntivo de neumonía viral, presentaron señal positiva por rRT-PCR frente al gen de matriz del virus de influenza. Las muestras positivas por rRT-PCR, fueron inoculadas en células MDC, para el aislamiento viral. Después de dos pasajes, se realizó el aislamiento del virus de influenza a partir del homogeneizado de las muestras de pulmón. Dichos aislamientos fueron posteriormente amplificados por PCR y secuenciados. La secuenciación completa del genoma de A/swine/Argentina/CIP051- A2/2008 (H3N2) (A2/08) reveló 96-98% de identidad nucleotídica con cepas H3N2 del virus de influenza humana que circuló en Oceanía y América del Norte desde 2000 a 2003 (Tabla 16).

4.4.3. Estudios serológicos

Con excepción de una muestra positiva a H3N2, todos los sueros fueron negativos a H1N1 y H3N2. De las muestras tomadas al momento de la faena el 98% fueron positivas al subtipo H3N2.

5. DISCUSSION

5.1. Estudio retrospectivo: Prevalencia serológica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante el año 2002. Estudio etiológico en pulmones con lesiones compatibles con neumonía necrótica porcina

La prevalencia individual observada para el subtipo H1 por la técnica IHA fue del 89,6 % (IC 54,55 - 98,07) y resultó cercana a los valores observados en EE.UU, entre los años 1998 y 2000 (66,3 % - 100 %) (Choi y col., 2002). Sin embargo, difiere de lo descrito en Europa (20% - 25 %) y en China (3,4 % al 12 %) para la cepa porcina clásica (Brown, 2000; Li y col., 2004). Las diferencias en la prevalencia serológica observada entre EE.UU y Asia podrían ser relativa, ya que la cepa porcina H1N1 observada en EE.UU es filogenéticamente cercana a la cepa circulante en la población humana lo cual aumentaría el número de reacciones cruzadas, incrementándose el porcentaje de animales seropositivos detectados. Sin embargo, en la UE el subtipo H1N1 predominante está relacionado con cepas de origen aviar (Marozin y col., 2002), con menor probabilidad de reacciones cruzadas.

La alta prevalencia individual obtenida por la prueba de IHA sumada a la alta sensibilidad de esta técnica, sugieren que en las poblaciones porcinas de la Argentina circularon, al menos desde 2002, cepas virales humanas o cepas porcinas con gran proximidad filogenética a las utilizadas en este estudio.

En relación al subtipo H3N2, en EE.UU. no se describieron casos clínicos provocados por cepas antigénicamente relacionadas a cepas humanas hasta 1984 (Brown, 2000; EasterdayyVan Reeth, 1999). Se demostró que existe reacción cruzada entre cepas, en particular con la cepa A/Sydney/5/97 H3N2 (Van Reeth y col., 2006). Sin embargo este subtipo circulante, resultante de una doble o triple recombinación, contiene material genético de cepas humanas (HA, NA, PB1) (Webby y col., 2004). Desde 1998, se observaron infecciones naturales, respuesta inmune y

aislamientos de este subtipo viral (Olsen, 2002; Zhou y col., 1999). En nuestro estudio, la prevalencia serológica a nivel individual fue de 73,8 % (IC 69,08 – 78,51) cercana a la descrita en EE.UU. (65,1 %) y México (56 %) (6, 21) y difirió de las descritas en UE y Asia (Choi y col., 2002; Lee y col., 1993; Maldonado y col., 2006). Sin embargo, a nivel de establecimiento, los resultados obtenidos mediante la prueba de ELISA (H1 y H3) fueron diferentes a los descritos en otros países (Jung y col., 2002).

La detección de anticuerpos contra los subtipos H1 y H3 es variable según el país donde se realizó el estudio, por ejemplo, en Corea 25,3 % (Jung y col., 2007); 6,6 % en México (Fleites y col., 2004) y en EE.UU. 1,4-2,5 % (Choi y col., 2002). En este trabajo, el alto porcentaje de sueros positivos para ambos subtipos (62,4 %) fue similar al porcentaje de establecimientos positivos (76,9 %). La ausencia de reactividad cruzada entre los subtipos H1 y H3 ha sido documentada (Webby y col., 2000), por lo que estos resultados reflejarían la circulación de ambos subtipos.

Ambas pruebas serológicas tienen una sensibilidad variable y son de alta especificidad (Chittick y col., 2002). No hay consenso respecto a la concordancia, siendo nula (Janke, 2000) o mayor del 80 % (Chittick y col., 2002; Skibbe y col., 2004). En este estudio se observó una concordancia nula a nivel individual y escasa a nivel establecimiento. Esto podría explicarse por los diferentes antígenos utilizados en la prueba de IHA (cepas de origen humano) y ELISA (cepas porcinas) (Skibbe y col., 2004).

Probablemente, las diferencias observadas entre ambas pruebas se deban a las características inherentes a las mismas, a los diferentes antígenos utilizados y a los isotipos de anticuerpos detectados por cada una de ellas.

Durante el período en que se desarrolló este trabajo, en la Argentina no se registraron casos clínicos confirmados de influenza A en las poblaciones porcinas. Asimismo, tampoco se registraron aislamientos virales provenientes de cerdos. Se descarta la posibilidad de detección de anticuerpos vacunales ya que no existen vacunas comerciales disponibles en el mercado. Los resultados obtenidos reflejan la circulación del virus de influenza A subtipos H1 y H3 en la población porcina nacional desde al año 2002.

Debido a la pobre concordancia observada entre las pruebas diagnósticas utilizadas en este estudio, la prueba de ELISA, podría ser de utilidad para el diagnóstico a nivel de establecimiento ya que esta última detectó al menos un animal positivo en cada establecimiento. El relevamiento y actualización de las cepas circulantes no solo resultará beneficioso para la industria porcina, sino también para los programas de salud pública que deben conocer las nuevas variables antigénicas del virus involucradas.

Los resultados del estudio etiológico en las lesiones compatibles con NNP concuerdan, en parte, con los indicados en la bibliografía, en la que se hace referencia a la identificación de más de un agente viral como causal de esta entidad (Drolet y col., 2003; Larochelle y col., 1994; Pesch S y col., 2000). Sin embargo, tanto en Canadá (Drolet y col., 2003) como en Alemania (Rekik y col., 1994) e Italia (Morandi y col.), la participación viral más comúnmente observada en casos de NNP fue la del PRRSv sólo o en combinación con PCV-2 y no así la asociación entre VI y PCV-2. Contrariamente, estudios recientes realizados en Europa muestran a PCV-2, sólo o en asociación con PRRSv, como el agente más frecuentemente detectado en lesiones NNP (Grau-RomaySegales, 2007; SzeredySzentirmai, 2008). El hecho que el VI en cerdos ha sido prácticamente descartado en estudios de campo como agente causal de NNP, debido a su baja prevalencia en las lesiones pulmonares, no lo invalida como uno de los posibles agentes causales

de este tipo de lesiones. En estudios experimentales se ha podido reproducir el cuadro con las lesiones descritas, con cepas de VI antigénicamente diferentes a las observadas en casos de campo. (Dea y col., 1992; Rekik y col., 1994). La situación de nuestro país, libre de PRRSv, sumado a que en el momento de este relevamiento no había información de aislamiento de VI en cerdos, dificulta la interpretación de la etiopatogenia de NNP. La marcación positiva para el virus de influenza lograda mediante una sola de las técnicas utilizadas podría atribuirse al corto tiempo posinfección durante el cual el virus puede ser detectado, o a problemas inherentes a la técnica como, por ejemplo, el método de recuperación antigénica. La detección de PCV-2 y el aislamiento de *P. multocida* en ambas muestras, soportan la suposición de una amplia difusión de este virus en nuestro medio, aún en cerdos en terminación. El aislamiento de *P. multocida* de los pulmones afectados concuerda con hallazgos previamente descritos (Hansen y col., 2010). La presencia de numerosos agentes bacterianos ha sido asociada con infecciones virales primarias, que facilitarían, luego del ingreso al tracto respiratorio, la colonización de las vías aéreas (DoneyWhite, 2003; Lopez-Soria y col., 2010; Palzer y col., 2008). Este último punto es de suma importancia ya que la colonización bacteriana secundaria muchas veces podría enmascarar las lesiones primarias causadas por una infección viral inicial. En este relevamiento tres agentes fueron identificados en lesiones de NNP, no descartándose la posibilidad que otros agentes como el virus de Aujeszky, Torque teno virus (TTV) o coronavirus respiratorio pudiesen estar involucrados en el desarrollo de este cuadro anatomopatológico.

En este relevamiento serológico y estudio etiológico de lesiones de NNP se determinaron la circulación y presencia del virus de influenza. Sin embargo, durante el período de estudio no se presentaron reportes de aislamiento viral en nuestro país.

5.2. Estudio longitudinal prospectivo para la determinación de agentes causales de enfermedades respiratorias en 10 establecimientos porcinos de producción intensiva

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la circulación del virus de influenza porcina durante un ciclo completo de producción, en 10 establecimientos con manejo intensivo así como su impacto en las variables productivas. Además, dada la gran posibilidad de interacción de este virus con otros agentes que afectan el aparato respiratorio, se evaluaron posibles factores de riesgo que pudiesen influir en la presentación de los agentes más comunes del complejo respiratorio porcino, en la producción argentina.

El estudio serológico longitudinal contra los subtipos H1N1 y H3N2 demostró que ninguno de los subtipos virales evaluados, circuló durante el periodo en estudio. A pesar que se constataron signos respiratorios (tos y estornudos de forma aleatoria, afectando a un porcentaje mayor al 50% de la población por periodos variables) compatibles con infección viral en 7/11 (63,3%) de los establecimientos, en las etapas de desarrollo y terminación, no se observó seroconversión a lo largo de estas etapas de producción. Sorpresivamente estos resultados se contraponen a los datos serológicos previamente recabados considerando que, en la temporada invernal 2002, se determinó que un 53,84% y un 30,76% de la granjas estudiadas fueron positivas a los subtipos H1N1 y H3N2 respectivamente (Pineyro y col., 2010). A pesar que la prevalencia intra-granja, observada en este relevamiento previo, fue sólo del 2,33% y 9,64% para los subtipos H1N1 y H3N2 respectivamente, numerosos estudios han demostrado que la prevalencia serológica del virus de influenza tiene carácter variable y estacional (Choi y col., 2002; Ogawa y col., 1983). Así, en estudios previos llevados a cabo en Holanda se observó que en ocho de nueve brotes de influenza no se detectaron anticuerpos contra el subtipo viral circulante. Sumado a esto, en otros nueve brotes se identificaron altos títulos de anticuerpos

contra el virus, inclusive durante la fase aguda de la infección, lo que lleva a pensar que los animales estuvieron expuestos previamente y la infección cursó en forma subclínica antes de manifestarse clínicamente (Loeffen y col., 2003). A pesar que la dinámica de anticuerpos parece variar entre establecimientos con pie de cría de aquellos donde sólo se realiza el engorde (Loeffen y col., 2009), se ha reportado que el 95% de los animales son seropositivos al final de la etapa de terminación, aunque a menudo no se detectan signos clínicos lo que indicaría la presentación subclínica de la enfermedad (Loeffen y col., 2003). Así, la ausencia de seroconversión en múltiples granjas en una temporada específica, como la observada en el presente relevamiento, podría estar asociada al carácter fluctuante en la epidemiología de influenza entre temporadas y entre establecimientos (Ogawa y col., 1983). Esto último podría ser de suma importancia ya que establecimientos de gran escala, con alto estatus sanitario resultan más susceptibles a la infección y consecuente seroconversión, dada la presencia de una gran cantidad de animales en la etapa de engorde y terminación (Gardner y col., 2002).

Se ha observado que el número de animales alojados en la etapa de terminación es un factor de riesgo para la diseminación del agente y que incrementa exponencialmente por cada 1000 animales alojados (Poljak y col., 2008). Sin embargo, el incremento en el riesgo estaría más bien asociado a la densidad animal (número de animales/m²), y no al número total de animales, con un impacto directo en condiciones ambientales tales como humedad y temperatura de los galpones, factores que favorecen la transmisión del agente (Lowen y col., 2007). A pesar que el número y densidad animal son importantes en la diseminación de la enfermedad, no se ha establecido una unidad mínima para la transmisión y sólo se han reportado casos donde el riesgo aparece a partir de 5000 animales para H1 y más de 1000 animales en engorde para H3 (Suriya y col., 2008). En nuestro caso y durante el periodo en estudio, el

promedio de animales en la etapa de desarrollo-terminación, así como la densidad animal, parecieron no ser factores de riesgo determinantes para la presencia de SIV, a diferencia de aquellos reportes donde se describe una alta densidad y alta carga animal asociadas no sólo con la circulación de SIV, sino otras enfermedades concurrentes (Poljak y col., 2008). En este estudio tampoco se observó transmisión pasiva de anticuerpos contra los subtipos H1N1 y H3N2 ya que los animales evaluados a los 21, 35 y 56 días de vida fueron negativos. Dependiendo del nivel inmunitario del plantel reproductor y de la cepa circulante, la vida media de los anticuerpos maternos puede variar entre 12 días (Loeffen y col., 2003) y 4 semanas o alcanzar las 14 semanas (Desrosiers y col., 2004; Olsen y col., 2006). Sobre esta base se podría concluir que el virus no circuló durante el periodo en estudio dentro de los planteles reproductores.

Un factor que debe ser tenido en cuenta para el estudio serológico del virus de influenza, es la técnica utilizada para la detección de anticuerpos. La técnica de inhibición de la hemaglutinación es considerada la prueba de referencia por lo que los resultados obtenidos a través de la prueba de ELISA deberían ser interpretados con mucha cautela (Desrosiers y col., 2004). Los kits comerciales, no se adaptan a los subtipos circulantes en cada región y comúnmente no contienen los subtipos regionales, lo cual puede disminuir la sensibilidad diagnóstica de la prueba. Esto último, es debido fundamentalmente a la falta de correlación entre el *S/P ratio* de las pruebas de ELISA y los títulos de la prueba de IHA, lo que produce falsos negativos cuando los son bajos (Leuwerke y col., 2008). Originalmente se había propuesto la evaluación de los sueros a través de la prueba de agar gel precipitación. Sin embargo esta es una prueba menos sensible y menos específica que las utilizadas originalmente. Sumado a esto, la imposibilidad de importar los antígenos necesarios para la realización llevo a que los sueros fueran evaluados solamente por las pruebas de ELISA y de IHA. Sin embargo en este

relevamiento la ausencia de circulación viral detectada por la ausencia de seroconversión, fue confirmada por la falta de señal positiva contra el gen productor de la proteína de matriz (M) a través de la técnica de rRT-PCR en las muestras de hisopados nasales de los mismos animales evaluados serológicamente. Esta técnica tiene una alta sensibilidad (93,8%), siendo capaz de detectar ARN de 10^{-1} EID₅₀, así como muy alta especificidad (98%) (Spackman y col., 2002). A pesar que el virus puede ser completamente eliminado por el hospedador entre 7 y 10 dpi (Olsen y col., 2006), la posibilidad de falsos negativos quedaría descartada, debido la ausencia de seroconversión durante el periodo en estudio.

Sumado a los estudios serológicos y de biología molecular, se evaluaron muestras pulmonares de 40 animales provenientes de 11 establecimientos, a través de técnicas de IHQ. Estos animales murieron o fueron sacrificados debido a cuadros respiratorios severos. Todos los animales en estudio presentaron diferentes grados de lesión pulmonar cuando fueron evaluados histológicamente (Tabla 6). Sin embargo, en ninguna de las muestras se pudo determinar la presencia de antígeno viral contra el virus de influenza. La técnica utilizada tiene alta sensibilidad y especificidad y es comparable al aislamiento viral (Swenson y col., 2001) dada la utilización de un anticuerpo dirigido contra la nucleoproteína del virus de influenza subtipo A (Vincent y col., 1997).

En resumen, la ausencia total de seroconversión durante este estudio longitudinal, sumado a la ausencia de amplificación de una porción altamente conservada del virus y la ausencia de antígeno viral evaluado por IHQ, en numerosos animales contemporáneos al grupo en estudio, indicaría la ausencia de circulación viral en los establecimientos evaluados durante el periodo en estudio.

Dada la presencia de signos respiratorios en un porcentaje mayor al 50% de los animales en producción en 7/11 y 9/11 establecimientos en las etapas de recría y terminación, respectivamente (Tabla 5), y sumado a la disminución de parámetros productivos, se evaluó la presencia de diversos agentes responsables de enfermedad respiratoria. El mismo grupo de animales evaluados serológicamente contra influenza porcina presentó diferentes niveles de seroconversión contra tres agentes del complejo respiratorio porcino. En todos los establecimientos los animales fueron seropositivos a PCV-2 desde los 21 y 35 días de vida, en niveles variables. Numerosos estudios han demostrado diferencias en la seroprevalencia durante las primeras semanas de vida entre rodeos. La duración de la inmunidad pasiva en lechones provenientes de cerdas naturalmente infectadas puede ser moderadamente variable, observándose una disminución total de anticuerpos maternos entre las 4 y 8 semanas de vida, dependiendo del grado de exposición viral del plantel, y el promedio de paridad del hato (Rodríguez-Arriola, 2002). Así, tanto la prevalencia total como la prevalencia intra-granja correspondiente a las 5 primeras semanas de vida observada en nuestro estudio se correspondería con un alto grado de inmunidad pasiva, por lo cual se puede inferir que los hatos reproductores tuvieron un alto grado de contacto con el virus ya que al momento de este relevamiento no se disponía de vacunas comerciales contra PCV-2 en el país. El comportamiento observado en la prevalencia de anticuerpos en las etapas de desarrollo y terminación fue independiente para cada granja, no encontrándose un patrón específico. Previos estudios demostraron que establecimientos con signos clínicos y lesiones típicas de SMAP, en la etapa de recría y terminación, presentan un alto porcentaje de animales seropositivos aproximadamente a las 11 semanas de vida (Grau-Roma y col., 2009). En este estudio, a las 12 semanas de vida, el 50% de los establecimientos presentó seroconversión y la prevalencia intra-granja fue del 22,2 % (95% IC 17,01-27,36). Sin embargo,

a pesar que sólo se observó seroconversión en el 50% de los establecimientos, en el 70% de los mismos se observaron animales con lesiones histológicas típicas causadas por la infección por PCV-2 (linfonodos reactivos, depleción linfoidea y nefritis intersticial) y al menos un animal con inmunomarcación positiva en muestras de pulmón evaluadas a través de la técnica de IHQ. Sobre un total de 40 muestras de pulmón analizadas, el 40% (95% IC 23,56-56,43) presentaron inmunomarcación positiva. Desde la primera descripción de PCV-2, mayormente se ha asociado a este virus con la presentación de cuadros de desmedro post destete. Sin embargo en muchos estudios este agente también ha sido vinculado a la presentación de cuadros exclusivamente respiratorios, ya sea por sí solo o en concurrencia con otros microorganismos, por lo que se lo considera un agente importante en el desarrollo del complejo respiratorio porcino (Brockmeier y col., 2002; Lopez-Soria y col., 2010).

Sumado a la alta prevalencia de PCV-2 en los establecimiento en estudio, en el 50% de los mismos se recuperaron distintos biovares de *P. multocida*. Sorpresivamente, todos los animales de los que se aisló *P. multocida*, fueron positivos a PCV-2 en muestras de pulmón por la técnica de IHQ. Así, del total de animales analizados, un 37,5% (95% IC 15,19-64,56) presentaba infecciones combinadas.

En un solo establecimiento se aisló *A. pleuropneumoniae* en un animal, el cual también fue positivo a *P. multocida* y a PCV-2 por IHQ.

En este estudio etiológico se observó que el agente más prevalente fue PCV-2. Sin embargo, el carácter multifactorial de las lesiones neumónicas observadas coincide con lo descrito en múltiples publicaciones (DoneyWhite, 2003; Hansen y col., 2010; Lopez-Soria y col., 2010; Palzer y col., 2008; Sibila y col., 2004). Estudios previos plantean una mayor predisposición a infecciones bacterianas en animales infectados con PCV-2 (Alarcon y col.,

2011). Por lo tanto en este estudio, la alta prevalencia serológica así como el gran porcentaje de establecimientos que presentaron lesiones compatibles con infección por PCV-2 o inmunomarcación positiva en muestras de pulmón, indicarían que este agente ha jugado un papel importante en la presentación de cuadros respiratorios durante la temporada evaluada. Sumado a esto, se observó que la gran mayoría de los establecimientos presentó cuadros infecciosos múltiples, que agravarían la manifestación de los cuadros respiratorios e impactarían en el desarrollo productivo de los establecimientos.

En este estudio longitudinal también se demostró que la circulación de *A. pleuropneumoniae* y *M. hyopneumoniae* resulta de gran importancia en nuestros sistemas de producción. A pesar que en nuestro estudio etiológico *A. pleuropneumoniae* fue aislado en sólo un establecimiento y que lesiones típicas de pleuroneumonía compatibles con este agente fueron observadas sólo en tres establecimientos en una proporción del 33% (95% IC 9,9-65,10), la prevalencia serológica demostró que hay una gran circulación de este agente en todos los sistemas de producción. Los resultados obtenidos indican que *A. pleuropneumoniae* presenta una gran prevalencia en los planteles reproductores, y las diferencias en el porcentaje de animales seropositivos podría estar relacionada con el grado de exposición de estos planteles al agente, y con la disminución natural de los anticuerpos calostrales. (Chiers y col., 2002). En la etapa de desarrollo y terminación, el 80% y el 90% de los establecimientos presentaron animales seropositivos. Las variaciones observadas en la seroprevalencia entre granjas son coincidentes con los periodos de máxima exposición al agente, lo que indicaría que *A. pleuropneumoniae* circula en las etapas de engorde y terminación. Pese a estos resultados serológicos, fue baja la presentación de cuadros relacionados con infección con *A. pleuropneumoniae*. Esto podría estar relacionado a varios factores: el alto grado de inmunidad pasiva observada en los planteles

evaluados, lo que produciría un retardo en la aparición de los signos clínicos típicos; la presentación de planteles con manejo multi-sitios que podría disminuir la transmisión del agente en las etapas críticas para la infección de los planteles de engorde; el gran porcentaje de establecimientos que utiliza antibióticos en forma continua o en pulso en las etapas de recría (continuo 5/10, pulso 4/10) y desarrollo y terminación (continuo 2/10, desarrollo y terminación 8/10).

Finalmente, el gran porcentaje de establecimientos seropositivos a *A. pleuropneumoniae* con alta seroprevalencia intra-granja no se correlacionó con el porcentaje de lesiones compatibles en la planta de faena. La baja prevalencia de lesiones pulmonares observada podría estar asociada a que sólo animales con lesiones crónicas alcanzarían el peso de faena. En conclusión, *A. pleuropneumoniae* presentó una gran prevalencia serológica, pero no se observaron signos clínicos o lesiones características de la infección por este agente. Esta presentación podría depender del tipo de manejo, medidas de bioseguridad, utilización profiláctica de antibióticos y número de animales en producción.

En el caso de *M. hyopneumoniae*, tanto en este como en previos estudios (Morris y col., 1995), las lesiones histopatológicas se consideraron confirmatorias de la infección, dada la falta de anticuerpos comerciales para su inmunomarcación *in situ* y la dificultad para cultivar este agente. La circulación de *M. hyopneumoniae* fue confirmada mediante la evaluación de anticuerpos, constatándose que la variación intra-granja observada pudo estar dada por diferentes factores de manejo, ya que 9/11 establecimientos utilizaban vacunas contra este agente. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que los planes de vacunación no son unificados por lo que probablemente los niveles de protección varíen entre establecimientos. Es una práctica común la vacunación de las cerdas reproductoras durante la gestación, lo que incrementa los

niveles de inmunidad pasiva (Sibila y col., 2004). Sin embargo el nivel de anticuerpos calostrales puede verse influenciado por la paridad del plantel. En este estudio, entre los planteles evaluados, el promedio de paridad de las reproductoras fue variable lo que explica las diferencias de animales seropositivos observadas en la maternidad. Por último, el grado de exposición del plantel reproductor al agente juega un papel importante en la seroprevalencia en la etapa de maternidad (Sibila y col., 2004). La confirmación de que el agente circuló en los planteles de engorde y terminación podría estar basada en que en dichas etapas un 80% de los planteles fueron seropositivos a los 86, 105 y 156 días de vida y que todos los establecimientos presentaron lesiones compatibles con infección por *M. hyopneumoniae*, en los pulmones evaluados en la planta de faena. Otros estudios, han descrito una correlación entre la prevalencia serológica y la presencia de lesiones de tipo broconeumónico observadas en frigorífico (Morris y col., 1995). En este estudio la prevalencia serológica intra-granja para la etapa final de terminación varió entre el 10% y el 100%, y estuvo en relación con el porcentaje de animales que presentaron lesiones compatibles. En conclusión, *M. hyopneumoniae* estuvo presente en todas las granjas en estudio con diferente dinámica en su infección debido a las diferencias en los seroperfiles observados en las etapas de engorde y terminación.

Debido al carácter multifactorial y el gran impacto económico de las enfermedades respiratorias en la producción porcina, se han realizado numerosos esfuerzos en determinar la relación de los perfiles serológicos con los fallos en la conversión alimenticia, la disminución en la ganancia diaria de peso y la presencia de lesiones pulmonares en frigorífico (Alarcon y col., 2011; Andreasen y col., 2001; Andreasen y col., 2000; Martinez y col., 2009; Vigre y col., 2004). Cerdos con serología positiva a *M. hyopneumoniae* cercana al momento de la faena evidenciaron un alto grado de lesiones de bronconeumonía de tipo catarral. Contrariamente, no se pudo

establecer una asociación entre la presencia de anticuerpos contra varios tipos de *A. pleuropneumoniae* y la ocurrencia de lesiones en frigorífico (Andreasen y col., 2001; Van Til y col., 1991). A pesar que numerosos estudios serológicos han demostrado la presencia de anticuerpos contra PCV-2 en fases tardías de terminación no se ha reportado asociación entre seroconversión y lesiones pulmonares en frigorífico. Sin embargo, en estudios etiológicos, se identificó PCV-2 solo o en combinación, en muestras de pulmón obtenidas de animales faenados (Hansen y col., 2010). En este estudio no se pudo observar, para ninguno de los agentes evaluados, una asociación directa entre seroconversión y lesiones pulmonares en frigorífico. Esto podría estar relacionado con las características epidemiológicas de cada agente en cada establecimiento, ya que la seroconversión contra *M. hyopneumoniae* tiene característica intra-granja, mientras que *A. pleuropneumoniae* tiene características intra-lote dentro de cada granja (Vigre y col., 2004).

La prevalencia serológica en relación a la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia presentó numerosas asociaciones. La literatura muestra discrepancias respecto de la correlación entre seroconversión y disminución de ganancia diaria de peso (Stark, 2000). En nuestro estudio se pudo establecer que la seroconversión detectada entre los 86 y 165 días de vida contra *M. hyopneumoniae* tiene una correlación negativa con la ganancia diaria de peso entre los 82 días de vida y el momento de faena. Sumado a esto la seroconversión contra *A. pleuropneumoniae* evaluada a los 165 días de vida tuvo correlación negativa con la ganancia diaria de peso en el periodo comprendido entre los 82 y 105 días de vida. Por el contrario, en granjas crónicamente infectadas no se ha podido establecer correlación entre el momento de seroconversión contra ninguno de estos agentes y la disminución en la ganancia diaria de peso (Andreasen y col., 2001; Stark, 2000).

En relación a las lesiones pulmonares identificadas en frigorífico, se observó que la presencia de BNC tuvo correlación negativa con la ganancia diaria de peso entre los 82 y 105 días de vida. En estudios previos se ha propuesto que existe una correlación positiva entre la presencia de lesiones compatibles con infección con *A. pleuropneumoniae* y los días en llegar al peso de faena. Mientras que, en el caso de las lesiones compatibles con infección con *M. hyopneumoniae* (Wilson y col., 1986) y a diferencia de nuestros resultados, no se observó correlación con la disminución en la ganancia diaria de peso. Por otro lado, a pesar que en nuestro estudio no se pudo establecer una asociación directa entre la presencia de los agentes nombrados y las lesiones halladas en frigorífico, debido a la falta de diagnóstico etiológico, los resultados de la evaluación serológica frente a estos dos agentes permite inferir el gran impacto de estos patógenos en el desarrollo de las lesiones identificadas en frigorífico. Sumado a esto se pudieron identificar periodos críticos en la seroconversión que pueden afectar índices productivos así como inferir que estos agentes tienen impacto directo, o resultan predisponentes, en los incrementos en la tasa de mortalidad observados en los registros productivos.

El análisis de infecciones respiratorias frecuentemente se ha asociado a la presencia de factores de riesgo de tipo medio ambiental o de manejo que predisponen a infecciones tanto virales como bacterianas. En este estudio también se determinaron factores de riesgo asociados con seroconversión durante los periodos de producción. Así, estudios multietiológicos realizados en España no han podido establecer factores de manejo asociados a la presencia de animales seropositivos para SIV, PRRS, PCV-2 y el virus de Aujeszky (Lopez-Soria y col., 2010). Sin embargo numerosos estudios han determinado múltiples factores considerados de riesgo para la presentación de enfermedades respiratorias. Estos comprenden diferentes categorías como características del establecimiento, factores de manejo, factores ambientales y factores

demográficos (Stark, 2000). En nuestro estudio, factores de manejo y características del establecimiento fueron los que presentaron mayor implicancia como factores de riesgo asociado a la presencia de animales seropositivos para las distintas entidades evaluadas. Aunque numerosos trabajos han planteado la posibilidad del tamaño de granja como un factor de riesgo (Gardner y col., 2002), en nuestro caso sólo la seroconversión contra PCV-2 estuvo asociada al tamaño del establecimiento. No se pudo establecer una asociación entre las tres categorías evaluadas con la presencia de animales seropositivos contra *A. pleuropneumoniae*, y el mismo factor pareció tener un carácter protector en la presentación de animales seropositivos a *M. hyopneumoniae*. El porcentaje de animales seropositivos generalmente está asociado a la densidad de animales por corral, lo cual favorece la transmisión aerógena y por contacto directo de los agentes respiratorios. El manejo del flujo de animales (flujo continuo vs todo adentro todo afuera) en las unidades de engorde así como la presencia de pisos semi-sólidos en los corrales de engorde, fueron considerados factores importantes para la presentación de animales seropositivos contra *A. pleuropneumoniae*. Estas variables coinciden con aquellas previamente reportadas, las cuales serían consideradas parte de un establecimiento con bajos niveles de bioseguridad (Maes y col., 2001). Sin embargo el resto de las variables de manejo evaluadas en este estudio parecen no tener un impacto sobre estas normas de bioseguridad. A diferencia de los análisis de riesgo en relación a la presentación serológica de PCV-2 realizados en múltiples granjas en Europa (Alarcon y col., 2011; Grau-Roma y col., 2009), en los que no se pudieron establecer factores de manejo asociados a la presentación de animales seropositivos contra PCV-2, en este estudio la limpieza de los corrales con agua fría y la no utilización de sustancias químicas desinfectantes fueron consideradas de riesgo para la presentación de animales seropositivos contra PCV-2. Múltiples análisis de riesgo para la presentación de animales positivos contra *M. hyopneumoniae* (Fraile y

col., 2010; Maes y col., 2000), han reportado numerosas variables predisponentes. En nuestro análisis la presencia de pisos semi-sólidos y la limpieza de los corrales parecen tener una acción protectora. El uso de tratamiento antibiótico contra enfermedades respiratorias fue también considerado otro factor de riesgo en la presentación de animales seropositivos contra *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae*. Esto podría estar asociado al mal uso de antibióticos que mayormente se realiza de forma empírica sin una caracterización de la susceptibilidad antibiótica de las cepas circulantes. De este modo se favorecería la resistencia de los agentes involucrados, con el consecuente fracaso terapéutico. Sin embargo, en nuestro caso, este factor tuvo un carácter protector para la presentación de animales positivos para PCV-2. Por último, la utilización de tratamientos profilácticos en el caso de *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* presentó resultados contrapuestos. Esto podría asociarse al tipo de antibióticos utilizados en la profilaxis, probablemente específicos para uno de los agentes y por lo tanto con consecuente efecto protector, en detrimento de la protección frente a otros patógenos respiratorios. En este sentido, los altos niveles de seroconversión para *A. pleuropneumoniae* podrían estar reflejando un efecto profiláctico parcial de los antibióticos utilizados, con reducción en la manifestación clínica de la enfermedad, pero permitiendo una alta exposición al agente y la consecuente seroconversión. En conclusión, este relevamiento mostró al carácter multifactorial de las infecciones respiratorias en un grupo de establecimientos de producción intensiva. Se han podido determinar numerosos factores de riesgo para la manifestación serológica de estas entidades y se han establecido asociaciones entre la seroconversión para múltiples agentes con pérdidas productivas tal como ganancia diaria de peso. A pesar que no se pudo detectar la presencia del virus de influenza durante la temporada en estudio, se pudo caracterizar y asociar etiológicamente la presentación clínica con otros agentes del complejo respiratorio porcino. La presentación de cuadros

respiratorios no necesariamente produce un aumento significativo de los índices de morbi/mortalidad en el plantel, sino que su ocurrencia puede traducirse en disminución de índices productivos tales como kg/cerda/año, aumento en días a faena, etc. Un aumento del consumo de medicamentos en los alimentos, o un aumento en la medicación inyectable, podrían implicar mayor utilización del personal en tareas sanitarias, incrementando los costos de kg de cerdo producido. Así, podemos concluir que el estudio de entidades respiratorias tiene no sólo importancia a nivel sanitario sino también a nivel económico dentro de cada establecimiento.

5.3. Brote de influenza porcina causado por una cepa de influenza humana H3N2 no contemporánea

Una granja libre puede infectarse por el virus de influenza a través de la introducción de cerdos de una granja positiva (Brown, 2000). El cuadro se desarrolla con una presentación epidémica que afecta aproximadamente al 50% de la población (Olsen, 2002; Olsen y col., 2002). Clínicamente se caracteriza por una presentación súbita, 3-7 días, con fiebre alta, depresión, respiración abdominal, secreción óculo-nasal y tos (Olsen, 2002; Olsen y col., 2002; Poljak y col., 2008). El consumo de alimento se reduce durante 1-2 semanas y la pérdida de peso puede llegar a ser considerable (Janke, 2000; JankeyYoon, 1999). Por lo general, la mortalidad es baja y la recuperación ocurre en un tiempo variable entre 7 y 10 días. La infección progresa a la totalidad de la población en 2-3 semanas (Olsen, 2002; Olsen y col., 2002), pudiendo persistir en la granja hasta 4 meses.

Una vez introducida la infección, factores de riesgo tales como el tamaño de granja, la inmunidad de grupo (subpoblaciones no inmunes), la densidad animal, el manejo y el índice de replicación del virus podrían determinar si la infección, después del primer episodio, se mantendrá o no en la granja (Brown, 2000). Por lo general, la mayoría de las infecciones son

autolimitantes, sino hay una entrada continua de personas o de cerdos no inmunes (Barbé y col., 2009). Sin embargo, la reinfección en intervalos de tiempo irregulares se produce fácilmente en las regiones de alta densidad de cerdos (Barbé y col., 2009; Brown, 2000). Desde el punto de vista epidemiológico, es relevante que la granja afectada cuenta con su propia fuente de reposición de reproductores, se encuentra en una zona carente de granjas porcinas y además, tiene un alto nivel de bioseguridad.

En América del Norte, así como en Europa, la infección subclínica es muy común ya que la mayoría de la población de cerdos ha estado en contacto con uno o más subtipos, sin manifestación clínica (Brown, 2000; Reeth, 2007). La vida media de los anticuerpos calostrales es de aproximadamente 12 días para los subtipos H1 y H3. Dependiendo de los títulos iniciales de la madre, los lechones pueden permanecer seropositivos y protegidos hasta la edad de 8-10 semanas (Desrosiers y col., 2004; Van Reeth, 2000). Si los cerdos se infectan en el momento en que la inmunidad materna persiste, aunque sea parcialmente, no hay posibilidad de desarrollo de enfermedad clínica salvo que la infección viral vaya asociada con otros agentes y se manifieste como parte del complejo de enfermedad respiratoria porcina (Jung y col., 2005; Olsen, 2002; Olsen y col., 2002; Reeth, 2007). En el brote descrito aquí??, el porcentaje de morbilidad, la edad de los cerdos afectados y los signos clínicos que se registraron correspondieron una infección endémica. Sin embargo, el cuadro en el sitio dos persistió por más tiempo que el reportado en la literatura (Olsen, 2002; Olsen y col., 2002), no habiéndose determinado la fuente de infección. En este contexto, no se puede descartar la posibilidad de reagudización de un cuadro subclínico. En América del Norte, se comprobó que una cepa humana de H3N2 virus /Swine/Ontario/00130/97(H3N2) cruzó la barrera interespecie infectando a un cerdo en Canadá en 1997. Sin embargo, no infectó a otros cerdos de la piara (Karasin y col., 2000). Por el

contrario, A/swine/Argentina/CIP051-A2/08 (H3N2) se transmitió de manera eficiente entre los cerdos (Cappuccio y col., 2011).

Todos los subtipos de influenza se asocian con manifestaciones clínicas similares y no parece haber diferencias en su patogenicidad (Reeth, 2007). Sin embargo, cuando se observaron diferencias, estas pudieron estar relacionadas con el estatus inmunológico de rebaño, las variantes dentro de los subtipos (Brown y col., 1993), la edad de los cerdos susceptibles (Richt y col., 2003) y la respuesta inmune innata (Charley y col., 2006; Kim y col., 2008).

La infección de cerdos con subtipos H3N2 humanos puede ocurrir en condiciones naturales (Brown, 2000) y se han reportado en China y Europa (de Jong y col., 2007). En América del Norte sólo se reportaron dos casos de infección de cerdos con cepas enteramente humanas de virus de influenza, desde los años 1977 hasta 1998. Todos sus genes estaban relacionados filogenéticamente con los virus de la gripe que circularon en la población humana durante el mismo año de su aislamiento. Sin embargo no se observó transmisión entre cerdos (Karasin y col., 2000).

Debido a la corta vida media de los cerdos, los virus de influenza humana que se transfieren a los cerdos parecen ser genéticamente más estables que sus homólogos en humanos, en parte debido a la baja presión de selección inmune (Gorman y col., 1991), en particular en Argentina, donde no hay vacunas contra influenza. Sin embargo, un estudio sugiere que la inmunidad humoral en cerdos juega un papel menor en los procesos de selección evolutiva del subtipo porcino H3N2 que el observado en humanos (de Jong y col., 2007). Por otro lado, los cerdos pueden servir como reservorios de cepas H3N2 que han dejado de circular en el hombre (Karasin y col., 2000). Así, en China, cepas H3N2 aisladas en cerdos entre los años 2005-2006 estuvieron estrechamente relacionadas con aislamientos humanos de los años 1995-1999 (Yu y

col., 2008). El virus H3N2 aislado circuló en la población humana de América de Norte y Eurasia entre los años 2000-2003. Debido a la falta de identificaron de las cepas humanas circulantes durante ese periodo en la Argentina, se desconoce si el actual virus circuló en la población humana.

El cuadro clínico después de la infección del virus H3N2 es muy similar al H1N1 (Janke, 2000; JankeyYoon, 1999). En Estados Unidos, granjas con exposición masiva al virus H3N2 de triple recombinación, presentaron cuadros reproductivos caracterizados por una alta incidencia de abortos en asociación con fiebre alta, así como reducción del consumo de alimento por un periodo de 2 a 3 días, incremento en la tasa de mortalidad en la etapa de recría (Olsen, 2002; Olsen y col., 2002; Richt y col., 2003) y reducción de la GDP (Torremorell y col., 2009). En nuestro estudio, no se registraron trastornos reproductivos ni aumento de la mortalidad en el sitio dos.

El virus de la gripe porcina es un patógeno primario de las vías respiratorias del cerdo (Olsen y col., 2006; Reeth, 2007). Las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio son las células diana durante la infección viral, observándose un cuadro patológico más severo cuando se ve afectado el epitelio bronquiolar (Olsen y col., 2006; Richt y col., 2003). La necrosis y descamación de las células epiteliales de las vías respiratorias, la infiltración de neutrófilos y el exudado mucoso se consideran lesiones de tipo patognomónicas de la infección por SIV (Jung y col., 2005; Richt y col., 2003). En nuestro caso, solamente en tres cerdos se observó inmunomarcación positiva en las células epiteliales de los bronquios los que presentaron cambios mínimos, asociados a infiltración de células mononucleares de la pared alveolar o infiltrado mononuclear ocupando la luz alveolar. No se detectó señal positiva en las células epiteliales bronquiolares. A diferencia de otros virus ARN, el ARNv, así como los antígenos virales, pueden

ser detectados tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células infectadas. Los resultados obtenidos concuerdan con descripciones previas (Janke, 2000; Jung y col., 2002). La distribución de los antígenos virales en el parénquima pulmonar depende de la duración de la infección (Jung y col., 2002). Se ha observado que durante los primeros estadios de la infección (1-3 dpi) el virus se puede detectar principalmente afectando las células del epitelio bronquial y bronquiolar (Jung y col., 2002), mientras que en estadios más avanzados (7-10 dpi) el virus se puede detectar en neumocitos y macrófagos alveolares (Jung y col., 2002). La gravedad de las lesiones se relaciona con la presión infecciosa. En este caso sobre la base de los hallazgos anatomopatológicos, histopatológicos y sumado a la edad de los animales afectados, la severidad del cuadro clínico se debió a una alta presión infecciosa asociada a un bajo nivel de protección serológica del plantel.

Normalmente la incidencia de la infección es mayor en el período post-destete, tras el descenso de la inmunidad maternal. Los perfiles serológicos trasversales resultan una herramienta útil para el diagnóstico indirecto de la infección por el virus de influenza debido al corto período de tiempo durante el cual el virus puede ser aislado de los tejidos (Gillespie, 1999). Los resultados serológicos negativos obtenidos en este estudio, luego de la aplicación de la prueba de Elisa sobre suero de los cerdos que pasaron el cuadro clínico, pueden ser explicados por la menor sensibilidad de las pruebas ELISA utilizadas frente a H1 y H3 aislados de humanos en comparación con la prueba HI (Barbé y col., 2009).

En conclusión, se describe el primer brote de infección por el subtipo H3N2 de origen humano en cerdos de Argentina y en América del Sur. El diagnóstico presuntivo fue realizado por las características epidemiológicas, clínicas y anatomopatológicas incluyendo los estudios inmunohistoquímicos. Se confirmó el diagnóstico mediante aislamiento del virus, su subtipificación y genotipificación.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones parciales

1. Se determinó la presencia de anticuerpos contra los subtipos H1N1 y H3N2 así como la combinación de ambos a nivel granja e individuo.
2. La alta prevalencia serológica individual obtenida por la prueba de IHA sumada a la alta sensibilidad de esta técnica, sugieren que en las poblaciones estudiadas desde el año 2002, circularon cepas virales humanas o cepas porcinas con gran proximidad filogenética a las cepas humanas utilizadas como antígeno en este estudio.
3. Debido a la pobre concordancia observada entre las pruebas diagnósticas utilizadas en este estudio, la prueba de ELISA, podría ser de utilidad sólo para el diagnóstico a nivel de establecimiento ya que detectó, al menos, un animal positivo en cada establecimiento.
4. Las diferencias observadas entre ambas pruebas (IHA y ELISA) se deberían a las características inherentes a cada una de ellas, a los diferentes antígenos utilizados y a los isotipos de anticuerpos detectados por cada prueba.
5. La identificación de PCV-2 y VI en pulmones con lesiones compatibles con NNP concuerda, en parte, con lo indicado en la bibliografía, en la que se hace referencia a la participación de más de un agente viral como causal de esta entidad.

6. El hecho que el VI en cerdos ha sido prácticamente descartado en estudios de campo como agente causal de NNP, debido a su baja prevalencia en las lesiones pulmonares, no lo invalida como uno de los agentes causales de este tipo de lesiones. La marcación positiva para el virus de influenza lograda mediante sólo una de las técnicas utilizadas podría atribuirse al corto tiempo posinfección durante el cual el virus puede ser detectado.
7. El relevamiento serológico retrospectivo, sumado al estudio etiológico de lesiones de NNP, reafirma la ocurrencia de circulación del virus de influenza en la población porcina, aún en ausencia de signos clínicos y aislamiento viral.
8. El estudio serológico longitudinal en 10 establecimientos contra los subtipos H1N1 y H3N2 demostró que ninguno de los subtipos virales evaluados, circuló durante el periodo en estudio a pesar que se constataron signos respiratorios en un porcentaje mayor al 50% de la población, por periodos variables. Este resultado podría estar asociado al carácter fluctuante de la epidemiología de influenza entre estaciones y entre establecimientos, a la no correspondencia entre los antígenos de los subtipos circulantes y los utilizados en las pruebas serológicas o, efectivamente, a la ausencia de circulación del virus en las granjas estudiadas.
9. Los resultados negativos por medio de la técnica de rRT-PCR contra el gen productor de la proteína de matriz (M) en las muestras de hisopados nasales de los mismos animales en los que se evaluó la presencia de anticuerpos contra VI, así como la ausencia de inmunomarcación en los tejidos evaluados mediante IHQ en un número representativo de

cerdos con cuadros de neumonía, confirman la ausencia de circulación viral durante el periodo en estudio.

10. En un alto porcentaje de establecimientos se observaron signos respiratorios durante el periodo de estudio, los cuales estuvieron asociados a infecciones simples y/o mixtas. Durante los estudios etiológicos se detectó la presencia de PCV-2, *P. multocida*, y *A. pleuropneumoniae* en muestras de animales con signos respiratorios. A pesar que no se determinó la presencia de *M. hyopneumoniae*, se observaron lesiones características de su infección. Estudios serológicos demostraron una alta seroprevalencia de PCV-2, *A. pleuropneumoniae* y *M. hyopneumoniae* en las etapas de recría así como de engorde/terminación.
11. Todos los establecimientos fueron seropositivos a PCV-2, en particular desde los 21 a 35 días de vida, en porcentajes variables. La prevalencia de anticuerpos en las etapas de desarrollo y terminación fue independiente para cada granja, no observándose un patrón específico. En el 70% de los establecimientos se confirmaron lesiones histopatológicas compatibles con la infección por PCV-2 y, en al menos un animal por establecimiento, se observó IHQ positiva en muestras de pulmón. En el 50% de las muestras con neumonía se aislaron diferentes biovares de *P. multocida* y, en una sola granja se aisló *A. pleuropneumoniae* asociado a *P. multocida* y PCV-2.
12. Mediante estudios serológicos se demostró la circulación de *A. pleuropneumoniae* y *M. hyopneumoniae*. Entre el 80% y 90% de los establecimientos en las etapas de desarrollo y

terminación fueron serológicamente positivos a *A. pleuropneumoniae* y, el 80% de los mismos, a *M. hyopneumoniae*. La determinación de *A. pleuropneumoniae* se realizó mediante estudios bacteriológicos, y la de *M. hyopneumoniae* sobre la base de lesiones histopatológicas en muestras obtenidas en necropsias de campo y muestras de animales inspeccionados en el frigorífico. La circulación de *M. hyopneumoniae* fue confirmada mediante la evaluación de anticuerpos, constatándose que la variación intra-granja observada pudo estar dada por variaciones de manejo y aplicación o no de vacunas.

13. Todos los establecimientos evaluados presentaron diferentes porcentajes de animales con lesiones pulmonares al momento de la faena. Se observó que el tipo de lesión más prevalente fue aquella compatible con infección por *M. hyopneumoniae* y neumonía catarral complicada. Esto, sumado a la alta prevalencia serológica en las etapas de recría y engorde/terminación, demuestra la importancia de este agente en los sistemas de producción evaluados.
14. A pesar que el porcentaje de lesiones tipo pleuroneumonía reflejó su baja prevalencia tanto en los animales evaluados en granja como en aquellos evaluados en frigorífico, y pese a la baja frecuencia en la que se recuperó *A. pleuropneumoniae* en muestras con lesiones pulmonares, se observó que la prevalencia serológica en la mayoría de los establecimientos fue similar a la obtenida para la infección con *M. hyopneumoniae*. De esta manera se podría concluir que *A. pleuropneumoniae* tiene un alto grado de circulación dentro de los planteles evaluados pero una baja manifestación clínica, tal vez asociada al amplio uso de antibióticos a lo largo de los periodos de producción. Por último, aunque no de forma concluyente, podría inferirse que estos manejos medicamentosos podrían retrasar la aparición de las lesiones ya

que un bajo porcentaje de animales con lesiones características de la infección por este agente son observados al momento de la faena.

15. Debido al carácter multifactorial y al gran impacto económico de las enfermedades respiratorias en la producción porcina, se estudió la relación de los perfiles serológicos con fallos en la conversión alimenticia, disminución en la ganancia diaria de peso y presencia de lesiones pulmonares en frigorífico.
16. La prevalencia serológica en relación a la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia presentó numerosas asociaciones. En nuestro estudio se pudo establecer que la seroconversión detectada entre los 86 y 165 días de vida contra *M. hyopneumoniae* tiene una correlación negativa con la ganancia diaria de peso entre los 82 días de vida y el momento de faena. La seroconversión contra *A. pleuropneumoniae* evaluada a los 165 días de vida tuvo correlación negativa con la ganancia diaria de peso en el periodo comprendido entre los 82 y 105 días de vida.
17. Cerdos con serología positiva a *M. hyopneumoniae* cercana al momento de la faena evidenciaron un alto grado de lesiones de bronconeumonía de tipo catarral. Contrariamente, no se pudo establecer una asociación entre la presencia de anticuerpos contra varios tipos de *A. pleuropneumoniae* y la ocurrencia de lesiones en frigorífico.

18. En relación a las lesiones pulmonares identificadas en frigorífico, se observó que la presencia de BNC tuvo correlación negativa con la ganancia diaria de peso entre los 82 y 105 días de vida.
19. En este estudio se evaluaron los factores de riesgo asociados con seroconversión durante los periodos de producción. Factores de manejo y características del establecimiento fueron los que presentaron mayor implicancia como factores de riesgo asociados a la presencia de animales seropositivos, para las distintas entidades evaluadas, y sólo la seroconversión contra PCV-2 estuvo asociada al tamaño del establecimiento.
20. No se pudo establecer una asociación entre las tres categorías evaluadas (factores de manejo, factores ambientales y factores demográficos) con la presencia de animales seropositivos contra *A. pleuropneumoniae*, y el mismo factor pareció tener un carácter protector en la presentación de animales seropositivos a *M. hyopneumoniae*.
21. El manejo del flujo de animales (flujo continuo vs todo adentro todo afuera) en las unidades de engorde así como la presencia de pisos semi-sólidos en los corrales de engorde, fueron considerados factores importantes para la presentación de animales seropositivos contra *A. pleuropneumoniae*. Sin embargo el resto de las variables de manejo evaluadas en este estudio parecen no tener impacto en la presentación de los agentes infecciosos estudiados.

22. En este estudio, la limpieza de los corrales con agua fría y la no utilización de sustancias químicas desinfectantes fueron consideradas de riesgo para la presentación de animales seropositivos para PCV-2 y *M. hyopneumoniae*.
23. El tratamiento antibiótico contra enfermedades respiratorias fue también considerado otro factor de riesgo en la presentación de animales seropositivos para *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae*, asociado a su uso en forma empírica que favorecería la resistencia de los agentes involucrados.
24. Se pudo determinar un grupo de factores de riesgo que podría favorecer la presencia en las granjas, de los agentes evaluados. A pesar que la asociación de diferentes factores de manejo, así como las características edilicias de los establecimientos, se correlacionaron con animales seropositivos y no clínicamente enfermos, esta evaluación podría dar una medida de la importancia de estos factores en relación a la circulación los microorganismos durante el periodo evaluado.
25. En conclusión, este relevamiento mostró el carácter multifactorial de las enfermedades respiratorias, al analizar el rol de distintos factores de riesgo en el desarrollo de la respuesta serológica frente a los agentes estudiados y el impacto de la prevalencia serológica y lesiones pulmonares sobre la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia.
26. Se describió un brote de infección por virus de influenza A H3N2 de origen humano. La cepa aislada circuló en la población humana de América de Norte y Eurasia entre 2000-

27. En el brote descrito, el porcentaje de morbilidad, la edad de los cerdos afectados y los signos clínicos que se registraron correspondieron una infección endémica. El cuadro en el sitio 2 persistió por más tiempo que los reportados, siendo indeterminada la fuente de infección. Así, el hecho de una posible una reagudización desde un cuadro subclínico no puede ser descartado. Sumado a esto no se detectó aumento de la mortalidad ni de trastornos reproductivos.

28. Las lesiones macro y microscópicas se correspondieron con las descritas para la infección con el virus de influenza. Los resultados positivos de IHC, sólo se observaron a nivel de bronquiolos, los que mostraron cambios mínimos, así como en algunas células mononucleares situadas en la pared alveolar o en los espacios alveolares.

29. Se realizó la tipificación molecular del aislamiento y se estableció la relación de los segmentos genómicos del aislamiento causal de este brote, con cepas circulantes en América del Norte y Oceanía.

- **Conclusiones generales**

1. Sobre la base de la información presentada en la revisión sobre el virus de influenza, la infección en el cerdo y la respuesta del mismo, se concluye que es necesario un constante relevamiento debido a los diferentes mecanismos del virus para adaptarse a nuevos huéspedes y evadir la respuesta inmune innata y adaptativa.
2. El cambio de hospedadores específicos observado durante las últimas dos décadas demuestra que las mutaciones puntuales que el virus ha acumulado por más de siete décadas ha resultado en nuevos hospedadores que no pueden ejercer ningún tipo de presión inmunológica, favoreciendo el desarrollo de cuadros clínicos más severos, una rápida diseminación y falla en las vacunas existentes.
3. Los resultados obtenidos en este estudio, mediante evaluación serológica, etiológica y anatomopatológica, reflejan la circulación del virus de influenza A subtipos H1N1 y H3N2 en la población porcina nacional desde el año 2002.
4. A pesar que a lo largo de las tres fases de este estudio se utilizaron tres distintos grupos de establecimientos y que estos estudios no fueron conducidos simultáneamente, se puede concluir que los establecimientos en estudio están endémicamente infectados con numerosos agentes del complejo respiratorio porcino causando pérdidas productivas constantes e invaluable y que estas se ven agravadas por brotes epidémicos de influenza porcina los cuales están emergiendo con mayor frecuencia bajo su forma tradicional.

5. Como futuras acciones se deberá evaluar la prevalencia real de la circulación de influenza porcina, así como su impacto productivo. Deberían llevarse a cabo numerosos relevamientos que incluyan un número representativo de granjas de distintas áreas geográficas para la identificación y evaluación de la dinámica de influenza así como su interacción con los agentes más prevalentes del complejo respiratorio porcino.
6. Mantener un sistema de vigilancia constante no solo en establecimientos con alto estatus sanitario sino en aquellos que poseen pobre atención sanitaria, los cuales podrían actuar como reservorio del agente.
7. Un mayor entendimiento de la variabilidad antigénica del virus, de la patogenia de la infección y de la regulación de los mecanismos de defensa innata y adaptativa permitiría la aplicación de medidas terapéuticas más adecuadas. En este sentido, los organismos del estado que administran los planes de salud animal deberían diseñar relevamientos epidemiológicos activos que permitan identificar los subtipos y genotipos actuantes en el país. Por último, teniendo en cuenta las características zoonóticas de este agente y sumado a la potencialidad patógena que este virus tiene al adaptarse a nuevos hospedadores específicos resulta necesario el desarrollo de planes conjuntos que comprendan no sólo a la población humana sino a las especies domésticas más susceptibles.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(25):2605-15.
2. Alarcon P, Velasova M, Werling D, Stark KD, Chang YM, Nevel A, et al. Assessment and quantification of post-weaning multi-systemic wasting syndrome severity at farm level. *Prev Vet Med*. 2011;98(1):19-28. Epub 2010/11/03.
3. Andreasen M, Mousing J, Thomsen LK. No overall relationship between average daily weight gain and the serological response to *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in eight chronically infected Danish swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001;49(1-2):19-28.
4. Andreasen M, Mousing J, Thomsen LK. No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesion in Danish swine. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001;52:147-61.
5. Andreasen M, Nielsen JP, Baekbo P, Willeberg P, Botner A. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 2000;45:221-35.
6. Atassi MZ, Webster RG. Localization, synthesis, and activity of an antigenic site on influenza virus hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(3):840-4.
7. Ayora-Talavera G, Fau - Cadavieco-Burgos JM, Cadavieco-Burgos Jm Fau - Canul-Armas AB, Canul-Armas AB. Serologic evidence of human and swine influenza in Mayan persons. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(1):158-61.

8. Barbé F, Labarque G, Pensaert M, Van Reeth K. Performance of a Commercial Swine Influenza Virus H1N1 and H3N2 Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Pigs Experimentally Infected with European Influenza Viruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2009;21(1):88-96.
9. Boulanger A, Ramirez OJ, Moscardi A, editors. Serological evidence of swine influenza virus infection on Venezuela pigs farms. 18th International Pig Veterinary Society Congress; 2004; Hamburgo, Alemania: International Pig Veterinary Society.
10. Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL. Porcine Respiratory Disease Complex. In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. *Polymicrobial Diseases*. Washington (DC): American Society for Microbiology; 2002. p. 231-58.
11. Brockwell-Staats C, Webster RG, Webby RJ. Diversity of Influenza Viruses in Swine and the Emergence of a Novel Human Pandemic Influenza A (H1N1). *Influenza Other Respi Viruses*. 2009;3(5):207-13. Epub 2009/09/22.
12. Brown I, Done S, Spencer Y, Cooley W, Harris P, Alexander D. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Veterinary Record*. 1993;132(24):598-602.
13. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol*. 2000;74(1-2):29-46. Epub 2000/05/09.
14. Brown IH. The pig as an intermediate host for influenza A viruses between birds and humans. *International Congress Series*. 2001;1219:173-8.
15. Brown IH, Ludwig S, Olsen CW, Hannoun C, Scholtissek C, Hinshaw VS, et al. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. *J Gen Virol*. 1997;78 (Pt 3):553-62. Epub 1997/03/01.

16. Brydon EW, Smith H, Sweet C. Influenza A virus-induced apoptosis in bronchiolar epithelial (NCI-H292) cells limits pro-inflammatory cytokine release. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 9):2389-400. Epub 2003/08/15.
17. Cappuccio J, Pena L, Dibarbora M, Rimondi A, Piñeyro P, Insarralde L, et al. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a noncontemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. *Journal of General Virology.* 2011.
18. Charley B, Riffault S, Van Reeth K. Porcine Innate and Adaptative Immune Responses to Influenza and Coronavirus Infections. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;1081(1):130-6.
19. Chiers K, Donne E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F. Actinobacillus pleuropneumoniae infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Vet Microbiol.* 2002;85(4):343-52. Epub 2002/02/22.
20. Chittick W, Holck JT, Polson D, Ricket L, editors. Capabilities of two swine influenza H1N1 serologic assay. The 17th International Pig Veterinary Society Congress; 2002; Ames, Iowa, USA: International Pig Veterinary Society.
21. Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Evaluation of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for subtyping hemagglutinin genes 1 and 3 of swine influenza type A virus in clinical samples. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14(1):62-5. Epub 2003/04/12.
22. Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. *Arch Virol.* 2002;147(6):1209-20. Epub 2002/07/12.
23. Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can Vet J.* 2003;44(9):735-7. Epub 2003/10/04.

24. Choi YK, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW, Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J Virol Methods*. 2002;102(1-2):53-9. Epub 2002/03/07.
25. Choi YK, Lee JH, Erickson G, Goyal SM, Joo HS, Webster RG, et al. H3N2 influenza virus transmission from swine to turkeys, United States. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2156-60. Epub 2005/01/25.
26. Clark LK. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. *Animal Reproduction Science*. 1996;42(1-4):447-54.
27. Cornaglia E, Arora J, Dea S, Lallier RA, editors. Competitive ELISA for serological diagnosis of swine influenza virus (H1N1). 15th International Pig Veterinary Society Congress; 1998; Birmingham, Inlgaterra: Pig Veterinary Society
28. de Jong JC, Smith DJ, Lapedes AS, Donatelli I, Campitelli L, Barigazzi G, et al. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol*. 2007;81(8):4315-22. Epub 2007/02/09.
29. Dea S, Bilodeau R, Sauvageau R, Montpetit C, Martineau GP. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J Vet Diagn Invest*. 1992;4(4):380-92. Epub 1992/10/01.
30. Desrosiers R, Boutin R, Broes A. Persistence of antibodies after natural infection with swine influenza virus and epidemiology of the infection in a herd previously considered influenza-negative. *J Swine Health Prod*. 2004;2(12):78-81.
31. Desrosiers R, Boutin R, Broes A. Persistence of antibodies after natural infection with swine influenza virus and epidemiology of the infection in a herd previously considered influenzanegative. *J Swine Health Prod*. 2004;12(2):78-81.

32. Dewhurst S, Dollard SC, Pellett PE, Dambaugh TR. Identification of a lytic-phase origin of DNA replication in human herpesvirus 6B strain Z29. *J Virol.* 1993;67(12):7680-3. Epub 1993/12/01.
33. Donaldson LJ, Rutter PD, Ellis BM, Greaves FEC, Mytton OT, Pebody RG, et al. Mortality from pandemic A/H1N1 2009 influenza in England: public health surveillance study. *BMJ.* 2009;339.
34. Done S, White M. Porcine respiratory disease and complexes: the story to date. In *Practice.* 2003;25(7):410-7.
35. Done SH, Brown I, Paton D, Higgins R, Hannam D. Clinical signs in respiratory diseases of neonatal swine with special reference to PRRS and swine influenza. *The Pig J.* 1994;33:133-9.
36. Drolet R, Laroche R, Morin M, Delisle B, Magar R. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet Pathol.* 2003;40(2):143-8. Epub 2003/03/15.
37. Du L, Zhao G, Zhang X, Liu Z, Yu H, Zheng BJ, et al. Development of a safe and convenient neutralization assay for rapid screening of influenza HA-specific neutralizing monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;397:580-5. Epub 2010/08/06.
38. Dunn JJ, Gordon C, Kelley C, Carroll KC. Comparison of the Denka-Seiken INFLU A.B-Quick and BD Directigen Flu A+B kits with direct fluorescent-antibody staining and shell vial culture methods for rapid detection of influenza viruses. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):2180-3. Epub 2003/05/08.

39. Easterday BC, Van Reeth K. Swine Influenza. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Disease of Swine*. 8th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1999. p. 277-90.
40. Fegan N, Blackall PJ, Pahoff JL. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Veterinary Microbiology*. 1995;47(3-4):281-6.
41. Fleites MA, Rodriguez Buenfil JC, Carrasco AC, Rodríguez Guzmán L, Ayora Tavera G, Segura Correa JC. Serological profile of porcine influenza, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in farms of Yucatán, México. *Vet Mex*. 2004;35(4):295-305.
42. Forrest HL, Webster RG. Perspectives on influenza evolution and the role of research. *Anim Health Res Rev*. 2010;11(1):3-18. Epub 2010/07/02.
43. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol*. 2000;38(11):4096-101. Epub 2000/11/04.
44. Fraile L, Alegre A, Lopez-Jimenez R, Nofrarias M, Segales J. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet J*. 2010;184(3):326-33. Epub 2009/06/17.
45. Gardner IA, Willeberg P, Mousing J. Empirical and theoretical evidence for herd size as a risk factor for swine diseases. *Anim Health Res Rev*. 2002;3(1):43-55. Epub 2002/10/29.
46. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009;325(5937):197-201. Epub 2009/05/26.
47. Geiss GK, Salvatore M, Tumpey TM, Carter VS, Wang X, Basler CF, et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the

nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10736-41. Epub 2002/08/01.

48. Gibbs AJ, Armstrong JS, Downie JC. From where did the 2009 'swine-origin' influenza A virus (H1N1) emerge? *Virology*. 2009;6:207. Epub 2009/11/26.

49. Gillespie TG. Diagnosing endemic swine influenza virus in nursery pigs using cross-sectional serologic profiling. *Swine Health Prod*. 1999(2):81-3.

50. Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine*. 2010;28(31):4895-902. Epub 2010/06/18.

51. Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, Webster RG. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol*. 1991;65(7):3704-14.

52. Gottschalk M, Taylor DJ. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw B, Zimmerman JJ, D'allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd; 2006. p. 563-76.

53. Gramer MR, Lee JH, Choi YK, Goyal SM, Joo HS. Serologic and genetic characterization of North American H3N2 swine influenza A viruses. *Can J Vet Res*. 2007;71(3):201-6. Epub 2007/08/19.

54. Grau-Roma L, Hjulsager CK, Sibila M, Kristensen CS, Lopez-Soria S, Enoe C, et al. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol*. 2009;135(3-4):272-82. Epub 2008/11/26.

55. Grau-Roma L, Segales J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of

- porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet Microbiol.* 2007;119(2-4):144-51. Epub 2006/10/31.
56. Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest.* 1991;3(1):101-12.
57. Haines DM, Clark EG. Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can Vet J.* 1991;32(5):295-302.
58. Haines DM, Waters EH, Clark EG. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Can J Vet Res.* 1993;57(1):33-6. Epub 1993/01/01.
59. Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, et al. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol.* 2010;143(2-3):120-31. Epub 2010/02/26.
60. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.* 2001;146(12):2275-89. Epub 2002/01/29.
61. Hurt AC, Baas C, Deng YM, Roberts S, Kelso A, Barr IG. Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A(H1N1) influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses.* 2009;3(4):171-6. Epub 2009/07/25.
62. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol.* 1998;72(9):7367-73. Epub 1998/08/08.

63. Jackson T, Fuchs N, Chandler-Conrey N, Prouty K, Leathers V, Soderlund L, et al., editors. Evaluation of two ELISA tests for the detection of antibodies to Swine influenza virus subtypes H1N1 and H3N2. 18th International Pig Veterinary Society Congress; 2004; Hamburgo, Alemania: International Pig Veterinary Society.
64. Janke BH. Diagnosis of swine influenza. *Swine Health Prod.* 2000;8(2):79-84.
65. Janke BH, Yoon KJ, editors. Swine Influenza viruses – Emergence of new subtype in mid-west swine and current research. En: libro de ponencias: Swine Disease Conferences for Swine Practitioners; 1999; Iowa. Estados Unidos.
66. Jung K, Ha Y, Chae C. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. *J Comp Pathol.* 2005;132(2-3):179-84. Epub 2005/03/02.
67. Jung K, Song D-S, Kang B-K, Oh J-S, Park B-K. Serologic surveillance of swine H1 and H3 and avian H5 and H9 influenza A virus infections in swine population in Korea. *Preventive Veterinary Medicine.* 2007;79(2-4):294-303.
68. Jung T, Choi C, Chae C. Localization of swine influenza virus in naturally infected pigs. *Vet Pathol.* 2002;39(1):10-6. Epub 2002/07/10.
69. Jung T, Choi C, Chung H-K, Kim J, Cho W-S, Jung K, et al. Herd-level seroprevalence of swine-influenza virus in Korea. *Preventive Veterinary Medicine.* 2002;53(4):311-4.
70. Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, et al. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):1073-9. Epub 2002/03/07.
71. Karasin AI, Schutten MM, Cooper LA, Smith CB, Subbarao K, Anderson GA, et al. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-

- 1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res.* 2000;68(1):71-85. Epub 2000/08/10.
72. Kim HM, Lee Y-W, Lee K-J, Kim HS, Cho SW, van Rooijen N, et al. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. *J Virol.* 2008;JVI.02602-07.
73. Kim WI, Wu WH, Janke B, Yoon KJ. Characterization of the humoral immune response of experimentally infected and vaccinated pigs to swine influenza viral proteins. *Arch Virol.* 2006;151(1):23-36. Epub 2005/09/01.
74. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas de color. 5th ed. S.A. EMP, editor. Argentina 1999.
75. Krause R. The swine flu episode and the fog of epidemics. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(1):40-3. Epub 2006/02/24.
76. Landolt GA, Karasin AI, Phillips L, Olsen CW. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):1936-41. Epub 2003/05/08.
77. Larochelle R, Sauvageau R, Magar R. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. *Can Vet J.* 1994;35(8):513-5. Epub 1994/08/01.
78. Larsen DL, Karasin A, Zuckermann F, Olsen CW. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet Microbiol.* 2000;74(1-2):117-31. Epub 2000/05/09.
79. Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Larson ME. Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine. *Vet Microbiol.* 1995;43(2-3):241-50. Epub 1995/02/01.

80. Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Simonson RR. ELISA method for detection of influenza A infection in swine. *J Vet Diagn Invest.* 1993;5(4):510-5. Epub 1993/10/01.
81. Leuwerke B, Kitikoon P, Evans R, Thacker E. Comparison of three serological assays to determine the cross-reactivity of antibodies from eight genetically diverse U.S. swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20(4):426-32. Epub 2008/07/05.
82. Lewis PA, Shope RE. Swine Influenza : Ii. A Hemophilic Bacillus from the Respiratory Tract of Infected Swine. *J Exp Med.* 1931;54(3):361-71. Epub 1931/07/31.
83. Li H, Yu K, Xin X, Yang H, Li Y, Qin Y, et al. Serological and virologic surveillance of swine influenza in China from 2000 to 2003. *International Congress Series.* 2004;1263:754-7.
84. Liu D, Liu X, Yan J, Liu WJ, Gao GF. Interspecies transmission and host restriction of avian H5N1 influenza virus. *Sci China C Life Sci.* 2009;52(5):428-38. Epub 2009/05/28.
85. Loeffen WL, Heinen PP, Bianchi AT, Hunneman WA, Verheijden JH. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;92(1-2):23-35. Epub 2003/03/12.
86. Loeffen WL, Hunneman WA, Quak J, Verheijden JH, Stegeman JA. Population dynamics of swine influenza virus in farrow-to-finish and specialised finishing herds in the Netherlands. *Vet Microbiol.* 2009;137(1-2):45-50. Epub 2009/02/03.
87. Loeffen WL, Nodelijk G, Heinen PP, van Leengoed LA, Hunneman WA, Verheijden JH. Estimating the incidence of influenza-virus infections in Dutch weaned piglets using blood samples from a cross-sectional study. *Vet Microbiol.* 2003;91(4):295-308. Epub 2002/12/13.

88. Lopez-Soria S, Maldonado J, Riera P, Nofrarias M, Espinal A, Valero O, et al. Selected Swine viral pathogens in indoor pigs in Spain. Seroprevalence and farm-level characteristics. *Transbound Emerg Dis.* 2010;57(3):171-9. Epub 2010/06/24.
89. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS pathogens.* 2007;3(10):1470-6. Epub 2007/10/24.
90. Lu BL, Webster RG, Hinshaw VS. Failure to detect hemagglutination-inhibiting antibodies with intact avian influenza virions. *Infect Immun.* 1982;38(2):530-5. Epub 1982/11/01.
91. Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM, Scholtissek C. European Swine Virus as a Possible Source for the Next Influenza Pandemic? *Virology.* 1995;212(2):555-61.
92. MacFaddin. Hippurate hydrolysis test. . *Biochemical Test for the Identification of Medical Bacteria.* 2nd ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1980. p. 141-62.
93. Maes D, Chiers K, Haesebrouck F, Laevens H, Verdonck M, Kruif Ad. Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Vet Res.* 2001;32(5):409-19.
94. Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Vrijens B, et al. Herd factors associated with the seroprevalences of four major respiratory pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Veterinary research.* 2000;31(3):313-27. Epub 2000/06/23.
95. Maldonado J, Van Reeth K, Riera P, Sitja M, Saubi N, Espuna E, et al. Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J.* 2006;172(2):377-81. Epub 2005/05/26.

96. Mancini DAP, Cunha EMS, Mendonça RMZ, Dias ALF, Castro AF, Pinto JR, et al. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. *Virus Reviews Research*. 2006;11(1-2):39-43.
97. Marozin S, Gregory V, Cameron K, Bennett M, Valette M, Aymard M, et al. Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J Gen Virol*. 2002;83(Pt 4):735-45. Epub 2002/03/22.
98. Martinez J, Peris B, Gomez EA, Corpa JM. The relationship between infectious and non-infectious herd factors with pneumonia at slaughter and productive parameters in fattening pigs. *Vet J*. 2009;179(2):240-6. Epub 2007/11/21.
99. Miller GY, Song Y, Bahnsen PB. An economic model for estimating batch finishing system profitability with an application in estimating the impact of preventive measures for porcine respiratory disease complex. *Journal of Swine Health and Production*. 2001;4(1):169-77.
100. Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, Kobasa D, et al. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol*. 2000;74(13):6015-20. Epub 2000/06/14.
101. Moore MK, Cicnjak-Chubbs L, Gates RJ. A new selective enrichment procedure for isolating *Pasteurella multocida* from avian and environmental samples. *Avian Dis*. 1994;38(2):317-24. Epub 1994/04/01.
102. Morandi F, Ostanello F, Fusaro L, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, et al. Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs. *J Comp Pathol*. 2010;142(1):74-8. Epub 2009/07/28.

103. Morandi F, Ostanello F, Fusaro L, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, et al. Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs. *J Comp Pathol.* 142(1):74-8. Epub 2009/07/28.
104. Morin M, Girard C, Elazhary Y, Fajardo R, Drolet R, Lagace A. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. *Can Vet J.* 1990;31(12):837-9. Epub 1990/12/01.
105. Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE, Anderson RJ, Parker KM. Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Preventive Veterinary Medicine.* 1995;21(4):323-37.
106. Mutters R, Ihm P, Pohl S, Frederiksen W, Mannheim W. Reclassification of the Genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the Basis of Deoxyribonucleic Acid Homology, with Proposals for the New Species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int J Syst Bacteriol.* 1985;35(3):309-22.
107. Ogawa H, Taira O, Hirai T, Takeuchi H, Nagao A, Ishikawa Y, et al. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. *J Virol Methods.* 2009;160(1-2):210-4. Epub 2009/05/27.
108. Ogawa Y, Goto H, Hirano T, Shimizu K, Ohno Y, Kuroda H, et al. Sero-epizootiological study on swine influenza in a prefecture of Japan. *J Hyg (Lond).* 1983;90(3):403-6. Epub 1983/06/01.
109. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res.* 2002;85(2):199-210. Epub 2002/05/30.

110. Olsen CW, Brammer L, Easterday BC, Arden N, Belay E, Baker I, et al. Serologic evidence of H1 swine Influenza virus infection in swine farm residents and employees. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(8):814-9. Epub 2002/07/27.
111. Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, Van Reeth K. Swine Ifluenza. In: Straw B, Zimmerman JJ, D'allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine.* 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd; 2006. p. 469-82.
112. Ostanello F, Dottori M, Gusmara C, Leotti G, Sala V. Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2007;54(2):70-5. Epub 2007/02/20.
113. Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *The Veterinary record.* 2008;162(9):267-71. Epub 2008/03/04.
114. Pensaert M, Haesebrouck F, Castryck F. Usefulness of the direct fluorescent antibody technique for diagnosis of influenza in swine. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1986;33(5):379-82. Epub 1986/06/01.
115. Perfumo CJ, editor. Current situation of swine influenza in South America. III Fórum Internacional de Suinocultura; 2010; Curitiba, Paraná, Brazil. .
116. Pesch S, Schmidt U, Ohlinger VF. Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of co-infection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). The 16th International Pig Veterinary Society Congress; Melbourne, Australia: International Pig Veterinary Society; 2000. p. 581.
117. Pineyro PE, Baumeister E, Cappuccio JA, Machuca MA, Quiroga MA, Tedoroff T, et al. [Seroprevalence of the swine influenza virus in fattening pigs in Argentina in the 2002 season: evaluation by hemagglutination-inhibition and ELISA tests]. *Rev Argent Microbiol.*

- 2010;42(2):98-101. Epub 2010/07/01. Prevalencia serologica del virus de influenza A en cerdos en Argentina durante la temporada 2002: evaluacion mediante inhibicion de la hemaglutinacion y ELISA.
118. Poljak Z, Dewey CE, Martin SW, Christensen J, Carman S, Friendship RM. Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. *Can J Vet Res.* 2008;72(1):7-17. Epub 2008/01/25.
119. Ramirez OJ, Boulagner A, Moscardi A. Evidencia Serológica de infección por el virus de influenza porcina en granjas de cerdos en Venezuela. . *RevFac de Ciencias Veterinarias.* 2005;46(2):51-60.
120. Rao BL. Epidemiology and control of influenza. *Natl Med J India.* 2003;16(3):143-9. Epub 2003/08/22.
121. Reeth KV. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res.* 2007;38(2):243-60.
122. Reeth KV, Brown I, Essen S, Pensaert M. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Res.* 2004;103(1-2):115-24. Epub 2004/05/28.
123. Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology. *Microbes Infect.* 2001;3(1):81-7. Epub 2001/02/28.
124. Rekik MR, Arora DJ, Dea S. Genetic variation in swine influenza virus A isolate associated with proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J Clin Microbiol.* 1994;32(2):515-8. Epub 1994/02/01.

125. Richt JA, Lager KM, Janke BH, Woods RD, Webster RG, Webby RJ. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3198-205. Epub 2003/07/05.
126. Rodriguez-Arrioja GM. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American journal of veterinary research.* 2002;63(3):354-7.
127. Russell RJ, Gamblin SJ, Haire LF, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, et al. H1 haemagglutinin receptor complexes. *International Congress Series.* 2004;1263:191-5.
128. Schnitzler SU, Schnitzler P. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. *Virus Genes.* 2009;39(3):279-92. Epub 2009/10/08.
129. Seo SH, Goloubeva O, Webby R, Webster RG. Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. *J Virol.* 2001;75(19):9517-25. Epub 2001/09/05.
130. Shaw MW, Arden NH, Maassab HF. New aspects of influenza viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(1):74-92. Epub 1992/01/01.
131. Shope RE. Swine Influenza : V. Studies on Contagion. *J Exp Med.* 1934;59(2):201-11. Epub 1934/01/31.
132. Sibila M, Calsamiglia M, Vidal D, Badiella L, Aldaz A, Jensen JC. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Can J Vet Res.* 2004;68(1):12-8. Epub 2004/02/26.
133. Skibbe D, Zhou EM, Janke BH. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with hemagglutination inhibition assay for serodiagnosis of swine influenza virus (H1N1) infection. *J Vet Diagn Invest.* 2004;16(1):86-9. Epub 2004/02/21.

134. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. 2009;459(7250):1122-5. Epub 2009/06/12.
135. Song DS, Lee JY, Oh JS, Lyoo KS, Yoon KJ, Park YH, et al. Isolation of H3N2 swine influenza virus in South Korea. *J Vet Diagn Invest*. 2003;15(1):30-4. Epub 2003/02/13.
136. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, et al. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3256-60.
137. Stark KD. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine--a literature review. *Vet J*. 2000;159(1):37-56. Epub 2000/01/21.
138. Stech J, Xiong X, Scholtissek C, Webster RG. Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *J Virol*. 1999;73(3):1878-84. Epub 1999/02/11.
139. Suarez DL. Evolution of avian influenza viruses. *Vet Microbiol*. 2000;74(1-2):15-27. Epub 2000/05/09.
140. Suriya R, Hassan L, Omar AR, Aini I, Tan CG, Lim YS, et al. Seroprevalence and risk factors for influenza A viruses in pigs in Peninsular Malaysia. *Zoonoses Public Health*. 2008;55(7):342-51. Epub 2008/08/01.
141. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Jr., Chambers TM, Kiso M, et al. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol*. 2000;74(24):11825-31. Epub 2000/11/23.
142. Suzuki Y, Nei M. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol*. 2002;19(4):501-9. Epub 2002/03/29.

143. Swenson SL, Vincent LL, Lute BM, Janke BH, Lechtenberg KE, Landgraf JG, et al. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J Vet Diagn Invest.* 2001;13(1):36-42. Epub 2001/03/13.
144. Szeredi L, Szentirmai C. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Vet Hung.* 2008;56(1):101-9. Epub 2008/04/12.
145. Takemae N, Parchariyanon S, Damrongwatanapokin S, Uchida Y, Ruttanapumma R, Watanabe C, et al. Genetic diversity of swine influenza viruses isolated from pigs during 2000 to 2005 in Thailand. *Influenza Other Respi Viruses.* 2008;2(5):181-9. Epub 2009/05/21.
146. Takimoto S, Grandien M, Ishida MA, Pereira MS, Paiva TM, Ishimaru T, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol.* 1991;29(3):470-4. Epub 1991/03/01.
147. Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, Nakanishi Y, Fukuda R. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J Gen Virol.* 1993;74 (Pt 11):2347-55. Epub 1993/11/01.
148. Teodoroff TA, Pecoraro MR, Baumeister E, Janke BH, Machuca M, Cappuccio JA, et al. Serological and immunohistochemical studies of influenza virus in fattening pigs in Argentina. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases; Roma, Italia2003. p. 262-3.
149. Teodoroff TA, Piñeyro P, Pecoraro MR, Baumeister E, Cappuccio JA, Perfumo CJ, editors. Seroprevalence of H1 and H3 influenza virus in fattening pigs from Argentina. En: libro de ponencias: II Congreso Latinoamericano de Suinicultura; 2004; Foz do Iguacu. PR Brasil.

150. Thacker B, Wilson W, Mueller A, editors. Impact of maternally-derived antibodies on serological responses to swine influenza vaccination. . En: libro de ponencias: 18th International Pig Veterinary Society Congress; 2004; Hamburgo, Alemania: International Pig Veterinary Society.
151. Thacker BJ, Cain CM, Janke BH, Kinker DR, editors. Swine influenza virus passive antibody levels in pigs from vaccinated or nonvaccinated sows. En: libro de ponencias:15th International Pig Veterinary Society Congress; 1998; Birmingham, Inglaterra.
152. Thacker EL, Thacker BJ, Janke BH. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. *J Clin Microbiol.* 2001;39(7):2525-30.
153. Torremorell M, Juarez A, Chavez E, Yescas J, Doporto JM, Gramer M. Procedures to eliminate H3N2 swine influenza virus from a pig herd. *The Veterinary record.* 2009;165(3):74-7. Epub 2009/07/21.
154. Van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet Microbiol.* 2000;74(1-2):109-16. Epub 2000/05/09.
155. Van Reeth K, Brown IH, Durrwald R, Foni E, Labarque G, Lenihan P, et al. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. *Influenza Other Respi Viruses.* 2008;2(3):99-105. Epub 2009/05/21.
156. Van Reeth K, De Vleeschauwe A, Kyriakis C, Pensaert M. Influenza in birds, pigs and humans: Old theories versus current viewpoints. 19th International Pig Veterinary Society Congress; Copenhagen, Dinamarca: International Pig Veterinary Society; 2006. p. 26-35.
157. van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD, et al. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science.* 2006;312(5772):399. Epub 2006/03/25.

158. Van Til LD, Dohoo IR, Morley RS. Epidemiological associations between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* antibody titers and lung lesions in Prince Edward Island swine herds. *Can J Vet Res.* 1991;55(4):347-51. Epub 1991/10/01.
159. Vigre H, Dohoo IR, Stryhn H, Busch ME. Intra-unit correlations in seroconversion to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae* at different levels in Danish multi-site pig production facilities. *Prev Vet Med.* 2004;63(1-2):9-28. Epub 2004/04/22.
160. Vincent LL. A review of swine influenza diagnostics. *J Swine Health Prod.* 1998;6(1):33-4.
161. Vincent LL, Janke BH, Paul PS, Halbur PG. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest.* 1997;9(2):191-5. Epub 1997/04/01.
162. Webby RJ, Rossow K, Erickson G, Sims Y, Webster R. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Research.* 2004;103(1-2):67-73.
163. Webby RJ, Swenson SL, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol.* 2000;74(18):8243-51. Epub 2000/08/23.
164. Webby RJ, Webster RG. Emergence of influenza A viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1416):1817-28. Epub 2002/01/10.
165. Webster RG. 1918 Spanish influenza: the secrets remain elusive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1164-6. Epub 1999/02/17.
166. Webster RG. The importance of animal influenza for human disease. *Vaccine.* 2002;20 Suppl 2:S16-20. Epub 2002/07/12.

167. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):152-79. Epub 1992/03/01.
168. Wesley RD. Exposure of sero-positive gilts to swine influenza virus may cause a few stillbirths per litter. *Can J Vet Res.* 2004;68(3):215-7. Epub 2004/09/09.
169. Wilson MR, Takov R, Friendship RM, Martin SW, McMillan I, Hacker RR, et al. Prevalence of respiratory diseases and their association with growth rate and space in randomly selected swine herds. *Can J Vet Res.* 1986;50(2):209-16. Epub 1986/04/01.
170. Yu H, Hua RH, Zhang Q, Liu TQ, Liu HL, Li GX, et al. Genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in China from 1970 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1067-75. Epub 2008/01/18.
171. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS pathogens.* 2005;1(1):e4. Epub 2005/10/05.
172. Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol.* 2006;80(16):7976-83. Epub 2006/07/29.
173. Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, et al. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol.* 1999;73(10):8851-6. Epub 1999/09/11.
174. Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, et al. Emergence of H3N2 reassortant influenza A viruses in North American pigs. *Vet Microbiol.* 2000;74(1-2):47-58. Epub 2000/05/09.

Tabla 1: Proporción de sueros positivos por las pruebas de IHA y ELISA para los subtipos H1, H3 y H1 + H3.

	Casos Individuales					
	IHA	%	IC 95%	ELISA	%	IC 95%
H1N1	303 / 338	89,64	86,24 - 93,04	8 / 343	2,33	0,58 - 4,07
H3N2	262 / 355	73,8	69,08 - 78,51	33 / 342	9,64	6,37 - 12,92
H1N1 + H3N2	211 / 338	62,42	57,11 - 67,73	0 / 342	-	-

Tabla 2: Proporción de granjas positivas por las pruebas de IHA y ELISA para los subtipos H1, H3 y H1 + H3

	Granjas					
	IHA	%	IC 95%	ELISA	%	IC 95%
H1N1	11 / 13	84,61	54,55 - 98,07	7 / 13	53,84	25,13 - 80,77
H3N2	9 / 13	69,23	38,57 - 90,90	4 / 13	30,76	9,09 - 61,42
H1N1 + H3N2	10 / 13	76,92	46,18 - 94,96	0 / 13	-	-

Tabla 3: Correlación de Kappa para ambas pruebas a nivel individual y a nivel de granja para H1 y H3.

	Casos Individuales		Granjas	
	ELISA - IHA (H1)	ELISA - IHA (H3)	ELISA - IHA (H1)	ELISA - IHA (H3)
Valor de Kappa	0,005	0,070	0,350	0,235
Valor de <i>p</i>	0,330	0,0003	0,09	0,188
IC (95%)	0,001 - 0,009	0,043 - 0,096	-0,052 - 0,752	- 0,054 - 0,524

Tabla 4: Frecuencia de establecimientos según distintas características de producción.

Concepto evaluado	Categoría	Número total de granjas dentro de cada categoría
Sistema de producción y manejo		
Sitio I	Flujo continuo	1
	Todo dentro/Todo afuera	9
Sitio II	Flujo continuo	5
	Todo dentro/Todo afuera	5
Sitio III	Flujo continuo	9
	Todo dentro/Todo afuera	1
Tipo de piso	Enrejado 100%	6
	Enrejado 50%	4
Defensas perimetrales	Si	3
	No	7
Número de madres en producción	<200	4
	200-300	4
	>300	2
Peso corporal a la faena	< 100	3
	100-105	3
	>105	3
Promedio de ganancia diaria desde destete a terminación/g	< 550	3
	550-700	3
	>700	3
Mortalidad en maternidad	< 9%	3
	9-11%	3
	> 11%	4
Mortalidad en recría	< 2%	2
	2-4%	3
	> 4%	5
Mortalidad en desarrollo-terminación	< 2%	0
	2-4%	6
	> 4%	4
Programa de vacunación	<i>M. hyopneumoniae</i>	9
	<i>A. pleuropneumoniae</i>	0
	PCV-2	0
	<i>Escherichia coli</i>	1
	Influenza	0
Medicación en el alimento		
Recría	Continua	5
	Pulsos	4
	Nunca	1
Desarrollo-terminación	Continua	2
	Pulsos	8
	Nunca	0

Tabla 5: Frecuencia, distribución y cronicidad de signos clínicos respiratorios compatibles con infección por el virus de influenza y de signos sistémicos compatibles con síndrome de adelgazamiento posdestete.

Signos clínicos	Categoría	Número total de granjas dentro de cada categoría
<u>Signos respiratorios</u>		
<u>Recría</u>		
Tos	Si	7
	No	4
Estornudo	Si	7
	No	4
Descarga óculo-nasal	Si	4
	No	7
Postración e inactividad	Si	5
	No	6
Distribución del cuadro	Aleatoria	8
	Por corral	2
	Por galpón	1
Duración del cuadro	1-7 días	2
	7-21 días	3
	2 meses	1
	Persistente	5
<u>Desarrollo-terminación</u>		
Tos	Si	9
	No	2
Estornudo	Si	8
	No	3
Descarga óculo-nasal	Si	5
	No	6
Postración e inactividad	Si	5
	No	6
Distribución del cuadro	Aleatoria	11
	Por corral	0
	Por galpón	0
Duración del cuadro	1-7 días	5
	7-21 días	0
	2 meses	1
	Persistente	5
<u>Signos sistémicos compatibles con SMAP</u>		
Adelgazamiento	Si	9
	No	2
Palidez	Si	7
	No	4
Diarrea	Si	7
	No	4
Disminución del consumo	Si	2
	No	9

Tabla 6: Frecuencia de lesiones histopatológicas pulmonares observadas en cada establecimiento.

Número de establecimiento	Bronconeumonía (NEP)	Bronconeumonía catarral, supurativa (BNCS)	Pleuroneumonía (PL)	Pleuritis Fibrinosa (PLF)	Bronquitis/ Bronquiolitis (BB)	Cambios Circulatorios (CC)
1					1/1 (100%)	
2		4/4 (100%)				
3				1/4 (25%)		3/4 (75%)
4		2/7 (28,5%)	1/7 (14,3%)	1/7 (14,3%)		3/7 (42,8%)
6				2/3 (66%)		1/3 (34%)
7		2/3 (75%)				1/3 (25%)
8		2/4 (50%)				2/4 (50%)
9		4/8 (50%)	2/8 (25%)	2/8 (25%)		
10		1/2 (50%)	1/2 (50%)			
11	1/6 (16,6%)	1/6 (16,6%)			4/6 (66,6%)	

Tabla 7: Frecuencia de lesiones histopatológicas en cada establecimiento.

Órgano/ tipo de lesión	Establecimiento										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Linfonodo:											
Linfonodo reactivo								1/4 (25%)	4/8 (50%)		2/7 (28%)
Depleción linfoidea		1/4 (25%)	1/4 (25%)	2/4 (50%)			2/3 (66%)	4/4 (100%)	4/8 (50%)		2/7 (28%)
Tonsila:											
Depleción linfoidea									1/8 (12.5%)		
Tonsilitis necrótica							1/3 (33%)		1/8 (12.5%)		
Riñón:											
Nefritis Intersticial	2/2 (100%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)					2/8 (25%)	1/1 (100%)	1/7 (14%)
Glomerulonefritis Fibrinosa							1/3 (33%)	1/4 (25%)	1/8 (12.5%)		
Corazón:											
Pericarditis fibrinosa			1/4 (25%)			1/3 (33%)			3/8 (37.5%)		
Hígado:											
Necrosis centrolobulliar				1/4 (25%)	1/1 (100%)				1/8 (12.5%)		1/7 (14%)
Perihepatitis						2/3 (66%)					
Intestino delgado:											
Depleción linfoidea en placas de Peyer				1/4 (25%)			1/3 (33%)				
Enteritis catarral				1/4 (25%)						1/1 (100%)	
Enteritis profunda		1/4 (25%)									
Intestino grueso:											
Necrosis superficial							1/3 (33%)				1/7 (14%)
Depleción linfoidea							1/3 (33%)				
Hiperplasia de células caliciformes								1/4 (25%)		1/1 (100%)	

Tabla 8: Lesiones en frigorífico: número de animales afectados, tipo y extensión de lesiones pulmonares

Número de establecimiento	Número de animales afectados por tipo de lesión		Porcentaje de superficie pulmonar afectada según tipo de lesión							
	Total	Total afectados (%)	M (%)	MC (%)	F (%)	PLC (%)	M (DS)	MC (DS)	F (DS)	PLC (DS)
1	107	51(47,66)	16 (31,37)	14 (27,45)	15 (29,41)	6 (11,76)	6,7 (3,0)	10,0 (3,9)	10,2 (5,5)	9,2 (2,6)
2	71	10 (14,08)	9 (90,0)	0	1 (10,0)	0	4,2 (1,2)	0	5,0 (-)	0
3	49	36 (73,47)	17 (47,22)	3 (8,33)	13 (36,11)	3 (8,33)	8,1 (7,3)	21,7 (2,9)	8,3 (5,2)	41,7 (31,7)
4	26	10 (38,46)	10 (100,0)	0	0	0	10,7 (6,1)	0	0	0
5	68	68 (100,00)	31 (45,59)	9 (13,24)	12 (17,65)	16 (23,53)	11,3 (6,8)	11,5 (8,2)	12,7 (6,3)	10,3 (6,9)
6	24	9 (37,50)	2 (22,2)	6 (66,67)	1 (11,11)	0	16,2 (8,8)	11,7 (8,3)	5,0 (-)	0
7	73	54 (73,97)	21 (38,89)	9 (16,67)	21 (38,89)	3 (5,56)	7,0 (3,7)	11,7 (9,1)	8,1 (3,7)	10,5 (6,2)
8	149	91 (61,07)	72 (79,123)	13 (14,29)	5 (5,49)	1 (1,10)	15,3(9,0)	20,4 (8,8)	10,0 (6,4)	10,0 (-)
9	23	12 (52,17)	2 (16,67)	6 (50,0)	4 (33,33)	0	6,2 (5,3)	9,6 (5,6)	13,1 (5,5)	0
10	65	41 (63,08)	25 (60,98)	11 (26,83)	5 (12,20)	0	6,4 (3,1)	13,7 (8,0)	7,0 (5,1)	0

Neumonía catarral compatible con infección por *M. hyopneumoniae* (M), Neumonía catarral complicada (MC), fisuras (F), Pleuroneumonía (PLC). Desvío estándar (DS)

Tabla 11: Asociación entre variables cualitativas de manejo y seroconversión frente a tres agentes patógenos respiratorios. Modelo univariado.

Variable	Serología positiva a <i>M. hyopneumoniae</i>				Serología positiva a <i>A. pleuropneumoniae</i>				Serología positiva a PCV-2				
	Cerdos positivos (%)	Odds Ratio	P-value	95% IC del OR ^c	Cerdos positivos (%)	Odds ratio	P-value	95% IC del OR ^c	Cerdos positivos (%)	Odds Ratio	P-value	95% IC del OR ^c	
	Maternidad	Tratamiento antibiótico	93 (31,0)	0,63	0,14	0,36-1,12	170 (56,7)	0,67	0,26	0,34-1,31	92 (30,7)	4,04	0,0002
Recría	Numero de madres	123 (41,0)	N/D	< 0,0001	N/D	217(72,33)	N/D	0,032	N/D	100 (33,3)	N/D	0,65	N/D
	TDTF	45 (15,0)	0,78	0,34	0,49-1,26	12 (4,0)	0,18	< 0,0001	0,09-0,35	8 (2,67)	0,17	< 0,0001	0,08-0,37
	Piso enrejillado	90 (30,0)	0,49	0,018	0,27-0,87	45 (15,0)	0,15	< 0,0001	0,08-0,28	38 (12,7)	0,30	0,0003	0,16-0,56
	Limpieza con agua fría vs. agua caliente	9 (3,0)	0,59	0,24	0,29-1,33	15 (5,0)	3,10	0,0046	1,43-6,66	15 (5,0)	4,87	0,0001	2,22-10,65
	Desinfectante	114 (38,0)	5,12	< 0,0001	2,41-10,88	66 (22,0)	1,13	0,74	0,59-2,18	31 (10,33)	0,15	< 0,0001	0,08-0,28
Desarrollo/Terminación	Numero de madres	123 (41,0)	N/D	< 0,0001	N/D	81 (27,0)	N/D	0,926	N/D	61 (20,33)	N/D	< 0,0001	N/D
	Tratamiento profiláctico	84 (28,0)	0,29	< 0,0001	0,16-0,52	66 (22,0)	1,13	0,74	0,59-2,18	46 (15,33)	0,71	0,37	0,36-1,39
	Tratamiento antibiótico	105 (35,0)	0,42	0,0314	0,19-0,92	69 (23,0)	0,51	0,12	0,24-1,12	61 (20,33)	17,91	0,0013**	1,08-297,09
	TDTF	6 (2,0)	0,26	0,0032	0,10-0,66	9 (3,0)	0,86	0,84	0,38-1,95	15 (5,0)	4,87	0,0001	2,22-10,65
	Piso enrejillado	90 (30,0)	0,49	0,018	0,27-0,87	15 (5,0)	3,10	0,0046	1,43-6,66	53 (17,7)	5,84	< 0,0001	2,66-12,82
	Limpieza con agua fría vs. agua caliente	27 (9,0)	0,95	0,89	0,54-1,68	9 (3,0)	0,29	0,0007	0,14-0,63	N/D	N/D	N/D	N/D
	Numero de madres	138 (46,0)	N/D	0,006	N/D	99 (33,0)	N/D	< 0,0001	N/D	61 (20,3)	N/D	< 0,0001	N/D
Desinfectante	84 (28,0)	0,44	0,001	0,27-0,74	69 (23,0)	0,98	1,0	0,58-1,65	38 (12,67)	0,64	0,16	0,36-1,16	
Tratamiento antibiótico	78 (26,0)	0,29	< 0,0001	0,17-0,50	45 (15,0)	0,18	< 0,0001	0,11-0,31	38 (12,67)	0,64	0,16	0,36-1,16	

* P values < 0.2; ** Logit estimators usa una corrección de 0.5 en cada celda para las tablas que contienen cero. N/D: No se calculó el OR y IC debido a que no son variables dicotómicas.

Tabla 12: Asociación entre factores de manejo y seroconversión para tres agentes patógenos respiratorios. Modelo lineal generalizado.

Variable	Serología positiva a <i>M. hyopneumoniae</i>			Serología positiva a <i>A. pleuropneumoniae</i>			Serología positiva a PCV-2		
	OR	95% CI of OR ^e	P-value	OR	95% CI of OR ^e	P-value	OR	95% CI of OR ^e	P-value
TDTF	0,388	0,209 - 0,720	0,0028	2,391	1,319 - 4,335	0,0041	N/D	N/D	N/D
Piso enrejillado	2,018	0,665 - 6,123	<0,0001	1,485	0,548 - 4,022	0,0013	N/D	N/D	N/D
Limpieza con agua fría vs agua caliente	0,470	0,259- 0,853	0,0131	N/D	N/D	N/D	3,595	1,811 - 7,137	0,0003
Desinfectante	1,761	1,000- 3,102	0,0501	N/D	N/D	N/D	4,751	2,847 - 7,928	<0,0001
Número de madres	0,330	0,215 - 0,507	<0,0001	N/D	N/D	N/D			
	0,405	0,250- 0,655	<0,0001	N/D	N/D	N/D	1,664	1,316 - 2,103	<,0001
Tratamiento profiláctico	5,390	2,225- 13,060	0,0002	0,481	0,231-1,002	0,0505	N/D	N/D	N/D
Tratamiento antibiótico	2,731	1,713- 4,353	<0,0001	2,713	1,758 - 4,186	<0,0001	0,482	0,299 - 0,774	0,0026

* P-value < 0,5; N/D: No se observó asociación entre las variables y la presencia de animales seropositivos.

Tabla 13: Correlación entre edades de seroconversión para *A. pleuropneumoniae* y *M. hyopneumoniae* y ganancia diaria de peso. Correlación entre lesiones tipo BNC observadas en frigorífico y ganancia diaria de peso.

	<i>r</i> Spearman	<i>P</i> -value
GDP 82-105 y porcentaje de seropositivos a <i>App</i> a los 165 días	-0,785	0,036
GDP 82-105 y porcentaje de seropositivos a <i>Mh</i> a los 86 días	-0,778	0,022
GDP 105-Faena y porcentaje de seropositivos a <i>Mh</i> a los 165 días	-0,821	0,006
GDP 82-105 y el porcentaje BNC observado en frigorífico	-0,714	0,023

BNC: Bronconeumonía catarral, GDP: ganancia diaria de peso, *App*: *A. pleuropneumoniae*, *Mh*: *M. hyopneumoniae*

Tabla 14. Resumen de los hallazgos clínicos, macroscópicos, rRT-PCR y diagnóstico presuntivo en función de los hallazgos macroscópicos.

Nº protocolo	Edad Días	Peso Kg (Temp).	Hallazgos macro	rRT-PCR SIV	Diagnóstico Presuntivo
20026	45	13 (N)	CCV	Pulmón +	Neumonía (SIV)
20027	50	17 (N)	CCV	Pulmón e Hisopado Bronquial	SLD
20028	45	7 (NE)	SLD	Hisopado Bronquial +	Neumonía (SIV)
20029	45	8 (H)	CCV	Pulmón +	Neumonía (SIV)
20030	50	14 (N)	CCV RAI 4	Pulmón +	Neumonía (SIV) Rinitis (RAI)
20031	50	15 (H)	Diarrea CCV RAI 2	Pulmón e Hisopado Bronquial	Enteritis Neumonía
20134	51	12,2 (F)	CCV	Pulmón +	Neumonía (viral)
20139	51	9 (F)	CCV RAI 4	Pulmón +	Neumonía (viral) Rinitis (RAI)
20140	51	11 (N)	CCV	Pulmón +	Neumonía (viral)
20141	51	13 (F)	CCV RAI 2		Neumonía

N: Normal, **NE:** No evaluado, **H:** hipotermia, **F:** Fiebre. **CCV:** Consolidación cráneo-ventral, **RAI:** Rinitis atrófica a cuerpos de inclusión # grado de desviación del tabique nasal, **SLD:** Sin lesiones de carácter diagnosticas.

Tabla 15. Resumen de los hallazgos microscópicos y los resultados de la técnica de IHQ.

Nº protocolo	Histopatología	IHQ
20026	Bronquiolitis necrótica	-
20027	Bronquiolitis necrótica	+
20028	SLD	-
20029	Bronquiolitis necrótica	+
20030	Bronquiolitis necrótica y colapso pulmonar Cecitis y colitis catarral	-
20031	Bronconeumonía con hiperplasia del epitelio bronquiolar e infiltración de pmn en la luz. Linfoadenitis, apoptosis en las placas de Peyer del ID	
20134	SLD	-
20139	Bronconeumonía supurativa, con pleuritis, bronquiolitis necrótica RAI	-
20140	Bronquiolitis necrótica y colapso pulmonar	+
20141	Bronquiolitis necrótica	-

RAI: Rinitis a cuerpo de inclusión. **SLD:** Sin lesiones diagnosticas. **pmn:** polimorfo nucleares

Tabla 16. Análisis de similitud nucleotídica (BLAST) para los segmentos completos de los genes PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1 y NS y las cepas de influenza A con estrecha relación nucleotídica para cada uno de los genes estudiados.

Segmento genómico*	% de similitud	Cepas identificadas por BLAST	Subtipo	Número de acceso en Genbank
1 (PB2)	98%	A/Wellington/34/2001	H3N2	CY012319.1
	96%	A/New York/418/2002	H3N2	CY003207.1
	96%	A/Auckland/604/2001	H3N2	CY023073.1
2 (PB1)	97%	A/New York/80/2001	H3N2	CY000575.1
	97%	A/Western Australia/15/2001	H3N2	CY013222.1
3 (PA)	98%	A/New York/75/2002	H3N2	CY001306.1
	98%	A/Auckland/602/2001	H3N2	CY022530.1
4 (HA)	97%	A/Hong Kong/CUHK28038/2000	H3N2	EU856960.1
	97%	A/Auckland/603/2001	H3N2	CY023058.1
5 (NP)	96%	A/Auckland/610/2002	H3N2	CY025053.1
	96%	A/Western Australia/45/2003	H3N2	CY015839.1
	96%	A/New York/408/2002	H3N2	CY003130.1
6 (NA)	98%	A/New York/114/2002	H3N2	CY000539.1
	98%	A/New York/85/2001	H3N2	CY000387.1
	98%	A/Auckland/614/2002	H3N2	CY022207.1
7 (M1)	97%	A/New York/85/2001	H3N2	CY000386.1
	96%	A/New York/420/2002	H3N2	CY003778.1
8 (NS)	96%	A/Western Australia/29/2002	H3N2	CY015736.1
	96%	A/New York/86/2002	H3N2	CY015728.1

*PB, polimerasa base; PA, polimerasa ácida; HA, hemaglutinina; NP, nucleoproteína; NA, neuraminidasa; M, proteína de matriz; NS, proteína no estructural

Figura 1: Porcentaje de animales positivos por establecimiento, para los subtipos H1N1 y H3N2 detectados mediante la técnica de IHA.

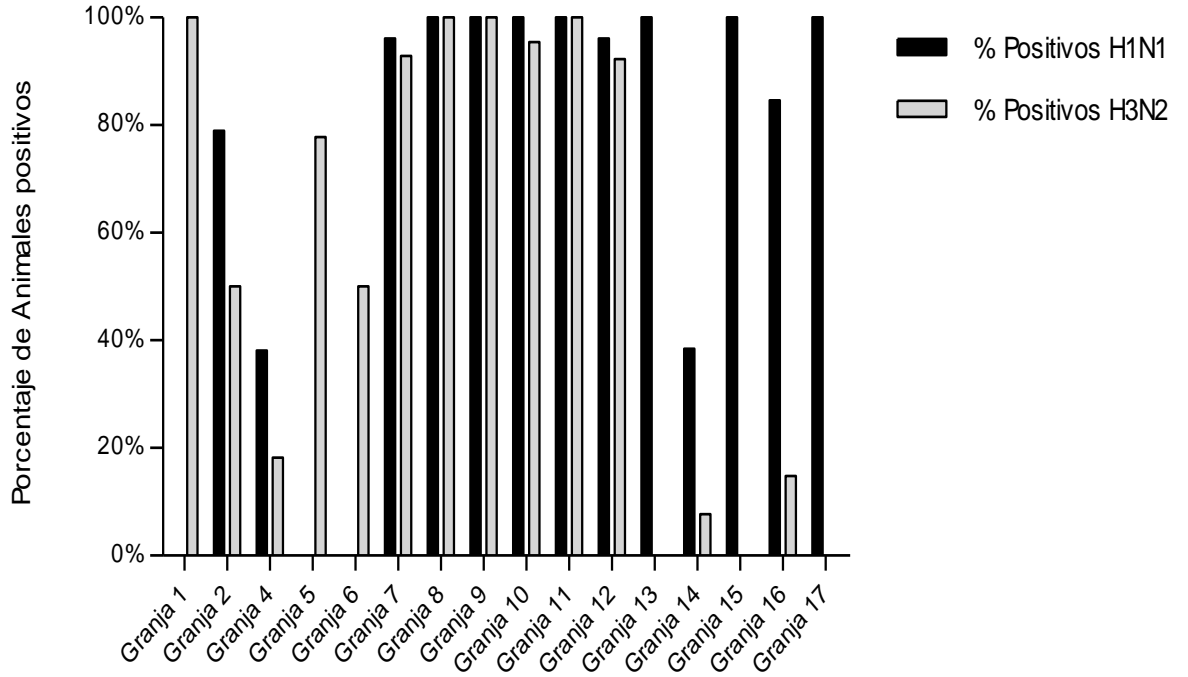
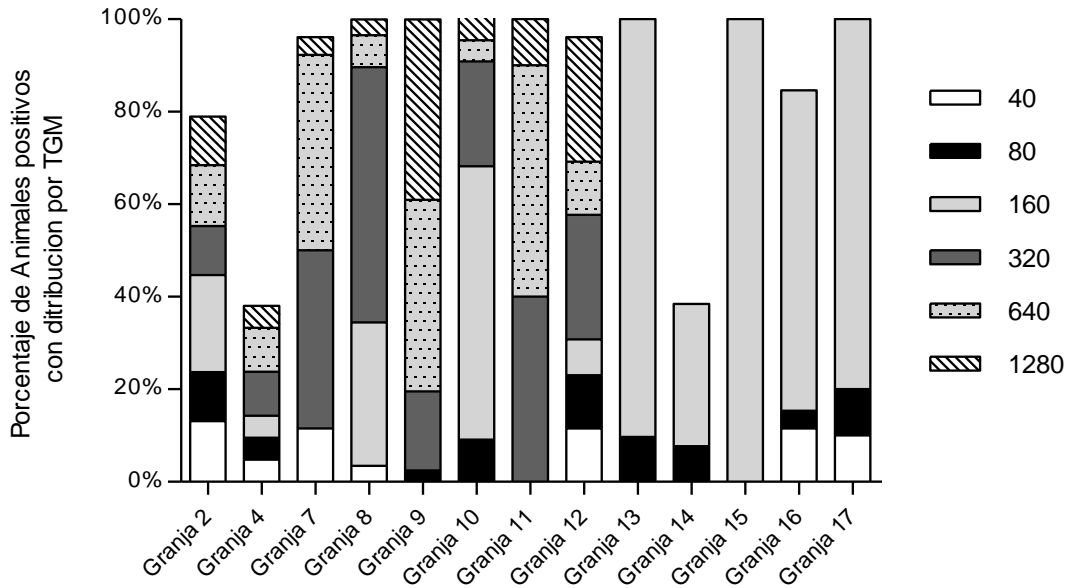
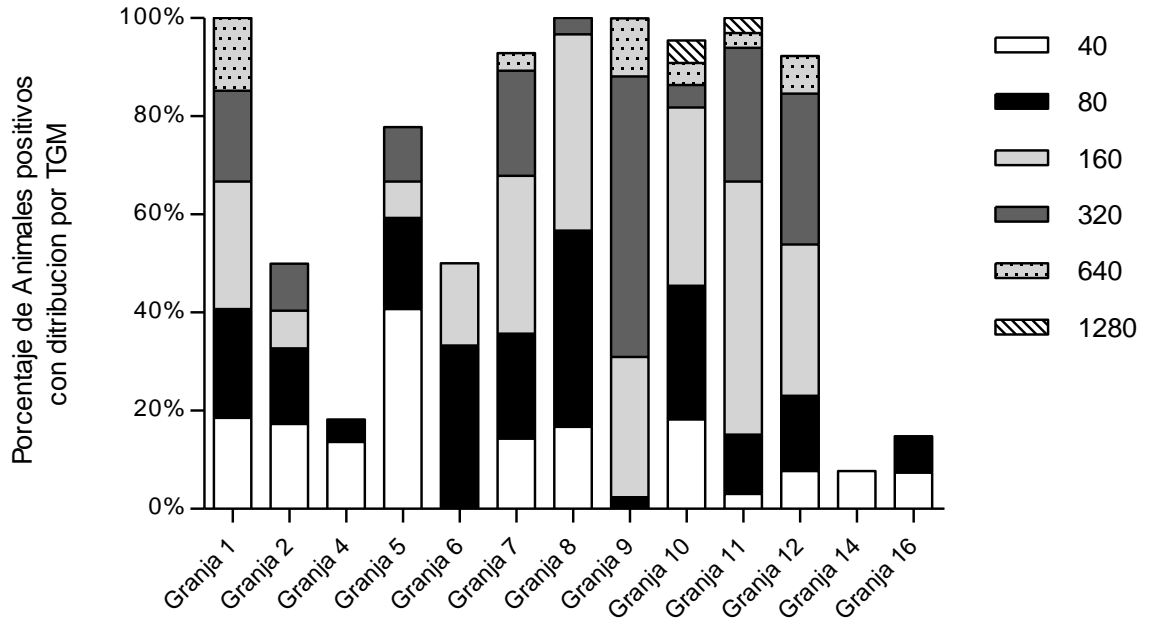


Figura 2: Distribución intra-granja de TGM observados en animales detectados positivos mediante la técnica de IHA para el subtipo H1N1.



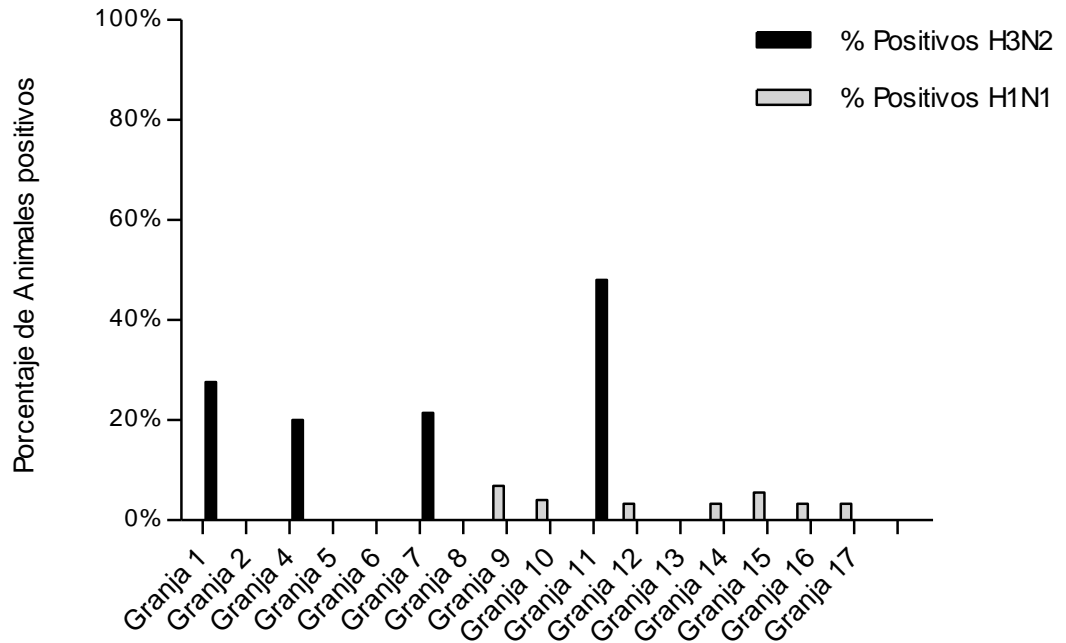
TGM: Titulo geométrico medio

Figura 3: Distribución intra-granja de TGM observados en animales detectados positivos por la técnica de IHA para el subtipo H3N2.



TGM: Título geométrico medio

Figura 4: Porcentaje de animales positivos por establecimiento, para los subtipos H1N1 y H3N2 detectados mediante la técnica de ELISA.



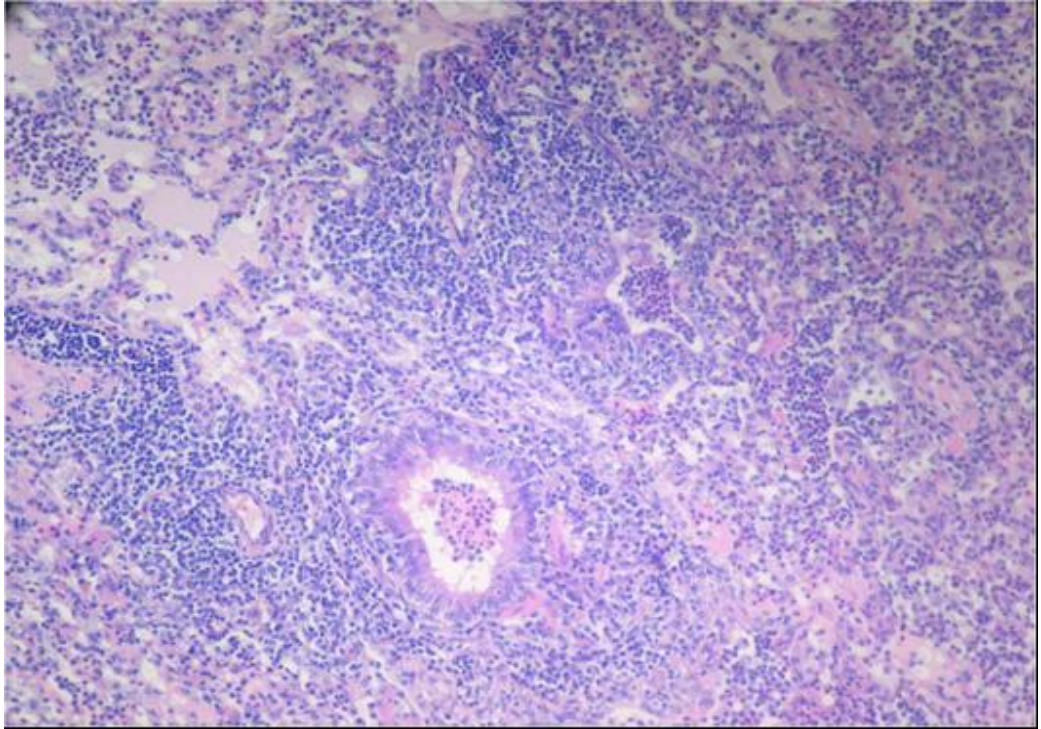


Figura 5: Nneumonía necrótica porcina. Bronquios: necrosis del epitelio, descamación y exudado en la luz. Hiperplasia del tejido linfoideo asociado.20X.

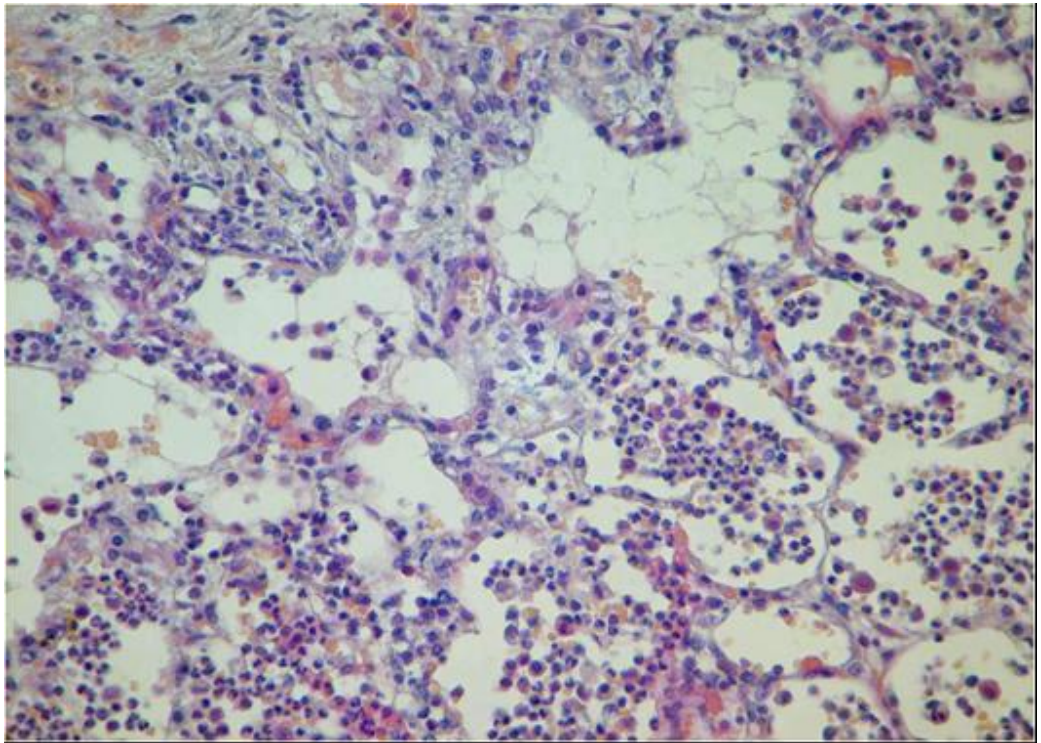


Figura 6 A: Alvéolos con exudado intraluminal e infiltración intersticial de macrófagos y neutrófilos. 20X

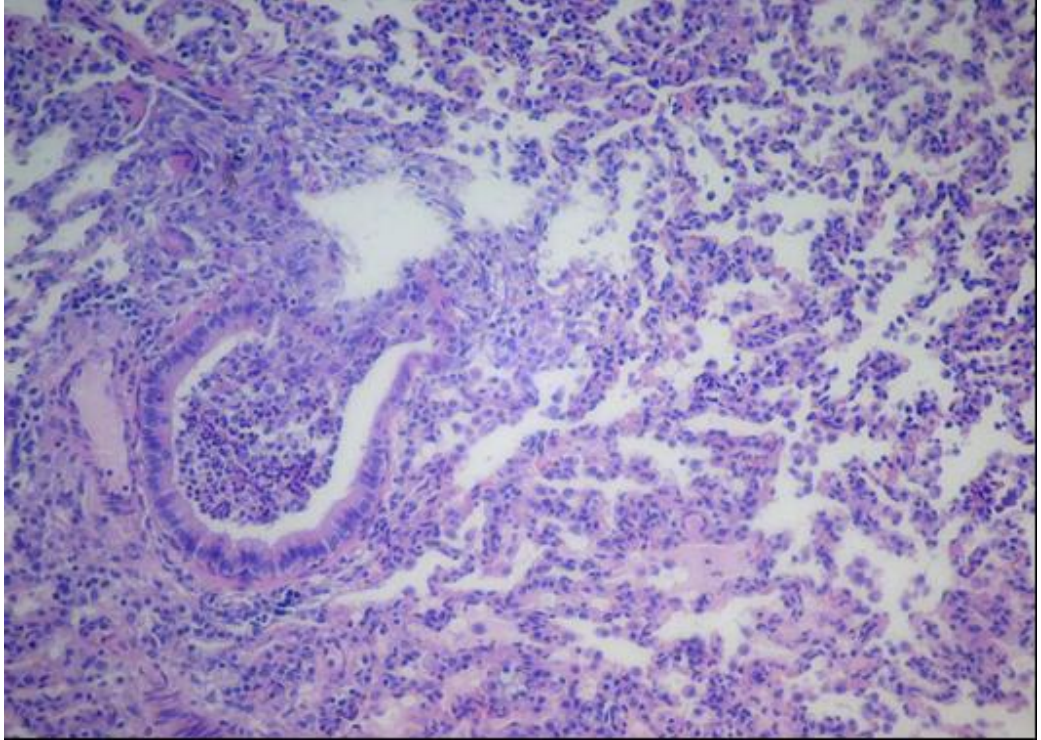


Figura 6 B: Bronquiolo: necrosis del epitelio en uno de los polos bronquiolares, descamación y exudado en la luz. Alvéolos: colapso alveolar, infiltración mononuclear, epitelización y áreas con edema alveolar. 20X.

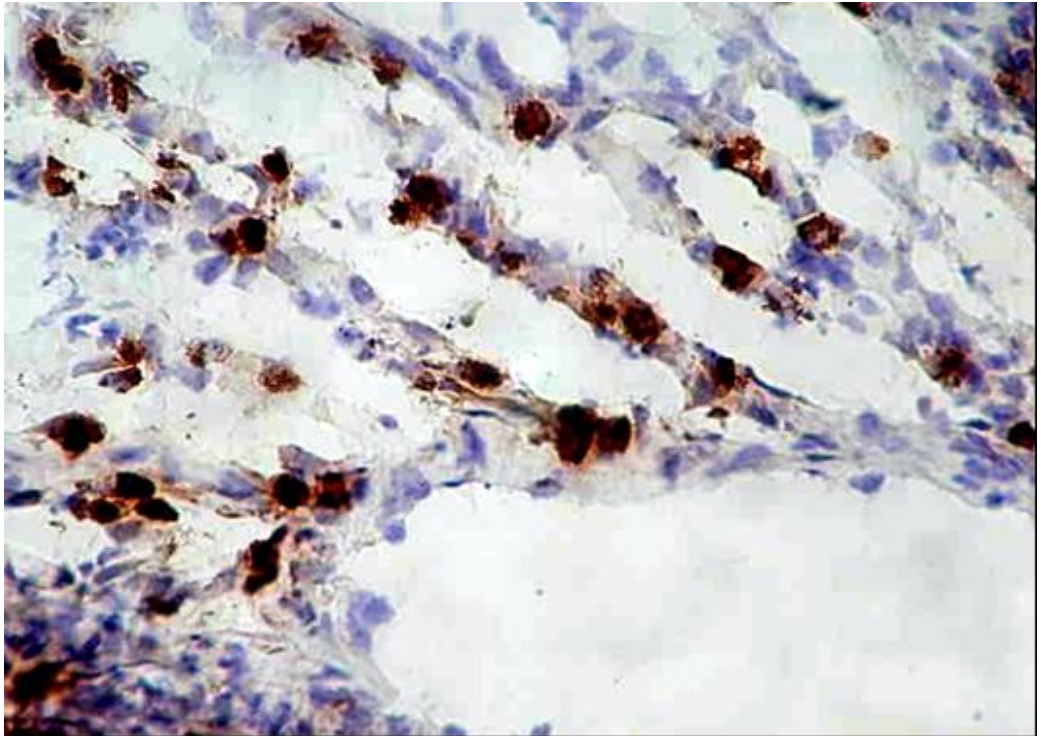


Figura 7: Pulmón: inmunomarcación positiva en macrófagos del septo alveolar y neumocitos. 100X. IHQ SIV

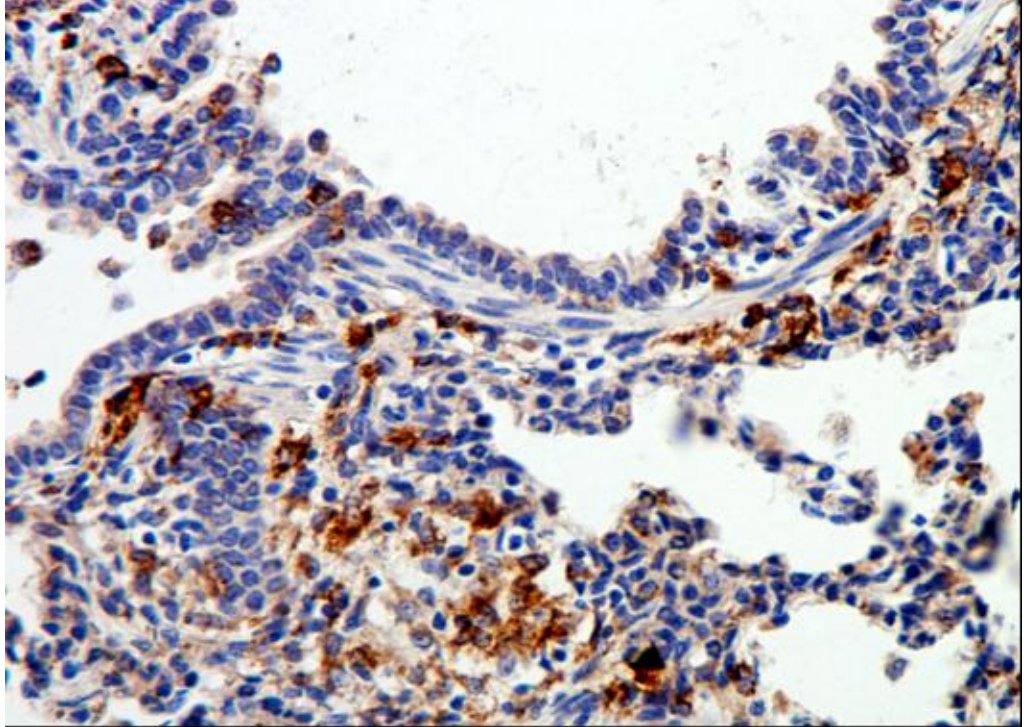


Figura 8: IHQ anti PCV2 – Pulmón – Histiocitos con inmunomarcación positiva a PCV-2 en tejido linfoideo peribronquial (BALT) 40X.

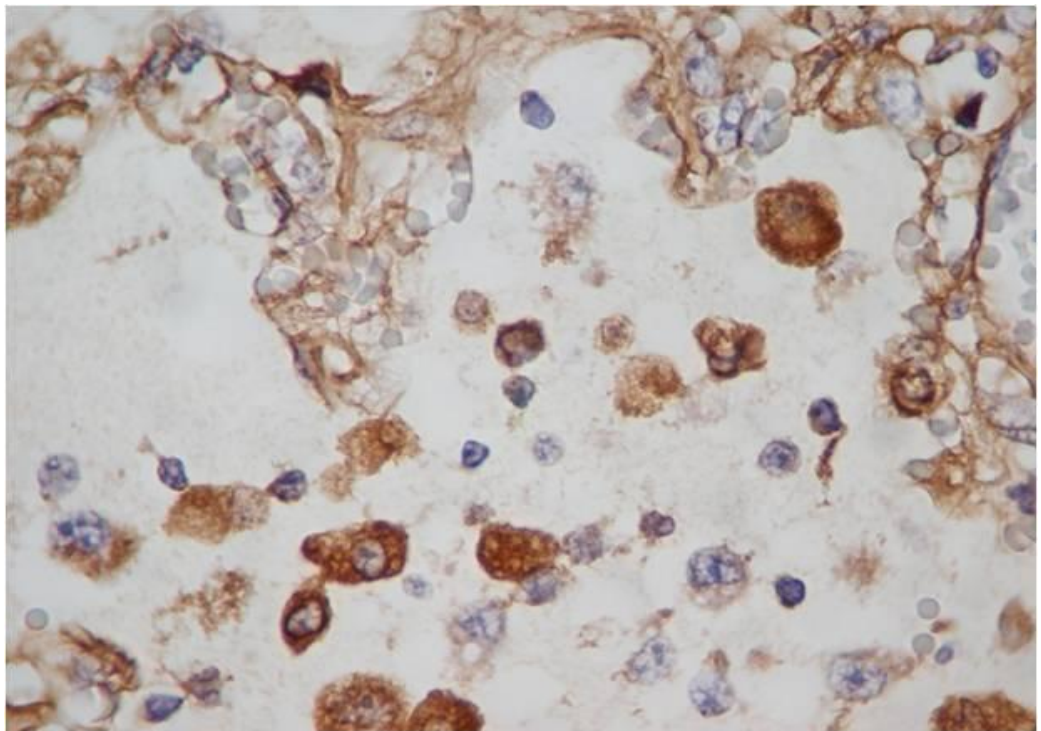


Figura 9: IHQ anti PCV2 Pulmón, inmunomarcacion positiva contra PCV-2 en macrófagos alveolares. 40X

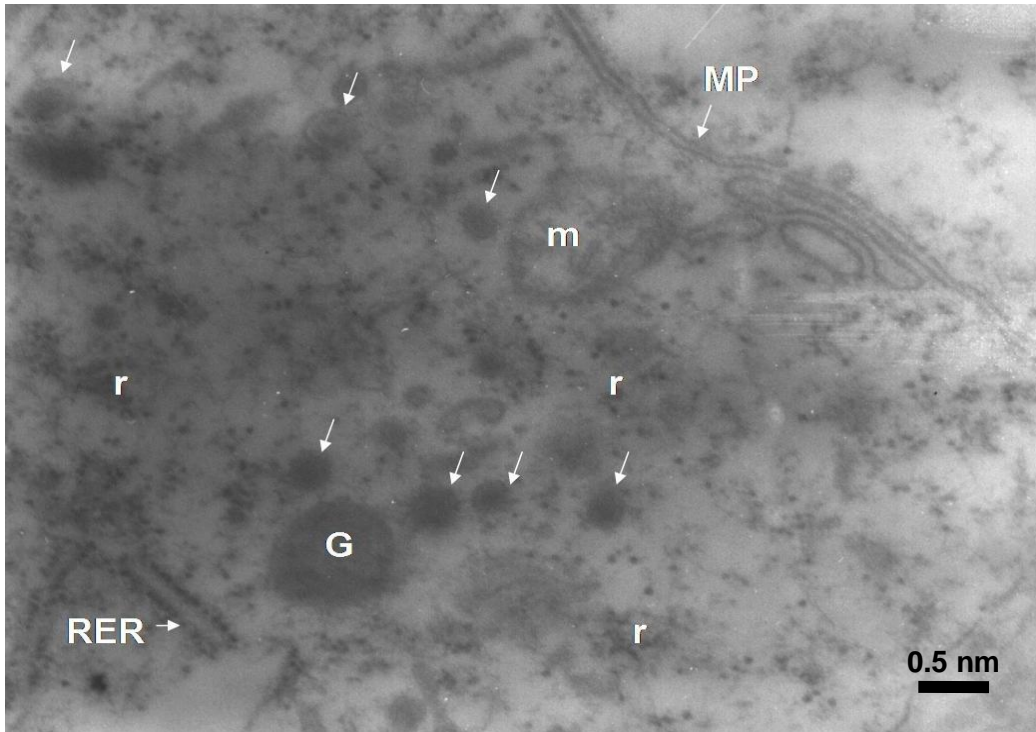


Figura 10: RER: retículo endoplásmico rugoso; G: gránulo; m: mitocondria; MP: membrana plasmática; r: ribosomas; Flechas: partículas virales. ME

Figura 11: Esquema de muestreo longitudinal para la determinación de agentes compatibles con infección del virus de influenza

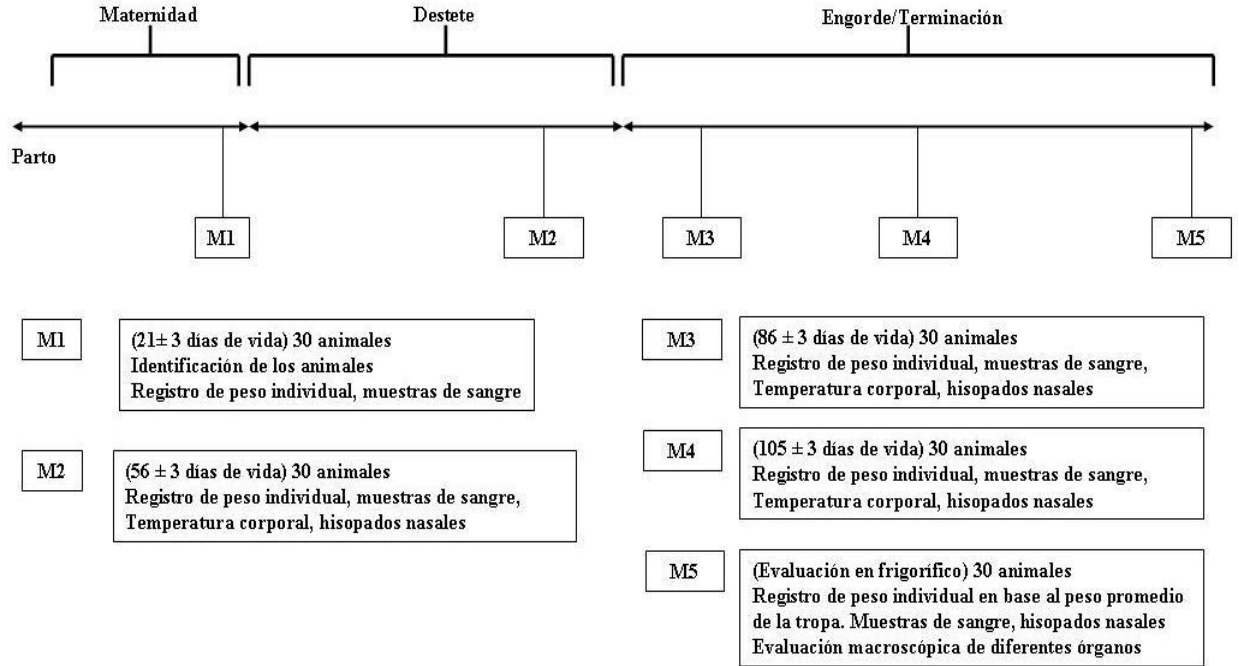


Figura 12: Distribución de parámetros productivos por establecimiento

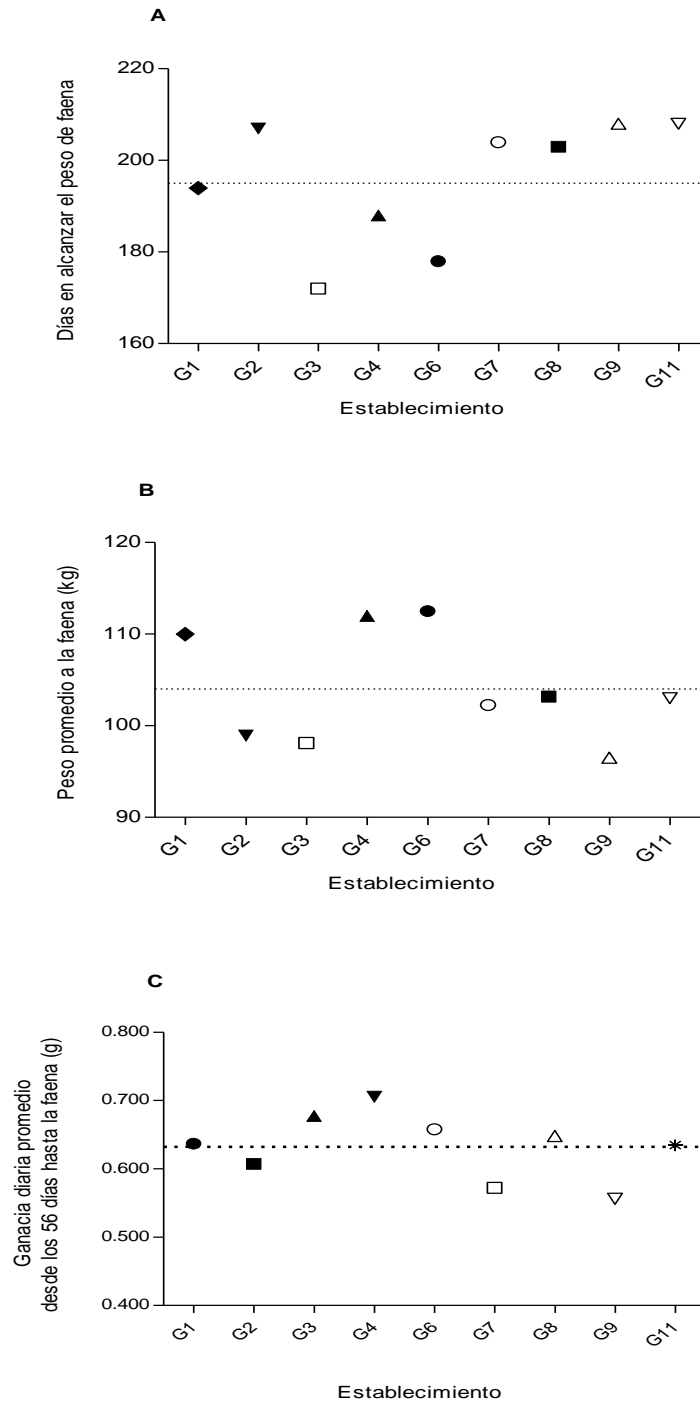


Figura 12A: distribución de los días en alcanzar el peso de faena con respecto a la media (línea de puntos) de todos los establecimientos (195 días, $DS \pm 13,6$). **Figura 12B:** distribución de los pesos promedio a la faena (línea de puntos) con relación al peso promedio para todos los establecimientos (104,6 kg, $DS \pm 6,06$). **Figura 12C:** GDP desde los 56 días de vida hasta peso de venta en relación a la media (línea de puntos) para todo los establecimientos (602g, 95% IC 531-673).

Figura 13: Porcentaje de mortalidad global y para cada etapa de producción a lo largo de un año

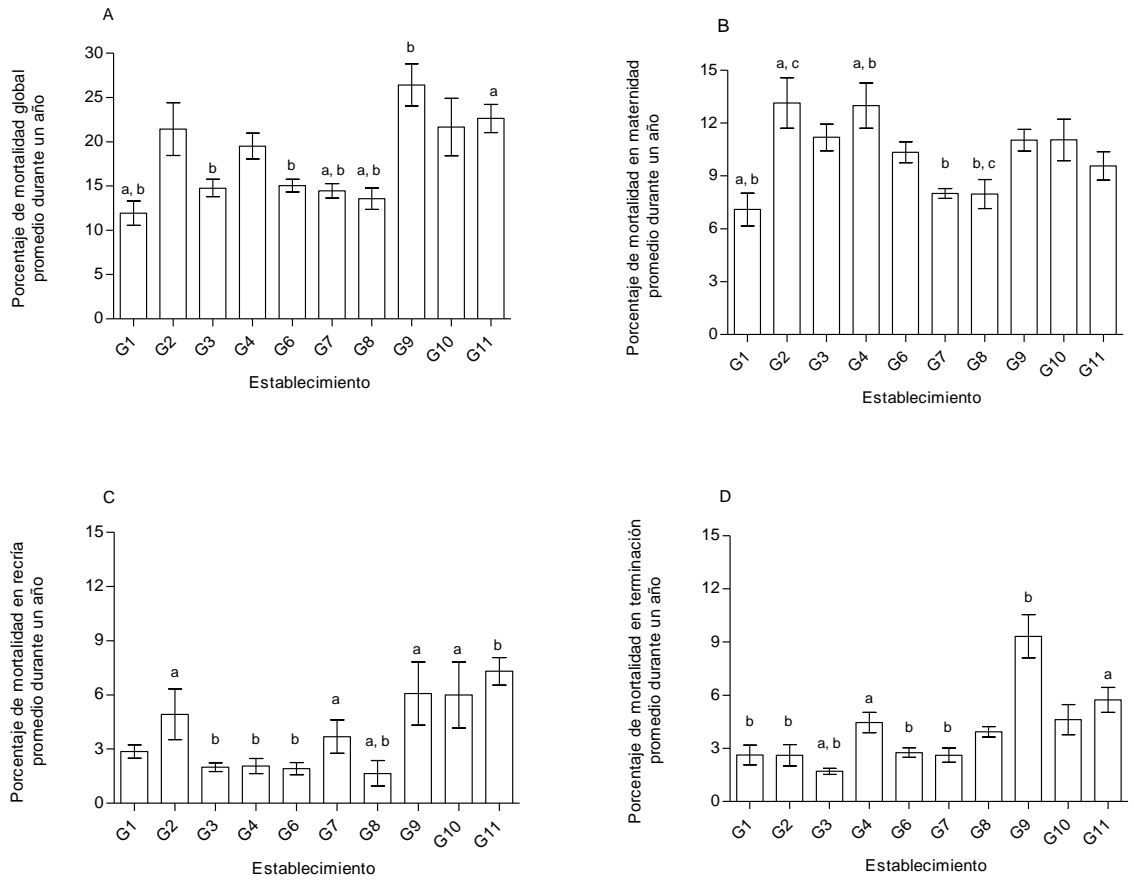


Figura 13A: mortalidad global desde el nacimiento hasta la faena. Figuras 13B, 13C y 13D: promedio de mortalidad en 10 establecimientos en cada etapa de producción (maternidad, recría, desarrollo-terminación) y diferencias estadísticas entre establecimientos. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre establecimientos.

Figura 14: Valores mensuales de mortalidad por establecimiento: control estadístico de proceso aplicado sobre un periodo mínimo de 6 meses en cada etapa de producción

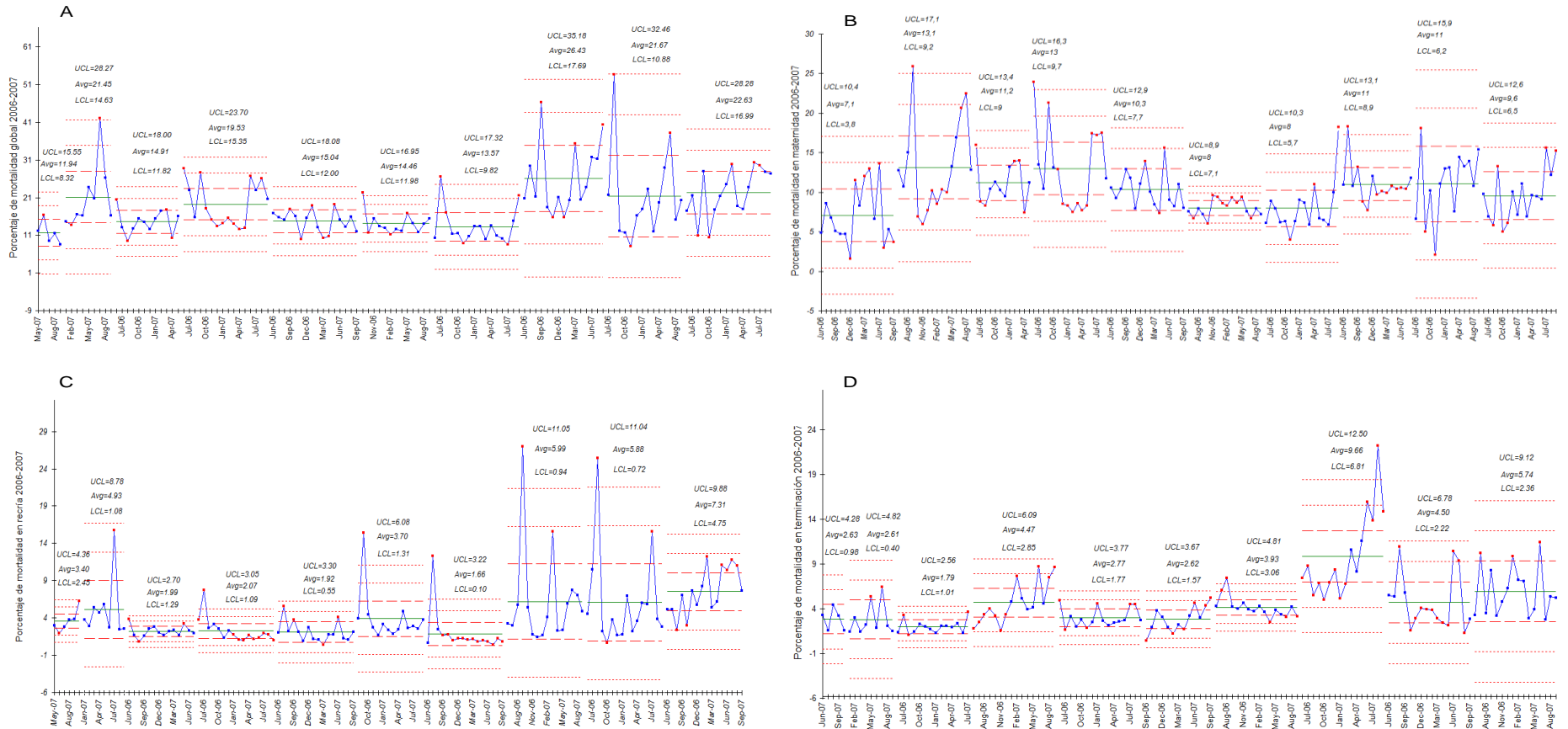


Figura 14A: expresa los valores de mortalidad global para cada establecimiento. **Figuras 14B, 14C y 14D:** control estadístico de proceso aplicado a cada una de las etapas de producción (maternidad, recría, desarrollo-terminación). Líneas verdes: promedio de cada etapa para cada establecimiento. Líneas rojas: sigmas con respecto a la media. Puntos rojos: grupos que presentan desvíos del control estadístico de proceso ($> 1 \sigma$ por 5 periodos, 2σ por dos periodos o $> 3 \sigma$ en al menos un periodo). UCL: Límite de control superior, Avg: Promedio, LCL: Límite de control inferior.

Figura 15: Seroprevalencia para *M. hyopneumoniae* (15A), *A. pleuropneumoniae* (15B) y PCV-2 (15C), por establecimiento, en distintas etapas de producción

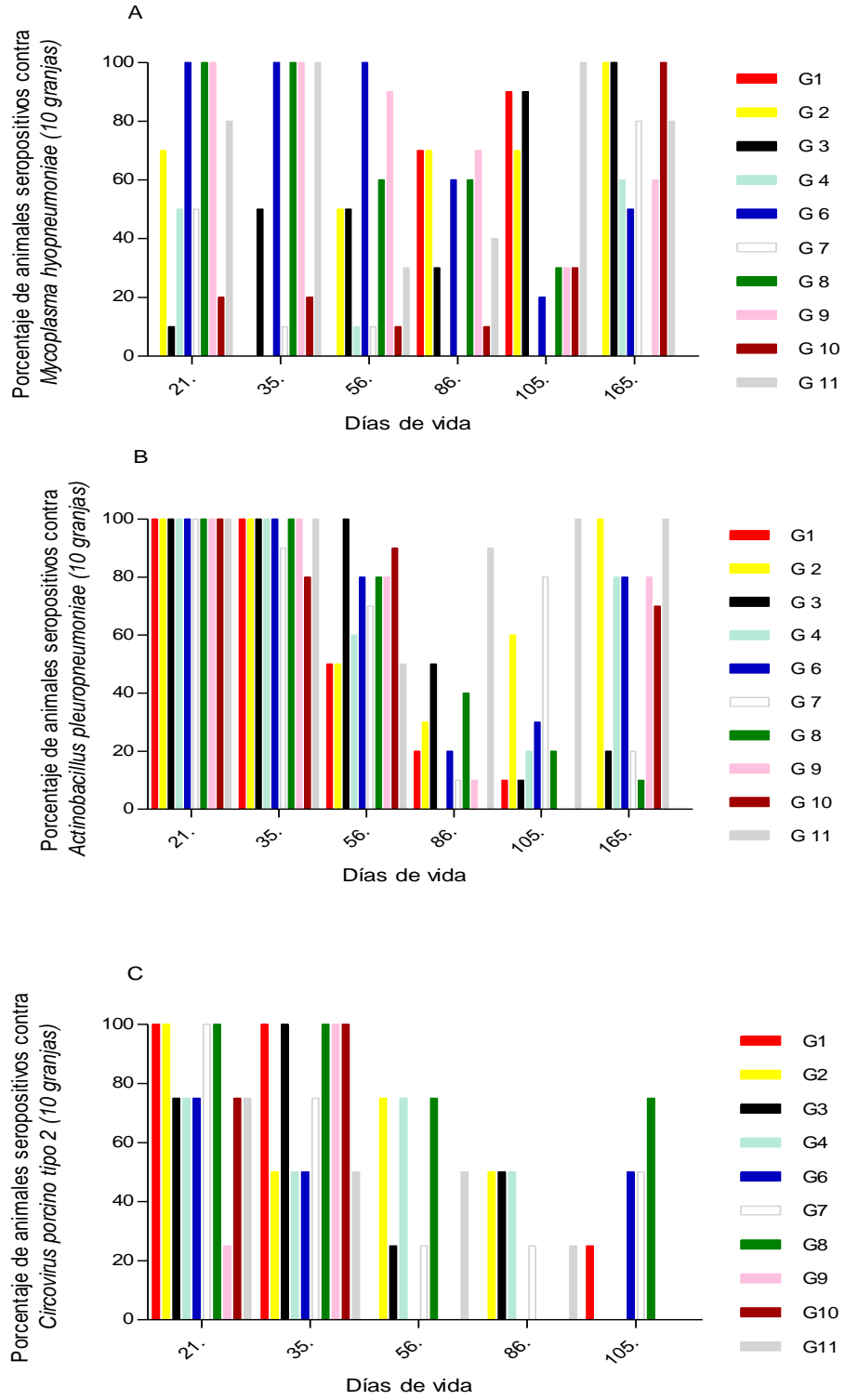




Figura 16A. Lesiones macroscópicas en cerdos infectados naturalmente con SIV H3N2. Nótese el patrón multifocal de consolidación lobulillar tipo “tablero de ajedrez” afectando los lóbulos cráneoventrales y dorsocaudales.



Figura 16B. Lesiones macroscópicas en cerdos infectado naturalmente con con SIV H3N2. Nótese el patrón multifocal de consolidación lobulillar tipo “tablero de ajedrez” afectando los lóbulos cráneoventrales y dorsocaudales.

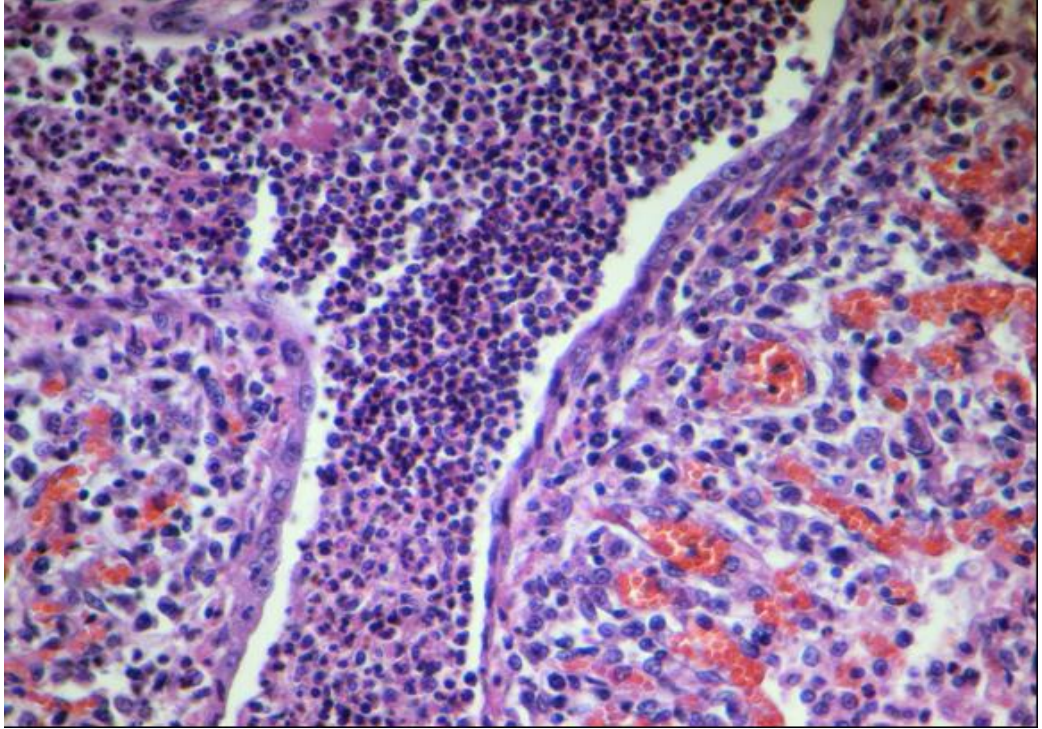


Figura 17A. Hallazgos histopatológicos en cerdos infectado naturalmente con SIV H3N2. La mucosa bronquiolar se encuentra recubierta por epitelio plano y se observan abundantes neutrófilos y células necróticas descamadas ocupando la luz bronquiolar. Hematoxilina y eosina. 40X

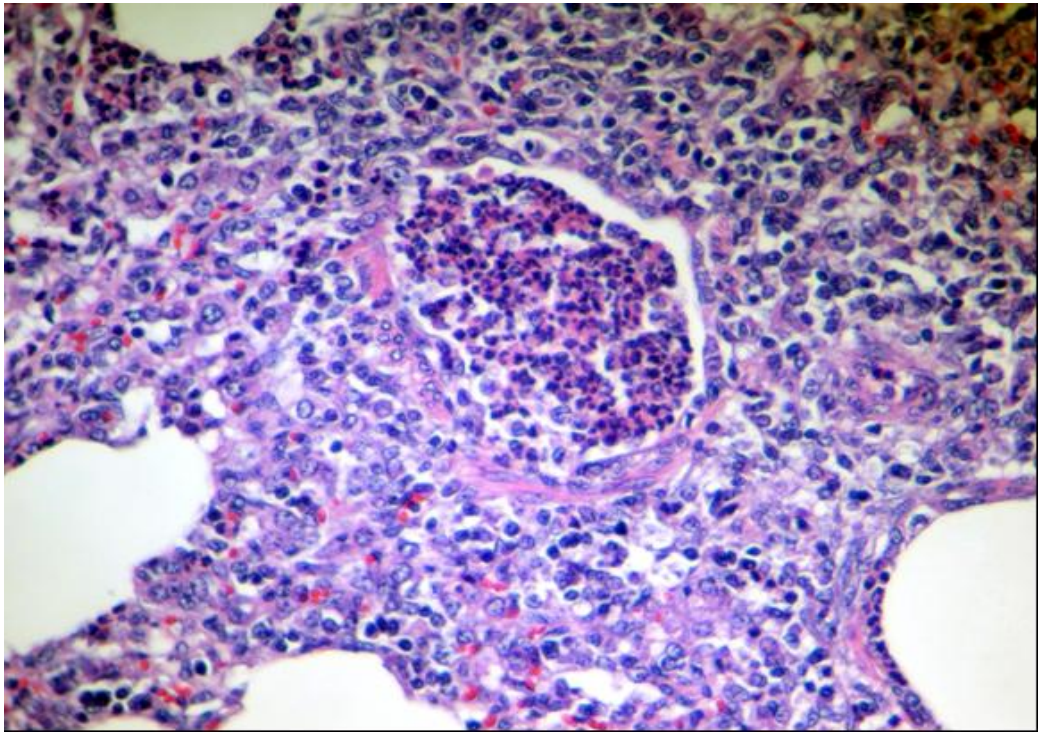


Figura 17B. Hallazgos histopatológicos en cerdos infectado naturalmente con SIV H3N2. Se observa necrosis unilateral de la mucosa del epitelio de revestimiento bronquiolar. La luz bronquiolar se encuentra completamente ocluida por abundantes células necróticas descamadas y neutrófilos. Hematoxilina y eosina. 40X

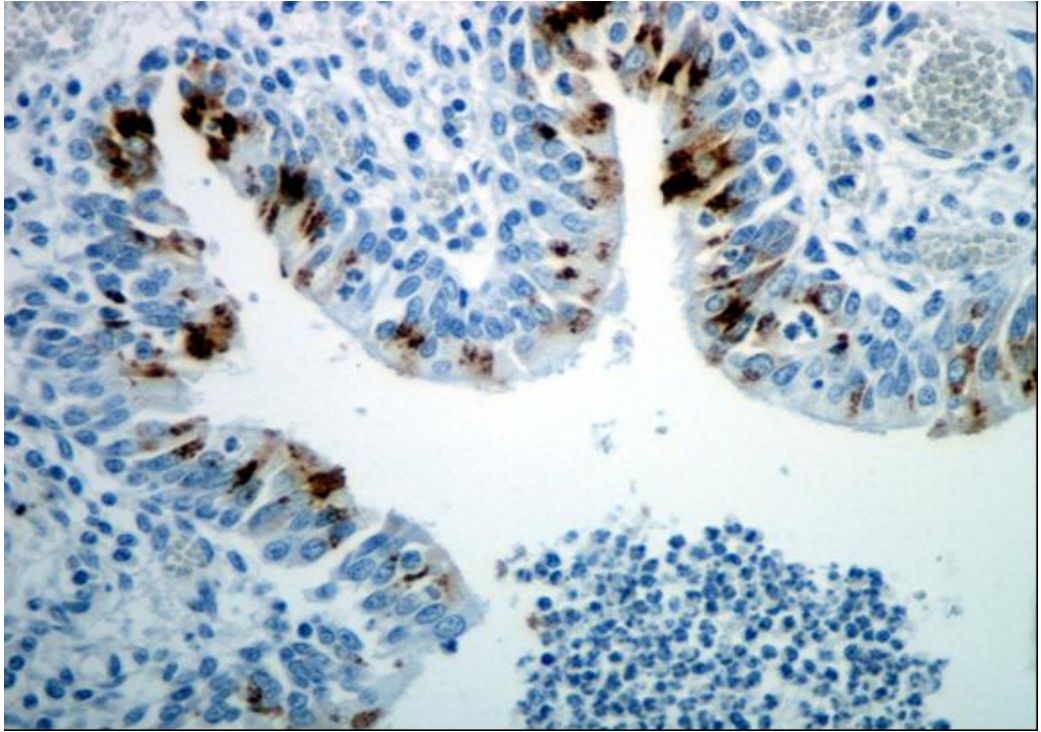


Figura 18A. IHQ anti SIV en cerdos infectado naturalmente con SIV H3N2. Se observan células epiteliales bronquiolares con inmunomarcacion intracitoplasmática positiva, asociadas a moderados cambios inflamatorios. Caso 20027. 40X.

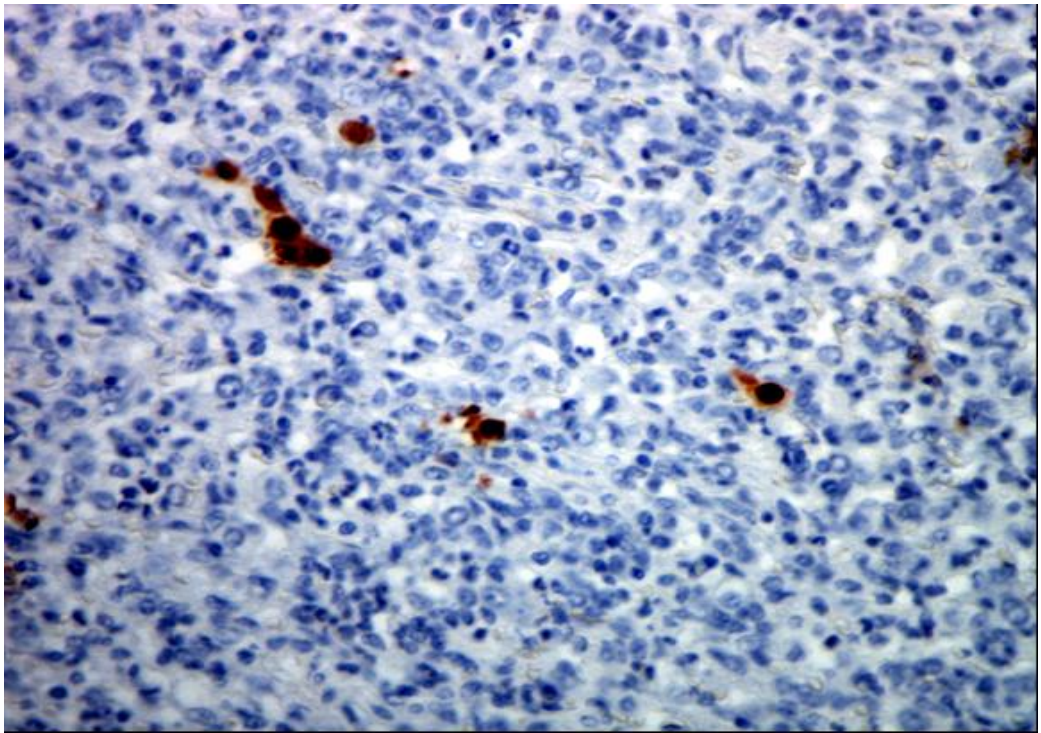


Figura 18B. IHQ anti SIV en cerdos infectados naturalmente con SIV H3N2. Se observan escasas células mononucleares positivas en la luz alveolar. .Obj. 40X

PLANILLAS

Investigación epidemiológica de la infección por Influenza Porcina

1. Características generales de la granja

Número de identificación de la granja (ID)

Datos identificatorios del establecimiento

Nombre de la granja

Nombre y apellido del veterinario

Provincia:

Ciudad:

C.P.:

Identificación del entrevistador

Nombre:

Fecha:

Dentro del sistema de múltiples fases, ¿cómo se da el flujo de animales?

	Todo dentro/ todo fuera	Flujo continuo
Sitio I		
Sitio II		
Sitio III		

Características de la granja:

Número de cerdas:

Producción de lotes:

Duración / separación entre dos lotes de cerdas:

1 Semana

3 Semanas

Otro

Distancia entre las instalaciones de las cerdas y las de destete (en m)

Distancia entre las instalaciones de las cerdas y las de destete y engorde (en m)

Parámetros de producción:

Número promedio de lechones nacidos vivos por cerda:

Número promedio de lechones destetados/año/cerda productiva:

Promedio de GDP (del destete a la venta)

Índice de conversión alimentaria (del destete a la venta)

Edad promedio al destete (días)

Edad promedio al engorde (meses)

Adopciones:

¿Durante qué periodo (horas posteriores al parto) se realizan?

Porcentaje de lechones transferidos %

Porcentaje de hembras receptoras %
 ¿A qué edad se castran los machos? días

Mortalidad:

Porcentaje de mortalidad en el período de recría: %
 Fecha en que detectó el aumento de la mortalidad
 Porcentaje de mortalidad en el período de engorde: %
 Fecha en que detectó el aumento de la mortalidad
 Densidad de cerdos en un área de 2 km de la granja estudiada:
 Número de unidades de engorde dentro del área:
 Número de unidades de ciclo completo dentro del área:

Descripción clínica de Influenza Porcina en la granja

Signos Clínicos	Si	No
Tos		
Adelgazamiento		
Disminución del consumo		
Postración / inactividad		
Descarga óculo-nasal		
Otros síntomas (especificar)		

Edad de los cerdos cuando manifiestan el problema (en meses)

Prevalencia (porcentaje de cerdos afectados)

Distribución dentro de la granja:

Aleatoria Por camadas Por corral

2. Reposición

Inseminación artificial Monta natural

% de inseminación artificial

% de monta natural

Introducción de animales: Sí No

Cantidad de cerdas por entrada

Cantidad de machos por entrada

Cuarentena para los animales introducidos: Sí No

Duración (días)

Emplazamiento dentro del perímetro de la granja Sí No

Fuera (< 50 m) de otras instalaciones propias Sí No

Fuera (> 50 m) de las instalaciones vecinas Sí No

Fuera (> 50 m) de otras instalaciones Sí No

Frecuencia de introducción (ej: por semana)

Contacto con animales viejos o sus productos, o con animales enfermos
("Inmunización progresiva" / "feed – back")

Sí

No

3. Instalaciones

	Sala de destete	Sala de engorde / terminación
Número de salas		
Nº de corrales / sala		
Nº de camadas / corral		
Nº de cerdos / m ²		
Partición (sólida / reja)		
> 1 lote (misma edad) / sala		
Distancia con el alojamiento de las cerdas reproductoras		

4. Prácticas de limpieza

	Instalaciones de maternidad / lactancia	Instalaciones de destete	Instalaciones de engorde / terminación
Limpieza con agua fría	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Limpieza con agua caliente	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Exterminio de insectos	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Exterminio de roedores	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Presencia de defensa contra pajaros	Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Vaciado de la fosa	Total <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/>	Total <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/>	Total <input type="checkbox"/> Parcial <input type="checkbox"/> Nunca <input type="checkbox"/>

5. Vacunas

	Si	No	Cantidad de dosis	Edad de vacunación
<i>Mycoplasma</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
<i>Actinobacillus</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Rinitis atrófica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Otra vacuna comercial	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Autovacunas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

6. Antibióticos

	Destete	Engorde / terminación
Adiciona ATB en el alimento (si/no)		
Frecuencia de utilización de los pulsos (días)		
Periodicidad de rotación de ATB (meses)		
Pulsos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Continuo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ninguno	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tipo de ATB usados comúnmente

	Destete	Engorde/terminación
Penicilina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tilosina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tiamulina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tilmicosina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Clortetraciclina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Oxitetraciclina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Florfenicol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Colistina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Virginiamicina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lincomicina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fosfomicina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros		

7. Bioseguridad

Visitantes:

	Mamelucos	Botas	Instrumental Veterinario
Propios de la granja			
Descartables			
Ninguno			

Baño de pie	Si	No
A la entrada de la granja		
A la entrada de cada edificio		
A la entrada de cada sala		

Frecuencia de recambio de desinfectantes (días)

Tipo de desinfectante

Almacenamiento de cadáveres:

En un contenedor a < de 50 metros de las instalaciones Sí No

En un contenedor a > de 50 metros de las instalaciones Sí No

Otros (especificar)

Enfermería:

Existe Sí No
 Dentro del galpón Sí No