

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS ANTES Y
DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN CONTRA EL VIRUS DE
INFLUENZA PORCINA E IDENTIFICACIÓN DE INMUNIDAD PASIVA
EN UNA GRANJA LECHONERA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA
ALFREDO URBINA LEÓN

Asesores:

Dra. Maria Elena Trujillo Ortega

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

MVZ. EPA. Roberto Martínez Rodríguez

México D.F

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres y abuelos por su amor, enseñanzas, comprensión, apoyo, principios de trabajo y honestidad, que han sido base para mi desarrollo personal y profesional.

A mis amigos, que han sido mis hermanos, por su apoyo, consejos y compañía.

A Giovanna que con su amor, apoyo, consejos y paciencia me ha acompañado durante mi crecimiento como estudiante y como persona y que en los momentos más difíciles ha sido mi principal apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradezco a Dios que me ha dado tantas bendiciones y que me ha dejado ir a su lado a lo largo de este camino como estudiante y profesionista.

A mis profesores de la facultad que me enseñaron los principios necesarios para poder hacer mejor a nuestra sociedad en base al trabajo y honestidad como Médico Veterinario Zootecnista.

A mis asesores y sinodales que gracias a sus consejos he podido lograr este proyecto para finalizar mi ciclo escolar.

Al MVZ Marco Antonio Herradora que me ha enseñado la importancia de nuestra labor de ayuda a la sociedad como profesionistas y que me ha abierto muchas puertas para mi desarrollo profesional, pero sobre todo por los valores que me ha compartido.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
RESULTADOS.....	49
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIÓN.....	83
REFERENCIAS.....	84

RESUMEN

ALFREDO URBINA LEÓN. Evaluación de parámetros productivos antes y después de la vacunación contra el virus de Influenza porcina e inmunidad pasiva en una granja lechonera (bajo la dirección de: Dra. María Elena Trujillo Ortega, Dr. José Iván Sánchez Betancourt y MVZ. EPAP. Roberto Martínez Rodríguez).

La presente investigación se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina, cuya piara se detectó positiva a la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza porcina mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) en el mes de agosto del 2007, se realizó la vacunación en una misma fecha a todo el pié de cría con una vacuna inactivada bivalente del virus de Influenza porcina tipo A que contiene los subtipos H1N1 y H3N2 y se tomaron muestras de suero para su evaluación por medio de la técnica de IH. Se identificó el efecto de la vacunación del pié de cría y los cerdos destetados, así como en las madres y en los lechones se identificó la inmunidad pasiva. También se identificaron los parámetros productivos a través del programa Pigchamp®. En ninguna de las variables de los parámetros productivos se observó diferencia estadística significativa ($P<0.05$). La vacunación en sábana de las cerdas gestantes no generó aumento estadísticamente significativo ($P<0.05$) en la seropositividad para ambos subtipos. Los lechones provenientes de cerdas gestantes fueron aumentando gradualmente su seropositividad sin tener diferencia estadística significativa

entre cada muestreo. A lo largo del estudio la seropositividad y titulación de anticuerpos para el subtipo H3N2 fue menor y más inestable que para H1N1.

INTRODUCCIÓN

La Influenza porcina (IP) es una enfermedad respiratoria aguda, infecciosa, del cerdo causada por el virus de influenza (VI) tipo A.

La infección por el virus de influenza porcina (VIP) es una causa común e importante de neumonía broncointersticial y enfermedad respiratoria en cerdos alrededor del mundo. En la mayoría de los animales, la enfermedad es caracterizada por comienzo abrupto y un curso corto de fiebre (24 - 48 hrs), inapetencia, letargia, tos, disnea y descarga nasal.

Sin embargo, la enfermedad clínica puede persistir en la piara por varias semanas mientras el virus se propague de cerdo a cerdo dentro de la población.

El virus de influenza también puede actuar sinérgicamente con otros patógenos virales o bacterianos produciendo el complejo respiratorio porcino. El curso y la severidad de la infección con el VIP puede ser afectado por estos agentes coinfectantes; la edad del cerdo en conjunto con el estado de salud e inmunidad y potencialmente el serotipo viral.¹

Debido a que su ruta de entrada es la respiratoria, la infección inicial es por medio de corrientes de aire, la mayoría de las lesiones inducidas por el VIP son parecidas a bronconeumonías de origen bacteriano.²

Historia de la enfermedad

La IP fue observada por primera vez en 1918 en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA), Hungría y China.^{3, 4, 5}

La IP ha recibido considerable atención desde 1918 debido a que a fines del verano de ese año apareció en los cerdos del centro norte de los EUA una enfermedad epizootica, que tenía muchas similitudes clínicas y anatómo-patológicas con la influenza en el hombre.

La aparición de la enfermedad en los cerdos coincidió con la pandemia de influenza de 1918, que se estima fue responsable de la muerte de 20 millones de personas en todo el mundo.²

Posteriormente investigaciones serológicas retrospectivas confirmaron que la enfermedad en cerdos y humanos fue causada por el virus de influenza A (VI A), estrechamente relacionado en ambos casos. El agente causal fue un (VI A) H1N1 que probablemente derivan de un ancestro común.^{6, 7, 8} Estudios de la secuencia genética de la hemaglutinina (HA) reveló que el virus muy probablemente se difundió de humanos a cerdos y fue consistente con el hecho de que los veterinarios no describieron la enfermedad en cerdos hasta después de la aparición en humanos.^{9, 10, 11}

Dorset KJS fue el primero en reconocer la enfermedad en 1922 como diferente a cualquiera encontrada previamente.⁹ Los diversos aspectos de la enfermedad como signos, lesiones y curso, fueron descritos por Dorset y MC Bryde en 1927 y 1928 durante la década siguiente al primer trabajo. Sin embargo, en 1930 el virus de la Influenza porcina (VIP) se aisló y fue identificado por Shope en 1931.²

Antes de 1975 había pocos datos de presencia de IP en lugares que no fueran los EUA o en Europa donde se observaron VIP del subtipo H1N1 como fue el caso de Checoslovaquia¹², el Reino Unido y Alemania Occidental entre 1940 y 1950.¹³ Posteriormente, el virus y la enfermedad se describieron hasta 1976, cuando la IP clínica surgió nuevamente en las granjas del norte de Italia. Los virus responsables de estos primeros brotes estaban muy relacionados a los virus H1N1 clásico probablemente habían ingresado a Italia con un embarque de cerdos de EUA.¹⁴

Desde 1979, aparecieron epizootias de VIP H1N1 en Francia, Bélgica, Holanda, Alemania y otros países de Europa continental.^{15, 16, 17, 18, 19, 20, 21}

Desde finales de la década del 70 se han reportado diversos casos de IP en varios lugares de Asia. La mayoría de esos brotes se debió al virus del cerdo H1N1 o H3N2. Los brotes producidos por los virus H1N1 similares al H1N1 clásico se describieron en Taiwán en 1975.²²

Los virus aislados en Europa después de 1979 estaban relacionados con los virus H1N1 clásicos pero eran claramente distinguibles. Sus hemaglutininas

estaban relacionadas más estrechamente al H1 aviario y es probable que hayan sido transmitidos al cerdo por los patos.²³

En Gran Bretaña, sin embargo, la situación no fue la misma que en el continente Europeo, comenzando en 1986, con un VIP clásico similar al VIP norteamericano que circuló con una prevalencia moderadamente alta, pero fue de importancia clínica menor.²⁴

En 1988 en China se describió el aislamiento del virus H3N2 a partir de cerdos en los que la H3 es similar al antígeno H3 del VI que afecta al humano, y otros virus H3N2 de los cerdos son similares a los virus H3 humanos más recientes.²⁵

Easterday BC en 1980, consideró que la historia natural del VI ha seguido siendo en gran parte estable por un periodo de por lo menos 60 años, el virus fue mantenido relativamente sin cambios antigénicos.¹

En la actualidad, los VI H1N1 clásico y aviario se encuentran circulando en la población de cerdos británica, junto con el virus H3N2.²⁶

En los últimos años, los virus H1N2 y H3N2 han sido asociados con enfermedad grave de cerdos en Canadá, aislaron diferentes virus de influenza a partir de cerdos con enfermedades similares a la influenza. Estos virus incluyen un H1N1 similar al H1N1 temprano (1930) y un H1N1 más parecido a los más recientes virus H1N1 norteamericanos²⁷ y un H3N2 similar al virus H3N2 humano temprano.²⁸

En tiempos mas recientes, análisis genéticos confirmaron que los virus de IP en cerdos y humanos de 1918 estaban estrechamente relacionados, aunque no es claro si el progenitor del virus fue transmitido de cerdos a personas o de personas a cerdos.²⁹

Etiología

Los VI se clasifican como tipo A, B o C, en base a la relación antigénica de las nucleoproteínas (NP) y proteínas matriz (M). El genoma vírico consta de 8 segmentos de ARN de cadena simple que codifican 11 proteínas víricas; 4 proteínas mayores estructurales; Hemaglutinina (H), neuraminidasa (N), NP, y matriz (M1 y M2), 3 subunidades de RNA polimerasas dependientes de RNA (PA, PB1, y PB2) y proteínas no estructurales (NS1 y NS2). Las proteínas NP y M1 son proteínas estructurales internas y sirven como determinadores de antígeno conservado del tipo de virus y juegan un rol importante en la exportación nuclear de RNPs.^{30, 31} Las moléculas de la M cubren la cara interna de la envoltura y rodean el core, dentro del cual se encuentra un complejo helicoidal de moléculas que consisten en ácido ribonucleico (ARN) asociado a nucleoproteína vírica (NP) y polimerasas (enzimas que inician la replicación).² Las características antigénicas de los dos tipos de glucoproteínas de superficie sirven de base para dividir los virus en subtipos. Hasta ahora, se identificaron 16 hemaglutininas y 9 neuraminidasas en todos los virus de influenza tipo A.¹ El sistema actual de nomenclatura del VI, introducido en 1980, designa el tipo,

huesped, lugar, número de cepa (si existe), año de aislamiento y subtipo antigénico.³²

La IP es producida por un VI tipo A, de la familia *Orthomyxoviridae*. Los VIP son viriones pleomorfos de aproximadamente 80-120 nm de diámetro, envueltos con glucoproteínas, normalmente llamadas “espículas” que se proyectan a partir de la superficie. Estas glucoproteínas son los antígenos principales de superficie y son de dos tipos distintos: la H y la N.¹

La H es la responsable de la unión del virus a las células y produce aglutinación de eritrocitos. La N es la responsable de la elusión enzimática del virus a los eritrocitos y puede jugar algún papel en la liberación del virus de las células infectadas. Los anticuerpos antihemaglutinina son de mayor importancia en la prevención de la infección con un virus de influenza que contiene la misma hemaglutinina, mientras que los anticuerpos contra la neuraminidasa restringen la diseminación del virus a partir de las células infectadas.

Las “espículas” de glucoproteína de la H y N se encuentran incluidas en una envoltura lipídica que rodea el centro de la partícula vírica. Los lípidos de envoltura hacen al virus altamente susceptible a los detergentes más comúnmente utilizados como desinfectantes antivirales.¹

Los subtipos más comunes de influenza que circulan en los cerdos mundialmente son el “clásico” H1N1, el símil aviario H1N1, H1N2 y el símil humano H3N2. Otros subtipos que han sido identificados en cerdos se incluyen

el H1N7, H3N1, H4N6 y H9N2. La inmunidad contra un VI H1N1 no proporciona protección contra los virus del subtipo H3N2.^{33,34}

En 1988, severos brotes de enfermedades respiratorias fueron descritas en Canadá como “influenza atípica” debido a su inusual proliferación y lesiones histopatológicas necróticas en pulmones infectados y aunque el virus seguía siendo H1N1 exhibió un grado mucho mayor de antigenicidad y variación genómica a la de subtipos previamente descritos.³⁵

Los virus H3N2 son un poco menos estables que los H1N1 y los aislamientos recientes pueden mostrar variaciones antigénicas menores cuando se les compara con los virus prototipo más antiguos.³⁶

Debido a que el ARN vírico es segmentado, ocurren intercambios genéticos, o recombinación, entre diferentes VI A en el curso de las infecciones mixtas.³⁶

Los cambios genéticos y antigénicos observados durante los últimos años entre los subtipos de VIP circulante parecen coincidir con el incremento de virulencia y la decreciente protección por medio de las vacunas comerciales.³⁷

Epidemiología

La primera aparición de IP en una población de cerdos suele asociarse con el movimiento de animales de piaras infectadas a piaras susceptibles.²

La apreciación ha sido siempre que la influenza porcina es una infección corta que aparece una vez al año, generalmente en otoño o inicio de invierno, y

desaparece. En algunas piaras, esta aparición anual es predecible mediante el diagnóstico de laboratorio, esta etapa es una “etapa de gripe” cuando el número de diagnósticos de VIP incrementan, usualmente de octubre a diciembre, pero la enfermedad puede presentarse a lo largo de todo el año y un pequeño incremento durante el verano.^{1, 2} Sin embargo, ha sido claramente demostrado por diferentes estudios que el VIP circula alrededor de todo el año.³⁸

La principal forma de transmisión es la directa cerdo a cerdo por vía nasofaríngea con virus que es excretado en secreciones nasales con títulos $\geq 10^7$ partículas infecciosas por ml en el pico de la infección, típicamente 2 a 5 días después de la exposición.^{39, 40} La epidemiología de VIP que induce la enfermedad ha evolucionado de enfermedad estacional a tener un perfil de enfermedad endémica.⁴¹

En diversos sistemas de producción se ha visto incrementada la incidencia de las enfermedades respiratorias, debido a la infección con el VIP en cerdos de todas las edades incluyendo las áreas de maternidad y los cerdos en finalización.⁴²

En regiones densamente pobladas de cerdos, la diseminación por el aire puede contribuir a las epidemias explosivas en grandes áreas geográficas, en particular en una población inmunológicamente susceptible.

El contacto estrecho entre cerdos, a menudo realizado por las prácticas de alojamiento, situaciones de estrés, meteorológicas y factores medioambientales conducen a la diseminación del VIP.¹ Una vez que la infección ha aparecido en

una explotación de cerdos o en cualquier situación en la que no hay despoblación total, existe la posibilidad de circulación continua del virus.⁴³ Bajo estas condiciones, los cerdos pueden infectarse a una edad muy temprana, cuando la inmunidad materna decae. En la mayoría de los casos los VIP desaparecen de una piara después de un brote. Dependiendo de su prevalencia en una región en particular, los virus pueden introducirse en algún momento posterior (meses o años), causando infecciones en el pié de cría y engorde. La prevalencia y distribución del VIP y los subtipos prevalecientes son diferentes en distintas partes del mundo y puede haber diferencias regionales dentro de un país o continente.²

A medida que más cerdos se mantienen en encierro y no se encuentran sujetos a fluctuaciones medio ambientales, la enfermedad puede hacerse de naturaleza menos estacional.²

En las regiones enzoóticas, es poco probable que las granjas no sean expuestas repetidamente al virus. Por consiguiente, la mayoría de los lechones nacidos vivos provienen de cerdas inmunes adquieren anticuerpos séricos a través del calostro. Los anticuerpos calostrales pueden proporcionar protección contra la enfermedad pero no contra la infección. En piaras con circulación continua de virus, pueden infectarse cerdos jóvenes en presencia de anticuerpos maternos.¹

En conjunto con el Síndrome reproductivo respiratorio porcino (PRRS), VIP en ocasiones induce severa neumonía intersticial con bronquiolitis necrosante y formación de membrana hialina.¹

La infección con el virus H1N1 de influenza es subclínica frecuentemente y los signos típicos generalmente se presentan solo en el 25 a 30% de la piara. Blaskovic en 1970 demostró que el virus H1N1 de influenza porcina fue excretado por un cerdo infectado durante cuatro meses, aunque lo típico es de 7 a 10 días.²

La circulación continua de VIP dentro de la piara sin la aparente necesidad de un huésped intermediario fue demostrada alrededor de un año. Además, el virus H1N1 de influenza ha sido recuperado de cerdos sin signos de enfermedad.⁴⁴

Transmisión interespecies

Los VI pueden infectar varias especies de animales como lo son; aves, cerdos, caballos y humanos.⁴² Es de gran importancia epidemiológica y en salud pública que el VIP pueda infectar humanos como fue demostrado cuando una persona murió en EUA en Nueva Jersey en 1976.⁴⁵

Recombinación viral y mezcla sanguínea

Debido a que la temperatura normal en los cerdos se encuentra entre la temperatura más alta de la aves y las más baja de los humanos, el cerdo ha sido descrito por varios artículos como el mayor hospedador en el que la recombinación puede ocurrir, en algunas ocasiones resultando en nuevas cadenas que pueden plantear una amenaza para el cerdo y otras especies.⁴⁵

El sur de China puede servir como el centro del cual varias cadenas del VI se pueden originar debido a que es el área mas concentrada de humanos, cerdos y patos domésticos en el mundo y las prácticas de agricultura traen un contacto estrecho entre estos.⁴⁵

Algunos VI pueden ser extremadamente inestables genéticamente, dando lugar a las variantes que podrían afectar especies que no habían sido afectadas.⁴⁶

Existe limitada evidencia para el mantenimiento del VI H1N1 humano después de la transmisión natural dentro de las poblaciones de cerdos ⁴⁶ pero el VI H3N2 humano es comúnmente recuperado de cerdos en Asia y Europa.⁴⁷

En Norteamérica, el VI H3N2 humano ha sido recuperado de cerdos mucho menos frecuentemente^{48, 49}, pero su introducción en la población de cerdos es factor crítico, es una emergencia para la recombinación de los virus que ahora dominan la población porcina en los EUA.¹

Infecciones de cerdos con subtipos humanos suelen ocurrir bajo situaciones naturales. Shope en 1931⁵⁰ presentó evidencia serológica de que podía ocurrir, pero no fue hasta el aislamiento en Hong Kong del virus H3N2 de cerdos de Taiwan en 1970, que las investigaciones comenzaron a examinar el potencial de transmisión de subtipos humanos a cerdos.⁵¹

Los virus H1N1 humanos también pueden afectar cerdos y la transmisión cerdo a cerdo no ha sido demostrada bajo condiciones experimentales.⁵²

Estudios de vigilancia serológica alrededor del mundo sugieren que la prevalencia del subtipo H1N1 humano se transmite fácilmente a los cerdos^{53, 54} debido a que ocasionalmente se logra el aislamiento del virus, pero aparentemente no es mantenido en cerdos.⁵⁵

La transmisión del VI de cerdos a humanos puede ocurrir; ya que se han encontrado anticuerpos del virus H1N1 en personas que estuvieron en contacto cercano con cerdos.^{56, 57}

Reservorios de virus de influenza A

Estudios filogenéticos de los VIA han revelado linajes de genes virales específicos de especie y han demostrado que la prevalencia de la transmisión interespecie depende de la especie animal.⁵⁸

Se sabe que las aves acuáticas son la fuente de todos los virus de influenza para otras especies. Los cerdos son importantes hospedadores en la ecología del VI debido a que son susceptibles a la infección con influenza humana y aviar.⁴⁶

Alrededor del mundo las aves acuáticas son portadores del VI en su tracto intestinal. Estas aves liberan el virus por medio de su excremento y pueden fácilmente contaminar su medio ambiente, exponiendo a otras especies con las que tienen contacto.⁵⁹

Solo un limitado número de subtipos parecen infectar otras especies. Los virus que afectan a los humanos parecen estar limitados a los H1, H2 y H3 y mas recientemente el subtipo H5 en conjunto con subtipos N1 y N2.⁵⁹

El éxito de la transmisión interespecies de los VI depende de su cadena genética. La transmisión efectiva entre especies puede seguir de reacomodos genéticos, cuando la progenie del virus contiene una cadena genética que tiene la capacidad de replicarse en el nuevo hospedador.⁴⁶

Los cerdos son susceptibles a la infección con VI A humano y aviar por que las células del tracto respiratorio expresan los receptores SA α 2, 6Gal que son usados preferentemente por los VI humanos y los receptores SA α 2, 3 Gal preferidos por los VI aviar.^{60, 61} El cerdo parece tener un amplio rango como hospedador para el VI con el gen NP en virus recombinantes⁶² para humanos y aves. Recientes estudios por Kida, investigaron experimentalmente el potencial de crecimiento en un amplia diversidad de virus de influenza aviar en cerdos, indicando que estos virus (incluyendo representantes de los subtipos H1 al H3), con o sin los tipos HA que se sabe infectan a humanos, pueden ser transmitidos a los cerdos. Por lo tanto la posibilidad de la introducción de genes del virus de influenza aviar a los humanos vía cerdos puede ocurrir.⁶³

Los cerdos infectados con VI H1N1 o H3N2 humano rápidamente desarrollan anticuerpos contra este virus.⁴⁶

Evidencia de los cerdos como mezclador de virus de influenza de origen no porcino ha sido demostrada en Europa por Castrucci.⁶⁴

Los VI H3N2 con los genes HA humanos y el NA aviar para las proteínas internas han sido aislados de cerdos en Asia⁶⁵ también es el H3N2 el virus dominante en Europa.⁶⁶

Los virus triplemente recombinantes contienen los genes del VI humana HA, NA y PBI polimerasa; los genes NP, M Y NS de la clásica IP H1N1 del cerdo; y los genes PB2 y PA polimerasa de origen aviar de EUA.^{49, 67}

La infección con alguno de los virus triples recombinantes han sido asociados no solo con enfermedades respiratorias, también con abortos espontáneos en cerdas y muerte de cerdos adultos.^{49, 67}

Este inusual resultado fatal con el clásico VIP H1N1, queda por determinarse si la asociación con los abortos del virus triple recombinante es debido al efecto viral o solo a la fiebre alta en los animales afectados.¹

Adaptación del virus

La evolución y adaptación del virus H3N2 humano en cerdos que siguió la transmisión a principios de los años 70's apareció de manera similar al virus H1N1 aviar. En Europa, la presencia del virus H3N2 humano en cerdos fue por al menos 10 años basada en la detección de anticuerpos y no fue hasta 1984 que el virus fue asociado directamente con brotes de enfermedad respiratoria en cerdos.⁶⁸

Todos los genes del virus humano y el clásico de IP forman un grupo hermano desde que comparten un ancestro en común y su comparable velocidad de cambio en algunos genes como el NP es muy similar.⁶⁹

Sin embargo, análisis de genes del VI aviar a consecuencia de la transmisión de cerdos en Europa revelan el alto ritmo de evolución de los genes de influenza en un periodo aproximado de 10 años, y puede deberse a que el virus posee un mutador en el complejo de polimerasa.⁷⁰

Se ha demostrado que viejos linajes del virus humano H3N2 se ha mantenido en circulación en cerdos además que su circulación continúa entre los seres humanos.^{46, 47}

Patogenia

Generalmente la infección con el VIP se limita al tracto respiratorio.⁷¹ La forma primaria de transmisión es a través del contacto cerdo con cerdo por medio de la ruta nasofaríngea, el virus es eliminado por medio de secreciones nasales y diseminado a través de aerosoles.⁴⁶

Brown IH en 1993, describió el aislamiento del virus a partir de cerdos infectados experimentalmente a los 1 y 3 días postinoculación.⁷²

Se ha demostrado la replicación del virus en mucosa nasal, amígdalas, traquea, linfonodos traqueobronquiales y pulmones, éstos parecen ser el principal órgano blanco.⁷³

Después de la inoculación intratraqueal de cerdos, los títulos de virus en los pulmones pueden ser superiores a 10^8 DIH50/ gramo de tejido.^{74, 75} La cantidad de virus que alcanza las vías aéreas más profundas y la producción resultante de virus infeccioso en los pulmones parece ser lo que determina la magnitud de la enfermedad. La inoculación experimental de altas cantidades de virus (10^7 – $10^{7.5}$ DIH 50) por vía nasal en cerdos de engorda (+/- 100 kg) produjo infecciones subclínicas, en tanto que la inoculación intratraqueal de la misma dosis de virus produjo signos clínicos típicos dentro de las 24 horas.⁷⁶ De 1 a 5 días postinfección el virus puede ser aislado de hisopos nasales y cesa posterior a los 7 días.^{42, 77}

Estudios por inmunofluorescencia de tejido pulmonar demuestran la rapidez de replicación del virus y el tropismo muy específico para el epitelio de los bronquiolos.^{72, 74, 75}

En los estudios por Nayac, las células del epitelio bronquial se tiñeron en forma positiva dentro de las 2 horas posteriores a la infección. A las 16 horas, había zonas fluorescentes de epitelio bronquial. La tinción era intensa a las 72 horas postinfección y luego disminuyó. El antígeno también se detectó en los tabiques alveolares a las 4 horas después de la infección, y a las 24 horas había numerosas células fluorescentes en los alveolos y los conductos alveolares.⁷⁸ La tinción fluorescente en bronquiolos y alveolos desapareció al día 9. La inmunofluorescencia en los bronquios puede involucrar casi el 100% de las células epiteliales.⁷⁴ No obstante, 2-3 días postinfección, los títulos del virus en los pulmones y las células positivas al virus comienzan a declinar.¹

El daño directo a las células por el VIP ha sido atribuido a la apoptosis causado por la NA y/o por las proteínas PB1F2.⁷⁹

Sin embargo, citocinas proinflamatorias producidas por el hospedador durante el estado agudo de la infección probablemente juegan un rol crítico en el desarrollo de la enfermedad por IP. El soporte de esto proviene del estudio de pulmones infectados por el VIP para el interferon- α (TNF α), el factor- α de necrosis tumoral (TNF α), interleucina – 1(IL1) e interleucina 6 (IL6).^{80, 75} Estas citocinas inducen disfunción pulmonar e inflamación, fiebre, malestar, pérdida del apetito, y pueden exacerbar otros efectos.¹

De esta manera, el alcance del virus a las vías aéreas profundas y el resultado de la producción de virus infeccioso probablemente determinan la extensión de la producción de citocinas en los pulmones, lo que determina la severidad de la enfermedad.¹

Signos clínicos

La infección con el VI A es típicamente una enfermedad de piara dirigida a una rápida diseminación del virus. Infecciones con subtipos virales H1N1, H1N2 y H3N2 son clínicamente similares, y los virus de todos los subtipos han sido asociados con episodios respiratorios agudos en la mayoría de los países de Europa y en los EUA.^{46, 81}

El comienzo es súbito, después de un periodo de incubación de 1-3 días, la mayoría de los animales de la piara muestran signos al mismo tiempo.

Presentan anorexia, inactividad, postración, los animales se agrupan y amontonan. También se observa respiración jadeante, laboriosa, entrecortada y abdominal, sobre todo cuando los animales son obligados a moverse. Además el movimiento puede estar acompañado de paroxismos graves de tos que pueden sonar como una jauría de perros ladrando. La fiebre por lo común se encuentra en el rango de 40.5-41.7° C. También puede observarse conjuntivitis, rinitis, descarga nasal y estornudos. Existe evidente pérdida de peso y debilidad, relacionadas con la anorexia e inactividad además se ha relacionado con abortos y un bajo porcentaje de mortalidad en el pié de cría. La morbilidad es alta (cerca de 100%), pero la mortalidad es baja (por lo usual menos del 1%), a menos que haya infecciones interrecurrentes y/o que los cerdos sean muy jóvenes. En general la recuperación empieza 5-7 días después del inicio y es tan súbita y notable como el comienzo. Los brotes agudos de IP clínicamente típica suelen limitarse a cerdos totalmente susceptibles, seronegativos.^{2, 82}

Un estudio longitudinal realizado en 1996, en piaras de engorda en Holanda demostró que la infección y enfermedad características ocurren sobre todo a las 18 semanas de edad. La mayoría de animales de cría que adquirieron inmunidad activa como resultado de infecciones anteriores y su descendencia, inmune por los anticuerpos adquiridos de la madre, no son afectados.²

No existe ninguna indicación hasta el momento de que haya diferencias en el sitio de replicación en los pulmones con cepas de VI diferentes.²

Existen múltiples factores que pueden determinar el resultado clínico de la infección con VI, incluyendo nivel inmune y edad, presión de infección, infecciones interrecurrentes, condiciones climáticas y el alojamiento.²

Se ha sabido por años que las infecciones secundarias por bacterias respiratorias, como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis* tipo 2, complican la gravedad y curso de una infección con VI.²

Se ha demostrado que la prevalencia con infecciones dobles o triples con VIP y coronavirus respiratorio porcino (CVRP) o virus de PRRS es sumamente alta en unidades de engorda intensivas en Europa.^{83, 84, 85, 86}

El cuadro clínico asociado es menos característico que el de los brotes de IP aguda y normalmente solo el 20 a 50% de los cerdos de la piara muestran enfermedad respiratoria, fiebre y disminución en la ingesta de alimento. Sin embargo, factores desconocidos pueden impactar el desarrollo de la enfermedad tras infecciones virales duales, debido a que en otros estudios, los signos clínicos no se incrementaron, posterior a inoculaciones simultáneas en cerdos con CVRP, en ambos subtipos virales; H1N1 y H3N2.⁸⁶

Efectos productivos

La enfermedad causa pérdidas en la producción, el crecimiento y la engorda de cerdos en Europa y en EUA.²

En un estudio que usó una cepa de H1N1 sensible a la temperatura, se demostró que los cerdos no vacunados e infectados experimentalmente requirieron 2 semanas más para alcanzar el peso de comercialización que los vacunados y expuestos al virus.⁸⁷

Diversos sistemas de producción comúnmente se ven afectados por la infección con el VIP debido a que los problemas respiratorios se ven aumentados en todas las etapas incluyendo las maternidades.⁴²

Algunos reportes sugieren que fallas reproductivas, dificultades al parto y problemas neonatales pueden estar relacionadas con brotes de IP.^{46, 88, 89}

Recientes investigaciones con VIP en los EUA indican que los cerdos nacidos vivos de madres inoculadas durante los primeros estadios de gestación con virus vivo tuvieron altos índices de mortalidad y bajos pesos al destete que las madres control.² Además, abortos esporádicos en el último tercio de gestación e incremento en nacidos débiles han sido reportados durante brotes de IP en Europa y EUA.^{6, 60, 90, 91}

En EUA, desde agosto 1998, la situación con la enfermedad de IP ha cambiado y muchos productores y veterinarios han reportado severas enfermedades respiratorias y algunos abortos en piaras causados por un nuevo serotipo.⁹²

El curso, la naturaleza y severidad de la IP varía con el subtipo viral pero también con la edad y el estado inmunológico del hospedador.¹

En un estudio realizado por Ronald DW, se demostró que las cerdas expuestas al VIP H3N2 se vieron afectadas en el número de lechones nacidos vivos.⁹³

La hipótesis de que los virus de influenza pueden precipitar una enfermedad más grave en combinación con otros virus respiratorios se ha visto apoyada por estudios experimentales de infección doble.^{84, 94} En estos estudios, la fiebre, la enfermedad respiratoria y el retraso de crecimiento fueron significativamente más marcados ($P<0.05$) y duraderos en infecciones dobles que en cerdos infectados con un solo virus.²

Lesiones

Macroscópicas

Las lesiones macroscópicas encontradas en la IP no complicada con otros agentes son fundamentalmente las correspondientes a una neumonía vírica.

Los cambios se limitan a menudo a los lóbulos apical y cardiaco de los pulmones, aunque en casos graves más de la mitad del pulmón puede estar afectada. Las zonas afectadas son de color púrpura y están consolidadas. Puede evidenciarse cierto grado de edema interlobulillar. Las vías aéreas pueden estar llenas de un exudado fibrinoso teñido con sangre y los linfonodos del mediastino y bronquios suelen encontrarse aumentados de tamaño. En casos graves puede haber pleuritis fibrinosa.^{50, 94, 95}

Morin M en 1990⁹⁶, describió una neumonía proliferativa grave y necrotizante (NPN) en cerdos como enfermedad de reciente aparición en la provincia de Quebec, Canadá. Estos autores describieron consolidación confluyente de los lóbulos craneales y medio y de la mitad inferior de los lóbulos caudales. Los lóbulos no se colapsaban; estaban rojos o grises, “húmedos y carnosos” y era frecuente el edema interlobulillar. De los animales afectados se aisló VI tipo A.⁹⁶

El porcentaje de tejido pulmonar con lesiones macroscópicas y consolidación visible fue en reportes de infecciones experimentales, pero más del 50% de los pulmones pueden ser afectados entre los 4 y 5 días postinfección.^{97, 98}

Las cepas H1N1 y H3N2 clásicas que se encuentran en circulación desde 1986 producen lesiones macroscópicas mínimas y una neumonitis intersticial muy leve, tanto en forma natural como experimental.⁹⁹ La variante mas reciente de H1N1 por otro lado, produce marcadas lesiones macroscópicas y alteraciones histopatológicas mas serias que incluyen necrosis grave del epitelio bronquial, exudación alveolar e infiltración con neutrófilos.¹⁰⁰

En otra investigación realizada por Kitikoon P, en el 2006 con H1N1 heterólogo se encontró tras la necropsia, lesiones consistentes con consolidación de áreas pulmonares bien demarcadas de coloración púrpura oscura.^{101, 102}

Microscópicas

Bachmann PA en 1989¹⁰³, hizo un resumen conciso de las lesiones microscópicas de la IP: “Histológicamente, puede observarse una degeneración

diseminada y necrosis del epitelio de bronquios y bronquiolos. Las luces de los bronquios, bronquiolos y alvéolos están llenas de un exudado que contiene células descamadas y neutrófilos, y más tarde principalmente monocitos. Además hay hiperemia variable con dilatación de los capilares e infiltración de los tabiques alveolares con linfocitos, histiocitos y células plasmáticas. Una extensa atelectasia alveolar, neumonía intersticial y enfisema acompañan a estas lesiones. Hay también infiltración celular peribronquial y perivascular.^{50, 104,}

105

Las lesiones histopatológicas de la pleuroneumonía necrotizante fueron descritas extensamente por Morin M *et al.*, (1990), Girard C, *et al.*, (1992) y Dea S, *et al.*, (1992) Thaker EL, *et al.*, 2001 entre las que se incluyen lesiones exudativas caracterizadas por alveolos llenos de edema rico en proteínas y macrófagos; bronquiolitis necrotizante que afecta principalmente los bronquiolos terminales; coágulos de células necróticas en los conductos alveolares y alvéolos; y lesiones proliferativas caracterizadas por proliferación de neumocitos tipo II, responsables de la epitelialización alveolar y formación de membrana hialina en la luz de los conductos alveolares terminales.^{96, 102, 106, 107}

En fluidos colectados de lavados pulmonares dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación, se puede tener un conteo mayor al 50% de la población celular y los macrófagos son las células dominantes en cerdos saludables.⁷⁵

Los neutrófilos no sólo causan obstrucción de las vías aéreas, estos probablemente contribuyan también al daño pulmonar por la liberación de sus

enzimas. Después de algunos días hay infiltración perivascular y peribronquial de linfocitos.⁹⁸

Diagnóstico

Puede sospecharse de IP cuando hay un brote de enfermedad respiratoria aguda que involucra la mayoría o todos los cerdos en una piara, en especial en las estaciones mas frías de otoño y comienzo del invierno.

La identificación de los cerdos con fiebre aguda (12 a 72 horas postinfección) parece ser la mejor forma de predecir la excreción del virus. Usualmente el pico de fiebre es a las 24 horas postinfección.¹⁰⁸

La mejor muestra para el aislamiento del virus a partir de un animal vivo es mucosidad nasal obtenida por hisopado de los pasajes nasales, o en el caso de los cerdos muy pequeños en los que es difícil introducir un hisopo en los pasajes nasales, puede obtenerse mucosidad faríngea por hisopado. Es mas probable encontrar el virus en secreciones nasales y faríngeas durante el periodo febril que después que la fiebre ha desaparecido. El hisopo se suspende en un medio de transporte conveniente (como solución fisiológica con glicerol). El virus también puede aislarse del tejido pulmonar de cerdos que mueren o se sacrifican durante la fase aguda de la enfermedad. El tejido pulmonar debe mantenerse en las mismas condiciones que el material de los hisopos. Hasta que se cultive, en ese momento el tejido se muele y se suspende en solución fisiológica.¹⁰⁹

El VIP se desarrolla con facilidad cuando se inocula en huevos de gallina embrionados. Puede ser inoculado por vía intra alantoidea o intra amniótica. La temperatura de incubación varía entre 33°C y 37°C, normalmente, los embriones infectados no mueren y la presencia del virus se demuestra después de 48-72 horas de incubación por la prueba de hemaglutinación en los líquidos alantoideo y/o amniótico. Aunque el huevo embrionado suele ser el sistema de cultivo utilizado con mayor frecuencia, se han utilizado varios sistemas de cultivos de células para el desarrollo y diagnóstico. Estos incluyen células de riñón de ternero, de pulmón de feto de cerdo, de riñón de canino, de riñón de cerdo, fibroblastos de embrión de pollo, células diploides humanas Chang¹¹⁰ células Vero.¹¹¹ Además recientes trabajos han demostrado que las células de riñón canino Mardin–Darby y células pulmonares de mink pueden ser co- cultivados para el aislamiento del VIP.¹¹²

Otros métodos para detectar el virus o los antígenos virales son las técnicas de inmunofluorescencia directa aplicadas al tejido pulmonar¹¹³, la inmunofluorescencia indirecta aplicada a células del epitelio nasal^{114,115}, la microscopia de inmunofluorescencia aplicada al contenido de lavados bronquioalveolares¹¹⁶, detección inmunohistoquímica en tejidos fijados^{59, 117,118}, enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA)¹¹⁹, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{120, 121, 122, 123}, el cultivo celular rápido que utiliza tinción de inmunoperoxidasa para la tipificación y subtipificación y una prueba de enzimoimmunoensayo de membrana (Directigen FLU-A) que rápidamente detecta antígeno de influenza A en muestras clínicas.¹

El diagnóstico serológico de IP requiere el uso de muestras de suero pareadas, una obtenida en el curso de la fase aguda de la enfermedad y la segunda 3-4 semanas después, para demostrar un aumento de la cantidad de anticuerpos cuando se prueba contra los antígenos apropiados.²

El subtipo de hemaglutinina se determina por medio de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH).^{109,124}

Los estudios serológicos son utilizados para evaluar el estatus inmunológico de los cerdos de varias etapas de producción para determinar el momento óptimo de la vacunación. Sin embargo, la interpretación de los datos serológicos son frecuentemente confundidos por factores como las diferencias antigénicas entre los virus que inducen anticuerpos y los virus usados para la prueba serológica y la dificultad en diferenciar si los anticuerpos son de origen materno o si fueron inducidos por infección o vacunación.¹²⁵

El diagnóstico positivo de la enfermedad por métodos serológicos y virológicos en cerdos lactantes o destetados de hembras con anticuerpos contra el virus puede ser complicado. Los anticuerpos maternos persisten durante 2-4 meses, dependiendo de su nivel inicial.¹

La tasa de recuperación del virus y la gravedad de los signos de enfermedad se relaciona en forma inversa a los niveles de anticuerpos maternos. Después de que los anticuerpos maternos desaparecen, los cerdos pueden infectarse de nuevo, eliminar virus, tener signos de enfermedad y presentar una respuesta de anticuerpos primaria típica.^{105, 125}

Tratamiento

No hay ningún tratamiento específico para la IP. Es importante cuidar la lactancia mediante el suministro de un resguardo cómodo y una cama libre de polvo, limpia y seca. Para evitar el estrés adicional, los cerdos no deben moverse o transportarse durante las fases agudas de la enfermedad. El agua limpia y fresca deberá estar accesible en todo momento, por que la mayoría de los animales tendrán fiebre.²

Hay una marcada pérdida del apetito durante el curso de la enfermedad, pero éste retorna rápido con la mejoría clínica. Por lo común se usan expectorantes como tratamiento de la piara y se administran en el agua de bebida. Se han usado antibióticos y otros tratamientos antimicrobianos para la piara con el objeto de controlar las infecciones bacterianas coexistentes o secundarias. Los animales pueden necesitar atención y tratamiento antibacteriano adicional e individual en casos graves.¹

La amantadina demostró ser eficaz para disminuir la respuesta febril y eliminación del virus en cerdos experimentalmente infectados. Sin embargo no hay ningún tratamiento antivírico autorizado contra la IP.¹

La completa despoblación es la única medida efectiva para eliminar la enfermedad.⁴⁶

Prevención y control

Las medidas estándar de bioseguridad para impedir que los animales susceptibles entren en contacto con animales infectados son apropiadas para prevenir la introducción de IP en una piara debido a las conocidas características de transmisión interespecies del virus de influenza, las medidas de bioseguridad deben incluir medios para prevenir el contacto con otras especies, en particular aves.²

El primer paso en la prevención es detener la exposición de los cerdos jóvenes con cerdos mayores previamente infectados.⁴⁵

También es importante excluir a los humanos sospechosos de padecer una infección por virus de influenza del contacto con los cerdos.

El grado y duración de la resistencia a infecciones posteriores en cerdos recuperados de influenza no ha sido determinado con precisión. Pueden encontrarse niveles sustanciales de anticuerpos durante por lo menos 6 meses después de una infección.²

La despoblación parcial, segregación de los cerdos destetados recientemente, el sistema todo dentro todo fuera y la higiene, son considerados pasos esenciales en el control de la diseminación de la enfermedad en la granja y minimiza los efectos económicos.¹²⁵

El control efectivo de la IP requiere la vacunación contra ambos subtipos; H1N1 y H3N2. Estos dos subtipos del virus han infectado a los cerdos por décadas. La historia de la IP en países alrededor del mundo sugiere que en el futuro no es predecible y cambios continuos son probables.¹²⁶

Las vacunas inactivadas a virus enteros y las vacunas de subcomponentes preparadas a partir del virus tratado con detergente se encuentran disponibles en el mercado. Estas vacunas contienen cepas de virus de influenza H1N1 y H3N2 de origen humano. El componente H1N1, la cepa prototipo A/New Jersey/1/76 (H1N1) y Port Chalemers/73 (H3N2), confiere un alto grado de protección contra la cepa "aviar" H1N1 que se encuentra circulando actualmente en las poblaciones porcinas europeas. En cuanto al componente H3N2, debe considerarse con mucha precaución la cepa al ser incluida en la vacuna para proporcionar la mejor protección, debido a que varias cepas H3N2 circulan en las poblaciones porcinas.¹²⁷

Las vacunas que están disponibles, son producidas por una "ruptura" de partes de virus de influenza altamente purificados.¹

Las vacunas contra el VIP se administran por vía intramuscular y la protección se basa en la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en suero. Se acostumbra aplicar dos inyecciones de vacuna separadas por 3 semanas de intervalo. En condiciones experimentales, una vacunación de cerdos de engorda con vacuna monovalente en base a la cepa A/New jersey/1/76 (H1n1) o a la cepa A/Port Chalmers/1/73(H3N2) produjo protección

clínica y disminución de la replicación del virus en los pulmones (127). Dos dosis de la vacuna H1N1 separadas por un intervalo de 1 mes produjeron protección completa contra la infección .¹²⁷

Debe tenerse cuidado de no vacunar antes de las 10 semanas, con el fin de evitar la interferencia producida por la inmunidad materna.

Para determinar el esquema de vacunación es necesario identificar la edad en la cual la infección suele ocurrir en la pira y la disminución de la inmunidad pasiva en los cerdos destetados.⁴⁵

En vista de la extensa circulación de virus H1N1 en cerdos y de la conservación antigénica de estos virus, la vacunación debe ser un valioso componente de los programas de control de la IP.

Además de la naturaleza de los antígenos virales, la dosis del antígeno y el adyuvante, la salud de los cerdos al momento de la vacunación, la apropiada administración y el tiempo, afectan la eficiencia de la vacuna.¹²⁸

Las vacunas en los EUA en general primariamente contienen el virus H1N1 clásico y el triple recombinante H3N2, también las vacunas trivalentes contienen el virus H1N1 recombinante, recientemente disponible. Vacunas autógenas que contienen tipos específicos de la pira son también utilizadas en los E.UA.¹

Basados en reportes europeos de una conversión antigénica menor para el VIP subtipos H1N1 y el H3N2 durante la década de los 90s (129), el reemplazo de los antígenos de la vacuna ha sido considerado recientemente, sin embargo

estudios en cerdos con las vacunas comerciales han inducido altos títulos de anticuerpos para los recientes tipos de H1N1 y H3N2 y una excelente protección virológica y clínica.¹³⁰

La protección completa contra la infección no ha podido ser demostrada, sin embargo, la vacuna puede reducir los títulos del H1N1 desafiado en hisopos nasales por 1-2 log¹⁰ unidades infecciosas. Los títulos del virus en pulmones de los cerdos vacunados y las lesiones microscópicas pulmonares fueron reducidas también.¹³¹

En el estudio realizado por Hoon J, *et al.*, 2006 encontró que las dos vacunas comerciales utilizadas reducen los signos clínicos y las lesiones presentes en los pulmones pero tuvieron fallas significativas en reducir la excreción del virus después del desafío, lo cual implica un riesgo en el control epidemiológico y la posibilidad de favorecer la mutación y la generación de variantes genéticas.¹⁰⁵

En Holanda De Jong JC en 2001¹²⁹, analizó diferentes tipos de H1N1 de recientes brotes, usando métodos serológicos y moleculares. Ellos encontraron una marcada heterogenicidad genética y antigénica en las pruebas de IH y en los análisis de la secuencia de nucleótidos entre los diferentes tipos. La heterogenicidad observada puede dificultar el control de la IP por medio de la vacunación e indica que la eficiencia de las vacunas contra IP requiere una re-evaluación y que la reactividad de los VIP deben ser monitoreados regularmente.¹²⁹

Las vacunas que inducen anticuerpos detectables por la prueba de IH pueden tener una corta liberación y un significativo decremento en los títulos serológicos reportados 10 semanas después de la vacunación.¹

En algunas investigaciones que evaluaron los títulos generados tras la vacunación se encontró, que los títulos en la prueba de IH inducidos por la vacunación no fueron detectados 2 semanas después de la primera vacunación, sin embargo, se presentaron 2 semanas después de la segunda vacunación, con títulos entre 1:80 hasta 1:320, similar a los anteriores reportes.^{132, 133}

Las vacunas de DNA son una nueva alternativa en las estrategias de vacunación convencional contra la infección del VIP y ofrece varios beneficios potenciales y menores riesgos sobre las vacunas de virus vivo.³⁸

Inmunidad

La mayoría de las infecciones por el VIP no muestran signos clínicos definidos. La ausencia de signos clínicos sugiere, que muchas de las infecciones por VIP permanecen como subclínicas, sin embargo, pueden resultar con inmunidad por el resto de la vida. La protección derivada de la inmunidad materna durante infecciones recientes puede generar ausencia de signos clínicos.¹³⁴

La inmunidad adaptativa responsable de la infección por el VIP incluye la producción de anticuerpos e inmunidad celular. La respuesta de los anticuerpos es estimulada por las proteínas HA, NA, M y NP. Sin embargo, solo los anticuerpos de la región globular de la cabeza de la HA pueden bloquear el

ataque de los virus a los receptores en las células del hospedador y neutralizar la infectividad del virus.¹³⁴

Los anticuerpos contra las proteínas NA, M y NP no pueden prevenir el inicio de la infección pero pueden mediar la muerte de las células infectadas por otros mecanismos dependientes de las células.¹³⁴

Los linfocitos T citotóxicos están principalmente relacionados con las proteínas internas NP y M en varios modelos de influenza y en menor grado con las HA y NA. Sin embargo, los linfocitos T citotóxicos no pueden prevenir la infección, ellos pueden jugar un papel importante en despejar el virus de los pulmones.¹

La respuesta de la inmunidad celular y humoral juega un rol importante en la infección por VIP en los cerdos. Las inmunoglobulinas específicas del virus IgG, IgA y los títulos obtenidos en la prueba de IH presentan su pico de producción a las 2-3 semanas después de la infección primaria. Las inmunoglobulinas específicas predominantes contra el virus en el suero fueron las IgG. Los cerdos responden con inmunoglobulinas específicas contra el virus IgG e IgA en las vías aéreas superiores e inferiores y las IgA fueron las predominantes en ambos sitios.^{71, 120,135}

Normalmente los VIP se enfrenta a una respuesta inmune efectiva innata con producción de citocinas proinflamatorias⁹⁶, las cuales son responsables de una respuesta efectiva adaptativa humoral y celular, la cual elimina el virus del tracto respiratorio en una semana postinfección.^{135, 136}

En tiempo corto la destrucción del virus es mediada por las células T, seguido de la primera infección y posterior a la segunda exposición, las células T mantienen su memoria, mientras la protección contra la infección y la enfermedad clínica es mediada por los anticuerpos que neutralizan directamente las glicoproteínas de envoltura del virus.¹³⁷

Los anticuerpos detectados después de la infección natural con el VIP pueden persistir más de 28 meses. Altos títulos de anticuerpos para VIP no necesariamente sugiere que los animales hayan tenido contacto reciente con el virus.¹³⁷

Después de una primera infección con el VIP, se genera una sólida protección contra una reinfección con el mismo o similar antígeno.^{135, 136}

La protección cruzada contra algunos de los subtipos del VIP ha sido documentada. Un estudio reciente realizado en Bélgica ha demostrado que la inmunidad post infección para H1N1 y/o H3N2 provee protección cruzada contra el subtipo H1N2 mientras en otro estudio realizado por Van Reeth *et al.*, 2003 mencionan que la inmunidad cruzada de los subtipos europeos H1N1 y H3N2 y H1N2 se ha visto disminuida debido a la circulación concurrente de diferentes subtipos de VIP.¹³⁴

Inmunidad Pasiva

En cerdas que reciben rutinariamente vacunaciones previas al parto, los títulos serológicos de anticuerpos detectables por medio de la prueba de IH son

frecuentemente 1:160 a 1:640 o mayores, induciendo anticuerpos maternos mayores o más duraderos en sus lechones.¹ En un estudio realizado por Thacker¹³⁸, los niveles de anticuerpos pasivos del VIP disminuyeron por debajo de 1:40 a las 6 semanas de edad en todos los lechones de cerdas no vacunadas con bajos títulos de anticuerpos residuales. En contraste en lechones de cerdas vacunadas, los títulos de anticuerpos detectables por medio de la prueba de IH no disminuyeron por debajo de 1:40 hasta las 16 semanas de edad. La vacunación de las cerdas por lo tanto es importante en el control de la enfermedad en los lechones en la fase de lactancia.¹

Los anticuerpos calostrales contra el VIP persisten de 2 a 4 meses, dependiendo del nivel inicial.^{139, 88}

La prevalencia más alta de anticuerpos se encontró entre las 4-6 semanas de edad.¹⁴⁰

Loeffen W., en 2003 estimó la vida media de los anticuerpos maternos en 12 días para ambos subtipos del VIP (H1 y H3). Dependiendo del título inicial de la madre, los cerdos pueden permanecer positivos hasta 3 o 4 meses.¹⁴¹

La presencia de anticuerpos derivados de la madre (ADM) disminuyen la enfermedad clínica, no reducen la cantidad de virus presente en el tracto respiratorio de los cerdos infectados y su presencia reduce la eficiencia de la vacunación y posiblemente aumenta la neumonía por el VIP. En este estudio, parece que los ADM inhiben la producción de memoria en las células T por la vacuna.¹⁴²

Los cerdos pueden ser protegidos durante el estrés del destete con altos títulos de anticuerpos maternos contra la enfermedad fatal pero no contra la infección y la replicación del virus.¹⁴¹ Estos animales pueden excretar el virus hasta por 16 semanas.^{136, 141}

Hay evidencia que sugiere que después del decremento de anticuerpos los cerdos pueden ser infectados, excretar el virus, tener signos de enfermedad, y tener una respuesta primaria de anticuerpos.¹⁴¹

Cuando la infección ocurre con una baja concentración de anticuerpos pasivos, la cual ocurre usualmente en los cerdos en crecimiento, la enfermedad clínica y una incompleta respuesta inmunológica es evidente.¹⁴¹

Estudios recientes han confirmado que la inmunidad materna no genera protección cruzada entre subtipos.⁴²

HIPÓTESIS

La vacunación de las hembras gestantes con la vacuna “Porcilis® End – FLUence 2” reduce el efecto de la influenza porcina sobre la productividad

OBJETIVOS

- 1) Identificar los parámetros productivos antes y después de la vacunación.

- 2) Evaluar la eficacia de la vacunación en sabana a través del monitoreo serológico.

- 3) Identificar la curva de anticuerpos generada por la inmunidad pasiva

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, que se ubica en el municipio de Jilotepec, Estado de México; cuya piara se detectó positiva a la presencia de influenza porcina mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación en el mes de agosto del 2007 y posteriormente se identificó la circulación viral con la técnica de PCR en suero e hisopos nasales de animales de pié de cría que presentaban signología sugerente a la enfermedad, los estudios de prevalencia realizados arrojaron resultados del 90%.

Vacunación

Se vacunaron a todas las cerdas de pié de cría de la granja incluyendo los reemplazos (130 vientres), con un refuerzo a los 14 días, exceptuando a las cerdas que tenían 20 días o menos de gestación, una semana previa y una semana posterior al parto, estas cerdas se vacunaron una vez pasadas las etapas de riesgo antes mencionadas, este sistema se conoce como “vacunación en sábana”. Se utilizó la vacuna “Porcilis® End – FLUence 2” de laboratorios Intervet, la cual es inactivada bivalente del virus de Influenza porcina tipo A que contiene los subtipos H1N1 y H3N2 en adyuvante de doble emulsión.

Parámetros productivos

Los parámetros productivos a evaluar antes y después de la vacunación de las hembras muestreadas se obtuvieron del programa PigChamp®, y son los siguientes: días de lactancia (DL), días a presentación de estro pos-destete (DPEPD), porcentaje de fertilidad de servicio a los 80 días (%FS80D), porcentaje de parición (PP), promedio de lechones nacidos en total (LNT), promedio de lechones nacidos vivos (LNV), promedio de lechones nacidos muertos (LNM), promedio de fetos momificados (FM), peso promedio de la camada (PPC), porcentaje de mortalidad en lactancia (ML), promedio de lechones destetados (NLD) y peso promedio de la camada al destete ajustada a 21 días (PPD).

Toma de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular interna por medio de la técnica descrita por Straw EB¹⁴⁴, utilizando una jeringa de 10 ml con aguja de calibre 18 para el pie de cría y de calibre 21 para los lechones y cerdos destetados con jeringa de 5ml, dejando las muestras a temperatura ambiente y de forma horizontal para que se logre una adecuada coagulación y separación del suero; posteriormente se centrifugaron y se inactivaron para que estuvieran listas para realizar la técnica de IH hacia los subtipos H1N1 y H3N2.

A cada muestra de suero se le realizó la prueba de IH para los subtipos H1N1 y H3N2. Se obtuvieron los títulos y se transformaron en logaritmo base 10 para realizar un análisis descriptivo de la titulación en los muestreos.

Replicación viral

Previo a la prueba de IH se realizó la replicación de los virus de referencia H1N1 (A/swine/New Jersey/11/76) y H3N2 (A/swine/Minnesota/9088-2/98) proporcionado por el Laboratorio de Virología del DPAC de la FMVZ de la UNAM.

Se ovoscopearon los embriones, se marcó la cámara de aire, la posición del embrión y se verificó que estuvieran vivos, se desinfectó el área donde se encontraba la cámara de aire, se realizó una pequeña perforación del lado opuesto del embrión, se inocularon 200 µl con los subtipos H3N2 y H1N1 por separado a cada uno de los embriones de pollo, se inocularon 200 µl de medio de cultivo a los controles negativos y se cubrió el orificio con pegamento blanco. Posteriormente se incubaron en estufa a 37° C. A las 24 horas se revisaron los embriones y se eliminaron los muertos. Se revisaron diariamente hasta las 72 horas y se separaron los que se murieron a partir de las 48 horas y se colectaron los líquidos corioalantoideos, en tubos vacutainer estériles, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y se congelaron hasta su titulación por medio de aglutinación. Los embriones de pollo cuyo líquido alantoideo aglutinó, se procedió a titularlos con eritrocitos de ave al 0.5%.

Prueba de Inhibición de la hemoaglutinación

Las muestras de sangre obtenidas en la granja se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se separó en tubos vacutainer identificados y en condiciones estériles. Los sueros se mantuvieron en congelación hasta el momento de trabajarlos, se inactivaron a 56°C por 30 minutos. Posteriormente fueron adsorbidos en microplacas de plástico de 96 pozos fondo en "U" y se utilizaron las siguientes cantidades por pozo: 50µl del suero, 100µl de caolín, 100µl de eritrocitos de ave al 5%. Quedando el suero diluido 1:5, las muestras se dejaron en refrigeración a 4°C y se trabajaron al día siguiente.

Posteriormente se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo en "U", se llenó la plantilla de sueros con su identificación, se colocaron 50µl de PBS en todos los pozos. Se colocaron 50µl de cada uno de los sueros (sobrenadante de la adsorción) en la línea "A" de cada uno de sus números correspondientes, se pipetearon 7 veces y se diluyeron 50µl de la columna "A" a "B" y así sucesivamente hasta la hilera "H". Al final se eliminaron 50µl, cada suero se diluyó desde 1:10 hasta 1:1280. Posteriormente se colocaron los sueros control positivo y negativo. Se agregaron 50µl de antígeno con 8 unidades hemoaglutinantes en cada pozo a partir de la línea "B" a la "H", se dejó una hilera para el control del virus y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 50µl de eritrocitos de ave al 0.5% en todos los pozos, se agregó una hilera para el control de eritrocitos y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos.

Se consideraron positivos a partir de 1:80, la lectura se realizó tomando la dilución inversa a donde se observó aglutinación de cada uno de los sueros.

Estudio serológico transversal de cerdas gestantes

Se realizó un estudio serológico transversal, el primer muestreo se realizó 14 días previos a la vacunación, el segundo muestreo 14 y el tercero 28 días posteriores a la vacunación respectivamente, con la finalidad de evaluar la curva de anticuerpos y la seropositividad del hato a 12 hembras de pie de cría incluyendo hembras de todos los partos.

Posteriormente se realizó la prueba de IH para la identificación de anticuerpos de los subtipos H1N1 y H3N2.

De los títulos obtenidos se realizaron promedios por muestreo y se realizó una gráfica de barras.

Posteriormente se obtuvo la cantidad de positivos y negativos por muestreo.

Estudio serológico transversal de cerdos del área de destete

Se realizó un estudio serológico transversal para evaluar la curva de anticuerpos del hato a 12 cerdos del área de destete. El primer muestreo se realizó 14 días previos a la vacunación del pie de cría (sin inmunidad pasiva vacunal), el segundo muestreo 14 días posteriores a la vacunación, en este muestreo ya hay cerdos de destete que recibieron inmunidad pasiva de cerdas vacunadas, y el tercer muestreo 28 días posteriores a la vacunación.

Posteriormente se realizó la prueba de IH para la identificación de anticuerpos de los subtipos H1N1 y H3N2.

De los títulos obtenidos se realizaron promedios por muestreo y se realizó una gráfica de barras.

Posteriormente se obtuvo la cantidad de positivos y negativos por muestreo.

Estudio serológico longitudinal de cerdas gestantes y lechones

Se realizó un estudio serológico longitudinal a 12 cerdas en el último tercio de la gestación y al 50% de los lechones nacidos de estas para evaluar la curva de anticuerpos, la seropositividad, así como la inmunidad pasiva conferida a sus lechones.

Los muestreos se realizaron 14 días posteriores a la vacunación, 28 días posteriores a la vacunación, el día del parto (el momento del parto se presentó entre los 14 y 28 días posteriores a la vacunación) y a los 14 días posparto de las hembras reproductoras.

Los lechones nacidos de las hembras antes mencionadas se muestrearon a los 14, 28, 42 y 56 días de edad.

Cada lechón se mantuvo en un espacio vital de 30.3 cm² y las hembras reproductoras en jaulas de maternidad de 3 m² cada una.¹⁴³

Posteriormente al muestreo se realizó la prueba de IH para la identificación de anticuerpos de los subtipos H1N1 y H3N2. De los títulos obtenidos se realizaron

promedios por muestreo y se realizó una gráfica de barras para las cerdas gestantes y otra para los lechones.

Posteriormente se obtuvo la cantidad de positivos y negativos por muestreo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron datos del programa PigChamp para realizar promedios de cada uno de los parámetros y se calcularon los porcentajes, 8 semanas previas a la vacunación y 8 semanas posteriores a la vacunación.

Se realizó la prueba de T pareada utilizada para comprobar la diferencia existente entre las medias de los diferentes parámetros productivos obtenidos antes y después de la vacunación de las hembras muestreadas y sus lechones como son: días de lactancia, días a presentación de estro pos-destete, promedio de lechones nacidos en total, promedio de lechones nacidos vivos, promedio de lechones nacidos muertos, promedio de fetos momificados, peso promedio de la camada, promedio de lechones destetados y peso promedio de la camada al destete.

Se realizó la comparación numérica para el porcentaje de fertilidad servicio a los 80 días, porcentaje de parición y porcentaje de mortalidad en lactancia.

En el caso de los títulos obtenidos de los sueros, se transformaron a logaritmo base 10, los valores mayores a 1.9 se consideraron positivos ya que este valor corresponde a la titulación 1:80, posteriormente se realizaron gráficas y cuadros

para analizar las tendencias numéricas de los títulos. Se realizó la prueba de Ji^2 para analizar la diferencia de positivos y negativos entre cada muestreo.¹⁴⁵ En el caso de los muestreos serológicos transversales de cerdas gestantes y cerdos del área de destete se comparó el primer muestreo con el segundo y posteriormente el primero con el tercero. En el caso del estudio longitudinal de cerdas gestantes y lechones nacidos de las cerdas muestreadas se comparó el primer muestreo con el segundo, el segundo con el tercero y el tercero con el cuarto por medio de la prueba de ji^2 , para la evaluación estadística de la seropositividad de las cerdas y los lechones.

RESULTADOS

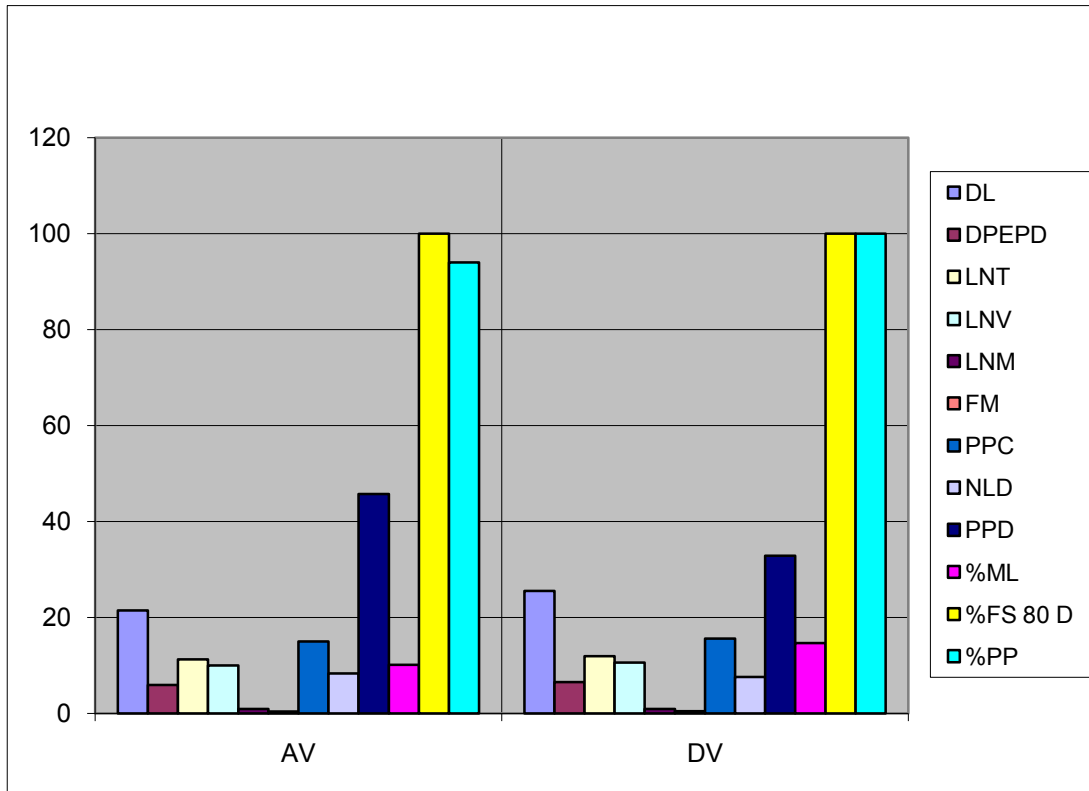
1. Parámetros productivos

En la gráfica y cuadro 1, se representa el efecto de la vacunación sobre los parámetros productivos de las cerdas muestreadas, en ninguno de los parámetros comparados hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) solo se encontraron diferencias numéricas, como se puede observar; los días de lactancia (DL) aumentaron después de la vacunación (DV) con una diferencia de 4 días en promedio siendo 21.44 antes de la vacunación (AV) y 25.53 DV; para el parámetro de días de presentación estro postdestete (DPEPD) se encontró una diferencia numérica de 0.062 con valores de 5.88 AV y 6.5 días DV; los lechones nacidos totales (LNT) mostraron un incremento DV de 0.71 con 11.93 DV y 11.22 AV ; el parámetro de lechones nacidos vivos (LNV) también incrementó después de la vacunación con un promedio de 10 lechones AV a 10.6 lechones DV con una diferencia numérica de 0.6 lechones; en el parámetro de lechones nacidos muertos (LNM) se encontró un aumento de 0.05 lechones DV con un promedio de 0.93 lechones DV y 0.88 AV, en el parámetro de promedio de fetos momificados (FM) existe una diferencia de 0.08 obteniendo valores de 0.38 AV y 0.46 DV. En el peso promedio de la camada (PPC) se observa que AV pesaron en promedio 14.95 kg y DV 15.59 kg obteniendo una diferencia de 0.64 kg ; en el caso del promedio de lechones destetados (NLD) se obtuvieron los valores de 8.31 AV y 7.54 DV con una diferencia de 0.77; el peso promedio al destete ajustado a 21 días (PPD) fue de 45.68 kg AV y de 32.86 kg

DV con una diferencia de 12.82 kg; el porcentaje de mortalidad en lactancia (ML) arrojó valores de 14.62% para DV y de 10.11% AV con una diferencia de 4.5%; en el parámetro de porcentaje de fertilidad de servicio que se midió hasta los 80 días de gestación (%FS80D) no se encontró diferencia entre antes y después de vacunar y por último el porcentaje de parición fue de 94% AV y del 100% DV con una diferencia del 6%.

No hubo diferencias estadísticas significativas en ninguno de los parámetros productivos, cabe mencionar que hubo algunos parámetros que tuvieron ligeras diferencias numéricas favorables posteriores a la vacunación como son: LNT, LNV, PPC y %PP.

Gráfica1. Promedios y porcentajes de los parámetros productivos antes y después de la vacunación contra el VIP.



DL: Días de lactancia, DPEPD: Días de presentación de estro pos –destete, LNT: Lechones nacidos totales, LNV: Promedio de lechones nacidos vivos, LNM: Promedio de lechones nacidos muertos, FM: Promedio de fetos momificados, PPC: Peso promedio de la camada, PLD: Promedio de lechones destetados, PPD: Peso promedio al destete, %ML: Porcentaje de mortalidad en lactancia, %FS: Porcentaje de fertilidad de servicio a los 80 días, %PP: Porcentaje de parición.

Cuadro 1. Comparación estadística y numérica de promedios y porcentajes de parámetros productivos antes y después de la vacunación contra el VIP

PARAMETROS	AV	ERROR E	DV	ERROR E	P=
DL	21.44	0.82	25.53	0.86	
DPEPD	5.88	0.63	6.50	1.56	0.6727
LNT	11.22	0.55	11.93	0.65	0.4102
LNV	10	0.56	10.6	0.66	0.4918
LNМ	0.88	0.24	0.93	0.30	0.9018
FM	0.38	0.18	0.46	0.19	0.7723
PPC	14.95	0.65	15.59	0.74	0.5187
NLD	8.31	0.6	7.54	0.6	0.1272
PPD	45.68	5.43	32.86	3.48	0.0598
%ML	10.11		14.62		
%FS 80 D	100.00		100.00		
%PP	94.00		100.00		

El cuadro representa los promedios de los parámetros productivos antes (AV) y después de la vacunación (DV) del pié de cría. DL: Días de lactancia, DPEPD: Días de presentación de estro pos-destete, LNT: Lechones nacidos totales, LNV: Promedio de lechones nacidos vivos, LNМ: Promedio de lechones nacidos muertos, FM: Promedio de fetos momificados, PPC: Peso promedio de la camada, PLD: Promedio de lechones destetados, PPD: Peso promedio al destete, %ML: Porcentaje de mortalidad en lactancia, %FS: Porcentaje de fertilidad de servicio a los 80 días, %PP: Porcentaje de parición.

2. Muestreo transversal de cerdas gestantes

En la gráfica 2 y cuadro 2 se puede observar que en el primer muestreo (M1 H1N1) previo a la vacunación de cerdas gestantes, los títulos promedio del subtipo H1N1 son 2.63, el segundo muestreo 14 días después de la vacunación (M2 H1N1), arroja un título de 2.93 y para el tercer muestreo (M3 H1N1), 28 días después de la vacunación, disminuye ligeramente siendo de 2.91.

El primer muestreo del subtipo H3N2 (M1 H3N2) es positivo con una titulación de 2.53, posteriormente en el segundo muestreo (M2 H3N2) se observa un ligero aumento con un título promedio de 2.89 y para el tercer muestreo (M3 H3N2) presenta una disminución con una titulación de 2.44.

En el primer muestreo antes de la vacunación los dos subtipos arrojan resultados positivos, en el segundo muestreo 14 días después de la vacunación el título para el subtipo H1N1 y H3N2 aumentó con respecto al muestreo anterior y fueron los más altos durante toda la prueba. En el tercer muestreo 28 días posteriores a la vacunación, el promedio de titulación para el subtipo H1N1 disminuye ligeramente y en el caso del subtipo H3N2 presenta el promedio más bajo de titulación de toda la prueba.

El promedio de cada uno de los muestreos para los dos subtipos evaluados es positivo. La titulación del subtipo H1N1 en los tres muestreos fue mayor que para el subtipo H3N2.

En los cuadros 3 y 4 se muestran los resultados estadísticos obtenidos de la comparación de seropositividad del primer muestreo (M1) con el segundo (M2) y posteriormente entre el primer (M1) y tercer muestreo (M3) para ambos subtipos del muestreo transversal de las cerdas gestantes.

Al realizar el análisis de J_i^2 para ver si existe diferencia estadística significativa entre muestreos, podemos observar que en la comparación de positivos y negativos, entre el primer y segundo muestreo para H1N1 existe diferencia estadística significativa ($P= 0.007$) con una diferencia numérica de 12 cerdas positivas de un total de 12 para el primer muestreo (M1 H1N1) y de 5 cerdas positivas de un total de 12 para el segundo (M2 H1N1), por lo que la seropositividad de las cerdas disminuyó del primer al segundo muestreo. En la comparación del primer muestreo (M1 H1N1) con el tercero (M3 H1N1) se

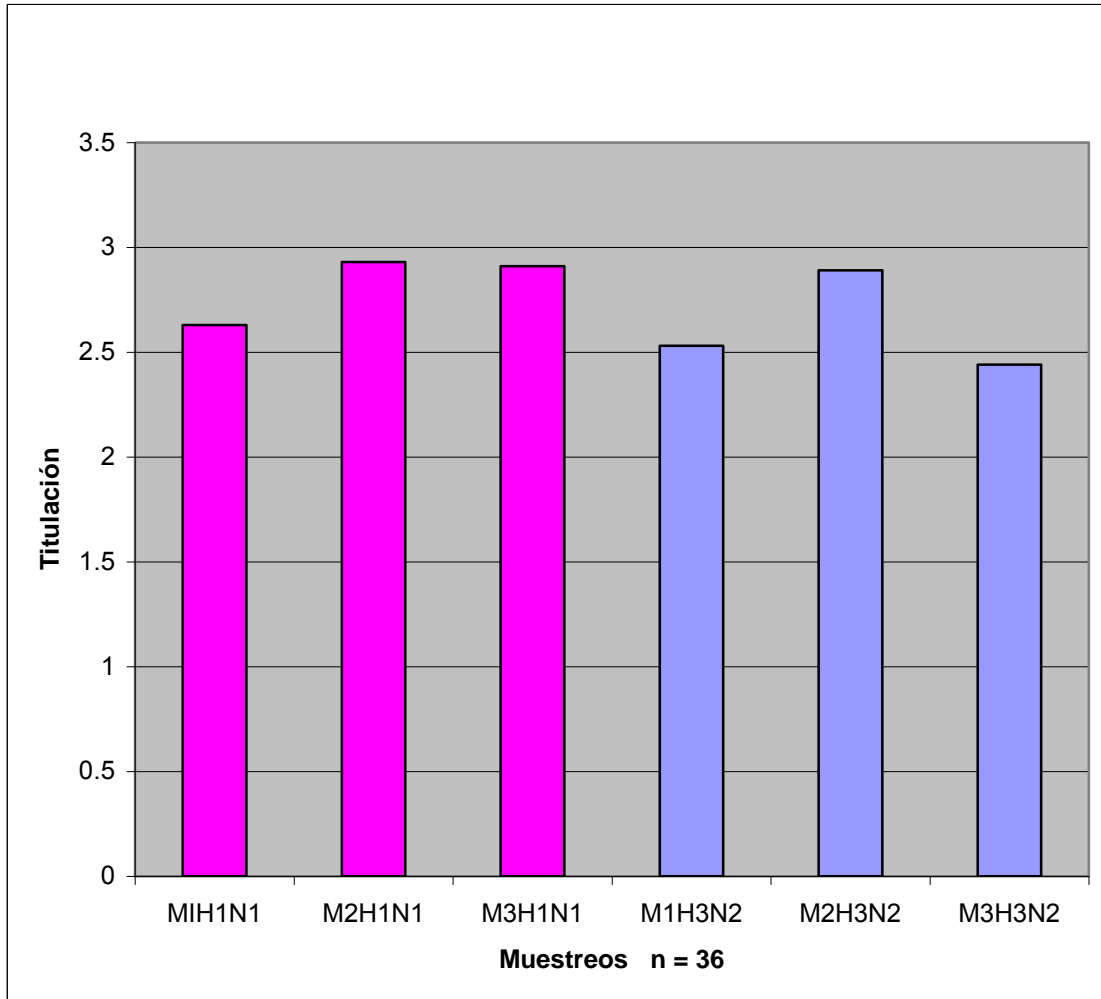
obtuvo una diferencia numérica de 12 cerdas positivas de un total de 12 para el primer muestreo y de 10 positivas de un total de 12 para el tercer muestreo sin ser estadísticamente significativo.

Para la comparación entre el primer (M1 H3N2) y segundo muestreo (M2 H3N2) para H3N2 no se obtuvo diferencia estadística significativa, teniendo una diferencia numérica de 8 cerdas positivas entre ambos muestreos, con 10 cerdas positivas de un total de 12 para el primer muestreo y de 2 positivas de un total de 12 para el segundo. Para la comparación entre el primer (M1 H3N2) y tercer muestreo (M3 H3N2) se obtuvo una diferencia numérica de 5 cerdas positivas entre ambos muestreos, con 10 cerdas positivas de 12 para el primero y de 5 cerdas positivas de 12 para el tercero con diferencia estadística significativa ($P=0.009$).

Se puede observar que para el subtipo H1N1 el primer muestreo comparado con el segundo, muestra diferencia estadística significativa, observando que la seropositividad disminuyó para el segundo muestreo, posteriormente tiene un repunte en su seropositividad para estabilizarse a los 28 días postvacunales.

En el caso del subtipo H3N2 se observa que del primer muestreo, en comparación con el segundo, se generó una disminución de la seropositividad sin ser estadísticamente significativo, que continúa ya que en la comparación del tercer muestreo con el primero se encuentra diferencia estadística significativa disminuyendo hasta tener una mayor cantidad de cerdas negativas.

Gráfica 2. Promedio de titulación de muestreo transversal de cerdas gestantes convertido en logaritmo base 10.



Títulos promedio de anticuerpos contra el VIP subtipo H1N1 ■ y H3N2 ■, (n) tamaño de muestra. M1 (14 días previos a la vacunación), M2 (14 días postvacunación), M3 (28 días postvacunación).

Cuadro 2. Promedio de titulación de anticuerpos contra el VIP subtipos H1N1 y H3N2 del muestreo transversal de cerdas gestantes convertidos a logaritmo base10.

Subtipo	Muestreo		
	M1	M2	M3
H1N1	2.63	2.93	2.91
H3N2	2.53	2.89	2.44

M1 (14 días previos a la vacunación), M2 (14 días posteriores a la vacunación), M3 (28 días posteriores a la vacunación).

Cuadro 3. Comparación estadística de seropositividad muestreo transversal de cerdas gestantes

Ji² TRANSVERSAL CERDAS GESTANTES	
MUESTREOS	P=
M1 H1N1	0.007
M2 H1N1	
M1 H1N1	0.5
M3 H1N1	
M1 H3N2	0.05
M2 H3N2	
M1 H3N2	0.009
M3 H3N2	

M1 (14 días previos a la vacunación), M2 (14 días posteriores a la vacunación), M3 (28 días posteriores a la vacunación).

Cuadro 4. Comparación numérica de seropositividad del muestreo transversal de cerdas gestantes

MUESTREO	#ANIMALES	POSITIVOS	NEGATIVOS	DIFERENCIA
M1 H1N1	12	12	0	12
M2 H1N1	12	5	7	2
M3 H1N1	12	11	1	10
M1 H3N2	12	11	1	10
M2 H3N2	12	7	5	2
M3 H3N2	12	5	7	2
TOTAL	72	51	21	30

M1 (14 días previos a la vacunación), M2 (14 días posteriores a la vacunación), M3 (28 días posteriores a la vacunación).

3. Muestreo transversal de cerdos del área de destete

En la gráfica 3 y cuadro 5 se puede observar que en la primera fase del muestreo que corresponde a los cerdos del área de destete 14 días previos a la vacunación del pié de cría (M1 H1N1) se tienen títulos considerados positivos para el subtipo H1N1 de 2.89, en el siguiente muestreo que corresponde a 14 días posteriores a la vacunación del pié de cría (M2 H1N1) los resultados aumentan ligeramente con una titulación promedio de 2.94 y en el tercer muestreo (M3 H1N1) la titulación que corresponde a cerdos destetados 28 días posteriores a la vacunación de las cerdas fue de 2.73.

Para el subtipo H3N2 se obtuvo una titulación promedio de 2.79 para el primer muestreo (M1 H3N2), mientras que para el segundo muestreo (M2 H3N2) se observa un ligero incremento con una titulación promedio de 2.94 y para el tercer muestreo (M3 H3N2) se presenta la titulación promedio más baja con un valor de 2.29.

En el promedio de titulación para cada uno de los tres muestreos los resultados son positivos y constantes, mostrándose ligeramente más altos para el subtipo H1N1.

En el cuadro 6 se muestran los resultados estadísticos obtenidos de la comparación de seropositividad del primer muestreo con el segundo y

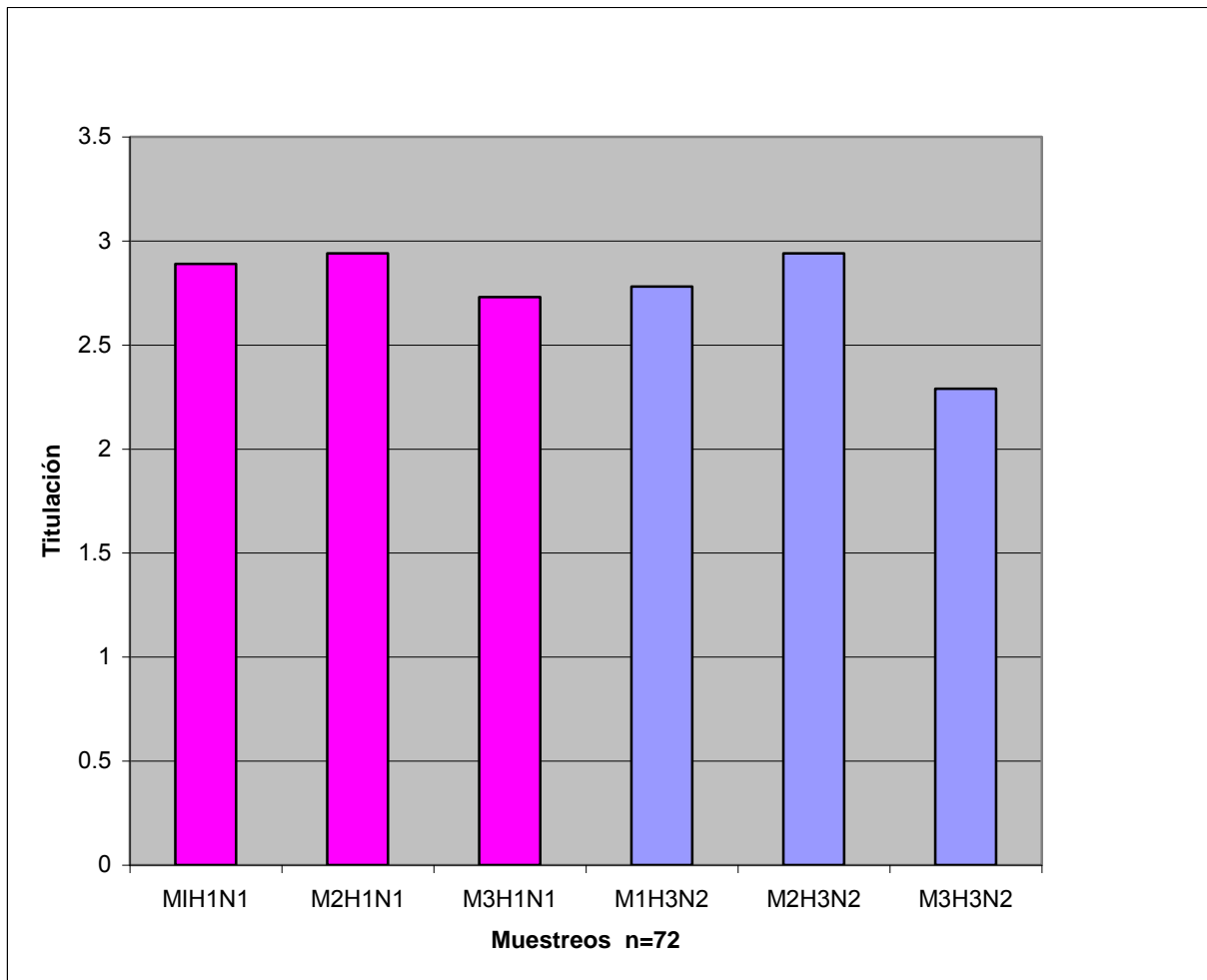
posteriormente entre el primer y tercer muestreo para ambos subtipos del muestreo transversal de los cerdos del área de destete.

En el cuadro 6 y 7 se observa una diferencia numérica de 5 cerdos positivos entre el primer muestreo de H1N1 y el segundo muestreo, 10 positivos de 12 en total para el primer muestreo (M1 H1N1) y de 5 positivos de 12 para el segundo muestreo (M2 H1N1) sin diferencia estadística significativa entre sí. Para la comparación entre el primer (M1 H1N1) y tercer muestreo (M3 H1N1) se encuentra una diferencia numérica de 2 cerdos positivos entre ambos, con 10 positivos de un total de 12 para el primero y de 12 positivos de un total de 12 para el tercero sin diferencia estadística significativa.

En el caso del subtipo H3N2 no se obtuvo una diferencia numérica entre el primer (M1 H3N2) y segundo muestreo (M2 H3N2), con 10 positivos de 12 para el primer muestreo y 10 positivos de 12 para el segundo sin diferencia estadística significativa. Para la comparación del primer muestreo (M1 H3N2) con el tercero (M3 H3N2), se encuentra una diferencia numérica de 2 cerdos positivos entre ambos, con 10 positivos de un total de 12 para el primero y de 8 positivos de un total de 12 para el tercer muestreo sin ser estadísticamente significativa.

Se observa que a lo largo de la prueba de los cerdos del área de destete no hay una diferencia estadística significativa en la comparación de la seropositividad entre muestreos y se mantienen estables para ambos subtipos.

Grafica 3. Promedio de titulación de muestreo transversal de cerdos del área de destete convertido a logaritmo base 10.



Títulos promedio de anticuerpos contra el VIP subtipo H1N1 ■ y H3N2 ■, (n) tamaño de muestra. M1 (14 días previos a la vacunación), M2 (14 días postvacunación) y M3 (28 días postvacunación)

Cuadro 5. Promedio de titulación de anticuerpos contra el VIP subtipos H1N1 y H3N2 del muestreo transversal de cerdos del área de destete convertidos a logaritmo base 10.

Subtipo	Muestreo		
	M1	M2	M3
H1N1	2.89	2.94	2.73
H3N2	2.78	2.94	2.29

M1 (14 días previos a la vacunación del pié de cría), M2 (14 días posteriores a la vacunación del pié de cría), M3 (28 días posteriores a la vacunación del pié de cría)

Cuadro 6. Comparación estadística de seropositividad muestreo transversal de cerdos del área de destete

Ji2 TRANSVERSAL CERDOS DESTETE	
MUESTREOS	P=
M1 H1N1	0.23
M2 H1N1	
M1 H1N1	0.3
M3 H1N1	
M1 H3N2	0.46
M2 H3N2	
M1 H3N2	0.53
M3 H3N2	

M1 (14 días previos a la vacunación del pié de cría), M2 (14 días posteriores a la vacunación del pié de cría), M3 (28 días posteriores a la vacunación del pié de cría).

Cuadro 7. Comparación numérica de seropositividad del muestreo transversal de cerdos del área de destete

MUESTREO	#ANIMALES	POSITIVOS	NEGATIVOS	DIFERENCIA
M1 H1N1	12	11	1	10
M2 H1N1	12	8	3	5
M3 H1N1	12	12	0	12
M1 H3N2	12	11	1	10
M2 H3N2	12	11	1	10
M3 H3N2	12	10	2	8
TOTAL	72	63	8	55

M1 (14 días previos a la vacunación del pié de cría), M2 (14 días posteriores a la vacunación del pié de cría), M3 (28 días posteriores a la vacunación del pié de cría).

4. Muestreo longitudinal de cerdas gestantes

En la gráfica 4 y cuadro 8, se observa en el primer muestreo para el subtipo H1N1 (M1 H1N1) un valor negativo con un título promedio de 1.46. A partir del segundo muestreo (M2 H1N1) el valor que se obtuvo fue de 2.6, el cual es el más alto de la prueba para este subtipo, en el tercer muestreo (M3 H1N1) se estabilizan los títulos teniendo un promedio de 2.44 y para el cuarto muestreo (M4 H1N1) se mantiene estable con un título promedio de 2.41

En el primer muestreo (M1 H3N2), el subtipo H3N2 alcanza el mínimo valor para considerarse positivo con un título promedio de 1.9 siendo el muestreo con el título promedio más alto de la prueba para este subtipo; mientras que en el segundo muestreo (M2 H3N2) se obtuvo una titulación promedio de 1.01, el valor más bajo; en el tercer muestreo (M3 H3N2) con un título promedio de 1.51 hay un aumento sin llegar a considerarse positivo, para el cuarto muestreo (M4 H3N2) se tiene un decremento con un título promedio de 1.22 y se mantiene negativo.

Durante el tiempo de la prueba representada en la gráfica 4, el subtipo H1N1 muestra un incremento con una posterior estabilización en su título, teniendo un valor negativo solo al inicio de la prueba mientras el subtipo H3N2 muestra un decremento en su titulación teniendo un valor positivo solo al inicio.

En ninguna de las comparaciones de seropositividad entre los muestreos para ambos subtipos se encontró diferencia estadística significativa, solo numérica.

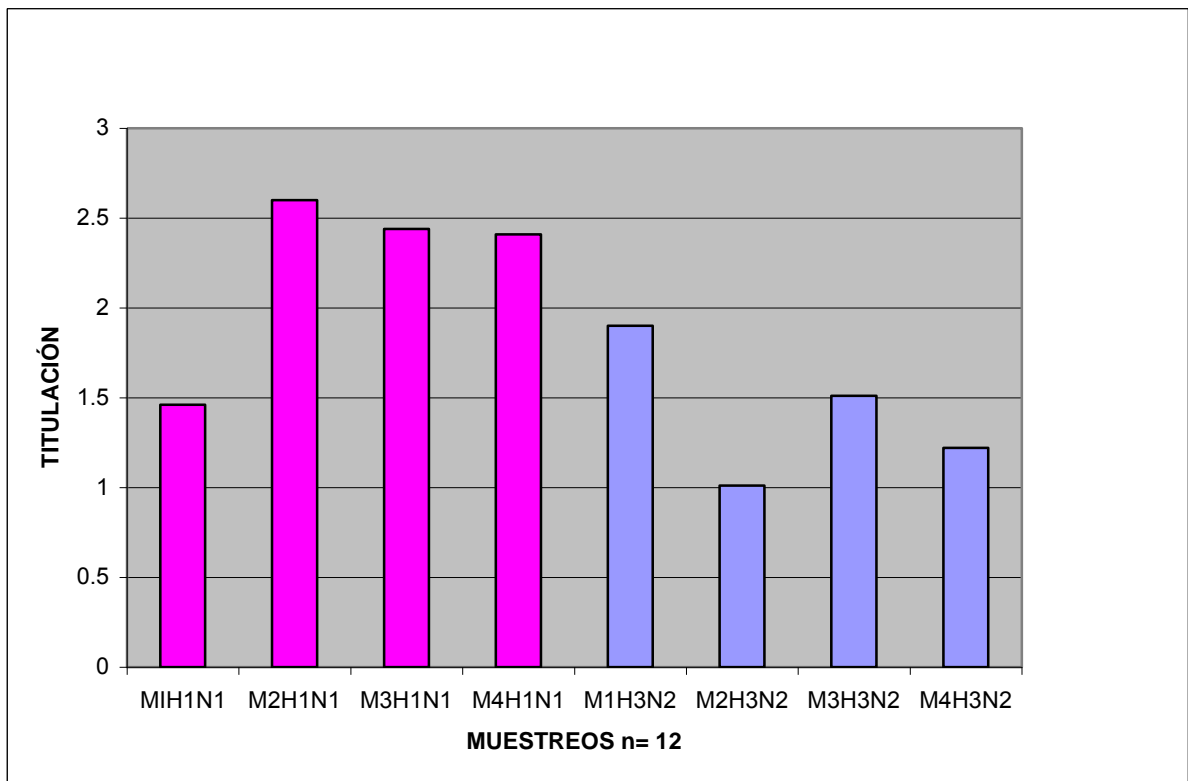
En los cuadros 9 y 10 se observa, en la comparación del primer muestreo (M1 H1N1) con el segundo (M2 H1N1) para el subtipo H1N1, una diferencia numérica de cerdas positivas mayor para el segundo muestreo que para el primero, en el que se obtuvo, 6 cerdas positivas de un total de 12 , y de 7 positivas de un total de 9 para el segundo muestreo, en la comparación entre el segundo (M2 H1N1) y tercer muestreo (M3 H1N1) encontramos una diferencia numérica de 3 cerdas positivas entre ambos, con una diferencia de 7 positivas de un total de 9 para el segundo muestreo y de 10 positivas de un total de 12 para el tercer muestreo, en la comparación del tercer muestreo (M3 H1N1) con el cuarto (M4 H1N1) encontramos una diferencia numérica de 2 cerdas positivas, con 11 cerdas positivas de un total de 12 para el tercer muestreo y 9 positivas de un total de 9 para el cuarto.

En el caso del subtipo H3N2 para la comparación entre el primer (M1 H3N2) y el segundo muestreo (M2 H3N2), se tiene una diferencia numérica de 5 cerdas positivas más en el primer muestreo, con 8 cerdas positivas de un total de 12 y de 3 positivas de un total de 9 para el segundo, en la comparación entre el segundo (M2 H3N2) y tercer muestreo (M3 H3N2), encontramos una diferencia numérica de 4 cerdas positivas más en el tercer muestreo, con 3 positivas de un total de 9 para el segundo muestreo y 7 positivas de un total de 12 para el tercer muestreo, para la comparación del tercer (M3 H3N2) con el cuarto muestreo (M4 H3N2) encontramos una diferencia numérica de 1 cerda positiva mas en el tercer muestreo, con 7 positivas de un total de 12 para el tercer muestreo y 6 positivas de un total de 9 para el cuarto.

Se observa a lo largo de la prueba para H1N1 un aumento gradual en la seropositividad de las cerdas sin generarse una diferencia estadística significativa entre cada muestreo medido con los muestreos consecutivos inmediatos.

En el caso del subtipo H3N2 se observan estables la cantidad de cerdas positivas a lo largo del muestreo sin diferencia estadística significativa.

Grafica 4. Promedio de titulación de muestreo longitudinal de cerdas gestantes convertido a logaritmo base 10.



Títulos promedio de anticuerpos contra el VIP subtipo H1N1 ■ y H3N2 ■, n tamaño de muestra, M1 (14 días previos a la vacunación), M2 (28 días posteriores a la vacunación), M3 (el día del parto, los partos se presentaron entre los 14 a 28 días posteriores a la vacunación), M4 (14 días postparto).

Cuadro 8. Promedio de titulación de anticuerpos contra el VIP subtipos H1N1 y H3N2 del muestreo longitudinal de cerdas gestantes, convertido a logaritmo base10.

Subtipo	Muestreo			
	M1	M2	M3	M4
H1N1	1.46	2.6	2.44	2.41
H3N2	1.9	1.01	1.51	1.22

M1 (14 días posteriores a la vacunación), M2 (28 días posteriores a la vacunación), M3 (el día del parto), M4 (14 días posteriores al parto).

Cuadro 9. Comparación estadística de seropositividad muestreo longitudinal de cerdas gestantes.

Ji2 LONGITUDINAL CERDAS GESTANTES	
MUESTREOS	P=
M1 H1N1	0.4233
M2 H1N1	
M2 H1N1	0.2
M3 H1N1	
M3 H1N1	0.24
M4 H1N1	
M1 H3N2	0.19
M2 H3N2	
M2 H1N1	0.28
M3 H1N1	
M3 H3N2	0.2
M4 H3N2	

M1 (14 días posteriores a la vacunación), M2 (28 días posteriores a la vacunación), M3 (el día de parto), M4 (14 días posteriores al parto).

Cuadro 10. Comparación numérica de seropositividad del muestreo longitudinal de cerdas gestantes.

MUESTREO	#ANIMALES	POSITIVOS	NEGATIVOS	DIFERENCIA
M1 H1N1	12	6	6	0
M2 H1N1	9	8	1	7
M3 H1N1	12	11	1	10
M4 H1N1	9	9	0	9
M1 H3N2	12	8	4	4
M2 H3N2	9	3	6	3
M3 H3N2	12	7	5	2
M4 H3N2	9	6	3	3
TOTAL	84	58	26	38

M1 (14 días posteriores a la vacunación), M2 (28 días posteriores a la vacunación), M3 (el día del parto), M4 (14 días posteriores al parto).

5. Muestreo longitudinal de lechones nacidos de cerdas muestreadas

En la gráfica 5 y cuadro 10 se puede observar que el promedio de los títulos se mantiene positivo en todos los muestreos; siendo para H1N1, 2.69 a los 14 días después de nacer (M1 H1N1), de 2.75 a los 28 días posteriores al nacimiento (M2 H1N1), de 2.63 a los 42 días después del nacimiento (M3 H1N1) y en el cuarto muestreo de 2.67 a los 56 días después del nacimiento (M4 H1N1).

Para el subtipo H3N2 los títulos promedio obtenidos fueron los siguientes; 2.58 a los 14 días después de nacer (M1 H3N2), 2.74 a los 28 días posteriores al nacimiento (M2 H3N2), y 2.19 a los 42 días después del nacimiento (M3 H3N2), en el cuarto muestreo a los 56 días después del nacimiento (M4 H3N2) se obtuvo 2.13 siendo el más bajo durante la prueba.

Se puede observar que durante todo el estudio el subtipo H1N1 presenta los títulos más altos y se mantienen constantes. Para el subtipo H3N2 se observa

una disminución en sus títulos mientras avanza el estudio mostrando sus valores más bajos en el último muestreo a los 56 días después del nacimiento.

En ninguna de las comparaciones de seropositividad entre cada muestreo para este estudio se encontró diferencia estadística significativa.

En los cuadros 12 y 13 se observa una diferencia numérica en la comparación del primer muestreo (M1 H1N1) con el segundo (M2 H1N1) para el subtipo H1N1 de 5 lechones positivos entre ambos, con 18 lechones positivos para el primero y 22 positivos para el segundo. Para la comparación del segundo muestreo (M2 H1N1) con el tercero (M3 H1N1); se obtuvo una diferencia numérica de 5 lechones positivos entre ambos, con 19 lechones positivos en el segundo muestreo y de 14 positivos para el tercer muestreo, en el caso de la comparación entre el tercer (M3 H1N1) y el cuarto muestreo (M4 H1N1) se encontró una diferencia numérica de 8 lechones positivos entre ambos, con 32 lechones positivos para el tercer muestreo y de 40 positivos para el cuarto.

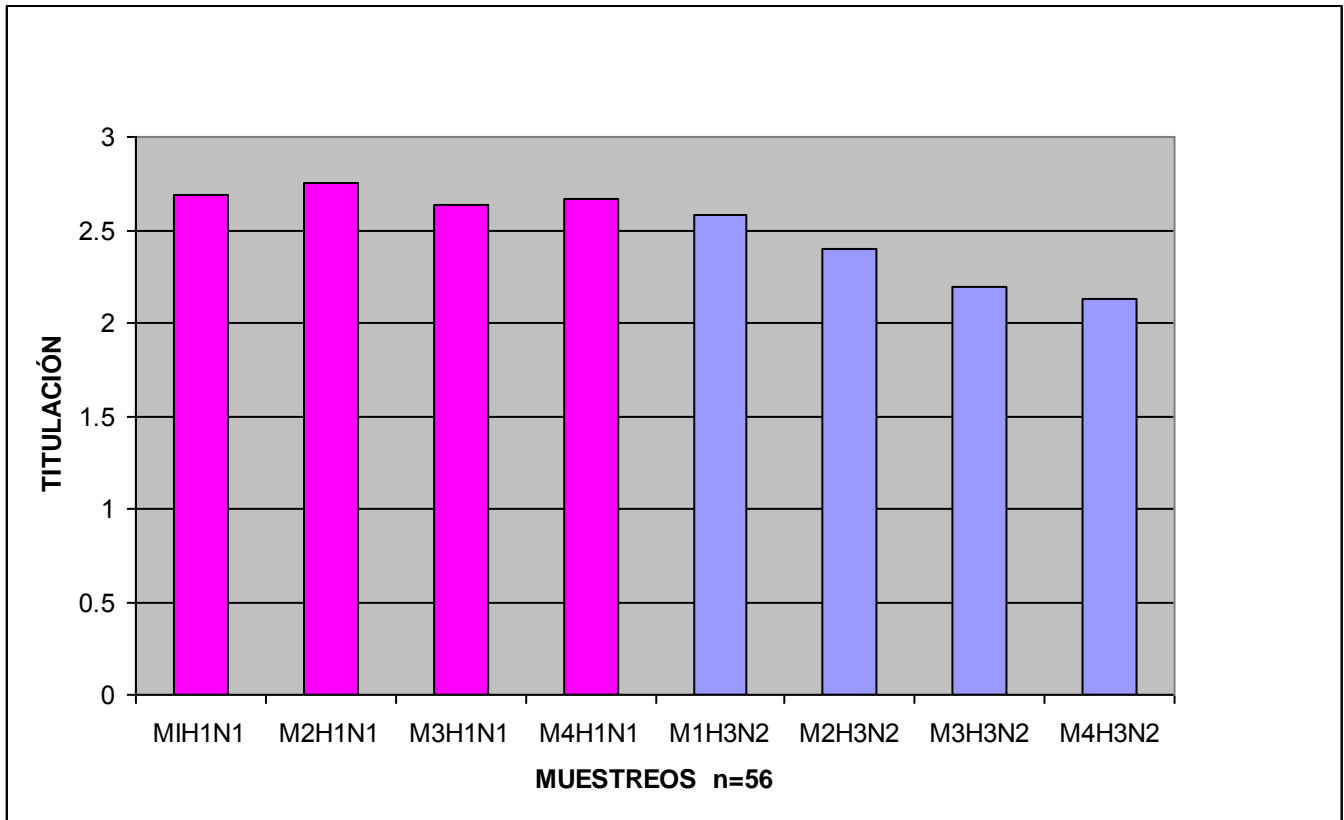
En el caso de la seropositividad del subtipo H3N2 se observó una diferencia numérica de 6 lechones entre el primer muestreo (M1 H3N2) y el segundo (M2 H3N2), con 22 lechones positivos para el primer muestreo y 16 positivos para el segundo, en el caso de la comparación entre el segundo muestreo (M2 H3N2) con el tercero (M3 H3N2) se encontró una diferencia numérica de 8 lechones positivos, con 16 lechones positivos para el segundo y de 24 para el tercero, para la comparación del tercer muestreo (M3 H3N2) con el cuarto (M4 H3N2) se

encontró una diferencia numérica de 10 lechones positivos, con 24 lechones positivos para el tercero y 34 positivos para el cuarto.

En el caso del subtipo H1N1 se observa un aumento gradual en la seropositividad sin haber diferencia estadística significativa entre cada muestreo consecutivo pero observando un aumento numérico importante de lechones seropositivos entre el primer y último muestreo.

En el caso del subtipo H3N2 no se encontró diferencia estadística significativa en la comparación de cada muestreo y numéricamente se observa un aumento gradual de la seropositividad de los lechones sin ser tan marcado como en el caso de H1N1.

Grafica 5. Promedio de titulación de muestreo longitudinal de lechones nacidos de cerdas muestreadas convertido a logaritmo base 10.



Títulos promedio de los anticuerpos contra el VIP subtipo H1N1 ■ y H3N2 ■, n tamaño de muestra. M1 (14 días de edad), M2 (28 días de edad), M3 (42 días de edad), M4 (56 días de edad).

Cuadro 11. Promedio de titulación de anticuerpos contra el VIP subtipos H1N1 y H3N2 del muestreo longitudinal de lechones nacidos cerdas muestreadas convertido a logaritmo base 10.

Subtipo	Muestreo			
	M1	M2	M3	M4
H1N1	2.69	2.75	2.63	2.67
H3N2	2.58	2.4	2.19	2.13

M1 (14 días de edad), M2 (28 días de edad), M3 (42 días de edad), M4 (56 días de edad)

Cuadro 12. Comparación estadística de seropositividad muestreo longitudinal de lechones nacidos de cerdas muestreadas.

Ji2 LONGITUDINAL LECHONES	
MUESTREOS	P=
M1 H1N1	0.69
M2 H1N1	
M2 H1N1	0.3
M3 H1N1	
M3 H1N1	0.36
M4 H1N1	
M1 H3N2	0.56
M2 H3N2	
M2 H3N2	0.43
M3 H3N2	
M3 H3N2	0.29
M4 H3N2	

M1 (14 días posteriores a la vacunación), M2 (28 días posteriores a la vacunación), M3 (el día de parto), M4 (14 días posteriores al parto).

Cuadro 13. Comparación numérica de seropositividad de muestreo longitudinal de lechones nacidos de cerdas muestreadas.

MUESTREO	#ANIMALES	POSITIVOS	NEGATIVOS	DIFERENCIA
MI H1N1	60	39	21	18
M2 H1N1	60	41	19	22
M3 H1N1	60	46	14	32
M4 H1N1	60	50	10	40
M1 H3N2	60	41	19	22
M2 H3N2	60	38	22	16
M3 H3N2	60	42	18	24
M4 H3N2	60	47	13	34
TOTAL	480	344	136	208

M1 (14 días de edad), M2 (28 días de edad), M3 (42 días de edad), M4 (56 días de edad).

DISCUSIÓN

1. Evaluación de parámetros productivos antes y después de la vacunación.

La IP ha sido investigada por varios autores durante muchos años desde el brote de 1918 pero aún se tiene pocos datos acerca de los efectos sobre los parámetros en las maternidades de las granjas, esto debido a que la enfermedad durante muchos años no fue considerada como un factor independiente causante de daños en la productividad del pié de cría. Pero en años recientes investigadores como Brown⁴⁶ han reportado cambios importantes sobre la virulencia de la IP y decreciente protección por medio de las vacunas siendo probable que por estas circunstancias el virus sea reportado como causante de abortos y desordenes reproductivos; (Iwona Markowska D y Arunas Stankevicius)¹⁴¹ como dificultades al parto y problemas neonatales,^{46, 88} infertilidad, lechones nacidos muertos y lechones nacidos débiles y bajo peso al destete.^{2, 60, 90, 91}

La presente investigación dio como resultados solo tendencias numéricas en todos los parámetros productivos ya que en ningún caso se encontró diferencia estadística significativa, por lo que se discutirán las tendencias numéricas.

En el caso de lechones nacidos total (LNT) se encontró una mejora posterior a la vacunación con 0.71 lechones de diferencia promedio sugiriendo un efecto positivo de la vacunación; esto se puede deber a que al disminuir los signos

clínicos de la enfermedad, disminuyó el estrés en la cerdas así como los episodios febriles (signo relacionado con problemas reproductivos en la cerdas)¹⁴⁴ evitando reabsorciones y propiciando una mayor fertilidad. Estos resultados también se relacionan con la estabilización propia de la enfermedad.

Se presentó una mejora en el total de lechones nacidos vivos LNV con una diferencia numérica positiva de 0.6 lechones después de la vacunación por lo que probablemente la disminución de los signos clínicos influyeron positivamente para el aumento de las camadas.⁹³

También se reportó un incremento de 0.05 en el promedio de lechones nacidos muertos (LNM) después de la vacunación, el cual es una diferencia mínima sin ser estadísticamente significativa lo que contrasta con el efecto de la IP reportado por Ronald D. Wesley⁹³ quien menciona que en su investigación la presencia de la enfermedad aumentaba el número de lechones muertos, esto se puede deber a que en la granja donde se realizó el presente trabajo, el brote de IP no fue tan agresivo con las cerdas gestantes.

En los resultados también se observa una mejora en el parámetro de peso promedio de la camada de 0.64 kg, esta tendencia favorable se podría relacionar con la aplicación de la vacunación. Esto se puede deber a que la inmunidad generada por las madres aumenta después de la aplicación de la vacuna y esto evita la presentación de signos clínicos que podrían derivar en la presentación del complejo respiratorio, periodos febriles y falta de apetito durante la gestación lo cual puede afectar directamente el desarrollo de los lechones. La vacunación

tuvo un efecto numérico positivo sobre estos parámetros sin ser estadísticamente significativos.²

Hubo una disminución en el promedio de lechones destetados de 0.77 y una disminución en el peso promedio al destete de 12.82 kg por camada después de la vacunación sin mostrar diferencia estadística significativa así como un aumento en la mortalidad durante la lactancia de 4.5%, que se pudo deber al manejo del área por el personal de la granja, lo cual contrasta con lo mencionado por Straw EB, Sylvie D Allaire (2000) quien menciona que en algunos casos del VIP al ser inoculado en los primeros estadios de gestación reporta disminución en el peso al destete y mortalidades en lactancia.² Aunque el efecto de la vacunación fue positivo sobre los demás parámetros no tuvo ningún efecto sobre estos, por lo que no sabemos si los resultados negativos estén relacionados con la IP o con otros factores como el manejo en la granja o enfermedades propias del área.

También hubo un aumento en los días de lactancia probablemente relacionado con los efectos negativos observados durante esta etapa, por lo que el manejo debió de haberse prolongado para que los lechones salieran mejor preparados del área para el destete.

Se encontró un aumento en el porcentaje de parición del 6% (PP) después de la vacunación, quizá debido a que con la vacunación se disminuyó la presentación de signos clínicos como se ha mencionado anteriormente, por lo que parece que se tuvo un efecto positivo sobre este parámetro relacionado con los efectos

reproductivos de fertilidad, como lo reportan los estudios realizados por Iwona Markowska D y Arunas Stankevicius quienes en 2005 realizaron un reporte en Polonia durante un súbito brote de IP el cual relacionaron con aumento en la cantidad de abortos¹⁴¹, así como lo descrito por Madec FC quién en 1989 estudió un brote severo de IP en Francia en el que encontró que durante el brote solo 3 de 13 cerdas gestantes en sus primeras semanas de gestación llegaron a parto, mientras que en 18 cerdas de más de 45 días de gestación abortaron⁸³, así como lo descrito por Easterday BC en 1999 quien menciona que los cerdos nacidos vivos de madres inoculadas durante los primeros estadios de gestación con virus vivo tuvieron altos índices de mortalidad y bajos pesos al destete que las madres control.²

En estudio realizado por Ronald D Wesley en 2003 quien expuso a 32 cerdas con virus vivo de manera experimental y comparó con cerdas control, encontró que la infección con el VIP afectó el numero de lechones nacidos vivos, con 2 lechones nacidos vivos mas en las cerdas que no fueron inoculadas, posteriormente reinfecto a 6 cerdas con el VIP subtipo H3N2 obteniendo un aumento en el numero de lechones nacidos débiles con 3 lechones nacidos débiles por camada reinfectada.⁹³

No se encontraron parámetros afectados significativamente por la aplicación de la vacuna esto coincide con lo reportado por Díaz Fuentes en su investigación en esta misma granja, quien no encontró cambios significativos durante el brote para lechones nacidos vivos, lechones nacidos muertos, fetos momificados, peso total de la camada y peso promedio del lechón.¹⁴⁹

La no significancia estadística en la afectación de los parámetros productivos se puede relacionar con las cepas del VIP que afectaron a la granja, Straw EB, Silvye D Allaire 2005 menciona que el curso, la naturaleza y severidad de la IP varía con el subtipo viral pero también con la edad y el estado inmunológico del hospedador¹

2. Evaluación de la eficacia de la vacunación en sabana.

Durante el análisis de los resultados se encontró que antes de la vacunación, los cerdos del área de destete y el pié de cría de la granja ya mostraba títulos positivos a IP esto debido a que la granja es considerada positiva al VIP.

Los títulos más altos fueron para H1N1, aunque también la titulación de anticuerpos hacia el subtipo H3N2 fue positiva, tanto en las cerdas gestantes como en los cerdos destetados, al realizar el análisis estadístico y evaluar la seropositividad se encontró que en ambos casos desde el primer muestreo se obtuvieron títulos positivos.

En las gráficas los títulos mas altos se presentan a los 14 días posteriores a la vacunación para ambos subtipos, en la evaluación de la seropositividad para el subtipo H1N1 al comparar el primer muestreo con el segundo para el subtipo encontramos que hay una disminución en la cantidad de cerdas positivas con una diferencia estadística significativa. Posteriormente para el tercer muestreo la mayor parte de las cerdas se encuentran inmunizadas ya que no hay diferencia estadística significativa en la comparación de seropositividad entre el primer y

tercer muestreo. Por los resultados obtenidos, la vacuna está ejerciendo estímulo antigénico para el subtipo H1N1 sobre las cerdas desde los 14 días postvacunales para estabilizarse a los 28 días, lo cual coincide con investigaciones realizadas por Erikson G, Rapp –Gabrielson V quien en 2002 realizó un estudio en el que midió los anticuerpos generados por una vacuna comercial por medio de las pruebas de ELISA e IH y reporto que los anticuerpos generados por el VIP solo pueden ser detectados por corto tiempo, los cerdos presentaron su pico 2 semanas después de la segunda vacunación y se reportaron seronegativos 8 semanas después¹⁴⁶. W.I Kim en 2005 estudió la respuesta inmune en cerdos experimentalmente infectados y vacunados contra el VIP, encontró que los títulos inducidos por la vacunación y medidos por la prueba IH fueron detectados 2 semanas después de la segunda vacunación con títulos en rangos entre 1:80 y 1:320.¹⁴⁷

En el caso del subtipo H3N2 en cerdas gestantes al parecer se generó mayor estímulo antigénico por el virus de campo que por el virus vacunal, lo cual coincide con Jee Hoon Lee¹⁴⁸ quien menciona que se puede generar una protección débil por medio de las vacunas comerciales debido a la heterogenicidad del virus.

Cabe mencionar que la respuesta de seropositividad para el subtipo H3N2 así como la descripción gráfica se encuentra siempre por debajo de los valores obtenidos para el subtipo H1N1 esto coincide con lo obtenido por Díaz Fuentes quien realizó un estudio de prevalencia del VIP subtipos H1N1 y H3N2 en esta mismas granja en el 2007 por medio de la prueba de IH en el que al realizar la

identificación del virus en encontró valores siempre mas altos para H1N1 la cual considera endémica.¹⁴⁹

En los cerdos del área de destete, tanto la titulación como la evaluación de la seropositividad y el análisis estadístico para ambos subtipos se mantienen estables y se consideran positivos durante todo el estudio sin diferencia estadística significativa. Estos resultados pueden estar relacionados a que el efecto de la vacuna no se ve reflejado en su inmunidad, ya que no todas las cerdas vacunadas les habían transmitido los anticuerpos que generaron tras la vacunación y sin embargo el virus se encuentra circulando, esto coincide con la investigación realizada Robert Desroisiers en 2004 quien realiza un estudio de persistencia de anticuerpos después de la infección con el VIP en una granja que se consideraba negativa previamente y menciona que la inmunidad generada tras la infección natural puede durar hasta 28 meses y la inmunidad generada por las madres permanece hasta 8 semanas dependiendo del valor inicial.¹³⁸

Parece que el estímulo antigénico del virus H1N1 en esta granja fue mayor, esto se puede deber a dos causas; a que el virus H1N1 se encontraba mas diseminado en la granja y continuaba reinfectando a los cerdos, por lo que el estímulo antigénico en la piara se mantenía constante o a que la vacuna protege de manera mas sólida contra el subtipo H1N1 que contra el H3N2 debido a la variabilidad del virus como lo menciona Haesebrouck F. y col 1985¹²⁸ quien en su investigación reprodujo la enfermedad producida por el VIP subtipo H3N2 y estudió las variedades en Bélgica y sugiere el cuidado en la elección del tipo de

vacuna aplicada para el subtipo H3N2 debido a que varias cepas H3N2 circulan en las poblaciones porcinas.

Durante todo el estudio el subtipo H3N2 se mostró mas inestable en su antigenicidad ya que se observaron mas variaciones entre muestreos tanto en la descripción del comportamiento de sus títulos como en la seropositividad del hato, esto coincide con lo mencionado por Kaiser ,C. y col 1991³⁶, quien realizó un estudio de la variación de los antígenos de superficie del VIP subtipo H3N2 y asevera que son menos estables que los H1N1 además de que la producción de anticuerpos generada posterior a la vacunación se mostró con menor intensidad.

3. Evaluación de la curva de anticuerpos generada por la inmunidad pasiva

En el caso de las cerdas gestantes muestreadas longitudinalmente se observó que 14 días después de la vacunación los títulos promedio se encontraban en el rango mínimo para considerarse positivos contra el subtipo H3N2, y contra el subtipo H1N1 se mantenían negativas, cabe mencionar que los resultados de las gráficas son derivados de promedio y son solo descriptivas. Ya había cerdas con títulos positivos con valores altos en ambos casos y la diferencia de positivas y negativas fue mínima, por eso el promedio arroja valores negativos.

A los 28 días después de la vacunación hay un incremento del promedio de anticuerpos contra el subtipo H1N1 considerándose positivos, y disminuye para el subtipo H3N2. La relación entre positivos y negativos muestra un aumento en

la cantidad de positivos en el caso del subtipo H1N1 y disminuye en el caso del subtipo H3N2, ambos sin diferencia estadística significativa, esto quizá se deba a que el estímulo de la vacuna comenzaba a tener efecto sobre las cerdas para el subtipo H1N1, mientras la infección por el subtipo H3N2 comenzaba a decrecer. A partir del segundo muestreo la titulación de H1N1 se mantiene positiva y constante y la de H3N2 se mantiene negativa el resto del estudio en la descripción numérica de titulación, esto coincide con lo mencionado por Haesebrouck F. y col 1985.¹²⁸ y Kaiser .C y col 1991³⁶ citados anteriormente ya que como a lo largo del estudio, el subtipo H3N2 se sigue mostrando más inestable que el H1N1 y no se refleja el efecto de la vacunación.

En el caso de la evaluación estadística de seropositividad durante el estudio se mantiene un aumento muy ligero entre cada muestreo sin una diferencia estadística significativa para ambos subtipos. Estos resultados contrastan con resultados obtenidos con la investigación realizada por Díaz Fuentes¹⁴⁹ en los que la respuesta postvacunal muestra incrementos en la titulación de las cerdas vacunadas en comparación con cerdas no vacunadas de la misma granja, esto puede estar relacionado a que en la granja ya había pasado el brote y las cerdas se encontraban con inmunidad previamente generada por la infección, por lo que no se muestra un incremento estadísticamente significativo en los muestreos posteriores a la vacunación.

En contraste, los lechones desde los 14 días de nacidos tienen un nivel de anticuerpos positivo en promedio para ambos subtipos, siendo más alto y

estable en el caso de H1N1 y mostrando una disminución paulatina para el subtipo H3N2 pero se mantuvo positiva.

En el caso de la evaluación de la seropositividad, los lechones muestran un aumento gradual en el número de positivos para ambos subtipos y sin una diferencia estadística significativa entre cada muestreo, pero con una diferencia numérica de 22 lechones positivos en el caso de H1N1 y de 12 lechones positivos en el caso de H3N2 entre el primer y último muestreo.

Posiblemente la variación en la inmunidad pasiva entre los resultados obtenidos en las madres y los lechones se deba a que los anticuerpos generados por los lechones para H1N1 se derivan de la inmunidad generada por sus madres durante la vacunación a través de la inmunidad pasiva, ya que sin ser estadísticamente significativa la diferencia numérica y la tendencia entre cada muestreo, es mayor para los lechones que para las madres y se mantiene estable y positiva. Al parecer en el caso del subtipo H3N2 la inmunidad generada por los lechones es menor, ya que durante todo el estudio se observa que el hato genera una inmunidad más estable para el subtipo H1N1 que para el subtipo H3N2 lo cual coincide con lo encontrado en la investigación realizada por Díaz Fuentes, quien como se mencionó anteriormente encontró una prevalencia más estable en el caso del subtipo H1N1.¹⁴⁹

La inmunidad pasiva contra el VIP de manera más clara contra el subtipo H1N1, se mantiene en los lechones durante 8 semanas con la mayor titulación y seropositividad entre la semana 2 y 6 para ambos subtipos, lo que coincide con

investigaciones realizadas por Candotti P Foni quien analizó el tiempo en que la inmunidad materna para diferentes variantes de VIP desaparecen, utilizó 1000 lechones de 21 granjas con sistema de ciclo completo en Italia, las muestras las obtuvo de lechones de 3, 6, 9, 12 y 15 semanas de edad y encontró que la vida media de los anticuerpos fue entre 6.3 y 7.5 semanas (6.6 para H1N1, 6.3 para H1N2 y 7.5 para H3N2). Encontró la mayor prevalencia de anticuerpos específicos para los 2 subtipos entre las 3 y las 6 semanas de edad en comparación con los demás grupos de edad.⁸⁸

Aún en la octava semana de edad en los cerdos del presente estudio, los niveles de titulación para ambos subtipos se mantienen positivos en especial para el subtipo H1N1, esto probablemente se deba al estímulo que recibieron las cerdas durante la gestación con la aplicación de la vacuna, lo cual coincide con lo encontrado por Thacker¹³⁹, en el que los títulos detectables por la prueba de IH generados en los lechones nacidos de cerdas vacunadas durante la gestación, se mantenían por encima de 1:40 en un periodo mayor a las 6 semanas mientras que para los lechones nacidos de cerdas no vacunadas disminuía a valores menores a 1:40 después de la sexta semana.

Candotti P Foni⁸⁸ analizó el tiempo en el que la inmunidad materna decrecía para diferentes variantes del VIP, obteniendo que la concentración de anticuerpos calostrales para el subtipo H3N2 y el H1N1 decrecen entre las 9 y 15 semanas de edad, lo cual coincide con los resultados arrojados durante esta investigación para ambos subtipos, siendo mas claro para el subtipo H1N1, que para el subtipo H3N2, observando que las cerdas gestantes durante el muestreo

longitudinal arrojan títulos negativos para el subtipo H3N2 y durante el muestreo transversal siempre mantienen títulos por debajo de los obtenidos para el subtipo H1N1, lo que sugiere que la circulación del VIP subtipo H3N2 es irregular aunque se mantiene en toda la línea de producción sin que la inmunidad se establezca en las cerdas aún con la aplicación de la vacuna la cual contiene el subtipo H3N2.

CONCLUSIONES

Se concluye que la vacunación no generó un cambio en los parámetros productivos medidos en esta investigación, por lo que es necesario revisar los parámetros productivos en las demás etapas de producción para conocer si la vacunación tuvo un efecto positivo en ellos.

Se concluye que la vacunación en sávana de las cerdas gestantes no generó aumento significativo en la seropositividad de la granja para ambos subtipos. La inmunidad generada contra el virus de influenza subtipo H1N1 fue más sólida y estable que contra el subtipo H3N2 durante todo el estudio.

Las cerdas gestantes generaron protección en los lechones por medio de inmunidad pasiva aumentando la seropositividad de manera gradual con anticuerpos contra los subtipos H1N1 y H3N2.

REFERENCIAS

1. Straw EB, Sylvie D Allaire, Mengeling LW, Taylor DJ. Diseases of swine. Iowa States Press. 9th Edition. Iowa.2005; 469-482.
2. Straw EB, Sylvie D Allaire, Mengeling LW, Taylor DJ. Enfermedades del cerdo. Intermédica 2000, Buenos Aires Argentina, 8^a edición Tomo I, 1999. 161-169.
3. Chun J., Influenza including its infection among pigs. Natl. Med. J. China 5,1919; 34-44.
4. Beveridge. W.I.B. Influenza: the last great plague. An unfinished story of discovery, Heinemann Educational Books, London, UK. (Ed.), 1977.
5. Koen, J.S. A practical method for the field diagnosis of swine diseases. Am J. Vet. Med.14,1919; 468.
6. Gorman, O.T., Bean, W.J., Kawaoka, Y., Donatolli, I, Guo, Y.L., Webster., R.G. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. J. Virol. 65,1991; 3704-3714.
7. Kaneage, Y., Sugita, S., Shortridge, K.F., Yoshioka, Y., Nerome, K. Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and

human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. Arch. Virol.1994;134, 17-28.

8. Reid, A. H., Faning, T.G., Hultin, J.V., Taubenberger, J.K., 1999. Origin and evolution of the 1918 „ Spanish’ influenza virus hemagglutinin gene. Proc. Of Natl. academy of Sciences USA 1996; 1651-1656.

9. Dorset, M; McBryde, C.N and Niles, W.B . Remarks on “hong flu”. J Am Vet Med Assoc1992; 62:162-171.

10 .Mc Bryde, C.N. Some observations on “hong flu” and its seasonal prevalence in Iowa. J Am Vet Med Assoc 1927; 71:368-377.

11. Mc Bryde, C. N.; Niles, W. B; and Moskey, H. E. Investigations on the transmission end etiology of hong flu. J Am Vet Med Assoc 1928;73:331-346.

12. Harnach, R.; Hubik, R; and Chvatal, O. Isolation of the virus of swine influenza in Czochoslovakia. Cas Ceskoslov Vet 1950;5:289.

13. Kaplan, M.M., and Payne, A.M.M. Serological survery in animals for type A influenza in relation to the 1957 pandemic. Bull WHO 1959;20:465-488.

14. Nardelli, L.; Pascucci, S.; Gualandi, G.R; and Loda, P. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. Zentralbl Veterinärmed (B). 1978;25:853-857.

15. Vandeputte, J.; Pensaert, M.; and Castryck, F. Serologische diagnose en onderzoek naar verspreiding van het varkesinfluenzavirus in België. Vlaams Diergeneeskd Tijdschr. 1980;49:1-7.
16. Ottis, K.; Bollwahn, P.A.; and Heinritzi, K. Ausbruch von Schweineninfluenza in der Bundesrepublik Deutschland: Klinik, Nachweis und Differenzierung. Tierärztl Umschau. 1981;36:608-612.
17. Sorensen, K.J.; Hoyr, P.D.; Roensholt, L.; Hage, L.; Westergaard, J.M.; and Pedersen, K.B. Influenza hos svin I Danmark. Dan Veterinaertidsskr. 1981; 64:826-829.
18. Gourreau, J.M.; Kaiser, C.; Valette, M.; Douglas, A.R.; Labie, J.; and Aymard, M. Isolation of two H1N2 influenza viruses from swine in France. Arch Virol 1994;135:365-382
19. Masurel, N.; de Boer, G.F.; Anker, W.J.J.; and Huffels, A.D.N.H.J. Prevalence of influenza viruses A-H1N1 and H3N2 in swine in the Netherlands. Comp Immun Microbiol Infect dis. 1983;6:141-149.
20. Sinnecker, H.; Sinnecker, R; Zilske, E.; Strey, A.; and Leopoldt, D. 1. Influenzavirus A/ swine- Ausbrüche bei Hausschweinen und Antikörperbefunde in Humanseren. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd infectionstr Hyg Abt 1: Orig Reihe A. 1983; 255:209-213.
21. Martinsson, K.; Klingeborn, B.; and Rockborn, G. Utbrott av influenza suis i Sverige. Sven veterinartidn. 1983;35:37.

22. Hsu, F.S.; Joseph, R.L.; Chang, C.R.; Chen, W.F.; and Chou, N.Y. An epizootic of swine in Taiwan. *Proc Int Congr Pig Vet Soc.* 1976;4:16.
23. Peansert, M.; Ottis, K.; Vandeputte, J.; Kaplan, M.M.; and Bachman, P.A. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential for man. *Bull WHO* 1981; 59:75-78.
24. Roberts, D.H.; Cartwright, S.F.; and Wibberley, G. Outbreaks of classical swine influenza in pigs in England in 1986. *Vet Rec* 1987;121:53-55.
25. Kida, H.; Shortridge, K.F.; and Webster, R.G. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *J Virol* 1988;162(1):160-166.
26. Brown, I.H.; Harris, P.A.; and Alexander, D.J. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain, 1991-2. *Epidemiol Infect* 1995; 114:511-520.
27. Bikour, M.; Frost, E. H.; Deslandes, S.; Talbot, B.; and Elazhary, Y. Persistence of a 1930 swine influenza A(H1N1) virus in Quebec. *J Gen Virol* 1995a; 76(10): 2539-2547.
28. Bikour, M.; Frost, E. H.; Deslandes, S.; Talbot, B.; and Elazhary, Y. Recent H3N2 swine influenza virus with hemagglutinin and nucleoprotein genes similar to 1975 strains. *J Gen Virol* 1995b; 76(3): 697-703.

29. Taunberger JK, Reid AH, Janczewski TA, Fanning TG. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish Influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 2001;356: 1829-1839.
30. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002: 3068-3087.
31. O Neill R, Talon EJ, Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* 1998;17:288-296.
32. International Committee on Taxonomy of Viruses 2002. 0.046 *Orthomyxoviridae* family. Genus. *Influenzavirus A*. Code 00.046.0.01
33. Li H, Yu K, Xin X, Yang H, Li Y, Qin Y, Bi Y, Tong G and Chen H. Serological and virologic surveillance of swine influenza in China from 2000 to 2003. *International Congress Series* 2004; 1263: 754-757.
34. Xu C, Fan W, Wei, R and Zhao H. Isolation of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003 (H9N2) virus. *Microbes and infection* 2004; 6: 919-925.
35. Dea S, Bilodeau R, Sauvageau C. Antigenical variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J Vet Diagn Invest* 1992;4:380-392.

36. Kaiser, C.; Valette, M.; Million-Jolly, J.; et al. Mise en evidence da variations des antigens de surface du virus grippal H3N2 chez le porc en France a l'aide d'anticorps monoclonaux. *Epidemiol et Santé anim* 1991;19:75-84.
37. Brown I.H.: Epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* 2000, 74, 29-46.
38. Olsen CW. DNA vaccination against influenza viruses: A review with emphasis on equine and swine influenza. *Vet Microbiol* 2000;74:149-164.
- 39 Landolt GA, Karasin AI, Philips L, Olsen CW. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. *J Clin Microbiol* 2003;41: 1936-1941.
40. Van Reeth K, Labarque G, De Clerq S, Pensaert M. Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. *Vaccine* 2003a; 21:1375-1381.
41. Choi. Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory disease in pigs. *Can. Vet. J.* 2003; 44, 735-737.
42. Choi. Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S. Evaluation of transmission of swine influenza type A subtype H1N2 virus in seropositive pigs. *Am. J, Vet. Res* 2004 ;65, 303-306.

43. Madec, F.; Gourreau, J. M.; Kaiser, C.; Le Dantec, J. ; Vannier, P. ; and Aymard M. Etude de la persistance d' une activité du virus gripal H1N1(Swine) dans les élevages porcins en dehors des phases épidémiques. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1985;8 :247-258.
44. Hinshaw VS, Bean WJ, Webster RG, Easterday BC. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. *Virology* 1978;84:51-62.
45. Bruce H. Janke, DVM. Classic swine influenza. *Large animal practice*. Marc-april 1998: 24-29.
46. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* 2000 74:29-46.
47. Olsen CW, Swayne D, Subbarao K. Epidemiology and control of human and animal influenza. In *Contemporary Topics in influenza Virology*. Y Kawaoka 2004, ed. Norwich: Horizon Scientific Press (in press).
48. Bikour MH, Frost EH, Deslandes S, Talbot B, Weber JM, Elazhary Y. Recent H3N2 swine influenza virus with haemagglutinin and nucleoprotein genes similar to 1975 human strains. *J Gen Virol* 1995 76:697-703.

49. Karisin AI, Schutten MM, Cooper LA, Smith CB, Subbarao K, Anderson GA, Carman S, Olsen CW. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: Evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res* 2000c; 68:71-85.
50. Shope RE. Swine Influenza. Filtration experiments and etiology. *J exp Med* 1931;54:3/3- 385.
51. Kundin, W.D. Hong Kong A2 influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. *Nature* 1970; 228, 857.
52. Kundin, W.D., Easterday, B.C. Hong Kong influenza infection in swine: experimental and field observations. *Bull. World Health Organization* 1972;47, 489-491.
53. Roberts, D.H., Cartwright, S.F., Wibberley, G. Outbreaks of classical swine influenza in pigs in England in 1986. *Vet. Record* 1987;121, 53-55
54. Brown, I.H., Harris, P.A., Alexander, D.J. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-92. *Epidemiol Infect.* 1995b;114, 511-520.
55. Katsuda, K., Sato, S., Shirahata, T., Lindstrom, S., Nerome, R., Ishida, M., Nerome, K., Goto, H. Antigenic and genetic characteristics of H1N1 human influenza virus isolated from pigs in Japan. *J. Gen. Virol.* 1995a;76, 1247-1249.

56. Kluska , V ., Mcku, M ., Mensik, J. Evidence for pig influenza virus antibodies in humans. *Ceskoslovenska Pediatrie* 1961;16, 408-411.
57. Schnurrenberger, P.R., Woods, G.T., Martin, R.J. Serologic evidence of human infection with swine influenza virus. *Am. Rev. Respiratory Dis* 1970;102, 356-361.
58. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.*1992;56, 152-179.
59. Janke Bh. The significance of antigenic variation in swine influenza virus for serodiagnosis. *Proceedings, Swine Disease Conference for Swine Practitioners, Iowa State University, Ames, IA, October 30-31, 1997, pp. 7-14.*
60. Ito T, Suzuki T, Takada A, Horimoto T, Wells K, Kida H, Otsuki K, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Recognition of N glycolylneuraminic acid linked to galactose by the $\alpha 2, 3$ linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks. *J Virol* 2000;74: 9300-9305.
61. Suzuki T, Horiike G, Yamazaki Y, Kawabe K, Masuda H, Miyamoto Kawaoka Y, Suzuki Y. Swine influenza virus strains recognize sialic acid chains containing the molecular species of sialic acid predominantly present in the swine tracheal epithelium. *FEBS Letters* 1997;404:192-196.

62. Sholtisek, C., Burger, H., Kistner, O., Shortridge, K.F. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 1985;147, 287-294.
63. Kida, H., Ito, T, Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K.F., Kawaoka, Y., Webster, R.G. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J. Gen. Virol.* 1994;75, 2183-2188.
64. Catrucci, M.R., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 1993, 503-506.
65. Peiris JSM, Guan Y, Ghose P, Markwell D, Krauss S, Webster RG, Shortridge KF. Co-circulation of avian H9N2 and human H3N2 viruses in pigs in southern China. In *Options for the control of Influenza IV. Excerpta Medica International Congress Series 1219*. A Osterhaus, N Cox, and Hampson, eds. Amsterdam: Excerpta Medica, 2001a; 195-200.
66. Lin YP, Bennett M, Gregory V, Grambas S, Ragazzoli V, Lenihan P, Hay A. Emergence of distinct avian-like influenza A H1N1 viruses in pigs in Ireland and their reassortment with cosirculating H3N2 viruses. In *International Conference on Options for the control of Influenza V*. Y Kawaoka, ed. Amsterdam: Elsevier 2004;1263: 209-213.

67. Webby RJ, Swenson S, Krauss SL, Gerrish PJ, Goyal SM, Webster RG. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol* 2000;74:8243-8251.
68. Haesebrouck, F., Biront, P., Pensaert, M.B., Leunen, J. Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *Am. J. Vet. Res* 1985; 46, 1926-1928.
69. Gorman, O.T., Bean, W. J., Kawaoka, Y., Donatelli, I., Guo, Y.J., Webster, R.G. Evolution of Influenza A virus nucleoprotein genes implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J. Virol* 1991;65, 3704-3714.
70. Ludwig, S., Stitz, L., Planz, O., Van, H., Fitch, W.M., Scholtissek, C. European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? *Virology* 1995;212, 555- 561.
71. Heinen PP, van Nieuwstadt AP, Pol JM, de Boer- Lijtze EA, van Oirschot JT, Bianich AT. Systemic and mucosal isotype specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. *Viral Immunol* 2000;13:237-247.
72. Brown IH, Done SH, Spencer YL, Cooley WA, Harris PA, Alexander DJ. Pathogenicity of a swine influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. *Arch Virol* 1993;142:1045-1050.

73. Lanza, I.;Brown, I.H.; and Paton, D.J. Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. *Res Vet Sci* 1992;53:309-314.
74. Haesbrouck, F. And Peansert, M. Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunized with an inactivated influenza H1N1 vaccine. *Vet Microbiol* 1986;11:239-249.
75. Van Reeth K, Naumawinck H, Peansert M. Broncheoalveolar interferon- α , tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? *J Infect Dis* 1998;177:1076-1079.
76. Maes L, Haesebrouck F, Peansaert M. Experimental reproduction of clinical disease by intratracheal inoculation of fattening pigs with swine influenza virus isolates, *Proc confr int Pig Vet Soc*1984;.60.
77. Clavijo A, Tresnan DB, Jolie R, Zhou EM. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *Can J Vet Res.* 2002;66:117-121.
78. Nayac, D.P.; Twiehaus, M. T.; Kelley, G. W.; and Underdahl, N.R. Immunocytologic and histpatologic development of experimental swine influenza infection in pigs. *Am J Vet Res* 1965;26:1271-1282.
79. Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennick JR, Yewdell JW. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a

predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. J Virol 2003;77:7214-7224.

80. Van Reeth K, Van Gucht S, Peansert M. Correlations between lung proinflammatory cytokine levels, virus replication and disease after swine influenza virus challenge of vaccination- immune pigs. Viral Immunol 2002;15:583-594.

81. Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, Liu L, Yoon K-J, Krauss, Webster RG. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. J Virol 1999; 73:8851-8856.

82. Rossow K. Swine pathology and diagnosis. Proc Allen D Lemay Swine Conf 1999;26:2-4.

83. Madec F, Kaiser C, Jestin A, Gourreau J-M, Vannier P, Kobisch M, Madec F, Aymard M Les syndromes grippaux en porcherie d'élevage : enquête "flash" réalisée en Bretagne. Courte Commun Le Point Veterinaire 1987 ;654-659.

84. Van Reeth K, Pensaert MB. Porcine respiratory coronavirus mediated interference against influenza virus replication and disease after swine influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. Am J Vet Res 1994;55:1275-1281.

85. Houben S, Van Reeth K, Peansert MB. Pattern of infection with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus on swine farms in Belgium. *J Vet Med B* 1995;42:209-215.
86. Van Reeth K, Naumawinck H, Peansert M. Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by swine influenza virus in conventional and colostrum- deprived pigs. *J Vet Med B* 2001c;48:283-292.
87. Easterday, B.C .; Murphy,B.R.; And Mc Gregor, S.Infection and vaccination of pigs with influenza A/New Jersey/8/76(Hsw1N1.) virus. *J Infect Dis* 1977;136(Suppl):699-702.
88. Candotti P., Foni E., Leotti G.,Joisel F., Longo S., Rota Nodari S. : Serological prevalence for swine influenza virus in pigs between 3 and 15 weeks of age in italian farms : evaluation of maternal antibody decay curve. Proc. 4th International Symposium on Emerging and reemerging pig disease, Rome, italy, 2003, pp.272-273.
89. Easterday B.C.Influenza virus infection of the suckling pig. *Acta Vet* 1971;(Suppl)2:33-42.
90. Grobe Beilage E., Schenk L, Suss J., Schreder C.: The influence of maternal antibodies on the frecuency, severity and serology of the infection with influenza A virus. Proc 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy, 1996 p. 130.

91. Jeong K., Park Y.I., Jin W., Han J.H Jeong H.K., Kim H.J Rha J., Moon D.H.: Dual antibody prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus in Korea. Proc. 18th International Pig Veterinary Congress, Hamburg. Germany, 2004, p. 122.
92. Loeffen WL, Heinen PP, Bianchi AT, Hunneman WA, Verhijden 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 Immunopatol* 2003;92:23-35.
93. Wesley D. R. Exposure of sero-positive gilts to swine influenza virus may cause a few stillbirths per litter. *Can J Vet Res* 2003;68:215-217.
94. Van Reeth K, Naumawinck H, Peansert M. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microbiol* 1996;48:325-335.
95. Nakamura, R.M. In Vivo and in Vitro Studies of Swine Influenza: a Hypotesis on the interepizootic Survival of Virus. Ph.D. diss., Univ Wisconsin-Madison 1967.
96. Morin, M.; Girard, C.; Elazhary, Y.; Fajardo, R.; Drolet, R.; and Lagace, A. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. *Can Vet J* 1990;31:12.

97. Born B, Vincent L, Janke B, Paul P. Comparative pathogenicity of atypical and typical swine influenza viruses. Proc Annu Meet Am Assoc Swine Pract, 1998;pp. 63-66.
98. Richt JA, Lager KM, Janke NH, 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; 41:3198-3205.
99. Done, S.H.; Spencer, Y. I.; Brown, I.H.; Higgins, R.; and Hannam, D.A. Natural swine influenza virus (A/swine/Eng/195852/92) infections in pigs in the UK: Morphology, immunocytochemistry and aging of lesions. Proc Int Congr Pig Vet Soc 1994;13:103.
100. Brown, I.H.; Done, S.H.; Spencer, Y.I.; Cooley, W.A.; Harris, P.A.; and Alexander, D.J. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. Vet Rec 1993a;132:598-602.
101. P Kitikoon, D Nilubol, B.J. Erickson, B.H. Janke, T.C. Hoover, S.A. Sornsen, E.L. Thacker. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. Vet Immun Immunopathol 2006;112:117-128.

102. Thacker, E.L, Thacker B.J., Janke, B.H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. J. Clin. Microbiol.2001;39. 2525-2530.
103. Bachman, P.A.Swine influenza virus. In Virus Infections of Porcines. Ed. M. B.Pensaert. Amsterdam: Elsevier Science. 1989;193-207.
104. Urman ,H.K.; Underdahl,N.R.; and Young, G. A.Comparative histopatology o experimental swine influenza and virus pneumonia of pigs in disease-free, antibody-devoid pigs. Am J Vet Res 1958;19:913-917.
105. Jee Hoon Lee, Gramer MR, Han Soo Joo. Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant. Can J Vet 2006;71:207-212.
106. Girard , C.; Morin, M.; and Elazhary , Y.Experimentally induced porcine proliferative and necrotising pneumonia with influenza a virus. Vet Rec 1992;130(10): 206-207.
107. Dea, S.; Bilodeau, R.; Sauvageau, R. ; montpetit, C. ; Martineau, G.P. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizaing pneumonia in pigs. J.Vet Diag Invest 4(4)1992;380-392.
108. Schorr E, and Hinshaw V.S. Use of polymerasa reaction to detect swine influenza virus in specimens. American Journal of Veterinary Res 1994;55; 952-956.

109. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: Recommendations of the advisory committee on immunization

110. Ferrari M, Scalvini A, Losio MN, Corrad A, Socini M, Bignotti E, Milanesi E, Ajmone-Marsan P, Barlati S, Belloti D, Tonelli M. Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. *J Virol Methods* 2003;107:205-212.

111. Govorkova EA, Kaverin NV, Gubareva LV, Meignier B, Webster RG. Replication of influenza A viruses in a green monkey kidney continuous cell line (Vero). *J Infect Dis* 1995;172:250-253.

112. Landolt GA, Karasin AI, Hofer C, Mahaney J, Svaren J, Olsen CW. The use of real-time Taq MANT RT PCR and cell culture methods to detect swine influenza A viruses. *Am J Vet Res* 2005; 66:119-124.

113. Barigazzi G, Bonardi S, Fibu E, Candotti P, Ferrari B, Bedogni I. Use of the direct immunofluorescence technique to diagnose swine influenza: a comparison with virus isolation. *Atti del XIX Mtg Ann soc Ital Patol e Allev d Suini*, 1992;309-318.

114. Onno M, Jestin A, Nannier P, Kaiser C. Diagnosis of swine influenza with an immunofluorescence technique using monoclonal antibodies. *Vet Q* 1990;12:251-254.

115. Long BC, Goldberg TL, Swenson SL, Erickson G, Scherba G. Adaptation and limitations of established hemagglutination inhibition assays for the

detection of porcine anti-swine influenza virus H1N2 antibodies. J Vet Diagn Invest 2004;16:264-270.

116. Runge M, Ganter M, Delbeck F, Hartwick W, Ruffer A, Franz B, Amtsberg G. Demonstration of pneumonia in swine as a constant problem: Culture and immunofluorescence microscopic studies of bronchoalveolar lavage(BAL) and serological findings(in German). Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1996;109:101-107.

117. Haines DM, Waters EH, Clark FG. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin- embedded tissues. Can J Vet Res1993; 57:33-36.

118. Vincent LL, Jankee BH, Paul PS and Halbur PG. A monoclonal antibody based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin fixed paraffin ambedded tissues. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1997; 9: 191-197.

119. Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Larson ME. Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine. Vet Microbiol 1995;43:241-250.

120. Schorr E, Wentworth D. Hinshaw VS. Use of polymerase chain reaction to detect swine influenza virus in nasal swab specimens. AmJ Vet Res 1994,55:952-956.

121. Foni F, Chiapponi C, Fratta E, Gabriano C, Barigazzi G and Merenda M. Detection of swine influenza virus by RT-PCR and standered methods. 4th International symposium on emerging and re- emerging pig diseases. Rome, June 29th – July 2nd , 2003. pp. 5-8.
122. Chiapponi C, Fallacara F and Foni F. Subtyping of H1N1,H2N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. Journal of Virological Methods 2002; 102: 53-59.
123. Choi KY, Goyal SM, Kang SW, Farnham MW and Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H2N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. Journal of virologycal Methods 2002; 102: 53-59.
124. Long BC, Goldberg TL, Swenson SL, Erickson G, Scherba G. Adaptation and limitations of established hamagglutination inhibition assays for the detection of porcine anti-swine influenza virus H1N2 antibodies. J Vet Diagn Invest 2004;16:264-270.
125. Renshaw HW. Influence of antibody-mediated immune suppression on clinical, viral, and immune responses to swine infection. Am J Vet Res 1975;36: 5-13.
126. Madec F and Wadiolve J. Control PCV or control other factors? Several aproachess to a complex problem. Merial symposium, Ames IA, USA, 2002. 45-53.

127. Janke BH. The persistence of H1N1 and H3N2 subtypes in U.S. swine populations. *Focus* 2002; 4: 7-9.
128. Haesebrouck F, Biont P, Peansert MR, Leuven J. Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *Am J Vet Res* 1985;46:1926:1928.
129. Bikour MH, Cornaglia E, Weber JM, Elazhary Y. Comparative study of the immunostimulatory properties of different adjuvants administered with an inactivated influenza virus vaccine and evaluation of passive immunity in pigs. *Immunol Infect Dis* 1994; 4:166-172.
130. De Jong JC, Heinen PP, Loeffin WLA, van Nieuwstadt AP, Claas ECJ, Bebetebroer TM, Bijlsma K, Verweij C, Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF, Foucher RAM and Kimmen TG. Antigenic and molecular heterogeneity in recent swine influenza A(H1N1) virus isolates with possible implications for vaccination policy. *Vaccine* 2001; 19: 4452-4464.
131. Van Reeth K, De Clerq S, Peansert M. The significance of antigenic evolution for vaccine efficacy: Learning from vaccination- challenge studies in pigs. In *Proceedings of the Symposium on emergence and Control of Zoonotic Ortho- and Paramyxovirus Disease*. B Dodet, M Vicari, eds. Paris: John Libbery Eurotex, 2001a;99-106.
132. Rapp-Gabrielson VJ, Gergen LR, Eddy BA, Wasmoen TL, Lechtenberg KF, Hanna M. Efficacy and safety of Maxivac M+, a combination swine

influenza vaccine, killed virus- Mycoplasma hyopneumoniae bacterin. Proc Am Assoc Swine Pract 2000;201-205.

133. Hillbrands H, Kitikoon P, Erickson B, Thacker E. SIV vaccine induced neutralizing and hemagglutination inhibition antibodies. Proceedings of the 35th Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians. Des Moines, IA.2004;63-65

134. Jackson TA, Chandler-Conrey N, Prouty K. Serologic responses to three commercial bivalent swine influenza virus vaccines in juvenile pigs. Proc, 35th Annual Meeting of American Association of Swine Veterinarians, Des Moines, IA,2004; 235-240.

135. H. Kothalawa, M.J.M Toussaint, E Guys. An overview of swine influenza. Vet Microbiol 2000.

136. Larsen DL, Karasin A, Zuckerman F, Olsen CW. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. Vet Microbiol 2000;43:241-250.

137. Heinen PP, de Boer- Lijtze EA, Bianich AT. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtype influenza A virus infection. J gen Virol. 2001a;82:2607-2707.

138. Desrosiers Robert. Persistence of antibodies after natural infection with swine influenza virus and epidemiology of the infection in a herd previously considered influenza-negative. J swine H and Prod, March-april, 2004;78-81.

139. Thaker B. Vaccination strategies for swine influenza virus. Proc AD Lemman Swine Conf,2000; 21-25
140. Madec F., Gourreau J.M, Kaiser C., Le Dantec J., Vannier P., Aymard M, : The persistence of activity of H1N1 (swine) influenza virus in pig breeding units during non-epidemic phases. Com Immunol Microbial Infect Dis 1985, 8, 247-258.
141. Iwona Markowska D, Arunas Stankevicius. Seroprevalence of antibodies against swine influenza virus in pigs of different age. Bull Vet Inst Pulawy 2005;49:3-7,.
142. Loeffen WLA, Nodelik G, Heinen PP, Van Leengoed LAMG, Hunneman WA, Verheijden JHM. Estimating the incidence of influenza-virus in Dutch weaned piglets using blood samples from a cross-sectional study. Vet Micro. 2003; 295- 308.
143. Trujillo ME, Martínez GR, Herradora LM. La piara reproductora. Ed. Mundi prensa,1ª Edición. D.F México. 2002
144. Straw EB, D´allaire S, Mengeling LW, Taylor JD.Diseases of swine. Iowa States Press. 8th Edition. Iowa. 1999; 277-290.
145. Wayne WD. Bioestadística Base para el análisis de las ciencias de la salud.Ed. Limusa.4ªEdicion.D.F México2002.

146. Erikson G, Rapp –Gabrielson V, Jackson T, EEdy B, Gergen L, Bennett K, Velek K. Duration of HI and ELISA antibodies following vaccination against SIV. Proc IPVS Ames, Iowa. 2002;1:180.
147. W.I Kim, W. H. Wu, B Janke, KJYoon. Characterization of the humoral immune response of experimentally infected and vaccinated pigs to swine influenza viral proteins. Arch Virol, Iowa 2006; 151; 23-36.
148. Jee Hoon Lee, Marie René Gramer y Han Soo Joo. Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant. Can J Vet Res 2007;71:207-212.
149. Díaz Fuentes J. C. Determinación de animales seropositivos y del virus de Influenza porcina antes y después de la vacunación en una granja productora de lechones (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México 2008.