



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias

Lugar: Instituto de Virología, CICVyA, INTA

Área: Microbiología

Título: CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA EN CERDOS EN
ARGENTINA

Autor: Méd. Vet. Marina Dibárbara

Director: Dr. Ariel Pereda

Co-Director: Dr. Carlos Perfumo

2016

Este trabajo está dedicado a mis padres, quienes me dieron la posibilidad de estudiar y ser hoy Médica Veterinaria y a Javier, mi compañero de vida.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer especialmente a mis directores los Dres Ariel Pereda y Carlos Perfumo por haber depositado en mí su confianza, por su enseñanza, apoyo, consejos y paciencia. Gracias por haberme guiado en este camino y ayudado a enriquecer mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, quienes me acompañaron y enseñaron muchísimo. En especial a mis amigos Agus y Lucas.

Al Instituto de Virología del CICVyA INTA por haberme permitido llevar a cabo mi trabajo y a todos mis compañeros, en especial al locutorio por haberme soportado en todas mis formas.

Al Dr Daniel Pérez de la Universidad de Maryland, EE.UU, por su apoyo y gran colaboración en la financiación de este trabajo.

A la Dra Amy Vincent del USDA Iowa, EE.UU y la Dra Nicola Lewis de la Universidad de Cambridge, Inglaterra, por su amplia colaboración en la realización de los ensayos de cartografía antigénica.

Al Laboratorio de Virus Respiratorios y Centro Nacional de Influenza “Dr. Carlos G. Malbrán” en particular a la Dra. Elsa Baumeister por su continua colaboración y muy gentil donación de cepas de referencia para los ensayos de cartografía.

Al toda el área de cultivos del CICVyA INTA, muy especialmente a Osvaldo, por haberme ayudado siempre con mi trabajo, a veces no muy planificado.

Al servicio de secuenciación del CICVyA INTA.

Al bioterio del CICVyA, especialmente a Fátima, por su gran colaboración en las extracciones de sangre de cobayo para los ensayos de inhibición de hemoaglutinación.

Al grupo de trabajo de la Cátedra de Patología de la FCV UNLP por su colaboración en los muestreos y estudios histopatológicos.

Al grupo de trabajo de la Cátedra de Patología de la FCV UNR por la remisión de muestras. Muy especialmente al Dr Javier Sarradell, gracias a quien inicié mis estudios en sanidad porcina y formé las bases para mi capacitación.

A la Cátedra de Virología de la FCV UNL por la remisión de muestras.

A todos los veterinarios, asesores y particularmente a los propietarios de granjas por haberme permitido el ingreso a sus establecimientos.

A todas las Agencias de Extensión y Unidades Experimentales de INTA que colaboraron en los muestreos, especialmente al grupo de Sanidad Animal de INTA Marcos Juárez y a María Natalia Aznar del Instituto de Patobiología del CICVyA INTA.

A mis padres por su enorme esfuerzo y continuo apoyo en todas mis decisiones. A mi hermano y amigas de la vida por haberme acompañado y aconsejado durante toda esta etapa.

Finalmente a mi compañero de trabajo y de vida, GRACIAS JAVI, por tu enseñanza, paciencia y dedicación, por haberme acompañado y apoyado en todas mis decisiones. Por estar siempre a mi lado.

Gracias a este trabajo que nos dio la posibilidad de cruzarnos en el camino.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Clasificación y estructura de <i>Influenza A virus</i>	1
1.2. Mecanismos de evolución de <i>Influenza A virus</i>	5
1.3. La Infección por <i>Influenza A virus</i> en cerdos	6
a. Formas de presentación de la infección por <i>Influenza A virus</i> en cerdos	7
b. Transmisión de <i>Influenza A virus</i>	7
c. Signos clínicos	8
d. Lesiones causadas por <i>Influenza A virus</i> en cerdos	8
e. <i>Influenza A virus</i> dentro del complejo respiratorio porcino	9
f. Inmunidad inducida por <i>Influenza A virus</i> en cerdos	10
1. Respuesta inmune humoral	10
2. Respuesta inmune celular	11
1.4. Influenza en cerdos: importancia en la salud pública	11
1.5. Evolución de <i>Influenza A virus</i> en cerdos a nivel mundial	12
a) Influenza en cerdos en Norteamérica	12
b) Influenza en cerdos en Europa	14
c) Influenza en cerdos en Asia	15
d) Influenza en cerdos en Centro y Sudamérica	16
e) Influenza en cerdos en Argentina: antecedentes	18
2. HIPÓTESIS	19
3. OBJETIVOS	19
1. Objetivo general	19
2. Objetivos específicos	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
A. ESTUDIOS TRANSVERSALES CLÍNICOS, SEROLÓGICOS, PATOLÓGICOS Y VIROLÓGICOS EN 9 GRANJAS EN ARGENTINA.	
1. Diseño del estudio	20
2. Muestreo	21
3. Estudios serológicos	22

4. Estudios moleculares.....	23
5. Aislamiento viral.....	24
6. Caracterización molecular.....	24
7. Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.....	25

B. ESTUDIOS CLÍNICOS Y VIROLÓGICOS REALIZADOS ANTE LA PRESENCIA DE CUADROS COMPATIBLES CON INFECCIÓN POR IAV EN CERDOS.

1. Granjas evaluadas.....	25
2. Examen clínico	25
3. Toma de muestras.....	26
4. Estudios virológicos y moleculares.....	26

C. EVALUACIÓN DE LA CIRCULACIÓN DE IAV EN CERDOS EN PEQUEÑOS PRODUCTORES/PRODUCTORES FAMILIARES CON BAJO NIVEL DE TECNIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN.

1. Diseño del estudio.....	26
2. Caracterización de los establecimientos.....	27
3. Toma de muestras.....	28
4. Estudios serológicos.....	28
5. Estudios moleculares.....	28

D. DETECCIÓN DE IAV EN MUESTRAS DE CERDOS REMITIDAS AL CICVyA INTA POR ORGANISMOS PÚBLICOS Y ASESORES VETERINARIOS: PERÍODO 2010 A 2014.

1. Muestras procesadas.....	29
2. Estudios virológicos y moleculares.....	29

E. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS IAV AISLADOS EN CERDOS EN ARGENTINA: PERÍODO 2010 A 2014.

1. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS.....	29
2. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA.....	30
a. Obtención del panel de sueros de referencia.....	31
b. Obtención de los IAV controles.....	32

c. Ensayo de Inhibición de Hemoaglutinación.....	32
d. Análisis y generación de los mapas de cartografía antigénica.....	32
5. RESULTADOS.....	33
A. ESTUDIOS TRANSVERSALES CLÍNICOS, SEROLÓGICOS, PATOLÓGICOS Y VIROLÓGICOS EN 9 GRANJAS EN ARGENTINA.....	33
B. ESTUDIOS CLÍNICOS Y VIROLÓGICOS REALIZADOS ANTE LA PRESENCIA DE CUADROS COMPATIBLES CON INFECCIÓN POR IAV EN CERDOS.....	39
C. EVALUACIÓN DE LA CIRCULACIÓN DE IAV EN CERDOS EN PEQUEÑOS PRODUCTORES/PRODUCTORES FAMILIARES CON BAJO NIVEL DE TECNIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN.....	41
D. DETECCIÓN DE IAV EN MUESTRAS DE CERDOS REMITIDAS AL CICVyA INTA POR ORGANISMOS PÚBLICOS Y ASESORES VETERINARIOS: PERÍODO 2010 A 2014.....	44
E. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS IAV AISLADOS EN CERDOS EN ARGENTINA: PERÍODO 2010 A 2014.....	47
6. DISCUSIÓN.....	67
A. ESTUDIOS TRANSVERSALES CLÍNICOS, SEROLÓGICOS, PATOLÓGICOS Y VIROLÓGICOS EN 9 GRANJAS EN ARGENTINA.....	67
B. ESTUDIOS CLÍNICOS Y VIROLÓGICOS REALIZADOS ANTE LA PRESENCIA DE CUADROS COMPATIBLES CON INFECCIÓN POR IAV EN CERDOS.....	71
C. EVALUACIÓN DE LA CIRCULACIÓN DE IAV EN CERDOS EN PEQUEÑOS PRODUCTORES/PRODUCTORES FAMILIARES CON BAJO NIVEL DE TECNIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN.....	73

D. DETECCIÓN DE IAV EN MUESTRAS DE CERDOS REMITIDAS AL CICVyA INTA POR ORGANISMOS PÚBLICOS Y ASESORES VETERINARIOS: PERÍODO 2010 A 2014	75
E. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS IAV AISLADOS EN CERDOS EN ARGENTINA: PERÍODO 2010 A 2014	77
7. CONCLUSIONES	82
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
9. ANEXOS	103

ABREVIATURAS

IAV: *Influenza A virus*

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

PB2: polimerasa básica 2

PB1: polimerasa básica 1

PA: polimerasa ácida

HA: hemaglutinina

NP: nucleoproteína

NA: neuraminidasa

M: matriz

NS: proteína no estructural

NEP: proteína de exportación nuclear

cH1N1: clásico H1N1

rH1N1: reasortante H1N1

TRIG: genes internos triple reasortante

TRIGpdm: genes internos triple reasortante pandémico 2009

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

rRT-PCR: PCR en tiempo real

pdm09: pandémico 2009

PRRS: Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

MDCK: Madin-Darby canine kidney

IHA: Inhibición de la hemoaglutinación

UHA: unidades hemoaglutinantes

PBS: solución buffer de fosfato

HA: hemoaglutinación

TGM: título geométrico medio

OPS: Organización Panamericana de la Salud

OMS: Organización Mundial de la Salud

OFFLU: red de expertos en influenza animal

GITEP: Grupo de Intercambio Tecnológico de Explotaciones Porcinas

CICVyA: Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

USDA: departamento de Agricultura de EE.UU

TERMINOLOGÍA DE USO EN PRODUCCIÓN PORCINA

Sistemas extensivos / a campo: unidad de producción en donde los animales se crían en espacios abiertos al aire libre, con baja tecnificación y escasa densidad de animales por m².

Sistemas confinados: unidad de producción en donde los cerdos se crían encerrados en galpones, separados en corrales, con alta densidad animal, moderada a alta tecnificación, con temperatura y ventilación usualmente manejadas por el hombre.

Producción en múltiples sitios: sistema de crianza en el cual las distintas etapas productivas (Maternidad – destete –desarrollo y engorde) se encuentran separadas geográfica y ambientalmente, idealmente los operarios e insumos son exclusivos por unidad y la separación es mayor o igual a 3 km. Estos sistemas suelen contar unos estándares de bioseguridad altos.

Producción en sitio único: sistema de crianza en donde todas las etapas productivas se desarrollan en un mismo espacio geográfico. Las etapas productivas se encuentran separadas en galpones, manejadas por los mismos operarios, utilizando los mismos insumos.

Ciclo productivo completo: cría de animales desde su concepción hasta la venta a faena. En Argentina aproximadamente a los 165 días con 115 kg de peso vivo. Incluye las etapas de Gestación, Maternidad, Destete o recría y desarrollo/engorde.

Cría de lechones: cría de animales desde su concepción hasta la venta, con una edad y peso variable, entre los 6 y 18 kg (21 a 60 días). Incluye etapas de Gestación, Maternidad y primera etapa de destete o recría.

Cabañas: sistema productivo habilitado para comercializar material genético, reproductores o semen fresco.

Sistema todo dentro/todo fuera (AIAO “all-in all-out”): sistema de manejo consistente en que las unidades (sección, sala, galpón) se vacían de animales, luego se lavan y desinfectan y se dejan vacías para secarse antes de la repoblación con un nuevo grupo de animales.

Hembras múltiparas: hembras con más de un parto.

Cachorras: hembra reproductora antes de su primer parto.

Categoría destete: animales destetados desde los 21/28 días hasta los 70 días (6/8 kg hasta 25/30 kg aproximadamente)

Categoría desarrollo- terminación: animales desde los 70 días hasta los 165 días (25/30 kg hasta los 115 kg aproximadamente)

Capones: animales de entre 90 y 115 kg, con más de 120 días.

Reposición interna: selección de reproductores a partir de animales púberes de la propia granja.

Reposición externa: compra de reproductores en edad púber a otro establecimiento.

RESÚMEN

La infección por *Influenza A virus* (IAV) es considerada una de las principales causas de enfermedad respiratoria en cerdos. Además, su carácter zoonótico representa un riesgo para la salud pública. En Argentina, si bien existían reportes de presencia de anticuerpos, el primer aislamiento de IAV en cerdos fue en el año 2008, de un subtipo H3N2 completamente humano. Luego, asociado a la pandemia humana del año 2009, se aisló un subtipo H1N1 pandémico (H1N1pdm09) y se reportaron múltiples cuadros clínicos relacionados a este virus. Es por ello que el objetivo general de este trabajo fue caracterizar las cepas de IAV circulantes en cerdos en Argentina y la forma de presentación de dicha infección.

Se realizaron estudios clínicos, patológicos, serológicos y virológicos en nueve granjas intensivas porcinas. Los resultados demostraron una presentación clínico-epidemiológica endémica en 8 granjas en animales de entre 21 y 50 días. Desde el punto de vista anatomopatológico, el diagnóstico más frecuente fue la bronconeumonía supurativa con bronquiolitis necrotizante. Los estudios serológicos evidenciaron dos patrones. En uno de ellos se observó una caída de los anticuerpos calostrales entre los 21 y 49 días y un posterior aumento marcado en el porcentaje de animales seropositivos (20 a 80%), lo cual se asoció con una circulación activa del virus. En cambio, en el otro patrón, observado en dos granjas, se detectó un bajo porcentaje de animales seropositivos en reproductores, menos del 50%, y en la línea de producción, el mayor porcentaje de cerdos positivos fue del 20%, lo cual es sugerente de una infección endémica con baja circulación del virus. Los resultados de los ensayos de Inhibición de la Hemoaglutinación detectaron anticuerpos contra H1pdm09, δ H1 y H3 en todas las granjas y en el 75% de los animales presencia de anticuerpos contra más de un subtipo. Se detectó, mediante rRT-PCR, IAV en 7 granjas, la mayoría entre los 21 y 50 días de vida, y se obtuvieron 5 aislamientos, 4 fueron caracterizados como subtipo H1N1pmd09 y uno como subtipo H3N2.

Se realizaron además, estudios clínicos y virológicos en 12 granjas intensivas que reportaron cuadros compatibles con infección por IAV. La inspección clínica determinó, en 8 granjas, el cuadro clínico endémico y en 4 granjas se observó la forma epidémica. La edad de presentación de los signos clínicos fue variable, siendo los animales de postdestete los más afectados (30 a 40 días). Todas las granjas evaluadas fueron positivas por rRT-PCR y la edad de detección del virus coincidió con la edad de presentación de los signos clínicos. Se obtuvieron un total de 13 aislamientos de IAV, H1N1pdm09 (7), H1N2 δ 2 (3) y H3N2 cluster II (3).

Se evaluó la circulación de IAV en pequeños productores y productores familiares. Se tomaron muestras de 57 establecimientos de distintas regiones del país. Los estudios serológicos detectaron la presencia de anticuerpos contra H1pdm09 en más del 60% de los establecimientos y en el 40% de los animales, mientras que menos del 17% de los establecimientos y del 2% de los animales fueron positivos para el subtipo H3.

Se realizó el diagnóstico y la caracterización de IAV a partir de muestras enviadas al Laboratorio de Aves y Porcinos, CICVyA, INTA. Se recibieron muestras de 51 establecimientos, de 10 provincias y se obtuvieron 27 aislamientos. El 70% de los subtipos aislados fueron caracterizados como H1N1pdm09. También se obtuvieron aislamientos de los subtipos $\delta 2$ H1N2; $\delta 2$ H1N1; $\delta 1$ H1N1 y H3N2.

El análisis filogenético del total de los aislamientos (N=45), mostró un predominio en la circulación del subtipo H1N1pdm09. Solamente 5 aislamientos se caracterizaron como subtipo H3N2 cluster II, 8 aislamientos como $\delta 2$ H1N2, un único aislamiento como subtipo $\delta 2$ H1N1 y el restante como subtipo $\delta 1$ H1N2. Todos ellos poseen gen M pandémico y genes externos de IAV humanos estacionales. Se identificaron 9 introducciones de IAV de humanos a cerdos, 7 relacionadas con la pandemia H1N1 del año 2009 y 2 con IAV humanos estacionales H3 y H1, circulantes más de una década atrás.

Los estudios de cartografía antigénica demostraron que, a pesar de la similitud a nivel genético en los virus detectados en el país, las diferencias antigénicas son marcadas.

La infección por IAV se encuentra ampliamente diseminada en cerdos de nuestro país. En la mayoría de las granjas evaluadas se observó la presentación endémica (subclínica). Estos resultados alertan sobre la posible generación de virus reasortantes y la presencia de un porcentaje variable de animales sin anticuerpos contra IAV que permitirían la persistencia de la infección.

La totalidad de los subtipos de IAV circulantes en cerdos en Argentina corresponde a introducciones de virus de origen humano, en algunos casos relacionados con cepas circulantes más de una década atrás. Esto resalta la importancia del hombre en la epidemiología de IAV en cerdos en nuestro país y supone un riesgo para la población humana por la posibilidad de reintroducciones.

La información generada en este estudio muestra que los subtipos circulantes en el país no se corresponden con los reportados en Norteamérica y Eurasia. Este hecho, sumado a la alta variación antigénica observada y a la rápida evolución de IAV, alerta sobre la necesidad de desarrollo de inmunógenos locales y ensayos diagnósticos que permitan el correcto control de IAV en las explotaciones porcinas de nuestro país.

SUMMARY

Infection with *Influenza A virus* (IAV) is considered the major cause of respiratory disease in pigs. Moreover, is a zoonotic disease posing a risk to Public Health. In Argentina, although there were specific serological reports, the first isolation of IAV in pigs was a fully human H3N2 subtype in 2008. Then, an H1N1pdm09 subtype, associated with a human pandemic, was isolated and multiple clinical cases in pigs were reported. For these reasons the general objective of this study was to characterize the strains of IAV circulating in pigs in Argentina and the forms of presentation of the infection.

Clinical, pathological, serological and virological studies in nine intensive pig farms were performed. The results demonstrated a clinical-epidemiological enzootic presentation in 8 animal farms between 21 and 50 days. From the pathological point of view, the most frequent lung injury was suppurative bronchopneumonia with necrotizing bronchiolitis. Serological studies showed two patterns. In one of them a decrease in colostral antibodies between 21 and 49 days and a subsequent marked increase in the percentage of positive animals (20-80%) was observed. This pattern was associated with an active virus circulation. In contrast, the other pattern showed a low percentage of positive animals in breeding, less than 50%. In this case the highest percentage of positive pigs in the production line was 20%, which is suggestive of endemic infection with low circulation of IAV. The hemagglutination inhibition test detected H1pdm09, δ H1 and H3 antibodies on all farms. Moreover, the 75% of the animals had antibodies against more than one subtype. It was detected IAV by rRT-PCR in 7 farms, most between 21 and 50 days old, and 5 isolates were obtained. Four of the isolates were characterized as H1N1pmd09 subtype and one as H3N2 subtype.

Clinical and virological studies were also conducted in 12 intensive farms who reported the presence of clinical cases of IAV infection. Clinical inspection determined in 8 farms the clinical-epidemiological enzootic presentation and in 4 farms the epizootic form was observed. The age of presentation of clinical signs was variable being weaning animals the most affected ones (30-40 days). All farms were positive by rRT-PCR and virus detection age coincided with the age of presentation of clinical signs. A total of 13 isolates of IAV were obtained: H1N1pdm09 (7), H1N2 δ 2 (3) and H3N2 cluster II (3).

Influenza virus circulation was evaluated in small producers and family farmers. A total of 57 farms samples from different regions of the country were taken. Serological studies detected the presence of antibodies against H1pdm09 by more than 60% of farms and 40% of animals, whereas less than 17% of farms and 2% of the animals were positive for H3 subtype.

The detection and characterization of IAV from samples sent to the Avian and Swine Laboratory, CICVyA, INTA was performed. Samples of 51 establishments were received from 10 provinces and 27 isolates were obtained. The 70% of the isolates were characterized as H1N1pdm09. In addition, isolates of $\delta 2$ H1N2; $\delta 2$ H1N1; $\delta 1$ H1N1 and H3N2 were obtained.

Phylogenetic analysis of all the isolates (N = 45) showed a predominance in the circulation of H1N1pdm09 subtype. Only five isolates were characterized as H3N2 cluster II subtype, 8 as $\delta 2$ H1N2 subtype, one as $\delta 2$ H1N1 subtype and the remaining one as $\delta 1$ H1N2 subtype. All of them have pandemic M gene and external genes from human seasonal IAV. Nine IAV introductions from human to pigs were detected. Seven of them were related with the H1N1pdm09 and two with human seasonal H1 and H3 that were circulating more than a decade ago.

Antigenic mapping studies showed that, despite the similarity at the genetic level in the virus detected in the country, the antigenic differences are marked.

IAV infection is widespread in pigs of our country. In most farms evaluated the enzootic presentation (subclinical) was observed. These results warn about the possible generation of reassortants virus and the presence of a variable percentage of pigs without antibodies against IAV that would allow persistent infection.

All subtypes of IAV circulating in pigs in Argentina correspond to introductions of viruses of human origin, in some cases related to circulating strains over a decade ago. This highlights the importance of humans in epidemiology of IAV in pigs in our country and poses a risk to the human population because of the possibility of reintroductions.

The information generated in this study shows that circulating subtypes in the country do not correspond to those reported in North America and Eurasia. This fact, coupled with the high antigenic variation observed and the rapid evolution of IAV, warn the need to develop local immunogens and diagnostic tests that allow proper control of IAV in pig farms in our country.

1. INTRODUCCIÓN

Influenza A virus (IAV) es un importante patógeno responsable de grandes pérdidas económicas en la industria porcina mundial y al mismo tiempo representa una constante amenaza a la salud pública, la cual quedó resaltada con la pandemia producida por un nuevo subtipo viral H1N1 en el año 2009. En cerdos, son una de las mayores causas de enfermedad respiratoria, cuyas presentaciones clínicas de infección pueden estar asociadas a cuadros de hasta un 100% de morbilidad. En Argentina, se conoce la circulación de IAV en la producción porcina desde el año 2003 (Teodoroff y col., 2003), aislándose por primera vez en 2008 un subtipo H3N2 completamente humano en cerdos (Cappuccio y col., 2011).

1.1. Clasificación y estructura de *Influenza A virus*

Influenza A virus pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, la cual se clasifica en 6 géneros: *Influenzavirus* A, B, C, D, *Thogovirus* e *Isavirus* (Palese y col., 2007; Szewczyk y col., 2014) de los cuales solamente el género *Influenzavirus* tipo A es zoonótico. Los géneros *Influenzavirus* tipo B y C son patógenos principalmente del humano. El género *Influenzavirus* B se describió en bovinos y el género *Influenzavirus* tipo C ocasionalmente infecta a cerdos y perros (Ohwada y col., 1987). El género *Influenzavirus* tipo D fue recientemente descrito en cerdos y ganado vacuno (Szewczyk y col., 2014). Los IAV son altamente variables, miden entre 80 y 120 nm, son virus envueltos, de genoma ARN, segmentado, cadena simple y polaridad negativa. El genoma del virus posee ocho segmentos de ARN, que varían en longitud entre 890 y 2341 nucleótidos: segmento 1: PB2, segmento 2: PB1, segmento 3: PA, segmento 4: HA, segmento 5: NP, segmento 6: NA, segmento 7: M y segmento 8: NS. Estos 8 segmentos codifican entre 16 y 17 proteínas según la cepa (Vasin y col., 2014).

- **Proteínas externas: HA, NA**

Hemaglutinina (HA)

La HA, además de ser la única proteína capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, es la proteína más abundante, representando el 80% del total de la partícula vírica (Samji, 2009). Es una proteína integral de membrana, de naturaleza glicoproteica (N-ligando) que se proyecta como trímeros desde la envoltura viral

(Olsen, 2002). La HA se procesa por medio de procesos post traduccionales tales como el clivaje proteolítico, glicosilación y acetilación de ácidos grasos (Webster y col., 1992). El precursor proteico de la HA es un homotrímero no covalente denominado H04A0 que luego es escindido por proteasas celulares en dos partes: HA1 (327 aminoácidos) y HA2 (222 aminoácidos). La cabeza globular de la glicoproteína HA está formada enteramente por la porción HA1 (incluyendo el dominio de unión al receptor y el dominio estearasa), mientras que el tallo lo conforman ambas porciones, HA1 y HA2 (Wiley y col., 1987). Esta HA clivada, luego de sufrir cambios en su estructura, interactúa con las membranas de los endosomas y permite así el ingreso a la célula del hospedador. La HA es responsable de la unión de la envoltura del virus a la membrana lipídica de la célula hospedadora, y por lo tanto determina el grado de virulencia y la especificidad de hospedador. La unión de cada uno de los subtipos virales al huésped dependerá del tipo de receptor que predomine en los tejidos del hospedador donde normalmente replique. Los IAV, adaptados tanto a humanos como a cerdos, tienden a unirse, preferentemente, a receptores de ácido siálico N-acetilneuramínico tipo $\alpha 2,6$ presentes en la célula hospedadora (Skehel y col., 2000; Matrosovich y col., 2009; Trebbien y col., 2011), a diferencia de los virus aviares, los cuales poseen preferencia por receptores tipo $\alpha 2,3$. Cabe destacar que no se trata de una especificidad absoluta, sino que la unión de virus a receptores distintos al de su preferencia podría darse ante infecciones con altos títulos del virus o ante pequeñas mutaciones puntuales en el gen HA (Szewczyk y col., 2014). El cerdo posee ambos tipos de receptores de ácido siálico ($\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$) en su tracto respiratorio superior, lo cual le permite ser infectado tanto por IAV de origen aviar, humano o de cerdo, actuando así como un gran "vaso mezclador" (Ito, 2000; Scholtissek y col., 1985).

Neuraminidasa (NA)

Es una glicoproteína inserta en la membrana lipídica a través de espículas, siendo el segundo antígeno de superficie más abundante del virión. Su principal función es remover la unión entre la HA del virus y el ácido siálico de la célula hospedadora para permitir así la liberación eficiente de los nuevos viriones de la célula infectada y su diseminación (Samji, 2009; Ma y col., 2010). Además, su actividad enzimática favorece la degradación del mucus presente en el tracto respiratorio lo que facilita su llegada a las células (Matrosovich y col., 2004).

- **Proteínas internas**

Tienen roles estructurales, interfieren en la respuesta antiviral de la célula hospedadora, participan en la replicación del genoma viral y están relacionadas con la virulencia (Samji, 2009; Ma y col., 2010; Chakrabarti y col., 2013; Lee y col., 2009).

Proteína de matriz M1: es la proteína más abundante del virión y su principal rol es estructural, encontrándose debajo de la envoltura lipídica. Se encuentra presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células infectadas. Juega un rol importante en el inicio del ensamblaje de la progenie del virus y en la infección (Ali y col., 2000).

Proteína de matriz M2: funciona como canal iónico, favoreciendo la acidificación del interior de la partícula viral luego de su ingreso a la célula hospedadora y permitiendo así que se lleve a cabo la etapa de desnudamiento del virus (Ma y col., 2010). También participa en el ensamblaje del virión (Rossman y Lamb, 2011). Está presente en forma de tetrámero en grandes cantidades en la superficie de las células infectadas y en escasa cantidad en el virión (Webster y col., 1992).

Proteína de matriz M42: complementa y podría reemplazar a la proteína M2 en virus carentes de la misma. Su expresión bajo condiciones normales se restringe a la minoría de los IAV (cerca del 0,2%) (Vasin y col., 2014).

Nucleoproteína NP: es la segunda proteína más abundante del virión sintetizada por las células infectadas y es el mayor sitio antigénico para la respuesta T-citotóxica (Webster y col., 1992). Es fosforilada por la célula huésped, y se especula que este patrón de fosforilación podría estar relacionado con la restricción viral del hospedador. Forma parte del complejo ribonucleoproteico junto al ARN viral (Samji, 2009; Lee y col., 2009), asociado a las polimerasas básicas PB1 y PB2 y a la polimerasa ácida PA (Chakrabarti y col., 2013). Cumple un importante rol en el transporte de los complejos ARN del citoplasma al núcleo celular (Cros y Palese, 2003).

Polimerasa básica PB1: se localiza en el núcleo de las células infectadas y participa en la síntesis del ARN viral al ser la responsable de la elongación del ARNm (Webster y col., 1992). Participa tanto en la replicación como en la transcripción. Una proteína adicional PB1-F2, está encargada tanto de la modulación del sistema inmune como del incremento en la patogenicidad en ciertas combinaciones entre el virus y determinados tipos de huéspedes (Pena y col., 2012). Se asocia con efectos pro-apoptóticos y pro-

inflamatorios (Zamarin y col., 2005). Se encuentra presente en muchos, pero no en todos los IAV (Krumbholz y col., 2010). Una tercer proteína codificada por el segmento PB1 es la PB1-N40, la cual fue detectada en una gran variedad de IAV incluyendo cepas humanas, equinas y aviares (Wise y col., 2009). Esta proteína afecta la eficiencia de replicación de los IAV manteniendo el balance en la expresión de las proteínas PB1 y PB1-F2 (Vasin y col., 2014).

Polimerasa básica PB2: provee de actividad ARN polimerasa dependiente de ARN. Reconoce y se une a la estructura CAP 5' de la célula hospedadora y así da lugar al inicio de la transcripción del ARNm (Webster y col., 1992). La PB2 sintetizada migra hacia el núcleo de las células infectadas.

Polimerasa ácida PA: también se encuentra localizada en el núcleo de las células infectadas. Forma parte del complejo ARN polimerasa dependiente de ARN viral, junto con la PB1 y PB2. Provee actividad endonucleasa de ARN e interactúa con PB1 modulando la respuesta inmune del hospedador y la virulencia del virus (Días y col., 2009). Una segunda proteína, también codificada por el segmento 3, se denomina PA-X. La misma está asociada con la modulación de la respuesta a la infección viral por parte del hospedador (Jagger y col., 2012). Dos proteínas adicionales han sido descritas recientemente, relacionadas con el segmento PA: PA-N182 y PA-N155, con potenciales roles en el ciclo de replicación viral, pero aún no han sido determinadas (Vasin y col., 2014).

Proteína no estructural NS1: la proteína NS1, a pesar de ser la más abundante en células infectadas durante el ciclo replicativo del virus, no se incorpora a la progenie (Palese y col., 1999). Es una proteína multifuncional relacionada con numerosos mecanismos de interacción entre el virus y el huésped, como ser: escape de los mecanismos antivirales de la célula hospedadora, regulación de la expresión de genes tanto del virus como de las células huésped (Egorov y col., 1998; Romanova y col., 2009).

Proteína no estructural NS2: también llamada proteína de exportación nuclear (NEP), forma parte del virión (Richardson y col., 1991). Media el transporte del complejo viral ribonucleoproteico del núcleo al citoplasma e interactúa con el complejo de poro nuclear (Paterson and Fodor, 2012).

Proteína no estructural NS3: es producida por algunas cepas de IAV y estaría relacionada con la adaptación del virus al ratón, pero aún no ha sido provado (Vasin y col., 2014).

Los subtipos de IAV se definen por la naturaleza antigénica de las HA y NA. Hasta el momento se han identificado 16 antígenos de HA (HA 1 a 16) y 9 antígenos de NA (1 a 9) (Fouchier y col., 2009; Tong y col., 2012) circulantes en aves y dos antígenos HA y NA circulantes en murciélagos (Webby y col., 2007; Freidl y col., 2015). La combinación de ambos antígenos determina el subtipo viral, como por ejemplo: H1N1. A pesar de que algunos de estos subtipos no son patógenos para su hospedador natural, muchos son altamente virulentos tanto para sus hospedadores naturales como para otras especies susceptibles (Webby y col., 2007).

En relación a la nomenclatura de los IAV, la Organización Mundial de la Salud publicó en 1980 una convención de nomenclatura aceptada internacionalmente para los virus de influenza (OMS, 1980). El enfoque utiliza los siguientes componentes:

- el tipo antigénico (por ejemplo: A, B, C)
- el huésped de origen (por ejemplo: porcino, equino, pollo, etc.). No se da un huésped de origen para los virus de origen humano.
- origen geográfico (por ejemplo: Argentina, Taiwán, etc.)
- número de cepa (por ejemplo: 15, 7, etc.)
- año de aislamiento (por ejemplo: 57, 2009, etc.)
- para los virus de influenza A, la descripción, entre paréntesis, de los antígenos hemaglutinina y neuraminidasa (por ejemplo: (H1N1), (H5N1))

Ejemplos de nomenclatura: A/swine/Alberta/35/76 (H1N1) para un virus originado en cerdos, A/Argentina/16/2009 (H3N2) para un virus de origen humano.

1.2. Mecanismos de evolución de *Influenza A virus*

Los IAV poseen una amplia diversidad debido principalmente a dos mecanismos: “*shift* antigénico” y “*drift* antigénico”, mediante los cuales evade al sistema inmune. El “*shift* antigénico” es posible debido a la naturaleza segmentada de IAV que le permite llevar a cabo un mecanismo de reasociación genética o “reassortment”. El mismo permite el intercambio de segmentos genéticos de dos o más IAV que coinfectan una misma célula de un mismo individuo, dando como resultado la expresión de proteínas que darán lugar a un nuevo subtipo viral (subtipo reassortante). Este mecanismo es el que más alerta sobre el riesgo de ocurrencia de una pandemia en la población humana, ya

que este nuevo IAV podría poseer hemagglutininas capaces de unirse a receptores humanos, en una población carente de inmunidad para el mismo. Asimismo, el cerdo es susceptible a ser infectado tanto por subtipos de IAV aviares como humanos, al poseer receptores para ambos subtipos, permitiendo la generación de dobles (aviar/humano) y triples (aviar/humano/cerdos) subtipos reasortantes, los cuales son capaces de evadir la respuesta inmune preexistente (Ito, 2000; Scholtissek y col., 1985).

Por otro lado, los IAV evolucionan de forma más gradual mediante un mecanismo denominado “*drift* antigénico”, mediante el cual los genes HA y NA acumulan mutaciones puntuales a lo largo del tiempo. Esto es consecuencia de la alta tasa de replicación de los IAV y de la pobre capacidad de corrección de errores que posee la ARN polimerasa (Liu y col., 2009). Como consecuencia se generan progenies virales con genoma mutado que, si las condiciones ambientales les son favorables para su supervivencia, se convertirán en la nueva población viral predominante. Estas nuevas variantes van acumulando mutaciones suficientemente significativas como para generar cambios en las propiedades antigénicas del virus. De esta forma, logran escapar a la neutralización por los anticuerpos inducidos por otros subtipos de IAV o por las vacunas y lograr así reinfectar o persistir en una población (McDonald y col., 2007). Este mecanismo le permite al virus evadir la respuesta inmune preexistente, aunque de manera más lenta que con el “*shift* antigénico”. Las proteínas internas de IAV también acumulan mutaciones pero en menor proporción a las proteínas externas. Sin embargo, estos cambios también contribuyen a la readaptación del virus a la especie hospedadora (Matrosovich y col., 2009). Un buen ejemplo es la combinación de genes internos norteamericanos “TRIG” (Genes Internos Triple Reasortantes).

Un aspecto epidemiológico importante a considerar de los IAV es el salto de especie, el cual ocurre en hospedadores como el cerdo o el humano, los cuales pueden ser infectados por un subtipo de IAV que se transmite íntegro desde otra especie hospedadora, como por ejemplo, las aves y logra replicarse eficientemente en el nuevo hospedador (Zhu y col., 2013; Brown, 2013).

1.3. La infección por *Influenza A virus* en cerdos

Influenza fue identificada clínicamente como una enfermedad respiratoria en cerdos en el año 1918 (Brown, 2000), asociada a la pandemia de influenza humana conocida como “gripe española” (Myers y col., 2007). Sin embargo, IAV fue aislado por primera vez en cerdos e identificado como subtipo H1N1, recién en el año 1930 (Shope y col., 1931). Los subtipos mayoritariamente circulantes actualmente en cerdos a nivel

mundial son tres: H1N1, H1N2 y H3N2, los cuales son el resultado de una compleja interacción y evolución entre virus de origen humano, aviar y porcino (Van Reeth y col., 2012).

1.3. a: Formas de presentación de la infección por *Influenza A virus* en cerdos

La infección causada por IAV en el cerdo puede presentarse de tres formas diferentes dependiendo de diferentes factores propios del virus, de los animales, del ambiente y del sistema de producción:

- **Epidémica:** se presenta con casos de enfermedad clínica, generalmente limitada a cerdos completamente susceptibles, seronegativos, con una morbilidad mayor al 35% y una baja mortalidad (Loeffen y col, 1999).
- **Endémica:** se presenta con una morbilidad que oscila entre 25 y 35% y con signos clínicos menos marcados (Olsen, 2006a).
- **Subclínica:** en poblaciones de cerdos con circulación endémica del virus, contribuye a la producción de cuadros respiratorios de etiología multifactorial dentro del “complejo respiratorio porcino” (Brown 2002; Olsen, 2002; Olsen, 2006a).

1.3. b: Transmisión de *Influenza A virus*

La principal ruta de transmisión de IAV en cerdos es la transmisión directa a través del contacto cerdo-cerdo vía aérea, con títulos de excreción viral que alcanzan, en el pico de la infección, las 1×10^7 partículas infecciosas por ml (Landolt y col., 2003; Larsen y col. 2000). Esta vía permite la diseminación de IAV dentro de áreas densamente pobladas de cerdos y dificulta su control sobre todo en granjas con altos estándares de bioseguridad y sistemas todo dentro-todo fuera (Van Reeth y col., 2012). Tanto los animales enfermos como los infectados en forma subclínica juegan un importante rol en la transmisión de IAV dentro y entre granjas, por lo cual se resalta la importancia del control en los movimientos de animales y en las prácticas para minimizar la transmisión de este agente (Torremorell y col., 2012).

La forma indirecta también es una vía de transmisión importante, sobre todo en establecimientos a campo, donde las aguas contaminadas con heces de aves han estado implicadas en importantes brotes en cerdos de IAV de origen aviar (Karasin y col., 2000; Karasin y col 2004). Los fómites contaminados, como pueden ser la vestimenta, botas, alimento, o el personal de la granja, también son una fuente de

transmisión, por lo cual se considera de suma importancia tomar medidas de bioseguridad para evitar la transmisión dentro o entre granjas (Allerson y col., 2013). Se han realizado numerosos estudios para evaluar el comportamiento estacional de IAV dentro de la producción porcina en asociación con las bajas temperaturas de invierno, sin embargo, el uso de los sistemas de producción en confinamiento, ha dejado atrás el concepto de “estacionalidad” de IAV en cerdos (Van Reeth y col., 2012).

1.3. c: Signos clínicos

La infección por IAV en cerdos da lugar a un cuadro caracterizado por anorexia, inactividad, fiebre alta (40,5° a 41,5°C), disnea/respiración abdominal, tos, estornudos, descarga nasal no purulenta. Presenta un corto periodo de incubación de 3 a 5 días y un rápido comienzo en la manifestación del síndrome, y también una pronta recuperación, generalmente a los 5-7 días del comienzo del cuadro (Webster y col., 2002; McQueen y col., 1968; Richt y col., 2003). En las presentaciones epidémicas, la morbilidad puede alcanzar el 100%, sin embargo la mortalidad no suele exceder el 1%, en los casos no complicados. En aquellas infecciones por IAV acompañadas de infecciones bacterianas concomitantes, puede llevar a una enfermedad respiratoria multifactorial, con altas tasas de mortalidad.

Se ha reportado una reducción en la performance reproductiva luego de un brote de IAV, la misma se asocia al cuadro febril que sufre la hembra, llevando al incremento en los porcentajes de infertilidad, presencia de abortos, nacidos débiles y retornos al celo, entre otros (Olsen y col., 2006a).

1.3. d: Lesiones causadas por *Influenza A virus* en cerdos

Las lesiones macroscópicas que se observan en las infecciones por IAV sin complicaciones, son las propias de una neumonía viral. La misma se manifiesta como una bronconeumonía exudativa, con áreas de consolidación multifocal en las partes craneoventrales del pulmón, con múltiples focos de atelectasia lobulillar bien delimitadas del tejido pulmonar sano, de color púrpura, consistencia firme y aspecto deprimido a la palpación. La alternancia de estos lobulillos con los de apariencia normal es lo que le da el aspecto de “tablero de ajedrez”. Se observa hiperemia y edema de la mucosa traqueobronquial, con abundante exudado catarral a mucopurulento en las vías aéreas. Puede acompañarse de edema de tabiques interlobulares y aumento de tamaño y edema de linfonódulos bronquiales y

mediastinales. A medida que la infección progresa, el tejido lesionado se observa deprimido y mucho más firme a la palpación, de color púrpura más intenso y con posible presencia de fisuras, como consecuencia de los mecanismos de reparación del pulmón (Van Reeth y col., 2012).

Microscópicamente, se observa necrosis y posterior descamación de las células epiteliales donde el virus se replica: mucosa nasal, tonsilas, tráquea y pulmones, considerando al epitelio bronquial, bronquiolar y alveolar como los lugares de infección masiva de IAV. Esta necrosis se acompaña de infiltración linfocitaria peribronquiolar y neumonía intersticial de severidad variable. El exudado inflamatorio, consistente en detritus provenientes del desprendimiento celular, edema y neutrófilos, provoca la obstrucción de las vías aéreas y el consiguiente daño del parénquima pulmonar por la liberación de enzimas y mediadores inflamatorios. Las lesiones tardías incluyen hiperplasia por regeneración de las células epiteliales de las vías aéreas y agregados perivasculares y peribronquiales de linfocitos y células plasmáticas, como resultado de la respuesta inmune (Azoulay-Dupuis y col., 1984).

1.3.e: Influenza A virus dentro del complejo respiratorio porcino

Influenza A virus forma parte del “complejo respiratorio porcino”, un complejo multifactorial que provoca una enfermedad respiratoria severa resultante de la infección conjunta de dos o más agentes. Dentro de los virus respiratorios que forman parte del complejo se encuentran el virus de la enfermedad de Aujeszky, coronavirus respiratorio porcino, circovirus porcino tipo 2 y virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, exótico en la Argentina). Dentro de los patógenos bacterianos, los más importantes son *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*.

Dentro del complejo respiratorio, IAV actúa como predisponente a infecciones bacterianas secundarias a través de muchos mecanismos. Por un lado, altera la composición de la barrera de epitelio respiratorio, produciendo una descamación de las células ciliadas de la tráquea y disrupción del epitelio de la misma (Avadhanula y col., 2006). Además favorece la colonización bacteriana al aumentar el número de receptores de bacterias en el hospedador (Peltola y col., 2004; McCullers y col., 2006) y al producir la alteración de los péptidos antibacterianos (Didierlaurent y col., 2008). A nivel inmunológico, IAV produce una desensibilización de los receptores de linfocitos T (TLR), con la consecuente disminución de los neutrófilos circulantes y el aumento en la carga bacteriana, junto a la reducción en la producción de citoquinas y de los

mecanismos antibacterianos dependientes de TLR (Zhou y col., 1999). Como resultado de la interacción de estos mecanismos, la infección por IAV se observa, en la mayoría de los casos, en forma de neumonías complicadas. Macroscópicamente podrán observarse desde bronconeumonías supurativas o neumonías lobulillares hasta bullas enfisematosas con abscesos o pleuritis asociada, lo cual tiende a enmascarar la neumonía propia producida por IAV.

1.3. f: Inmunidad inducida por *Influenza A virus* en cerdos

1.3. f1: Respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral es principalmente contra las proteínas HA, NA, M y NP (Wright y col., 2007). Sin embargo, los únicos anticuerpos que pueden bloquear la unión del virus a la célula hospedadora y por lo tanto neutralizar la infección viral son los anticuerpos generados contra la cabeza globular de la HA (Matthew y col., 2015). Los mismos pueden encontrarse en el tracto respiratorio del cerdo entre 4-5 días post infección y en suero aproximadamente a los 7 días post infección alcanzando su pico a las 2 semanas (Larsen y col., 2000; Lee y col., 1995; Pomorska-Mol y col., 2012). La inmunidad protectora, mediada por anticuerpos neutralizantes, puede predecirse a través de las técnicas de neutralización viral o inhibición de la hemoaglutinación (IHA). Estas técnicas miden la cantidad de anticuerpos neutralizantes contra IAV mediante la observación y cuantificación de procesos de aglutinación de glóbulos rojos (Vincent y col., 2008). Los títulos de estos anticuerpos en suero caen gradualmente a las 8-10 semanas post inoculación (Van Reeth y col., 2004), sin embargo, la inmunidad adquirida persiste toda la vida productiva del cerdo (160-200 días). La producción de anticuerpos contra HA está relacionada con la dosis infectiva del virus (Waffarn y col., 2011). La inmunidad generada contra HA proporciona una sólida protección homóloga contra la reinfección con el mismo virus o cepa similar y protección heteróloga variable contra subtipos diferentes, la cual dependerá del grado de similitud antigénica de las proteínas HA de estos virus y de cómo se unan sus epitopes (Larsen y col., 2000; Van Reeth y col., 2004). No hay protección serológica cruzada entre IAV subtipo H1 y H3, al menos mediante la técnica de IHA y en algunos casos tampoco hay protección cruzada entre distintos linajes dentro de los subtipos H1 y H3 (Van Reeth y col., 2004). Los anticuerpos contra NA contribuyen a reducir la eliminación del virus y/o la severidad de la enfermedad (Nelli y col., 2010; Van Poucke y col., 2010; Ito y col., 1998). A pesar de tener una menor tasa de mutación que la proteína HA, los cambios en la NA pueden reducir la protección de los anticuerpos preexistentes (Kreijtz y col.,

2011). La respuesta inmune contra las proteínas NP y M es principalmente mediada por anticuerpos (Van Reeth y col., 2004).

Los lechones recién nacidos no poseen inmunidad contra IAV dado que los anticuerpos no cruzan la barrera transplacentaria. Los anticuerpos IgM, IgA y IgG son transferidos a través del calostro de la madre durante las primeras 36 horas de vida, mientras que los anticuerpos IgA de mucosa se transfieren más tiempo por leche, hasta el destete (Holtkamp y col., 2007; Salmon y col., 2009). Esta inmunidad adquirida protege a los lechones recién nacidos de infecciones por IAV, pero por otro lado interfiere en el desarrollo de inmunidad activa post infección y/o post vacunación (Salmón y col., 2009).

1.3. f2: Respuesta inmune celular

La inmunidad mediada por células se desarrolla principalmente por los linfocitos T citotóxicos, los cuales cumplen un rol muy importante en la eliminación de IAV de las células infectadas (Braciale y col., 2012). Esta respuesta celular está dirigida principalmente a las proteínas internas, más conservadas de IAV, principalmente a la NP (Braciale y col., 2012; Hillaire y col., 2013). Las células T activadas se han reportado en cerdos a partir de los 5-7 días post infección (Pomorska-Mol y col., 2012).

1.4: Influenza en cerdos: importancia en la salud pública

En 1974 se aisló por primera vez en humanos *Influenza A virus* de origen porcino y desde entonces el IAV de origen porcino pasó a ser considerado un potencial agente zoonótico (Myers y col., 2007; Smith y col., 1976). En 1976 se demostró por primera vez la transmisión de IAV del cerdo al humano (Easterday, 1980). La mayoría de las infecciones por IAV de origen porcino son clínicamente indistinguibles de las producidas por IAV humano. Han sido esporádicos los reportes de infecciones en humanos con subtipos de origen porcino H1N1, H1N2 y H3N2 (Acha y col., 2003; Brown, 2000). Considerando la gran cantidad de personas en contacto con cerdos en el mundo, el número de transmisiones cerdo-humano que han sido documentadas a nivel mundial es muy pequeño. Se han realizado numerosos estudios serológicos para detección de anticuerpos de IAV de origen porcino en humanos, los cuales sugieren una amplia distribución del mismo a nivel mundial. Históricamente, a excepción del brote de IAV de origen porcino en New Jersey en 1976, donde cerca de 500 humanos se infectaron con un IAV H1N1 idéntico al aislado de cerdos en ese momento, es limitada la evidencia de transmisión de persona a persona de linajes de IAV de origen

porcino, siendo la pandemia H1N1 de 2009 (H1N1pdm09) la más reciente e importante a nivel mundial (Myers y col., 2007; Top y col., 1977). Se ha reportado un subtipo reasociado H3N2 con H1N1pdm09 aislado en 12 personas en EE.UU, sin embargo la transmisión persona-persona fue limitada (Nelson y col, 2012). Se ha observado que las personas que trabajan con cerdos, ya sea dentro de los establecimientos porcinos, de los frigoríficos y los veterinarios, tienen una mayor exposición y por lo tanto un riesgo mayor de contraer el virus (Myers y col., 2006).

La principal amenaza para la salud pública está relacionada con el cerdo y su capacidad de generar subtipos reasociados de IAV con potencial pandémico. Como se expresa en el apartado 1.1, la tráquea del cerdo posee receptores de ácido siálico $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, los cuales le permiten ser infectado tanto por IAV de origen aviar como humano, convirtiéndose así en un hospedador intermediario para la generación de subtipos de IAV reasociados aviares/humanos con potencial pandémico. Por otro lado, los IAV de origen aviar pueden adquirir en el cerdo la habilidad de unirse a los receptores $\alpha 2,6$ del humano, al modificar sus receptores de superficie $\alpha 2,3$, lo cual favorece el salto de especie de los IAV aviares al ser humano (Ito y col., 1998). Sin embargo, este salto de especie no depende solamente de los receptores de ácido siálico, sino también de receptores secundarios que el virus requiere para hacer una infección productiva en la nueva especie hospedadora (Chu y col., 2004). Por estas razones, la Organización Mundial de la Salud (OMS), promueve desde el año 1957, año de la pandemia asiática, una investigación interdisciplinaria de IAV, considerando el rol potencial de los animales en la ecología y epidemiología de IAV en humanos, bajo el paradigma: "Una salud, un mundo" ("One-health, one-world") (Kaplan, 1969).

1.5: Evolución de *Influenza A virus* en cerdos a nivel mundial

1.5. a. Influenza en cerdos en Norteamérica

El primer subtipo de IAV circulante en cerdos en Norteamérica fue el subtipo H1N1, derivado de la pandemia de gripe española del año 1918. Fue aislado por primera vez en cerdos en 1930 por Shope, denominándose "H1N1 clásico porcino" (cH1N1) y manteniéndose como el único subtipo persistente en la población de cerdos de EE.UU. durante los siguientes 80 años (Shope y col., 1931). En el año 1998, un subtipo triple reasortante H3N2 emerge, se establece y propaga ampliamente en la población de cerdos de Norteamérica (Webby y col., 2000). El mismo contiene segmentos genéticos de IAV subtipo cH1N1 (NP, M, NS), IAV H3N2 estacional de humanos (PB1, HA, NA) e IAV de origen aviar (PB2, PA) (Zhou y col., 1999). A la composición genética interna

de este subtipo de IAV en cerdos se la denomina “cassette TRIG” (Triple Reassortants Internal Genes) (Vincent y col., 2008). Estos subtipos H3N2 fueron evaluados genética y antigénicamente, clasificándose en cuatro clusters filogenéticamente diferentes: cluster I, II, III y IV, este último considerado una variante del cluster III (Richt y col., 2003; Webby y col., 2000; Olsen y col., 2006^b; Webby y col., 2004). A nivel inmunológico, los clusters I y III poseen reactividad cruzada, a diferencia del cluster II que no posee reacción cruzada ni con el cluster I ni con el III (Richt y col., 2003). Posterior a su emergencia, los subtipos H3N2 se reasociaron con el subtipo cH1N1, dando origen a los subtipos reasortantes H1N1 (genes internos del subtipo H3N2 y HA/NA del cH1N1) y H1N2 (HA del cH1N1 y NA y genes internos del subtipo H3N2 (Webby y col., 2004; Karasin y col., 2002; Lorusso y col., 2011).

Otro evento importante en la epidemiología de IAV en cerdos en Norteamérica fue la emergencia entre los años 2003 y 2005 de los subtipos “similares a humanos” (“human-like”), virus que poseen la HA de origen humano y que son genética y antigénicamente diferentes al subtipo cH1N1. En Estados Unidos, los subtipos “human-like” H1N1 y H1N2, emergieron en cerdos en el año 2005. Estudios filogenéticos posteriores los diferenciaron de los aislamientos canadienses, lo que demostró la ocurrencia de dos eventos de introducción diferentes en Norteamérica. Los genes NA de estos subtipos “human-like” son originalmente de linaje humano N1/N2, con genes internos pertenecientes al cassette TRIG (Vincent y col., 2009^a; Lorusso y col., 2011).

Con el objetivo de representar la evolución de IAV H1 en cerdos en Norteamérica, surge la clasificación en distintos clusters. Los IAV pertenecientes al linaje cH1N1 evolucionaron a lo largo del tiempo para dar lugar a los clusters α , β y γ , mientras que los subtipos H1 que poseen genes HA similares a las virus humanos estacionales H1 circulantes a partir del año 2003, se clasifican dentro del cluster δ (Vincent y col., 2009b). Los subtipos H1N1 que surgen en la pandemia del año 2009 se clasifican dentro del cluster pandémico 2009 (pdm09). Recientemente se ha reportado un nuevo subcluster γ 2 antigénicamente diferente al resto de los virus γ (Anderson y col., 2015). El cluster δ se diferencia en subclusters δ 1 y δ 2, según hayan surgido a partir de IAV humano estacional H1N2 o H1N1 respectivamente. Los cinco clusters α , β , γ , δ y pdm09 pueden encontrarse asociados tanto a subtipo N1 como N2. Estudios de cartografía antigénica y análisis filogenéticos han demostrado que IAV pertenecientes a los seis clusters, cocirculan en la actualidad en la población de cerdos de EE.UU., con limitada reacción cruzada entre ellos (Lorusso y col., 2011).

En abril de 2009, un nuevo IAV emerge en la población humana, desencadenando una pandemia: el IAV pandémico H1N1 (H1N1pdm09), originado a partir del triple

reordenamiento de IAV de origen humano, aviar y porcino. El análisis genómico de este nuevo virus determinó que seis de sus segmentos estaban relacionados con IAV de cerdos de Norteamérica y dos (NA y M) con IAV aislados en cerdos en Eurasia (Trifonov y col., 2009; Cohen y col., 2009). Los segmentos HA, NP y NS del H1N1pdm09, derivan del subtipo cH1N1, los segmentos PB2, PB1 y PA, del TRIG H3N2 y los segmentos M y NA, del “avian-like” H1N1 euroasiático (Peiris y col., 2009). A esta combinación de genes internos se la denominara como: “genes internos triple reasortante pandémico” (TRIGpdm). Este subtipo emerge en cerdos en Norteamérica, estableciéndose y diseminándose rápidamente a nivel mundial. Se reporta en al menos 14 países y posteriormente, comienzan a aislarse la segunda generación de subtipos reasociados (Ducatez y col., 2011; Kitikoon y col., 2012).

El programa de vigilancia epidemiológica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), reportó que en el año 2014 los subtipos más frecuentemente aislados en Norteamérica fueron: H1N1 (en su mayoría cluster γ), H1N2 (en su mayoría δ) y H3N2. En menor proporción, se han aislado IAV subtipo H3N1 y subtipos humanos estacionales H3. El subtipo H1N1pdm09, luego de haber evidenciado una reducción gradual en su circulación en cerdos entre los años 2011 y 2012, evidenció una reemergencia en los últimos años, como subtipos reasociados. Sin embargo, el 90% de los virus endémicos aislados en cerdos en Norteamérica poseen la proteína de matriz M del TRIGpdm (OFFLU, 2014a).

1.5. b: Influenza en cerdos en Europa

En Europa, el IAV fue aislado por primera vez en cerdos en Gran Bretaña, entre los años 1938 y 1940 (Lamont, 1938; Blakemore y col., 1941). Este subtipo, años más tarde, fue caracterizado como subtipo H1N1, relacionado a las cepas humanas A/Wisconsin/33 y A/PuertoRico/8/34, y no así a la cepa A/Sw/Iowa/1930, aislada en los Estados Unidos (Neumeier y col., 1994). El subtipo cH1N1 fue introducido en Europa en 1976 (Nardelli y col., 1978) luego de una importación de cerdos desde Norteamérica a Italia y se estableció rápidamente, circulando en cerdos en varios países (Masurel y col., 1983; Sorensen y col., 1981; Abusugra y col., 1987; Roberts y col., 1987). Paralelamente a la pandemia rusa de 1977, se detectó la circulación en cerdos del subtipo humano H1N1, el cual a pesar de no lograr adaptarse y mantenerse en la población porcina, jugó un importante rol en la posterior generación de virus reasortantes (Hannoun y col., 1980).

En el año 1979, un IAV H1N1 de origen aviar, ingresa en la población porcina europea, demostrando así la eficiente transmisión interespecies de IAV. Los primeros

aislamientos del mismo se reportaron en Bélgica y Alemania, para luego establecerse como un nuevo linaje en cerdos (Pensaert y col., 1981; Scholtissek y col., 1983). Este nuevo subtipo “similar a aves” (“avian-like”) reemplazó al subtipo cH1N1, se diseminó ampliamente por todos los cerdos de Europa y se convirtió en el subtipo dominante a partir de la década del '90 (Schultz y col., 1991; Aymard y col., 1983; Yus y col., 1992). En relación al subtipo H3N2, a fines de la década del '70 y en estrecha vinculación con la pandemia de 1968 de Hong Kong, ingresan a la población de cerdos de Europa los subtipos “human-like” H3N2. Los mismos estaban antigénica y genéticamente relacionados con los subtipos humanos estacionales contemporáneos, hecho que demostró múltiples sucesos de introducción independientes (Ottis y col., 1982; Milev y col., 1981; Castrucci y col., 1994). A mediados de los años '80, este subtipo H3N2 adquiere el cassette interno del subtipo “avian-like” generando así un subtipo reasociado “human-like-swine” H3N2, con genes HA y NA originarios de las cepas humanas iniciales H3N2 (Castrucci y col., 1993). En 1994, en Reino Unido, se aísla por primera vez el subtipo reasociado H1N2, con gen HA derivado del subtipo “human-like” H1N1 que circuló durante la pandemia rusa de 1977, y NA y genes internos derivados del subtipo “human-like-swine” H3N2 (Brown y col., 1995).

A partir del año 2009, entra en circulación en cerdos de Europa el subtipo H1N1pdm09, y su siguiente generación de subtipos reasociados, los cuales se establecen de forma endémica en la población de cerdos, junto a otros subtipos reasociados menos frecuentes, provenientes de los subtipos H1N2 con los virus “avian-like” y H1N1 con los “human-like” (Kyriakis y col., 2011; Moreno y col., 2011; Howard y col., 2011).

Los estudios más actuales llevados a cabo dentro del programa de vigilancia de IAV en cerdos en la Unión Europea, han reportado la presencia de los siguientes subtipos: H1N1 “avian-like”, como el predominante (32%), seguido del H1N2 (21%) y H3N2 (18%). En cuanto al subtipo H1N1pdm09, se han detectado genes del mismo en aislamientos virales de subtipos reasociados, provenientes de países donde previamente no se había reportado la circulación del mismo, indicando que estas nuevas introducciones serían desde humanos (OFFLU 2014a).

1.5. c: Influenza en cerdos en Asia

Diversidad de subtipos de IAV han sido introducidos en el continente asiático desde Europa y Norteamérica como resultado de la importación de cerdos (Zhu y col., 2013). El subtipo cH1N1, luego de su incorporación en el año 1974 en Hong Kong, se convirtió en uno de los dominantes y se distribuyó ampliamente en numerosas

regiones y países asiáticos (Shortridge col., 1979; Kupradinun y col., 1991; Guan y col., 1996; Lee y col., 2008; Chatterjee y col., 1995). Este subtipo dio lugar a un subtipo reasociado H1N2 al adquirir la NA de IAV de origen humano contemporáneo (A/Hong Kong/1/68; A/Port Chalmers/1/73-like; A/Sidney/05/97-like), los cuales se adaptaron y diseminaron ampliamente (Shortridge y col., 1977; Peiris y col., 2001).

Los subtipos “human-like” H3N2 fueron aislados por primera vez en Taiwán luego de la pandemia humana de Hong Kong de 1968 (Kundin y col., 1970), cuyas variantes virales H3N2 contemporáneas, fueron aisladas de forma regular en muchos países del continente asiático (Shortridge y col., 1979; Shortridge y col., 1977). Dentro de las de mayor importancia se encuentran el virus A/Port Chalmers/1/73 y el A/Victoria/3/75. La transmisión a cerdos de estas dos variantes ha sido demostrada en varios países asiáticos, incluyendo China, Corea y Japón (Shortridge y col., 1977; Shortridge y col., 1979; Yamane y col., 1979; Nerome y col., 1981). La tercera variante H3N2 causante de importantes brotes clínicos fue el virus A/Syney/05/97, el cual se introdujo en la población de cerdos de China (Peiris y col., 2001; Zhou y col., 1999). Exceptuando estas variantes, la mayoría de los IAV “human-like” H3N2 fueron transitorios y no se establecieron con éxito en la población de cerdos.

Los subtipos reasociados H3N2 europeos fueron detectados por primera vez en el año 1999 en China, asociados a la importación de cerdos (Vijaykrishna y col., 2011).

Posteriormente a la emergencia del subtipo H1N1pdm09 en humanos, este virus infecta la población de cerdos de China y Japón, dando lugar a la segunda generación de subtipos reasociados (Matsuu y col., 2012; Vijaykrishna y col., 2011).

Los reportes actuales de la vigilancia de IAV en cerdos en Japón y sudeste asiático han relevado aislamientos de los subtipos H1N1pdm09 y H1N2, con HA del subtipo cH1N1 y NA “human-like”. Los genes internos de estos subtipos fueron en algunos casos, completos del TRIGpdm y en otros, una combinación del TRIGpdm y el cH1N1. La vigilancia en la zona norte y sur de Vietnam ha reportado en el año 2013 presencia de los subtipos H1N1pdm09, H1N2 y H3N2. Tailandia reportó aislamientos de los subtipos H1N1pdm09 y H3N2 mientras que Corea de Sur, detectó subtipos TRIG norteamericanos y “avian-like” europeos (OFFLU 2014a).

1.5. d: Influenza en cerdos en Centro y Sudamérica

Son pocos los países que se han abocado al estudio de IAV en cerdos en Centro y Sudamérica, con diversos niveles de profundidad en cada uno de ellos. En Brasil, el IAV fue aislado por primera vez en cerdos en el año 1978 (Cunha y col., 1978) y relacionado serológicamente con el virus de referencia A/Swine/Illinois/1/63, aunque

esto no fue confirmado mediante estudios moleculares. Estudios serológicos realizados en el año 2002 evidenciaron la circulación en cerdos en Brasil de los subtipos humanos H1N1, H3N2 e *Influenza virus* tipo B (Brentano y col., 2002; Mancini y col., 2006). El estudio de la infección por IAV en cerdos cobra importancia en Brasil recién en el año 2009, asociado a la pandemia humana H1N1pdm09, en donde se lanzan proyectos enfocados al desarrollo de técnicas de diagnóstico y caracterización molecular (OFFLU, 2011). Estudios realizados por Rajão y col., reportan que de 25 virus analizados, 16 fueron caracterizados como H1N1pdm09, 5 H3N2, y 4 δ H1N2 (Rajão y col., 2013). Entre los años 2009 y 2010 se ha demostrado una alta prevalencia (20 virus, 100%) en la circulación del subtipo H1N1pdm09 en cerdos en cinco estados del sur de Brasil (Schaefer y col., 2011; Rajão y col., 2012). En el año 2011 se aísla en cerdos salvajes, criados en sistemas semi intensivos, un subtipo reasociado “human-like” H1N2 con genes HA y NA pertenecientes al cluster δ y genes internos derivados del H1N1pdm09 (Biondo y col., 2014). Este mismo subtipo, posteriormente fue aislado a partir de un cuadro respiratorio en una granja (Schaefer y col., 2015; Schmidt y col., 2014). Brasil reportó la vigilancia de IAV en cerdos en el período 2013 a 2014, con un total de 68 aislamientos, pertenecientes a los subtipos H3N2, H1N2 δ y H1N1pdm09. En todos estos aislamientos se detectó el gen M de matriz del subtipo H1N1pdm09. Estudios serológicos realizados por IHA en 13 granjas evidenciaron la circulación de estos mismos subtipos, y la presencia de más de un subtipo por granja (OFFLU, 2014a).

Estudios realizados en Perú en cerdos de traspatio, determinaron la circulación de IAV H1N1pdm09. De un total de 1303 muestras de cerdos, la prevalencia de anticuerpos fue del 0% previo a la pandemia, 85% en coincidencia con el pico de la pandemia (Octubre de 2009), del 24% en abril de 2010 y de 1% en octubre de 2011. Además, en el pico de la pandemia se aislaron 3 IAV de cerdos que se caracterizaron como subtipo H1N1pdm09. Estudios filogenéticos revelaron dos eventos de introducción diferentes de IAV en cerdos desde el humano (Tinoco y col., 2015).

En Colombia, el primer reporte de presencia de anticuerpos de IAV en cerdos fue en 1977 (Hanssen y col., 1977). Un relevamiento realizado en el período 2008 a 2010, en granjas intensivas localizadas en las tres mayores áreas de producción de cerdos del país, reportó un total de 15 aislamientos de IAV pertenecientes a 9 granjas. Nueve de estos aislamientos se caracterizaron como subtipo H1N1pdm09 y los restantes como cH1N1 (Ramírez-Nieto y col., 2012). Estudios más recientes reportaron la presencia de subtipo H1N1pdm09 en 7 de 11 establecimientos porcinos (Jiménez y col., 2014).

En Chile se han identificado 4 subtipos de IAV circulantes en cerdos: H1N1pdm09, H1N2, H3N2 y cH1N1 (Medina y col., no publicado). Estudios serológicos indican una

alta prevalencia del subtipo H1N1pdm09 y los datos sugieren un potencial “drift” antigénico en las estas cepas (OFFLU, 2014a).

1.5. e: Influenza en cerdos en Argentina: antecedentes

Los primeros trabajos de investigación sobre IAV realizados en cerdos en Argentina demostraron la presencia de anticuerpos contra subtipos H3 y H1 (Teodoroff y col., 2003; Teodoroff y col., 2004). Un estudio serológico retrospectivo realizado en 13 granjas demostró que hubo circulación de cepas de IAV humanas y/o porcinas con estrecha relación antigénica con cepas humanas desde al menos el año 2002. Asimismo, otro estudio evaluó la circulación del subtipo H3 en muestras de suero de granjas de genética (5 granjas), utilizando como antígeno IAV de origen humano subtipo H3 (A/Sydney/05/97 y Panamá/200/99) de amplia circulación en la población humana nacional, detectándose anticuerpos contra H3 en 4 de las 5 granjas estudiadas en porcentajes que oscilaron entre el 9,1 y el 87,9% (Piñeyro y col., 2006). En ninguno de estos estudios se reportó el aislamiento y caracterización de IAV (Piñeyro y col., 2010)

En Argentina, se aisló por primera vez IAV en cerdos en el año 2008 a partir de un caso de enfermedad respiratoria en una granja de la provincia de Buenos Aires (Cappuccio y col., 2011). El virus fue caracterizado como subtipo H3N2 enteramente humano. Estudios moleculares y filogenéticos revelaron una identidad nucleotídica de entre 96 y 98 % con IAV de origen humano que circularon en Oceanía y Norteamérica entre los años 2000 y 2003 (Cappuccio y col., 2011). Debido a la falta de información de aislamiento viral y caracterización molecular de IAV en cerdos en Argentina durante este período, no pudo inferirse retrospectivamente el origen preciso, pero los datos filogenéticos sugieren la introducción y adaptación de un virus enteramente humano a la población porcina. Estudios posteriores evaluaron la patogenicidad y transmisibilidad de este subtipo H3N2 en cerdos bajo condiciones experimentales. Si bien produjo signos clínicos y lesiones típicas de IAV, estas últimas fueron leves. Por otro lado se demostró que la eliminación del virus por nariz comienza a los 2 dpi y alcanza el máximo a los 5 dpi (Cappuccio y col., 2011).

En junio de 2009, Argentina se convierte en el segundo país en reportar la presencia del subtipo H1N1pdm09 en cerdos. El mismo se reporta en una granja localizada en la provincia de Buenos Aires, que manifestó un cuadro respiratorio agudo, de moderada morbilidad (30%) y alta mortalidad, en animales de las categorías de destete y engorde. Estudios moleculares demostraron que el virus estaba genéticamente relacionado con la cepa H1N1pdm09 (Pereda y col., 2010).

2. HIPÓTESIS

Existen en Argentina cepas de *Influenza A virus* circulantes en granjas de cerdos domésticos con características moleculares y/o antigénicas que difieren de las ya reportadas en otras regiones del mundo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar y caracterizar las cepas de *Influenza A virus* circulantes en cerdos en Argentina.

3.2. Objetivos específicos

- Releva la situación epidemiológica de *Influenza A virus* en cerdos en granjas porcinas nacionales
- Caracterizar molecular y antigénicamente los aislamientos de *Influenza A virus* obtenidos de cerdos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Caso clínico

Un caso clínico de infección por *Influenza A virus* en cerdos se define como: un grupo de casos clínicos en cerdos que presenten fiebre, estornudos, tos y/o secreciones nasales/oculares en al menos una unidad de observación individual, desarrollado en un plazo de una semana y que afecte al menos al 10% de los animales presentes en dicha unidad. La unidad de observación individual es constituida por un agrupamiento de cerdos que están confinados en un mismo espacio físico y poseen contacto frecuente entre ellos. Puede ser toda la granja (si no hay compartimientos dentro de ella) o galpones (si existen divisiones dentro de la granja) (FAO, 2009).

Origen de las muestras

Las muestras provinieron de 4 orígenes diferentes (A, B, C y D) dependiendo del tipo de vigilancia empleada: activa o pasiva. La vigilancia activa se basa en el muestreo programado y con un diseño predeterminado, sin considerar la presencia de casos clínicos. En cambio, la vigilancia pasiva se basa en el reporte de casos clínicos agudos compatibles con infección por IAV (Simon y col., 2014).

A: estudios transversales diseñados en 9 granjas porcinas confinadas (vigilancia activa)

B: estudios realizados ante la presencia de cuadros compatibles con infección por IAV en cerdos (vigilancia pasiva)

C: estudios de la circulación IAV en cerdos en pequeños productores/productores familiares con bajo nivel de tecnificación de la producción (vigilancia pasiva)

D: muestras remitidas al Instituto de Virología, CICVyA, INTA por organismos públicos y asesores veterinarios (vigilancia pasiva)

A: ESTUDIOS TRANSVERSALES CLÍNICOS, SEROLÓGICOS, PATOLÓGICOS Y VIROLÓGICOS EN 9 GRANJAS EN ARGENTINA

1. Diseño del estudio

Se realizaron estudios transversales en 9 granjas porcinas de Argentina, entre los meses de enero y mayo del 2012. Se invitó a participar del estudio a granjas porcinas confinadas de ciclo completo nucleadas en el Grupo de Intercambio Tecnológico de

Explotaciones Porcinas (GITEP) que agrupa a las principales empresas productoras de cerdos del país.

El criterio de selección de los establecimientos se basó en:

- 1) aceptación en brindar información productiva al momento de la visita al establecimiento.
- 2) que el personal involucrado en el estudio pueda visitar el establecimiento para recolectar las muestras
- 3) que se conserven animales muertos en los últimos 3 días para la realización de necropsias y eventualmente toma de muestras para estudios complementarios
- 4) que acepten la publicación de los resultados a nivel nacional e internacional.

Selección de las granjas

Nueve granjas con un total de 21180 hembras en producción, las cuales representan, al momento del estudio, cerca del 10% del stock de madres del país, aceptaron participar del estudio. Las granjas estaban localizadas en las provincias de Santa Fe (3 granjas), Buenos Aires (2 granjas), Córdoba (3 granjas) y San Luis (1 granja), las cuales representan a las cuatro mayores áreas de producción de cerdos del país.

Selección de los animales

Se evaluó la presencia de signos clínicos compatibles con infección por IAV en cada uno de los animales y se midió su temperatura rectal. Se consideró animal febril aquel con temperatura rectal mayor a 37.5°C. Se seleccionaron aquellos animales que presentaban signos clínicos, sin embargo, si se detectaba un número menor a 30 animales con signos clínicos en un grupo etario, se aplicó un muestreo al azar para completar el número de muestras.

2. Muestreo

Diseño del muestreo:

Se tomaron muestras de sangre e hisopado nasal de 15 hembras multíparas, 15 cachorras y 30 animales en cada una de las siguientes edades: 7, 21, 35, 49, 63, 77, 100 y 160 días (n=270). Este número de muestras permite estimar, con una confianza del 95% y con una prevalencia esperada del 5 al 20%, la detección de al menos un

animal positivo en una población de 1000 o más animales (EpiInfo, CDC, Atlanta, GA, USA).

Toma de muestras:

- **Estudios serológicos:** las muestras de sangre se tomaron por punción de la vena cava craneal. Una vez extraída, se mantuvo 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se conservó a 4°C hasta la llegada al laboratorio, donde se centrifugo a 3000 rpm 5 minutos para obtención del suero.
- **Estudios virológicos:** se tomaron muestras de hisopados nasales, de ambas narinas. Se utilizaron hisopos de dacrón estériles y los hisopos se resuspendieron en 1ml de solución de transporte de PBS suplementado con penicilina (10,000 UI/ml), estreptomycin (10,000 µg/ml), anfotericina B (20 µg/ml) y albumina. A partir de los animales hallados muertos al momento de la visita, se le realizaron las necropsias. De aquellos pulmones que presentaron lesiones compatibles con infección por IAV, se tomaron muestras de pulmón en frascos estériles. Todas las muestras se mantuvieron refrigeradas por no más de 24 horas o en ultrafreezer de -80 °C hasta su procesamiento.
- **Estudios histopatológicos:** las muestras de pulmón con lesiones compatibles con IAV fueron extraídas y fijadas en formol al 10%.

3. Estudios serológicos

Se utilizó un kit de ELISA para detección de anticuerpos contra la NP de IAV (IDVet, Montpellier, Francia) en las muestras de suero, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Aquellas muestras positivas por la técnica de ELISA correspondientes a los animales de 160 días y de las hembras multíparas, fueron analizados por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA) de acuerdo al protocolo estándar (OIE, 2014). Como antígenos se utilizaron subtipos de IAV aislados en Argentina: H1N1pdm09 (pH1), H1N2 cluster $\delta 1$ ($\delta 1H1$), H1N1 cluster $\delta 2$ ($\delta 2H1$) y H3N2 cluster II (H3). Los sueros utilizados fueron tratados previamente con caolín y adsorvidos con glóbulos rojos de cobayo para eliminación de aglutininas inespecíficas. Posteriormente los sueros fueron diluídos con solución fisiológica hasta obtener una dilución 10^{-1} . Se realizaron diluciones seriadas 1:2 en PBS de los sueros de los animales y de los sueros homólogos a estos antígenos, como controles positivos. Los ensayos se

realizaron en placas de 96 pocillos fondo v. Posteriormente se enfrentaron estas diluciones a un título fijo de 8 unidades hemaglutinantes (UHA) de cada uno de los antígenos, previamente titulados por la técnica de hemaglutinación (HA). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, para permitir la unión antígeno-anticuerpo. Finalmente se enfrentó la reacción a una suspensión de glóbulos rojos de cobayo al 0.8%. Luego de 45 minutos de incubación, se realizó la lectura de los resultados. La técnica de IHA se basa en la capacidad que tienen los IAV de aglutinar glóbulos rojos. Si ocurre reacción antígeno-anticuerpo, la hemaglutinación de los glóbulos rojos es inhibida. El título del suero es la dilución más alta que inhibe totalmente la hemaglutinación. Se calculó el título geométrico medio (TGM) para cada categoría en cada una de las granjas evaluadas.

4. Estudios moleculares

Cada muestra de parénquima pulmonar se maceró en un mortero de porcelana con el agregado de arena estéril y solución buffer fosfato (PBS) estéril a pH 7.0-7.2, suplementado con penicilina (10,000 UI/ml), estreptomicina (10,000 µg/ml) y anfotericina B (20 µg/ml), generando una suspensión al 20% peso/volumen. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 1.500 rpm durante 5 minutos para eliminar restos de tejido y arena, y el sobrenadante fue clarificado a través de un filtro estéril de 0.22-µm (Whatman Inc., Clifton, NJ). Los sobrenadantes filtrados se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Los hisopados nasales fueron resuspendidos en 1ml de solución de PBS como se describió anteriormente y almacenados a -80°C hasta su utilización.

Se realizó la extracción de ARN total utilizando el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), a partir del líquido de resuspensión de los hisopos y de la suspensión del macerado de pulmón. Las muestras de hisopos fueron testeadas en pools de 5/6 muestras. El ARN extraído de cada pool, se almacenó a -80°C hasta su retrotranscripción. Se obtuvo su ADN copia (ADNc) utilizando el kit de síntesis de cDNA High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El ADNc obtenido fue utilizado para realizar el diagnóstico por real time rt-PCR (rRT-PCR), dirigido a amplificar parte del gen de la matriz (M). Esta región se encuentra en el segmento genómico más conservado entre las diferentes cepas de IAV (Spackman et al., 2002). Para ello se utilizó el kit de PCR "TaqMan PCR Universal Master Mix" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los primers y sonda utilizados para la reacción corresponden al protocolo publicado por la OMS, en una concentración de 40uM

(WHO, 2009). La reacción de rRT-PCR se realizó en un equipo ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5. Aislamiento viral

El aislamiento viral se realizó a partir de cada uno de los hisopos pertenecientes a los pooles positivos por rRT-PCR, de forma individual y de la suspensión del macerado pulmonar. Se utilizó la línea celular de riñón de perro “Mardin-Darby Canine Kidney” (MDCK) provista por el Área de Cultivos Celulares del Instituto de Virología de INTA. Para el aislamiento viral, se utilizó el protocolo de la Organización Panamericana de Salud (OPS, 2010). Se determinó la presencia de efecto citopático y luego se verificó el crecimiento viral por medio de la técnica de rRT-PCR descrita anteriormente. Se realizaron hasta 3 pasajes por MDCK a las muestras que no presentaron efecto citopático y el posterior chequeo por rRT-PCR del 3º pasaje de las muestras para darla como negativa.

6. Caracterización molecular

Se realizó la caracterización molecular de los aislamientos obtenidos mediante un sistema de amplificación de los segmentos genómicos que permite la secuenciación de la totalidad del genoma de IAV (Hoffman y col., 2001). Brevemente, este sistema se basa en la utilización de oligonucleótidos que hibridan en los extremos conservados de cada segmento genómico para la síntesis del ADNc, y el diseño de primers específicos sobre estas regiones para la PCR. El ADNc se obtuvo utilizando el protocolo de la enzima SuperScript (SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit, CA, USA). La amplificación de cada uno de los segmentos se realizó mediante una PCR, utilizando la enzima GoTaq polimerasa (GoTaq® DNA Polymerase, Promega, WI, USA) según la técnica descrita anteriormente (Hoffman y col., 2001). Los fragmentos amplificados por rt-PCR, se revelaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) según instrucciones del fabricante. La secuenciación fue realizada utilizando el kit “BigDyeTerminator kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en un equipo ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el mismo set de primers (Hoffman y col., 2001), con el método de dideoxinucleótidos marcados con una sustancia fluorescente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El genoma completo de cada aislamiento fue analizado con el sistema “Nucleotide Blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar las cepas de IAV más relacionadas con cada segmento de los aislamientos obtenidos.

El análisis filogenético de los aislamientos obtenidos en estos estudios se muestran en la sección E.

7. Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

Las muestras de pulmón se embebieron en parafina y luego se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Para su observación microscópica se realizaron técnicas de rutina. Los estudios de inmunohistoquímica fueron realizados sobre las muestras sospechosas a la observación microscópica, utilizando un anticuerpo anti-NP A monoclonal, isotipo MS1g2a (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) según protocolo descrito previamente (Pereda y col, 2010).

B: ESTUDIOS CLÍNICOS Y VIROLÓGICOS REALIZADOS ANTE LA PRESENCIA DE CUADROS COMPATIBLES CON INFECCIÓN POR IAV EN CERDOS EN ARGENTINA

1. Granjas evaluadas

Se visitaron granjas que informaron cuadros clínicos compatibles con infección por IAV en cerdos y que aceptaron la visita de investigadores del Instituto de Virología del CICVyA INTA y/o de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, para la toma de muestras y caracterización del cuadro clínico. Al momento de la visita, se recabó información de las características productivas y antecedentes sanitarios de los establecimientos.

2. Exámen clínico

Se realizó un exámen clínico grupal a todos los cerdos de más de 21 días (post destete). Durante el mismo se registró el porcentaje de animales con tos, estornudos, disnea, decaimiento y la presencia de otros signos clínicos no asociados al aparato respiratorio.

3. Toma de muestras

A partir de los datos del exámen clínico, se realizó la toma de muestras para detección de IAV. Aquellos animales que no respondían de manera "natural" a los estímulos o se mantenían apartados y que tenían una temperatura corporal mayor a 39^o5 (fiebre) se les realizó el hisopado nasal. Aquellos animales hallados muertos al momento de la visita y con lesiones macroscópicas compatibles con infección por IAV, se les tomó muestras de tejido pulmonar.

4. Estudios virológicos y moleculares

Ambos estudios fueron realizados según lo descrito previamente (apartados 4, 5 y 6 de la sección A). En aquellos casos clínicos que presentaron más de un animal positivo, se decidió caracterizar solamente un aislamiento. De cada virus aislado se realizó la caracterización a partir de los segmentos HA, NA y M, siguiendo los lineamientos sugeridos en la Guía para la detección de Influenza en cerdos (OFFLU, 2014b).

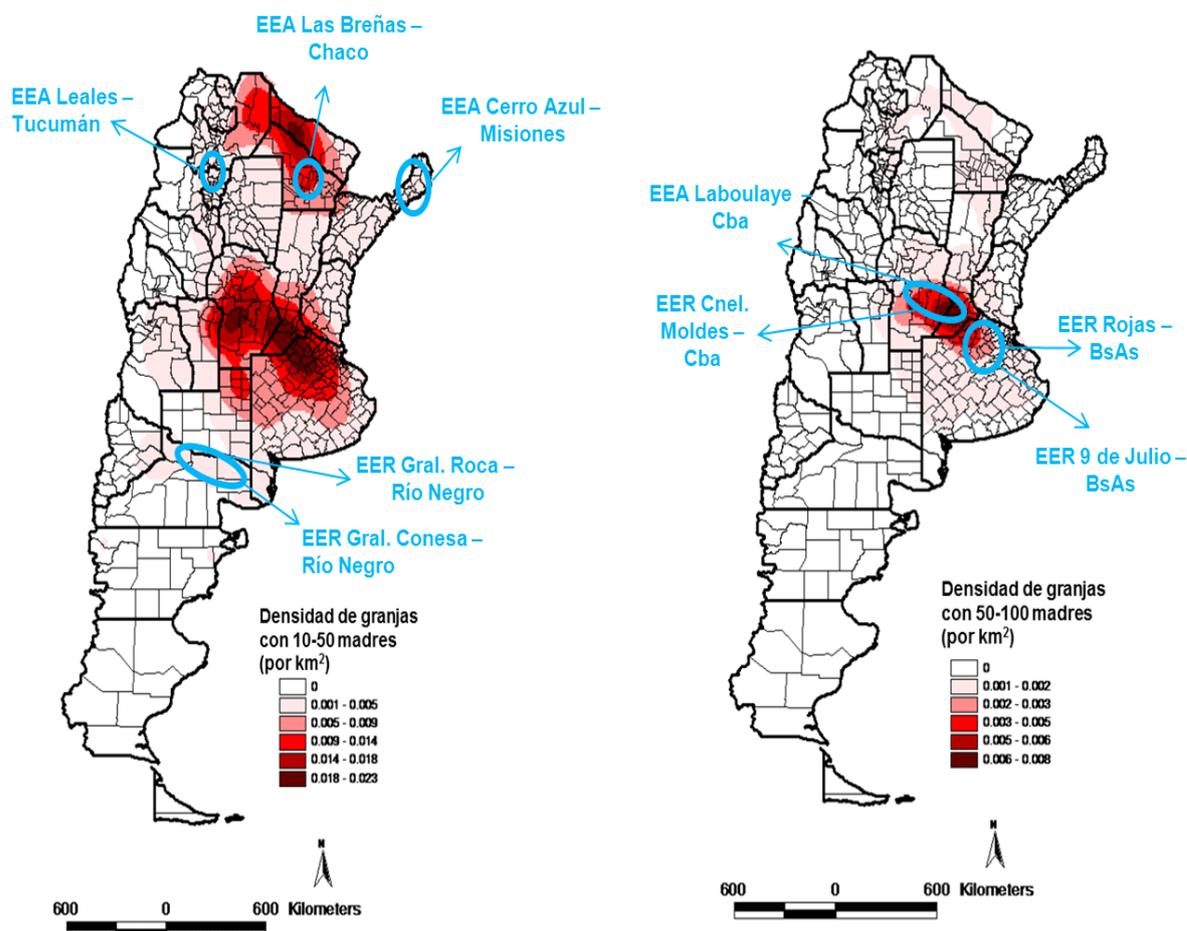
El análisis filogenético de los aislamientos obtenidos en estos relevamientos se muestra en la sección E.

C: EVALUACIÓN DE LA CIRCULACIÓN DE IAV EN CERDOS EN PEQUEÑOS PRODUCTORES/PRODUCTORES FAMILIARES CON BAJO NIVEL DE TECNIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

1. Diseño del estudio

Se realizó un relevamiento sobre el estrato de pequeños productores y productores familiares de cerdos pertenecientes a tres grandes zonas productivas del país: noroeste, centro y sur. El criterio de selección de las granjas se basó en la accesibilidad a los establecimientos que se encontraban en estrecha relación con las Agencias de extensión/ Estaciones experimentales del Instituto Nacional de Tecnología Agroalimentaria (INTA). Las zonas que abarcaron el relevamiento se presentan en la figura 1.

Figura 1: distribución de las zonas muestreadas en relación a las existencias porcinas en Argentina (SENASA 2014), según categoría. Izquierda: granjas de 10 a 50 madres. Derecha: granjas de 50 a 100 madres.



2. Caracterización de los establecimientos

Se agruparon los establecimientos según número de madres en dos categorías:

- Establecimientos de 10 a 50 madres: Tucumán, Misiones, Chaco y Río Negro.
- Establecimientos de entre 50 a 100 madres: Buenos Aires y Córdoba.

Se realizó una encuesta dirigida al propietario/encargado de la producción con el fin de obtener información acerca de los parámetros productivos y sanitarios de la misma. Posteriormente las granjas fueron categorizadas según:

- Localidad y provincia
- Tipo de sistema de producción (a campo, confinado total, confinado parcial)
- Finalidad de la producción (cabaña, ciclo completo, cría de lechones)
- Procedencia de los animales

3. Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre de 10 hembras adultas/padrillos por establecimiento y de 10 capones (según disponibilidad en la granja). Solamente en aquellos animales que presentaron signos clínicos compatibles con infección por IAV al momento de la visita, se tomaron muestras de hisopados nasales para el diagnóstico molecular de IAV. En la categoría de <50 madres, se tomaron muestras de hisopados nasales en Misiones (N=7), Chaco (N=9) y Tucumán (N=6), mientras que en la categoría 50 a 100 madres, se tomaron muestras en Rojas, Buenos Aires (N=15) y 9 de Julio, Buenos Aires (N=16). Las técnicas de muestreo fueron descritas en la sección 2.b del apartado A.

4. Estudios serológicos

Los sueros de los animales fueron analizados por la técnica de IHA. Para el mismo se utilizaron como antígenos 2 subtipos de influenza previamente aislados en Argentina: H1N1pdm09 (H1pdm09) y H3N2 cluster II (H3). Las pruebas fueron realizadas según lo descrito previamente en el apartado 3 de la sección A. Se consideraron títulos de 1/40 o mayores como positivos y granja positiva aquella con al menos un animal positivo.

5. Estudios moleculares

Fueron realizados según lo descrito en el apartado 4 de la sección A.

D: DETECCIÓN DE IAV EN MUESTRAS DE CERDOS REMITIDAS AL CICV y A INTA POR ORGANISMOS PÚBLICOS Y ASESORES VETERINARIOS: PERÍODO 2010 A 2014

1. Muestras procesadas

Se evaluaron muestras de pulmones/hisopados nasales remitidas al laboratorio por veterinarios asesores de granjas porcinas, veterinarios del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y por grupos de investigación de las Facultades de Veterinaria de las Universidades de Rosario (UNR), La Plata (UNLP) y Esperanza (UNL).

2. Estudios virológicos y moleculares

El procesamiento de las muestras, diagnóstico molecular, aislamiento viral y caracterización molecular fue realizado tal como se describe en los apartados 4, 5 y 6 de la sección A. En aquellos casos clínicos que presentaron más de una muestra positiva, se decidió caracterizar solamente uno o dos aislamientos. Se caracterizaron los segmentos M, HA y NA, tal como se recomienda en la guía para la detección de Influenza en cerdos (OFFLU, 2014b), a excepción de los dos primeros aislamientos "human-like" δ H1 (2009 y 2010), los cuales fueron secuenciados completamente, al ser caracterizados como subtipos reasortantes.

E: ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS IAV AISLADOS EN CERDOS EN ARGENTINA: PERÍODO 2010 A 2014

1. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS

Las bases de datos para la realización de los análisis filogenéticos fueron confeccionadas con una selección de secuencias nucleotídicas pertenecientes al período 1998 - 2014, tanto de IAV de origen humano como porcino. Para que dicha base sea representativa, se incluyó información de todos los países disponibles. Solamente para el segmento HA, para su completa caracterización, se incluyeron secuencias desde el año 1970 al 2014. Toda la información fue obtenida del banco de datos [Influenza Research Database \(http://www.fludb.org\)](http://www.fludb.org). Se analizaron las secuencias nucleotídicas de los segmentos HA, NA y M de la totalidad de los

aislamientos (N=45) y de los segmentos PB2, PB1, PA, NP y NS de los 7 primeros aislamientos obtenidos. Cada segmento genómico fue analizado por separado, y a su vez los segmentos NA y HA fueron analizados separadamente en secuencias N1 y N2, y H3 y H1 respectivamente para su mejor caracterización. Para el segmento H3 se confeccionaron dos bases de datos, una a partir de secuencias de IAV de origen humano, con el objetivo de poder estimar el potencial evento de introducción de los aislamientos H3 de cerdos y otra con secuencias de IAV de origen porcino y humano a fin de poder clasificar a los mismos. Con estas bases de datos se construyeron los alineamientos de secuencias correspondientes por medio del programa de edición BioEdit v 7.0.9 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA), constituidos por el siguiente número de secuencias: 420 H1, 63 H3 para clasificación y 241 H3 para estimar potencial evento de introducción, 261 N1, 223 N2, 244 M, 130 PB2, 151 PB1, 151 PA, 187 NP, 185 NS. Para cada uno de estos alineamientos se construyó un árbol filogenético mediante el método de Máxima Parsimonia. La técnica de *bootstrap* (remuestreo) fue utilizada como soporte estadístico para las ramas del árbol filogenético (100 réplicas). Los mismos fueron realizados con el software MEGA versión 5.0 (Tamura y col., 2011). Posteriormente los árboles filogenéticos obtenidos fueron editados por medio del programa FigTree v1.3.1 (Institute of Evolutionary Biology, Edinburgh. Scotland).

Para la clasificación de los aislamientos según el segmento HA, se utilizó el criterio utilizado por los grupos de investigación de EE.UU (Richt y col., 2003; Webby y col., 2000; Olsen y col., 2006a; Webby y col., 2004). Para la determinación de los eventos de introducción de IAV desde humanos se consideraron como potenciales introducciones aquellos clusters monofiléticos soportados por valores de *bootstrap* superiores al 70% (Nelson y col., 2015). Este análisis se realizó en los segmentos HA y NA.

2. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA

La cartografía antigénica es un método que se utiliza para visualizar e incrementar la resolución de los datos obtenidos por medio de los ensayos de IHA. Como resultado se obtiene un mapa en donde la distancia entre dos puntos representa la distancia antigénica medida en los ensayos de IHA (una unidad antigénica representa una dilución 1:2). Inicialmente la cartografía antigénica fue utilizada para cuantificar y visualizar la evolución antigénica del virus influenza A H3N2 desde 1968 en adelante. Desde entonces, se ha convertido en una herramienta fundamental en las actividades

de vigilancia del virus de influenza realizada por la OMS. Los datos de ensayos de IHA remitidos por los laboratorios de referencia de influenza a nivel mundial son utilizados para la realización de mapas antigénicos que determinan posibles cambios a ser realizados en la composición de las vacunas para la próxima estación. La cartografía antigénica hoy en día es también utilizada para otros patógenos como ser: Influenzavirus B, influenza equina (H3N8), virus de la rabia, calicivirus felino, entre otros. La cartografía antigénica para influenza A en porcinos, ha comenzado a implementarse recientemente para el análisis de los factores relacionados a la ecología y evolución de los IAV circulantes en cerdos. Su empleo permite determinar el correcto uso y formulación de las vacunas comerciales, seleccionar las cepas de importancia a nivel local como regional, evaluar la competencia entre subtipos y variantes de subtipos como así también estimar el potencial riesgo de introducción de otros virus porcinos en la población de cerdos como también su introducción en humanos (OFFLU 2015).

Para realizar el mapa de cartografía antigénica, se seleccionaron 7 IAV del total de aislamientos obtenidos en este estudio correspondientes al período 2010 a 2014. Además se incluyó el virus A/swine/Argentina/SAGiles-31215/2009, por ser el primer IAV H1N1pdm09 aislado en cerdos en Argentina (Pereda y col., 2009). Los mismos fueron seleccionados teniendo en cuenta las distancias nucleotídicas observadas en los estudios filogenéticos, el lugar de procedencia y el año de origen y siguiendo las indicaciones y sugerencias del grupo de investigación del Departamento de Zoología de la Universidad de Cambridge, Inglaterra, Reino Unido, a cargo de la Dra. Nicola Lewis (grupo de referencia internacional en el tópico en influenza animal).

a) Obtención del panel de sueros de referencia

Se realizó la importación del panel de sueros de referencia (N=66). Los mismos fueron gentilmente donados por la Dra Amy Vincent de la Unidad de Vigilancia de Enfermedades de Virus y Priones del USDA-ARS (National Animal Disease Center, Ames, Iowa, EE.UU). Dichos sueros fueron obtenidos a partir de cerdos hiperinmunizados utilizando distintos IAV de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 (ver anexo 1).

b) Obtención de los IAV controles

Se utilizaron cinco (5) aislamientos de IAV controles, seleccionados por la Dra Lewis para la validación de los ensayos. Cuatro fueron donados por la Dra Amy Vincent y uno (A/Brisbane/59/07) fue provisto gentilmente por el Laboratorio de Virus Respiratorios y Centro Nacional de Influenza, Instituto Nacional de Epidemiología, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, a cargo de la Dra. Elsa Baumeister (Tabla 1).

Tabla 1: IAV utilizados como controles para los estudios de cartografía antigénica.

Cepa viral	Cluster
A/swine/Minnesota/01146/2006 (H3N2)	cluster IV
A/swine/Ohio/511445/2007 (H1N1)	gamma
A/swine/Illinois/003200/2010 (H1N2)	delta-1
A/swine/Illinois/00685/2005 (H1N1)	delta-2
A/Brisbane/59/07 (H3N2)	

Se determinó el título viral por medio de la técnica de hemoaglutinación siguiendo el protocolo propuesto por Lewis (Lewis y col., 2014). El título de trabajo fue de 8 unidades hemoaglutinantes (UHA).

c) Ensayo de Inhibición de Hemoaglutinación

La técnica de IHA fue realizada de acuerdo al protocolo descrito previamente en el apartado 3 de la sección A. Los resultados se muestran en el anexo 2.

d) Análisis y generación de los mapas de cartografía antigénica

Los resultados de los ensayos de IHA fueron analizados por la Dra. Nicola Lewis, quien posteriormente confeccionó los gráficos tridimensionales utilizando el software PyMOL Molecular Graphics Systems (DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA) (DeLano, 2002), ilustrando las relaciones antigénicas entre los diferentes IAV aislados de cerdos en Argentina, los IAV de cerdos de Norteamérica y los antisueros de referencia.

5. RESULTADOS

A. ESTUDIOS TRANSVERSALES CLÍNICOS, SEROLÓGICOS, PATOLÓGICOS Y VIROLÓGICOS EN 9 GRANJAS EN ARGENTINA

Los signos clínicos característicos de infección endémica con IAV, principalmente tos, disnea y fiebre, fueron observados en 8 granjas (Tabla 2):

Tabla 2: localización de la granja, número de madres, características de la producción y edad de presentación de los signos clínicos.

Granja	Provincia	Nº de madres	Multiple sitio/ sitio único	Signos compatibles con infección por IAV (días de edad de presentación)
G0	Buenos Aires	6000	3 sitios	63
G1	Córdoba	740	3 sitios	No detectados
G2	Santa Fé	2400	3 sitios	49 a 63
G3	Córdoba	500	1 sitio	35 a 49
G4	Santa Fé	4500	3 sitios	21 y 140
G5	Córdoba	500	1 sitio	50 y 120
G6	Buenos Aires	340	1 sitio	25
G7	San Luis	4500	3 sitios	35
G8	Córdoba	1700	3 sitios	35

En la figura 7 (página 45) se muestra la localización (georreferenciación) de cada uno de los establecimientos.

Estudios serológicos

Todas las granjas, evaluadas por la técnica de ELISA, presentaron anticuerpos contra IAV. El porcentaje de seroprevalencia total promedio fue del 48,5%, con rangos entre 7,1 a 79,4%. Los mayores porcentajes de animales seropositivos se observaron en las hembras multíparas y en los capones de 160 días de edad.

El patrón de infección puede agruparse en dos escenarios diferentes. El patrón 1, observado en dos granjas (G1 y G3) (Figura 2A), donde menos del 50% del estrato de hembras multíparas (cerdas) y cachorras fueron seropositivas, mientras que en el resto de las categorías evaluadas, el mayor porcentaje de cerdos positivos fue del 20%. En las restantes 7 granjas, que presentan el patrón 2 (Figura 2B), el porcentaje de animales seropositivos en el estrato de hembras multíparas y cachorras fue del

60% o mayor. En el resto de las categorías, se observó un descenso del nivel de anticuerpos calostrales entre los 21 y los 35 días de edad en concordancia con el periodo post destete, seguido de un aumento de animales seropositivos en los periodos de desarrollo y engorde.

Figura 2 A: porcentaje de animales positivos por ELISA por categoría o edad. Patrón 1.

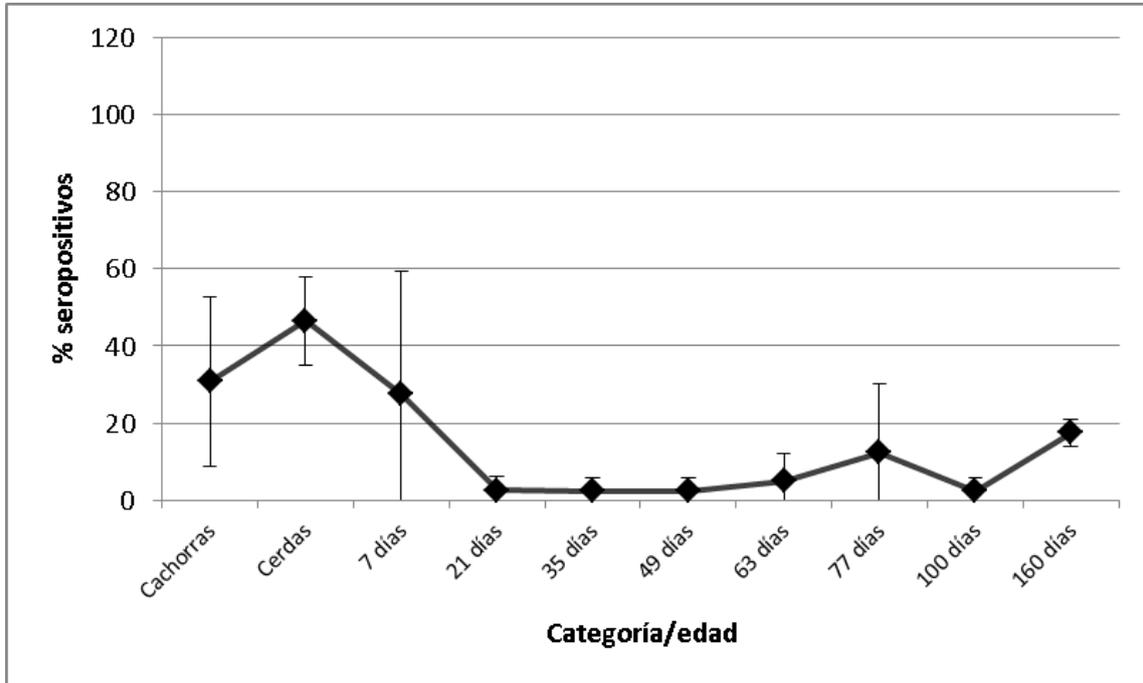
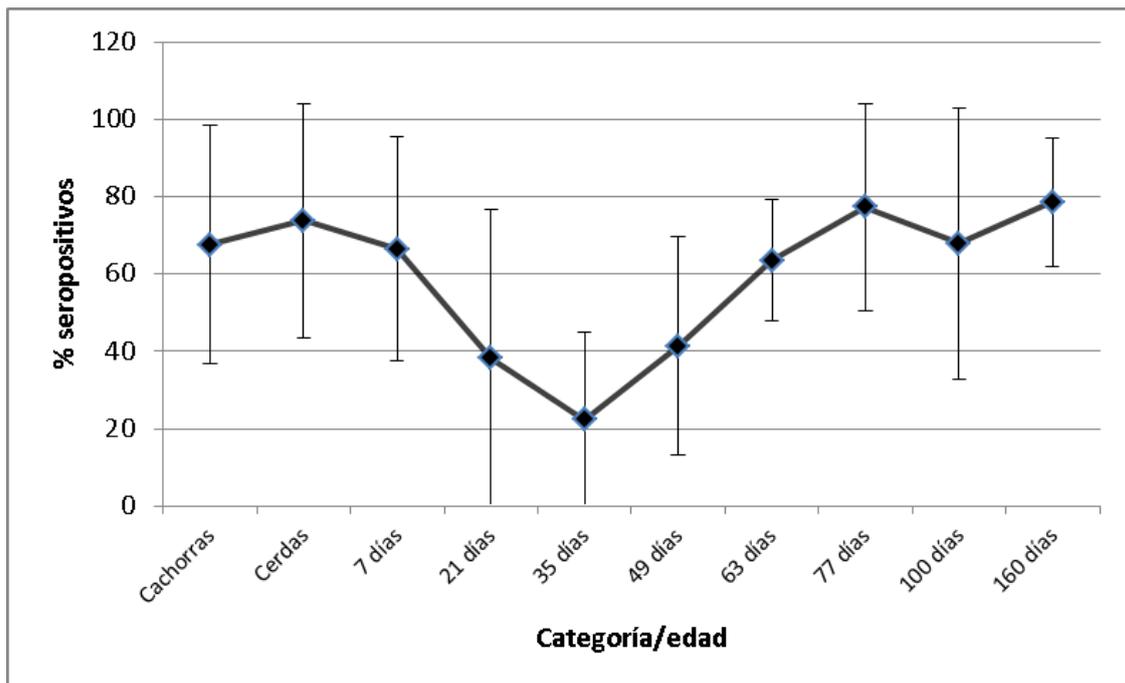
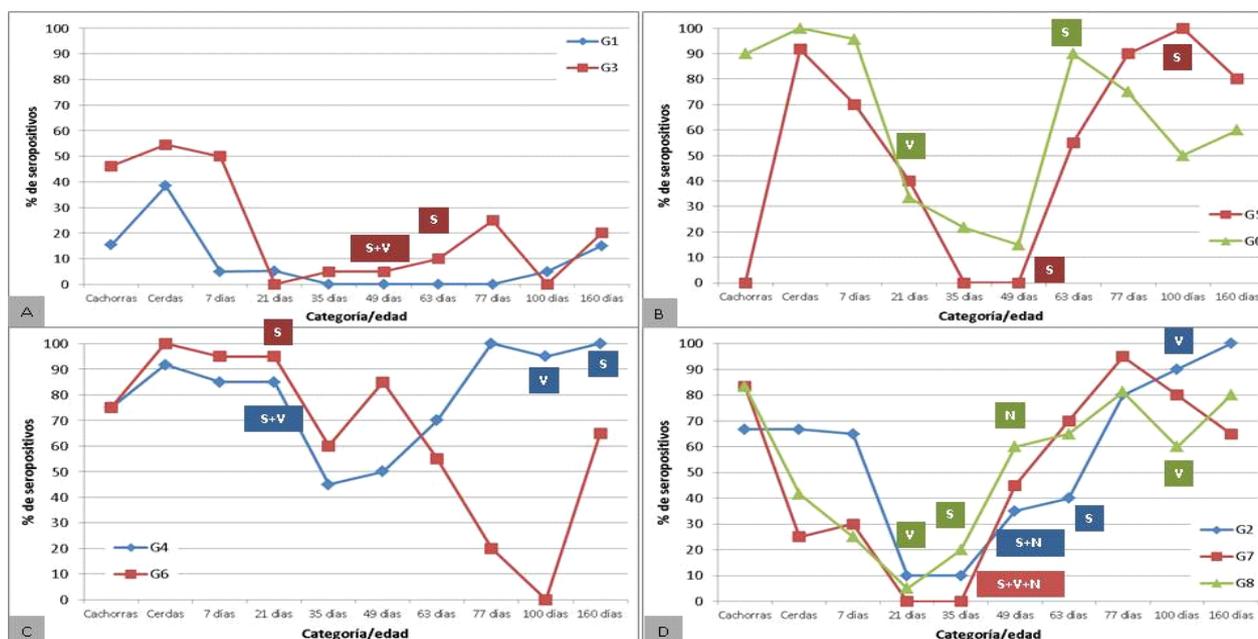


Figura 2 B: porcentaje de animales positivos por ELISA por categoría o edad. Patrón 2.



No hubo correlación entre el porcentaje de animales seropositivos, los signos clínicos observados y la detección virológica a partir de hisopados nasales o de animales de necropsia. Los perfiles serológicos individuales de cada granja, la presencia de signos clínicos (S), la detección viral a partir de hisopados nasales (V) o cerdos hallados muertos (N), se presentan en la figura 3. Para su mejor visualización los resultados fueron agrupados según similitud del patrón serológico.

Figura 3: relación entre el porcentaje de cerdos seropositivos, presencia de signos clínicos y detección viral en cada una de las granjas evaluadas.

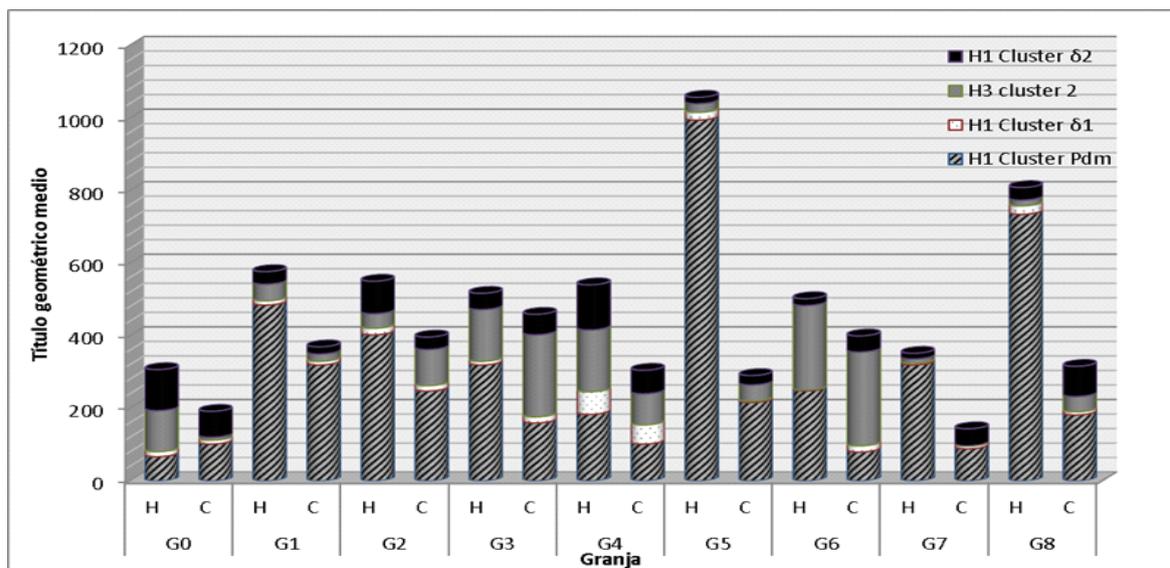


S: signos clínicos **V:** detección de IAV por rRT-PCR. **N:** detección de IAV por rRT-PCR a partir de necropsias.

A: Granjas 1 y 3; **B:** granjas 0 y 5; **C:** granjas 4 y 6; **D:** granjas 2, 7 y 8.

Los ensayos de inhibición de hemoaglutinación evidenciaron la presencia de anticuerpos contra los subtipos H1pdm09, δ 2H1 y H3 en todas las granjas, y en 8 granjas la presencia de anticuerpos contra δ 1H1. El TGM fue superior en hembras múltiparas que en animales de 160 días. El TGM calculado en sueros contra el subtipo H1pdm09, fue superior a cualquier otro subtipo analizado. Solamente una granja (G0) presentó títulos superiores contra H3 que contra H1pdm09 en las hembras múltiparas. En capones, en dos granjas (G3 y G6) se detectaron mayores títulos contra H3 que contra H1pdm09. En relación a los TGM δ 2H1 y δ 1H1 fueron muy bajos, con la excepción de la granja 4 (Figura 4).

Figura 4: título geométrico medio en sueros de hembras múltiparas y capones de 160 días en cada una de las granjas. Resultados para cada subtipo.



H: hembras múltiparas C: capones

El 87,4% de los sueros evaluados presentaron anticuerpos contra más de un subtipo. El mayor porcentaje de animales presento anticuerpos contra H1pdm09, H1δ2 y H3, y también contra H1pdm09 y H3 (Tabla 3)

Tabla 3: porcentaje y número de hembras y capones positivos contra los distintos subtipos de IAV evaluados.

Subtipo	Nº madres	% madres	Nº capones	% capones	Total	% Total
H1pdm09 + H1δ2 + H3	21	31,8	39	31,4	60	31,6
H1pdm09 + H3	17	25,7	21	16,9	38	20,0
H1pdm09+H1δ1+H1δ2+H3	12	18,2	15	12,1	27	14,2
H1pdm09	9	13,6	14	11,3	23	12,1
H1pdm09 + H1δ2	2	3,0	26	20,1	28	14,7
Otros	5	7,7	9	8,2	14	7,4
Total de sueros positivos por ELISA	66	100	124	100	190	100

Estudios virológicos

IAV fue detectado a partir de hisopados nasales en 7 granjas (G0, G2, G3, G4, G5, G7 y G8). Se procesaron 400 pools de hisopados nasales, de los cuales 33 (8,18%) fueron positivos a IAV por rRT-PCR. Se obtuvieron 12 muestras de pulmones con lesiones de neumonía compatible con infección por IAV, pertenecientes a 4 granjas, de los cuales 4 fueron positivos por rRT-PCR (Tabla 4).

Tabla 4: resumen de los resultados virológicos obtenidos separados por granja y tipo de muestra.

Granja	Nº pooles Procesados	Nº pooles Positivos	Edad (días)	Nº pulmones Procesados	Nº Pulmones Positivos	Nº aislamientos Totales
G0	14	2	21	0	0	7
G1	43	0		0	0	0
G2	54	2	49-100	2	1	2
G3	54	2	21-49	2	0	1
G4	54	7	21-63-100	3	1	1
G5	46	10	21	0	0	0
G6	46	0		1	0	0
G7	46	4	35	1	1	6
G8	43	6	21-100	3	1	0
Total	400	33		12	4	17

Se obtuvieron 17 aislamientos virales pertenecientes a 5 granjas. Se seleccionó un aislamiento por granja para su caracterización molecular completa. Cuatro de los aislamientos obtenidos, pertenecientes a las granjas G2, G3, G4 y G7, presentaron un 99% de identidad nucleotídica con cepas de IAV del subtipo H1N1pdm09. El aislamiento restante, perteneciente a la granja (G0), fue caracterizado como un subtipo reasociado H3N2. El mismo posee genes superficiales, HA y NA, relacionados a un subtipo humano H3N2 y genes internos provenientes del subtipo H1N1pdm09 (Tabla 5). (Números de acceso del GenBank: del KC876520 al KC876559)

Tabla 5: resumen de los aislamientos obtenidos en los estudios transversales

Granja	Origen	Subtipo	Nombre del aislamiento
G0	Buenos Aires	H3N2	A/swine/Argentina/CIP051-A160/2011
G2	Santa Fe	H1N1pdm09	A/swine/Argentina/CIP051-A201.E22/2012
G3	Córdoba	H1N1pdm09	A/swine/Argentina/CIP051-A202-D33/2012
G4	Santa Fe	H1N1pdm09	A/swine/Argentina/CIP051-A204/2012
G7	San Luis	H1N1pdm09	A/swine/Argentina/CIP051-A207/2012

Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

Se realizaron un total de 34 necropsias de las cuales, solo 12 presentaron lesiones de neumonía compatible con infección por IAV, de las cuales se tomaron muestras para estudios histopatológicos. La lesión macroscópica observada con mayor frecuencia fue, en 10 casos (83,33%), bronconeumonía craneoventral. En los 2 casos restantes, se observó la lesión característica de “tablero de ajedrez”, representada por áreas de consolidación lobulillar. Las lesiones histopatológicas observadas en 8 casos (66,66%) fueron: bronquiolitis necrotizante, con necrosis y desprendimiento de células epiteliales e infiltrado inflamatorio en vías aéreas.

La inmunohistoquímica realizada sobre los pulmones con lesiones de bronconeumonía, evidenció reacción positiva a la nucleoproteína de IAV solamente en un solo caso perteneciente a la granja G7, a pesar de que mediante estudios de rRT-PCR se detectó IAV en 4 de esos pulmones.

B. ESTUDIOS CLÍNICOS Y VIROLÓGICOS REALIZADOS ANTE LA PRESENCIA DE CUADROS COMPATIBLES CON INFECCIÓN POR IAV EN CERDOS

Se visitaron un total de 12 establecimientos porcinos que reportaron cuadros clínicos respiratorios compatibles con infección por IAV. El 100% de las granjas evaluadas fueron positivas a IAV mediante estudios de rRT-PCR. La inspección clínica determinó que en 8 granjas el cuadro clínico se correspondía con la forma endémica (20 a 30% de animales afectados) y en las restantes se observó un cuadro clínico epidémico (más de 35% de animales afectados). La edad de presentación de los signos clínicos fue variable, siendo los animales de destete (30 a 40 días) los más afectados (10 granjas). Se procesaron un total de 646 muestras, de las cuales 129 fueron positivas a IAV por rRT-PCR (19,96%). La edad de detección de IAV por rRT-PCR fue variable y coincidió con la edad de presentación de los signos clínicos en 10 granjas. En las granjas 2 y 7 la detección de IAV fue a partir de pulmones provenientes de animales hallados muertos de edades diferentes a los que presentaban el cuadro clínico. En la tabla 6 se describen las granjas visitadas, su localización, características productivas/sanitarias y los resultados clínicos y de detección molecular de IAV por rRT-PCR. En la figura 7 (página 45) se muestra la localización (georreferenciación) de cada uno de los establecimientos.

Tabla 6: resumen de las características productivas/sanitarias y hallazgos clínicos y virológicos en cada una de las granjas.

Granja	Fecha	Provincia	Sistema de producción	Antecedentes de infección por IAV	Edad de presentación de los signos clínicos	Forma de presentación	Detección de IAV por rRT-PCR
1	sep-12	Cba	1 sitio	NO	Todas las categorías	Epidémica	28/35/70 días
2	dic-12	Bs As	3 sitios	SI	60 días	Endémica	15/21 días
3	abr-13	Sta Fe	3 sitios	SI	30 a 44 días	Endémica	37 días
4	abr-13	Bs As	1 sitio	NO	Todas las categorías	Epidémica	Todas las categorías
5	dic-13	E Ríos	3 sitios	NO	40 días	Endémica	40 días
6	abr-14	Cba	3 sitios	SI	30-50 días	Endémica	42 días
7	may-14	Sta Fe	3 sitios	SI	40 días	Endémica	56 días
8	may-14	Bs As	1 sitio	NO	21-50 días	Epidémica	14 a 49 días
9	jun-14	Cba	3 sitios	NO	35-50 días	Epidémica	49 días
10	jul-14	Bs As	2 sitios	NO	40 días	Endémica	28/49/56 días
11	sep-14	Bs As	2 sitios	NO	40 días	Endémica	35/42/49/92 días
12	nov-14	Cba	3 sitios	SI	100-120 días	Endémica	100 días

Se obtuvieron un total de 13 aislamientos de IAV pertenecientes a 8 granjas. Sobre el total de virus caracterizados, 7 aislamientos pertenecientes a 5 granjas correspondieron al subtipo H1N1pdm09. Otros 3 aislamientos, pertenecientes a una sola granja, se caracterizaron como subtipo H3N2 reasociado, cuyo gen M fue caracterizado como pdm09 y sus genes de superficie presentaron un 99% de identidad

nucleotídica con el subtipo humano H3N2 aislado en cerdos en Argentina en el año 2008. Los 3 aislamientos restantes fueron caracterizados como subtipo H1N2 reasociado, con gen interno M del subtipo pdm09, HA caracterizada como H1 “human-like” $\delta 2$ y NA con un 99% de identidad nucleotídica con el subtipo H3N2 de Argentina del 2008, al igual que los subtipos anteriormente descritos (Tabla 7).

Tabla 7: caracterización de los aislamientos obtenidos por granja.

Granja	Edad de obtención de aislamientos (días)	Nombre del aislamiento	Subtipo	Nº acceso GenBank
1	35	A/swine/Argentina/CIP051-A232/2012	H1N1pdm09	KR863461 a KR863463
2	21	A/swine/Argentina/CIP051-C02.M1.1/2013	$\delta 2$ H1N2	KR863479 a KR863481
2	35	A/swine/Argentina/CIP051-C02.M1.5/2013	$\delta 2$ H1N2	KR863420 a KR863422
3	37	A/swine/Argentina/CIP051-C06.G3/2013	H1N1pdm09	KR863455 a KR863457
4	100	A/swine/Argentina/CIP051-C07-E1/2013	H3N2	KR863476 a KR863478
4	49	A/swine/Argentina/CIP051-C07-D2P1/2013	H3N2	KR863449 a KR863451
4	21	A/swine/Argentina/CIP051-C07-MP2.1/2013	H3N2	KR863464 a KR863466
6	42	A/swine/Argentina/CIP112-C40.P5/2014	H1N1pdm09	KR863437 a KR863439
6	42	A/swine/Argentina/CIP112-C40.P6/2014	H1N1pdm09	KT873326 a KT873328
7	56	A/swine/Argentina/CIP112-C47/2014	$\delta 2$ H1N2	KR863417 a KR863419
8	28	A/swine/Argentina/CIP112-C46/2014	H1N1pdm09	KR863414 a KR863416
10	49	A/swine/Argentina/CIP112-C59.B6/2014	H1N1pdm09	KR863458 a KR863460
10	49	A/swine/Argentina/CIP112-C59.P/2014	H1N1pdm09	KT873323 a KT873325

C. EVALUACIÓN DE LA CIRCULACIÓN DE IAV EN CERDOS EN PEQUEÑOS PRODUCTORES/PRODUCTORES FAMILIARES CON BAJO NIVEL DE TECNIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

Caracterización de los establecimientos

El estrato de granjas de 10 a 50 madres, tenían en promedio de 5 a 15 madres, se dedicaban a la producción de cerdos como actividad secundaria y realizaban solamente la cría de lechones para su venta (12-15 kg de peso aproximadamente). En relación a los sistemas de producción, fueron en su mayoría sistemas extensivos a campo o con confinamiento parcial. En ambos casos se observó baja tecnificación, nutrición variable y controles sanitarios deficientes. En cambio, los establecimientos de 50 a 100 madres, realizaban la producción de cerdos como actividad primaria, en su mayoría de ciclo completo, con producción de capones (100-110 kg de peso aproximadamente) y uno solo se categorizó como cabaña de venta de reproductores. Los sistemas productivos eran confinados parcial o totalmente, con controles sanitarios variables.

Los datos recolectados en cada una de las encuestas (localización de las granjas, sistema de producción y tipo de establecimiento) se muestran en las tablas 8 y 9.

Tabla 8: distribución de las granjas, discriminadas por categoría, según localidad y provincia.

Provincia	Localización *	Nº de establecimientos	Categoría
Tucumán	Leales	4	10 a 50
Chaco	Las Breñas	2	10 a 50
Misiones	San Javier	7	10 a 50
Río Negro	General Roca/Conesa	15	10 a 50
Buenos Aires	Rojas/9 de Julio	20	50 a 100
Córdoba	Cnel Moldes/Laboulaye	9	50 a 100
Total		57	

*20km epicentro en la ciudad de

Tabla 9: distribución de granjas según sistema de producción

Provincia	a campo	confinado total	confinado parcial
Tucumán	0	3	1
Chaco	2	0	0
Misiones	2	3	2
Río Negro	6	4	5
Buenos Aires	1	2	17
Córdoba	2	6	1
Total	13	18	26

Al comparar el origen de los reproductores en cada uno de los estratos se observó que la mayoría de las granjas de 50 a 100 madres compran sus reproductores en cabañas habilitadas por SENASA; mientras que los productores más pequeños, en su mayoría compran sus reproductores a establecimientos particulares, inclusive, un alto porcentaje de granjas desconocía el origen de sus reproductores (Figuras 5 y 6).

Figura 5: procedencia de los animales en granjas de 10 a 50 madres

Figura 5: procedencia de animales en granjas de < de 50 madres

■ particular ■ núcleo ■ cabaña ■ s/i

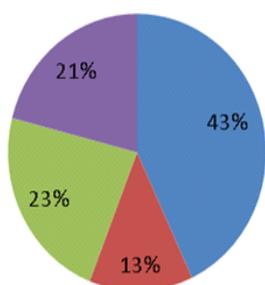
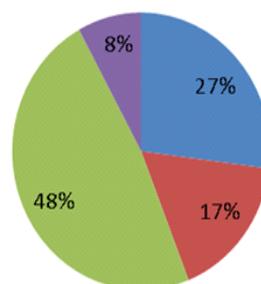


Figura 6: procedencia de animales en granjas de 50 a 100 madres

■ particular ■ núcleo ■ cabaña ■ s/i



s/i: sin información (origen desconocido)

Figura 6: procedencia de los animales en granjas de 50 a 100 madres

Figura 5: procedencia de animales en granjas de < de 50 madres

■ particular ■ núcleo ■ cabaña ■ s/i

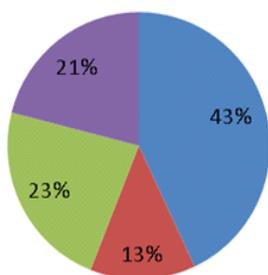
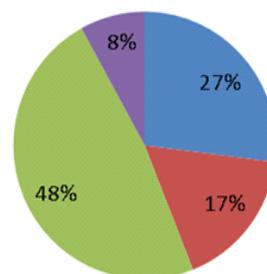


Figura 6: procedencia de animales en granjas de 50 a 100 madres

■ particular ■ núcleo ■ cabaña ■ s/i



s/i: sin información (origen desconocido)

Estudios serológicos

El porcentaje de animales positivos por la técnica de IHA al subtipo H1pdm09 fue similar en las 2 categorías de granjas evaluadas, con valores de 30% de animales positivos. Sin embargo, se observó un mayor porcentaje de establecimientos positivos a este subtipo en el estrato de 50 a 100 madres (más del 90%). En cuanto al subtipo H3, el porcentaje de animales positivos fue considerablemente menor, con valores máximos de 2 % en establecimientos de 50 a 100 madres. En el estrato de menos de 50 madres, solamente 1 establecimiento resultó positivo al subtipo H3 (Tabla 10).

Tabla 10: porcentaje y número de animales y establecimientos positivos por IHA contra subtipo H1 y H3.

Tipo de establecimiento	% animales (positivos/total) H1pdm09	% establecimientos (positivos/total) H1pdm09	% animales (positivos/total) H3	% establecimientos (positivos/total) H3
50 a 100 Madres	39,06 (150/384)	93,1 (27/29)	2,08 (8/384)	17,24 (5/29)
10 a 50 Madres	32,35 (77/238)	60,71 (17/28)	0,42 (1/238)	3,57 (1/28)

Estudios moleculares

En la categoría de 10 a 50 madres, se procesaron 22 hisopos en 4 pooles (respetando granja de origen y categoría), el resultado fue negativo para todos ellos mediante rRT-PCR. En la categoría 50 a 100 madres, se procesaron 31 hisopos en 7 pooles, siguiendo el mismo criterio de armado de los mismos. Sólo un pool perteneciente a una granja de la localidad de 9 de Julio, Buenos Aires fue positivo por rRT-PCR. La georreferenciación de este establecimiento se muestra en la figura 7 (página 45).

D. DETECCIÓN DE IAV EN MUESTRAS DE CERDOS REMITIDAS AL CICVyA INTA POR ORGANISMOS PÚBLICOS Y ASESORES VETERINARIOS: PERÍODO 2010 A 2014

Se recibieron un total de 724 muestras, de las cuales 435 fueron hisopados nasales y 289 pulmones. Las muestras fueron remitidas desde 51 establecimientos, localizados en las provincias de Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Tucumán, Chaco, San Juan, La Rioja, San Luis y La Pampa. En la figura N° 7 (página 45) se presenta la localización (georreferenciación) de las granjas estudiadas. Los casos clínicos reportados se presentaron a lo largo de todos los meses del año. No se observó un patrón estacional en relación a la remisión de muestras ni a la detección de IAV por rRT-PCR. El 17,4% (126) de las muestras fueron positivas mediante rRT-PCR. Del total de muestras positivas, 81 (64,3%) se correspondieron con muestras de pulmón y 45 (35,7%) con hisopados nasales. Se obtuvieron un total de 27 aislamientos provenientes de 7 granjas: Granjas G6, G8, G10, localizadas en la provincia de Santa Fe y Granjas G5, G12, G15 y G18 en la provincia de Buenos Aires. El 70,4% del total de aislamientos fueron caracterizados como subtipo H1N1pdm09; el 18,5%, fueron subtipo reasociado "human-like" $\delta 2$ H1N2; el 3,7% subtipo reasociado "human-like" $\delta 2$ H1N1; el 3,7% subtipo reasociado "human-like" $\delta 1$ H1N1 y el 3,7%, subtipo H3N2 (Tabla 11).

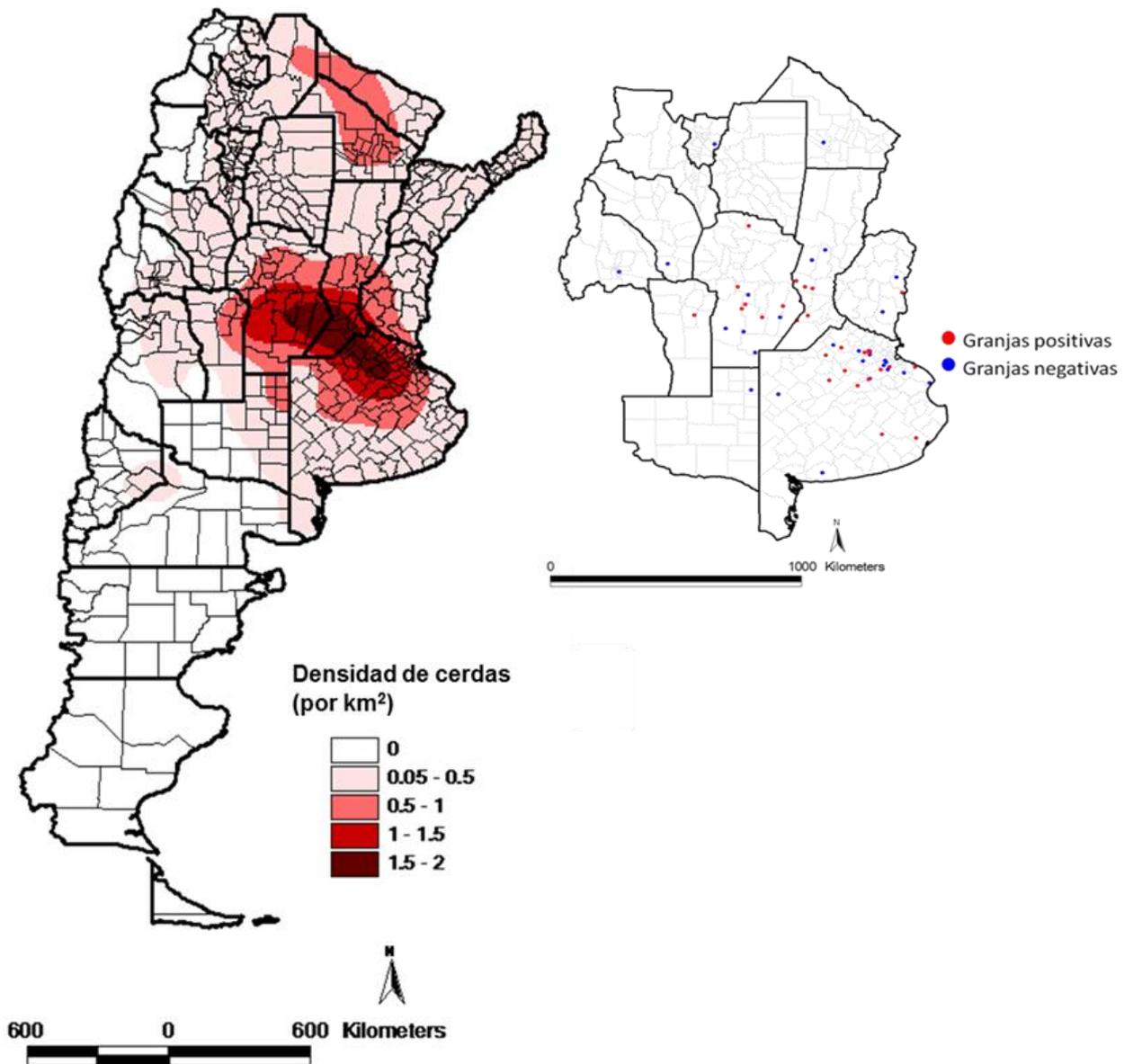
Números de acceso del GenBank: KR863464 a KR863467; KR863399 a KR863401; KR863435, KR863436, KT873322; KR863443 a KR863445; KR 863405 a KR863407; KT873338 a KT873340; KT873335 a KT873337; KR863396 a KR863398; KT873329 a KT873331; KR863432 a KR863434; KR863443 a KR863445; KT873341 a KT873343; KR863411 a KR863413; KR863470 a KR863472; KR863402 a KR863404; KR863452 a KR863454; CY075861 a CY075868; KR863393 a KR863395; KR863429 a KR863431; KR863426 a KR863428; KR863423 a KR863425; KR863473 a KR863475; CY075853 a CY075860; KT873332 a KT873334; KR863390 a KR863392; KR863467 a KR863469; KR863408 a KR863410.

Tabla 11: descripción de las granjas positivas a IAV por rRT-PCR y de los aislamientos obtenidos.

Granja	Localidad	Provincia	Nº positivos rRT-PCR	Aislamientos obtenidos	Subtipo
G1	9 de Julio	Buenos Aires	3	No aislados	
G2	Cañuelas	Buenos Aires	9	No aislados	
G3	Carnerillo	Córdoba	1	No aislado	
G4	Chañar Ladeado	Santa Fe	2	No aislados	
G5	Cnel. Vidal	Buenos Aires	5	A/swine/Argentina/CIP051-L23/2011	H1N1pdm09
G6	El Trébol	Santa Fe	9	A/swine/Argentina/CIP112-C35.25176/2014 A/swine/Argentina/CIP112-C35.25175/2014 A/swine/Argentina/CIP112-C35.25174/2014 A/swine/Argentina/CIP051-A234-06/2012 A/swine/Argentina/CIP051-A234-07/2012 A/swine/Argentina/CIP051-EITrebol/2011	H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09
G7	Junín	Buenos Aires	1	No aislado	
G8	Landeta	Santa Fe	6	A/swine/Argentina/CIP051-A201.pul/2012	H1N1pdm09
G9	Las Bandurrias	Santa Fe	1	No aislado	
G10	Villa Amelia	Santa Fe	34	A/swine/Argentina/CIP112-C37/2014 A/swine/Argentina/CIP051-C15.10590/2013 A/swine/Argentina/CIP051-C15.10636/2013 A/swine/Argentina/CIP051-C14.A1/2013 A/swine/Argentina/CIP051-C14.A2/2013 A/swine/Argentina/CIP051-C14.A3/2013 A/swine/Argentina/CIP051-A181-C2/2011 A/swine/Argentina/CIP051-A181-C4/2011 A/swine/Argentina/StaFeN2/2010	H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09 d1 H1N2
G11	Pipinas	Buenos Aires	2	No aislados	
G12	Roque Pérez	Buenos Aires	32	A/swine/Argentina/CIP051-C05.21/2012 A/swine/Argentina/CIP051-C29.42/2013 A/swine/Argentina/CIP051-A241-2/2012 A/swine/Argentina/CIP051-A241-9/2012 A/swine/Argentina/CIP051-A199/2011 A/swine/Argentina/CIP051-BsAs76/2009	d2 H1N2 d2 H1N2 d2 H1N2 d2 H1N2 d2 H1N2 d2 H1N1
G13	Saladillo	Buenos Aires	1	No aislado	
G14	Salto	Buenos Aires	1	No aislado	
G15	San Andrés de Giles	Buenos Aires	1	A/swine/Argentina/CIP051-C12-155/2013	H3N2
G16	San Andrés de Giles	Buenos Aires	1	No aislado	
G17	Santa Eufemia	Córdoba	12	No aislados	
G18	Tandil	Buenos Aires	3	A/swine/Argentina/CIP051-C08-648/2011 A/swine/Argentina/CIP051-C08-473/2010 A/swine/Argentina/CIP051-A178/2010	H1N1pdm09 H1N1pdm09 H1N1pdm09
NI			2	No aislados	
Total			126		27

NI: no informado

Figura 7: a la derecha de la figura se muestra la localización geográfica (georeferenciación) de todas las granjas en las cuales se tomaron muestras para detección de IAV por rRT-PCR. Se incluyen aquellas evaluadas en los apartados A, B, C y D. A la izquierda de la figura se muestra la densidad total de cerdas en Argentina.



E. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS IAV AISLADOS EN CERDOS EN ARGENTINA: PERÍODO 2010 A 2014

1. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS

Se obtuvieron un total de 45 aislamientos de IAV en cerdos, 30 (66,66%) fueron caracterizados como subtipo H1N1pdm09, cuyos genes HA, NA y M agruparon con secuencias de IAV provenientes de la pandemia humana H1N1 del 2009. Solamente 5 aislamientos (11,11%), se caracterizaron como subtipo reasortante H3N2, con gen M interno de origen pdm09 y genes externos de IAV humanos estacionales. El 17,77% de los aislamientos (8) resultaron subtipo reasortante “human-like” δ 2 H1N2, con matriz pdm09 y genes externos de origen humano. Un único aislamiento fue caracterizado como subtipo “human-like” δ 2 H1N1 y otro como subtipo “human-like” δ 1 H1N2. En ambos casos los genes externos (HA y NA) se relacionan con IAV de origen humano estacional, mientras que el gen M deriva del subtipo H1N1pdm09 (Figuras 8 a 17).

Inferencias filogenéticas sobre el gen HA:

En la filogenia del gen H1, dentro del cluster pandémico, se observaron 7 clusters monofiléticos diferentes, soportados por un *bootstrap* superior al 70% (Tabla 12; Figuras 8 y 9).

En relación a los subtipos “human-like” δ 2, los 9 aislamientos caracterizados formaron un cluster monofilético único con un soporte del 99% de *bootstrap* (Tabla 12). El subtipo “human-like” δ 1 H1, se observa como un único evento de transmisión de IAV humano estacional a cerdos (Figura 8). Todos los aislamientos de IAV “human-like” aislados en cerdos se relacionan con IAV humanos estacionales que circularon entre los años 2000 y 2002.

Las inferencias filogenéticas realizadas sobre el gen H3 con secuencias humanas correspondientes al período 1999 a 2014 indican que los 5 aislamientos H3N2 caracterizados forman un cluster monofilético único con un soporte de 100% de *bootstrap* (Tabla 12; Figura 10) y se relacionan con secuencias humanas circulantes en el periodo 1999 a 2003.

Al realizar el análisis filogenético con secuencias provenientes de cerdos, todos los aislamientos H3N2 obtenidos forman parte del Cluster II (Figura 11).

Inferencias filogenéticas sobre el gen NA:

En relación al análisis del gen NA, 14 aislamientos (31,11%) agruparon con secuencias pertenecientes al subtipo N2 y 31 aislamientos (68,89%) fueron caracterizados como subtipo N1. De estos últimos, 30 agruparon con secuencias del subtipo H1N1pdm09, pudiéndose identificar 7 clusters monofiléticos diferentes, coincidentes con los observados para el segmento H1. El aislamiento “human-like” δ 2 H1N1 A/swine/Argentina/CIP051-BsAs76/2009 se observa como un único evento de transmisión de IAV de humanos a cerdos (Figura 12).

De los 14 aislamientos N2, 13 formaron un cluster monofilético único, soportado por un 100% de *bootstrap* (Figura 14 y 15). Al igual que los resultados expuestos sobre las inferencias filogenéticas sobre el gen HA, todos estos aislamientos derivan del subtipo H3N2 A/swine/Argentina/CIP051-A2/2008. Posteriormente, se evidencian dos sub clusters diferentes. En el primero se agrupa la totalidad de las secuencias pertenecientes a una misma granja (aislamientos A160, A199, A241-2, A241-9, C02-M1.1, C02-M1.9, C29-42 y C05-21) involucrando, además, 2 eventos de reasociación: uno con el subtipo pdm09 (gen M) en el aislamiento A160 y otro con un subtipo “human-like” δ 2 H1N2 (gen H1) en el resto de los aislamientos. El segundo sub cluster (C07, C47 y C12) posee secuencias pertenecientes a 3 granjas diferentes.

El aislamiento A/swine/Argentina/CIP-051StaFeN2/2010 se presentó como un único evento de transmisión de IAV desde humanos a cerdos, relacionado con cepas circulantes durante el periodo 1998 a 2004 (Figura 14).

Inferencias filogenéticas sobre el gen M:

Las inferencias filogenéticas realizadas sobre el gen M demostraron que el 100% de los aislamientos obtenidos agrupan con IAV pdm09. Se identificaron, solamente 5 clusters monofiléticos con valores de *bootstrap* superiores al 70%. Sin embargo, éstos clusters no se corresponden en su totalidad con los observados en las inferencias filogenéticas sobre los genes HA y NA (Figura 16 y 17).

Inferencias filogenéticas sobre los genes PB2, PB1, PA, NP y NS:

Los análisis filogenéticos realizados sobre estos genes internos en los siete aislamientos secuenciados completamente, indican que la totalidad de los mismos agrupan con secuencias de IAV pdm09, al igual que los resultados evidenciados en la filogenia del gen M (Figuras 18 a 22).

Tabla 12: clusters monofiléticos con % de bootstrap superiores al 70% de IAV H1N1pdm09 (1 a 7), human-like δ 2 H1N2 (8) y H3N2 (9) período 2008 a 2014.

Cluster	Nombre de los aislamientos	% bootstrap
1	A/sw/Argentina/CIP051-A181-C4/2011/2011; A/sw/Argentina/CIP051-A204/2012/2012; A/sw/Argentina/CIP051-A181-C2/2011/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-15.10636/2013/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-C14.A2/2013/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-C14.A1/2013/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-C15.10590/2013/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-C14.A3/2013/H1N1	97 (HA), 99 (NA)
2	A/sw/Argentina/CIP051-A178/2010/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-C08-473/2010/H1N1	95 (HA), 100 (NA)
3	A/sw/Argentina/CIP051-L23/2011/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-A202-D33/2012/H1N1	95 (HA), 100 (NA)
4	A/sw/Argentina/CIP051-A234.07/2012/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-A234.06/2012/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-EITrebol/2011/H1N1; A/sw/Argentina/CIP112-C35.25176/2014/H1N1; A/sw/Argentina/CIP112-C35.25175/2014/H1N1; A/sw/Argentina/CIP112-C35.25174/2014 H1N1	100 (HA), 97 (NA)
5	A/sw/Argentina/CIP051-A201.E22/2012/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-A201.pul/2012/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-C06.G3/2013/H1N1	100 (HA), 100 (NA)
6	A/sw/Argentina/CIP112-C40.P5/2014/H1N1; A/sw/Argentina/CIP112-C40.P6/2014/H1N1	100 (HA), 100 (NA)
7	A/sw/Argentina/CIP112-C59.P/2014/H1N1; A/sw/Argentina/CIP112-C59.B6/2014/H1N1	100 (HA), 100 (NA)
8	A/sw/Argentina/CIP051-BsAs76/2009/H1N1; A/sw/Argentina/CIP051-A199/2011/H1N2; A/sw/Argentina/CIP051-A241.2/2012/H1N2; A/sw/Argentina/CIP051-A241.9/2012/H1N2; A/sw/Argentina/CIP051-C05.21/2012/H1N2; A/sw/Argentina/CIP051-C02.M1.1/2013/H1N2; A/sw/Argentina/CIP051-C02.M1.5/2013/H1N2; A/sw/Argentina/CIP051-C29.42/2013/H1N2; A/sw/Argentina/CIP112-C47/2014/H1N2	99 (HA)
9	A/sw/Argentina/CIP051-A2/2008/H3N2** ; A/sw/Argentina/CIP051-A160/2011/H3N2; A/sw/Argentina/CIP051-C12.155/2013/H3N2; A/sw/Argentina/CIP051-C07-D2P1/2013/H3N2; A/sw/Argentina/CIP051-C07-MP2.1/2013/H3N2; A/sw/Argentina/CIP051-C07-E1/2013/H3N2	100 (HA)

* Pereda y col., 2009

**Cappuccio y col., 2011

Figura 10: relaciones filogenéticas entre IAV H3 humano y H3 de cerdos de Argentina.

- H3 humano estacional 1999 a 2003
- H3 humano estacional 2004 a 2007
- H3 humano estacional 2008 a 2011
- H3 humana estacional 2012 a 2014
- H3 cerdos Argentina

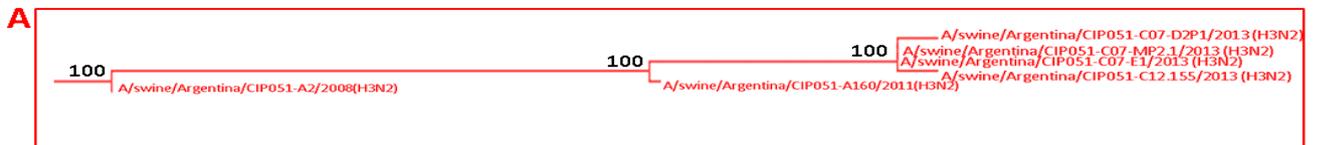
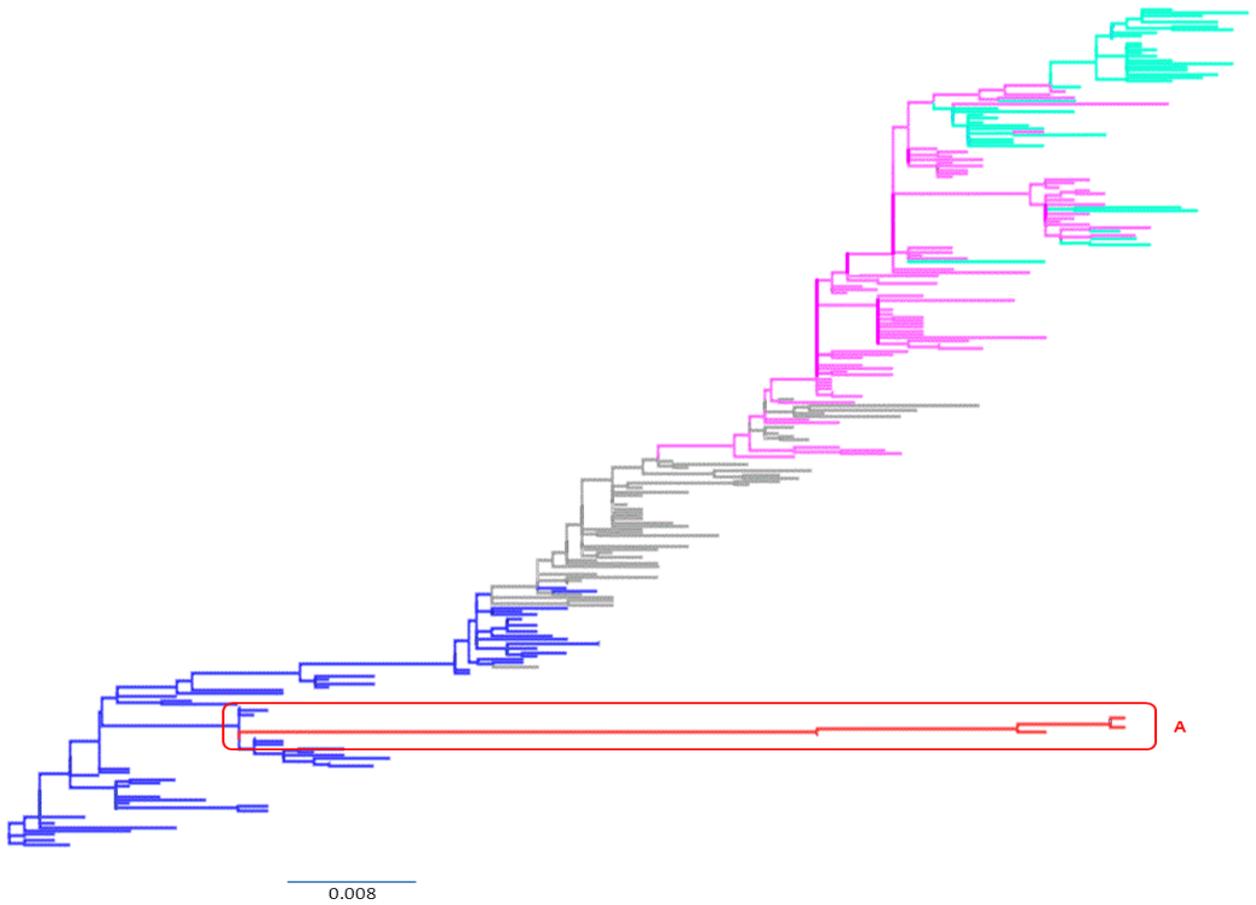


Figura 11: relaciones filogenéticas entre IAV H3 humano y H3 de cerdos de Argentina.

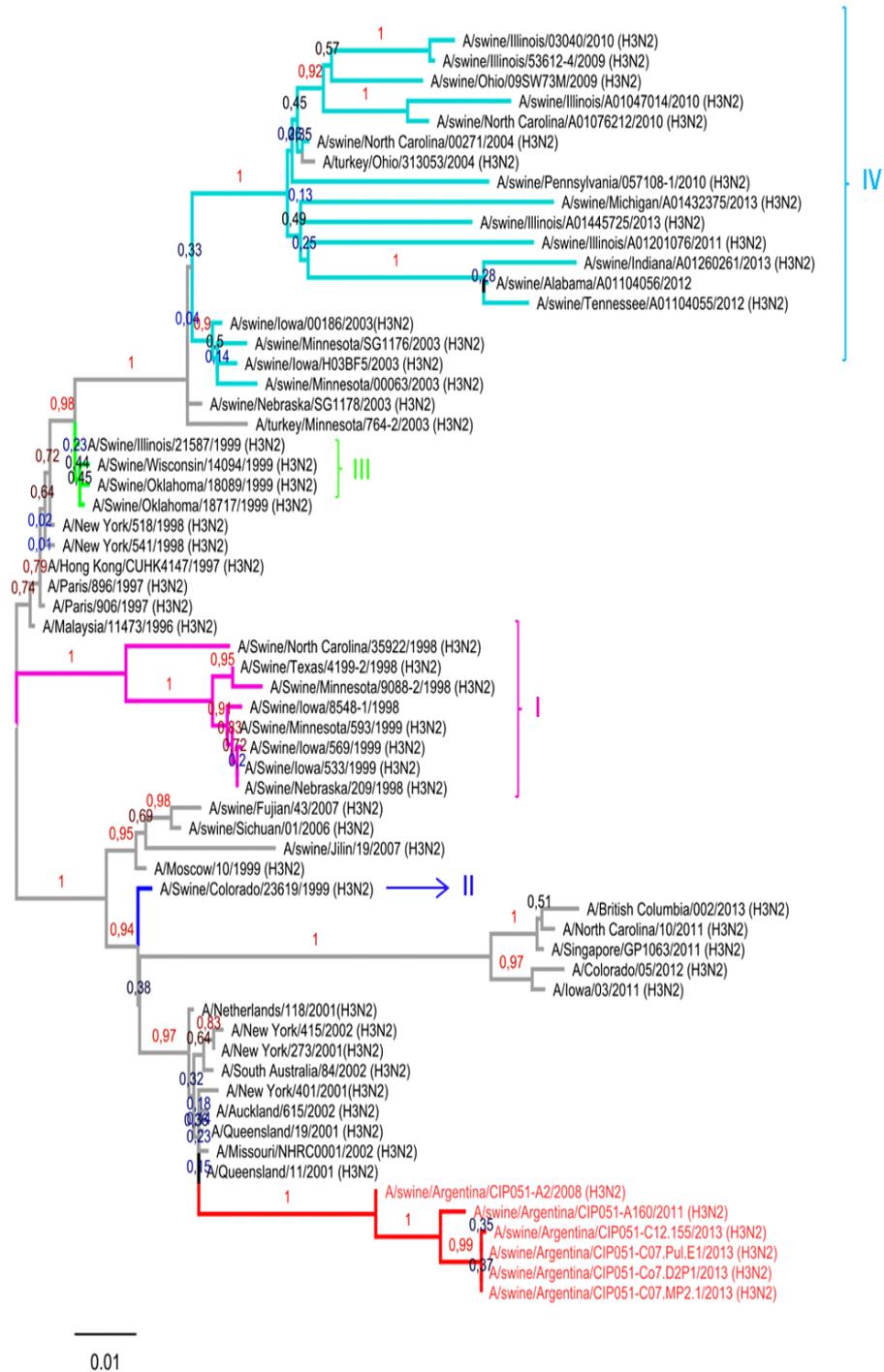


Figura 12: inferencias filogenéticas sobre el gen NA-N1.

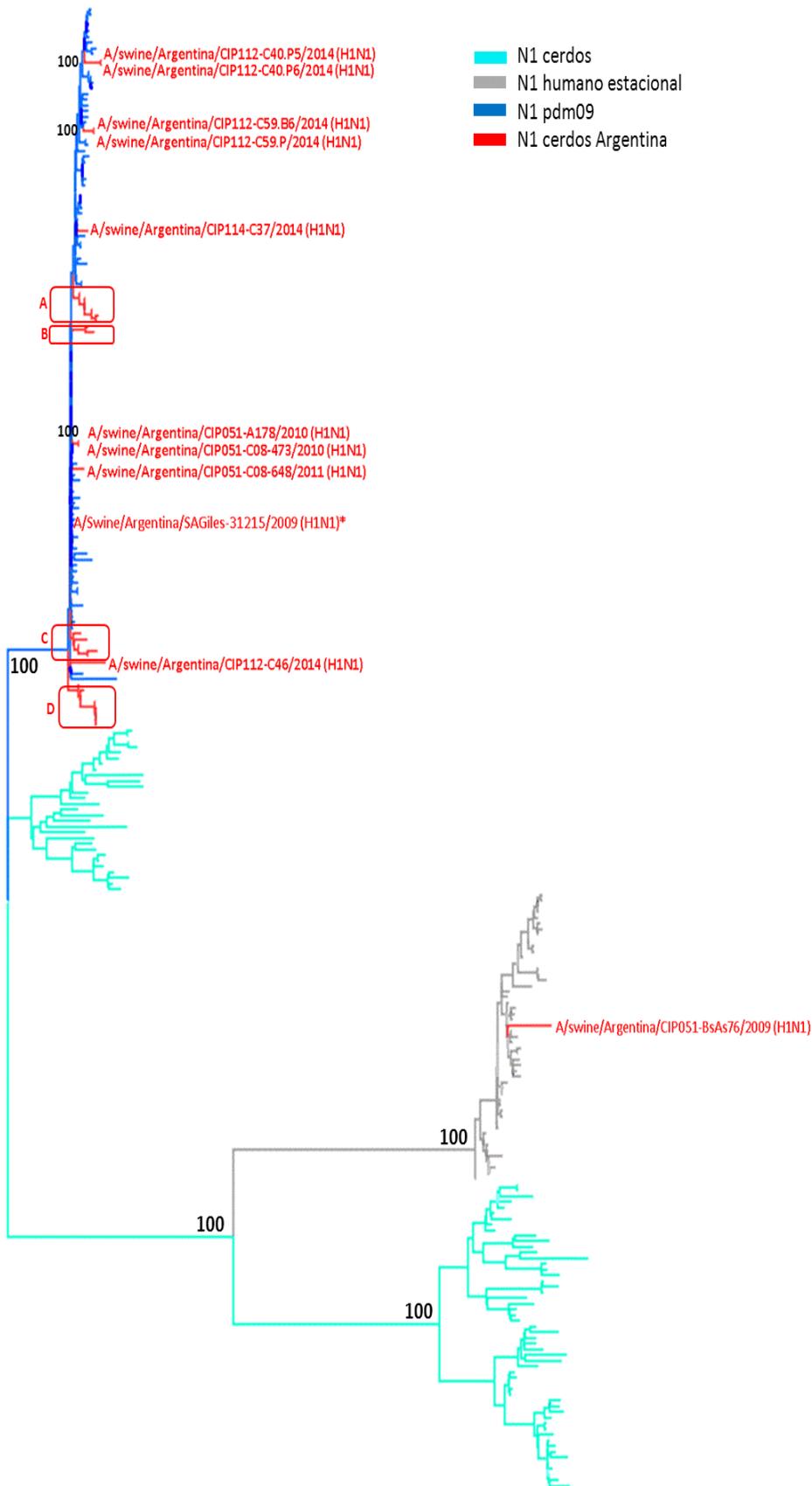


Figura13: detalle de los recuadros A, B, C y D señalados en la figura 12.

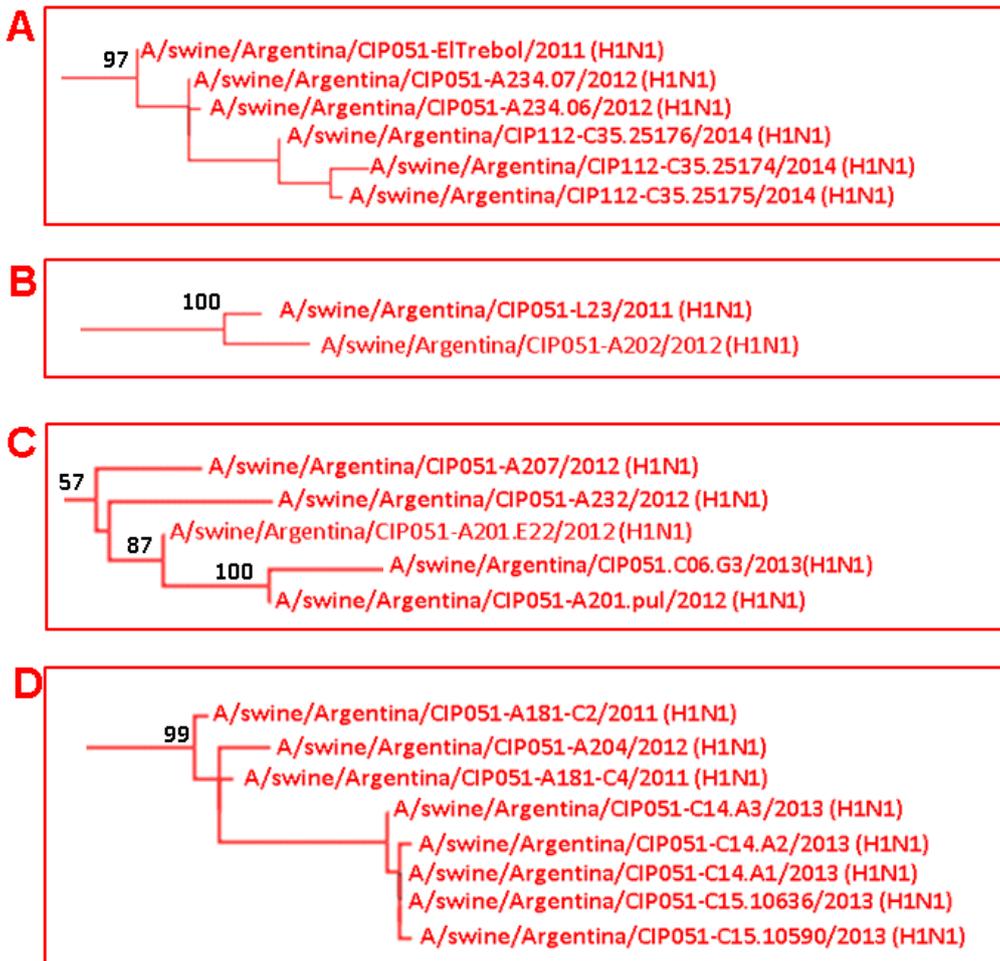


Figura 14: relaciones filogenéticas entre IAV N2 humano y N2 de cerdos de Argentina.

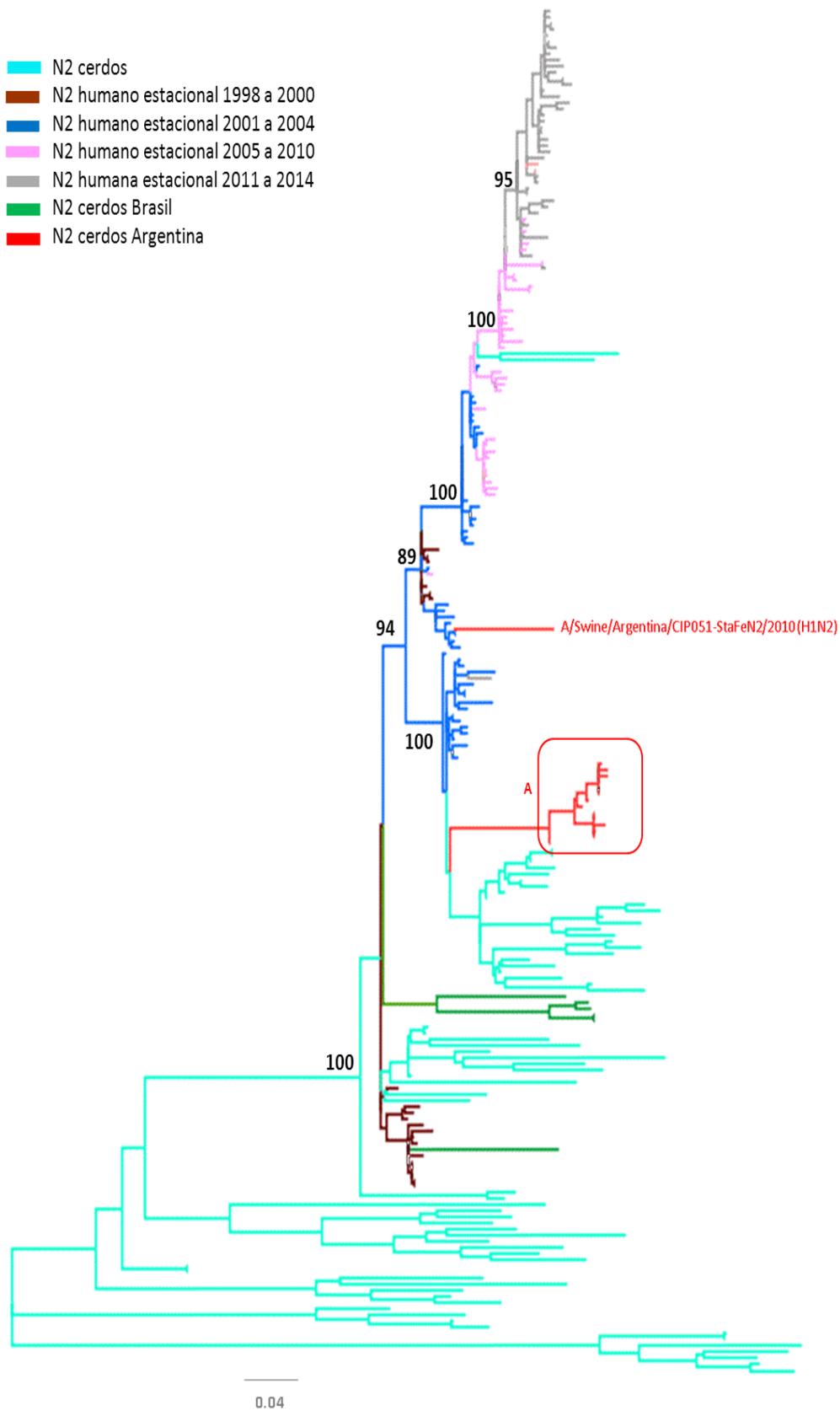


Figura 15: detalle del recuadro A señalado en la figura 14.

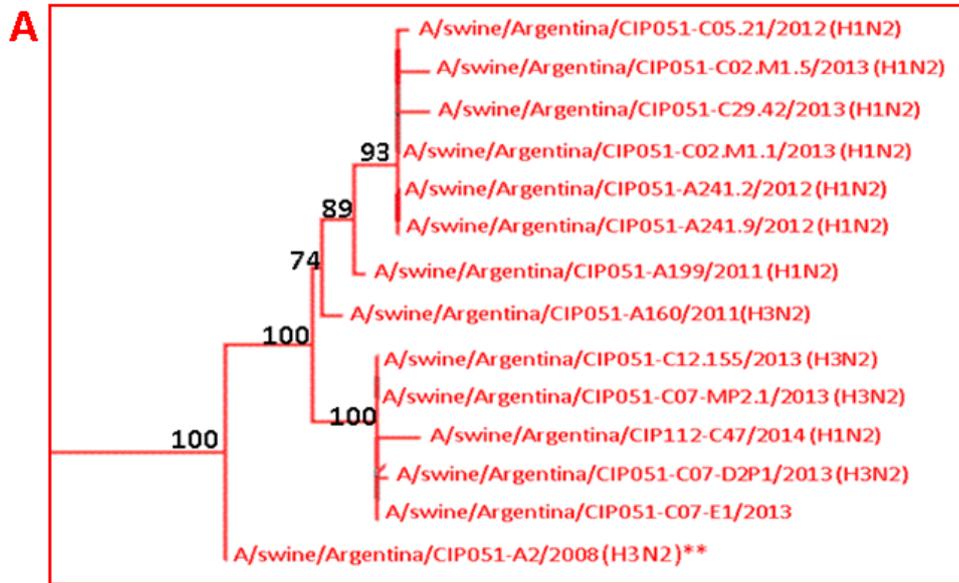


Figura 16: inferencias filogenéticas sobre el gen M.

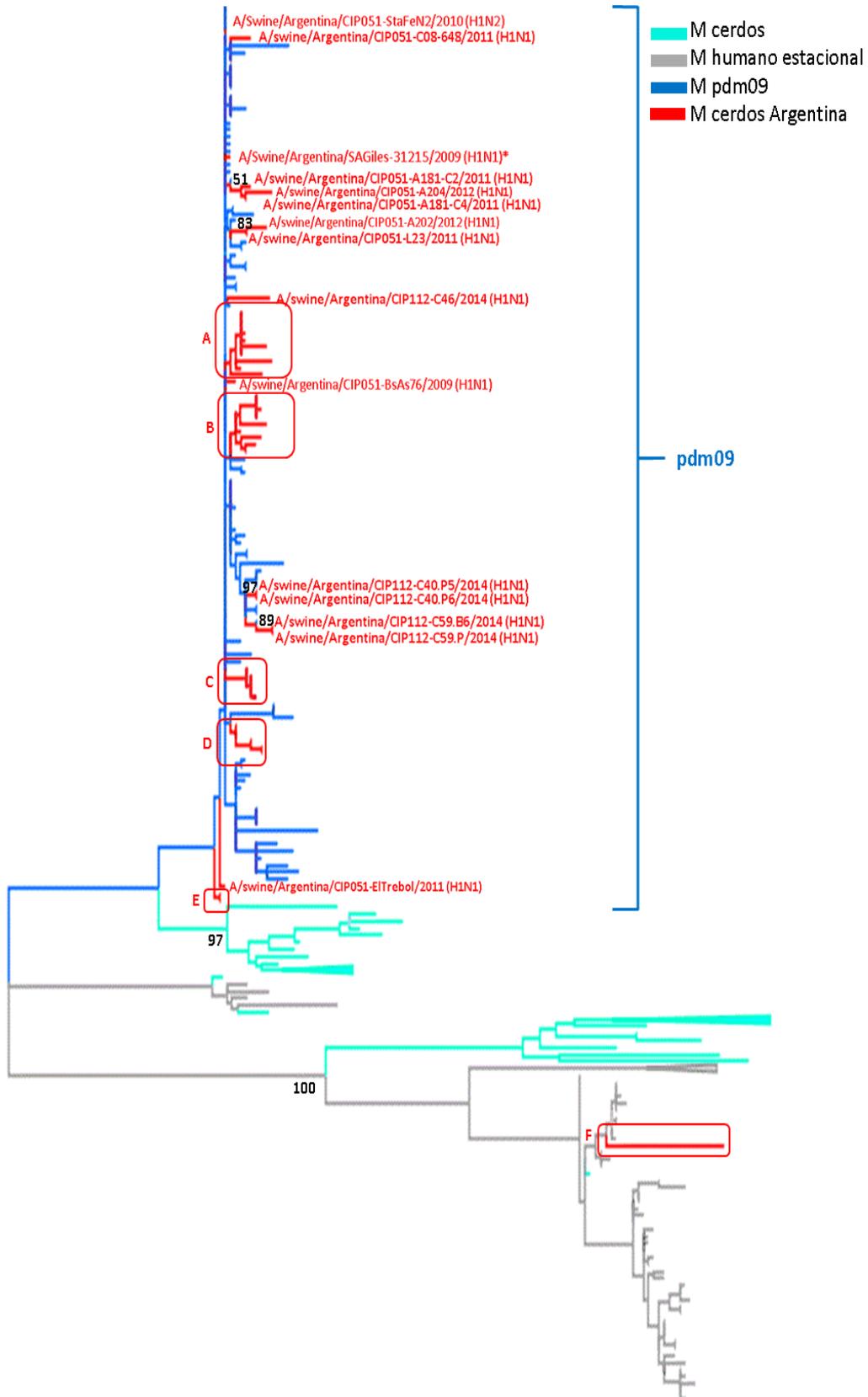


Figura 17: detalle de los recuadros A, B, C, D, E y F señalados en la figura 16.

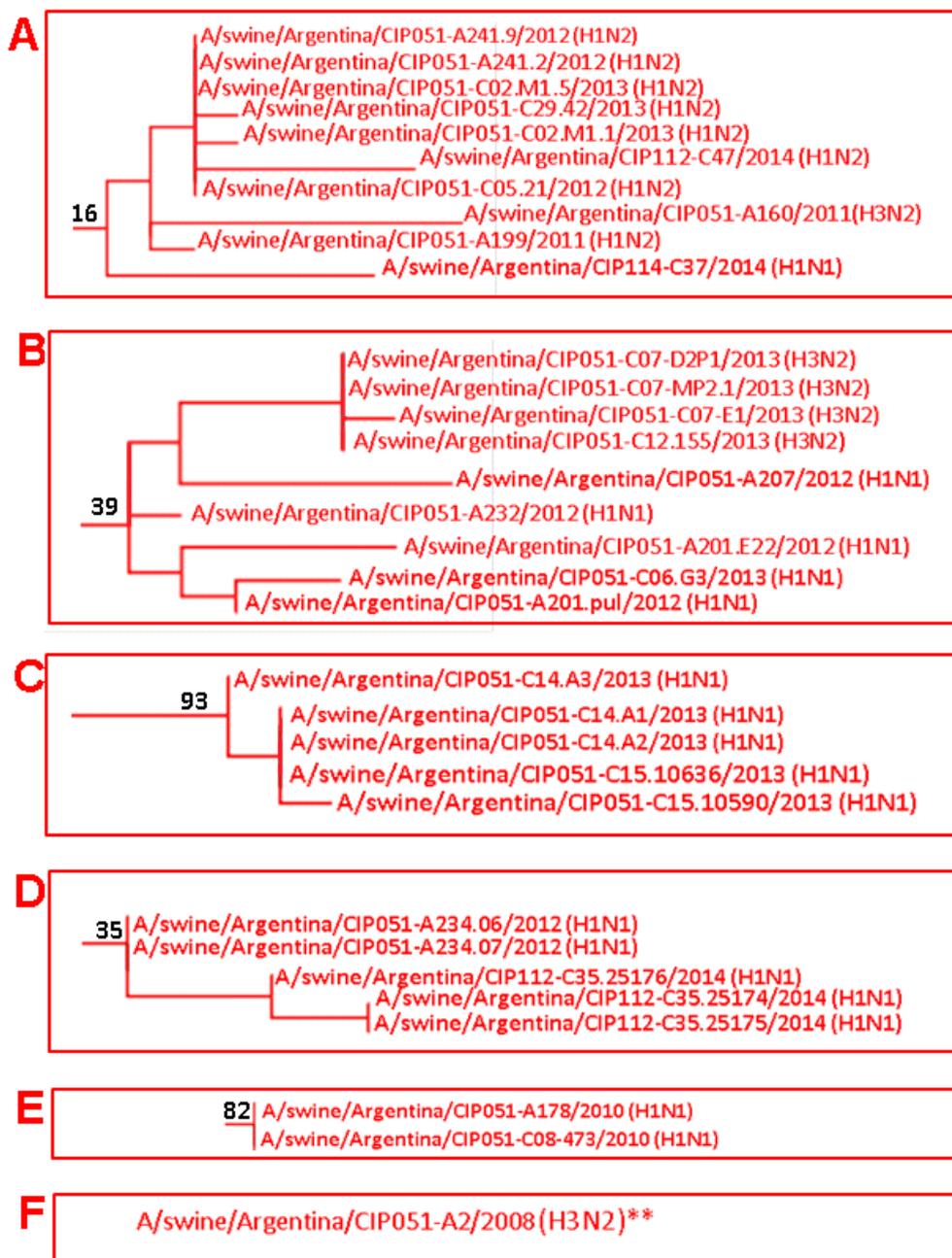


Figura 18: inferencias filogenéticas sobre el gen PB2

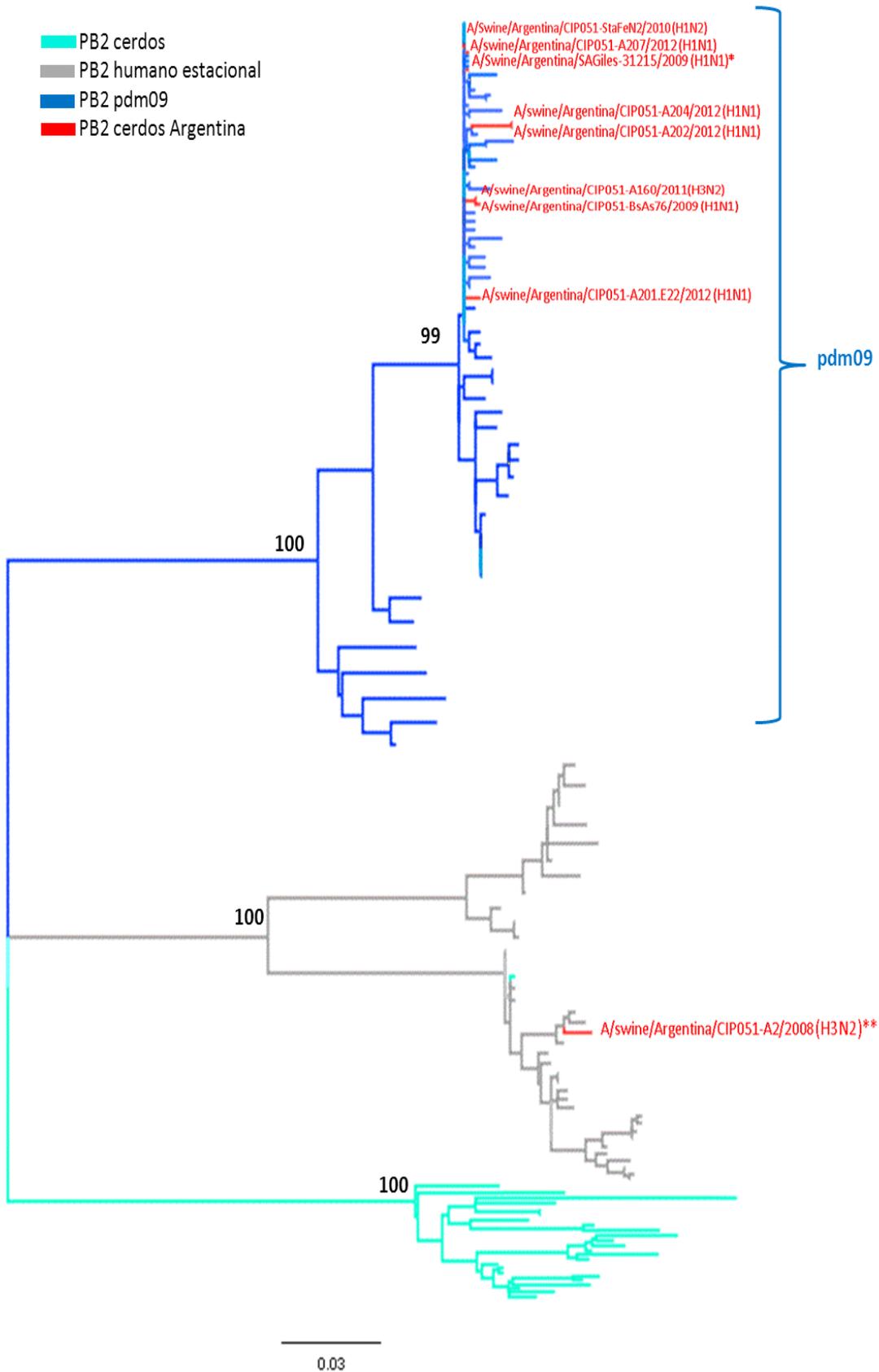


Figura 19: inferencias filogenéticas sobre el gen PB1

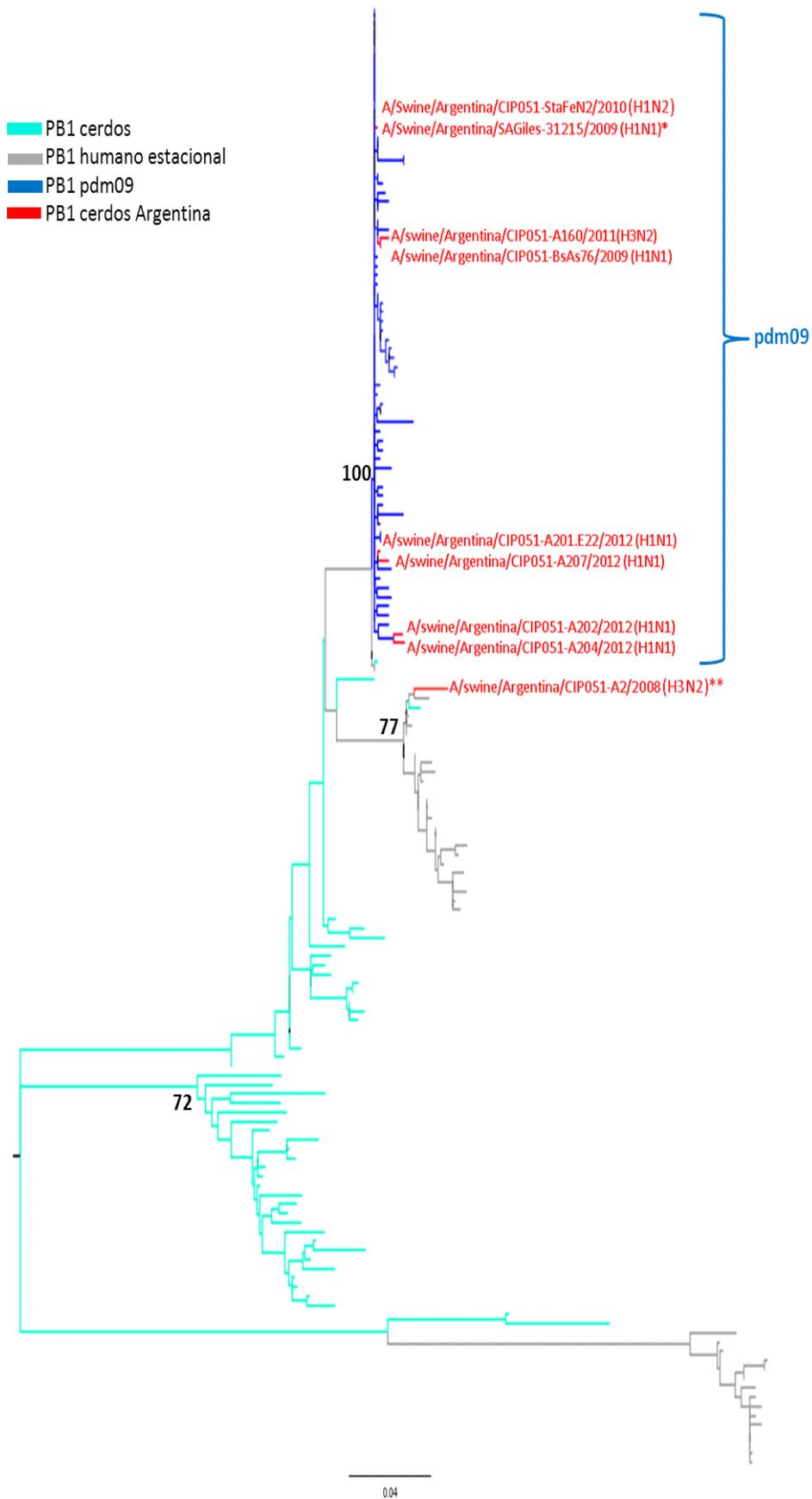


Figura 20: inferencias filogenéticas sobre el gen PA.

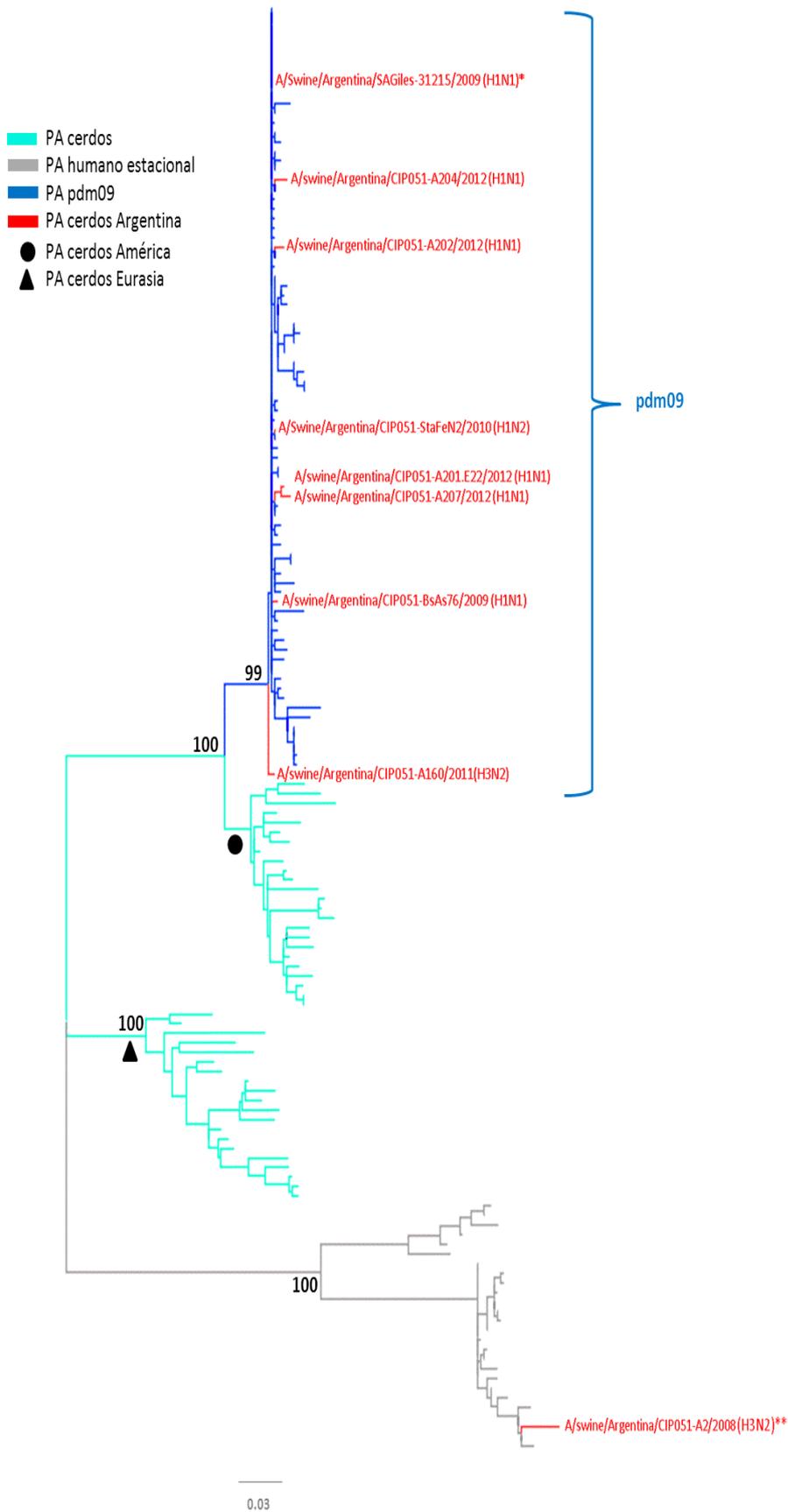


Figura 21: inferencias filogenéticas sobre el gen NP.

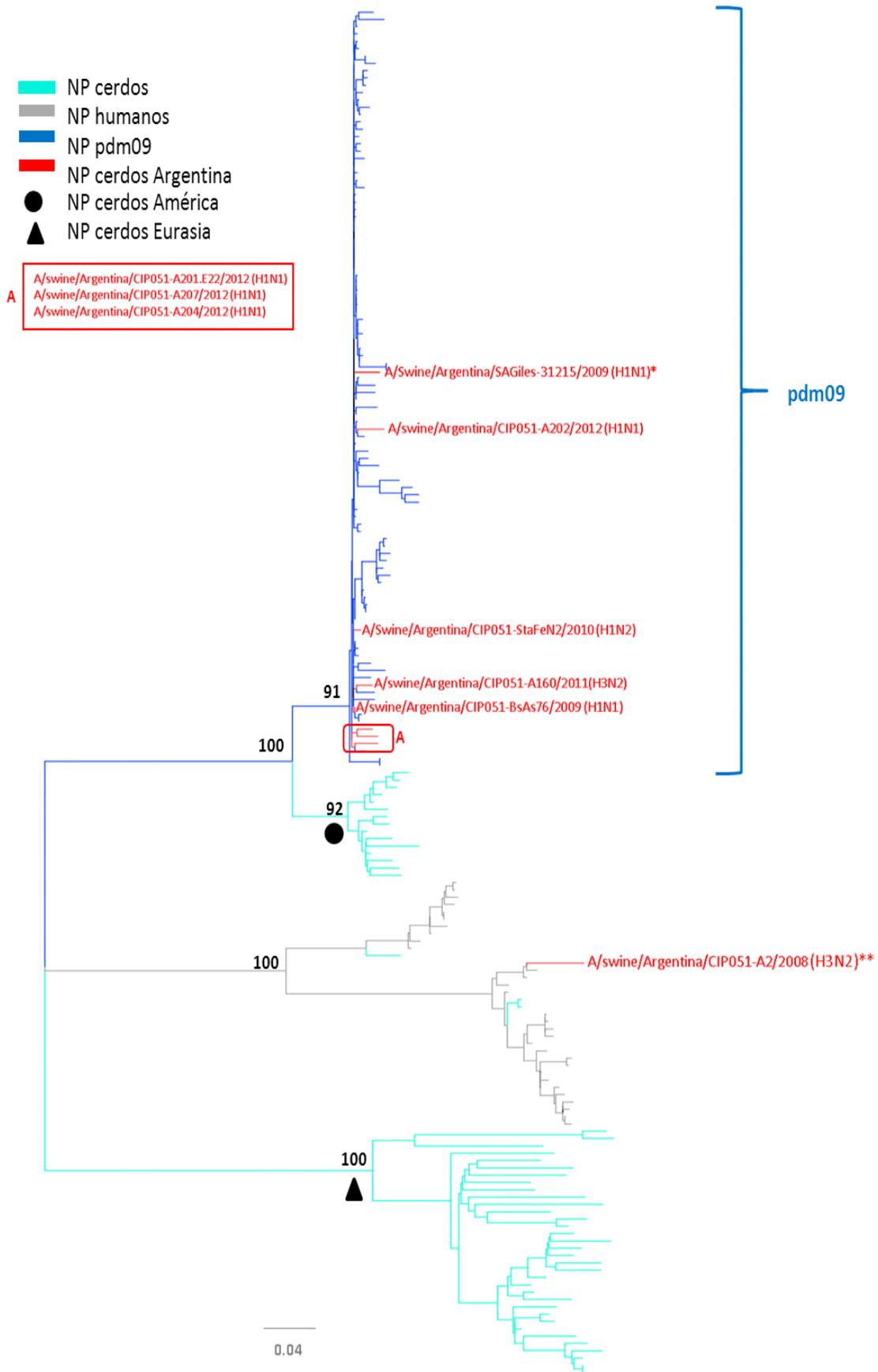
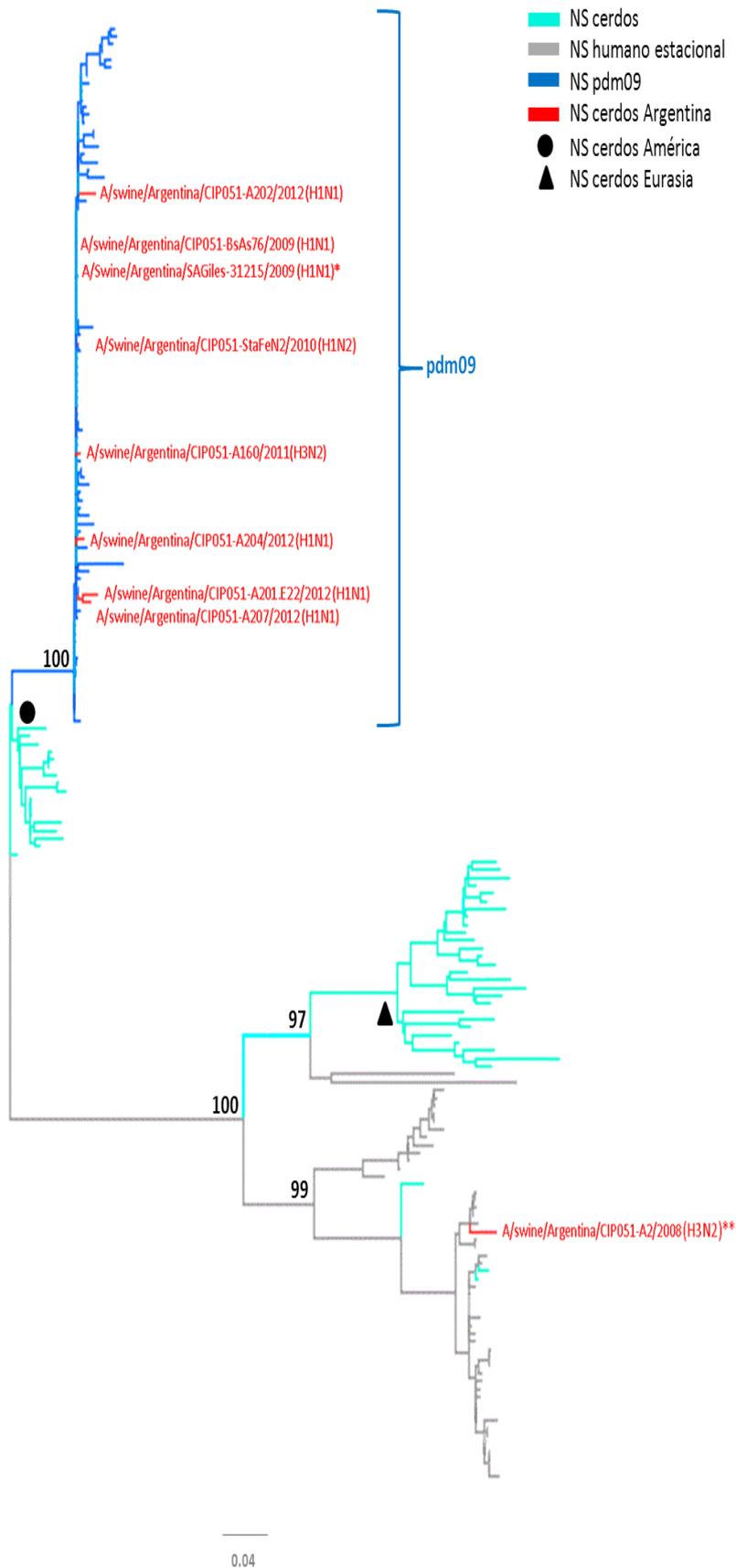


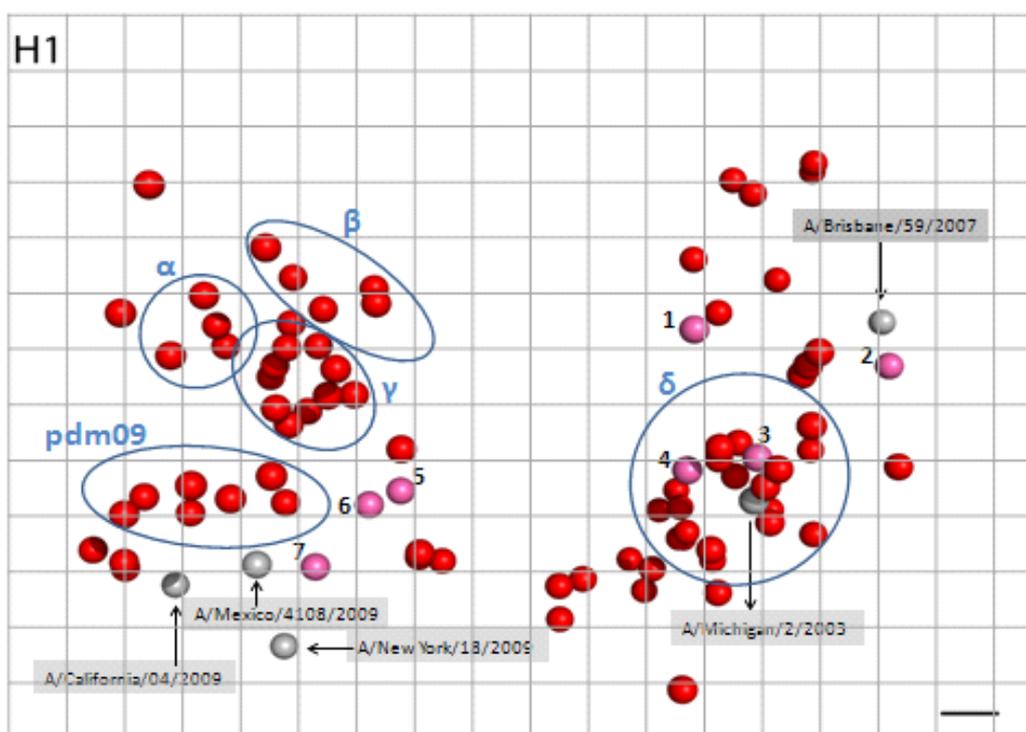
Figura 22: inferencias filogenéticas sobre el gen NS.



2. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA

Los resultados de los ensayos de IHA fueron ordenados en una tabla (anexo 2) y utilizados para la realización de los mapas de cartografía antigénica. El mapa antigénico 3D realizado con IAV H1 incluyó 7 aislamientos: 4 aislamientos “human-like” H1 y 3 aislamientos H1pdm09. Las relaciones antigénicas entre los IAV de cerdos de Argentina (esferas rosas), de Norteamérica (esferas rojas) y los antisueros de referencia (esferas grises) se observan en la Figura 23. Los distintos clusters se señalan en círculos celestes.

Figura 23: mapa antigénico de los *Influenza A virus* H1 de origen porcino.



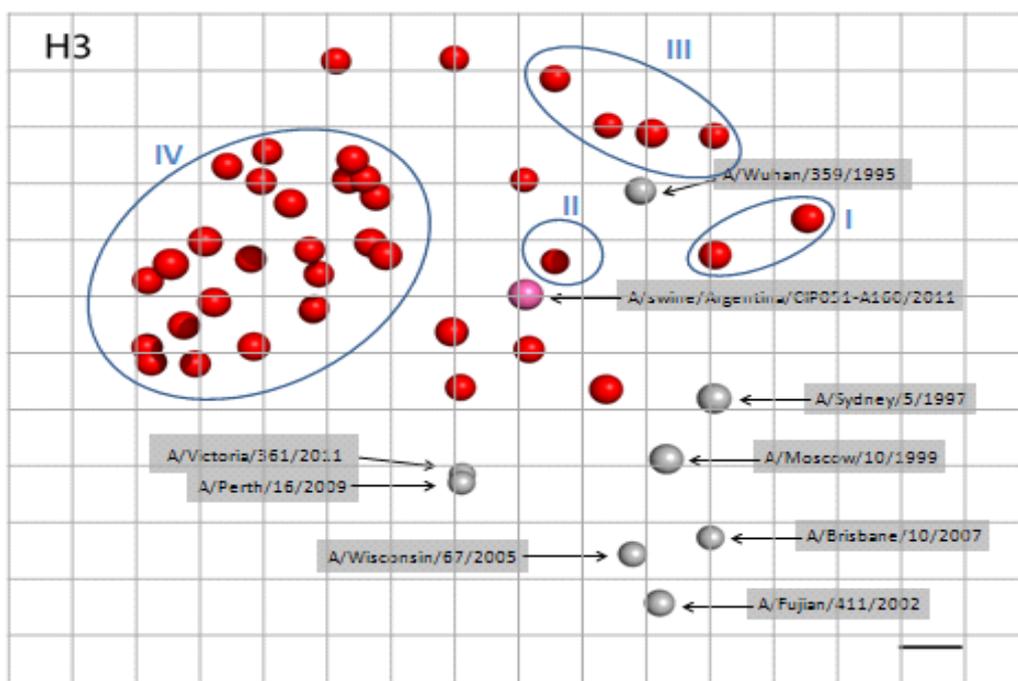
- 1 - A/swine/Argentina/CIP112-C47/2014 (δ 2H1N2)
- 2 - A/swine/Argentina/CIP051-C29.42/2013 (δ 2H1N2)
- 3 - A/swine/Argentina/CIP051-BsAs76/2009 (δ 1H1N1)
- 4 - A/swine/Argentina/StaFeN2/2010 (δ 1H1N2)
- 5 - A/swine/Argentina/CIP112-C40.P5/2014 (H1N1pdm09)
- 6 - A/swine/Argentina/SAGiles-31215/2009 (H1N1pdm09)
- 7 - A/swine/Argentina/CIP051-A204/2012 (H1N1pdm09)

El estudio reveló que los IAV “human-like” A/swine/Argentina/CIP112-C47/2014 y A/swine/Argentina/CIP051-C29.42/2013 se encuentran a 2 unidades antigénicas del virus A/swine/Argentina/CIP051-BsAs76/2009, a pesar de estar incluidos los tres dentro del mismo cluster monofilético (99% *bootstrap*) observado en los estudios de filogenia. El virus A/swine/Argentina/CIP051-C29.42/2013 mostró la mayor reactividad

cruzada con el suero de referencia A/Brisbane/59/2007. El virus A/swine/Argentina/StaFeN2/2010, clasificado filogenéticamente como “human-like” $\delta 1$ H1N2, se encuentra a una unidad antigénica del virus A/swine/Argentina/CIP051-BsAs76/2009, clasificado como “human-like” $\delta 2$ H1N1. Ambos se encuentran relacionados con el suero de referencia A/Michigan/2/2003. En relación a los virus H1N1pdm09, el mapa antigénico reveló que los IAV A/swine/Argentina/SAGiles-31215/2009 y A/swine/Argentina/CIP112-C40.P5/2014, a pesar de haber sido aislados con 5 años de diferencia, se encuentran relacionados antigénicamente (menos de una unidad antigénica). Ambos aislamientos se encuentran a 1 y 1.5 unidades antigénicas respectivamente del virus A/swine/Argentina/CIP051-A204/2012. Este último IAV se encuentra cerca del suero de referencia A/México/4108/2009 y a 2 unidades antigénicas de A/California/04/2009.

El mapa antigénico de los IAV H3 reveló que el virus A/swine/Argentina/CIP051-A160/2011 se encuentra a menos de una unidad antigénica del virus H3 Cluster II norteamericano y a más de 2 unidades antigénicas de los Clusters I, III y IV. Los antisueros de referencia A/Wuhan/359/1995 y A/Sydney/5/1997 fueron los más cercanamente relacionados, con 2 y 3 unidades antigénicas de diferencia respectivamente, mientras que el resto de los antisueros se encontró a más de 3 unidades antigénicas (Figura 24). Los distintos clusters se señalan en círculos celestes.

Figura 24: mapa antigénico de IAV H3N2 A/swine/Argentina/CIP051-A160/2011.



6. DISCUSIÓN

A. ESTUDIOS TRANSVERSALES CLÍNICOS, SEROLÓGICOS, PATOLÓGICOS Y VIROLÓGICOS EN 9 GRANJAS EN ARGENTINA

En las 9 granjas evaluadas mediante estudios clínicos, serológicos, virológicos y anatomopatológicos se observó evidencia de la infección por IAV. Debido al criterio de inclusión y el número de granjas evaluadas, los resultados de este estudio no son extrapolables al resto de la población de cerdos del país. Los resultados de este trabajo coinciden con estudios serológicos previos realizados en cerdos en el país, en donde se observaron anticuerpos contra IAV en un alto porcentaje de las granjas evaluadas (Piñeyro y col., 2010). La presentación clínico-epidemiológica observada, endémica en 8 granjas y subclínica en una granja, coincide con la reportada en otros países, donde se menciona que la presentación subclínica o endémica es más común en granjas de cerdos (Simón-Grife y col., 2011; Williamson y col., 2012; Simón y col., 2014; Corzo y col., 2013; Gronvedt y col., 2011).

El estudio se realizó entre los meses de enero a abril de 2011, un año con temperaturas extremadamente altas para esos meses en nuestro país. Además, los veterinarios o responsables de las granjas, reportaron la presencia de signos clínicos a lo largo de todo el año. Estos resultados difieren del patrón estacional reportado en el hemisferio norte en años previos a la pandemia humana del año 2009 (Olsen y col., 2006a) y se asemejan a lo reportado en estudios más recientes (Kyriakis y col., 2011; Harder y col., 2013). Las razones de estas diferencias podrían deberse a:

- 1) reinfección a lo largo del año con cepas antigénicamente diferentes
- 2) el manejo del ambiente (ambientes controlados) utilizado en las granjas con manejo intensivo como las evaluadas en este estudio
- 3) la presencia continua de cerdos susceptibles (*naive*) dentro de las granjas

Los resultados serológicos obtenidos en este trabajo, detectaron anticuerpos anti influenza A en todas las granjas, sin embargo la seroprevalencia dentro de las granjas fue variable, con valores que oscilaron entre 7,1% y 79,35%. Los valores de seroprevalencia en madres y animales de engorde fueron de 66,4% y 65% respectivamente. Estudios previos llevados a cabo en Argentina reportaron valores inferiores de cerdos seropositivos (Piñeyro y col., 2010.) Estudios realizados en España reportaron valores inferiores (López-Soria y col., 2010) o similares, donde se detectaron anticuerpos contra influenza A por ELISA en el 93,9% de las granjas evaluadas (Simón-Grife y col., 2011). Un estudio nacional realizado en Inglaterra detectó anticuerpos contra influenza A en el 52% de las granjas evaluadas (Mastín y

col., 2011). Ambos estudios reportaron que la seroprevalencia entre granjas fue variable, con valores desde 4 al 100% (Simón-Grife y col., 2011; Mastín y col., 2011). De todas formas, debe considerarse que las diferencias entre estudios podrían estar sujetas a diferencias en los antígenos y test utilizados, al grado de transmisión del virus, a las características de las granjas (uno y múltiples sitios, nivel de bioseguridad, flujo de animales, política de reemplazo de hembras) o a la diseminación de la infección por IAV en granjas de cerdos luego de la pandemia del 2009, tal como sugieren los resultados del ensayo de IHA y estudios más recientes de otros países (Simón-Grife y col., 2011; López-Soria y col., 2010; Kyriakis y col., 2011; Harder y col., 2013). Cabe resaltar que ninguno de los trabajos mencionados se realizó en granjas que vacunaban contra influenza. Además, en Argentina, al momento de la realización de este estudio no estaba permitida la vacunación de cerdos contra *Influenza A virus*. Desde un punto de vista serológico, en las granjas analizadas, se observaron dos patrones de infección. En el primero, detectado en dos granjas, el bajo porcentaje de reproductoras seropositivas (menor al 50%) y el escaso porcentaje de animales positivos en la línea de producción sugiere una infección pasada con IAV en el plantel reproductor. Este bajo porcentaje y/o ausencia de anticuerpos hace que la población sea más susceptible ante un nuevo contacto con IAV. Por el contrario, el segundo patrón, observado en las restantes 7 granjas, muestra el descenso de los anticuerpos maternos entre los 21 y 49 días y una posterior seroconversión. Esta seroconversión se asociaría con una circulación viral activa, hecho demostrado, ya que en la mayoría de estas granjas (6 granjas) se detectó IAV mediante rRT-PCR entre estas edades, además de detectarse en la etapa de terminación. Debe tenerse en cuenta que los lechones con anticuerpos calostrales pueden infectarse con IAV (Loeffen y col., 2003; Rose y col., 2013), ya sea a partir de animales de la misma edad, de más edad o de otras fuentes del virus, y que estos virus podrían transmitirse luego a lo largo de toda la etapa de crecimiento. Un pequeño grupo de cerdos de destete infectados podrían actuar de fuente de mantenimiento del virus y así transportarlo a las unidades de producción distantes o mantenerlo dentro de la misma unidad de producción y generar reinfecciones permanentemente, aún en ausencia de cuadro clínico (Allerson y col., 2013; Rose y col., 2013; Corzo y col., 2013). El uso de vacunas en madres podría disminuir la transmisión del virus en algunos casos (Allerson y col., 2013). Sin embargo, para impedir completamente la transmisión del virus dentro de la granja, sería necesario evaluar el nivel de antigenicidad cruzada de las cepas vacunales con las cepas locales circulantes (Matthew y col., 2015).

En este estudio, los antígenos utilizados para los ensayos de IHA, fueron cepas aisladas en este trabajo o en trabajos previos realizados en cerdos en Argentina

(Pereda y col., 2010; Cappuccio y col., 2011). Por este motivo, los resultados obtenidos podrían considerarse representativos de los subtipos circulantes en cerdos en Argentina. Sin embargo, el escaso número de muestras y la escasa representatividad de las mismas, hace necesario estudios más abarcativos para una mejor aproximación. Tal como se expresó anteriormente, el no uso de vacunación al momento del estudio, permitió que los resultados reflejen la situación de infección en granjas no vacunadas. Los resultados de este ensayo demuestran la infección por IAV de diferentes subtipos (H1pdm09, δ 1H1, δ 2H1, H3) en las granjas evaluadas. Sin embargo, al igual que lo reportado en otras partes del mundo, la frecuencia de detección de anticuerpos contra cada cepa varía (Simón Grife y col., 2011; Lopez-Soria y col., 2010; Maldonado y col., 2006; Pascua y col., 2008). Sumado a esto, coincidente con lo reportado en muchas partes del mundo, cerca del 80% de los sueros analizados poseen anticuerpos contra dos o más subtipos (Simón Grife y col., 2011; Pascua y col., 2008; Mastín y col., 2011; Liu y col., 2011). Los resultados de la IHA indican la posible co circulación de diferentes subtipos de IAV en las granjas estudiadas y por lo tanto la posibilidad de eventos de reasociación (Simón Grife y col., 2011; Pascua y col., 2008).

El TGM observado en los ensayos de IHA fue diferente entre las granjas y categorías evaluadas. En madres, los valores de TGM fueron superiores en relación a los valores de TGM observados en animales de 160 días. La falta de inmunidad homogénea en las categorías evaluadas alerta acerca de la continua presencia de sub poblaciones no inmunes y por lo tanto susceptibles, tal como se expresó anteriormente. Esta situación favorece la persistencia de la infección en las granjas, en concordancia con estudios realizados por otros autores (Kyriakis y col., 2011; Simón-Grife y col., 2011; Lopez-Soria y col., 2010; Loeffen y col., 2003).

En relación a los estudios histopatológicos, se observó evidencia de lesiones causadas por IAV en ocho casos. *Influenza A virus* fue aislado en cuatro de estos casos y solamente uno fue positivo por inmunohistoquímica. Estos resultados podrían atribuirse al hecho de que estas muestras fueron tomadas de animales hallados muertos al momento de la visita que no fueron seleccionados (presencia de signos clínicos), como así también a la baja carga de virus en las vías aéreas, particularmente a nivel de los bronquiólos, lugar de multiplicación inicial de IAV. Se observó una mayor detección de IAV por rRT-PCR a partir de muestras de pulmones con lesión, al igual que lo reportado en otros estudios (Williamson y col., 2012; Maldonado y col., 2006; Pascua y col., 2008). Estos resultados indican que el envío de muestras para aislamiento viral a partir de pulmones con lesiones de neumonía aumentaría la probabilidad de detección de IAV.

En seis de las nueve granjas estudiadas se detectó IAV a partir de hisopos nasales en cerdos en edades donde no se observaron signos clínicos. Las tasas de detección de IAV mediante rRT-PCR fueron similares a las observadas en estudios previos (Williamson y col., 2012; Maldonado y col., 2006). La detección de IAV en infecciones subclínicas es considerada una de las principales ventajas de la vigilancia activa. Cabe destacar que una de las fuentes de ingreso más importantes de IAV es a través del ingreso de hembras de reemplazo o el movimiento de animales infectados de manera subclínica. Además, estas infecciones suponen un riesgo para la salud pública, ya que el hombre podría infectarse al estar en contacto con animales asintomáticos pero que se encuentran excretando suficientes partículas virales (Myers y col., 2007; Gray y cols., 2007; Newman y col., 2008). Esto indica que la vigilancia activa es una herramienta muy útil que debería implementarse junto a la vigilancia pasiva para una correcta caracterización de la infección por IAV en cerdos, como así también en otras especies (Simon-Gaëlle y col., 2014; Ferreidoni y col., 2012; Corzo y col., 2013; Kaplan y cols., 2015).

En este estudio, la mayoría de los IAV aislados fueron caracterizados como subtipo H1N1pdm09. Además, el único subtipo reasortante H3N2 de origen humano, posee todos los genes internos de origen pdm09. La granja en la cual se aisló dicho virus posee antecedentes de infección por un subtipo H3N2 completamente humano (Cappuccio y col., 2011). Estos hallazgos sugieren que el subtipo H1N1pdm09 se ha establecido de manera endémica y que sus genes internos se mantienen en la población de cerdos por medio de eventos de reasociación genética, lo que favorece su adaptación en el hospedador porcino. Este hecho coincide con lo reportado en otras partes del mundo (OFFLU, 2014a; Anderson y col, 2013; Liu y col., 2012; Vijaykrishna y col., 2011).

B. ESTUDIOS CLÍNICOS Y VIROLÓGICOS REALIZADOS ANTE LA PRESENCIA DE CUADROS COMPATIBLES CON INFECCIÓN POR IAV EN CERDOS

La visita a establecimientos ante el reporte de casos clínicos compatibles con infección por IAV permitió una mejor caracterización de la forma de presentación del virus de lo previamente evaluado. Esto se debió a que se agregaron más establecimientos a los evaluados anteriormente (estudio transversal) y que, en este estudio, todos los establecimientos solicitaban el diagnóstico dado la presencia de cuadros clínicos respiratorios. Los cuadros epidémicos fueron observados en cuatro establecimientos, ninguno de ellos reportó antecedentes de cuadros clínicos compatibles con infección por IAV. Esta presentación clínica podría asociarse al ingreso de un nuevo subtipo viral en el establecimiento, a la pérdida de inmunidad asociada a alta tasa de reposición de hembras o a la pérdida de inmunidad por algún factor concomitante no evaluado (Brown y col., 2002, Forgie y col., 2011; Olsen y col., 2006a). En tres de estos establecimientos se observó un factor de riesgo común. El mismo fue la alta tasa de reposición de cachorras, asociado a cambios de líneas genéticas para mejoras productivas o despoblaciones totales o parciales con el objetivo de erradicar otra enfermedad, sin previa cuarentena. El rol de los reproductores como fuente de ingreso y/o mantenimiento de IAV en los establecimientos se conoce desde hace tiempo y está aún vigente (Corzo y col., 2013; Olsen y col., 2006a; Olsen y col., 2002; Forgie y col., 2011; Díaz y col., 2015). Tal es así que en un estudio realizado en hembras de reposición a lo largo de un año, se demostró la co existencia de múltiples subtipos de IAV y el rol de las cachorras de reposición como fuente de mantenimiento del virus (Díaz y col., 2015). Reforzando este concepto, en la granja 4, el cuadro se presentó la semana posterior al ingreso de cachorras de reemplazo. Además, el cuadro se asoció con IAV subtipo reasortante H3N2. Este virus presentó una homología de más del 99% con un IAV aislado previamente en una granja distante 176 km. Esta granja fue la que proveyó las cachorras de reemplazo a la granja 4. Si bien no se evaluaron otras posibles fuentes de ingreso, la alta homología entre ambos virus, y el hecho de que el único contacto entre ambas granjas fue la compra de reproductores, sugiere que las cachorras de reemplazo fueron la fuente de ingreso del virus. El restante cuadro epidémico se observó en una granja nueva, con sistema de producción en sitios múltiples y todo dentro-todo fuera. Los animales afectados tenían entre 35 y 50 días de vida. Esos lechones nacieron todos de madres primerizas y fueron los primeros animales criados en el establecimiento. En esta situación particular, ante la pérdida y/o

el bajo título de anticuerpos colostrales y el no contacto con otros cerdos, estos animales habrían sido susceptibles a la infección y cuadro clínico epidémico con IAV de origen porcino o humano (Forgie y col., 2011; Olsen y col., 2006a).

Similar a lo observado en los estudios transversales del apartado A, la presentación endémica sigue siendo la más frecuentemente observada y la edad de presentación más frecuente fue entre los 30 y 60 días de vida. Cinco de las granjas evaluadas tenían antecedentes de diagnóstico de IAV. Estos antecedentes explicarían el carácter endémico de la presentación (Brown y col., 2002; Forgie y col., 2011; Olsen y col., 2006a). Cabe destacar que, el empleo de medidas de manejo y control aplicadas en granjas porcinas, medidas de bioseguridad interna y externa, cuarentena, vacunación del personal, sistemas todo dentro-todo fuera, etc, serían insuficientes para prevenir la transmisión e infección por IAV dentro de las granjas (Anderson y col., 2013).

En relación a la edad de presentación de los signos clínicos, si bien se observó relación entre ésta y la edad de detección del virus por rRT-PCR (al igual que lo observado en los estudios transversales del apartado A), se detectó IAV en edades distintas a las del cuadro clínico, a partir de animales de necropsia. La falta de relación entre la detección viral y la presentación clínica, fue reportada por Corzo (Corzo y col., 2013). En sus estudios detectó presencia del virus tanto en animales con y sin signos, como así también con y sin vacunación asociando esta detección a la toma de muestras al inicio o, en el caso de las necropsias, al final del cuadro, cuando ya los signos clínicos no están presentes (Corzo y col., 2013). La detección de IAV en lechones inmediatamente luego del destete fue reportada en varios trabajos. La presencia de poblaciones de animales que están con diferentes niveles de anticuerpos (animales con anticuerpos maternos en descenso, animales con infección activa y sin anticuerpos, animales susceptibles), sería un factor muy importante en el mantenimiento de la infección dentro de una granja (Allerson y col., 2013; Allerson y col., 2014; Corzo y col., 2013; Van Reeth y col., 2012)

Al igual que en el resto de los estudios realizados en este trabajo, se obtuvo un mayor porcentaje de subtipos caracterizados como H1N1pdm09. Sumado a esto, se pudo observar nuevamente un evento de reasociación entre subtipos de IAV, ya que se aisló un subtipo reasortante “human-like” H1N2 resultante de la combinación de los subtipos humanos H3N2, H1N1 y H1N1pdm09. Esto coincide con reportes recientes de estudios realizados en cerdos de EE.UU, donde el 40% de los aislamientos porcinos son resultantes de eventos de reasociación entre IAV H1N1 y H1N2 y virus humanos estacionales, remarcando nuevamente el importante rol del ser humano en la epidemiología de IAV (Anderson y col., 2015).

C. EVALUACIÓN DE LA CIRCULACIÓN DE IAV EN CERDOS EN PEQUEÑOS PRODUCTORES/PRODUCTORES FAMILIARES CON BAJO NIVEL DE TECNIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

Los estudios realizados en granjas de cerdos de pequeños productores/productores familiares de Argentina coinciden con lo reportado en otras partes del mundo en relación a la circulación endémica de IAV, independientemente del grado de tecnificación (Saavedra-Montañez y col., 2013; Tinoco y col., 2015; Torremorell y col., 2012). Los porcentajes de animales seropositivos fueron mayores, para el subtipo H1pdm09, que los reportados en México y Perú (Saavedra-Montañez y col., 2013; Tinoco y col., 2015). Si bien estos resultados no son comparables dado la variación entre laboratorios de la técnica utilizada (IHA) y las características de los establecimientos relevados en cada uno de los estudios, estos valores sugieren un mayor contacto con este subtipo de los cerdos de pequeñas explotaciones en nuestro país. Este resultado coincide con los datos obtenidos en los estudios realizados en explotaciones más tecnificadas, en las cuales se observó un predominio en la circulación del subtipo H1pdm09. Cabe destacar que el estudio realizado en México, detectó el mayor porcentaje de cerdos seropositivos al subtipo H1pdm09 en el año 2000, previo a la pandemia, lo que sugiere que este estrato productivo pudo haber participado en la generación de este IAV (Saavedra-Montañez y col., 2013). La transmisión humano-cerdo en estos sistemas de producción quedó evidenciada en el estudio realizado en Perú, donde el mayor porcentaje de cerdos seropositivos a subtipo H1pdm09 coincidió con el pico de la pandemia en humanos. En el año posterior se observó un marcado descenso en el porcentaje de animales seropositivos (Tinoco y col., 2015). En relación a la circulación del subtipo H3, la misma fue escasa (17% de las granjas, 2% de los animales), estos bajos porcentajes difieren de los reportados en México (Saavedra-Montañez y col., 2013) y se asocian a la baja circulación de este subtipo en la población porcina detectada en nuestro país. Hay que destacar que, al momento de planificar este estudio, se seleccionaron los dos subtipos de IAV aislados previamente en el país, no realizándose estudios contra otros subtipos. Por lo cual, no puede descartarse la circulación de otros subtipos de IAV.

La circulación de IAV observada en nuestro trabajo fue mayor en los establecimientos más grandes y con mayor grado de tecnificación, lo cual coincide con sistemas de producción de ciclo completo. Este hecho podría estar asociado al mayor número de animales dentro de un establecimiento y a la mayor densidad animal por m². Ambos factores favorecen el contacto entre los animales y la transmisión de IAV. Además, en

las granjas que producen capones, el tiempo de permanencia para llegar a venta es más prolongado (5 meses y medio) lo que aumentaría el riesgo de exposición al IAV (Shope y col., 1931; Van Reeth y col., 2012). La transmisión por medio de fómites cobra importancia en estos establecimientos, de más de 50 madres, más tecnificados, ya que el hombre suele tener un mayor contacto con los animales, debido al empleo de diversas técnicas de manejo que se aplican como ser la castración, la vacunación, la alimentación, inseminación artificial, entre otras. Esto aumentaría las probabilidades de transmisión de IAV dentro de la granja, como así también la transmisión desde humanos a cerdos y el riesgo de re introducciones de IAV (Allerson y col., 2013). Sumado a esto, los sistemas productivos de ciclo completo cuentan con animales de diferentes edades y diferentes niveles de inmunidad, lo que aumentaría el riesgo de transmisión de IAV dentro de la granja (Allerson y col., 2014; Corzo y col., 2014; Simón-Grifé y col., 2012; Rosé y col., 2013). Otro factor de riesgo que presentan estos establecimientos es que realizan compra de reproductores a granjas intensivas entre dos y tres veces al año. Ninguno de los establecimientos de este estrato realizaba la cuarentena alejada de la granja, siendo esta una de las principales vías de ingreso de IAV (Van Reeth y col., 2012; Olsen y col., 2006a; Allerson y col., 2014).

La detección de IAV por rRT-PCR se realizó solo a partir de animales sintomáticos, siendo positiva sólo una granja. Estos resultados podrían estar relacionados a las características de las granjas evaluadas, de un solo sitio y sistemas continuos de producción. En estas condiciones, la infección por IAV se diseminaría rápidamente por toda la población, generando, por un lado una respuesta inmune muy rápida y por el otro, que la infección sea autolimitante (Torremorel y col., 2012).

Si bien los resultados obtenidos no son extrapolables, por el tipo de muestreo (sesgado y no representativo), se observó la circulación de IAV en granjas porcinas familiares/pequeñas. Este estrato productivo, que representa el 98,53% del total de establecimientos porcinos de Argentina, no suele ser considerado al momento de los relevamientos sanitarios y podría ser una potencial fuente de mantenimiento de IAV en cerdos que tienen contacto estrecho con humanos con el consiguiente riesgo tanto para las explotaciones porcinas como para la salud pública.

D. DETECCIÓN DE IAV EN MUESTRAS DE CERDOS REMITIDAS AL CICVyA INTA POR ORGANISMOS PÚBLICOS Y ASESORES VETERINARIOS: PERÍODO 2010 A 2014

El relevamiento de IAV en cerdos realizada por organismos públicos y asesores veterinarios, permitió abarcar un mayor número de provincias y de establecimientos porcinos de Argentina.

Tanto en los estudios de casos clínicos compatibles con infección por IAV como en el diagnóstico de muestras remitidas al laboratorio (consideradas ambas estrategias como vigilancia pasiva de IAV), el porcentaje de detección por rRT-PCR fue superior en comparación con los estudios de vigilancia activa (estudios transversales, apartado A). Esta mejora en la sensibilidad de la detección viral estaría relacionada con la estrategia de toma de muestras empleada. Los estudios de vigilancia pasiva se realizan ante casos clínicos compatibles, en aquellas edades o animales con signos clínicos, o lesiones sugestivas de infección por IAV. Esta estrategia incrementó la eficiencia de detección de IAV, tal como fue reportado por otros autores (Simon y col., 2014). Este aumento en la detección se relacionaría con la búsqueda del virus en las edades más susceptibles, en animales con signos clínicos que excretan virus por un corto período de tiempo, de 5 a 11 días (Corzo y col., 2013; Cappuccio y col., 2011; Torremorel y col., 2012). Por otro lado, a pesar de su menor tasa de detección viral, la estrategia de vigilancia activa, fue sugerida como la adecuada por la OFFLU e implementada por muchos países luego de la pandemia del 2009 (Simón y col., 2014; OFFLU, 2013). Esta estrategia se basa en el hecho de que tanto la eliminación del virus por nariz como la detección viral es más consistente en la etapa temprana de infección y que podría ocurrir inclusive antes de la aparición de los signos clínicos o en ausencia de los mismos (OFFLU, 2013; Welsh y col., 2010). Diversos estudios mostraron que la infección subclínica asociada a IAV es más frecuente que los cuadros clínicos (Martin-Valls y col., 2014; Simon-Grifé y col., 2011; Simon-Grifé y col., 2012). Los IAV que circulan en cerdos de manera subclínica podrían adaptarse y evolucionar dando lugar a nuevos subtipos potencialmente más patógenos, tanto para el cerdo como para el hombre (Nelson y col., 2015).

El patrón no estacional observado tanto en los estudios de vigilancia activa como pasiva de este trabajo, coinciden con los reportados en otras partes del mundo y se asociaría a la intensificación de la producción porcina y al uso de sistemas de ambiente controlados (Kyriakis y col., 2011; Harder y col., 2013). Sin embargo, debe considerarse como un factor importante, que durante la época invernal hay mayor

circulación de IAV en humanos y esto podría incrementar el riesgo de salto inter especie. En relación a este tema, el CDC (Centro de Control de Enfermedades, EE.UU) recomienda que todas las personas mayores de 6 meses debieran vacunarse anualmente contra influenza. Sin embargo, y a pesar de la clara relación entre los IAV circulantes en humanos y porcinos, solamente los trabajadores de la salud son considerados como población en riesgo para el Ministerio de Salud al momento de iniciar las campañas de vacunación. Esto no considera a un número alto de personas que tienen contacto estrecho con porcinos (veterinarios, trabajadores de granja, frigorífico, productores) y que también serían un factor de riesgo para la transmisión de IAV entre humanos y cerdos. La industria porcina nacional, al menos los mayores productores, siguen las recomendaciones generadas por las asociaciones de EE.UU y el SENASA en relación a la vacunación contra influenza a los trabajadores y la no concurrencia al trabajo de personas con signos compatibles con influenza (Nelson y col., 2015).

La estrategia de realizar el diagnóstico de IAV para otros colegas e instituciones permitió, además de aumentar el número de establecimientos y provincias, el aislamiento y la caracterización de 5 subtipos diferentes de IAV en cerdos: H1N1pdm09, δ 2 H1N2, δ 2 H1N1, δ 1 H1N2 y H3N2. Similar a lo observado en los apartados previos, el subtipo predominante fue el H1N1pdm09 y los restantes subtipos identificados se relacionaron en su totalidad con virus de origen humano. Finalmente se detectaron nuevos eventos de reasociación.

El mapa de distribución de los establecimientos muestreados, en todos los estudios realizados (apartados A, B, C y D) coincide con las zonas de mayor densidad porcina del país, donde las tres principales provincias evaluadas fueron las tres provincias más importantes de producción de cerdos: Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, que abarcan el 65,45% de las existencias totales de porcinos del país (MAGyP 2015).

E. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS IAV AISLADOS EN CERDOS EN ARGENTINA: PERÍODO 2010 A 2014

A diferencia de lo reportado en la población de cerdos de Norteamérica y Eurasia, los IAV circulantes en cerdos en Argentina se relacionan en su totalidad con IAV de origen humano. Se detectaron además, eventos de reasociación de IAV con virus humanos estacionales circulantes en el país hace más de una década atrás. Una situación similar se reportó recientemente en Brasil, principal fuente de importación de reproductores de cerdos de Argentina, donde se identificaron en cerdos, entre los años 2009 a 2012, múltiples IAV humanos estacionales H3N2, H1N1 y H1N2 relacionados con los subtipos circulantes en humanos hace más de 10 años (Nelson y col., 2015).

En nuestro país, se evidencia un predominio en la circulación de IAV H1N1pdm09, a diferencia de otros países, donde prevalecen las reasociaciones entre este subtipo y IAV “swine-like”, “human-like” o “avian-like” (OFFLU, 2014a; Simon y col., 2014; Nelson y col., 2014). En Italia, el subtipo H1N1pdm09 fue esporádicamente detectado luego del año 2009, no así sus reasortantes, los cuales han sido detectados con mayor frecuencia, al igual que en Alemania (Chiapponi y col., 2014; Starick y col., 2011; Starick y col., 2012), Corea del Sur (Kim y col., 2011), Reino Unido y Hungría (Howard y col., 2011; Moreno y col., 2012). La vigilancia epidemiológica de IAV en cerdos en EE.UU reportó un incremento, en el año 2013, en la detección de subtipos reasociados (Anderson y col., 2013). Además, el 40% de los aislamientos provenientes de cerdos en EE.UU, son el resultado de eventos de reasociación entre subtipos porcinos y humanos estacionales (Anderson y col., 2013).

En relación a los genes internos de IAV, en los 7 primeros aislamientos se realizó la caracterización completa. Posteriormente, siguiendo los lineamientos de diagnóstico propuestos por OFFLU (OFFLU, 2014b), solamente se caracterizaron los genes HA, NA y M. En nuestro estudio, todos los genes internos caracterizados agruparon dentro del cluster pdm09, hecho coincidente con lo reportado en otras partes del mundo (OFFLU, 2014a; Anderson y col., 2013; Liu y col., 2012; Vijaykrishna y col., 2011). El gen M pdm09 se combinó con IAV endémicos de cerdos, lo cual sugiere una ventaja adaptativa de este gen aún no conocida (Chou y col., 2011; Anderson y col., 2013; Nelson y col., 2012). Una de las posibles desventajas del uso de la caracterización parcial es que no permitiría detectar la aparición de nuevos subtipos reasociados como ha sido el H1N1pdm09, la emergencia del cassette TRIG en Norteamérica en 1998 o recientemente la aparición del subtipo variante vH3N2 en EE.UU, combinaciones que se volvieron, en su momento, dominantes (Simon y col., 2014; Poon y col., 2010; Olsen y col., 2006b; Wong y col., 2012).

En nuestro país, el subtipo H1N1pdm09 reasoció con IAV humanos estacionales circulantes una década atrás, intercambiando los segmentos HA y NA y manteniendo el gen M pdm09 con lo cual incrementó la diversidad genética. Este hecho dificultaría a futuro el control eficiente mediante las vacunas comerciales disponibles (Nelson y col., 2014; Simon y col., 2014; Ducatéz y col., 2011; Kitikoon y col., 2012; Liu y col., 2012; Vijaykrishna y col., 2011). Otro riesgo es la aparición de nuevos subtipos patógenos para el humano como se observó en el año 2012 en EE.UU con el subtipo vH3N2 que afectó a más de 300 personas (Wong y col., 2012). Es importante resaltar que no se detectaron en este trabajo IAV de otro origen distinto al humano, durante los años en los cuales se realizó el estudio. En relación a la sola detección de IAV de origen humano, en cerdos, los resultados son coincidentes con lo reportado en Brasil (Figura 14) (Nelson y col., 2015). Es interesante que, en ambos países, solo se observaran cuadros clínicos de influenza, luego de la pandemia humana.

En este estudio, basándose en el análisis filogenético de los segmentos HA y NA, se detectaron siete clusters monofiléticos de IAV H1N1pdm09 en cerdos. El hecho de que cada uno de estos clusters este conformado por los mismos aislamientos, para cada uno de los segmentos, con un alto soporte de *bootstrap* indicaría siete potenciales eventos de introducción diferentes. En cambio, el análisis filogenético del segmento M, mostró que la conformación de los clusters no se corresponden, en su totalidad, con los observados para los genes superficiales y además poseen bajos soportes de *bootstrap*. Los resultados observados en la filogenia del gen M podrían relacionarse con que éste es un gen altamente conservado y por lo tanto, presenta escasas diferencias entre las secuencias analizadas. Nelson (Nelson y col., 2015) propone que la transmisión de IAV entre cerdos se evidencia por la detección de clusters monofiléticos, con altos soportes de *bootstrap* y que contengan solamente IAV de origen porcino (Nelson y col., 2015). Estas características se observaron en el análisis de HA y NA, no así en el análisis filogenético del gen M.

Al igual que en nuestro país, introducciones de IAV H1N1pdm09 de humanos a cerdos se observaron en distintos países, a pesar de las diferencias en la intensidad de la vigilancia epidemiológica de IAV en cerdos llevada a cabo en cada uno de ellos (Nelson y col., 2014). En Europa, recientemente se reportaron 32 diferentes introducciones de IAV H1N1pdm09 en el período 2009 a 2013 (Watson y col., 2015). Perera (Perera y col., 2014) detectó la introducción de al menos 8 IAV H1N1pdm09 en cerdos en Sri Lanka durante el período 2009 a 2012. Similares resultados se observaron en el Reino Unido e India (Lycett y col., 2012; Sharma y col., 2013). En Brasil, también se han identificado múltiples eventos de introducción de IAV pdm09 en el período 2009 a 2011 (Nelson y col., 2012). Finalmente en EE.UU, país que realiza

una vigilancia muy exhaustiva sobre la epidemiología de IAV en cerdos, reportó más de 100 introducciones de H1N1pdm09 (Nelson y col., 2014).

Otro evento de introducción fue el de IAV “human-like” δ 2H1, relacionado con el aislamiento de un subtipo “human-like” δ 2H1N1, aislado por primera vez en el año 2009 en una granja ubicada en la Provincia de Buenos Aires. El análisis filogenético relacionó a este virus con IAV humanos estacionales que circularon entre los años 1998 y 2002. En el año 2011, en la misma granja, se detecta un subtipo “human-like” δ 2H1N2, resultante de un evento de reasociación entre el virus “human-like” δ 2H1N1 aislado en 2009, un subtipo H3N2 humano aislado en cerdos, en esa misma granja en el año 2008 (Cappuccio y col., 2011) y un subtipo H1N1pdm09 del cual adquirió el gen M. Este subtipo “human-like” δ 2H1N2 se detectó en esa misma granja en los años 2012/2013 y en el año 2014 en otra granja, localizada en la provincia de Santa Fe a más de 400 km de distancia y con ninguna relación directa entre ambas. El análisis filogenético de los aislamientos que conforman este evento de introducción muestra una acumulación de cambios a nivel nucleotídico año a año (Figura 12), observado en la longitud del largo de ramas, que podría estar relacionado con cambios en las características antigénicas. Estos cambios permitirían la evasión de la respuesta inmune natural y la persistencia del virus en la población (McDonald y col., 2007). Los mecanismos de adaptación observados en este grupo de aislamientos (shift y drift antigénico), serían los posibles mecanismos por los cuales este virus persistió en la granja (Chou y col., 2011; Van Reeth y col., 2012). Deben considerarse también factores no relacionados al virus que podrían potencialmente haber favorecido esta persistencia, como ser el tipo de establecimiento y estado sanitario e inmune de los animales. En este caso se trató de un establecimiento de 6000 madres, de ciclo completo, con altos estándares de bioseguridad, sistema todo dentro-todo fuera y producción en múltiples sitios. Todos estos factores se relacionan con la persistencia de IAV en granjas porcinas (Allerson y col., 2013; Díaz y col., 2015; Rosé y col., 2013; Simon-Grifé y col., 2011; Simon-Grifé y col., 2012; Martin-Valls y col., 2014; Torremorell y col., 2012).

La introducción del subtipo H3N2 se relaciona con el primer aislamiento de IAV en cerdos en Argentina. La misma se asoció al ingreso de un virus completamente humano y su posterior transmisión entre cerdos (Cappuccio y col., 2011). Este subtipo, de manera similar al “human-like” δ 2H1 se relacionó con subtipos humanos estacionales circulantes entre los años 2000 y 2004. En el año 2011 se aisló, en la misma granja en que se obtuvo el primer aislamiento en el país, un subtipo reasociado H3N2 con gen M pdm09. La incorporación del gen M pdm09 en este virus H3N2 podría estar relacionado con la mejor adaptación (“fitness”) que le provee este gen los

IAV (Chou y col., 2011; Nelson y col., 2014; Simon y col., 2014). Este subtipo reasociado fue detectado posteriormente en otras dos granjas, distantes de la granja original, localizadas a más de 170 km. Cabe destacar que, a pesar de no haberse realizado un estudio epidemiológico profundo, ambas granjas reportaron el cuadro clínico en los días posteriores al ingreso de reproductores sin aislamiento en cuarentena. Estos animales provenían de la granja en la cual se realizó el aislamiento original del subtipo H3N2 reasociado, lo cual sugiere que fueron la potencial fuente de ingreso de este virus. En el análisis filogenético del gen H3 se observa un solo cluster monofilético con un 100% de *bootstrap* (Figura 10). En los dos primeros aislamientos de este cluster se observan largas longitudes de ramas, lo cual podría estar relacionado, al igual que lo expresado en el párrafo anterior, a los cambios a nivel genético propios de IAV como así también a la insuficiente información genética de aislamientos de H3 disponibles de Argentina (Nelson y col., 2015).

Los estudios de cartografía antigénica revelaron una relación cercana entre el IAV H3N2 analizado y los antisueros A/Wuhan/359/1995 y A/Sydney/5/1997, lo que lo relaciona con IAV norteamericanos, al estar ambos virus (A/Wuhan/359/1995 y A/Sydney/5/1997) directamente relacionados con los IAV H3N2 que emergen en Estados Unidos en 1998 (Webby y col., 2000). Los resultados obtenidos no pueden extrapolarse al resto de los aislamientos H3N2 obtenidos en cerdos en nuestro país, ya que a pesar de las similitudes a nivel genético entre los mismos (cluster monofilético, 100% *bootstrap*) podrían diferir a nivel antigénico. La evolución a nivel antigénico de los IAV de cerdos ocurre a tasas seis veces más lenta que los virus humanos, inclusive cuando las tasas de evolución genética (a nivel nucleotídico y aminoacídico) son similares (de Jong y col., 2007). Recientemente, se ha descrito que los IAV H3N2 que circulan en humanos en Argentina, están relacionados genéticamente con el virus A/Victoria/361/2011 y antigénicamente con el virus A/Perth/16/2009 (Russo y col., 2014). El virus de cerdos incluido en este mapa cartográfico se encuentra alejado espacialmente de dichos virus aislados con mayor frecuencia en humanos en Argentina. Esto alertaría acerca del riesgo de transmisión de IAV H3N2 tanto de humanos a cerdos como de cerdos a humanos. Debe destacarse que los IAV H3N2 aislados en cerdos en Argentina se relacionan con virus que actualmente no circulan en humanos ni están incluidos en las vacunas actuales. Existiría una franja etaria (niños menores de 13 años) que estaría expuesta a la infección por IAV H3N2 para los cuales carecen de inmunidad.

En relación a los IAV H1, se pudo observar que tanto los virus “human-like” como los H1N1pdm09 difieren antigénicamente a pesar de sus similitudes a nivel genético. Dentro de los IAV “human-like”, los virus A/swine/Argentina/CIP112-C47/2014 y

A/swine/Argentina/CIP051-C29.42/2013 se alejan espacialmente de los primeros subtipos “human-like” aislados en el país en los años 2009 y 2010. Esta distancia antigénica podría estar relacionada con los cambios nucleotídicos acumulados que se observan en el largo de longitud de rama de estos aislamientos observado en los estudios filogenéticos (Figura 8). La reactividad cruzada entre los virus “human-like” y H1N1pdm09 fue variable. Estudios previos evidenciaron reacción cruzada entre cerdos infectados o vacunados con IAV europeos y H1N1pdm09 o IAV norteamericanos (Van Reeth y col., 2006). Cabe destacar que, a pesar de las diferencias a nivel antigénico observadas en los IAV H1 circulantes en cerdos en Argentina, existiría protección parcial contra otros subtipos H1. Este hecho está relacionado no solamente con los anticuerpos de inmunidad cruzada sino también con la respuesta inmune celular y de mucosa generada contra sitios antigénicos altamente conservados. Esta respuesta provee protección parcial contra una infección recurrente con un virus no relacionado antigénicamente, inclusive en ausencia de inmunidad cruzada (Grebe y col., 2008; Van Reeth y col., 2003).

En este estudio el 100% de los aislamientos obtenidos fueron IAV originados en el hombre, además se detectaron múltiples eventos de introducción de estos virus, si bien no es posible determinar con precisión cuándo se produjo el salto interespecie. Los resultados de este estudio, si bien no son extrapolables a la población porcina nacional, remarcan la necesidad de mantener la vigilancia de IAV en cerdos en el país dado la generación de subtipos reasortantes que aumentan la variabilidad genética y antigénica del virus, dificultando su control mediante vacunas y aumentando el riesgo de generación de nuevos subtipos potencialmente patógenos para el humano. Finalmente, es necesario favorecer la difusión global de la información generada a partir de la vigilancia de IAV en cerdos y en humanos, ya que ésta provee las bases para una mejor interpretación de los eventos de zoonosis y transmisión interespecies, basada en el concepto de “Una Salud, un Mundo”.

7. CONCLUSIONES

- La infección por IAV es endémica en la mayoría de las granjas porcinas evaluadas.
- El patrón serológico más frecuentemente observado se correspondió con un alto porcentaje de hembras seropositivas (>60%), una caída de anticuerpos maternos hacia los 21 a 35 días de edad y un aumento entre los 49 y los 100 días, lo que indicaría una infección activa por contacto con el virus, en la mayoría de las granjas evaluadas, en la etapa del posdestete, entre los 25 y 40 días de edad.
- El cuadro clínico asociado a infección por IAV se observó, en coincidencia con lo mencionado previamente, con mayor frecuencia en la etapa de posdestete (21 a 50 días de vida).
- En los estudios transversales, el mayor porcentaje de animales presentó anticuerpos contra el subtipo H1N1pdm09. Sin embargo, más del 75% de los mismos, evidenció, al menos serológicamente, contacto múltiple con distintos subtipos (H1pdm, H3 y δ H1).
- No se observó un patrón estacional en la presentación de la infección por el IAV, lo que estaría relacionado a las condiciones de alta tecnificación en confinamiento.
- Existe circulación de IAV en pequeños productores porcinos y productores familiares, principalmente del subtipo H1N1pdm09.
- Los estudios de caracterización molecular demuestran un predominio del subtipo H1N1pdm09, si bien se detectaron subtipos H3N2 y subtipos “human-like” δ H1N1 y δ H1N2.
- Los IAV H3N2 y “human-like” δ H1 aislados en cerdos en Argentina se relacionan con IAV humanos estacionales que circularon entre los años 1998 a 2004.
- Los estudios filogenéticos detectaron 9 diferentes introducciones de IAV de humanos a cerdos.

- Los estudios de cartografía antigénica revelaron diferencias a nivel antigénico entre virus con alto grado de similitud a nivel genético, lo cual alerta sobre el riesgo de reinfecciones y persistencia de estos virus en la población de cerdos del país.
- Los IAV H3N2 aislados en cerdos en Argentina se relacionan con virus que actualmente no circulan en humanos ni están incluidos en las vacunas actuales, lo cual supone un riesgo para una parte de la población humana carente de inmunidad.
- Las estrategias de vigilancia activa y pasiva deberían utilizarse en complemento y no una en lugar de otra, dado que los resultados de ambas permiten una mejor caracterización de la infección por el IAV en cerdos.
- Basándose en el concepto de “Una Salud, un Mundo”, la difusión global de la información generada a partir de la vigilancia del IAV en cerdos, provee las bases para una mejor interpretación de la epidemiología del IAV considerando el potencial zoonótico y de transmisión interespecies.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abusugra IA, Linne T, Klingeborn B. The provenance of the Swedish swine influenza H1N1 virus of 1983. *Zentralbl Veterinarmed B*, 34:566-72, 1987.
- Acha PN, Szyfres B. Chlamydiosis, rickettsioses and viroses. Pan American Health Organization Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Scientific and Technical Publication, *Influenza*, 580:155-72, 2003.
- Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol.* ; 74:8709-19, 2000.
- Allerson M, Deen J, Detmer SE, Gramer MR, Joo HS, Romagosa A, Torremorell M. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. *Vaccine*, 31:500–505, 2013.
- Allerson M, Davies PR, Gramer MR, Torremorell M. Infection Dynamics of Pandemic 2009 H1N1 Influenza Virus in a Two-Site Swine Herd. *Transbound Emerg Dis*, 6:490–499, 2014.
- Anderson TK, Nelson MI, Kitikoon P, Swenson SL, Korslund JA, Vincent AL. Population dynamics of cocirculating swine influenza A viruses in the United States from 2009 to 2012. *Influenza Other Respir Viruses*, 4:42-51, 2013.
- Anderson TK, Campbell BA, Nelson MI, Lewis NS, Janas-Martindale A, Killian ML, Vincent AL. Characterization of co-circulating swine influenza A viruses in North America and the identification of a novel H1 genetic clade with antigenic significance. *Virus Res*, 201:24-31, 2015.
- Avadhanula V, Rodriguez CA, Devincenzo JP, Wang Y, Webby RJ, Ulett GC. Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species and cell type-dependent manner. *J Virol*, 80:1629-36, 2006.
- Aymard M, Brigaud M, Chastel C, Fontaine M, Tillon JP, Vannier P. Comparison of influenza antibody serologic immunity in man and in pig. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 3:111-9, 1980.
- Aymard M, Douglas AR, Fontaine M, Gourreau JM, Kaiser C, Madec F, Million J, Skehel JJ, Tillon JP. Epizootic swine influenza on animal farms in Brittany. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 31:311-27, 1983.
- Azoulay-Dupuis E, Lambre CR, Soler P, Moreau J, Thibon M. Lung alterations in guinea-pigs infected with influenza virus. *J Comp Pathol*, 94:273-83, 1984.

- Bálint A, Metreveli G, Widén F, Zohari S, Berg M, Isaksson M, Renström LH, Wallgren P, Belák S, Segall T, Kiss I. The first Swedish H1N2 swine influenza virus isolate represents an uncommon reassortant. *J Virol*, 6:180, 2009.
- Biondo N, Schaefer R, Gava D, Cantão ME, Silveira S, Mores MA, Ciacci-Zanella JR, Barcellos DE. Genomic analysis of influenza A virus from captive wild boars in Brazil reveals a human-like H1N2 influenza virus. *Vet Microbiol*, 168:34-40, 2014.
- Blakemore, F, Gledhill, AW. Swine influenza in the British Isles. *Proc R Soc Med*, 34:611, 1941.
- Braciale TJ, Sun J, Taeg SK. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nat Rev Immunol*, 12:295–305, 2012.
- Brentano L, Ciacci-Zanella JR, Mores N, Piffer IA. Levantamento soropidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Concórdia, 306, 2002.
- Brown IH, Chakraverty P, Harris PA, Alexander DJ. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet Rec*, 136:328-9, 1995.
- Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol*, 74:29-46, 2000.
- Brown IA. Influenza A viruses in pigs in Europe. En: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman JJ, editores. *Trends in emerging viral infections of swine*. Ed. Iowa State Press Ames (IA): Blackwell Publisher, 29-36, 2002.
- Brown IH. History and epidemiology of swine influenza in Europe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 370:133–146, 2013.
- Cappuccio JA, Pena L, Dibarbora M, Rimondi A, Piñeyro P, Insarralde L, Quiroga MA, Machuca M, Craig MI, Olivera V, Chockalingam A, Perfumo CJ, Perez DR, Pereda A. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. *Journal of General Virology*, 92:2871–2878, 2011.
- Castrucci MR, Donatelli I, Sidoli L, Barigazzi G, Kawaoka Y, Webster RG. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology*, 93:503-6, 1993.
- Castrucci MR, Campitelli L, Ruggieri A, Barigazzi G, Sidoli L, Daniels R, Oxford JS, Donatelli I. Antigenic and sequence analysis of H3 influenza virus haemagglutinins from pigs in Italy, *J Gen Virol*, 75:371-9, 1994.

- Chakrabarti AK, Pasricha G. An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. *Virology*, 440:97–104, 2013.
- Chatterjee S, Mukherjee KK, Mondal MC, Chakravarti SK, Chakraborty MS. A serological survey of influenza A antibody in human and pig sera in Calcutta. *Folia Microbiol*, 40:345-8, 1995.
- Chiapponi C, Baioni L, Luppi A, Moreno A, Castellan A, Foni E. Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding. *Vet Microbiol*, 174:9-15, 2014.
- Chou YY, Albrecht RA, Pica N, Lowen AC, Rich JA, Garcia Sastre A, Palese P, Hai R. The M segment of the 2009 new pandemic H1N1 influenza virus is critical for its high transmission efficiency in the guinea pig model. *J Virol*, 85:11235-44, 2011.
- Chu VC, Whittaker GR. Influenza virus entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:18153-8, 2004.
- Cohen J, Enserink M. Swine flu. After delays, WHO agrees: the 2009 pandemic has begun. *Science*, 324:1496-7, 2009.
- Conenello GM, Palese P. Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch. *Cell Host Microbe*, 2:207-9, 2007.
- Corzo CA, Culhane M, Juleen K, Stigger-Rosser E, Ducatez MF, Webby RJ, Lowe JF. Active surveillance for influenza A virus among swine, midwestern United States, 2009-2011. *Emerg Infect Dis*, 19:954-60, 2013.
- Corzo CA, Allerson M, Gramer M, Morrison RB, Torremorell M. Detection of airborne influenza a virus in experimentally infected pigs with maternally derived antibodies. *Transbound Emerg Dis*, 61:28-36, 2014.
- Cros JF, Palese P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.*; 95:3-12 2003.
- Cunha R, Passos WS, Do Valle MCC. Surto de gripe equina produzido por virus de influenza A/equi-1 no estado de Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Brasil Biol*, 38: 549-54, 1978.
- de Jong JC, Smith DJ, Lapedes AS, Donatelli I, Campitelli L, Barigazzi G, Van Reeth K, Jones TC, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol*, 81:4315-22. 2007.
- DeLano WR. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA. <http://www.pymol.org>

- Dias A, Bouvier D, Crépin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, 16;458:914-8, 2009.
- Díaz A, Perez A, Sreevatsan S, Davies P, Culhane M, Torremorell M. Association between influenza virus infection and pigs subpopulations in endemically infected breeding herds. *Plos One*, 10:0129213, 2015.
- Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, et al. Sustained desensitization to bacterial toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med*, 205:323-9, 2008.
- Doherty PC, Christensen JP. Accessing complexity: The dynamics of virus-specific T cell responses. *Annu Rev Immunol*, 18:561–592, 2000.
- Ducatez MF, Hause B, Stigger-Rosser E, Darnell D, Corzo C, Juleen K, Simonson R, Brockwell-Staats C, Rubrum A, Wang D, Webb A, Crumpton JC, Lowe J, Gramer M, Webby RJ. Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs, United States. *Emerg Infect Dis*, 17:1624-9, 2011.
- Easterday BC. Animals in the influenza world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 288:433-7, 1980.
- Egorov A, Brandt S, Sereinig S, Romanova J, Ferko B, Katinger D, Grassauer A, Alexandrova G, Katinger H, Muster T. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J Virol*, 72:6437-41, 1998.
- Ferrari G, Pinto J, Honhold N, Zingesser J, Dauphin G, Kim M, Dietze K, Domenech G, Lubroth J. FAO guidelines for surveillance of pandemic H1N1/2009 and other influenza viruses in swine populations. http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/AH1N1/docs/h1n1_guidelines_fao.pdf
- Ferreidoni SR, Harder TC, Gaidet N. Saving resources: avian influenza surveillance using pooled swab samples and reduced reaction volumes in real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, 186:119-125, 2012.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Guidelines for surveillance of pandemic H1N1/2009 and other influenza viruses in swine populations. Dauphin G, Dietze K, Domenech J, Ferrari G, Honhold N, Kim M, Lubroth J, Pinto J, Zingesser J. Rome, FAO, 2010.
- Forgie SE, Keenlside J, Wilkinson C, Webby R, Lu P, Sorensen O, Fonseca K, Barman S, Rubrum A, Stigger E, Marrie TJ, Marshall F, Spady DW, Hu J, Loeb M, Russell ML, Babiuk LA. Swine outbreak of pandemic influenza A virus on a Canadian research farm supports human-to-swine transmission. *Clin Infect Dis*, 52:10-8, 2011.

- Fouchier RA, Munster VJ. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *Rev Sci Tech*, 28:49–58, 2009.
- Freidl GS, Binger T, Müller MA, de Bruin E, van Beek J, Corman VM, Rasche A, Drexler JF, Sylverken A, Oppong SK, Adu-Sarkodie Y, Tschapka M, Cottontail VM, Drosten C, Koopmans M. Serological evidence of influenza A viruses in frugivorous bats from Africa. *PLoS One*, 10:0127035, 2015.
- Gray GC, McCarthy T, Capuano AW, Setterquist SF, Olsen CW, Alavanja MC. Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerg Infect Dis*, 13:1871-8, 2007.
- Grebe KM, Yewdell JW, Bennink JR. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? *Microbes Infect*, 10:1024-9, 2008.
- Grøntvedt CA, Er C, Gjerset B, Germundsson A, Framstad T, Brun E, Jørgensen A, Lium B. Clinical Impact of Infection with Pandemic Influenza (H1N1) 2009 Virus in Naïve Nucleus and Multiplier Pig Herds in Norway. *Influenza Res Treat*, 2011:163745, 2011.
- Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Li PH, Kawaoka Y, Webster RG. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *J Virol*, 70:8041-6, 1996.
- Hannoun C, Gourreau JM. Surveillance of influenza virus in healthy pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 3:133-6, 1980.
- Hanssen H, Hincapié O, López JH. Swine Influenza in Antioquia, Columbia. *Bol Oficina Sanit Panam*, 82:35-43, 1977.
- Harder TC, Grosse Beilage E, Lange E, Meiners C, Döhring S, Pesch S, Noé T, Grund C, Beer M, Starick E. Expanded cocirculation of stable subtypes, emerging lineages, and new sporadic reassortants of porcine influenza viruses in swine populations in Northwest Germany. *J Virol*, 87:10460-76, 2013.
- Heinen P. Swine influenza: A zoonosis. Utrecht University; Utrecht, the Netherlands: 2004. *Vet Sci Tomorrow*, 9-15, 2003.
- Hillaire ML, Rimmelzwaan GF, Kreijtz JH. Clearance of influenza virus infections by T cells: Risk of collateral damage? *Curr Opin Virol*, 3:430–437, 2013.
- Hinshaw VS, Bean WJ Jr, 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*, 84:51-62, 1978.
- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, 146:2275-89, 2001.
- Holtkamp D, Rotto H, Garcia R. The economic cost of major health challenges in large US swine production systems. *En memorias de: American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting, Orlando, FL, USA*, 3–6, 2007.

- Howard WA, Essen SC, Strugnell BW, Russell C, Barass L, Reid SM, Brown IH. Reassortant Pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 17:1049-52, 2011.
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *Virology*, 72:7367-73, 1998.
- Ito T. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses. *Microbiol Immunol*, 44:423-30, 2000.
- Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efstathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK, Digard P. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 13; 337:199-204, 2012.
- Jiménez LF, Ramírez Nieto G, Alfonso VV, Correa JJ. Association of swine influenza H1N1 pandemic virus (SIV-H1N1p) with porcine respiratory disease complex in sows from commercial pig farms in Colombia. *Virology*, 29:242-9, 2014.
- Johnsen LA. En kort litteraturoversigt samt sygdommens forlob og udbredelse i et praksisområde. *Dan Vet Tidsskr*, 68:193–201, 1985.
- Kaplan BS, DeBeauchamp J, Stigger-Rosser E, Franks J, Crumpton JC, Turner J, Darnell D, Jeevan T, Kayali G, Harding A, Webby RJ, Lowe JF. Influenza Virus Surveillance in Coordinated Swine Production Systems, United States. *Emerg Infect Dis*, 21:1834-6, 2015.
- Kaplan MM. Relationships between animal and human influenza. *Bull World Health Organ*, 41:485-6, 1969.
- Karasin 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*, 68:71-85, 2000.
- Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, Scherba G, Anderson G, Olsen CW. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J Clin Microbiol*, 40:1073-9, 2002.
- Karasin AI, West K, Carman S, Olsen CW. Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. *J Clin Microbiol*, 42:4349-54, 2004.
- Karasin AI, Carman S, Olsen CW. Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005). *J Clin Microbiol*, 44:1123-6, 2006.

- Kim SH, Moon OK, Lee KK, Song YK, Yeo CI, Bae CW, Yoon H, Lee OS, Lee JH, Park CK. Outbreak of pandemic influenza (H1N1) 2009 in pigs in Korea. *Vet Rec*, 169:155, 2011.
- Kitikoon P, Vincent AL, Gauger PC, Schlink SN, Bayles DO, Gramer MR, Darnell D, Webby RJ, Lager KM, Swenson SL, Klimov A. Pathogenicity and transmission in pigs of the novel A (H3N2) v influenza virus isolated from humans and characterization of swine H3N2 viruses isolated in 2010-2011. *Virology*, 86:6804-14, 2012.
- Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res*, 162:19–30, 2011.
- Krumbholz A, Philipps A, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, Wutzler P, Zell R. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. *Med Microbiol Immunol*, 200:69-75, 2010.
- Kundin WD. Hong Kong A-2 influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. *Nature*, 228:857, 1970.
- Kupradinun S, Peanpijit P, Bhodhikosoom C, Yoshioka Y, Endo A, Nerome K. The first isolation of swine H1N1 influenza viruses from pigs in Thailand. *Arch Virol*, 118:289-97, 1991.
- Kyriakis CS, Brown IH, Foni E, Kuntz-Simon G, Maldonado J, Madec F, Essen SC, Chiapponi C, Van Reeth K. Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health*, 58:93-101, 2011.
- Lamont HG. The problems of the practitioner in connection with the differential diagnosis and treatment of diseases of young pigs. *Vet Rec*, 50:1377, 1938.
- Landolt GA, Karasin AI, Phillips L, Olsen CW. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. *J Clin Microbiol*, 41:1936-41, 2003.
- Larsen DL, Karasin A, Zuckermann F, Olsen CW. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet Microbiol*, 74:117–131, 2000.
- Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Larson ME. Class specific antibody response to influenza A H1N1 infection in swine. *Vet Microbiol*, 43:241–250, 1995.
- Lee CS, Kang BK, Kim HK, Park SJ, Park BK, Jung K, Song DS. Phylogenetic analysis of swine influenza viruses recently isolated in Korea. *Virus Genes*, 37:168-76, 2008.
- Lee CW, Saif YM. Avian influenza virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, 32:301–310, 2009.

- Lewis NS, Anderson TK, Kitikoon P, Skepner E, Burke DF, Vincent AL. Substitutions near the hemagglutinin receptor-binding site determine the anti-genic evolution of influenza A H3N2 viruses in U.S. swine. *J Virol*, 88:4752–4763, 2014.
- Li W, Shi W, Quiao H. Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses. *J Virol*, 8:183, 2011.
- Liu N, Wang G, Lee KC, Guan Y, Chen H, Cai, Z. Mutations in influenza virus replication and transcription: detection of amino acid substitutions in hemagglutinin of an avian influenza virus (H1N1). *FASEB J*, 23:3377–3382, 2009.
- Liu W, Wei MT, Tong Y. Seroprevalence and genetic characteristics of five subtypes of influenza A viruses in the Chinese pig population: a pooled data analysis. *Vet J*, 187:200-206, 2011.
- Liu Y, Wang J, Ji J, Chang S, Xue C, Ma J, Bi Y, Xie Q. Phylogenetic diversity and genotypic complexity of H1N1 subtype swine influenza viruses isolated in mainland China. *J Virol*, 9:289, 2012.
- Loeffen WL, Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, Van Nieuwstadt AP, Bongers JH, Hunneman WA, Elbers AR, Baars J, Nell T, Van Zijderveld FG. Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Vet Rec*, 145:123-9, 1999.
- Loeffen WL, Heinen PP, Bianchi AT, Hunneman AW, Verheijden JH. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 92:23-35, 2003.
- López-Soria S, Maldonado J, Riera P, Nofrarías M, Espinal A, Valero O, Blanchard P, Jestin A, Casal J, Domingo M, Artigas C, Segalés J. Selected Swine viral pathogens in indoor pigs in Spain. Seroprevalence and farm-level characteristics. *Transbound Emerg Dis*, 57:171-9, 2010.
- Lorusso A, Vincent AL, Harland ML, Alt D, Bayles DO, Swenson SL, Gramer MR, Russell CA, Smith DJ, Lager KM, Lewis NS. Genetic and antigenic characterization of H1 influenza viruses from United States swine from 2008. *J Gen Virol*, 92:919-30, 2011.
- Lycett SJ, Baillie G, Coulter E, Bhatt S, Kellam P, McCauley JW, Wood JL, Brown IH, Pybus OG, Leigh Brown AJ. Combating Swine Influenza Initiative-COSI Consortium. Estimating reassortment rates in co-circulating Eurasian swine influenza viruses. *J Gen Virol*, 93:2326-36, 2012.
- Ma W, Richt JA. Swine influenza vaccines: Current status and future perspectives. *Anim Health Res Rev*, 11:81–96, 2010.

- Maldonado J, Van Reeth K, Riera P. Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J*, 172:377-381, 2006.
- Mancini D, Elenice MS, Cunha R, Mendonça Z, Dias A, Castro A, Pinto J, Mendonça R. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. *Virus Reviews & Research*, 11:1-2, 2006.
- Marozin S, Gregory V, Cameron K, Bennett M, Valette M, Aymard M, Foni E, Barigazzi G, Lin Y, Hay A. Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J Gen Virol*, 83:735-45, 2002.
- Martín-Valls, GE, Simon-Grifé M, van Boheemen S, de Graaf M, Bestebroer TM, Busquets N, Martín M, Casal J, Fouchier RAM, Mateu E. Phylogeny of Spanish swine influenza viruses isolated from respiratory disease outbreaks and evolution of swine influenza virus within an endemically infected farm. *Vet Microbiol*, 170:266–277, 2014.
- Mastin A, Alarcon P, Pfeiffer D, Wood J, Williamson S, Brown I; COSI Consortium, Wieland B. Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population. *PLoS Curr*, 3:RRN1209, 2011.
- Masurel N, Heijntink RA. Recycling of H1N1 influenza A virus in man, haemagglutinin antibody study. *J Hyg*, 90:397-402, 1983.
- Matrosovich, MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol*, 78:12665–12667, 2004.
- Matrosovich M, Stech, J, Klenk, HD. Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev Sci Tech*, 28:203–217, 2009.
- Matsuu A, Uchida Y, Takemae N, Mawatari T, Yoneyama SK, Kasai T, Nakamura R, Eto M, Saito T. Genetic characterization of swine influenza viruses isolated in Japan between 2009 and 2012. *Microbiol Immunol*, 56:792-803, 2012.
- Matthew R. Sandbulte, Anna R. Spickler, Pamela K. Zaabeland James A. Roth. Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines*, 3:22-73, 2015.
- McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev*, 19:571–582, 2006.
- McDonald NJ, Smith CB, Cox NJ. Antigenic drift in the evolution of H1N1 influenza A viruses resulting from deletion of a single amino acid in the haemagglutinin gene. *J Gen Virol*, 88:3209–3213, 2007.
- McQueen JL, Steele JH, Robinson RQ. Influenza in animals. *Adv Vet Sci*, 12:285-336, 1968.

- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Anuario 2014 (MAGyP) http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/porcinos/02-Informes/_archivos/000005-Anuario/140000-Anuario%202014.pdf
- Milev N, Pavlov N, Panaiotov P, Nikolova Z. Influenza epizootic in swine due to strain A (Victoria/3/75 H3N2). *Vet Med Nauki*, 18:10-6, 1981.
- Moreno A, Di Trani L, Faccini S, Vaccari G, Nigrelli D, Boniotti MB, Falcone E, Boni A, Chiapponi C, Sozzi E, Cordioli P. Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. *Vet Microbiol*, 149:472-7, 2011.
- Moreno A, Chiapponi C, Boniotti MB, Sozzi E, Foni E, Barbieri I, Zanoni MG, Faccini S, Lelli D, Cordioli P. Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. *Vet Microbiol*, 156:265-76, 2012.
- Myers KP, Olsen CW, Setterquist SF, Capuano AW, Donham KJ, Thacker EL, Merchant JA, Gray GC. Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? *Clin Infect Dis*, 42:14-20, 2006.
- Myers KP, Olsen CW, Gray GC. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis*, 44:1084-8. 2007.
- Nardelli L, Pascucci S, Gualandi GL, Loda P. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. *Zentralbl Veterinarmed B*, 25:853-7, 1978.
- Nelli RK, Kuchipudi SV, White GA, Perez BB, Dunham SP, Chang KC. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet*, 6:4, 2010.
- Nelson MI, Vincent AL, Kitikoon P, Holmes EC, Gramer MR. Evolution of novel reassortant A/H3N2 influenza viruses in North American swine and humans, 2009-2011. *J Virol* Aug, 86:8872-8, 2012.
- Nelson MI, Wentworth DE, Culhane MR, Vincent AL, Viboud C, LaPointe MP, Lin X, Holmes EC, Detmer SE. Introductions and evolution of human-origin seasonal influenza A viruses in multinational swine populations. *J Virol*, 88:10110-9, 2014.
- Nelson MI, Schaefer R, Gava D, Cantão ME, Ciacci-Zanella JR. Influenza A Viruses of Human Origin in Swine, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 21:1339-47, 2015.
- Nerome K, Ishida M, Nakayama M, Oya A, Kanai C, Suwicha K. Antigenic and genetic analysis of A/Hong Kong (H3N2) influenza viruses isolated from swine and man. *J Gen Virol*, 56:441-5, 1981.
- Neumeier E, Meier-Ewert H, Cox NJ. Genetic relatedness between influenza A (H1N1) viruses isolated from humans and pigs. *J Gen Virol*, 75:2103-7, 1994.

- Newman AP, Reisdorf E, Beinemann J, Uyeki TM, Balish A, Shu B, Lindstrom S, Achenbach J, Smith C, Davis JP. Human cases of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin. *Emerg Infect Dis*, 14:1470-2, 2008.
- Nfon CK, Berhane Y, Hisanaga T, Zhang S, Handel K, Kehler H, Labrecque O, Lewis NS, Vincent AL, Copps J, Alexandersen S, Pasick J. Characterization of H1N1 swine influenza viruses circulating in Canadian pigs in 2009. *J Virol*, 85:8667-79, 2011.
- OFFLU. Surveillance for Influenza in Pigs meeting. 6–7 April, OIE Headquarters, Paris, 2011. <http://www.offlu.net/index.php?id=193&L=-1%27>
- OFFLU. Strategy document for surveillance and monitoring of influenzas in animals, 2013. <http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/publications/pdf/OFFLUsurveillance.pdf>
- OFFLU. Swine Influenza Virus group meeting. 19-20 March, University of Minnesota, Minneapolis, USA, 2014a. <http://www.offlu.net/?id=311>
- OFFLU guidance on detecting influenza in pigs: laboratory testing algorithm, 2014b. http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/SIV_algorithm.pdf.
- OFFLU Swine Influenza Virus group meeting, 3 - 4 December 2015, OIE Headquarters, Paris. http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/meeting-reports/pdf/OFFLU_paris_2015/Antigenic_carto_SIV_2015.pdf
- Ohwada K, Kitame F, Sugawara K, Nishimura H, Homma M, Nakamura K. Distribution of the antibody to influenza C virus in dogs and pigs in Yamagata Prefecture, Japan. *Microbiol Immunol*, 31:1173-80, 1987.
- Olsen CW, Carey S, Hinshaw L, Karasin AI. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. *Arch Virol*, 145:1399-419, 2000.
- Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res*, 85:199-210, 2002.
- Olsen CW, Brown IH, Easterday BC. Swine influenza. En: Zimmerman JJ, D’Allaire S editores. *Disease of Swine 12nd*. Blackwell Publisher, Iowa, USA, 469-82, 2006a.
- Olsen CW, Karasin AI, Carman S, Li Y, Bastien N, Ojkic D, Alves D, Charbonneau G, Henning BM, Low DE, Burton L, Broukhanski G. Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis*, 12:1132-5, 2006b.
- Organización Internacional de Epizootias. (OIE). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, Swine influenza, 2014. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

- Organización Mundial de la Salud (OMS). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Boletín de la OMS*, 58:585-91, 1980.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Diagnóstico de virus de Influenza en mamíferos y aves. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-OPS/OMS, 2010.
- Ottis K, Sidoli L, Bachmann PA, Webster RG, Kaplan MM. Human influenza A viruses in pigs: isolation of a H3N2 strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. *Arch Virol*, 73:103-8, 1982.
- Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. En: Knipe DM, Howley PM editores. *Fields Virology*. 5ta edición. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1647–1689, 2007.
- Palese P, Muster T, Zheng H, O'Neill R, Garcia-Sastre A. Learning from our foes: a novel vaccine concept for influenza virus. *Arch Virol Suppl*, 15:131-8, 1999.
- Pascua PN, Song MS, Lee JH. Seroprevalence and genetic evolutions of swine influenza viruses under vaccination pressure in Korean swine herds. *Virus Res*, 138:43-49, 2008.
- Paterson D, Fodor E. Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS Pathog*, 2;8:e1003019, 2012.
- Peiris JS, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster RG, Shortridge KF. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J Virol*, 75:9679-86, 2001.
- Peiris JS, Poon LL, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol*, 45:169-73, 2009.
- Peltola VT, McCullers JA. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J*, 23:S87-97, 2004.
- Pena L, Vincent AL, Loving CL, Henningson JN, Lager KM, Li, W, Perez DR. Strain-dependent effects of PB1-F2 of triple-reassortant H3N2 influenza viruses in swine. *J Gen Virol*, 93:2204–2214, 2012.
- Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man. *Bull World Health Organ*, 59:75-8, 1981.
- Pereda A, Cappuccio J, Quiroga MA, Baumeister E, Insarralde L, Ibar M, Sanguinetti R, Cannilla ML, Franzese D, Escobar Cabrera OE, Craig MI, Rimondi A, Machuca M, Debenedetti RT, Zenobi C, Barral L, Balzano R, Capalbo S, Risso A, Perfumo CJ. Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina. *Emerg Infect Dis*, 16:304-7, 2010.

- Perera HK, Vijaykrishna D, Premarathna AG, Jayamaha CJ, Wickramasinghe G, Cheung CL, Yeung MF, Poon LL, Perera AK, Barr IG, Guan Y, Peiris M. Molecular epidemiology of influenza A(H1N1)pdm09 virus among humans and swine, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis*, 20:2080-4, 2014.
- Piñeyro PE, Cappuccio JA, Quiroga MA, Machuca MA, Teodoroff TA, Baumeister E, Perfumo CJ. Prevalencia serológica del virus de influenza en Argentina en cerdos de engorde mediante las pruebas de ELISA e inhibición de la hemaglutinación. V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR. Córdoba, Argentina, 287, 2006.
- Piñeyro PE, Baumeister E, Cappuccio JA, Machuca MA, Quiroga MA, Tedoroff T. Seroprevalence of the swine influenza virus in fattening pigs in Argentina in the 2002 season: evaluation by hemagglutination-inhibition and ELISA tests. *Rev Argent Microbiol*, 42:98-1, 2010.
- Pomorska-Mol M, Markowska-Daniel I, Kwit K. Immune and acute phase response in pigs experimentally infected with H1N2 swine influenza virus. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 66:334–342, 2012.
- Poon LL, Mak PW, Li OT, Chan KH, Cheung CL, Ma ES, Yen HL, Vijaykrishna D, Guan Y, Peiris JS. Rapid detection of reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza virus. *Clin Chem*, 56:1340–1344, 2010.
- Rajão DS, Alves F, Del Puerto HL, Braz GF, Oliveira FG, Ciacci-Zanella JR, Schaefer R, Reis JK, Guedes RM, Lobato ZIP, Leite RC. Serological evidence of swine influenza in Brazil. *Influenza Other Respir Viruses*, 7:109-12, 2012.
- Rajão DS, Costa AT, Brasil BS, Del Puerto HL, Oliveira FG, Alves F, Braz GF, Reis JK, Guedes RM, Lobato ZI, Leite RC. Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype. *Influenza Other Respir Viruses*, 7:783-90, 2013.
- Ramirez-Nieto GC, Diaz Rojas CA, Alfonso VJV, Correa JJ, Mogollon Galvis JD. First isolation and identification of H1N1 swine influenza viruses in Colombian pig farms. *Health*, 983-990, 2012. <http://dx.doi.org/10.4236/health.2012.430150>
- Ran Z, Shen H, Lang Y, Kolb EA, Turan N, Zhu L, Ma J, Bawa B, Liu Q, Liu H, Quast M, Sexton G, Krammer F, Hause BM, Christopher-Hennings J, Nelson EA, Richt J, Li F, Ma W. Domestic pigs are susceptible to infection with influenza B viruses. *J Virol*, 89:4818-26, 2015.
- Richardson JC, Akkina RK. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol*, 116:69-80, 1991.
- Richt JA, Lager KM, Janke BH, Woods RD, Webster RG, Webby RJ. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine

- influenza viruses cocirculating in the United States. *J Clin Microbiol*, 41:3198-205, 2003.
- Roberts DH, Cartwright SF, Wibberley G. Outbreaks of classical swine influenza in pigs in England in 1986. *Vet Rec*, 121:53-5, 1987.
 - Romanova J, Krenn BM, Wolschek M, Ferko B, Romanovskaja-Romanko E, Morokutti A, Shurygina AP, Nakowitsch S, Ruthsatz T, Kiefmann B, König U, Bergmann M, Sachet M, Balasingam S, Mann A, Oxford J, Slais M, Kiselev O, Muster T, Egorov A. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal DeltaNS1 H5N1 influenza vaccine. *PLoS One*, 19;4:e5984, 2009.
 - Rose N, Hervé S, Eveno E, Barbier N, Eono F, Dorenlor V, Andraud M, Camsusou C, Madec F, Simon G. Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *Vet Res*, 44:72, 2013.
 - Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*; 15; 411:229-36, 2011.
 - Russo ML, Pontoriero AV, Benedetti E, Czech A, Avaro M, Periolo N, Campos AM, Savy VL, Baumeister EG. Antigenic and genomic characterization of human influenza A and B viruses circulating in Argentina after the introduction of influenza A(H1N1)pdm09. *J Med Microbiol*, 63:1626-37, 2014.
 - Saavedra-Montañez M, Carrera-Aguirre V, Castillo-Juárez H, Rivera-Benitez F, Rosas-Estrada K, Pulido-Camarillo E, Mercado-García C, Carreón-Nápoles R, Haro-Tirado M, Rosete DP, Cabello C, Manjarrez ME, Sánchez-Betancourt I, Ramírez-Mendoza H. Retrospective serological survey of influenza viruses in backyard pigs from Mexico City. *Influenza Other Respir Viruses*, 7:827-32, 2013.
 - Salmon H, Berri M, Gerdt V, Meurens F. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol*, 33:384–393, 2009.
 - Samji, T. Influenza A: Understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*, 82:153–159, 2009.
 - Sandbulte MR, Spickler AR, Zaabel PK, Roth JA. Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccine*, 3:22-73, 2015.
 - Schaefer R, Zanella JRC, Brentano L, Vincent AL, Ritterbusch GA, Silveira S, Caron, Mores N. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. *Pesqui Vet Bras*, 31:761–767, 2011.
 - Schaefer R, Rech RR, Gava D, Cantão ME, Da Silva MC, Silveira S, Zanella JR. A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. *Arch Virol*, 160:29-38, 2015.

- Schmidt C, Cibulski SP, Muterle Varela AP, Mengue Scheffer C, Wendlant A, Quoos Mayer F, Lopes de Almeida L, Franco AC, Roehe PM. Full-Genome Sequence of a Reassortant H1N2 Influenza A Virus Isolated from Pigs in Brazil. *Genome Announc*, 18:2, 2014.
- Scholtissek C, Bürger H, Bachmann PA, Hannoun C. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*, 129:521-3, 1983.
- Scholtissek C, Burger H, Kistner O, Shortridge KF. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology*, 147:287–294, 1985.
- Schultz U, Fitch WM, Ludwig S, Mandler J, Scholtissek C. Evolution of pig influenza viruses. *Virology*, 183:61-73, 1991.
- Sharma S, Joshi G, Dash PK, Thomas M, Athmaram TN, Kumar JS, Desai A, Vasanthapuram R, Patro IK, Rao PV, Parida M. Molecular epidemiology and complete genome characterization of H1N1pdm virus from India. *PLoS One*, 8:56364, 2013.
- Shope R, Lewis P. Swine influenza: experimental transmission and pathology. *J Exp Med*, 54:349–59, 1931.
- Shortridge KF, Webster RG, Butterfield WK, Campbell CH. Persistence of Hong Kong influenza virus variants in pigs. *Science*, 196:1454-5, 1977.
- Shortridge KF, Webster RG. Geographical distribution of swine (Hsw1N1) and Hong Kong (H3N2) influenza virus variants in pigs in Southeast Asia. *Intervirology*, 11:9-15, 1979.
- Simón-Grifé M, Martín-Valls GE, Vilar MJ, García-Bocanegra I, Mora M, Martín M, Mateu E, Casal J. Seroprevalence and risk factors of swine influenza in Spain. *Vet Microbiol*, 149:56-63, 2011.
- Simón-Grifé M, Martín-Valls GE, Vilar MJ, Busquets N, Mora-Salvatierra M, Bestebroer TM, Fouchier RAM, Martín M, Mateu E, Casal J. Swine influenza virus infection dynamics in two pig farms; results of a longitudinal assessment. *Vet Res*, 43:24, 2012.
- Simón G, Larsen LE, Dürrwald R, Foni E, Harder T, Van Reeth K, Markowska-Daniel I, Reid SM, Dan A, Maldonado J, Huovilainen A, Billinis C, Davidson I, Agüero M, Vila T, Hervé S, Breum SØ, Chiapponi C, Urbaniak K, Kyriakis CS, ESNIP3 consortium, Brown IH, Loeffen W. European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PLoS One*, 9:115815, 2014.

- Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69:531-69, 2000.
- Smith TF, Burgert EO Jr, Dowdle WR, Noble GR, Campbell RJ, Van Scoy RE. Isolation of swine influenza virus from autopsy lung tissue of man. *N Engl J Med*, 294:708–10, 1976.
- Sorensen KJ, Have PD, Ronsholt L, Hage JM, Westergaard, Pedersen, KB. Influenza hos svin I Danmark. *Dan Vet Tidsskr*, 64:826–829, 1981.
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*, 40:3256–3260, 2002.
- Starick E, Lange E, Fereidouni S, Bunzenthal C, Höveler R, Kuczka A, grosse Beilage E, Hamann HP, Klingelhöfer I, Steinhauer D, Vahlenkamp T, Beer M, Harder T. Reassorted pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus discovered from pigs in Germany. *J Gen Virol*, 92:1184-8, 2011.
- Starick E, Lange E, Grund C, Grosse Beilage E, Döhring S, Maas A, Noé T, Beer M, Harder TC. Reassortants of pandemic influenza A virus H1N1/2009 and endemic porcine HxN2 viruses emerge in swine populations in Germany. *J Gen Virol*, 93:1658-63, 2012.
- Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochim Pol*; 61:397-401, 2014.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*, 28:2731–2739, 2011.
- Teodoroff TA, Pecoraro MR, Baumeister E, Janke BH, Machuca M, Cappuccio JA. Serological and immunohistochemical studies of influenza virus in fattening pigs in Argentina. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Roma, Italia, 262-3, 2003.
- Teodoroff TA, Piñeyro P, Pecoraro MR, Baumeister E, Cappuccio JA, Perfumo CJ. Seroprevalence of H1 and H3 influenza virus in fattening pigs from Argentina. II Congreso Latinoamericano de Suinicultura; Foz do Iguacu, PR Brasil, 2004.
- Tinoco YO, Montgomery JM, Kasper MR, Nelson MI, Azziz-Baumgartner E, Gilman RH, Bausch DG, Gonzalez AE. Transmission Dynamics of Pandemic Influenza A (H1N1) pdm09 Virus in Humans and Swine in Backyard Farms in Tumbes, Peru. *Influenza Other Respir Viruses*, 23, 2015.

- Tong S, LI Y, Rivaller P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis, CT, York IA. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci*, 109:4269–4274, 2012.
- Top FH Jr, Russell PK. Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey. *J Infect Dis*, 136: S376-80, 1977.
- Torremorell M, Allerson M, Corzo C, Diaz A, Gramer M. Transmission of influenza A virus in pigs. *Transbound Emerg Dis*, 1:68-84, 2012.
- Trebbien R, Larsen LE, Viuff BM. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *J Virol*, 8:434, 2011.
- Trifonov V, Khiabani H, Greenbaum B, Rabadan R. The origin of the recent swine influenza A (H1N1) virus infecting humans. *Euro Surveill*, 14: 19193, 2009.
- Van Poucke SG, Nicholls JM, Nauwynck HJ, Van Reeth K. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *J Virol*, 7:38, 2010.
- Van Reeth K, Van Gucht S, Pensaert M. Investigations of the efficacy of European H1N1- and H3N2-based swine influenza vaccines against the novel H1N2 subtype. *Vet Rec*, 5;153:9-13, 2003.
- Van Reeth K, Brown I, Essen S, Pensaert M. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Res*, 103:115–124, 2004.
- Van Reeth K, Labarque G, Pensaert M. Serological profiles after consecutive experimental infections of pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 swine influenza viruses. *Viral Immunol*, 19:373-82, 2006.
- Van Reeth K, Brown I, Olsen C. Influenza virus: En: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW editores. *Diseases of swine 10^o edition*. Wiley and Blackwell Publisher, USA, 557-571, 2012.
- Vasin AV, Temkina OA, Egorov VV, Klotchenko SA, Plotnikova MA, Kiselev OI. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res.*; 24; 185:53-63, 2014.
- Vijaykrishna D, Smith GJ, Pybus OG, Zhu H, Bhatt S, Poon LL, Riley S, Bahl J, Ma SK, Cheung CL, Perera RA, Chen H, Shortridge KF, Webby RJ, Webster RG, Guan Y, Peiris JS. Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. *Nature*, 473:519-22, 2011.
- Vincent AL, Lager KM, Ma W, Lekcharoensuk P, Gramer MR, Loiacono C, Richt JA. Evaluation of hemagglutinin subtypes 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol*, 118:212-22, 2006.

- Vincent AL, Ma W, Lager KM, Janke BH, Richt JA. Swine influenza viruses a North American perspective. *Adv Virus Res*, 72:127-54, 2008.
- Vincent AL, Ma W, Lager KM, Gramer MR, Richt JA, Janke BH. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes*, 39:176-85, 2009a.
- Vincent AL, Swenson SL, Lager KM, Gauger PC, Loiacono C, Zhang Y. Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. *Vet Microbiol*, 137:51-9, 2009b.
- Waffarn EE, Baumgarth N. Protective B cell responses to flu—No fluke! *J Immunol*, 186:3823–3829, 2011.
- Watson SJ, Langat P, Reid SM, Lam TT, Cotten M, Kelly M, Van Reeth K, Qiu Y, Simon G, Bonin E, Foni E, Chiapponi C, Larsen L, Hjulsager C, Markowska-Daniel I, Urbaniak K, Dürrwald R, Schlegel M, Huovilainen A, Davidson I, Dán Á, Loeffen W, Edwards S, Bublot M, Vila T, Maldonado J, Valls L, ESNIP3 Consortium, Brown IH, Pybus OG, Kellam P. Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J Virol*, 89:9920-31, 2015.
- Webby RJ, Swenson SL, Krauss PJ, Gerrish SM, Goyal Z, Webster RG. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J Virol*, 74:8243-825, 2000.
- Webby RJ, Rossow K, Erickson G, Sims Y, Webster R. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Res*, 103:67-73, 2004.
- Webby RJ, Webster RG, Richt JA. Influenza viruses in animal wildlife populations. *Curr Top Microbiol Immunol*, 315:67-83, 2007.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 56:152-79, 1992.
- Webster RG, COX NJ, Sthor K. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002. <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf>
- Welsh MD, Baird PM, Guelbenzu-Gonzalo MP, Hanna A, Reid SM, Essen S, Russell C, Thomas S, Barrass L, McNeilly F, McKillen J, Todd D, Harkin V, McDowell S, Choudhury B, Irvine RM, Borobia J, Grant J, Brown IH. Initial incursion of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus into European pigs. *Vet Rec*, 166:642-5, 2010.
- Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 56:365–394, 1987.

- Williamson SM, Tucker AW, McCrone IS, Bidewell CA, Brons N, Habernoll H, Essen SC, Brown IH, COSI, Wood JL. Descriptive clinical and epidemiological characteristics of influenza A H1N1 2009 virus infections in pigs in England. *Vet Rec*, 171:271, 2012.
- Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol*, 83:8021-31, 2009.
- Wong KK, Greenbaum A, Moll ME, Lando J, Moore EL, Ganatra R, Biggerstaff M, Lam E, Smith EE, Storms AD, Miller JR, Dato V, Nalluswami K, Nambiar A, Silvestri SA, Lute JR, Ostroff S, Hancock K, Branch A, Trock SC, Klimov A, Shu B, Brammer L, Epperson S, Finelli L, Jhung MA. Outbreak of influenza A (H3N2) variant virus infection among attendees of an agricultural fair, Pennsylvania, USA, 2011. *Emerg Infect Dis*, 18:1937-44, 2012.
- World Health Organization (WHO). CDC protocol of real time RTPCR for influenza A (H1N1). Swine Influenza, 2009. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf
- Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM editores. *Fields Virology*, 5ta edición. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins, 1691-1740, 2007.
- Yamane N, Arikawa J, Odagiri T, Ishida N. Annual examination of influenza virus infection among pigs in Miyagi prefecture, Japan: the appearance of swH1N1 virus. *Acta Virol*, 23:240-8, 1979.
- Yus E, Sanjuan ML, García F, Castro JM, Simarro I. Influenza A viruses: epidemiologic study in fatteners in Spain (1987-89). *Zentralbl Veterinarmed B*, 39:113-8, 1992.
- Zamarin D, García-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog.* ; 1:e4, 2005.
- Zhou NN, Senne DA, Landgraf JS, Swenson SL, Erickson G, Rossow K, Liu L, Yoon KJ, Krauss S, Webster RG. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol*, 10:8851-6, 1999.
- Zhou X, Wong S, Walter J, Jacks T, Eisen HN. Increased generation of CD8+ T cell clones in p53 mutant mice. *J Immunol*, 162:3957-60, 1999.
- Zhu H, Webby R, Lam TT, Smith DK, Peiris JS, Guan Y. History of Swine influenza viruses in Asia. *Curr Top Microbiol Immunol*, 370:57-68, 2013.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Nº	SUERO	Subtipo	Cerdo
H3N2 Humano estacional			
1	A/Wuhan/359/1995 (H3N2)-Antisuero	H3N2	396
2	A/Wuhan/359/1995 (H3N2)-Antisuero	H3N2	397
3	A/Sydney/5/1997 (H3N2)-Antisuero	H3N2	398
4	A/Sydney/5/1997 (H3N2)-Antisuero	H3N2	399
5	A/Moscow/10/1999 (H3N2)-Antisuero	H3N2	400
6	A/Moscow/10/1999 (H3N2)-Antisuero	H3N2	401
7	A/Fujian/411/2002 (H3N2)-Antisuero	H3N2	418
8	A/Fujian/411/2002 (H3N2)-Antisuero	H3N2	419
9	A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)-Antisuero	H3N2	402
10	A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)-Antisuero	H3N2	403
11	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-Antisuero	H3N2	420
12	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-Antisuero	H3N2	421
13	A/Perth/16/2009 (H3N2)-Antisuero	H3N2	422
14	A/Perth/16/2009 (H3N2)-Antisuero	H3N2	423
15	A/Victoria/361/2011 (H3N2)-Antisuero	H3N2	404
16	A/Victoria/361/2011 (H3N2)-Antisuero	H3N2	405
H3N2 cerdos			
17	A/SW/TX/4199-1/1998-Antisuero	H3N2-C1TRIG	480
18	A/SW/TX/4199-1/1998-Antisuero	H3N2-C1TRIG	480
19	A/SW/TX/4199-1/1998-Antisuero	H3N2-C1TRIG	480
20	A/Sw/CO/23619/1999 (C2)-Antisuero	H3N2-C2	548
21	A/Sw/CO/23619/1999 (C2)-Antisuero	H3N2-C2	548
22	A/Sw/MN/01146/2006 (H3N2-TRIG)-Antisuero	H3N2-TRIG	548
23	A/Sw/MN/01146/2006 (H3N2-TRIG)-Antisuero	H3N2-TRIG	548
24	A/SW/IL/02970/2009-Antisuero	H3N2-TRIG	527
25	A/SW/IL/02970/2009-Antisuero	H3N2-TRIG	527
26	A/Sw/IA/01700/2007 (H3N2-TRIG)-Antisuero	H3N2-TRIG	428
27	A/Sw/IA/01700/2007 (H3N2-TRIG)-Antisuero	H3N2-TRIG	429
28	A/SW/Pennsylvania/62170-1/2010 (IV H3N2)-Antisuero	IV H3N2	233
29	A/SW/Pennsylvania/62170-1/2010 (IV H3N2)-Antisuero	IV H3N2	234
H1N1/N2 Humano estacional			
1	A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)-Antisuero	H1N1	460
2	A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)-Antisuero	H1N1	462
3	A/Memphis/8/2003 (H1N1)-Antisuero	H1N1	458
4	A/Memphis/8/2003 (H1N1)-Antisuero	H1N1	459
5	A/Michigan/2/2003 (H1N2)-Antisuero	H1N2	496
6	A/Michigan/2/2003 (H1N2)-Antisuero	H1N2	497
7	A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)-Antisuero	H1N1	473
8	A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1)-Antisuero	H1N1	478
9	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-Antisuero	H1N1	468
10	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-Antisuero	H1N1	471
H1N1pdm09			
11	A/CA/04/2009 (pH1N1)-Antisuero	H1N1pdm09	960
12	A/CA/04/2009 (pH1N1)-Antisuero	H1N1pdm09	962
H1N1/N2 cerdos			
13	A/SW/IA/1973-Antisuero	αH1N1	428
14	A/SW/IA/1973-Antisuero	αH1N1	428
15	A/SW/OH/511445/2007-Antiserum	γH1N1	821
16	A/SW/OH/511445/2007-Antiserum	γH1N1	851

17	A/SW/OH/511445/2007-Antiserum	γ H1N1	860
18	A/SW/KY/02086/2008-Antiserum	β H1N1	872
19	A/SW/KY/02086/2008-Antiserum	β H1N1	873
20	A/SW/TX/01976/2008 δ 1 H1N2-Antiserum	δ 1 H1N2	882
21	A/SW/TX/01976/2008 δ 1 H1N2-Antiserum	δ 1 H1N2	883
22	A/SW/IA/02039/2008 δ 1 H1N2-Antiserum	δ 1 H1N2	870
23	A/SW/IA/02039/2008 δ 1 H1N2-Antiserum	δ 1 H1N2	871
24	A/SW/MN/02011/2008 δ 1 H1N2-Antiserum	δ 1 H1N2	886
25	A/SW/MN/02011/2008 δ 1 H1N2-Antiserum	δ 1 H1N2	887
26	A/SW/IL/003200/2010 δ 1 H1N2-Antisuero	δ 1 H1N2	173
27	A/SW/IL/003200/2010 δ 1 H1N2-Antisuero	δ 1 H1N2	174
28	A/SW/IA/02955/2010 δ 2 H1N2-Antisuero	δ 1 H1N2	177
29	A/SW/IA/02955/2010 δ 2 H1N2-Antisuero	δ 1 H1N2	178
30	A/SW/OH/003295/2010 δ 2 H1N2-Antisuero	δ 2 H1N2	201
31	A/SW/OH/003295/2010 δ 2 H1N2-Antisuero	δ 2 H1N2	499
32	A/SW/MN/003294/2011 δ 1 H1N2-Antisuero	δ 1 H1N2	175
33	A/SW/MN/003294/2011 δ 1 H1N2-Antisuero	δ 1 H1N2	176
34	A/SW/MN/07002083/2007 δ 2 H1N1-Antisuero	δ 2 H1N1	169
35	A/SW/MN/07002083/2007 δ 2 H1N1-Antisuero	δ 2 H1N1	170
36	A/SW/IL/00685/2005-Antisuero	δ 2 H1N1	171
37	A/SW/IL/00685/2005 H1N1-Antisuero	δ 2 H1N1	172

ANEXO 2

		SUEROS																												
IAV H3		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
CLUSTER	II	20	80	80	40	40	40	40	160	10	20	20	<10	<10	<10	10	160	320	320	160	160	640	320	<10	20	320	160	<10	<10	
	IV	320	320	160	160	320	160	320	160	160	320	640	160	160	80	80	320	320	160	160	320	320	640	640	640	640	640	640	640	320
		SUEROS																												
CLUSTER	Delta2	40	40	80	80	40	40	20	80	80	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	20	10	<10	10	20	20	10	20	
	Delta1	160	320	320	640	320	320	160	320	40	40	20	10	20	10	40	80	20	<10	20	160	80	<10	<10	10	20	20	10	10	
	Pdm09	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	80	640	640	640	320	320	320	20	20	20	20	20	20	20	40	<10	<10	<10	<10	
	Pdm09	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	640	640	640	80	160	160	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	Gamma	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	640	640	640	640	160	160	640	640	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	Delta1	160	640	320	320	80	160	80	160	40	40	40	40	40	40	20	40	40	10	20	80	80	40	10	<10	40	40	40	80	
	Delta2	320	640	640	640	160	160	320	640	80	40	80	40	80	40	20	20	10	<10	160	80	<10	<10	<10	<10	40	40	40	80	
		<10	<10	20	20	<10	10	20	40	160	80	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	Delta2	80	80	640	320	80	40	20	40	10	10	20	20	20	20	20	40	40	<10	20	40	40	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	Delta2	320	640	640	640	320	320	640	640	80	80	10	10	10	10	20	10	10	10	160	80	40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
	Pdm09	10	20	10	10	10	10	10	10	10	20	640	640	640	640	80	160	160	40	40	10	<10	20	10	20	10	20	20	20	
		SUEROS																												
CLUSTER	Delta2	80	40	20	10	80	80	40	40																					
	Delta1	320	160	40	40	320	320	160	160																					
	Pdm09	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10																					
	Pdm09	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10																					
	Gamma	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10																					
	Delta1	640	640	40	20	320	320	160	320																					
	Delta2	640	640	<10	<10	640	640	640	640																					
		<10	10	40	40	20	20	20	10																					
	Delta2	160	160	10	10	80	320	160	160																					
	Delta2	640	640	80	40	640	640	640	640																					
	Pdm09	20	<10	10	10	20	10	20	<10																					