

Enfermedades respiratorias del suino. Parte I: virus respiratorios. Revisión de literatura

Jl Velásquez A. MV. EspV.

Grupo de Enfermedades Infecciosas de los Animales-GEIA
Centro de Investigaciones Pecuarias-CIP. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.
AA1226 Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia. 1999.

(Recibido: abril 15, 99; aceptado: mayo 20, 99)

Resumen

El incremento y severidad de las enfermedades respiratorias porcinas, es una queja que han hecho en los últimos años, los productores Colombianos. Se discute sobre cuatro virus porcinos que causan enfermedad respiratoria. Son ellos el virus de síndrome reproductivo y respiratorio porcino-PRRSV, el virus de la enfermedad de Aujeszky-ADV, el virus de influenza porcina-SIV (H1N1, H3N2), el Coronavirus respiratorio porcino-PRCV y el Circovirus porcino-PCV. El Citomegalovirus Porcino no se incluye. Los cuadros respiratorios se complican según la presencia en forma concurrente de patógenos específicos de origen bacteriano y agentes respiratorios virales. Con excepción de los virus PRCV y PCV, la circulación de estos virus en la población, ha sido detectada en Colombia por el Instituto Colombiano Agropecuario-ICA por serología y aislamiento viral, en su Laboratorio Central de Diagnóstico (ICA-CEISA). A nivel mundial, hay acuerdo en cuanto a las formas de control, la efectividad del uso de las vacunas disponibles y en los programas de vacunación, sólo contra la enfermedad de Aujeszky.

Palabras claves:

Aujeszky, control, coronavirus, enfermedad respiratoria, influenza, patogénesis, porcino, PCV, PRRS.

Introducción

No se dispone de información suficiente sobre la presencia, comportamiento y efectos clínicos de patógenos virales porcinos en Colombia. Por la expansión y modernización de la industria nacional y el consecuente incremento en las importaciones de animales reproductores de Norte América y Europa en la década de los años noventa, y por la presión de los importadores y la incapacidad del gobierno para responder logísticamente a tiempo, se han introducido al país, nuevos patógenos específicos.

Son ellos, el PRRSV y el ADV. Aunque todavía no se ha reportado la presencia en Colombia de PRCV y de PCV, es muy probable que estén circulando en la población porcina nacional. El SIV se reportó en Colombia desde 1977 y se conoce poco de su epidemiología en el país y de sus efectos clínicos y económicos. De los anteriores virus, los más importantes en cuanto a la salud porcina son: el virus de Aujeszky y el virus de PRRS.

La Organización Internacional de Epizootias-OIE clasificó al PRRSV en su lista B, y lo nombra como virus del síndrome disgénico porcino.

Este virus es en la actualidad, el patógeno más importante en la producción porcina industrializada. Afecta la eficiencia productiva por sus efectos, respiratorios, sistémicos y reproductivos. Además, infecta en concurrencia con otros patógenos específicos que pueden ser bacterianos y virales, lo cual conduce a cuadros respiratorios que se complican según la edad de los animales, como ocurre en las infecciones simultáneas con el PRRSV+PRCV+SIV o también PRRSV+SIV. Bacterias como el *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma sp.*, se han reportado frecuentemente asociadas a problemas respiratorios en presencia del PRRSV.

El ADV está clasificado por la OIE en la lista A y por tanto causa bloqueo comercial al país infectado. En Colombia se ha detectado seroreactividad desde 1997.

De importancia en salud pública, el SIV (H1N1) está presente Colombia. La organización mundial de la salud-WHO (World Health Organisation) y sus centros colaboradores como el centro para el control de enfermedades infecciosas en Estados Unidos-CDC (Center for Disease Control), en Atlanta Georgia, mantiene un monitoreo genético del virus, alrededor del mundo.

Con excepción del PRCV y el PCV, los demás virus han sido detectados en Colombia por el ICA, en su Laboratorio Central de referencia Diagnóstica (ICA-CEISA). En Estados Unidos, el PRRSV, SIV y el ADV son los virus que con mayor frecuencia están involucrados en complejos respiratorios de campo, causando una entidad denominada como, Complejo de Enfermedad Respiratoria Porcina-PRDC (Porcine Respiratory Disease Complex) (6). Es posible que en nuestro medio se estén presentando infecciones virales concurrentes, como ocurre en otras latitudes. Por lo anterior, es necesario realizar estudios epidemiológicos y clínicos, con el fin de caracterizar el impacto de la presencia de estos agentes en la población de suinos en Colombia, como paso inicial para facilitar la formulación de medidas de control efectivas.

Síndrome reproductivo y respiratorio porcino-PRRS

En Colombia la infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino-PRRSV, se empezó a considerar endémica en for-

ma oficial ante la OIE, con el primer aislamiento de dos cepas virales de campo y un 19.2% de seropositividad (1), luego en 1998, Peña y Colaboradores, reportaron en cerdos de sacrificio, una seroreactividad del 29.05% en explotaciones tecnificadas en los siguientes seis Departamentos: Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Quindío, Risaralda y Valle.

El síndrome causado por el PRRSV, fue descrito desde 1987 en Estados Unidos por T. Loula. Lo describió clínicamente como un aborto a término y como enfermedad respiratoria neonatal. En 1992, investigadores del Instituto Central Veterinario de Holanda, en Lelystad, aislaron el virus en macrófagos alveolares porcinos, y lo denominaron virus de Lelystad. Seguidamente en Estados Unidos, investigadores de la Universidad de Dakota del Norte lograron reproducir la enfermedad por la infección de cerdos gnotobioticos, y de esta manera, pudieron observar el cumplimiento de los postulados de Koch, con lo cual fue posible la asignación de plena causalidad al virus aislado (16). Kerkaert, Pijoan y Dial en 1994, encontraron que en la recría, se le pueden atribuir hasta un 70% de todas las pérdidas económicas al PRRSV cuando está presente; y en el hato porcino un 25 % de todos los costos de tratamiento y prevención (32).

El virus del PRRS está clasificado como un virus del orden *nidovirus*, con los virus de la Deshidrogenasa láctica, la Arteritis equina, y la Fiebre hemorrágica del simio, y que componen un grupo de virus con envoltura lipídica de 13-15 kb, y RNA positivo de cadena simple con una estructura similar. El PRRSV, pertenece a la familia *Arteriviridae* y al Género *Arterivirus*. Estos se caracterizan por tener seis o siete mRNAs subgenómicas con una secuencia líder común 5'. Cada secuencia subgenómica mRNA es identificada por su producto o proteína o por su respectivo marco abierto de lectura-ORF (*Open Reading Frame*). Las proteínas del PRRSV correspondientes a los ORFs 5, 6 y 7 están asociadas a la envoltura, a las proteínas de membrana y a la cápside respectivamente. Estas estructuras superficiales son importantes porque se requieren para la interacción con el huésped. Se dispone de un anticuerpo monoclonal para el diagnóstico del virus, denominado SDOW-17. Por análisis estadísticos se sugiere que hay mutaciones de las bases y recombinaciones intragenómicas, las cuales son responsables de la evolución viral (51).

En varias cepas aisladas de cinco granjas con abortos epidémicos, se encontró que tenían en común, el patrón enzimático de restricción 142 de ORF5 (enzimas de restricción Mlu I, Hinc II y Sac II), lo que podría indicar que el patrón 142, es un marcador de virulencia y es una forma estable del PRRSV, que se ha venido desarrollando por evolución (45).

Los signos clínicos de un brote de PRRS, se caracterizan por una falla reproductiva en las cerdas, que cursa con anorexia, abortos, partos prematuros entre los 107 y 112 días de gestación, incremento de los nacidos muertos, momias, nacidos débiles, y retardo en el retorno al estro. En los neonatos se observa un desorden respiratorio con pirexia, neumonía intersticial, e incremento en la mortalidad. En la ceba, la enfermedad se parece a la Influenza porcina, puede ser subclínica y solo es patente cuando hay infecciones concurrentes bacterianas o víales, casos en los que se presenta, una severa enfermedad respiratoria crónica (68, 70).

Los procedimientos para un diagnóstico etiológico del PRRSV incluyen tejidos. Se considera que el éxito en la detección del agente, depende de la edad, estado agudo o persistente de la infección, disponibilidad de reactivos de laboratorio, y la urgencia en la obtención de los resultados. En casos agudos las muestras más apropiadas son suero y macrófagos alveolares. En caso de infección persistente, los macrófagos alveolares fueron una muestra más apropiada que el suero, el pulmón o cualquier otro tejido (44); sin embargo, Benfield y cols (1998), afirmaron que el PRRSV reside en tejidos inmunológicamente privilegiados como los testículos y está ausente en tejidos como pulmón y macrófagos alveolares.

La persistencia viral es un factor muy importante para la permanencia del virus en los animales sanos en las granjas. La replicación del PRRSV, ocurre en tejido linfoide, especialmente en nódulos y tonsilas durante las infecciones persistentes. En resumen, se puede aseverar según la información científica disponible hasta el momento, que los resultados más confiables indican que el virus normalmente persiste en ganglios linfáticos y en tonsilas, en verracos adultos en testículos y que el mecanismo de persistencia se desconoce. Sin embargo, hay evidencia de que el virus no persiste por toda la vida de los animales a pesar de que no hay ninguna

prueba diagnóstica que con certeza identifique a los persistentes. Se recomienda para el diagnóstico, el aislamiento viral, la prueba de reacción en cadena de la polimerasa-PCR y el raspado de tonsilas (4).

Cuando se compararon dos cepas del PRRSV, una de baja y otra de alta virulencia por infección *in vitro* de macrófagos intravasculares pulmonares y macrófagos alveolares, no hubo diferencia en la patogenicidad de las dos cepas virales en los dos tipos de macrófagos, como se reportó *in vivo*. Además, se observó una permisividad por parte de ambas células a la infección y se presentó una disminución en la capacidad bactericida de las células y su producción de anión superóxido de 24 a 48 horas posinfección (50). Hay concurrencia de varios agentes infecciosos con la infección por PRRV, lo cual ha sido muy observado con bacterias como: *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Salmonella cholerae suis*, y *Pasteurella multocida*. Los factores involucrados en el curso y severidad clínica respiratoria incluyen: edad al tiempo de la infección, raza, diferencias en la virulencia de la cepa, infecciones concurrentes, y presencia de anticuerpos específicos contra el PRRSV, los cuales inducen una exacerbación de la infección mediada por anticuerpos, como ocurre en felinos, con el virus de peritonitis infecciosa felina. Cuando se tienen anticuerpos neutralizantes <1:4, se desarrollan altos niveles de viremia (14, 68, 70).

Hay diferencias en cuanto a la patogenicidad entre los aislamientos norteamericanos y el virus holandés. Las lesiones características en pulmón son 1) infiltración de los septos pulmonares con células mononucleares, 2) hiperplasia de los neumocitos tipo I y II, 3) acumulación de macrófagos alveolares necróticos y restos de tejido en los espacios alveolares. En forma general se puede afirmar que el PRRSV produce una neumonía intersticial proliferativa necrótica, y es característica, la hiperplasia e hipertrófia de los neumocitos tipo II y la presencia de macrófagos alveolares necróticos en los alvéolos pulmonares. Además la enfermedad cursa con linfadenopatía caracterizada por hipertrofia folicular, hiperplasia y necrosis (31). Adicionalmente, el PRRSV puede producir vasculitis necrótica cutánea y sistémica (60) y ocurre con gran probabilidad, infección transplacentaria fetal, cuando las hembras se infectan en la gestación tardía (35).

El virus del PRRS es relativamente lábil una vez está a temperatura ambiente y en el primer día, éste se pudo aislar de acero inoxidable, alfalfa, plástico, botas de caucho, viruta, paja, saliva porcina, orina y heces. El virus persistió por 11 días en aguas negras y nueve días en agua potable, lo cual sugiere que el agua es una fuente de infección del PRRSV (66). El PRRSV ha sido aislado de la orofaringe de un cerdo a los 157 a 134 días Posinoculación, después del último aislamiento sérico, indicando estado de persistencia viral, por ello es importante conocer el periodo de excreción viral para efectos del control de la enfermedad (67).

El virus del PRRS, se excreta por semen y se requieren 10-15 ml o 50 ml de semen extendido para lograr la detección viral por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa-PCR (51, 11). Se sabe que el virus de PRRS entra al semen independientemente del tejido testicular y epidídimo mediante monocitos macrófagos infectados (virus no asociado a células epiteliales) (11).

Para el diagnóstico del PRRSV se pueden utilizar pruebas directas e indirectas así: Elisa de bloqueo para a gran escala discrimina serológicamente los animales infectados con cepas de PRRSV europeas o americanas (57), prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes-IFA, Seroneutralización, inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA). Un ELISA comercial (HerdChek PRRSV ELISA, IDEXX Laboratories Inc), el cual determina que la relación muestra (=Muestra)/ positivo-P (M/P), y cuando es > 0.4 , indica positivo; éste se ha impuesto en el mercado por su a) capacidad para detectar cepas virales europeas y americanas b) rapidez c) licencia del Departamento de Agricultura de Estados Unidos-USDA y del gobierno de Canadá (69). También se utilizan el aislamiento en células M-145, la prueba de PCR, y la de inmunohistoquímica (68, 30).

Los métodos de diagnóstico directo como la PCR, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y el aislamiento viral, se usan intensivamente para la detección del virus del PRRS. La detección de material genómico a través de la técnica de RT-PCR, determina RNA de muestras clínicas. Esta prueba representa un diagnóstico más sensible y específico que ELISA y el aislamiento viral (58). Se está utilizando cebadores o primers complementarios específicos para ORF7, ORF6 y ORF7

(RT-PCR Orisure™, Origen Inc). En la Universidad de Minnesota, Molitor y Colaboradores, desarrollaron una prueba comercial llamada Taqman™. Este método de PCR que detecta la secuencia ORF6, está capacitado inclusive para detectar virus en muestras de semen; y a diferencia de las demás pruebas de PCR anidadas, el uso del Taqman logra la realización de la prueba en un solo paso de amplificación en un tubo, que luego es leído por un fotómetro. Se eliminan de esta manera, problemas de intensa labor, contaminación cruzada con falsos positivos y se ahorra tiempo (69).

En cuanto al diagnóstico directo, la prueba de inmunohistoquímica-IHQ es ampliamente usada y utiliza un anticuerpo monoclonal denominado SDOW17 desarrollado en la Universidad de Dakota del sur, el cual es considerado un reactivo universal, a pesar de no reaccionar con el virus vacunal de PrimePac® de Schering Plough; pero que puede reaccionar con otro anticuerpo monoclonal denominado SR30. La IHQ, fue superada por la prueba de hibridación *in situ*, en la detección del agente, al hallar su RNA de tejidos en formalina (51). Zhang y cols (1998), reportaron que hay diferencia antigénica entre las cepas europeas y americanas de campo, en cuanto a sus glicoproteínas GP4 y GP5, las cuales fueron identificadas mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales. El antígeno de tipo proteico GP5 de la envoltura del PRRSV, es codificado por el ORF5 y se especula que induce respuesta neutralizante.

La prueba de fragmentos de restricción de longitud polimórfica-RFLP, utiliza enzimas de restricción, la cual genotipifica por el patrón de fragmentos de nucleótidos resultantes. El análisis de RFLP es una simple alternativa a pruebas menos prácticas como el Southern blot y el PCR anidado. Se pueden manejar amplicones de 637-818 pares de bases sin dificultad y además hay disponibilidad de una enzima de restricción barata como la HaeII, para discriminar entre cepas americanas y europeas y de las cuales se obtienen entre 215 y 445 nucleótidos y 299 y 338 nucleótidos, respectivamente. La secuencia ORF7 es altamente conservada en los virus del PRRS, y por ello es apropiado el ORF7 RT-PCR en el diagnóstico (46).

El diagnóstico clínico es muy importante para el establecimiento de las medidas de control. Dee en 1998, propuso una clasificación clínica así: a)

granja *negativa*: aquella no infectada por hallazgos clínicos y resultados de diagnóstico; b) granja *estable/inactiva*, en la cual la estabilidad se refiere a la transmisión viral y productividad en el hato de cría y la inactividad a la ausencia de signos clínicos en la población de lechones destetos; aquí los adultos están infectados pero no están eliminando el virus a los lechones y los parámetros productivos son equiparables a granjas no infectadas normales; c) granja *estable/activa*, adultos normales pero infectados y lechones destetos con signos clínicos. Frecuentemente se incluyen infecciones secundarias concurrentes por *Streptococcus sp*, *Mycoplasma sp*, *Haemophilus parasuis sp*, lo que incrementa la mortalidad y la presentación de pobre conversión alimenticia y reducción de la ganancia diaria de peso; d) granja *inestable*: signos clínicos en adultos y lechones. Se han documentado los títulos por ELISA en las anteriores categorías de granja y el criterio de clasificación clínica es compatible con los hallazgos serológicos, lo que le da validez a lo propuesto por Scott Dee (69).

En la terapia clínica se incluye el uso de antipiréticos y antibióticos. Los métodos estándar zoonosanitarios son utilizados para impedir la introducción del virus de PRRS en la población-Planes de bioseguridad. La producción porcina del modo "todo dentro, todo fuera", y del sistema de "producción de tres sitios" con "destete temprano segregado medicado", disminuye, la formas severas de la infección (17, 43, 27). Monte McCaw (1995), propuso el método McREBEL™ (Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria to Eliminate Losses):

1. Atetar lechones en las primeras 24 horas de vida.
2. Parar atetes de lechones entre camadas, dirigidos a ajustar tamaño, salvar lechones enfermos y lechones de bajo peso al nacimiento-BPN o runts.
3. Atetar para ajustar tamaño, sólo en las primeras 24 horas de vida después del nacimiento.
4. Únicamente mover lechones dentro una sala de parto en que nacieron. Nunca mover lechones o cerdas entre salas de parto.
5. Nunca mas usar cerdas nodrizas para medrar lechones BPN, lechones nacidos débiles y lechones infectados con PRRS.
6. Minimizar la manipulación de lechones, especialmente para aplicar antibióticos de rutina e inyecciones de hierro.

7. Evaluar el efecto en caso de enfermedad clínica de los tratamiento para lechones lactantes y de recría, y de todo procesamiento no esencial.

8. Inmediatamente hacer eutanasia a todo cerdo muy enfermo y con pocas probabilidades de recuperación.

9. Nunca mantener lechones por fuera del flujo. No mover cerdos BPN a los espacios donde están ubicados los animales más jóvenes.

10. Parar inmediatamente, todo programa de reciclaje para el consumo por parte de animales adultos, de nacidos muertos o fetos abortados.

11. Establecer un estricto flujo de todo dentro todo fuera-TDTF en la recría.

12. Mantener un periodo de 2 a 3 días para limpieza y desinfección entre salas o habitaciones.

Este método busca reducir mediante cambios de manejo, la exposición a bacterias y la eliminación de pérdidas. Las medidas que se prescriben, y para el caso del PRRSV, reducen la diseminación del virus entre los lechones (69).

La vacunación es considerada por algunos una alternativa de control. Osorio y Cols (1998), hallaron diferencias estadísticas al destete entre grupos de lechones de cerdas vacunadas y no vacunadas, en cuyos ensayos se compararon dos vacunas vivas modificadas con licencia en Estados Unidos, con una vacuna muerta preparada de una cepa virulenta bajo los estándares requeridos por USDA. Se han desarrollado vacunas comerciales muertas basadas de un aislamiento español que dio origen a una vacuna comercial inactivada en adyuvante oleoso, denominada Cyblue® de laboratorios Sobrino del grupo Cyanamid (18). Hay disponibilidad de una vacuna viva con licencia en Estados Unidos y en Colombia de los laboratorios Boehringer Ingelheim (Ingelvac®). En la actualidad, hay investigaciones en curso con el objeto de desarrollar vacunas de subunidades. El Reino Unido, no acepta vacunas vivas atenuadas ni muertas, sólo espera probar vacunas efectivas y diferentes a las vivas atenuadas y muertas, como un criterio para asegurar la efectividad del control de la enfermedad, para tener la seguridad de que no habrá problemas de reversión patogénica de las cepas vacunales, impedir la introducción de mas cepas vivas al país y no incrementar los costos diagnóstico por la diferenciación entre cepas vacunales y salvajes.

A pesar de todo lo anterior, las vacunas hasta ahora, no son la panacea. Desde 1995 hasta 1998,

una operación de 85.000 cerdas en Estados Unidos y totalmente integrada y en condiciones netamente industriales, implementó un monitoreo exhaustivo mediante la utilización de toda la logística de diagnóstico existente, y aplicó varias medidas de control. Las vacunas actuales, no han probado ser efectivas hasta ahora, y tampoco han superado a la forma de inmunización por exposición con tejidos infectados con virus vivo salvaje de la granja (suministro molido de reciclaje=nacidos muertos, momias y fetos) (22). Los valores de viremia en primerizas desafiadas y previamente vacunadas pueden ser indicadores o parámetros predictivos del nivel de protección. Contrario a lo que se podría pensar, el total de anticuerpos inducidos por inmunización antes del desafío con virus virulento, no parece correlacionarse con protección (47).

Es necesario recalcar que se han hallado como medidas prácticas, la obtención de primerizas libres de la infección por el virus de PRRS por parte de las granjas de cerdas, cuando se van a introducir animales, a un hato infectado; para ello, la aclimatación de las cerdas de reemplazo por aislamiento de ellas y por exposición al virus vacunal vivo modificado, y mediante dos inmunizaciones antes de ser expuestas en la granja infectada, es lo adecuado. Además, se ha observado útil, otra dosis de vacuna viva modificada a los 50 días de gestación en las cerdas de reemplazo; no se recomienda el uso de vacunas muertas porque no inducen inmunidad media-da por células (15).

Las cerdas de reemplazo de granjas proveedoras libres del PRRSV, pueden lograr una mejor aclimatación, entre 45-60 días, periodo en el cual ellas se infectan con el virus de campo en las unidades de aislamiento o cuarentena antes de entrar al hato infectado, y para ello se requiere de la introducción de animales con edades entre 90 y 120 días de edad a las granjas. Cuando los animales provienen de una granja infectada y por tanto están infectados y posiblemente eliminando virus, se debe esperar en la unidad de aislamiento, hasta que el resultado de la prueba serológica de ELISA sea como mínimo 0.5, lo cual puede ocurrir alrededor de los 125 días de edad del grupo, tiempo para el cual, el grupo ya estaría listo para ser introducido al hato porcino, con estabilidad inmunitaria subsiguiente (41).

La erradicación del PRRSV es difícil por la ocurrencia de persistencia viral. Se ha intentado

y se recomienda la aplicación de varias estrategias: depoblación-repoblación, prueba o test diagnóstico y remoción del animal, destete temprano segregado y depoblación de unidades de recría (69).

Enfermedad por la infección con el virus de Aujeszky-ADV

Se sabe que en Colombia durante año 1997, la División de sanidad animal del ICA-CEISA: Programa Nacional de Sanidad Porcina, determinó una seroreactividad del 1.85% para 2.166 muestras de suero de 56 granjas porcinas, de ocho departamentos de la zona andina y valles interandinos (1). Generalmente, la infección es altamente fatal en muchas especies de mamíferos, con excepción en el suino que llega a alcanzar la edad de recría (42). Normalmente la enfermedad de Aujeszky o pseudorabia, causa enfermedad fatal en lechones lactantes, enfermedad respiratoria y retardo en el crecimiento en lechones de recría y problemas reproductivos en animales adultos (63).

El virus de la enfermedad de Aujeszky-ADV (Aujeszky disease virus-ADV) pertenece a la familia: *Herpetovirinae*, género: *Alfaherpesvirinae*. El virus consta de una nucleocapside envuelta, que rodea un genoma lineal de 145 kb de DNA y que codifica alrededor de 100 proteínas. Su tamaño es entre 105-110 nm. La envoltura viral posee 9 proteínas, ocho de ellas tienen azúcares, por lo que se les denomina glicoproteínas: gI, gII (IIa, IIb, IIc), gIII, gIV, gp50, g63. Son no glicosiladas las de 115kd. Otras importantes son la gX y la timidina kinasa TK. Algunos genes que codifican las anteriores proteínas como gI, gIII, gX y TK, no son necesarios para la replicación viral, como se ha probado con la eliminación de los anteriores genes en algunas vacunas sintéticas. Las proteínas involucradas en la virulencia del virus de Aujeszky son la gI, gIII, g63 y TK. Sólo son inductoras de inmunidad las proteínas gII, gIII y la g50 (42).

El virus se mantiene en los animales adultos infectados persistentemente y por la introducción de animales infectados. Se disemina por contacto directo nariz-nariz. También por contacto venéreo y por semen. La transmisión vertical también ocurre con el virus de Aujeszky. El virus se transmite por agua y en aerosoles. Hay evidencia de que el ADV permanece viable en el ambiente hasta por 7 horas con una humedad

relativa del 55%. Los lechones lactantes, de precebo y del levante, usualmente se escapan a la infección (42, 63).

En cerdos susceptibles, la infección por ADV empieza en la orofaringe, y se replica en la células de esta mucosa. Después el virus entra en la parte terminal del nervio trigémino, el nervio glossofaríngeo o el nervio olfatorio. Luego, los viriones y las capsides son llevados por transporte retroaxonal hacia los bulbos olfatorios ganglio trigémino, para establecer la latencia viral. Durante esta fase hay producción de partículas infecciosas y sólo una parte del genoma es transcripcionalmente activa. Las células infectadas pueden reactivar la replicación viral por estrés y por inmunosupresión con fármacos. Luego las partículas infecciosas se transportan por flujo axonal anterógrado a los sitios periféricos de infección (42, 63). Las células mononucleares de sangre periférica, no son una fuente adecuada para el diagnóstico del ADV, no obstante, los bulbos olfatorios son tan apropiados como el ganglio trigémino en la detección de persistencia viral. Y la detección del virus en médula osea, indica que este tejido está implicado en la persistencia de la infección del virus de Aujeszky (3).

Respecto del diagnóstico, no es posible aislar el virus o detectarlo por la prueba de PCR en líquido cerebroespinal, cuando este está latente, pero sí cuando hay enfermedad clínica (2).

El control se ha hecho por programas de erradicación que implican una política de regionalización de las áreas infectadas (38). La eliminación del agente por aplicación del manejo en baches en el flujo de los animales en granja (manejo todo dentro todo fuera-TDTF), producción en tres sitios, serología y eliminación de animales positivos. Se tienen cuenta los siguientes aspectos: a) reducción clínica de la enfermedad, b) protección inmunológica contra la infección, c) diseminación viral después del desafío, d) latencia, e) reactivación, f) vacunas diferenciables por marcadores y g) modelos matemáticos para el control y erradicación del virus, cuando se piensa en el desarrollo de vacunas (63).

Para el control de la enfermedad de Aujeszky ha sido de primordial importancia, el apoyo con vacunas vivas modificadas genéticamente por la supresión de algunos genes y a la vez, marcadas

mediante la adición en el genoma viral de genes marcadores, para su diferenciación de los virus salvajes, lo que las hace más seguras en lo que respecta al manejo de planes de erradicación (38). Y como novedad, también se está explorando otra alternativa desde que Baltimore (1988), propusiera la inmunización intracelular con proteínas mutantes dominantes-negativas como una forma de terapia antiviral en humanos y mediante la transformación de líneas de animales para conferir resistencia a la infección viral. Estas moléculas reguladoras tienen dominios que son responsables de la interacción con el DNA. La actividad antiviral de proteínas mutantes dominantes-negativas del transactivador IE180 del virus de Aujeszky en líneas de células transformadas, muestran que es posible usar el gen IE180, como un transgen para la inmunización intracelular contra pseudorrabia (20).

La prueba de ELISA como tamiz y la prueba de PCR para la identificación de persistencia viral en la población, son las que se usan (38). Los programas de erradicación consideran modelos matemáticos que enfatizan en que un agente será erradicado de la población de huéspedes, cuando cada huésped infeccioso infecte un promedio menor a un huésped. Este parámetro es llamado relación de reproducción (R) de una infección particular en un tipo particular de población de huéspedes. Por tanto, cuando $R < 1$, la infección en la población se irá disminuyendo, y resultarán pocos animales infectados (brote menor). Pero cuando $R > 1$, la infección se diseminará (brote mayor o epidemia) (62).

Coronavirus respiratorio porcino-PRCV

Es un virus de la familia Coronaviridae y es considerado una variante del virus de la gastroenteritis transmisible-TGEV, por una homología genética del 96% entre estos dos virus. Tiene un genoma de RNA de 23 kb. El PRCV emergió en 1984 en Europa como un virus respiratorio principalmente, y como una variante del TGEV y de una antigenicidad similar. En Estados Unidos, se aisló por primera vez en 1989, donde hay una prevalencia serológica del 64-74%. El virus se replica eficientemente en células epiteliales del tracto respiratorio y en macrófagos alveolares. Los signos clínicos son mínimos, pero por análisis histopatológico, se observa una neumonía intersticial moderada. La diseminación se presenta por contacto directo y

por el aire, por corrientes. En los hatos endémicamente infectados, los animales adquieren la infección como mínimo a las 4 semanas de vida. La importancia del PRCV radica en que por su infección se produce una reacción de neutralización cruzada con el virus de TGE, lo que confiere inmunidad a los animales contra el TGEV (52).

La inoculación de vacunas intranasales contra PRCV, estimulan efectivamente la inmunidad de los lechones hasta de un día contra la infección del virus de TGE. La inmunidad se establece 6 días postinoculación (64).

El diagnóstico se hace por aislamiento viral y seroneutralización, pruebas se usan, para el diagnóstico de rutina contra PRCV. Sólo por ELISA de bloqueo se pueden diferenciar los anticuerpos de ambos virus, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno diferenciador E2 o proteína E2, el cual es un epítipo ausente en el PRCV y presente en el virus del TGE. Europa era antes endémica de TGE, y la posterior endemia de PRCV, hizo desaparecer la enfermedad de la gastroenteritis transmisible (52). Se ha reportado presencia de infecciones virales concurrentes del virus de PRRS y PRCV (49).

El virus de influenza porcina-SIV

En Colombia, se determinó seroreactividad viral al SIV en 1977 (29). La Influenza porcina es una enfermedad causada por la infección del virus A de influenza en el tracto respiratorio, induciendo tos, disnea y postración, la cual se disemina rápidamente a través de los hatos, con resolución dentro de una semana (59). En forma enzootica está distribuida mundialmente (19). Alrededor del 60% de los casos que fueron remitidos por influenza durante el año de 1994 al laboratorio de diagnóstico veterinario de la Universidad de Minnesota, fueron seropositivos (5).

El virus de Influenza, pertenece a la familia Orthomyxoviridae de los virus RNA. Posee banda de RNA negativa segmentada, encerrada en una cubierta lipídica derivada del huésped, la cual presenta unas proyecciones o antígenos que son hemaglutininas (HA), es decir, que aglutinan glóbulos rojos y otros de neuraminidasas (NA). Debajo de la cubierta está la proteína M rodeando el complejo en hélice que contiene a la nucleoproteína (NP) y a las proteínas de polimerasa. Con base en las diferencias

antigénicas entre las proteínas M y NP, el virus ha sido clasificado en los tipos (A, B y C). El virus tipo A de influenza se clasifica inclusive en subtipos según el huésped animal de origen, un lugar geográfico y el año de aislamiento (7). Predominantemente dos cepas del virus de influenza A se han aislado del suino; éstas son la cepa H1N1 y H3N2. Mundialmente, estas incluyen las cepas: clásica H1N1, la aviar H1N1 y la H3N2 de origen humano y animal, y que permanecen en la población suina y son una causa significativa de enfermedad respiratoria (26).

A pesar de que no hay nada que confirme la presencia del verdadero estado de portador, los cerdos jóvenes una vez son susceptibles por la desaparición de la inmunidad materna, se infectan con virus circulante en la granja. Así, por inhalación, el virus es depositado en la superficie del tracto respiratorio inferior. Por infección experimental después de 2 horas el virus de Influenza A es fácilmente detectable en el tracto respiratorio por Inmunofluorescencia, luego se multiplica por 72 horas para desaparecer completamente a los 9 días posinfección. El incremento de los títulos por la prueba de HI se correlaciona con el signo clínico de tos (40).

En humanos el virus causa efectos adversos sobre la capacidad de limpieza mucociliar, la blastogénesis de linfocitos, una quimiotaxis de los monocitos y sobre múltiples funciones de los polimorfonucleares (13). El diagnóstico diferencial también incluye *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Hemophilus parasuis* e inclusive *Mycoplasma hyneumoniae* (17).

Adicionalmente, la infección por coronavirus respiratorio porcino-PRCV, Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino-PRRSV, se pueden presentar concurrentemente con el virus A de Influenza en cerdos (49). Además, son los virus mas comúnmente aislados en suinos (34). El virus de Influenza suina es fácilmente cultivable a partir de hisopados pulmonares y nasales, en huevos embrionados de pollo de 9-12 días o por cultivo en células MDCK u otros. Todas las condiciones relacionadas con estrés, están asociadas a la presentación epidémica de la enfermedad, "influenza aguda", que luego pasa a ser crónica (19).

La transmisión interespecies es un discutido aspecto en la epidemiología de la influenza. Como en todos los virus RNA, la rata de muta-

ción es muy alta y está en un rango de 10 a 5 sustituciones de nucleótidos por sitio y ciclo de replicación. Debido a esta característica y a la presión de selección, estos virus con nuevas propiedades evolucionan rápidamente. En adición a esta rápida variación (drift), el virus es segmentado y puede tener la posibilidad de hacer rearrreglo súbito (reassortment), y generar una nueva cepa. Con base en estos aspectos, los virus de influenza son sujeto de intensa investigación en el campo de su genética evolutiva (56).

La WHO y el CDC, recomiendan la Prueba de HI para el diagnóstico, la cual está estandarizada a nivel mundial (72). Sin embargo la prueba de ELISA es una muy buena alternativa y permite diferenciar mejor entre los tipos si se usa con antígenos independientes de neuraminidasa y hemaglutinina (39, 40).

Tanto en humanos como en animales domésticos se han intentado varias vacunas (8, 24, 28). Las vacunas oleosas son una forma viable de control de la influenza suina (Easterday, 1992). La vacuna (Maxi-Flu®), con licencia en los estados unidos, elimina las lesiones 20:5 en los suinos vacunados, respecto de los no vacunados; además solo el 20 % de los vacunados excretan el virus después de un desafío (8, 61).

El tratamiento individual con antibióticos, es el procedimiento mas eficaz, para evitar la infección secundaria. Con el uso de espectorantes en los cerdos, igual que las medidas que disminuyan el estrés, también se indican en las granjas. El SIV también infecta al humano, como prueba de ello, dos muertes humanas se han confirmado. Porque este virus circula entre cerdos, humanos, y aves, el cambio genético frecuentemente ocurre generando nuevas cepas. Se debe tener mucha precaución con personas inmunosuprimidas (mujeres gestantes, trasplantados, pacientes con cáncer, etc.) cuando se trabaja en granjas de cerdos, y durante un brote de Influenza porcina (9).

Circovirus Porcino-PCV

Descrito como el agente causal de la anemia infecciosa de los pollos y la enfermedad de las plumas, el circovirus, también se ha sido propuesto como un agente patógeno del suino. Se han encontrado anticuerpos contra circovirus en humanos, ratones y bovinos (12). Se ha descrito además en palomas (37), y en un estudio, el vi-

rus de PRRS fue demostrado en 50% de los tejidos infectados con PCV; adicionalmente, la seroprevalencia a PCV en cerdos de sacrificio en Alemania, es del 77 al 95%. El PCV es un virus DNA pequeño, identificado por primera vez en Alemania en 1974 como un virus contaminante de una línea celular de riñón porcino obtenida de la American Type Culture Collection-ATCC (12).

El virus es de simetría icosaédrica. Su tamaño varía en las especies de palomas y en aves psittacidas de 16.5 a 17 nanómetros y en pollos de 24 nm. Los corpúsculos intracitoplasmáticos en cerdos son redondos, con tamaño variable entre 5-25 micras, homogéneos, de color magenta a basófilos y se presentan solos o en agredados. Son positivos a DNA por la tinción de Feulgen por la cual se ven mejor, que por la tinción de hematoxilina-eosina (37).

Investigadores canadienses han descrito el síndrome de emaciación multisistémico posdestete-PMWS (postweaning multisystemic wasting syndrome), como una nueva enfermedad que afecta a cerdos destetos de 5-6 semanas de edad, de granjas grandes y pequeñas, de alto nivel de salud. En los hatos de alta salud, la mortalidad por PMWS, alcanza el 10%, en contraste con hatos endémicamente infectados, los cuales presentan morbilidades y mortalidades bajas. La condición de hato no expuesto, mezcla de animales, alta densidad y calidad del aire son factores de riesgo asociados a la severidad de la enfermedad. El síndrome se caracteriza clínicamente por signos de emaciación, disnea, palidez, ictericia y adenitis linfoide. Las lesiones macroscópicas se han descrito en animales de pobre condición corporal, los cuales presentan ganglios linfáticos agrandados, pulmón con moteado rojo y gris, atrofia hepática y riñones serosos y agrandados con focos blanquecinos debajo de la cápsula, esplenomegalia e intestino lleno de líquido. Para corroborar las lesiones macro, se hace necesario disponer de 3 a 10 lechones para necropsia. En los macrófagos, se observan corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos (12).

La lesión microscópica más característica es una inflamación granulomatosa multifocal, que además incluye al timo. Las lesiones comprenden macrófagos epitelioides y células gigantes multinucleadas. Los nódulos linfoides presentan cariorrexis de células necróticas y en

sus centros muestran depleción y necrosis de coagulación (37). El diagnóstico requiere del suministro adecuado de tejidos como: ganglios linfoides inguinales, mesentericos y esternales agrandados; hígado, pulmón, riñón, bazo, ileo y tonsilas. El diagnóstico se establece por la evidencia del PMWS en los animales afectados y la presencia del PCV, con corpúsculos de inclusión en los órganos mencionados (12). Un diagnóstico más específico y de tipo directo se puede hacer por hibridación *in situ* y por

inmunohistoquímica en los órganos anteriormente descritos, utilizando un suero policlonal contra el virus preparado en conejo y el aislamiento del virus de campo (37).

Se ha observado en hatos que presentan infección endémica, ausencia de diferencias estadísticamente significantes entre las cerdas seronegativas y seropositivas y en el desempeño productivo de sus hijos, hasta el sacrificio (33).

Summary

Swine respiratory diseases, Part I: respiratory viruses. A review

The increasing incidence and severity of respiratory diseases in last years, have been a complaining of Colombian producers. Four viruses and their diseases are discussed. Those are the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus-PRRSV, the Aujeszky's disease virus-ADV, Swine Influenza virus-SIV (H1N1, H3N2), the Porcine Respiratory Coronavirus-PRCV and Porcine Circovirus-PCV. The Porcine Cytomegalovirus is not included. Respiratory cases get complicated because of the concurrent respiratory viral and bacterial infections in the swine population. To date, except PRCV and PCV, the circulation of these viruses have been detected by serology and virus isolation by the government at the central diagnostic veterinary laboratory at Bogota (ICA-CEISA). Word wide, only in Aujeszky disease, there is agreement on the control measures, vaccines and vaccination programs.

Key words: Aujeszky, control, coronavirus, influenza, pathogenesis, PCV, PRRS, respiratory diseases, Swine.

Referencias

- Arbeláez G, Ruiz S, Gómez A, Barrero D, Peña N, et al. (A) Estudios serológicos de la enfermedad de Aujeszky en granjas porcinas intensivas de Colombia. (B) Estudio del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en granjas porcinas intensivas de Colombia. Rev Col Cien Pec 1997; 10. Suplemento: 13, 16.
- Balasz M, Pujols J, Segalés J, et al. Aujeszky disease (pseudorabies) virus detection in cerebrospinal fluid in experimentally infected pigs. Vet Microbiol 1998; 60: 99-106
- Balasz M, Pujols J, Segalés J, et al. Study of the persistence of aujeszky's disease (pseudorabies) virus in peripheral blood mononuclear cells and tissues of experimentally infected pigs. Vet Microbiol 1998; 62: 171-183
- Benfield DA, Nelson J, Rossow K, et al. Pathogenesis and persistence of PRRS. Allen D. Leman Conference. University of Minnesota. 1998; 169-171
- Bey Russel. Influenza Virus. Allen D. Leman Conference. University of Minnesota. 1994; 159-161
- Boeckman S. Diagnosing and confirming PRDC. Swine Practitioners. May/ 1996; 4-8
- Brian R, Murphy BR, Webster RG. Orthomixovirus, Fields Virology/editors-in chief, Fields BN, Knipe DM, Howley PM: associate editors, Chanok RM, et al. 1996; 3rd ed, Lippincott-Raven Publishers, vol 1.
- Brown G. and McMillen JK. MaxiVac-FLU : Evaluation of Safety and Efficacy of Swine Influenza Vaccine. Proceedings of American Association of the Swine Practitioners, The 25th Annual Meeting. 1994; 37-39
- Chase C, Lockwood RD. Clinical Perspectives on swine influenza. Allen D. Leman Swine Conference. University of Minnesota. 1994; 162-163
- Christopher Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. J of Clin Microbiol 1995; 33: 1730-1734
- Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, et al. Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen and tissues from vasectomized and nonvasectomized boars. Vet Pathol 1998; 35: 260-267
- Colins J, Frank R, Rossow K. Swine diagnostic pathology: Porcine circovirus; four cases and a historical review. Allen D. Leman Swine Conference. University of Minnesota. 1998; 1-9

13. Cooper AD, Carcelen R. Effects of influenza A nucleoprotein on polymorphonuclear neutrophil function. *J Infect Dis* 1996; 173: 279-284
14. Cooper VL, Doster AR, Hesse RA, Harris NB. Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. *J Vet Diagn Invest* 1995. 7: 313-320
15. Dee SA. The role of the replacement gilt in the maintenance of the PRRS infectious process. 1998. Allen D. Leman Swine Conference. University of Minnesota. 96-99
16. Done SH, Paton DJ, White MEC. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): review, with emphasis on pathological, virological, and diagnostic aspects. *Br Vet J* 1996; 152-153.
17. Done SH and Brown HI. Pathogenesis of the Swine Influenza. Allen D. Leman Swine Conference. University of Minnesota. 1994; 157-158
18. Durán JP, Molás VX. Inmunoprofilaxis contra el virus de la enfermedad reproductiva y respiratoria de la cerda. *Anaporc.* 1995; 150: 25-30
19. Easterday BC. and Hinshaw VS. Swine Influenza. Diseases of Swine. 7Th edition. Iowa State University Press. 1992; 349-347
20. Etsuro O, Taharaguchi S, Watanabe S, et al. Supression of pseudorabies virus replication by a mutant form of immediate-early protein IE180 repressing the viral gene transcription. *Vet Microbiol.* 1998; 60: 107-117
21. FAO-OIE-WHO, Animal Health YearBook. 1994; PIX
22. Fernández L. Keeping the PRRSV genie in its bottle. Allen D. Leman Conference. University of Minnesota. 1998; 174-175
23. Friendship RM. and Henry SC. Cardiovascular system, hematology, and clinical chemistry. Diseases of Swine. Seventh edition. Iowa State University Press. 1992; 3
24. Gorse GJ, Otto EE, Powers DC, Induction of mucosal antibodies by attenuated and inactivated influenza virus vaccines in the chronically ill elderly. *J Infect Dis* 1996; 173: 285-290
25. Gramer ML, Christianson WT, Harris DL. Producing PRRS-negative pigs from PRRS-positive sows. Allen D. Leman Swine Conference. University of Minnesota. 1998; 190-193
26. Gross PA. Preparing for the next influenza pandemic: A reemerging infection. *Ann Int Med* 1996; 124:682-685
27. Gillespie TG. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus control by vaccination. Allen D. Leman Conference. University of Minnesota. 1995; 163-165
28. Khan AS, Polezhaev F, Vasiljeva R, et al. Comparison of US inactivated split-virus Russian live attenuated, cold-adapted trivalent Influenza vaccines in Russian school children., *J Infect Dis.* 1996; 173:453-456
29. Hanssen HV, Hincapié O, López JH, Influenza en los porcinos de Antioquia, Colombia, *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.* 1977; 82: 35-42
30. Harbur PG, Andrews JJ, Huffman EL, et al. Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J Diagn Invest* 1994; 6:254-257
31. Harbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, et al. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the lelystad virus. *Vet Pathol* 1995; 32: 648-660.
32. Hoefling Douglas C. Tracking the incidence or porcine respiratory diseases. *Vet Med* 1998; 391-398.
33. Hines RK, Lukert PD, Dau D, Case D. Some effects of porcine circovirus on performance. *Swine Health Prod* 1995; 6:251-255.
34. Janke BH. Diagnosis of Viral Respiratory Disease in Swine. *Swine Health and Prod* 1995; 3: 116-120
35. Kranker S, Nielsen J, Bille-Hansen V, Botner A. Experimental inoculation of swine at varios stages of gestation with a danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-PRRSV. *Vet Microbiol* 1998; 61: 21-31
36. Kerkaert BR, Pijoan C, Dial G. Financial impact of chronic PRRS. Allen D. Leman Conference. University of Minnesota. 1994; 217-218
37. Kiupel M, Stevenson GW, Mittal SK, et al. Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet Pathol* 1998; 35: 303-307
38. Kluge JP, Beran GW, Hill HT, Platt KB. Pseudorabies (Aujeszky's disease). Diseases of Swine 7ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. USA. 1992; 312-323
39. Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Larson ME. Class specific antibody response to influenzan A H1N1 infection in swine. *Vet Microbiol* 1995; 43; 241-250
40. Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Morrison RB, Freese W. Determination of hemagglutination-inhibition titers to influenza A virus in porcine sera by use of an enzyme linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1270
41. Loula Tim. What's new with PRRS on commercial farms?. Allen D. Leman Conference: University of Minnesota. 1998; 172-173.
42. Maez R, Sussman M, Vilnis A, Thacker B. Recent developments in latency and recombination of Aujeszky disease (Pseudorabies) virus. *Vet Microbiol* 1997; 55: 13-27
43. McCaw MB. Mc REBEL PRRS: management procedures for (PRRS) control in large herd nurseries. Allen D. Leman Conference: University of Minnesota. 1995; 161-162

44. Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diag Invest* 1995; 7: 3-16
45. Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC, et al. An update of research at the national animal disease center on current field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome PRRS virus. Allen D. Leman Conference: University of Minnesota. 1997; 138-144
46. Oleksiewicz MB, Bøtner A, Madsen KG, Storgaard T. Sensitive detection and typing of porcine reproductive syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol* 1998; 64: 7-22
47. Osorio FA, Zuckermann F, Wills, et al. PRRSV: comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence. Allen D Leman Conference. University of Minnesota. 1998; 176-182
48. Peña BN, Rincón MA, Arbeláez RG, et al. Reactividad serologica al SRRP en cerdos de sacrificio en DPTOS. tecnificados de Colombia. *Revista ACOVEZ*. 1998; 23: 3-9.
49. Reeth KV, Nauwynck H, Pensaert M. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory sindrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microbiol* 1996; 48: 325-335
50. Roongroje T, Thacker EL, Halbur PG. Influence of pig age on virus titer and bactericidal activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infected pulmonary intravascular macrophages (PIMs). *Vet Microbiol* 1998; 63: 177-187
51. Rossow KD. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. Review Article. *Vet Pathol* 1998; 35:1-20.
52. Saif LJ, Wesley RD, *Transmissible gastroenteritis. Diseases of Swine* 7ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. USA. 1992; 362-386
53. Sibbel RL, McMillen JK, Brown GB. Field experiences with MaxiVac-FLU. Allen D. Leman Conference. University of Minnesota. 1994; 166-167
54. Schang LM, Osorio FA. Quantitation of latency established by attenuated strains of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. *J virol Methods* 1994; 50: 269-280.
55. Schang LM, Kutish GF, Osorio FA. Correlation between precolonization of trigeminal ganglia by attenuated strains of pseudorabies virus and resistance to wild-type virus latency. *J virol* 1994; 68: 8470-8476
56. Scholtissek C. Molecular Evolution of Influenza Viruses. *Virus Genes* 1996; 11: 209-215.
57. Sorensen KJ, Standbygaard B, Botner A, et al. Blocking ELISA's for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1998; 60: 169-177
58. Spagnuolo-Weaver M, Walker IW, McNeilly F, et al. The reverse transcription polymerase chain reaction for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome: comparison with virus isolation and serology. *Vet Microbiol* 1998; 207-215
59. Taylor DJ. *Swine Influenza. Pig Diseases: 6th edition.* Glasgow. 1989. 37-40
60. Thibault S, Drolet R, Germain M, et al. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* 1998; 35:108-116.
61. Umbaugh J, Bey R, Simonson R, Lang S, Larson M. Swine Influenza Vaccine Efficacy. Allen D. Leman Conference. University of Minnesota. 1994; 164-165
62. Van Nes A, De Jong MCM, Buijtelts JAAM, Verheijden JHM. Implications derived from a mathematical model for eradication of pseudorabies virus. *Vet Microbiol* 1998; 39-58
63. Vilnis A, Sussman MD, Thacker BJ, Senn M, Maes RK. Vaccine genotype and route of administration affect pseudorabies field virus latency load after challenge. *Vet Microbiol*. 1998; 62: 81-96
64. Wesley RD, Woods R, Protective immunity against TGE induced by porcine respiratory coronavirus (PRCV). *Proceedings of the american association of swine practitioners-AASP*. 1995; 361-362
65. WHO Collaborating Centers for Reference and research on influenza (1982) concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Centers for Disease Control, Atlanta.
66. Wills R, Zimmerman JJ, Yoon KJW, et al. Porcine reproductive and reproductive and respiratory syndrome virus : routes of excretion. *Vet Microbiol* 1997; 55: 69-81
67. Wills R, Zimmerman JJ, Yoon KJW, Porcine reproductive and reproductive and respiratory syndrome virus : a persistent infection. *Vet Microbiol* 1997; 55: 231-240
68. Zimmerman J, Yoon KJ, Wills RW, Swenson SL, General overview of PRRS : A perspective from the United States. *Vet Microbiol* 1997; 55: 187-196
69. Zimmerman J, Yoon KJ, Stevenson G, Dee SA. PRRS compendium: a comprehensive reference on porcine reproductive and respiratory syndrome for pork producers, veterinary practitioners and researchers. 1998; National Pork Producers Council. 119p
70. Yoon KJ, Lien Lin Wu, Zimmerman JJ, Platt KB. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet Microbiol* 1997; 55: 277-287
71. Zhang Y, Rameshwer DS, Prem P. Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1998; 63: 125-136.
72. Zhou N, He S, Zhang T, et al. Influenza Infection in Humans and pigs in southeastern China. *Arch Virol*. 1996; 141: 649-661.