



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD
ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS DE INFLUENZA A,
QUE CIRCULAN EN CERDOS EN LA REGIÓN DEL BAJÍO
MEXICANO.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
CATALINA TUFÍÑO LOZA**

**TUTOR PRINCIPAL:
EDITH ROJAS ANAYA - MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
ELIZABETH LOZA RUBIO – MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL**

**JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA – FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA, U.N.A.M**

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

- Por mi oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de este trabajo. Por lo que ha sido y será . . . Gracias -

A mis padres, Rosa María y Miguel, les agradezco su apoyo, guía y su confianza en la realización de mis sueños. Soy afortunada por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo. Esta tesis es suya.

A mis hermanas, Tere y Rosita, con mucho cariño, por el cariño y sueños que hemos compartido y realizado.

A mi prima Lucy, mi tía Leonor, mis tíos José y Naín, y mis abuelitos, Lucía, Manuel y Chuchito, que me acompañan siempre y mandan todas sus bendiciones desde el cielo.

A Luis por su cariño, su estímulo, su apoyo constante, sus conocimientos y la gran ayuda que me brindo para no perder la fe en mí....evidencia de su gran amor ¡¡¡Gracias!!!

A Elia, Emma, Celene, Marilú, Fernando, Nancy, Dr. Fernando Diosdado, Oswaldo, Itan, Karla y Ariel por ser unos amigos increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y alegría. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío.

A Edith por depositar en mi toda su confianza, sus oportunos consejos, las reflexiones que me han ayudado tanto y su continuo apoyo. Gracias por creer en mí!!!!!!

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio y al Dr. José Juan Martínez Maya por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la elaboración de este trabajo.

A todas las personas que han dejado huella en mi vida, ustedes han sido fuente de alegría e inspiración y fueron de gran ayuda para terminar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

- Al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias - Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias – Laboratorio de Biotecnología en Salud Animal que me proporcionaron un lugar para la realización de esta tesis, bajo la tutoría de la Dra. Edith Rojas Anaya y Dra. Elizabeth Loza Rubio.
- A CONACyT - que me proporcionó la beca Nacional con No. de registro: 378454, para llevar a cabo mis estudios de maestría.
- Al proyecto “Epidemiología y caracterización de los virus de influenza A que afectan a los porcinos y aves en México” No. proyecto:127005-CONACyT
- A los Comités de Fomento y Protección Pecuaria, Unión de productores, asociaciones y dueños de las granjas de los estados muestreados que permitieron el acceso y contestaron amablemente a las encuestas, así como a los trabajadores de las granjas por brindar su tiempo en apoyo a este trabajo.
- A la Dra. María Eugenia Manjarrez Zavala jefa del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por su asesoría y donación del virus H1N1/2009 pandémico para la realización de la técnica de Inhibición de la hemaglutinación en sus instalaciones y de células MDCK para la replicación del aislamiento que se obtuvo.
- Al Dr. Carlos Cabello Gutiérrez del laboratorio de Virología del INER por su asesoría en la realización de diferentes actividades: cultivo, crecimiento y congelación de células MDCK; replicación y titulación del virus de influenza y manejo y procesamiento de muestras para su análisis por la técnica de Inhibición de la hemaglutinación e inmunofluorescencia.
- Al Dr. José Juan Martínez Maya por el apoyo brindado para el desarrollo del análisis estadístico realizado en esta tesis.

Resumen

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, su genoma es un ácido ribonucleico, dividido en 8 segmentos que codifican para doce proteínas: PB2, PB1, PB1-F2, N40, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2. Por la importancia que tiene el cerdo en epidemiología de la influenza, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar los virus de influenza A en cerdos de la región del Bajío Mexicano, así como determinar la frecuencia serológica y factores de riesgo asociados a la enfermedad. Se evaluaron 2048 muestras de sueros de cerdos de 256 unidades de producción (UP) para la determinación de frecuencias serológicas de los subtipos virales H1N1 endémico, H3N2 endémico y H1N1/2009. Por otra parte, se tomaron hisopados del tracto respiratorio superior para la detección del virus de influenza. La determinación de factores de riesgo asociados a la exposición de cada subtipo, se realizó mediante pruebas de homogeneidad de proporciones, razón de momios y análisis de regresión logística. Se obtuvo un aislamiento del estado de Guanajuato, cuya caracterización molecular lo ubico como subtipo H1N1. Los factores de riesgo asociados a la exposición del virus en las UP fueron: la etapa de pie de cría y destete, sementales, presencia de animales enfermos, producción de ciclo completo, UP a pie de carretera, alimentación con escamocha, presencia de humedales y cría de cerdos del personal que labora en UP porcina. En conclusión, el aislamiento A/Cerdo/México/Gto_Sal_1/2011 (H1N1) es de origen porcino ya que no se encontró relación con secuencias humanas, ni aviares. Dicho aislamiento mostró alta homología con otros de diferentes regiones de México, esto, puede ser debido principalmente a la movilización de animales en el país, además se observó mayor distribución del subtipo H1N1 endémico en los animales favorecido por algunos factores de riesgo que se encontraron significativos.

ABSTRACT

Influenza virus belongs to *Orthomyxoviridae* family, its genome consists of eight gene segments, single strand RNA to encode for 12 protein products: PB2, PB1, PB1-F2, N40, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2. The influenza virus infection in pigs is considered an important public health concern, therefore, the aims of this study were to isolate and characterize viruses from Mexican pigs in Bajío, as well as, determine seropositive frequencies and risk factors associated with the spread of swine influenza virus (SIV). Serum samples from 2048 pigs of 256 farms were analyzed for detection of antibodies against SIV subtypes H1N1 and H3N2, and H1N1/2009 pandemic. Nasal swabs were collected to virus identification by real-time reverse transcription-PCR. To evaluate the potential risk factors associated with SIV, were analyzed using X^2 test and logistic regression model. A virus isolated from Guanajuato was characterized and shown to be H1N1. Several risk factors were associated with seroprevalences of SIV: breeding stock and weaning pigs, the boars, infected animals, over the road farms, waste feeding, wetlands presence, pigs breeding by swine workers and breeding-fattening pig farms. In conclusion, the virus *A/cerdo/México/Gto_Sal_1/2011* (H1N1) isolate indicates to be swine origin and not related with human or avian sequences. This isolated shown high homology with other Mexican isolates, mainly because of trade, also, there was a high seroprevalence of H1N1 subtype bringing on because of the significant risk factors found in this study.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	4
1.1.1 Características del virus.....	4
1.1.2 Ciclo infectivo	8
1.1.3 Transmisión	10
1.2 Influenza Porcina	10
1.2.1 Patogenia	13
1.2.2 Diagnóstico	15
1.3 Distribución mundial del virus pandémico H1N1 en el cerdo	17
1.4 Factores de Riesgo	24
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo General	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
4.1 FASE I. Estudio epidemiológico del Virus de Influenza Porcina en Estados del Bajío Mexicano	29
4.1.1 Muestras biológicas	29
4.2 FASE II. Detección y aislamiento del virus de influenza A	30
4.2.1 RT-PCR en Tiempo Real	30
4.2.2 Aislamiento viral en cultivo celular	31
4.2.3 RT-PCR en tiempo real utilizando un panel de diferenciación de los subtipos virales de influenza porcina.....	31
4.2.4 Prueba de inhibición de la hemaglutinación	31
4.2.5 Caracterización de los aislamientos y sus genes	32
4.2.6 Construcción de árboles filogenéticos	33

4.3 Metodología estadística	33
5. RESULTADOS	36
5.1 Frecuencias serológicas	36
5.2 Aislamiento	41
5.3 Determinación de factores de riesgo	50
5.3.1 Análisis bivariado	50
5.3.2 Modelo multivariado	52
6. DISCUSIÓN	55
6.1 Frecuencias serológicas	55
6.2 Aislamiento	60
6.3 Determinación de factores de riesgo	63
7. CONCLUSIONES.....	76
8. REFERENCIAS.....	78
9. ANEXOS (Cuestionario y claves de factores de riesgo)	94
9.1 Cuestionario de producción y salud porcina	94
9.2 Claves de factores de riesgo	97

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Proteínas codificantes de los 8 segmentos del genoma del virus de influenza A.

Cuadro 2. Iniciadores usados en la amplificación completa de los genes M, HA y NA.

Cuadro 3. Factores de riesgo obtenidos del cuestionario aplicado a las UP y sus categorías de estudio.

Cuadro 4. Porcentaje de muestras serológicas positivas a los diferentes subtipos del virus de influenza A, en los cinco estados muestreados en la región del Bajío Mexicano del 2010-2012.

Cuadro 5. Porcentaje de muestras serológicas positivas en los diferentes municipios muestreados del estado de Guanajuato para los subtipos H1N1, H3N2 y A/H1N1/2009.

Cuadro 6. Cuadro 6. Porcentaje de muestras serológicas positivas en los diferentes municipios muestreados del estado de San Luis Potosí para los subtipos H1N1, H3N2 y A/H1N1/2009.

Cuadro 7. Porcentaje de muestras serológicas positivas en los diferentes municipios muestreados del estado de Querétaro para los subtipos H1N1, H3N2 y A/H1N1/2009.

Cuadro 8. Análisis BLASTn del gen HA del aislamiento Gto-Sal1 con secuencias del NCBI.

Cuadro 9. Análisis BLASTn del gen NA del aislamiento Gto-Sal1 con secuencias del NCBI.

Cuadro 10. Análisis BLASTn del gen M del aislamiento Gto-Sal1 con secuencias del NCBI.

Cuadro 11. Valores de Chi-cuadrada (X^2) para los diferentes factores de riesgo significativos por exposición para el subtipo H1N1 endémico.

Cuadro 12. Valores de Chi-cuadrada (X^2) para los diferentes factores de riesgo por exposición significativos para el subtipos H3N2.

Cuadro 13. Valores de Chi-cuadrada (X^2) para los diferentes factores de riesgo por exposición significativos para el subtipo H1N1 pandémico.

Cuadro 14. Valores de Chi-cuadrada (X^2) para los diferentes factores de riesgo por enfermedad para los virus de influenza A.

Cuadro 15. Estimación de factores de riesgo por exposición al subtipo H1N1 mediante el cálculo de regresión logística.

Cuadro 16. Estimación de factores de riesgo por exposición al subtipo H3N2 mediante el cálculo de regresión logística.

Cuadro 17. Estimación de factores de riesgo por exposición al subtipo H1N1 pandémico mediante el cálculo de regresión logística.

Cuadro 18. Estimación de factores de riesgo asociado a la enfermedad por virus de influenza A, mediante el cálculo de regresión logística.

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama estructural de virus de influenza.

Figura 2. Esquema del proceso de replicación del virus de la influenza.

Figura 3. Virus Influenza A (H1N1) de origen porcino causante del brote pandémico 2009.

Figura 4. Árbol filogenético para las secuencias de nucleótidos del gen HA.

Figura 5. Hipótesis del modelo de asociación entre los factores de riesgo para la presentación de enfermedades respiratorias.

Figura 6. Porcentaje de Unidades de Producción muestreadas en la región del Bajío Mexicano para la detección serológica del virus de influenza porcina del 2010 al 2012.

Figura 7. A) Células MDCK confluentes sin infectar y B) Efecto citopático producido por virus de influenza

Figura 8. RT-PCR en tiempo real utilizando un panel de iniciadores contra el virus de influenza para la amplificación de los virus tipo A y diferenciación de los subtipos H1N1, H3N2 endémicos y H1N1 pandémico, así como la amplificación del aislamiento Gto_Sal_1/2011 con los iniciadores universales para la detección del gen M (Flecha azul) y con los iniciadores para el subtipo H1N1 endémico (Flecha roja).

Figura 9. Amplificación de los genes completos M, HA y NA del aislamiento Gto_Sal_1/2011 para su purificación y posterior secuenciación. Carril: 1. Marcador de peso de 1 Kb (Biolabs, USA), 2. Gen M (1056 pb), 3. Gen HA (1533 pb) y 4. Gen NA (1442 pb).

Figura 10. Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del gen HA1. El árbol fue generado por el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas de bootstrap en el programa Mega 5.0.

Figura 11. Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del gen NA1. El árbol fue generado por el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas de bootstrap en el programa Mega 5.0.

Abreviaturas y Siglas usadas

ADN:	Ácido desoxiribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
BALF:	Lavados bronqueoalveolares
BLASTn:	Basic Local Alignment Search Tool de secuencias nucleotídicas.
CDC:	Centro de Control de las Enfermedades y Prevención de los Estados Unidos.
CFPP:	Comités de Fomento y Protección Pecuaria
CO ₂ :	Dióxido de carbono
C _T :	Cycle threshold ó ciclo umbral
dNTP's:	Desoxinucleótidos
EU:	Estados Unidos de América
FP:	Factor Protector
Fw:	Forward ó sentido
GTR:	General Time Reversible model
+G:	Distribución Gamma
INIFAP:	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
I.C.:	Intervalos de Confianza
IH:	Inhibición de la Hemaglutinación
IFN:	Interferon tipo I
IMSS:	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI:	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IP:	Influenza Porcina
kDA:	kiloDaltons
MDCK:	Madin Darbin Canine Kidney
NAHMS:	Sistema Nacional de Monitoreo de Salud Animal
NANA:	Ácido N-acetil-neuramínico
NCBI:	Base de Datos del National Center for Biotechnology
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OR:	Odds ratio ó razón de momios

OPS:	Organización Panamericana de la Salud
PANAFTOSA:	Centro Panamericano de Fiebre Aftosa-Salud pública veterinaria
pb:	Pares de bases
PRRS:	Síndrome respiratorio reproductivo porcino
RR:	Riesgo relativo
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
Rv:	Reverse ó antisentido
SENASICA:	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
UHA:	Unidad hemoaglutinante
US:	Relativo a dólares
USDA:	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UP:	Unidades de producción
X ² :	Ji-cuadrada
+	Ver en anexos las claves para cada factor de riesgo

1. INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria aguda que ha afectado a los humanos desde los tiempos antiguos. La súbita aparición de enfermedades respiratorias que persisten por pocas semanas e igualmente desaparecen, son características suficientes para identificar un número de epidemias mayores en el pasado. Una de estas epidemias fue reportada por Hipócrates, el padre de la Medicina, en el año 412 a.C. Numerosos episodios similares también fueron descritos en la Edad Media. El término influenza fue introducido en Italia al inicio del siglo XV para describir una epidemia que fue atribuida a la influencia de las estrellas. El término fue adoptado por los Ingleses en el siglo XVIII; durante el mismo período los franceses denominaron la enfermedad como la gripe (Ayora-Talavera, 1999).

Las principales epidemias y pandemias causadas por el virus de influenza han sido causadas por el virus tipo A, el cual también está asociado con la influenza aviar, equina y especies porcinas. Los virus de Influenza B sólo se han aislado de infecciones humanas y solo hay un subtipo, y tienen un bajo potencial de causar pandemias, aunque sí pueden provocar enfermedades respiratorias serias. Los virus de influenza C, infectan a humanos y cerdos, causan enfermedades respiratorias leves y han sido poco estudiados (Ma *et al.*, 2009).

El evento de influenza más catastrófico por zoonosis fue la pandemia de influenza A (H1N1) de 1918-1919 y sigue sin precedentes en cuanto a su severidad, causó el deceso de mas 50 millones de personas en todo el mundo. Esta pandemia se desarrolló en tres brotes. El primero, se observó una leve enfermedad respiratoria en la primavera de 1918 fue seguido por una segundo brote en el mes de septiembre de 1918 en Fort Funston, Kansas (ahora Fort Riley) y fue atribuida a un soldado, el cual había limpiado corrales de cerdo. No hay reportes de la presencia de aves domésticas en los campamentos de ese tiempo. La enfermedad fue diseminada entre los soldados y posteriormente a otras bases militares,

ciudades de Estados Unidos y por barcos militares hasta Europa. Esta primera oleada fue altamente contagiosa pero causó pocos decesos y recibió poca atención y en la mayor parte del mundo. Fue seguida por una segunda oleada en el mes de Septiembre a Noviembre de 1918, que dieron lugar a las tasas de mortalidad por encima del 2,5 %, en comparación con menos del 0,1 % registrado normalmente para los brotes de gripe. Un tercer brote con altas tasas de mortalidad también arrasó en todo el mundo en la primavera de 1919. El patrón de la mortalidad ocasionada por este virus era inusual, se observaron altas tasas de mortalidad en adultos jóvenes, principalmente entre los 15 y 35 años de edad. Las tasas de morbilidad fueron similares a la de otras pandemias, en donde los niños menores de 15 años experimentaron la mayor tasa de ataque (Schnitzler *et al.*, 2009).

La mayoría de los pacientes murieron de neumonías por complicaciones bacterianas, atribuidas principalmente a la falta de antibióticos; sin embargo, muchos otros murieron a causa de una neumonía viral. Los análisis filogenéticos hechos a este virus han determinado que sus genes eran de tipo aviar y de tipo humano como firma en algunas de las proteínas. Las mutaciones puntuales subsiguientes al reacondicionamiento genético de este virus es la causa más probable para la presentación de las oleadas de infección que se presentaron. La HA de este virus carece de un sitio múltiple de corte, el sello distintivo del virus de la influenza aviar de alta patogenicidad y que pertenece a los virus de alta patogenicidad de aves de corral. Otras proteínas diferentes, como la PB1-F2 contribuyeron a su virulencia y la HA y PB2 eran críticas para su transmisibilidad. Este virus reapareció en 1977/1978 y la actual temporada humana H1 las proteínas pertenecen al mismo linaje (Taubenberger *et al.*, 2005; Barry *et al.*, 2008; Schnitzler *et al.*, 2009).

En 1957 surgió un nuevo rearrreglo viral humano-ave del subtipo H2N2, este virus poseía la HA, NA y PB1 de un virus de influenza aviar, mientras que los segmentos restantes eran subtipo H1N1, éste fue reintroducido en humanos en

1977 causando un deceso de 2 millones de personas (Webster *et al.*, 1992; Schnitzler *et al.*, 2009). Esta pandemia fue originada en la provincia de Guizhou al Sur de China en el mes de febrero de 1957 y se extendió a la provincia de Hunan, así como a Singapur y Hong Kong en los meses de Marzo y Abril del mismo año. Este virus fue aislado en Japón. Se presentó una primera oleada de infección en Octubre de 1957 en los Estados Unidos y Reino Unido, seguida por una segunda oleada en Enero de 1958. La tasa de infección se excedió del 50%, afectando principalmente a las personas entre 5 y 19 años de edad. La mortalidad ocasionada por este virus es atribuida a la falta de inmunidad pre-existente entre la población humana hacia las nuevas glicoproteínas (Schnitzler *et al.*, 2009).

En 1968-69, un rearrreglo H3N2 surgió con una nueva HA y PB1 de virus aviar, conservando los segmentos del virus antecesor H2N2 (Webby *et al.*, 2004). Los primeros signos de esta nueva pandemia fueron notificados por el Sur de Asia en el verano de 1968 y el virus fue aislado en el mes de Julio del mismo año en Hong Kong. Este virus se extendió por todo el mundo durante el invierno de ese año y así como por 1969 y 1970. Las tasa de ataque alcanzaron un 40%, afectando a las personas de entre 10 y 14 años de edad. Este virus contiene una HA del subtipo H3 y comparte menos del 30% de homología con su predecesor. Sin embargo, los anticuerpo pre-existentes en la población hacia la proteína N2 posiblemente moderó la severidad de esta pandemia. Este virus fue transmitido a los cerdos poco después de que apareció en los seres humanos. El virus de influenza porcino fue aislado de humanos en 1974 y causó el deceso de al menos 1 millón de personas (Schnitzler *et al.*, 2009).

De 1974 a 2005 fueron confirmados 43 casos de transmisión de influenza A de cerdos a humanos con 6 casos letales. En 1976 se detectó influenza porcina subtipo H1N1 determinado por estudios serológicos, sin embargo éste sólo llegó a cerca de 200 casos (Gaydos *et al.*, 2006; Schnitzler *et al.*, 2009).

De diciembre de 2005 a Febrero de 2009 se detectaron 11 casos en humanos de Influenza porcina subtipo H1N1, posiblemente causado por la co-circulación y mezcla del triple rearreglo H3N2 con linajes porcinos establecidos, H1N1 y H1N2 que han circulado en Norteamérica desde el 1998 (Garten *et al.*, 2009; Lade *et al.*, 2011).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Características del virus

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y se divide en 3 tipos: A, B y C. Todos los virus influenza comparten características estructurales como el diámetro de 50 a 120 nm; la forma esférica; la presencia de una envoltura y el tipo de genoma. La envoltura corresponde a una bicapa de lípidos derivados de la membrana celular de la cual sobresalen alrededor de 500 espículas, conformadas por las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hacia el interior de la partícula viral, existe una capa formada por la proteína matriz (M) y más al interior, está la nucleocápside de simetría helicoidal, constituida por los complejos polimerasa y nucleoprotéico que incluye el genoma viral. Este es una cadena de ácido ribonucleico (ARN), de polaridad negativa, formada por 12000 a 15000 nucleótidos y dividido en 8 segmentos (Zimmerman *et al.*, 2004; Gramer, 2005; Olsen *et al.*, 2006; Talledo *et al.*, 2009) (Figura 1).

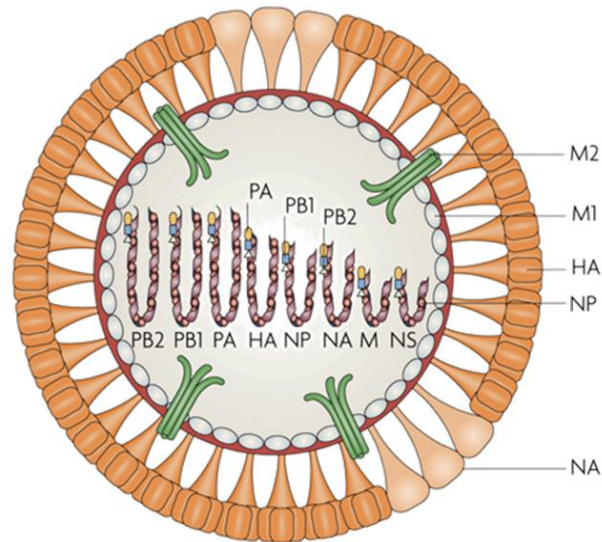


Figura 1. Diagrama estructural de virus de influenza. HA: hemaglutinina; M: matriz; NA: neuraminidasa; NP: nucleoproteína; NS: proteína no estructural; PA: polimerasa ácida; PB1 y PB2: polimerasa básica. *Modificado Nature Reviews Immunology 7, 267-268 (2007)*

De los ocho segmentos, seis son segmentos largos de ARN y codifican para un polipéptido presente tanto en la célula infectada como en el virión. Los dos segmentos pequeños, siete y ocho codifican para las proteínas matriz y la proteína no estructural (NS1 y NS2), respectivamente. La proteína matriz sólo se encuentra en el virión, las otras son polipéptidos no estructurales del virus, la NS1 es traducida de un transcrito colinear del segmento 8, se designa como no estructural porque es sintetizada en la célula infectada, pero no se incorpora al virión y la NS2 es una proteína de exporte nuclear (Krug *et al.*, 2003, Talledo *et al.*, 2009).

El genoma viral de los virus de influenza A codifican para un total de 12 proteínas (Wise *et al.*, 2009; Nfon *et al.*, 2011, Medina *et al.*, 2011): PB2, PB1, PB1-F2, N40, PA, HA, NP, NA, M1 Y M2 estructurales y NS1 y NS2 no estructurales cuyo tamaño y función se observan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Proteínas codificantes de los 8 segmentos del genoma del virus de influenza A				
Segmento	Gen	Tamaño (nt)	Péptido codificante	Función
1	PB2	2341	PB2	Reconocimiento del CAP de los ARNm del huésped, endonucleasa (parte del complejo de transcriptasa)
2	PB1	2341	PB1	Cataliza la adición de nucleótidos, elongación (parte del complejo de transcriptasa)
			PB1-F2	Proteína proapoptótica
			PB1-N40	Aún por definirse
3	PA	2233	PA	Parte del complejo de transcriptasa (actividad proteasa)
4	HA	1778	HA	Hemaglutinina: glicoproteína de superficie, reconocimiento y enlace al ácido siálico. Fusión en un pH baj y aglutinación de ertrocitos.
5	NP	1565	NP	Nucleoproteína: Interacción con los segmentos de ARN viral. Implicado en el transporte nuclear/citoplasmático de ARN viral y ARN del virión.
6	NA	1413	NA	Neuraminidasa: glicoproteína de superficie; degrada al ácido siálico (liberación del virión)
7	M	1027	M1	Proteína Matriz: componente mayor del virión
			M2	Proteína integral de membrana (canal iónico)
8	NS	890	NS1	No estructural: inhibidores de la exportación de Poli A de ARNm, en el proceso de corte y empalme de pre-ARNm y antagonista IFN
			NS2	No estructural: Participa en la exportación de RNP hacia fuera del núcleo

La NS1 es inmunomodulador determinando diversos efectos como la inhibición del interferón de tipo I (IFN) en las células infectadas. La proteína PB1-F2 es una proteína proapoptótica que no esta presente en todos los virus de influenza A (Rabadan *et al.*, 2007). Las proteínas PA, PB1 y PB2 interactúan con el genoma viral constituyendo el complejo nucleoprotéico y sintetizan nuevos ARN virales actuando como ARN polimerasa. La nucleoproteína (NP) se asocia a los segmentos del ARN viral y a las polimerasas, conformando la nucleocápside helicoidal. La proteína M1 forma la matriz, la proteína M2 que funciona como canal iónico y, junto a NP, constituyen el antígeno profundo que permite clasificar los virus influenza en los 3 tipos: A, B y C (Talledo *et al.*, 2009).

La HA y la NA son los antígenos de superficie, participan en la patogenicidad viral, determinan los diferentes subtipos de virus y juegan un rol crucial en la interacción entre el virus, la célula hospedera y el sistema inmune del cerdo (Rossman *et al.*, 2011). La HA es la glicoproteína de superficie más abundante (80%); es un trímero con una matriz de cerca de 225 KDa, constituida de tres subunidades idénticas. Cada monómero presenta dos cadenas polipeptídicas HA1 y HA2, unidas cada una por un enlace disulfuro. Esta facilita la unión del virus a la célula huésped ya que sirve como ligando al receptor de ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico; NANA) y la posterior fusión endosomal a la célula huésped. Reconoce receptores específicos de la mucosa respiratoria, permitiendo la adsorción del virus a la célula huésped. En la naturaleza se han descrito variantes (H1 – H17), de las cuales sólo las H1, H2 y H3 afectan al ser humano (Noda *et al.*, 2006; Talledo *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2012).

Las mutaciones importantes en el sitio antigénico de la HA, reduce o inhibe la unión de anticuerpos neutralizantes, formándose un nuevo subtipo; este fenómeno es conocido como «drift antigénico», las mutaciones que se desarrollan por efecto de este fenómeno son la explicación de las epidemias estacionales en climas fríos durante el invierno; sin embargo también se presenta el «shift antigénico» o reacomodo genómico, el cual se presenta por ejemplo cuando H1 es reemplazado por H5 y resulta en la formación de un virus mosaico, esta situación puede suceder cuando la célula es infectada por dos diferentes virus al mismo tiempo y sus segmentos genómicos son intercambiados durante la replicación (Noda *et al.*, 2006, Rossman *et al.*, 2011).

La NA es un tetrámero de aproximadamente 200 kDa. Ésta cataliza las uniones glicosídicas con el ácido siálico, acción que interviene en la liberación de viriones. Se han detectado nueve variantes de NA, de las cuales sólo N1 y N2 infectan a los humanos. La inhibición de la actividad de esta proteína provoca que los virus producidos en una célula se mantengan unidos en la superficie y agregados entre sí, lo que inhibe su diseminación. El «drift antigénico» puede ocurrir en la NA que

contiene importantes residuos de aminoácidos, los cuales al mutar pueden condicionar resistencia contra antivirales como el oseltamivir y zanamavir (Cheng *et al.*, 2009, Rossman *et al.*, 2011).

La HA y la NA tienen modificaciones postraduccionales por glicosilación (Klenk *et al.*, 2002), pero la estructura neuraminidasa permanece intacta (Blok *et al.*, 1982), en tanto que la hemaglutinina sufre un proceso de remoción del N- terminal que sirve como péptido señal.

1.1.2 Ciclo infectivo

El virus influenza A es capaz de producir enfermedad en humanos, porcinos, equinos, mamíferos marinos y semiacuáticos, aves de corral y muchas especies de aves silvestres. Los B y C sólo se asocian a enfermedades humanas, aunque se ha detectado infección en algunos animales, el virus de influenza C puede infectar ocasionalmente cerdos y perros (Ma *et al.*, 2009). La infección se disemina por vía aérea en aerosoles o por contacto con manos u objetos contaminados (fómites). El período de incubación es corto, desde algunas horas hasta días (Manjarrez *et al.*, 1999; Straw *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2004; Gramer, 2005; Talledo *et al.*, 2009; OIE, 2009; Polo, 2009; Medina *et al.*, 2011).

El virus llega a la mucosa del aparato respiratorio superior, vence la acción defensiva de cilios y mucus rompiendo los enlaces de ácido N-acetil-neuroamínico de este mediante la neuraminidasa viral (NA). Otra proteína externa del virus, la HA se une al receptor celular y se incorpora a la célula en una vesícula endoplasmática por endocitosis. La acidificación de la vesícula cambia la conformación de la HA e induce la fusión de la membrana viral con la membrana endocítica, liberando al citoplasma el complejo ARN - nucleoproteína (NP) - polimerasas (PA-PB1-PB2), el cual es transportado al núcleo. Allí se transcriben los 8 ARN mensajeros que originarán proteínas estructurales y no estructurales (NS1, NS2). Los nuevos viriones se ensamblan en el citoplasma celular y se

liberan por gemación. En esta etapa, la NA juega el papel fundamental de separar el ácido siálico de la superficie celular, permitiendo la liberación del virus y evitando su aglutinación en la mucosa. En este proceso algunas células mueren por efecto del virus o de la respuesta inmune celular; otras permiten varios ciclos replicativos virales (Ver Figura 2) (Straw *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2004; Gramer, 2005; García, 2006; Flores *et al.*, 2007; Lynch J *et al.*, 2007; Arbelaez *et al.*, 2008; Talledo *et al.*, 2009; OIE, 2009; Polo, 2009; Medina *et al.*, 2011).

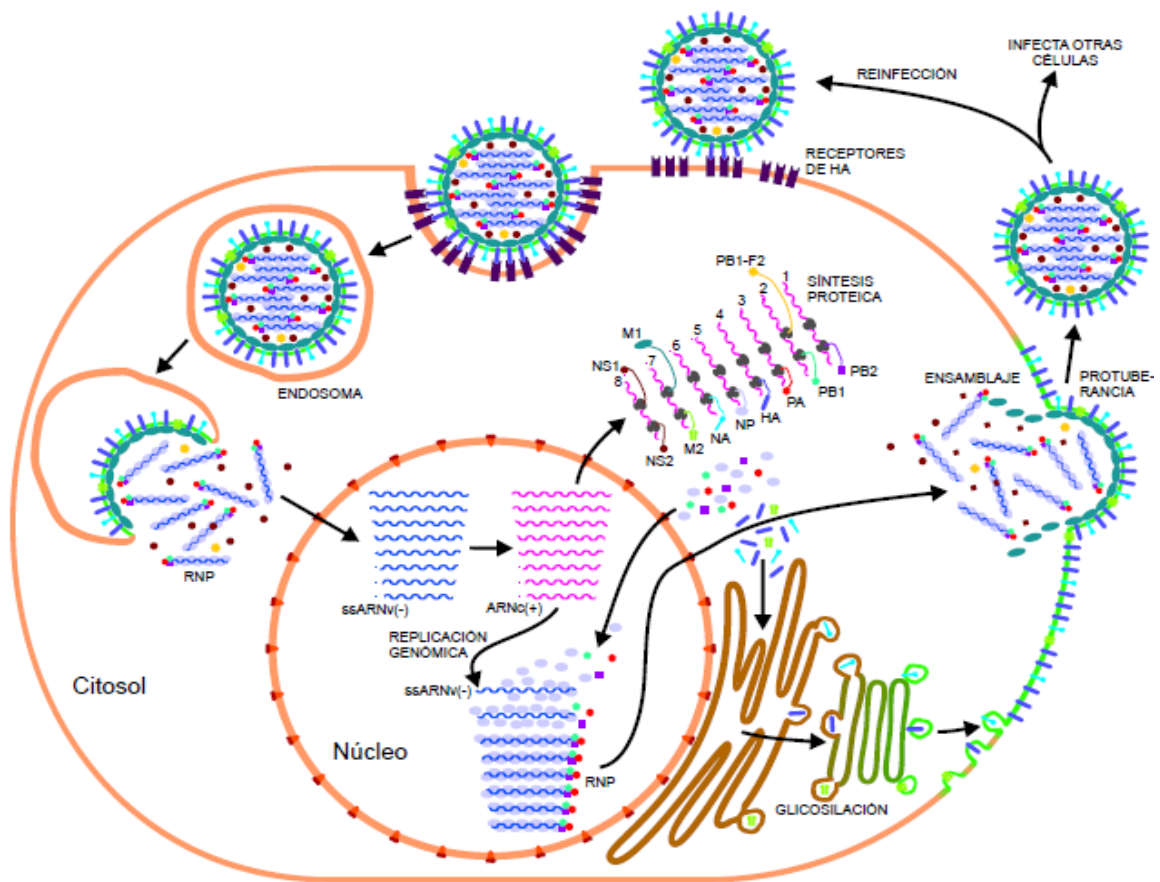


Figura 2. Esquema del proceso de replicación del virus de la influenza. Basado en Polo, 2009.

1.1.3 Transmisión

La principal fuente de entrada del virus de la influenza porcina en una unidad de producción es la introducción de animales infectados, aunque también se han descrito otras vías de entrada como los aerosoles, fómites e incluso el movimiento de personal con ropa o material contaminado (Alexander, 2007). Una vez dentro de la granja, la ruta primaria para la transmisión del virus es por vía nasofaríngea, mediante el contacto directo de nariz con nariz o contacto directo con el moco. Animales infectados clínicamente como subclínicamente juegan un papel importante en la transmisión del virus de influenza dentro de una unidad de producción así como entre éstas, destacando el control en las prácticas de movilización de animales para minimizar la transmisión de varios agentes infecciosos (Brookes *et al.*, 2009, Lange *et al.*, 2009). El virus es excretado en secreciones nasales y diseminado a través de aerosoles (Straw *et al.*, 2000; OIE, 2009).

El virus de la influenza es relativamente lábil, permaneciendo viable unas pocas horas a temperatura ambiente. Estudios con el virus de influenza han demostrado que puede permanecer con capacidad infectante durante un lapso de 24-48 horas en superficies no porosas como el acero inoxidable y el plástico y hasta 12 horas en la ropa, papel o pañuelos. Es estable por lo menos durante 4 semanas en agua a 4°C de temperatura y durante 5 días en agua a 20°C, propiedades que facilitan la transmisión entre las aves acuáticas y a los pájaros de otras especies (Zimmerman *et al.*, 2004).

1.2 Influenza porcina (IP)

En la actualidad, la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todos los países productores de porcino, cursando de forma enzoótica en México. Los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 de virus de influenza son los más frecuentemente reportados en todo el mundo (Straw *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2006; Torremorell *et al.*, 2012). No obstante, los orígenes y las características genéticas y antigénicas

de estos virus difieren según el continente o región en el que se aislen, debido tanto al fenómeno de recombinación como al de la deriva genética. Estas diferencias son especialmente evidentes en el caso del subtipo H1N1: el virus presente en América (llamado H1N1 porcino “clásico”) se originó directamente del H1N1 causante de la “gripe española” del año 1918 (Shope, 1931), mientras que el H1N1 euroasiático tiene un origen aviar y se aisló por primera vez a finales de los años 70 en Italia. Ambos virus presentan características genéticas y antigénicas diferentes (Straw *et al.*, 2000). En el caso del subtipo H3N2, es una triple recombinante que se caracteriza por contener los genes que codifican para la hemaglutinina y neuraminidasa de origen humano, mientras que los genes pertenecientes a las proteínas víricas internas son de origen aviar en la cepa europea (Madec *et al.*, 1984) y aviares y porcinos en el caso del subtipo norteamericano (Zhou *et al.*, 1999). Finalmente, el subtipo H1N2, aislado en Europa en el año de 1994 (Brown *et al.*, 1995), es un recombinante que contiene todos los genes del H3N2 porcino con la excepción del gen de la hemaglutinina, que proviene un H1N1 de origen humano. No obstante, en algunos países se han detectado H1N2 con la hemaglutinina de origen aviar, como es el caso de Dinamarca y Francia (Kyriakis *et al.*, 2009). También se han aislado otros subtipos de virus de influenza, aunque menos frecuentemente y no han llegado a establecerse de forma extensa en la población porcina. Entre estos cabe destacar los subtipos H1N7, H4N6, H3N3 y H3N1 (Brown *et al.*, 1994; Karasin *et al.*, 2000; Karasin *et al.*, 2004; Lekcharoensuk *et al.*, 2006).

En México, el virus de la IP es uno de los patógenos respiratorios primarios del cerdo, puesto que puede inducir enfermedad y lesiones pulmonares por sí solo, es una zoonosis en la cual los cerdos actúan como intermediarios o como portadores de nuevas cadenas virales (Olsen *et al.*, 2006; OIE, 2009; Sánchez *et al.*, 2010).

Existen múltiples factores que pueden determinar el resultado clínico de una infección con virus de la influenza, incluyendo nivel de inmunidad y edad, presión de infección, infecciones intercurrentes, condiciones climáticas y alojamiento

(Olsen *et al.*, 2006). En el cerdo se dan dos formas de la enfermedad, la epidémica o la endémica. En la forma epidémica el virus pasa por todas las fases con una recuperación rápida del cerdo si no existen factores de complicación, como las infecciones bacterianas secundarias. En la forma endémica los síntomas pueden ser menos aparentes, es decir, de forma subclínica, por tanto, no se muestran los síntomas clínicos de la infección (OIE, 2009). El virus de influenza porcina provoca brotes generalmente en la época fría con una morbilidad casi del 100% y mortalidad baja que no llega al 1% de los animales, a menos que haya infecciones recurrentes y/o los cerdos sean muy jóvenes (Olsen *et al.*, 2006; OIE, 2009).

La influenza porcina se caracteriza por afectar a los cerdos de la línea de producción, los cuales presentan una rápida aparición de signos clínicos, como fiebre, letargia, tos, estornudo, descarga nasal, disnea, mala calidad espermática, abortos, disminución de producción láctea, pérdida de apetito. La mortalidad es baja y la recuperación ocurre en siete o diez días, por lo cual se considera como enfermedad aguda, en pocos casos puede causar la muerte (Dea *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 2010).

El virus de IP constituye un importante patógeno en los cerdos ya que se le asocia con el síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRS); *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* y *Bordetella bronchiseptica* representan el denominado complejo respiratorio porcino. La presencia de este complejo en las granjas afecta los indicadores de producción, ocasionando disminución en la tasa de crecimiento, en la ganancia diaria, en la conversión alimentaria, en el consumo y peso de los cerdos al mercado. Se deben tomar medidas inmediatas para evitar que esta enfermedad se acompañe de otros factores que puedan causar daños severos y prolongar la enfermedad, e incluso causar mortalidad (Sánchez *et al.*, 2010; Swenson *et al.*, 2001).

El cerdo juega un papel muy importante en la epidemiología de la enfermedad, ya que presenta receptores para virus humanos y aviares, originando con ello la posibilidad de generar nuevos subtipos que complican su manejo y control (Sánchez *et al.*, 2010), estos receptores localizados en las células epiteliales del tracto respiratorio se denominan sialiloligosacáridos y son: a) ácido neuramínico 2, 3 galactosa y b) ácido neuramínico 2, 6 galactosa (Ha *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2007; Taubenberger *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2011; Manjarrez *et al.*, 2012).

1.2.1 Patogenia

La infección con el virus de influenza en general se limita al aparato respiratorio y la viremia se ha detectado solo en raras oportunidades. Se ha demostrado replicación del virus en mucosa nasal, tonsilas, tráquea, linfonodos traqueobronquiales y pulmones, estos últimos son el principal órgano blanco y el tropismo muy específico para el epitelio de los bronquiolos (Straw *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1993; Heinen *et al.*, 2000, Manjarrez *et al.*, 2010). El virus que se encuentra en las secreciones del tracto respiratorio de los cerdos que presentan un curso agudo, se transmite por vía aerógena o por contacto, se absorbe por vía oronasal y a las dos horas de su infección se encuentra en las células del epitelio bronquial y a las cuatro horas en los septos alveolares donde se pueden identificar por inmunofluorescencia. La concentración del virus alcanza un máximo a las 24 horas y empieza a reducirse al cabo de 72. Aproximadamente 16-24 horas es posible ver necrosis focal del epitelio bronquial con exudados, además de atelectasia focal e hiperemia del pulmón. Los exudados bronquiales y la atelectasia difundida, observados a simple vista, presentan el aspecto de lesiones moradas o rojo purpúreas que afectan lobulillos individuales de los lóbulos apical e intermedio del pulmón. Las lesiones se agravan progresivamente y pasadas 60-70 horas de la infección ocurre hiperplasia epitelial bronquial y necrosis coagulante de algunos alvéolos. Estas lesiones neumónicas suelen estar claramente delimitadas. Pueden estar distribuidas por todo el pulmón, pero en esta fase tienden a ser más extensas, alcanzando el diafragma, y confluir centralmente.

Este efecto se ve exaltado por el hecho de que las zonas no neumónicas se presentan pálidas y enfisematosas. Las vías respiratorias contienen un exudado mucopurulento abundante, con presencia de neutrófilos, y los linfonodos bronquiales y mediastinales aparecen edematosos pero rara vez congestionados. Puede también haber edema pulmonar severo, especialmente a nivel de tabiques interlobulares, o pleuritis serosa o serofibrinosa. Las lesiones macroscópicas varían ampliamente dependiendo de la duración del proceso clínico y de la gravedad de las complicaciones bacterianas. En las mucosas de las vías respiratorias altas es frecuente observar congestión y un exudado muco-fibrinoso de color blanquecino. Las lesiones pulmonares se caracterizan por una neumonía lobular catarral de coloración grisácea a rojo púrpura, presentando áreas de consolidación o atelectásicas. En las áreas no neumónicas se observa enfisema y un moderado edema interlobular. La distribución de estas lesiones corresponde a los lóbulos apical, cardíaco y zona anterodorsal del lóbulo diafragmático, extendiéndose siempre en sentido craneodorsal (Plonait *et al.*, 2001).

En algunas ocasiones puede observarse pleuritis fibrinosa o fibrino-necrótica como consecuencia de complicaciones bacterianas secundarias principalmente cuando interviene *P. multocida*. Pasado este tiempo, si el animal no muere, entrará en fase de recuperación. En las lesiones en cicatrización hay neumonía intersticial, exudados de células mononucleares e hiperplasia bronquial. Pasados 9 días el virus no podrá ser localizado ni en tejidos ni en exudado pulmonar (Plonait *et al.*, 2001), sin embargo se han descrito excreciones víricas de duraciones superiores a los cuatro meses, estos casos son poco frecuentes (Blasckovic *et al.*, 2000). Los anticuerpos frente al virus de la influenza porcina son detectables en suero a partir de los 7 días postinfección, aunque el momento óptimo de detección es a las 2 o 3 semanas post infección, momento en el que se produce el pico en los títulos de anticuerpos (Larsen *et al.*, 2000).

El impacto económico de la IP se estima en \$10.31 US dólar por cerdo, del cual el 64% se atribuye a pérdidas productivas (ganancia diaria de peso y conversión

alimenticia) y el 36% adicional al costo de los servicios veterinarios (Palacios, 2008). Debido a lo anterior, debe considerarse el diagnóstico oportuno del virus.

1.2.2 Diagnóstico

Debido a su importancia en la salud pública, debe considerarse el diagnóstico temprano y oportuno del virus de influenza porcina. En los brotes típicos puede hacerse un diagnóstico provisional en base a los hallazgos clínicos y patológicos. Pero debe confirmarse mediante aislamiento del virus o mediante la demostración de la presencia de sus anticuerpos específicos. Ello permitirá además efectuar el diagnóstico diferencial frente a otras infecciones pulmonares, que pueden presentar sintomatologías similares, tales como la pasteurelisis, pseudorrabia e infecciones por clamidias y especies de *Haemophilus*. El virus puede aislarse a partir de las secreciones nasales durante la fase febril o del tejido pulmonar (de 3 a 5 días) durante la etapa aguda precoz (Gene *et al.*, 2000; Janke, 2000; Olsen *et al.*, 2006).

Para el diagnóstico se toman muestras de tráquea, pulmón e hisopado nasal. El hisopo debe ser estéril, después de tomar la muestra debe suspenderse en un medio de transporte adecuado y mantenerse a 4°C hasta el momento de ser procesada. Si las muestras van a tardar más de 48 horas, se almacenarán a –70°C. Es conveniente agregar al medio de transporte un antimicrobiano apropiado para controlar los agentes microbianos y micóticos que puedan encontrarse en la muestra (Arbeláez *et al.*, 2008; PANAFTOSA-OPS/OMS, 2010).

La presencia del virus se puede establecer mediante el aislamiento viral, la detección de antígenos o del genoma viral. Para realizar el aislamiento del virus, generalmente se utilizan huevos embrionados de nueve días, libres de patógenos específicos, estos embriones son inoculados vía saco alantoideo con una preparación de la muestra, ya sea suspensión de un tejido o suspensión de un hisopo procesado, y se obtiene la cosecha del embrión a las 72 horas

posinoculación para confrontarlo con eritrocitos de ave (Spakman *et al.*, 2002; Arbeláez *et al.*, 2008).

Debido a que la enfermedad presenta un curso rápido, ya que el virus se replica en pulmón de tres a cinco días únicamente después de la infección, las muestras deben ser tomadas en la fase aguda de la enfermedad.

Otra opción de diagnóstico, es utilizar el cultivo celular, la más usada para el aislamiento de IP es la línea celular MDCK (Madin Darby Canine Kidney). Esta línea celular fue usada por primera vez en 1968 por Gauss; para 1975 el uso de células MDCK ya era más frecuente para el aislamiento de los virus de influenza tipo A, tras descubrir que la adición de tripsina en el cultivo estimulaba el crecimiento del virus y les permitía tensionarse para formar placas con gran eficiencia. Se mantienen hasta 7 días a 37°C. El efecto citopático (vacuolización y muerte celular) indica replicación viral, confirmándose la presencia del virus mediante la detección de antígenos virales con anticuerpos monoclonales específicos, reacción que generalmente se visualiza por inmunofluorescencia (Yoon *et al.*, 2004; Arbeláez *et al.*, 2008, Cabello *et al.*, 2009).

Otra técnica utilizada recientemente, es mediante la detección del genoma viral también se puede detectar sintetizando el ADN complementario al ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real (Young *et al.*, 2002; Chiaponni *et al.*, 2003; Richt *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Mallinga *et al.*, 2010). La alta similitud del actual virus pandémico con otros H1N1 de origen porcino hizo la identificación viral altamente dependiente de la secuenciación de ácidos nucleicos. En la actualidad, además del protocolo del CDC para el diagnóstico específico por RT-PCR en tiempo real recomendado muy al inicio de la pandemia, laboratorios de varios países han perfeccionado la especificidad de este análisis y diversos protocolos. La técnica de RT-PCR en tiempo real a partir de hisopado nasal, ha sido el método comúnmente utilizado para la detección de los virus de influenza tipo A en cerdos como parte de la vigilancia (Ellis *et al.*, 2009; OIE, 2009; WHO, 2009), se basan en la detección

del gen de la matriz (M), una región altamente conservada de los virus de influenza A, de modo que permiten detectar y cuantificar prácticamente la totalidad de los virus de influenza (Spackman *et al.*, 2008; Slomka *et al.*, 2010). De forma complementaria, otras RT-PCR (convencionales y en tiempo real) son capaces de amplificar las hemaglutininas y neuraminidasas porcinas (H1, H3, N1 y N2). Mediante este tipo de técnicas es posible determinar directamente el subtipo en caso de que se trate de una cepa porcina (Young *et al.*, 2002; Chiaponni *et al.*, 2003; Richt *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Mallinga *et al.*, 2010).

También, puede hacerse un diagnóstico retrospectivo, partiendo de muestras de suero tomadas durante la etapa aguda y de convalecencia de la enfermedad, demostrando la presencia de anticuerpos específicos, usando la prueba de inhibición de la hemaglutinación. (Straw *et al.*, 2000; García, 2006; Lynch *et al.*, 2007; OIE 2009).

1.3 Distribución mundial del virus pandémico H1N1 en el cerdo.

Se ha sugerido que el virus A/H1N1/2009 pandémico ha estado circulando en la población porcina, sin detectarse, por algún tiempo previo a su identificación inicial (Smith *et al.*, 2009; Garten *et al.*, 2009). El sur de China ha recibido mucha atención por la presencia de los linajes Euroasiático y Norteamericano en los cerdos de sus provincias. En América, la primera granja comercial infectada con el virus pandémico fue confirmada en Mayo del 2009 en Alberta, Canadá. (Howden *et al.*, 2009). Posterior a este reporte, se identificó este virus en muchos otros hatos alrededor del mundo por lo que la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) indicó que el virus está presente en todo el mundo (Hofshagen *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2010; Pasma *et al.*, 2010; Pereda *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Sreta *et al.*, 2010; Welsh *et al.*, 2010; Forgie *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2011).

El virus pandémico H1N1/2009 es conocido por transmitirse de manera eficiente entre los cerdos, haciendo la introducción de cerdos infectados a una población

como una posible ruta de entrada del virus a los hatos (Brookes *et al.*, 2009). La descripción detallada de las infecciones de piaras apunta al hecho de que este virus se comporta de manera similar a los virus porcinos endémicos y todas las poblaciones susceptibles de cerdos pueden infectarse y transmitir el virus (Lange *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2010). La presencia mundial del virus pandémico puede dar lugar a su recombinación con virus endémicos u otros virus. Un nuevo virus recombinante A/swine/Hong Kong/ 201/2010 (H1N1) fue identificado en cerdos a través de un sistema vigilancia en Hong Kong en enero del 2010 (Vijaykrishna *et al.*, 2010). Además, otros virus derivados del pandémico han sido descubiertos, incluyendo el subtipo H1N2 en Italia y Argentina, y H1N1 en Alemania, Sur de China, Tailandia y Argentina (Kitikoon *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2011; Pereda *et al.*, 2011; Starick *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011).

De manera similar, 9 virus recombinantes han sido reportados y aislados durante una vigilancia activa a través de los Estados Unidos de América (Ducatez *et al.*, 2011). Todos estos reportes refuerzan la importancia de la vigilancia sanitaria del virus de influenza en las poblaciones porcinas, así como el monitoreo de la evolución del virus H1N1 pandémico 2009 y los virus endémicos.

Este virus es resultante de la reasociación de segmentos de ARN de virus de influenza de origen porcino, aviar y humano. A su vez, el origen porcino de cinco de dichos fragmentos es diverso: tres de ellos están emparentados con el linaje “norteamericano” y otros dos con el “eurasiático” (Figura 3).

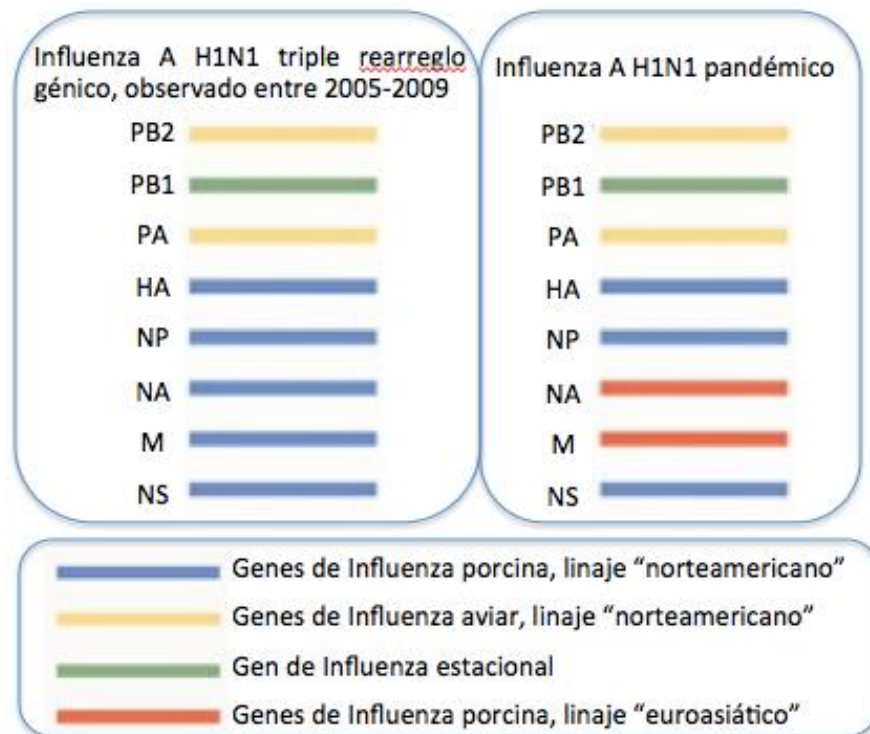


Figura 3. Virus Influenza A (H1N1) de origen porcino causante del brote pandémico 2009. Composición genética: PB2: polimerasa básica 2, PB1: polimerasa básica 1; PA: polimerasa ácida; HA: hemaglutinina, NP: nucleoproteína; NA: neuraminidasa; M: matriz; NS: proteína no estructural. Obsérvese la reasociación de genes provenientes de virus Influenza porcino (dos linajes diferentes), aviar y humano (Shinde, 2009).

La secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina responsable de la interacción con receptores celulares es idéntica al compararse con la observada en cepas del virus pandémico y la de las circulantes en 2008, por lo que es plausible que el espectro de infección en el tracto respiratorio humano sea semejante. Todos los virus aislados de este subtipo de 2009 a la fecha presentan una glutamina en la posición 627 en la proteína PB2, lo cual es poco común, ya que todos los virus de influenza humana conocidos tienen una lisina en esa posición, mientras que para los virus de influenza aviar es típica una glutamina. (Garten *et al.*, 2009; López y Arias, 2010). El reemplazo de glutamina por lisina en las cepas aviares se asocia la adaptación viral para propagarse en células humanas y determina una alta patogenicidad en mamíferos. Además, la presencia de glutamina o lisina en esta posición, también determina, respectivamente, la menor o mayor capacidad viral

de replicar a 33°C. Para una adecuada propagación Para una adecuada pr , es imprescindible que el virus pueda replicar en el tracto respiratorio superior, donde existe dicha temperatura (Malik *et al.*, 2009).

Todas las cepas que originaron pandemias en el siglo XX (H1N1 en 1918, H2N2 en 1957 y H3N2 en 1968) así como las cepas altamente patogénicas del subtipo H5N1 productoras de influenza aviar hacia fines de la década de 1990 y hasta la actualidad, expresaron PB1-F2. Su prevalencia es menor en las cepas humanas de In . -

agos alveolares tipo 2. Esto afecta la respuesta inmune del hospedero al inhibir una adecuada presentación de los antígenos virales a los linfocitos T CD4+ ayudadores (se impide el nexo entre la respuesta innata y la adaptativa!). Adicionalmente, la eliminación de dichas células, facilita la sobreinfección bacteriana. La cepa pandémica A/H1N1/2009 presenta una señal de terminación dentro del correspondiente marco de lectura que genera un péptido truncado en la posición 12, cuya secuencia aminoacídica no abarca el dominio de localización mitocondrial, lo que impediría su función pro-apoptótica. Esta proteína ha sido previamente asociada con la incrementada patogenicidad de los virus de 1918 y los virus H5N1 de alta patogenicidad (Garten *et al.*, 2009; Malik *et al.*, 2009; Van der Meer *et al.*, 2010).

La proteína NS1 es la principal responsable de la evasión a la respuesta inmune que exhiben cepas previamente caracterizadas de Influenza. inhibe el factor específico de corte y poliadenilación (CPSF30), uque participa en el procesamiento de pre-ARN (IFN). A su vez, n del IFN- α e IFN- β , lo que favorece la replica (pro

quinasa dependiente de ARN) que promueve la apoptosis, la prot (que degrada el ARN viral) y la Oligo-Adenilato sintetasa que activa la RNAsa L. Sin embargo, la cepa emergente A/H1N1/2009, posee una señal de terminación en el codón 220, lo cual crea una delección en el dominio peptídico que permite su interacción con las proteínas anteriormente menciones, involucradas con una variedad de vías de señalización implicadas en respuesta inmune innata. Esto no fue observado en el virus H1N1 de 1918 ni el virus H5N1 de alta patogenicidad (Garten *et al.*, 2009; Malik *et al.*, 2009; Van der Meer *et al.*, 2010).

En el gen de la NA, Garten *et al.*, (2009) reportaron que en los aislamientos del nuevo virus que se habían secuenciado hasta fines de mayo de 2009, no se detectaron mutaciones asociadas a resistencia a oseltamivir y zanamivir. Por el contrario, en todas las secuencias que se disponen de la proteína viral M2 se observa una asparagina en la posición 31. Esta mutación se asocia con resistencia a amantadina y rimantadina. Posteriormente Zhang y colaboradores (2013) encontraron que cinco virus de influenza aislados en el 2009 como virus estacionales son resistentes a oseltamivir y amantadina, además de muchos otros casos reportados de resistencia al oseltamivir (Zhang *et al.*, 2013).

Inmediatamente después de la diseminación del virus H1N1 pandémico en la población humana, fueron reportados varios brotes en distintos países alrededor del mundo. El primer caso fue detectado en abril del 2009 en una granja en Canadá, en cerdos que no habían sido vacunados previamente contra influenza. El virus fue transmitido de humanos a cerdos susceptibles, con la subsecuente transmisión de cerdo a cerdo. Esta infección también fue reportada en cerdos de Australia, uno de los pocos países que se reportaba como libre del virus de influenza previo al brote del 2009, así como en Noruega, donde no había sido descrita alguna frecuencia serológica contra el virus. De acuerdo a la OIE esta infección fue considerada como nueva y emergente hasta septiembre del 2010 (Vincent *et al.*, 2013).

Estudios en porcinos infectados con la nueva cepa probaron que estos desarrollan una enfermedad muy similar a la de la influenza porcina clásica: letargo, fiebre, descarga nasal y ocular, tos e inapetencia. Animales sin infectar colocados en cercanía de animales infectados también enfermaron y estos a su vez infectaron un nuevo grupo, pero el momento de mayor descarga viral se iba dilatando en cada ciclo yendo desde 3 días hasta 5 o 6 días en el último ciclo de transmisión. La histopatología fue muy similar a la de la influenza porcina tradicional con el clásico compromiso pulmonar (Vincent *et al.*, 2010).

Antigénicamente, los virus A/H1N1/2009 son homogéneos y muy similar a los virus de influenza porcina clásica (H1N1), así como a los de linaje norteamericano triple recombinante de virus A (H1N1) que ha circulado en los cerdos en los últimos 10 años en los Estados Unidos y que en ocasiones han infectado a humanos en el mismo período (Figura 4). Además, los análisis filogenéticos hechos a cada unos de los genes de los virus H1N1 pandémicos mostraron la formación de una rama independiente y diferente a las secuencias de origen porcino, sugiriendo que no se encuentran relacionados, como se muestra en la figura 4 con un árbol filogenético del gen HA (Shinde *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2010; 2013).

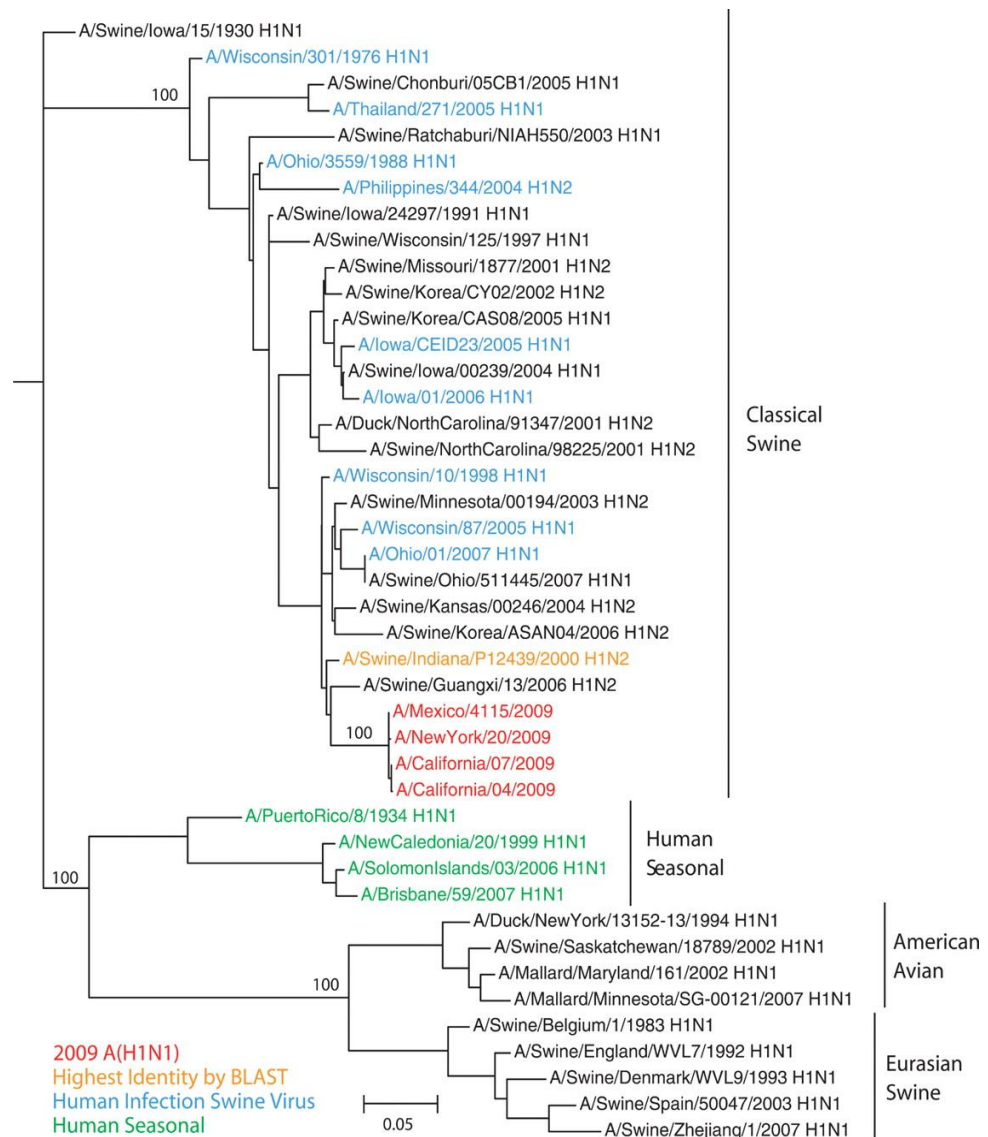


Figura 4. Árbol filogenético para las secuencias de nucleótidos del gen HA (Garten *et al.*, 2009).

La reactividad cruzada con antisueros de virus porcino es importante, ya que es el subtipo de HA en la que el virus H1N1/2009 está más estrechamente relacionado. Es posible especular que la inmunidad preexistente a ciertas cepas circulantes de la H1 del virus de influenza porcina puedan proporcionar un cierto nivel de protección en los cerdos contra el virus pandémico. Antisueros de cerdos vacunados con cinco vacunas comerciales de EE.UU. fueron evaluados mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación con tres cepas pandémicas H1N1

(CA/09, A/California/04/2009; NY/09, A/New York/18/2009; MX/09, A/México/4108/2009). La reactividad cruzada fue consistentemente baja entre antisueros y los tres virus H1N1/2009, aunque los títulos fueron ligeramente superiores con el aislado de México. Esto sugiere que las vacunas actualmente disponibles proporcionan una protección limitada contra la infección con la nueva cepa H1N1/2009 (Vincent *et al.*, 2010).

1.4 Factores de Riesgo

Desde principios de los 70's, se ha sugerido la idea de que la presentación de enfermedades respiratorias puede verse influenciada, no solo por la presencia de microorganismos específicos, sino también por la compleja interacción entre los factores relacionados al agente, al hospedador y al ambiente. El conocimiento de estos factores es esencial para el control y prevención de las enfermedades. Métodos epidemiológicos han ayudado a identificar los más importantes factores de riesgo e investigar su interacción. Los factores de riesgo potenciales para la ocurrencia de las enfermedades respiratorias incluye variables medio-ambientales y de manejo (Figura 5). La información que nos pueden proveer los factores relacionados con el manejo es fácilmente recolectada usando cuestionarios, los cuales son completados por el investigador durante la visita a las unidades de producción o aquellos que son enviados por correo para ser completados por los propios productores sin supervisión. Los factores medio-ambientales como por ejemplo: la humedad relativa, la temperatura, la calidad del aire y ventilación pueden ser registrados usando una metodología similar, siendo cuidadosamente interpretados, principalmente aquellos que no son cuantitativos (Stärk, 2000).

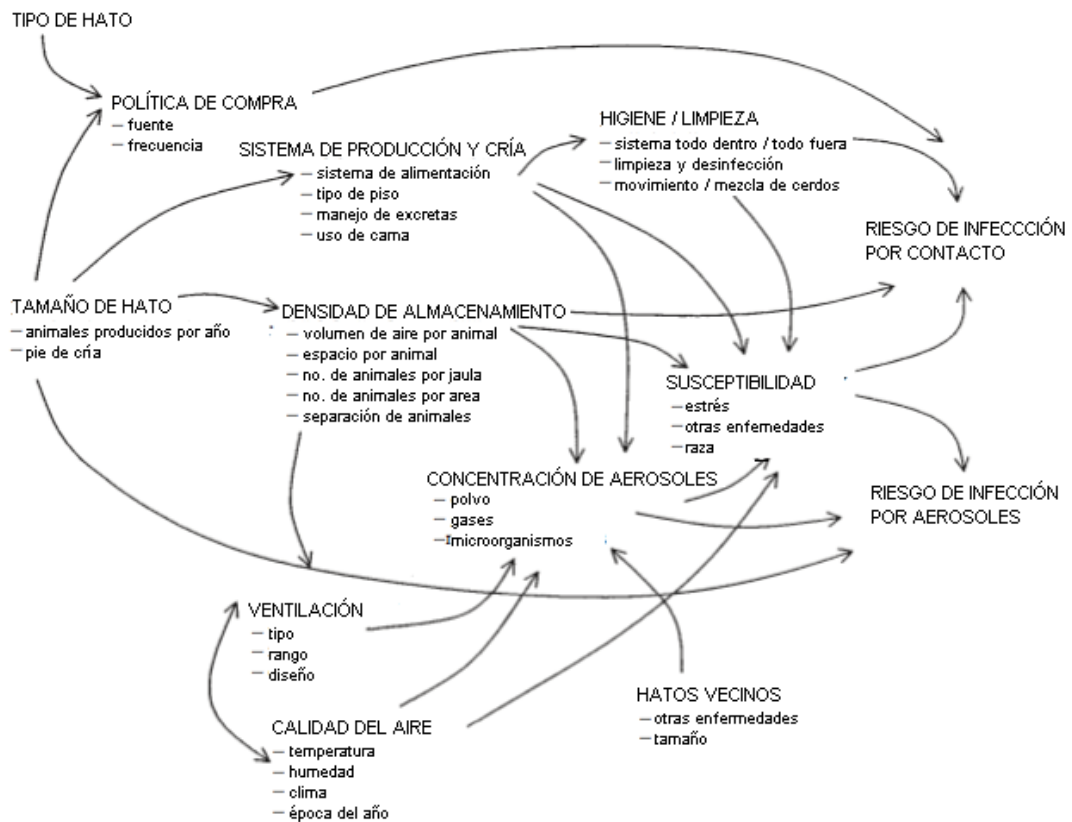


Figura 5. Hipótesis del modelo de asociación entre los factores de riesgo para la presentación de enfermedades respiratorias. (Fuente: Stärk, 2000)

Se llama factor de riesgo a una variable que se "cree que está relacionada" con la probabilidad de que se desarrolle la enfermedad. Para elegir a un factor como de riesgo se debe satisfacer que esté asociado estadísticamente con el desarrollo del factor respuesta; es decir, que la presencia del factor, o un cambio relevante en él, preceda a la ocurrencia del factor de respuesta, y finalmente que el efecto observado del factor que se observa no sea completamente explicado por cualquier fuente del error (Ducoing *et al.*, 1998). Las medidas de asociación nos indican la fuerza de asociación entre dos variables, tales como la exposición y la enfermedad. Las dos medidas de asociación que se usan más frecuentemente son el riesgo relativo (RR) y la razón de momios (Odds ratio: OR) que es una medida de asociación para respuestas categóricas (Thrusfield 1991; De Irala *et al*, 1997; Anderson *et al*, 2006). El OR es importante en epidemiología, porque

representa una estimación del riesgo relativo en un estudio de casos y controles. La RR y la OR se interpreta de la siguiente manera(Anderson *et al.*, 2006):

a) Cuando la RR u OR = 1: la exposición no tiene asociación con la enfermedad.

b) Cuando la RR o OR > 1: la exposición puede estar positivamente asociada a la enfermedad.

c) Cuando la RR o OR < 1: la exposición puede estar negativamente asociada a la enfermedad y ser de hecho, un factor de prevención.

En México, hasta el momento son pocos los estudios que han investigado los factores involucrados en la propagación del virus de influenza dentro de las unidades de producción porcina y entre los cerdos. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia y frecuencia serológica de los virus de influenza A que afectan a los cerdos en cinco estados de la región del Bajío Mexicano, así como su aislamiento y caracterización molecular.

2. JUSTIFICACIÓN

Los casos documentados de transmisión de influenza porcina a seres humanos, en contacto con cerdos, que muestran una enfermedad respiratoria aguda fatal, constituyen una señal clara del potencial zoonótico del virus de influenza que infecta cerdos y el papel potencial de los cerdos en la transmisión de nuevas cepas a humanos. Dado que diariamente existen interacciones humano-cerdo en situaciones ocupacionales y casuales, el potencial zoonótico del virus de influenza porcina debería ser reconocido (Shinde *et al.*, 2009).

El conocimiento oportuno de los subtipos de influenza porcina que circulan en las principales regiones productoras de cerdos, así como los factores de riesgo involucrados en su transmisión, podrán ayudar en desarrollo y aplicación de distintas estrategias de prevención y control de esta enfermedad.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y frecuencia serológica de los virus de influenza A que afectan a los cerdos en la región del Bajío Mexicano, así como su aislamiento y caracterización molecular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la distribución epidemiológica de los subtipos del virus de influenza A que afecta a los cerdos, mediante un muestreo en unidades de producción intensivas y de traspatio de la región del Bajío Mexicano.
- Determinación de los factores de riesgo significativos para los virus de influenza porcina en la región del Bajío Mexicano.
- Aislar virus de influenza A, a partir de muestras de cerdos de unidades de producción mexicanas situadas en el Bajío Mexicano
- Caracterizar los virus de influenza A obtenidos mediante la secuenciación del ARN viral, para determinar las posibles variaciones genéticas entre ellos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 FASE I. Estudio epidemiológico del virus de influenza porcina en estados del Bajío Mexicano.

Se realizó un estudio transversal no probabilístico en los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Querétaro y San Luis Potosí, basado en el levantamiento de cuestionarios en unidades de producción de traspatio, semi-intensivas e intensivas conforme a la participación voluntaria de los productores (muestreo de sujetos disponibles). También se tomaron muestras de sangre para serología y un hisopado nasal para el aislamiento viral y biología molecular (PCR y secuenciación) de cerdos en diferentes etapas de la línea de producción: destete, engorda-finalización y pie de cría.

Se estableció un tamaño de muestra para cada uno de los estados tomando como base los datos censales proporcionados por las uniones de porcicultores de cada Estado o de los Comités de Fomento y Protección Pecuaria (CFPP). Para cada Estado se calculó un tamaño de muestra utilizando una fórmula de proporciones considerando una prevalencia del 19% (frecuencia obtenida de un estudio serológico hecho en los estados productores de cerdo en el sur de México, (Datos no publicados, 2009)), una confianza del 95%, error del 0.04 y se consideró el total de la población animal, obteniéndose la “n” muestral.

En cada unidad de producción se aplicó un cuestionario pre-elaborado (ANEXOS 9.1), para establecer las características de producción y de cada individuo muestreado.

4.1.1 Muestras biológicas.

Las muestras fueron trasladados en cadena fría al laboratorio de Biotecnología en salud animal del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias del INIFAP para su procesamiento y análisis.

SUERO: Las muestras de sangre de los cerdos se obtuvieron de la vena cava anterior por veno-punción utilizando tubos para extracción de sangre con vacío de 10 ml sin anticoagulante con agujas del número 21 G x 38 mm. Una vez obtenida la muestra, se identificó con el número correspondiente de cada animal. Las muestras se conservaron a -20° C hasta su procesamiento.

MOCO: Se obtuvieron hisopados nasales que se colocaron en 3 ml de Medio Leibovitz (In vitro, México) con albumina sérica bovina al 0.5% y antibiótico-antimicótico 1x (Penicilina 1000 UI/ Estreptomina 1000 ucg/ Anfotericina B 0.25 µg/ml en solución de NaCl al 0.85% 100X, In vitro, Mexico). Posterior a ser alicuotadas las muestras se conservaron a una temperatura de -70° C hasta su procesamiento.

4.2 FASE II. DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DEL VIRUS DE INFLUENZA A.

Para la extracción de ARN a partir del hisopado nasal se utilizaron 250 µl, de la muestra, a los cuales se agregaron 750 µl de Trizol® Reagent (Invitrogen, USA). El procedimiento de extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, el ARN extraído fue almacenado a -70°C.

4.2.1 RT-PCR en Tiempo Real.

Para detectar el material genético del virus de influenza se realizó un ensayo de RT-PCR tiempo real. Todas las muestras con un C_T menor a 35 fueron consideradas positivas y posteriormente se inocularon en cultivos celulares para intentar el aislamiento viral. El protocolo utilizado fue el reportado por Spackman *et al.*, (2002) adaptado a las condiciones de laboratorio en una armonización realizada por el personal de la FAO con un protocolo de USDA en 2009. La prueba se llevó a cabo utilizando un Termociclador Light Cycler 480 II (Roche, España).

4.2.2 Aislamiento viral en cultivo celular

Para el aislamiento viral se siguió el protocolo de la PANAFTOSA-OPS/OMS, 2010, el cual se describe brevemente a continuación:

Se prepararon placas de 24 pozos para cultivo celular (Nunclon, Dinamarca) con un monostrato confluyente de células MDCK utilizando 2×10^5 células por pozo y se dejaron incubar por 24 hr. Posterior a la incubación se lavaron las células y fueron inoculadas con 100 μ l de la muestra que contenía 1.5 μ l de solución tripsina – verseno (In vitro, México). La placa se incubó 2 hr/37°C/5% CO₂ para la infección y posteriormente se retiró el medio colocando medio nuevo para dejar incubar por 6 días en las mismas condiciones para observar la presencia de efecto citopático. A todas las muestras se les realizaron dos pases en ciego y finalmente los sobrenadantes fueron almacenados a -70°C.

4.2.3 RT-PCR en tiempo real utilizando un panel de diferenciación de los subtipos virales de influenza porcina

Se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real utilizando iniciadores universales, que amplifican el gen M de los virus de influenza tipo A e iniciadores específicos que diferencian entre los subtipos H1N1 y H3N2 endémicos porcinos, y H1N1 pandémico, para la determinación del subtipo viral del aislamiento obtenido (CDC, 2008).

4.2.4 Prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH)

Los sueros fueron sometidos a la prueba de inhibición de la hemaglutinación empleando antígenos de referencia para el Virus de Influenza Porcina/H1N1, Influenza Porcina/H3N2 e Influenza Humana A/H1N1/2009 con 8 unidades hemoaglutinantes (UHA) (PANAFTOSA-OPS/OMS, 2010).

Los sueros de cerdo inactivados fueron adsorbidos con caolín al 20% (J.T.Baker, México) y eritrocitos de ave al 20% incubando a 4°C toda la noche, posteriormente se siguieron las indicaciones descritas en manual de diagnóstico de virus de influenza en mamíferos y aves de la PANAFTOSA-OPS/OMS, 2010. Se utilizaron como controles: sueros positivos a cada subtipo viral, sueros negativos a cada subtipo viral, control de virus con eritrocitos y eritrocitos sin tener contacto con antígeno. Los virus utilizados fueron titulados por la prueba de hemaglutinación (PANAFTOSA-OPS/OMS, 2010)

4.2.5 Caracterización de los aislamientos y sus genes

Se amplificaron los genes M, HA y NA para ser secuenciados de las muestras positivas, utilizando los iniciadores reportados por Hoffman *et al.*, (2001) que se muestran en el Cuadro 2. Los fragmentos fueron visualizados en geles de agarosa, purificados con MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) y enviados a secuenciar.

Cuadro 2. Iniciadores usados en la amplificación completa de los genes M, HA y NA		
Iniciadores	Gen	Tamaño
For: 5' TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG 3' Rev: 5' ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT 3'	M	1056 pb
For: 5' GACACATTATGTATAGGTTATC 3' Rev: 5' GTAAATCCTTGTTGATTCCAGC 3'	HA	1533 pb
For: 5' TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT 3' Rev: 5' ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT 3'	NA	1442 pb

La secuenciación fue llevada a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. La edición y ensamblaje de secuencias se hizo mediante los programas 4Peaks y MEGA 5.0. Con las secuencias de los tres genes se hizo un análisis BLASTn en la Base de Datos del National Center for Biotechnology (NCBI), para conocer la homología con otras secuencias ya reportadas.

4.2.6 Construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias completas de nucleótidos de cada uno de los genes fueron alineadas con secuencias de origen porcino, aviar y humano (norteamericanas, mexicanas, asiáticas y europeas), reportadas en el NCBI, para representar cada linaje (Garten *et al.* 2009). Esto se realizó mediante el programa Clustal X, para la posteriormente inferir arboles filigénéticos para cada gen utilizando el método de máxima verosimilitud y 1000 réplicas de bootstrap, utilizando el modelo GTR+G+I para el gen HA1 y el modelo Tamura 3-parameter para el gen NA1. Lo anterior se realizó utilizando el con el programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

4.3 Metodología estadística

Los datos de cada unidad de producción (UP) y de cada individuo de este estudio fueron integrados en bases de datos, con la consecuente adición de los resultados de laboratorio. Estas bases de datos se utilizaron para el análisis epidemiológico de la información y determinación de frecuencias, distribución espacial, poblaciones en riesgo y posibles factores de riesgo asociados.

Para la determinación de frecuencias de serológicas para los subtipos virales H1N1 endémico, H3N2 endémico y H1N1/2009 pandémico y de resultados de RT-PCR tiempo real, se elaboraron tablas de contingencia para la comparación de los estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro.

Para la determinación de posibles factores de riesgo asociados a la exposición se realizaron pruebas de homogeneidad de proporciones por Chi-cuadrada (X^2) y razón de momios con una significancia del 0.05, así como un análisis multivariado de regresión logística para aquellos factores que presentaron un valor de $P \leq 0.1$ en el análisis univariado. Las variables independientes correspondieron a los 20 factores de riesgo obtenidos del cuestionario y aplicado a las unidades de producción que se muestran en el Cuadro 3 y las variables dependientes al estado

positivo/negativo de cada uno de los 3 diferentes subtipos de los virus de Influenza que se analizaron en este estudio y utilizando la población de los animales que no fueron vacunados, para evitar sesgo. De igual manera se determinaron los posibles factores de riesgo asociados a la enfermedad, pero utilizando los resultados obtenidos de la detección del material genético del virus por RT-PCR tiempo real, con la misma población, de animales no vacunados y las mismas variables independientes. Todos los análisis se realizaron con el programa de cómputo Epi Info TM (Version 2007).

Cuadro 3. Factores de riesgo obtenidos del cuestionario aplicado a las UP y sus categorías de estudio.		
Factor de Riesgo		Categoría
<u>Estado</u>	Estados en los que se hizo el muestreo	Guanajuato
		San Luis Potosí
		Querétaro
		Michoacán
		Jalisco
<u>Sexo</u>	Respecto al género del animal muestreado	Macho
		Hembra
<u>Etapas de prod</u>	Respecto a la etapa del cerdo muestreado dentro de la línea de producción	Destete
		<u>Engorda-finalización</u>
		<u>Pie de cría</u>
<u>Tipo de animal</u>	Respecto al tipo de animal muestreado	<u>Vientre</u>
		Semental
		<u>Engorda</u>
<u>Origen</u>	Si los animales son propios de la UP, es decir, que hayan nacido ahí o si estos fueron comprados	Propio
		Comprado
<u>Barda</u>	Respecto a la presencia de una barda perimetral en la UP	No
		Si
<u>Agua</u>	Respecto al tipo de agua que utiliza la UP para dar de beber a sus cerdos	Potable
		Pozo
<u>Cerdos</u>	Respecto a las personas que trabajan en las UP también tienen cerdos en su casa	No
		Si
<u>Desinfección</u>	Respecto al uso de algún medio de desinfección en la UP	No
		Si

<u>Tapetes</u>	Respecto al uso de tapetes sanitarios para calzado del personal	No
		Si
Enfermo	Respecto a si el productor reportó haber tenido entre sus cerdos alguno enfermo, que haya mostrado fiebre, estornudos, moco con lagañas una semana antes del muestreo	No
		Si
<u>Escamocha</u>	Respecto a si utilizaban escamocha para la alimentación de los cerdos	No
		Si
<u>Tipo de UP</u>	Respecto al tipo de UP, según su tecnificación	<u>Tecnificada</u>
		Semitecnificada
		<u>Traspatio</u>
<u>Tipo de productor</u>	Respecto al tipo de productor de la UP	<u>Criador - engordador</u>
		<u>Engordador</u>
		Acopiador
		Combinación
<u>Humedales</u>	Respecto a si había humedales cerca de la UP	No
		Si
Mortalidad de aves	Respecto a si utilizaban mortalidad de aves para la alimentación de los cerdos	No
		Si
<u>Personal enfermo</u>	Respecto a si alguien del personal que atiende a los cerdos enfermaron de catarro al mismo tiempo que los cerdos	No
		Si
<u>Ropa de trabajo</u>	Respecto a si se hacía uso de ropa de trabajo exclusiva y específica dentro de la UP	No
		Si
<u>Personal ajeno</u>	Respecto a si a la UP podía entrar cualquier persona ajena	No
		Si
UP de aves	Respecto a si había unidades de producción de aves cerca de la UP en cuestión	No
		Si
<u>Carretera</u>	Respecto a si la UP se encontraba cerca de la carretera	<u>A pie de</u>
		<u>A 1 km</u>
		Otra distancia

5. Resultados

5.1 Frecuencias serológicas

Se obtuvieron 2048 muestras de suero e hisopados nasales de animales de 255 UP de los estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Querétaro, Michoacán y Jalisco. Se muestrearon 46 unidades tecnificadas, 81 unidades semitecnificadas y 128 unidades de traspatio (Figura 6).

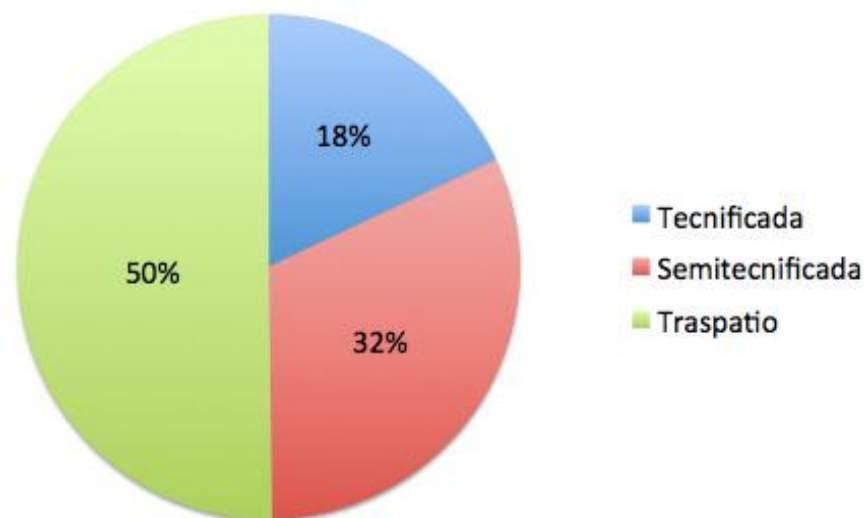


Figura 6. Porcentaje de Unidades de Producción muestreadas en la región del Bajío Mexicano para la detección serológica del virus de influenza porcina del 2010 al 2012.

Para los cinco estados muestreados se obtuvo una frecuencia global del 45.7% de anticuerpos por la prueba de IH para el H1N1 endémico, 20.4% para el subtipo H3N2, 13.2% para el subtipo A/H1N1/2009. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre los cinco estados muestreados ($P < 0.05$). Es de destacar que para el subtipo A/H1N1/2009 se obtuvo una frecuencia global de 15.9%, donde el estado de Querétaro presentó la frecuencia más alta con 55.5% (Ver Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de muestras serológicas positivas a los diferentes subtipos del virus de influenza A, en los cinco estados muestreados en la región del Bajío Mexicano del 2010-2012.

Estado	No. de cerdos muestreados	H1N1		H3N2		A/H1N1/2009	
		No. de cerdos positivos	%	No. de cerdos positivos	%	No. de cerdos positivos	%
Guanajuato	586	149	25.4	19	3.2	12	2.1
San Luis Potosí	429	63	14.7	16	3.7	1	0.2
Querétaro	407	126	31	4	1	226	55.5
Michoacán	408	394	96.6	313	76.7	28	6.9
Jalisco	218	203	93.1	65	29.8	4	1.8
Total	2048	935	45.7	417	20.4	271	13.2

Las frecuencias encontradas en cada uno de los estados muestreados en este estudio para los subtipos virales H1N1, H3N2 y H1N1 pandémico. En el estado de Guanajuato todos los municipios tuvieron al menos un animal seropositivo al subtipo H1N1 endémico y se obtuvo una frecuencia del 25.4%; 3.2% para el subtipo H3N2 con 12 municipios seropositivos y 2.04% para el subtipo A/H1N1/2009 con 7 municipios seropositivos al virus. Los municipios de Uriangato, Moroleón, Yururia y Pueblo Nuevo fueron seropositivas a la detección serológica de los tres subtipos virales y Acambaro, Cuernavaca, León, Celaya, Apaseo el Alto, Penjámico, La Purísima del Rincón y Manuel Doblado fueron seropositivas a los subtipos endémicos H1N1 y H3N2 (Ver el Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de muestras serológicas positivas en los diferentes municipios muestreados del estado de Guanajuato para los subtipos H1N1, H3N2 y A/H1N1/2009.

	Municipio	No. de cerdos muestreados	H1N1		H3N2		A/H1N1/2009	
			No. de cerdos positivos	%	No. de cerdos positivos	%	No. de cerdos positivos	%
1	Valle de Santiago	23	2	8.7	0	0	0	0
2	Jaral del Progreso	24	4	16.6	0	0	0	0
3	Irapuato	23	10	43.5	0	0	0	0
4	Huanimaro	23	1	4.3	0	0	0	0
5	Salamanca	26	7	26.9	0	0	0	0
6	Acámbaro	24	8	33.3	1	4.2	0	0
7	Cuerémario	23	12	52.2	2	8.7	0	0
8	Uriangato	23	10	43.5	2	8.7	2	8.7
9	Moroleón	23	12	52.2	2	8.7	1	4.3
10	San Francisco del Rincón	23	5	21.7	0	0	0	0
11	León	23	6	26.1	1	4.3	0	0
12	Celaya	23	9	39.1	1	4.3	0	0
13	Silao	23	1	4.3	0	0	0	0
14	Romita	23	12	52.2	0	0	0	0
15	Ocampo	26	1	3.8	0	0	0	0
16	Yuriria	23	3	13	1	4.5	3	13
17	Apaseo el Alto	23	5	21.7	2	8.7	0	0
18	Pénjamo	23	11	47.8	2	8.7	0	0
19	Abasolo	23	3	13	0	0	1	4.3
20	Cortázar	23	2	8.7	0	0	0	0
21	Tarimoro	23	3	13	0	0	1	4.3
22	San Miguel de Allende	24	5	20.8	0	0	1	4.2
23	Pueblo Nuevo	23	3	13	2	8.7	3	13
24	La Purísima del Rincón	25	12	48	2	8	0	0
25	Manuel Doblado	23	2	8.7	1	4.3	0	0
	TOTAL	586	149		19		12	

En el estado de San Luis Potosí, 8 municipios tuvieron al menos un animal seropositivo al subtipo H1N1 endémico con una frecuencia del 14.6%; 3.7% para el subtipo H3N2 con 5 municipios seropositivos al virus y 0.2% para el subtipo A/H1N1/2009 con 1 municipio seropositivo al virus. El municipio Villa de Reyes presentó una muestra seropositiva a los tres subtipos virales y Soledad de Graciano Sánchez, Villa de Arriaga, Villa de Reyes y Río Verde fueron seropositivos a los subtipos endémicos H1N1 y H3N2 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de muestras serológicas positivas en los diferentes municipios muestreados del estado de San Luis Potosí para los subtipos H1N1, H3N2 y A/H1N1/2009.								
	Municipio	No. de cerdos muestreados	H1N1		H3N2		H1N1/2009	
			No. de cerdos positivos	%	No. de cerdos positivos	%	No. de cerdos positivos	%
1	Soledad de Graciano Sánchez	42	17	40.5	1	2.4	0	0
2	Moctezuma	43	14	32.5	0	0	0	0
3	Santa María del Río	43	1	2.3	0	0	0	0
4	Villa de Arriaga	43	10	23.2	11	25.6	0	0
5	Villa de Reyes	43	3	6.8	1	2.3	1	2.3
6	Cárdenas	43	7	16.3	0	0	0	0
7	Río Verde	43	10	23.3	1	2.3	0	0
8	Ciudad Fernández	43	0	0	0	0	0	0
9	Carmona	43	0	0	2	4.6	0	0
10	Tamasopo	43	1	2.3	0	0	0	0
	TOTAL	429	63		16		1	

En el estado de Querétaro, 5 municipios tuvieron al menos un animal seropositivo al subtipo H1N1 endémico con una frecuencia del 30.9%; 1% para el subtipo H3N2 con 2 municipios positivos al virus y 55.5% para el subtipo A/H1N1/2009 con todos los municipios seropositivos al virus. Los municipios Peñamiller, Toliman y San Juan del Río fueron únicamente seropositivos al subtipo endémico H1N1 y el municipio de El Marqués presentó muestras seropositivas al subtipo A/H1N1/2009. El municipio de Amealco y Colon fueron seropositivos a la detección de anticuerpos a los tres subtipos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de muestras serológicas positivas en los diferentes municipios muestreados del estado de Querétaro para los subtipos H1N1, H3N2 y A/H1N1/2009.								
	Municipio	No. de cerdos muestreados	H1N1		H3N2		H1N1/2009	
			No. de cerdos positivos	%	No. de cerdos positivos	%	No. de cerdos positivos	%
1	Colón	74	39	52.7	1	1.35	50	67.6
2	Peñamiller	57	6	10.5	0	0	25	43.9
3	El Marqués	20	0	0	0	0	20	100
4	Tolimán	20	2	10	0	0	13	65
5	San Juan del Río	56	24	42.8	0	0	29	51.8
6	Amealco	180	55	30.5	3	1.66	89	49.4
	TOTAL	407	126		4		226	

En los estados de Jalisco y Michoacán, solo se muestreó un municipio para cada uno, debido a la alta población porcina registrada por los Comités y Asociaciones de productores porcinos y con mayor importancia en producción. Estos presentaron la mayor frecuencia de anticuerpos contra los subtipos virales endémicos H1N1 y H3N2, debido a que en estas unidades de producción vacunan contra Influenza, así como para otras enfermedades que son parte del complejo respiratorio porcino. También en estos municipios se encontraron en mayor proporción unidades de tipo tecnificado y semitecnificado con poblaciones de más de 1000 animales en algunos casos.

En el estado de Jalisco solo se llevó a cabo el muestreo en el municipio de Degollado. Presentó una frecuencia serológica del 93.1% para el subtipo H1N1 endémico, 29.8% para el subtipo H3N2 y 1.8% para el subtipo A/H1N1/2009

En el estado de Michoacán se realizó el muestreo en el municipio de La Piedad. Presentó una frecuencia serológica del 96.6% para el subtipo H1N1 endémico, 76.7% para el subtipo H3N2 y 6.9% para el subtipo A/H1N1/2009.

Para la detección del virus de influenza por RT-PCR en tiempo real se obtuvo una frecuencia global de 1.17% (24 muestras positivas). El estado de Guanajuato presentó la frecuencia más alta con el 3.07% y 11 municipios presentaron al

menos una muestra positiva a la prueba. En el estado de San Luis Potosí se obtuvo una frecuencia del 0.9% y 4 municipios presentaron al menos una muestra positiva a la prueba. En el estado de Querétaro se encontró solo una muestra positiva a la prueba al igual que en el municipio de Degollado de Jalisco y en el municipio de La Piedad, en Michoacán no se halló ninguna muestra positiva a esta prueba.

5.2 Aislamiento

Se obtuvo un aislamiento en células MDCK con la observación del efecto citopático correspondiente a un virus de influenza tipo A (destrucción del monoestrato y redondeamiento celular) (Figura 7). El aislamiento procedió del municipio de Salamanca y se le identificó de la siguiente manera: Gto_Sal_1/2011.

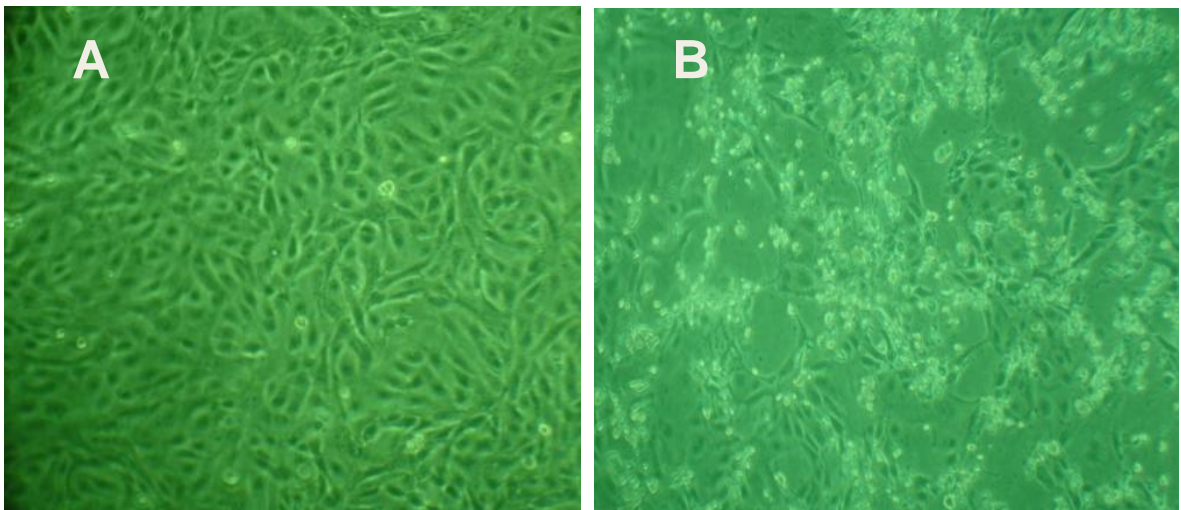


Figura 7. A) Células MDCK confluentes sin infectar y B) Efecto citopático producido por el virus de influenza

También se realizó en un ensayo de RT-PCR en tiempo real, el Panel de Influenza A propuesto por el CDC (CDC, 2008), el cual presenta iniciadores universales para la amplificación de los virus de influenza tipo A e iniciadores que diferencian entre los subtipos H1N1 y H3N2 endémicos porcinos y para el subtipo H1N1 pandémico;

este ensayo se hizo por duplicado con sus controles positivos para la amplificación de cada subtipo viral, controles negativos y controles internos. La muestra de ARN del aislamiento obtenido sólo amplificó con los iniciadores universales y con los iniciadores para el subtipo H1N1 endémico. En la figura 8 se puede observar la amplificación de los genes controles en ciclos muy tempranos (líneas, verde, gris y rosa) y posteriormente la amplificación del aislamiento viral únicamente con los iniciadores específicos para el gen M y el subtipo H1N1. Por lo tanto, el virus aislado se identificó como: A/Cerdo/México/Gto_Sal_1/2011 (H1N1).

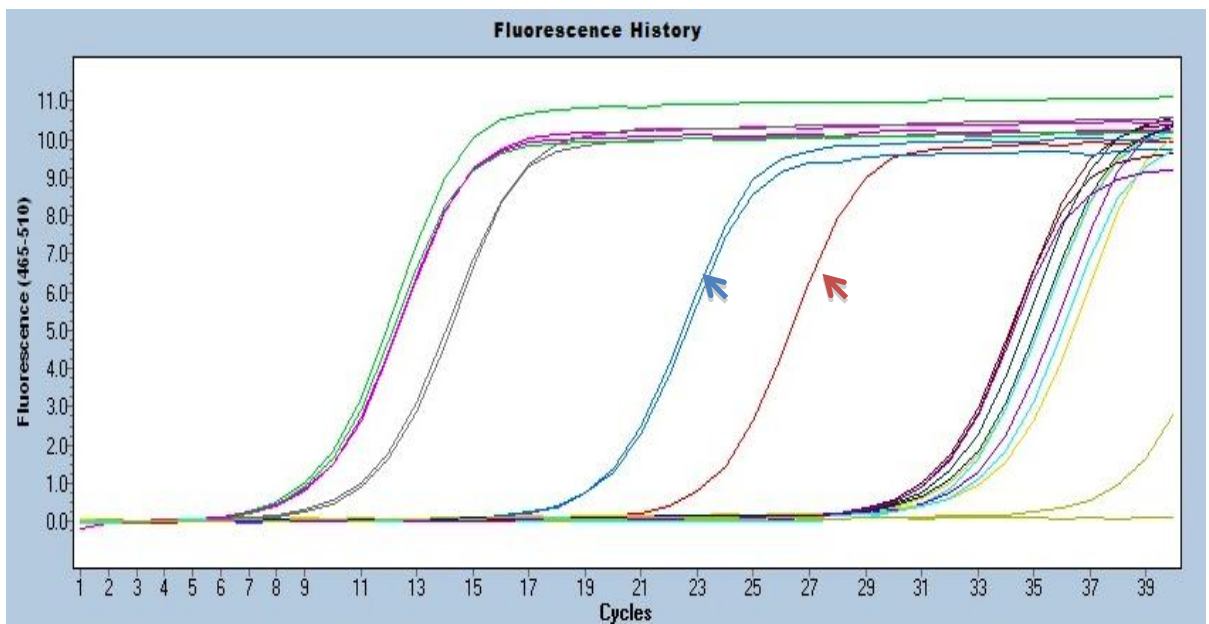


Figura 8. RT-PCR en tiempo real utilizando un panel de iniciadores contra el virus de influenza para la amplificación de los virus tipo A y diferenciación de los subtipos H1N1, H3N2 endémicos y H1N1 pandémico, así como la amplificación del aislamiento Gto_Sal_1/2011 con los iniciadores universales para la detección del gen M (Flecha azul) y con los iniciadores para el subtipo H1N1 endémico (Flecha roja).

Para la caracterización del aislamiento Gto_Sal_1/2011, se realizaron los ensayos de RT-PCR punto final para la amplificación de los genes completos HA, NA y M como se muestra en la Figura 9 y se purificaron y secuenciaron para su posterior análisis de secuencias en el GenBank.

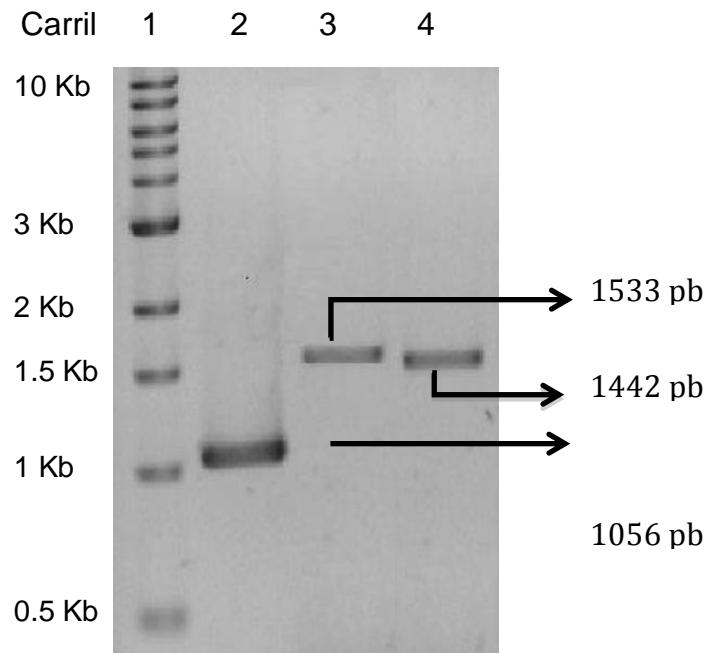


Figura 9. Amplificación de los genes completos M, HA y NA del aislamiento Gto_Sal_1/2011 para su purificación y posterior secuenciación. Carril: 1. Marcador de peso de 1 Kb (Biolabs, USA), 2. Gen M (1056 pb), 3. Gen HA (1533 pb) y 4. Gen NA (1442 pb).

El análisis BLASTn mostró que la secuencia del gen HA presentó una identidad del 99% con secuencias de México, de los estados de Veracruz, Querétaro y Estado de México del 2010, con secuencias de otros países como Estados Unidos en los años de 2003 y 1988, y Hong Kong de los años 1993 y 1999 tuvo una identidad del 95%, la gran mayoría de ellas origen porcino pertenecientes al subtipo H1N1. Este mismo comportamiento se observó para la NA (en los Cuadros 8 y 9). El gen M presentó una identidad que variaba de entre un 99-97% con secuencias mexicanas, americanas y chinas, sin embargo al ser un gen altamente conservado, se encontró mayor variedad en el origen, ya que además de identificar secuencias porcinas en su mayoría, también identifico aviares (Cuadro 10).

Cuadro 8. Análisis BLASTn del gen HA del aislamiento Gto-Sal1 con secuencias del NCBI.

Año	País	Origen	Número de secuencias	Subtipo	% de identidad	Valor de E
2010	México	Porcino	7	H1N1	99	0.0
2005	Guangxi	Porcino	1	H1N2	95	0.0
2004	EU	Porcino	1	H1N1	95	0.0
2004	Hong Kong	Porcino	2	H1N2	95	0.0
2003	EU	Porcino	23	H1N1	95	0.0
2003	EU	Porcino	1	H1N2	95	0.0
2003	Hong Kong	Porcino	2	H1N2	95	0.0
2002	Hong Kong	Porcino	1	H1N2	95	0.0
2001	EU	Porcino	9	H1N2	95	0.0
2000	EU	Porcino	1	H1N2	95	0.0
1999	EU	Porcino	1	H1N2	96	0.0
1994	Hong Kong	Porcino	14	H1N1	95	0.0
1994	WI	Porcino	2	H1N1	95	0.0
1993	Hong Kong	Porcino	15	H1N1	95	0.0
1992	IA	Aviar	1	H1N1	95	0.0
1991	EU	Porcino	3	H1N1	96	0.0
1990	EU	Porcino	1	H1N1	96	0.0
1988	EU	Porcino	7	H1N1	95	0.0

Cuadro 9. Análisis BLASTn del gen NA del aislamiento Gto-Sal1 con secuencias del NCBI.

Año	País	Origen	Número de secuencias	Subtipo	% de identidad	Valor de E
2012	EU	Porcino	1	H1N1	94	0.0
2011	EU	Porcino	3	H1N1	95	0.0
2010	México	Porcino	7	H1N1	99	0.0
2010	EU	Porcino	1	H1N1	95	0.0
2008	EU	Porcino	2	H1N1	94	0.0
2006	EU	Porcino	1	H1N1	94	0.0
2004	EU	Porcino	2	H1N1	95	0.0
2003	EU	Porcino	20	H1N1	95	0.0
2002	EU	Porcino	22	H1N1	95	0.0
2000	EU	Porcino	1	H1N1	94	0.0
1999	EU	Porcino	1	H1N1	94	0.0
1999	Hong Kong	Porcino	14	H1N1	96	0.0
1998	EU	Porcino	1	H1N1	97	0.0
1992	IA	Aviar	1	H1N1	94	0.0
1991	EU	Porcino	4	H1N1	95	0.0
1991	Canadá	Porcino	1	H1N1	93	0.0
1990	IA	Aviar	1	H1N1	94	0.0
1988	EU	Porcino	7	H1N1	95	0.0

Cuadro 10. Análisis BLASTn del gen M del aislamiento Gto-Sal1 con secuencias del NCBI.

Año	País	Origen	Número de secuencias	Subtipo	% de identidad	Valor de E
2010	México	Porcino	7	H1N1	99	0.0
2010	México	Porcino	3	H3N2	97	0.0
2008	EU	Porcino	1	H3N2	98	0.0
2005	Korea	Porcino	1	H1N1	97	0.0
2005	EU	Porcino	2	H3N2	97	0.0
2005	Hong Kong	Porcino	3	H1N2	97	0.0
2004	EU	Porcino	3	H3N1	97	0.0
2003	EU	Porcino	4	H1N1	97	0.0
2002	EU	Porcino	3	H1N1	98	0.0
2002	Hong Kong	Porcino	1	H1N2	97	0.0
2001	EU	Aviar	1	H1N2	98	0.0
2001	EU	Porcino	1	H1N2	97	0.0
1998	EU	Humano	1	H1N1	98	0.0
1998	EU	Aviar	1	H1N1	98	0.0
1994	EU	Humano	2	H1N1	97	0.0
1993	Hong Kong	Porcino	10	H1N1	97	0.0
1992	IA	Aviar	1	H1N1	98	0.0
1990	EU	Porcino	2	H1N1	98	0.0
1988	EU	Aviar	1	H1N1	97	0.0
1988	EU	Humano	2	H1N1	97	0.0
1988	EU	Porcino	7	H1N1	97	0.0

Se contruyeron 2 árboles filogenéticos, uno para el gen NA y otro para la HA, ambos, mostraron una distribución similar. En ellos se observó mayor relación genética con secuencias mexicanas de origen porcino de los estados de Veracruz, México y Querétaro, agrupándose en una misma rama, y menor relación con secuencias europeas de origen porcino. Se identificaron diferentes patrones de distribución en los árboles filogenéticos inferidos, en los cuales se encontraron agrupados en varias ramas las secuencias de origen porcino, en mexicanas, norteamericanas y canadienses junto con el aislamiento obtenido en este estudio, identificado como *A/Cerdo/México/Gto_Sal_1/2011 (H1N1)* (señalado con viñeta roja en el árbol de la figura 10 y 11).

En otras ramas se agruparon las secuencias de origen humano, aviar, euroasiáticas y en un clado aparte las correspondientes a los virus H1N1/2009 pandémico. Por lo anterior se concluye que el aislamiento encontrado es un virus de origen porcino principalmente relacionado con aislamientos mexicanos aunque tiene homología con virus de origen norteamericano y que esta no relacionado con virus de aves o humanos, lo anterior analizado mediante las secuencias inferidas de aminoácidos.

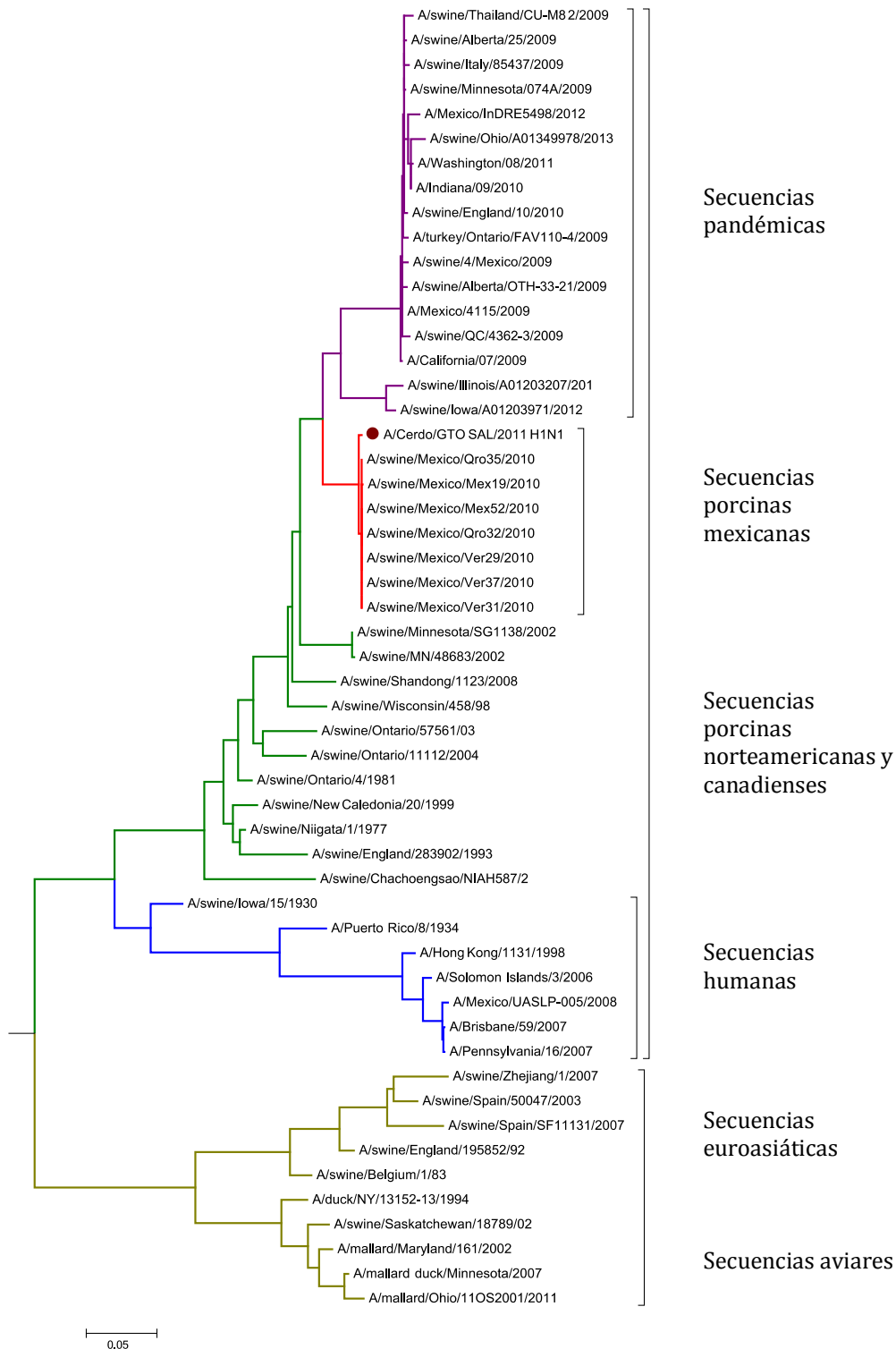


Figura 10. Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del gen HA1. El árbol fue generado por el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas de bootstrap en el programa Mega 5.0.

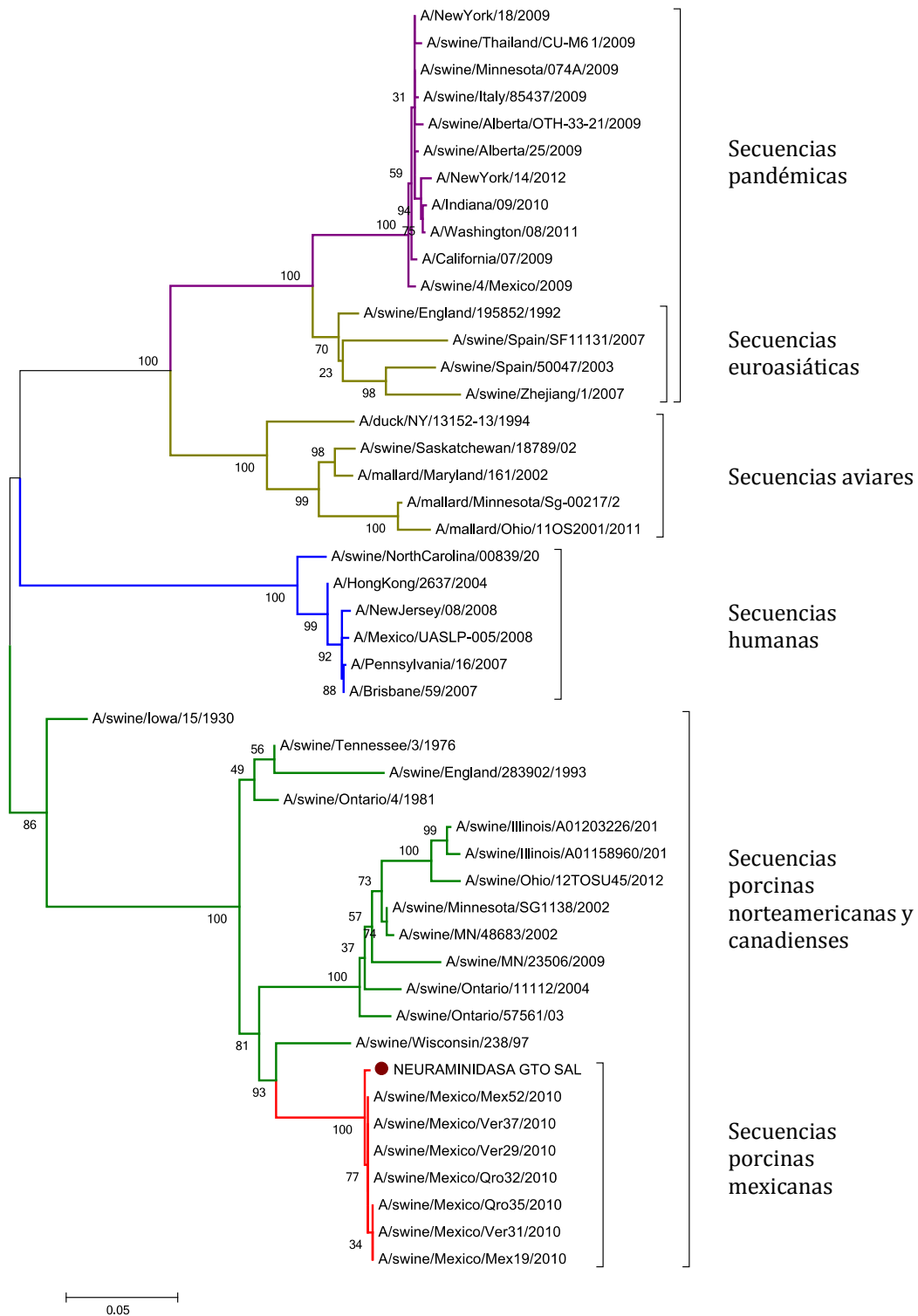


Figura 11. Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del gen NA1. El árbol fue generado por el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas de bootstrap en el programa Mega 5.0.

5.3 Determinación de factores de riesgo

5.3.1. Análisis Bivariado

Los posibles factores de riesgo significativos asociados por exposición a cada uno de los subtipos del virus de Influenza, así como los asociados a la enfermedad (relacionado con la detección del genoma del virus) que se encontraron en este estudio, a través de un análisis bivariado, se muestran en los siguientes cuadros y son aquellas categorías que presentaron una $P < 0.05$.

Cuadro 11. Valores de Chi-cuadrada (χ^2) para los diferentes factores de riesgo significativos por exposición para el subtipo H1N1 endémico.						
Factor de Riesgo	Categoría	No. de animales seropositivos	Total de animales muestreados	% de animales seropositivos	χ^2	<i>P</i>
Estado	Querétaro	126	407	30.7	16.3	0.00
Etapas de producción	Pie de cría	121	299	40.5	43.8	0.00
Tipo de animal	Vientre	119	303	39.3	51.1	0.00
	Semental	18	34	52.9	16.3	0.00
+Desinfección	Si	45	148	30.4	4.01	0.04
+Tapetes	Si	44	133	33.1	7.8	0.00
+Enfermo	Si	86	266	32	13.7	0.00
+Escamocha	No	276	1084	25.5	7.01	0.00
+Tipo de UP	Tecnificada	81	273	29.7	8.2	0.00
+Tipo de productor	Criador y engordador	250	924	27.1	13.7	0.00
	Combinación	9	15	60	10.7	0.00
+Personal enfermo	No	250	1013	24.7	8.9	0.00
+Personal ajeno	Si	30	93	32.3	3.9	0.04

Cuadro 12. Valores de Chi-cuadrada (χ^2) para los diferentes factores de riesgo por exposición significativos para el subtipos H3N2.						
Factor de Riesgo	Categoría	No. de animales seropositivos	Total de animales muestreados	% de animales seropositivos	χ^2	P
+Etapa de producción	Pie de cría	15	299	5	8.1	0.00
Tipo de animal	Viente	17	303	5.6	11.8	0.00
+Origen	Propio	31	882	3.5	7.02	0.00
+Escamocha	Si	16	327	4.9	7.2	0.00
+Carretera	A pie de carretera	15	295	5.1	8.9	0.00

Cuadro 14. Valores de Chi-cuadrada (χ^2) para los diferentes factores de riesgo por exposición significativos para el subtipo H1N1 pandémico.						
Factor de Riesgo	Categoría	No. de animales seropositivos	Total de animales muestreados	% de animales seropositivos	χ^2	P
Estado	Querétaro	226	407	55.5	611.4	0.00
+Etapa de producción	Destete	17	53	32.1	4.02	0.04
+Agua	Potable	192	930	20.6	26.9	0.00
+Cerdos	No	198	1139	17.4	5.91	0.01
+Desinfección	Si	49	148	33.1	31.4	0.00
+Escamocha	No	205	1084	18.9	13.9	0.00
+Tipo de UP	Tecnificada	64	273	23.4	8.15	0.00
+Tipo de productor	Criador y engordador	181	924	19.6	16.2	0.00
+Humedales	Si	112	363	30.9	61.6	0.00
+Personal enfermo	No	189	1013	18.7	11.7	0.00
+Ropa de trabajo	No	209	1070	19.5	22.9	0.00
+Personal ajeno	Si	36	93	38.7	34.1	0.00

Cuadro 15. Valores de Chi-cuadrada (χ^2) para los diferentes factores de riesgo por enfermada para los virus de influenza A.						
Factor de Riesgo	Categoría	No. de animales seropositivos	Total de animales muestreados	% de animales seropositivos	χ^2	P
Estado	Guanajuato	18	586	3.07	13.2	0.00
⁺ Etapa de producción	Engorda-finalización	17	747	2.3	4.11	0.04
⁺ Cerdos	Si	3	67	4.5	3.51	0.03
⁺ Carretera	A pie de	11	295	3.7	3.97	0.00

Estos factores representan un posible riesgo, ya que pueden estar asociados a la exposición de los distintos subtipos de influenza, así como a la presentación de la enfermedad, sin embargo, entre estos pueden encontrarse algunas variables de confusión, es decir, aquellas que pueden estar dando una asociación entre el factor y la exposición al subtipo, cuando en realidad no la hay. Para controlar estas variables de confusión, se realizó un análisis multivariado de regresión logística.

5.3.2 Modelo Multivariado

Para el análisis multivariado de regresión logística se tomaron en cuenta aquellos factores que presentaron una $P < 0.1$ en los resultados del análisis bivariado. Los resultados de este análisis multivariado se muestran en los siguientes cuadros 15-18, donde las categorías resaltadas en negritas corresponden a los factores de riesgo significativos que pueden estar asociados a la exposición de cada uno de los subtipos del virus de influenza, así como para la enfermedad, los cuales presentan una $P < 0.05$ y un $OR > 1$.

Estos factores pueden considerarse definitivos en todo el estudio, ya que este último análisis eliminó a las variables de confusión que pudieron haber estado sesgando la asociación entre los verdaderos factores de riesgo y la exposición al subtipo o a la presentación de la enfermedad. Por otra parte, los factores de riesgo

que se encontraron significativos ($P < 0.05$), pero con un $OR < 1$, representan factores de protección.

Cuadro 15. Estimación de factores de riesgo por exposición al subtipo H1N1 mediante el cálculo de regresión logística.			
Categoría	OR	I.C. 95%	Valor P
Combinación (Tipo de productor)	<u>5.8755</u>	<u>1.9513 - 17.6920</u>	<u>0.0016</u>
Criador y Engordador	1.2323	0.8809 - 1.7240	0.2226
Desinfección	0.6155	0.3255 - 1.1638	0.1354
Enfermos	<u>2.2988</u>	<u>1.6011 - 3.3005</u>	<u>0.0000</u>
Escamocha	0.7069	0.4859 - 1.0285	0.0698
Personal enfermo	0.8315	0.5651 - 1.2235	0.3492
Pie de cría	<u>1.7656</u>	<u>1.1164 - 2.7924</u>	<u>0.0151</u>
Querétaro	<u>1.7151</u>	<u>1.2438 - 2.3650</u>	<u>0.0010</u>
Semental	<u>3.9699</u>	<u>1.6513 - 9.5436</u>	<u>0.0021</u>
Tapetes	1.2828	0.7108 - 2.3152	0.4083
Tecnificada	1.2234	0.7992 - 1.8727	0.3533
Vientre	1.5297	0.9694 - 2.4138	0.0678
Personal ajeno	1.4392	0.8306 - 2.4937	0.1942

Cuadro 20. Estimación de factores de riesgo por exposición al subtipo H3N2 mediante el cálculo de regresión logística.			
Categoría	OR	I.C. 95%	Valor P
Carretera	<u>2.6414</u>	<u>1.1954 - 5.8363</u>	<u>0.0163</u>
Escamocha	<u>3.6674</u>	<u>1.7149 - 7.8428</u>	<u>0.0008</u>
Origen	<u>0.2906</u>	<u>0.0959 - 0.8809</u>	<u>0.0290 FP</u>
Pie de cría	1.9769	0.7834 - 4.9886	0.1490
Vientre	2.1551	0.8729 - 5.3205	0.0959

OR: Razón de momios

I.C. 95%: Intervalo de confianza

F.P.: Factor protector

Cuadro 21. Estimación de factores de riesgo por exposición al subtipo H1N1 pandémico mediante el cálculo de regresión logística.			
Categoría	OR	I.C. 95%	Valor P
Agua	0.5770	0.2613 - 1.2740	0.1736
Cerdos en casa	0.3648	0.1004 - 1.3259	0.1256
Criador y Engordador	<u>1.7608</u>	<u>1.0013</u> - <u>3.0963</u>	<u>0.0495</u>
Desinfección	2.2601	0.7074 - 7.2207	0.1688
Destete	<u>21.8319</u>	<u>5.7201</u> - <u>83.3256</u>	<u>0.0000</u>
Escamocha	0.6330	0.3067 - 1.3067	0.2162
Humedales	<u>2.0131</u>	<u>1.1214</u> - <u>3.6137</u>	<u>0.0191</u>
Personal enfermo	1.1916	0.5508 - 2.5781	0.6561
Querétaro	<u>176.9590</u>	<u>67.2425</u> - <u>465.6948</u>	<u>0.0000</u>
Ropa de trabajo	0.6963	0.3045 - 1.5920	0.3909
Tecnificada	1.1886	0.4430 - 3.1887	0.7315
Personal ajeno	0.7021	0.2845 - 1.7326	0.4429

Cuadro 22. Estimación de factores de riesgo asociado a la enfermedad por virus de influenza A, mediante el cálculo de regresión logística.			
Categoría	OR	I.C. 95%	Valor P
Carretera	1.9476	0.6661 - 5.6949	0.2233
Cerdos en casa	<u>5.0209</u>	<u>1.2397</u> - <u>20.3353</u>	<u>0.0238</u>
Engorda - Finalización	2.6431	0.8179 - 8.5416	0.1044
Guanajuato	<u>5.2900</u>	<u>1.5976</u> - <u>17.5163</u>	<u>0.0064</u>

OR: Razón de momios

I.C. 95%: Intervalo de confianza

6. DISCUSIÓN

6.1. Frecuencias serológicas

Con el impacto negativo de la influenza porcina debido a la aparición de la cepa A/H1N1/2009, es importante evaluar la seroprevalencia a los diferentes subtipos que circulan en las unidades de producción porcina en México. En este estudio se consideraron cinco estados de la región del Bajío mexicano, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Querétaro y San Luis Potosí; puesto que los tres primeros son consideradas de las principales entidades productoras de carne de porcino (Gallardo, 2006); y Querétaro y San Luis Potosí son importantes por ser entidades colindantes, en los cuales hay una alta movilización de animales por la compra-venta de pie de cría y cerdo para abasto provenientes de Guanajuato, Jalisco ó Michoacán, además de otras especies animales, dirigidos a distintos puntos de la República Mexicana.

Para la obtención de las frecuencias serológicas de cada estado se utilizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación, que proporciona información de valor *ante mortem* sobre la dinámica de infección del virus de influenza porcina; sin embargo genera poca información sobre la infección clínica en los animales, por lo que detecta el nivel de anticuerpos ante la exposición con el antígeno, pero no necesariamente la presencia de la enfermedad (Janke, 2000).

En este estudio, la exposición detectada al subtipo H1N1 endémico siempre mostró mayor frecuencia (45.7%) que al subtipo H3N2 (20.4%) y es el principal subtipo que prevalece tanto en el pie de cría como en los animales destinados al abasto. La exposición al subtipo H1N1 pandémico se mostró en menor proporción (15.9%) que los subtipos endémicos, prevaleciendo principalmente en la etapa de destete y en los sementales.

El estado de Guanajuato presentó una mayor seropositividad al subtipo H1N1. Esto mismo se ha observado en estudios anteriores, como el de Ávalos *et al.*, (2008) que encontraron que en este estado prevalecía principalmente el subtipo H1N1 en un 75% y un 28.9% el subtipo H3N2; Sánchez *et al.*, (2008) obtuvieron un 40% para el H1N1 y 30% para el H3N2. Mientras que Trujillo *et al.*, (2004) obtuvieron un 45.99% de sueros positivos a la presencia de anticuerpos contra el subtipo H1N1 y para el subtipo H3N2 el 29.74%. La seroprevalencia en este estudio es relativamente inferior a las reportadas, pero se sigue observando una relación de mayor porcentaje de seropositividad del subtipo H1N1 con respecto al subtipo H3N2 y esto puede variar en función de los años evaluados, así como la fluctuación del número de individuos evaluados.

Los estados de Jalisco y Michoacán, dos de las principales entidades productoras de carne de porcino en el país, presentaron las frecuencias serológicas más altas a los subtipos endémicos, 93.1% y 96.6% para el H1N1 respectivamente y 29.8% y 76.7% para el H3N2, atribuido principalmente a que las UP muestreadas y la gran mayoría establecidas en estos estados utilizan un esquema de vacunación contra influenza, aunado a la alta densidad animal en los municipios muestreados y la constante movilidad de animales tanto de pie de cría como de abasto, ya que las UP en estos municipios son de tipo tecnificado con poblaciones de más de 100 vientres y muchas de ellas a pie de carretera. Sánchez *et al.*, (2008) encontró en estos mismos estados prevalencias muy similares, del 81.8% y 81.3% para el H1N1 respectivamente y 39.8% y 32.6% para el H3N2 respectivamente y, al igual que Ávalos *et al.*, (2004) siempre manteniendo la relación de mayor proporción para el subtipo H1N1 y menor para el subtipo H3N2, como se observó para el estado de Guanajuato.

El estado de Querétaro presentó la frecuencia serológica más alta para el subtipo H1N1 pandémico con un 55.5%, en donde los municipios de Colón, El Marqués, Toliman y San Juan del Río presentaron frecuencias mayores al 50%. Por otra parte, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reportó en 2009 grandes

afectaciones durante la pandemia en la población mexicana. En cuanto a la distribución de los casos confirmados de influenza A H1N1 por entidad federativa, el Distrito federal registró 12%, le siguió el Estado de México, San Luis Potosí y Nuevo León, con 6% cada uno, y Jalisco con 5.9%; en su conjunto, estos seis estados acumularon 35.9% del total de enfermos de influenza. En este contexto, Querétaro se ubicó en el décimo sexto lugar con 2,220 (28.9%) casos confirmados de influenza A H1N1 de 7,673 casos sospechosos. La Jurisdicción Sanitaria I, en la ciudad de Querétaro, fue la más afectada, con 5802 casos sospechosos (75.6%); le siguió la II, en San Juan del Río, con 1,034 (13.4%). Al revisar la distribución de los enfermos por municipio se apreció que 65.9 % (5,055 pacientes) correspondió a Querétaro, 8.9% (684) a San Juan del Río, 6.6% (508) a Corregidora y 2.3% (180) a El Marqués. Los municipios de Querétaro, Corregidora y El Marqués corresponden a la zona conurbana de la ciudad de Querétaro, y en ellos se registró 77.1% de los eventos. La tasa de letalidad para la ciudad de Querétaro fue de 0.88%, para San Juan del Río de 1.8% y para Cadereyta de 1.2%; estas dos últimas superaron el resultado estatal. Al verificar los resultados por municipio, 46.7% aconteció en Querétaro, 10.4% en San Juan del Río, 9.1% en Pedro Escobedo, 7.8% en El Marqués; estos cuatro municipios registraron 74% de los fallecimientos (Romero-Márquez y Romero Zepeda, *et al.*, 2010). Estos reportes pueden verse relacionados con las frecuencias que se obtuvieron en los cerdos en este estudio, ya que el contacto de los productores con los cerdos es muy estrecho, puesto que las UP muestreadas para este estudio al ser en su mayoría de traspatio, se encontró que son atendidas por la familia principalmente. Estudios realizados en trabajadores de UP porcina han mostrado riesgo de presentar la enfermedad que aquellos que no están expuestos (Wisener *et al.*, 2013).

Aunque no se han reportado otros estudios serológicos en cerdos de UP en esta entidad, solo se encontró un estudio hecho en cerdos de traspatio de la Ciudad de México, en los cuales se detectó un 17.8% en muestras obtenidas durante el

período 2000-2009 sin observar correlación significativa entre los títulos de anticuerpos para los virus H1N1 pandémico y H1N1 endémico (Saavedra *et al.*, 2012).

En el estado de San Luis Potosí se presentaron las frecuencias mas bajas para los subtipos H1N1, H3N2 y H1N1 pandémico en comparación con el resto de los estados muestreados. En este estado solo se muestrearon algunos municipios colindantes con el estado de Guanajuato y Querétaro, debido a la inseguridad que el estado presentaba en ese momento y que los comités sugirieron para protección del grupo de personas encargadas del muestreo.

Estudios realizados en otros estados del país, reportan frecuencias serológicas con tendencias similares entre los subtipos endémicos, como las que se obtuvieron en este estudio, por ejemplo, Carrera *et al.*, (2010) encontraron que de muestras procedentes del Distrito Federal remitidas durante los años 2000 a 2009 se obtuvo una prevalencia general del 74% para el subtipo H1N1, mientras que para el subtipo H3N2 fue de 24.1%; además se encontró una seroprevalencia hacia ambos subtipos del 22.2%. Las delegaciones de Azcapotzalco y Coyoacán tuvieron los mayores porcentajes de seropositividad para ambos subtipos.

Por otra parte, en la comunidad de La Gloria, en el estado de Veracruz, en el mes de Junio del año 2009, dos meses posteriores a la pandemia A/H1N1, se encontraron frecuencias promedio de 92.6% para ambos subtipos endémicos, en cerdos provenientes de unidades de traspatio. Estudios anteriores revelaron en ese mismo estado frecuencias que oscilaban entre un 50 y 65%, indicando una circulación viral activa en esa zona, además de que en las unidades de traspatio se destaca una cercana convivencia de diversas especies incluyendo a los humanos, dando las condiciones suficientes para que pudiera ocurrir la transmisión a animales susceptibles, a otras especies o una posible recombinación viral (Pérez *et al.*, 2010).

En una UP de ciclo completo del municipio de Tenango, en Morelos se encontró el 96.55% de seropositividad para ambos subtipos endémicos, donde el 100% de los vientos que se encontraban en el área de servicios fue positivo al subtipo H1N1, mientras que para el subtipo H3N2 el 90%. Los vientos gestantes registraron el 100% de seropositividad para ambos subtipos. En el área de maternidad, el 90% de los vientos recién paridos fueron positivos al subtipo H1N1, mientras que para el subtipo H3N2 presentaron el 100%. También se identificaron el 6.9% de muestras positivas por PCR múltiple al subtipo H3N2, a partir de hisopado nasal; no se encontraron resultados positivos para el subtipo H1N1. La seropositividad en la línea de producción fue de 94.59% para el subtipo H1N1 y 81.98% para el subtipo H3N2. Con la prueba de RT-PCR múltiple se identificó que el 6.3% de las muestras provenientes de hisopos fueron positivas al H1N1 y 5.4% para el subtipo H3N2, de cerdos entre las 4 y 8 semanas de edad (Beltrán *et al.*, 2008).

Además de esto, en estados como Yucatán y Sonora, donde la porcicultura es una actividad económica importante, se encontraron bajas frecuencias de anticuerpos por exposición al subtipo H1N1 (8.66%) y elevadas para el subtipo H3N2 (90.56%) dado que no llevan ningún esquema de vacunación contra influenza porcina (Munguía *et al.*, 2010). En un estudio hecho en la temporada invernal de 2008-2009 en el estado de Sonora, se mostró una mayor prevalencia de anticuerpos para el subtipo H3N2 que para el H1N1, aún cuando en un reporte del 2005 se observaron tendencias contrarias (López-Robles *et al.*, 2009).

En los Estados Unidos, el Sistema Nacional de Monitoreo de Salud Animal (NAHMS) encontró en el 2006, que el 26.4%, 9.2% y 3.8% de pie de cría, lechones y cerdos en etapa de engorda-finalización respectivamente, fueron vacunados contra los subtipos H1N1 y H3N2 (Corzo *et al.*, 2012; Wisener y Sargeant, 2013).

De acuerdo con el programa de vigilancia Proyecto Sentinela Porcino de Ontario la proporción de hatos porcinos de engorda-finalización seropositivos al subtipo

H1N1 del 2004 al 2005 fue de 19.5% y 30.5%. y para el subtipo H3N2 fue de 6.5% y 40.8% respectivamente (Wisener y Sargeant, 2013).

En Europa, un estudio hecho en 146 UP de Inglaterra, durante los meses de verano del 2008 y 2009, mostró que se encuentran co-circulando los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2. Este último es el predominante en todas las etapas de producción, por ejemplo, el 29% de vientres son seropositivos al subtipo H1N2, el 19% para el subtipo H1N1 y únicamente el 1% de los vientres fueron seropositivos al subtipo H3N2. En la etapa de engorda finalización se encontró una seropositividad del 8% y 4% para los subtipos H1N2 y H1N1 respectivamente, y nula para el subtipo H3N2. Y en los cerdos destetados se halló algo muy similar, con el 8% y 2% para los subtipos H1N2 y H1N1 respectivamente, y nula para el subtipo H3N2 (Mastin *et al.*, 2011).

En países como Malasia, también se ha detectado mayor seroprevalencia del subtipo H1N1 en comparación con el subtipo H3N2, debido principalmente a que la mayoría de los cerdos que importan como pie de cría son originarios de países europeos, tal vez por esto frecuencias similares se observaron en Bélgica, Francia y hasta Korea que también es importador/comprador (Suriya *et al.*, 2008).

6.2 Aislamiento

En este estudio, se obtuvo un aislamiento proveniente del municipio de Salamanca, en el estado de Guanajuato, el cual fue replicado en la línea celular MDCK e identificado como subtipo H1N1. Las diferencias encontradas en el número de muestras positivas por aislamiento viral y por RT-PCR tiempo real (1 de 24) pudo estar influenciado por la temporada de muestreo, así como por el reducido período de excreción viral a través de las secreciones nasales, ya que la concentración del virus alcanza un máximo a las 24 horas y empieza a reducirse al cabo de 72, por lo que las muestras deben ser tomadas en la fase aguda de la

enfermedad, lo que dificulta su aislamiento (Gene *et al.*, 2000; Janke, 2000; Olsen *et al.*, 2006; Van Reeth *et al.*, 2007).

Es importante mencionar, que este estudio no fue dirigido a muestrear únicamente casos clínicos, si no que, se realizó un monitoreo general para conocer la distribución epidemiológica de los subtipos de influenza que se encuentran circulando en los cerdos de la región del bajío mexicano; pero esperando obtener aislamientos al realizar los muestreos durante la temporada invernal.

Respecto a la temporada de muestreo de los animales en este estudio, varió en gran medida por la disponibilidad de los productores así como por los comités de apoyo. El aislamiento que se obtuvo en este estudio fue de temporada invernal. Otro factor que pudo afectar en el aislamiento es la congelación de las muestras lo que pudo afectar la viabilidad del virus, por lo que la sensibilidad que tiene el RT-PCR en tiempo real permite detectar tanto fragmentos de genoma como partículas virales no viables.

La movilización y/o importación de animales y sus productos trae consigo un riesgo sanitario inherente de transferir enfermedades. Por lo que respecta a México, es un país importador, que ha satisfecho su incremento en necesidades de carne de cerdo con importaciones de pie de cría principalmente de EU, al punto en que hoy en día más del 30% de la carne de cerdo que se consume en el país es carne importada (Stephano, 2012), es por esto, que es posible deducir porque se encontraron homologías de hasta un 98-99% entre las secuencias de los genes HA, NA y M del aislamiento que se obtuvo y las secuencias porcinas de origen estadounidenses reportadas en el NCBI.

En el Banco de genes del NCBI se encontraron reportados 33 aislamientos de virus de influenza porcina de México, que corresponden a los estados de México (10), Veracruz (5), Tamaulipas (2), Oaxaca (1), Jalisco (3), Querétaro (2), Guanajuato (1), Michoacán (1), Hidalgo (2), Sonora (1), Guerrero (1), Distrito

Federal (1), Tlaxcala (1), Puebla (1) y Morelos (1) obtenidos durante los años 2009-2011, a partir de muestras de pulmón, tráquea y linfonodos (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2012).

En los árboles filogenéticos inferidos en este estudio, se observó una estrecha relación entre el aislamiento Gto_Sal_1 y las secuencias de otros aislamientos mexicanos de diferentes regiones geográficas del país (Figura 11 y 12), lo cual puede deberse a la movilización comercial de animales de los diferentes estados. En dichos árboles además se observó homología con secuencias de origen Norteamericano aunque en otra rama, lo anterior puede explicarse a la importación de genética porcina de empresas estadounidenses y canadienses para el mejoramiento genético de la producción porcina nacional.

Con estos resultados, es posible sugerir que el aislamiento Gto_Sal_1 proviene de cerdos, ya que se agrupa con secuencias del mismo origen. No se encontró relación con secuencias humanas, ni aviares.

Aunque no se habían notificado frecuencias serológicas, ni aislamientos del subtipo H1N2 en México, en un estudio del 2012 se encontraron cuatro aislados de este subtipo, el cual presenta una alta relación genética con cepas porcinas recientes de EU para los segmentos NS, NA (subtipos H1N2 y H3N2); con cepas humanas y porcinas para el segmento HA (subtipos H1N1 y H1N2) y con virus humano para los segmentos M y NP (subtipo pH1N1/2009) (Lara-Puente *et al.*, 2012a). Posteriormente, con estos virus se trabajaron un total de 486 sueros procedentes de diferentes estados de la República Mexicana entre los años 2006-2012, de las cuales el 21.39% resultaron positivas al H1N2, 23.86% al H3N2 y 60.49% positivas al H1N1. De esta manera, concluyeron que al menos tres diferentes subtipos del virus de influenza porcina están co-circulando actualmente en el país, H1N1, H3N2 y H1N2 (Lara-Puente *et al.*, 2012b).

6.3 Determinación de factores de riesgo

En este estudio, los factores de riesgo que se encontraron involucrados en la exposición al subtipo H1N1 endémico ($OR > 1$; $P < 0.05$), fueron en la etapa de pie de cría, en los sementales, en la presencia de animales enfermos, en la producción de ciclo completo con la entrada de animales por acopio para engorda y los cerdos muestreados del estado de Querétaro fueron detectados como una población en riesgo.

Como se mencionó anteriormente, México es un país importador de pie de cría, y usualmente este es vacunado con el objetivo de conferir inmunidad materna a las camadas que protejeran a los cerdos jóvenes de la enfermedad clínica (Thacker *et al.*, 2008). Los anticuerpos calostrales protegen a los lechones entre las 8 y 12 semanas (Morilla *et al.*, 2005), por tanto, la enfermedad se presenta de manera frecuente a partir de estas edades, que coincide cuando los animales entran en la etapa de engorda, en donde el movimiento, reacomodo y hacinamiento de los grupos, incrementan el contacto entre animales susceptibles e infectados con el virus de campo, favoreciendo la exposición y diseminación del virus en la población y que a su vez permite el desarrollo de infecciones secundarias.

Los tres requisitos que deben estar presentes para la transmisión de patógenos causantes de enfermedades respiratorias entre animales, son: 1) la excreción de animales infectados, 2) concentración crítica y 3) el contacto entre animales susceptibles y el agente causal. Así como los agentes causantes de enfermedades respiratorias son fácilmente introducidos en una UP, la política de compra de animales o acopio, es considerado uno de los factores de riesgo más importantes. Muchos autores han documentado esta asociación (Maes, 1997), tal y como se observó en los resultados obtenidos en este estudio al encontrarse como un factor de riesgo significativo el acopio de cerdos para engorda en una UP de ciclo completo.

Por esto, el consenso general, es que las unidades UP cerradas, es decir, que no introducen animales de otras UP, presentan menos riesgo, mientras que aquellas UP acopiadoras y engordadoras están en alto riesgo, particularmente si compran de varios sitios. El riesgo relativo de 13.54 para UP que compran todos sus animales en la etapa de destete comparado con las UP que tienen sus propios animales destetados fue reportado por Aalaund *et al.* 1976. Otro estudio reportó un OR de 2.38 para UP porcina acopiadoras de distintas UP y con prevalencias de enfermedades respiratorias mayores a 10% (Stärk, 2000). El OR encontrado en este estudio respecto al acopio de cerdos para engorda en una UP de ciclo completo fue de 5.88, coincidiendo esta variable con lo reportado en la literatura como un factor de riesgo, debido al impacto que tiene en una UP.

Diferentes políticas de compra de animales se ven reflejadas en los distintos tipos de producción. Ya que UP exclusivamente engordadoras requieren comprar animales de varios sitios, a diferencia de aquellas que son criadoras y engordadoras que es menos probable que compren gran número de animales. De esta manera las UP exclusivamente engordadoras tiene mayor riesgo de contraer enfermedades respiratorias. Además del tipo de animal, el tamaño de la piara, es comunmente encontrarlo como un factor de riesgo influencial en la presentación de enfermedades respiratorias en cerdos. Esto ha sido reportado en un gran número de publicaciones (Stärk, 2000).

La presencia de animales enfermos es comunmente visto y manejado en las UP, en este estudio se observó como un factor de riesgo significativo. En las UP muestreadas en este estudio se observó la presencia de un área conocida como enfermería, en donde, los cerdos enfermos por cualquier causa son alimentados y tratados con medicamentos hasta su recuperación y reintegrados a la piara. Desafortunadamente, una vez recuperados estos animales no logran alcanzar su peso al tiempo de salida de la UP para su venta y la práctica que se realiza es su reacomodo por tamaño y peso. Esto puede ocasionar el acarreo de patógenos de una área a otra dentro de una UP, incrementando el riesgo de exposición y

diseminación de agentes causales de distintas enfermedades entre cerdos de diferentes edades.

Otro factor de riesgo que resulto significativo para la exposición al subtipo H1N1 fueron los sementales, que generalmente son pocos dentro de las UP y son entrenados para la obtención de semen desde los 6 meses de edad, y el contacto y convivencia con ellos es sumamente cercana, además de que algunas veces son prestados entre productores para la monta de cerdas de traspatio y esta práctica puede contribuir a que estos animales puedan representar un riesgo como posible fuente en la diseminación y transmisión de varias infecciones además del virus de influenza.

En este estudio también observamos que los factores de riesgo que se encontraron involucrados en la exposición al subtipo H3N2 endémico ($OR > 1$; $P < 0.05$), fueron las UP que se encuentran a pie de carretera y la alimentación con escamocha; y como factor protector el origen, que corresponde a los animales que nacen dentro de las UP, a diferencia de aquellos que son comprados e introducidos a otras piaras.

La transmisión a través del transporte puede llegar a ser una ruta importante en la transmisión del virus en los cerdos. La movilización de cerdos a grandes distancias se ha visto implicada en la diseminación del virus de influenza de origen humano hacia las áreas de producción porcina en el medio oeste de los Estados Unidos (Nelson *et al.*, 2011). Además, el transporte global de animales infectados también se ha visto implicado en el movimiento de varias cepas del virus, a través de países y continentes. En China, hay virus de linajes norteamericano y euroasiático co-circulando, lo que sugiere, que el comercio internacional puede haber facilitado la introducción de esos virus (Vijaykrishna *et al.*, 2011).

La construcción de una UP a pie de carretera, implica una constante exposición a otros vehículos, paso de personal ajeno y movilización de otras especies animales

y se encontró como un factor de riesgo significativo en este estudio y otros autores han documentado esta misma asociación. Corzo *et al.*, detectaron una asociación entre el estatus serológico positivo a los subtipos virales de origen porcino de granjas de pavos en Minnesota, EU con la cercanía a las granjas de cerdos. Las granjas de pavos que tienen UP porcinas en un radio de 1.9 km tienen ocho veces más probabilidades de ser positivos a las pruebas serológicas hacia los subtipos H3N2 y H1N1, que en un radio de 4 a 6 km (Corzo *et al.*, 2012). La diseminación del virus de influenza por el personal, fómites y aerosoles, fue el modo mas fuertemente sospechoso en la transmisión, diseminación de la devastadora epizootia en aves de Pensilvania durante un brote de influenza de 1983-1984. Por tanto, el contacto frecuente entre UP por camiones con alimento u otros materiales o cualquier otro vehiculo, ha sido asociado con la diseminación del virus de influenza (Alexander, 2007).

En este estudio, se observó que muchas de la UP muestreadas se encuentran a pie de carretera, u otras en donde no hay un cerco sanitario o barda perimetral que delimite la entrada de autos a las UP. Y generalmente se encontraban en zonas muy transitadas como lo es en el caso del municipio de la Piedad, en Michoacán. En este municipio, la población porcina es alta, puesto que es uno de los principales estados productores de carne de cerdo y por esta misma razón la venta de animales a pequeños productores es una práctica común, lo que puede estar favoreciendo la exposición de los animales a varios patógenos.

La alimentación con desperdicios de comida o escamocha, es una práctica común de alimentacion de cerdos de traspatio, principalmente por ser barata, sin embargo no se recomienda, puesto que la mayoría de las veces, productos de origen animal se pueden encontrar en estos desperdicios, en su forma cruda o que no este completamente cocinada. Este fue otro de los factores de riesgo significativos que se encontró en este estudio para la exposición al subtipo H3N2. Los principales desperdicios vistos en la alimentación de cerdos en la UP muestreadas para este estudio eran de embutidos caducos con pan de desecho proveniente de

restaurantes, mercados, centros comerciales y empacadoras, esto con el propósito de reducir los costos de producción mediante su uso racional de desperdicios orgánicos a través de ensilados como una alternativa de alimentación para los cerdos.

Países como Cuba, tienen plantas procesadoras de residuos orgánicos que constituyen un sistema sostenible de producción, con las ventajas de recuperación y uso de residuos y subproductos que potencialmente constituyen una fuente de alimento para el cerdo y al mismo tiempo se contribuye a la descontaminación ambiental, transformando estos bioresiduos en un alimento inocuo para la salud del hombre y de los animales. De esta manera obtienen un producto de fácil manipulación y nutricionalmente más balanceado, utilizando tecnologías sencillas y económicas, Por lo que este tipo de procesamiento se puede aplicar a cualquier escala de producción y puede vincularse a cualquier cultivo de alta productividad en el trópico, (Domínguez, 1994), lo que sería una solución factible y económica para muchos países, como México

Sin embargo, por disposición general en la NOM-060-ZOO-1999 de las Especificaciones zoosanitarias para la transformación de despojos animales y su empleo en la alimentación animal, menciona que, queda prohibido el uso de tejidos y/o despojos crudos de animales en las raciones de los rumiantes, equinos, porcinos o aves, para prevenir la introducción y propagación de enfermedades de los animales que puedan ser diseminadas a través del empleo de despojos animales sin transformar o sometidas a un proceso de transformación (SAGARPA, 2001). Los desperdicios utilizados para alimentar a los cerdos tienen que ser tratados con calor (100°C por 2 horas), esto también esta regulado en el Decreto de Protección de Salud Porcina (SHPA) de 1980, para reducir el riesgo de entrada de enfermedades, así como la eliminación de cualquier tipo de microorganismo, ya que existen también otros microorganismos de preocupación pública que pueden

estar presentes en cualquier tipo de desperdicios de comida como *Salmonella* (USDA, 2009). Por esta razón, es considerado un factor de riesgo.

El número de cerdos comprados, es considerado un factor de riesgo importante, porque la probabilidad de comprar un animal infectado se incrementa con el número de animales comprados. Rosendal y Mitchell reportaron un OR de 10.87 para los compradores en comparación con aquellos que no compran. Por tanto, un efecto protector se identificó para las UP cerradas, cuarentenar al nuevo ganado y la compra de ganado sano con un OR=0.4, 0.8 y 0.7, respectivamente (Stärk, 2000). Otro estudio mostró que cerdos de UP donde no se importa o compran animales tuvieron un efecto protector (OR=0.33) (Suriya *et al.*, 2008). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, en la región del Bajío mexicano, este factor también se observó como un factor protector en los animales que nacen dentro de las UP respecto a la exposición al subtipo H3N2, coincidiendo con lo anteriormente reportado.

Otros de los factores de riesgo que se encontraron significativos, fueron los involucrados en la exposición al subtipo H1N1 pandémico (OR>1; P<0.05), encontrándose la etapa de destete, la presencia de humedales, la producción de ciclo completo y la población porcina muestreada del estado de Querétaro se encontró como una población en riesgo.

La etapa de destete, es una de las más susceptibles para los cerdos puesto que implica mucho estrés, ya que son separados de su madre y trasladados a nuevas instalaciones, donde al ser reagrupados con cerdos de otras camadas deben comenzar a jerarquizar, es decir, a buscar dominancia entre los cerdos del grupo por el alimento, agua y espacio; todo este estrés los hace susceptibles a infecciones respiratorias y digestivas. Por esta razón fue considerado como un posible factor de riesgo, el cual fue significativo para este estudio. Otros autores han demostrado como puede estar implicado este estrés en el estado de salud de los cerdos, por ejemplo, Hessing *et al.*, (1994) demostraron la asociación entre el

estatus social del cerdo y su respuesta inmune, en donde los cerdos dominantes presentaron valores significativamente altos en la proliferación de linfocitos, a diferencia del resto de los cerdos en la piara. Otros han demostrado que la reagrupación de cerdos después del destete es un agudo estresor (Blecha, 1985).

La presencia de humedales o cuerpos de agua, es un factor de riesgo que se encontró significativo en este estudio y puede estar ligado a la convivencia con otras especies animales y/o características de sobrevivencia del virus en ellos. Esta convivencia con otras especies es algo común en unidades de producción de cualquier especie, que es conocida como fauna nociva, en donde se incluyen perros, gatos, caballos, pájaros, ratas y ratones. Para el H3N2, encontraron significativos otros factores, además de la importación/compra de animales y la presencia de mascotas, fueron la disposición de animales muertos y la distancia de las UP con respecto a otras (Suriya et al., 2008).

Las aves son la especie que puede encontrarse casi siempre en todas las UP, atraídos por el alimento de los animales, cuya base es de granos como el sorgo y la soya. Debido a que los virus de influenza aviar son depositados a través de las rutas de migración de las aves, diversos mamíferos pueden infectarse por el contacto directo con las deyecciones aviares depositadas en sus trayectos migratorios, especialmente en fuentes hídricas como lagos, humedales, pantanales, entre otros, también por el consumo directo de aves o huevos infectados por depredadores naturales (Osorio *et al.*, 2009). También pueden verse contaminados los comederos o las mismas bodegas de almacén del alimento (Silos).

En este estudio, en todas las UP que se muestrearon se observó la presencia de fauna nociva, inclusive dentro de algunas UP se encontraban produciendo pollo de engorda y/o gallina de postura, haciendo la convivencia directa y el manejo de ambas especies era realizado por una misma persona. Este factor ha sido determinado por otros autores como la cría de especies aviares dentro de la UP, la

cual fue significativa, así como la presencia de mascotas (perros y gatos) dentro de las UP. Se ha documentado que los felinos son susceptibles a la infección de otros tipos de virus de influenza (Poland et al., 2007) y así como los cerdos tienen la capacidad de ser infectados por virus de tipo aviar y de mamíferos, la presencia de otros mamíferos como mascotas, especialmente los gatos, en las UP deben ser evitados (Suriya et al., 2008).

También UP de otras especies como bovinos, caprinos y ovinos se observaron por la cercanía con los cuerpos de agua, los cuales proveen a las UP más cercanas a este. Los pájaros son una especie difícil de erradicar de una UP y son considerados como plagas, ya que buscan la forma de entrar a los silos y a las naves donde se encuentran los cerdos para llegar a los comederos. Generalmente se observan nidos dentro de las mismas naves y es por esta razón que deben barrerse y limpiarse diariamente las instalaciones, eliminar todos los nidos encontrados y colocar mallas pajareras (de protección) en todos los espacios que sirvan para ventilación de las naves, así como de comederos y los propios cuerpos de agua que se encuentren expuestos, los comederos deben tener cubiertas también. Se sabe por ejemplo que después de ser excretados los virus de influenza aviar a través de sus deyecciones, pueden permanecer viables en fuentes de agua dulce, sedimentos y excretas húmedas por períodos prolongados de tiempo. En términos generales estos virus pueden sobrevivir un rango de cuatro hasta más de 30 días en temperaturas que oscilan entre 37 °C y 0 °C y su persistencia es inversamente proporcional al pH, temperatura y salinidad del medio acuoso. (Osores *et al.*, 2009).

En el estado de Querétaro se encontró que la población porcina puede estar en riesgo de exposición del virus pandémico, ya que en este estado se presentó la frecuencia serológica más alta a este subtipo, lo cual puede relacionarse a los altos índices de casos registrados en la población humana en 2009, además de que este virus se convertirá en endémico, se debe dar continuidad a las estrategias desarrolladas para el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica de

la enfermedad (Romero-Marquez y Zepeda, 2010). De acuerdo con el INEGI en 2012 consideró que el estado de Querétaro contribuyó con el 4.5% en la producción nacional de carne en el 2011, por tanto juega un papel relevante en la producción porcina en México.

Otros de los factores de riesgo que se encontraron involucrados con la presencia de la enfermedad por el virus de influenza A ($OR > 1$; $P < 0.05$), fueron la cría de cerdos del personal que labora en UP porcina y la población porcina del estado de Guanajuato.

La cría propia de porcinos del personal de las UP o aquellos que se dediquen a atender cerdos en una comunidad, se encontró como un factor de riesgo significativo. Este factor representa una constante exposición y posible diseminación del virus por fómites de un lugar a otro. Y es por esta razón que esta práctica debe evitarse y es considerada como una medida de bioseguridad importante en el manual de buenas prácticas de la producción porcina de muchos países como Costa Rica, Colombia, Argentina, entre otros, incluyendo México (SENASICA, 2004). Desafortunadamente es una práctica difícil de erradicar, por razones de tipo socioeconómico, como la pérdida de fuentes de empleo, migración poblacional, crisis en el sector agropecuario, entre muchas otras cosas. Esta práctica favorece la producción de traspatio, en donde muchos de los productores de traspatio también es personal que trabaja en UP porcina.

La población porcina que se muestreo en el estado de Guanajuato para este estudio, resulto presentar mayor riesgo de presentar la enfermedad. Esto puede estar ligado a que en 2012, el INEGI reportó que el estado de Guanajuato contribuyó con un 7.4% en la producción nacional de carne en el 2011. Es uno de los estados con mayor aporte junto con Jalisco con un 16.9%, el Estado de México con 14.9% y Michoacán de Ocampo con 6.4%, debido principalmente a la alta densidad de población porcina que presentan, lo que favorece movilización y

compra-venta de animales en pie y con ello el incremento de la probabilidad de propagación del virus en las UP establecidas en esta entidad.

Otros factores de riesgo que no fueron tomados en cuenta para ser analizados en este estudio pero que también son de gran importancia y que se encuentran involucrados en la introducción y transmisión del virus de influenza dentro de una UP son: el número de animales en la etapa de engorda-finalización, control del estatus sanitario de las cerdas de reemplazo, el número de animales de reciente adquisición de cualquier etapa, entre otros, son factores que ayudan a mantener una infección persistente dentro de la unidad de producción. Varios estudios han identificado la densidad o el número de cerdos como un factor de riesgo significativo. Se ha reportado que las instalaciones del área de engorda-finalización presenta 0.11 veces más probabilidades de ser positivo al virus de influenza porcina así como granjas con múltiples grupos de edad. El tipo de sitio de producción es considerado un factor de protección para la positividad del virus de influenza porcina, disminuyendo las probabilidades de un 15% de las instalaciones de finalización que operan en un flujo continuo, por lo tanto, el flujo fue un factor importante para mantener un estado negativo en los corrales de finalización. Otro factor protector reportado fue el uso de la cama de paja. Los vientos positivos incrementan el riesgo de positividad del grupo de animales de engorda, sin embargo el manejo puede reducir el riesgo de transmisión de los vientos a los animales de engorda (Poljak *et al.*, 2008; Mastin *et al.*, 2011; Simon-Grife *et al.*, 2011).

La distancia de las UP porcina con otras posiblemente infectadas, el tamaño y la densidad animal, son factores que en otros estudios han sido usados exitosamente para calcular los índices de riesgo para predecir el riesgo de re-infección para una UP en particular. Alaund *et al.*, reportaron con un OR=1.55 la ventilación nula de las UP y Flesja *et al.*, observaron que un recambio de aire mayor a 60m³ por hora por cerdo, tiene un efecto protector contra las neumonías (Stärk, 2000).

La temperatura y la humedad son variables que están relacionadas con el desarrollo de estas enfermedades. Un estudio encontró que el polvo, amoníaco, dióxido de carbono y microorganismos están correlacionados con la ocurrencia de neumonías y pleuresias en rastros de cerdos. Otros factores de manejo influyen en la concentración de partículas infectantes en el ambiente como la densidad animal, la ventilación, uso de camas de paja, disposición de heces y sistema de alimentación. Maes *et al.*, (1997) encontraron que durante el período de invierno, alta densidad animal regional y piaras grandes, constituyen importantes factores de riesgo para diseminación de patógenos respiratorios. En países como Malasia, también se han hecho estudios de factores de riesgo, en donde identifican que cerdos provenientes de UP grandes (>5000 animales) presentan un mayor riesgo, significativamente a la infección con el subtipo H1N1, en comparación con cerdos de UP más pequeñas (Suriya *et al.*, 2008).

En las UP muestreadas para este estudio se observó con frecuencia hacinamiento en los corrales de engorda-finalización principalmente. Durante el ciclo productivo aumenta continuamente la presencia de gérmenes en los alojamientos, que se pueden ver favorecidos por una alta acumulación de animales en espacios reducidos y al estar en un ambiente confinado, con nula ventilación, hace que los animales tengan una constante exposición a diversos contaminantes como bacterias (de heces), amoníaco (de orina), polvo (partículas pequeñas de dimensiones variables que proceden del suelo, alimentos seco, cama, heces), entre otros.

Los cerdos al estar constantemente expuestos a estos contaminantes utilizan una gran cantidad de energía para contrarrestar el daño respiratorio que puede llegar a generarse y desarrollan el síndrome de la estimulación crónica del sistema inmune. Este síndrome se manifiesta con el retraso en el crecimiento de los cerdos, mayor deposición de grasa y consumo de alimento, menor formación de músculo, lo que provoca grupos de animales de pesos desparejos. Esta es una

enfermedad común cuando hay malas condiciones higiénicas y de manejo en las unidades de producción (Morilla, 2012).

Entre más especializada es una unidad de producción, tendrá mayor demanda de medidas de higiene. Y es por esto que algunos estudios han demostrado que con limpieza y desinfecciones regulares pueden lograrse incrementos de las ganancias diarias de peso hasta del 17% en la etapa de engorda-finalización del ciclo productivo de los cerdos, así como una disminución de la mortalidad en torno al 1.5%. Se puede aumentar el número de lechones por cerda alrededor de 13. Aún cuando este efecto positivo depende de muchos factores, vale la pena llevarlo a cabo correctamente teniendo en cuenta a la vez un criterio consecuente en el manejo de costos y mano de obra (Strauch et al., 2003).

Si se tiene un buen programa de salud de la piara, este puede disminuir el número de animales enfermos, y al tener una piara sana, esta presentará un mejor comportamiento productivo. Un buen programa de salud va a permitir reducir también la incidencia de enfermedades y el costo por tratamientos. Las prácticas recomendadas para mejorar la salud del hato incluyen: un ambiente limpio y confortable, un programa adecuado de nutrición, manejo adecuado de vacunas y contar con un programa de vacunación y desparasitación, control de los registros de tratamientos y verificación de los tiempos de retiro de los productos usados en las Buenas Prácticas Pecuarias de Salud. Un buen programa de bioseguridad ayuda a disminuir los riesgos de transferir patógenos de una granja a otra (SENASICA, 2004).

Actualmente, en el manejo y control de la influenza en las UP tecnificadas que se muestrearon en los municipios de Degollado, en Guadalajara y La Piedad, en Michoacan, es a través de la vacunación con vacunas inactivadas bivalentes, que contiene los subtipos H1N1 y H3N2 y un adyuvante. El calendario de vacunación que siguen es: se aplican dos veces con un intervalo de 2 semanas. Las hembras gestantes se vacunan entre 2 y 3 semanas antes del parto para la consecuente

protección de los lechones. Las hembras de reemplazo y/o primerizas son vacunadas 2 veces la primera vez y posteriormente se vacunan una sola vez. En la línea de producción se puede vacunar a los animales mayores de 8 semanas de edad seguida por vacunaciones de refuerzo con un intervalo de 3 semanas entre cada una y la vacunación antes de la temporada de invernada. Estas vacunas ofrecen una reducción en la presentación de los signos clínicos de la enfermedad y la eliminación viral. Varios estudios han reportado estas vacunas comerciales inactivadas ofrecen una protección parcial. Existe una amplia variedad de laboratorios que ofrecen estas vacunas, tanto inactivadas como de virus muerto.

Se han contabilizado más de 220 prácticas estratégicas que se deben implementar en una UP para que tenga una buena protección, reduzca su contaminación interna, no contamine el medio ambiente y tenga buenas relaciones con los vecinos. Es prácticamente imposible implementar todas estas acciones por lo laborioso y el elevado costo, sin embargo existe el concepto 20:80 en el cual controlando el 20% de las medidas se controla el 80% restante. Es por este motivo que se seleccionaron las 39 prácticas más importantes para cumplir con los objetivos de la bioseguridad, y cumpliéndolas se puede reducir la contaminación en la pira, sin contaminar el medio ambiente y llevar la política del buen vecino, para que el personal y los vehículos no contaminen la granja, para que los animales de reemplazo y el semen no introduzcan patógenos a las pira, el manejo de excretas y desechos sea correctamente procesado.

Es importante reconocer que la bioseguridad no se circunscribe sólo a una granja porcina y además garantiza la producción de animales sanos. A pesar de que se han hecho diversos estudios para evaluar el nivel de bioseguridad en las granjas, se necesita que las medidas que se implementen sean regionales, para que una pira no contamine a otra.

Cuando se reduce la contaminación en la UP y en la pira se obtienen diversos beneficios como son de tipo comercial ya que se pueden comercializar libremente

los animales, el semen, sus productos y subproductos ya que no representan un riesgo para los humanos o para otras UP. Debido a que se reduce la contaminación. Estas medidas representan un recurso más barato y efectivo para el control de las enfermedades, que reducen los gastos que se generan por medicación, vacunación y manejo y controla el síndrome de la estimulación crónica del sistema inmune, debido a que los cerdos criados en un ambiente limpio donde hay una baja exposición a gérmenes, partículas, polvos, sustancias tóxicas, etc., tienen poco activado el sistema inmune y la energía ahorrada la utilizan para ganar más peso. Si se mejora la producción, la genética de los animales y la nutrición se expresan adecuadamente y se aumenta el porcentaje de cerdos de primera a la venta. Por lo tanto los cerdos y sus productos y subproductos van a tener un valor agregado.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, en este estudio se observó mayor distribución del subtipo H1N1 en los estados muestreados con respecto del subtipo H3N2, indicando una circulación viral activa en el Bajío mexicano, tanto en los animales destinados al abasto como en el pie de cría.

El aislamiento A/Cerdo/México/Gto_Sal_1/2011 (H1N1) es de origen porcino ya que no se encontró relación con secuencias humanas, ni aviares. Dicho aislamiento mostró alta homología con otros de diferentes regiones de México, esto puede ser debido principalmente a la movilización de animales por la compra-venta de pie de cría entre productores nacionales principalmente.

Los factores de riesgo que se encontraron significativos en el control de la transmisión y distribución del virus de influenza porcina en la región del Bajío mexicano, fueron: la etapa de pie de cría y destete; los sementales; la presencia de animales enfermos; la producción de ciclo completo con la entrada de animales por acopio para engorda; las UP que se encuentran a pie de carretera; la alimentación con escamocha; la presencia de humedales y la cría de cerdos del personal que labora en UP porcina.

Además, las poblaciones porcinas de los estados de Querétaro y Guanajuato presentaron mayor riesgo de exposición al subtipo H1N1/2009 y a la presentación de la enfermedad, respectivamente.

Es importante incrementar el monitoreo serológico para los subtipos de influenza circulantes en las unidades de producción porcina, pues una detección y confirmación diagnóstica de casos son fundamentales para asegurar un tratamiento adecuado y oportuno que se vea reflejado en la contención de la enfermedad evitando su propagación.

Por lo tanto, se debe considerar que los brotes de enfermedad en los animales son el resultado de la acumulación de fallas en la bioseguridad, por tanto, la

corrección de las medidas de bioseguridad y manejo de las UP pueden reducir en gran medida la transmisión de los virus de influenza.

8. REFERENCIAS

Ayora-Talavera G. Influenza: Historia de una enfermedad. *Rev Biomed* 1999; 10: 57-61.

Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 2007; 25: 5637-5644.

Anderson M, Nelson A. Enfoque en epidemiología de campo. North Carolina Center for Public Health Preparedness-The North Carolina Institute for Public Health. Vol. 3 Núm. 6. Acceso: http://cphp.sph.unc.edu/focus/vol3/issue6/3-6DataTests_espanol.pdf

Arbeláez G, Calderón D, Rincón M, Lora A, Mercado M. Implementación de dos tecnologías diagnósticas para la determinación del virus de la influenza. *Universitas Scientiarum*, 2008; 13 (1), 65-74.

Avalos GP, Mendoza ES, Macías M, Trujillo OME, Sánchez BJI. Seroprevalencia del virus de influenza porcina en el Bajío de la república Mexicana. *Memorias del XLIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Morelia, Mich., México. 2008; 170.

Barry JM, Viboud C, Simonsen L. Cross-protection between successive waves of the 1918–1919 influenza pandemic: epidemiological evidence from US Army camps and from Britain. *J Infect*. 2008; 198 (10): 1427–1434.

Beltrán FR, Sánchez BJI, Herradora LMA, Martínez RR, Trujillo OME. Monitoreo del virus de influenza porcina en una granja de ciclo completo mediante el uso de las técnicas de IH y PCR múltiple. *Memorias del XLIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Morelia, Mich., México. 2008; 228.

Blasckovic D, Jamrichova O, Rathova V, Kociskova D, Kaplan MM. Experimental infection of weanling pigs with A/Swine influenza virus. *Bull. World Health Org*. 2000; 42: 767-770.

Blecha F, Pollmann DS, Nichols DA. Immunologic reactions of pigs regrouped at or near weaning. *Ame J Vet Res* 1985; 46:1934-1937.

Blok J, Air G, Laver W, Ward C, Lilley G, Woods E, Roxburgh C, Inglis A. Studies on the size, chemical composition, and partial sequence of the neuraminidase (NA) from type A influenza viruses show that the N-terminal region of the NA is not processed and serves to anchor the NA in the viral membrane. *Virology* 1982; 119: 109-121.

Brookes SM, Irvine RM, Nunez A, Clifford D, Essen S, Brown IH, Van Reeth K, Kuntz-Simon G, Loeffen W, Foni E, Larsen L, Matrosovich M, Bublot M, Maldonado J, Beer M, Cattoli G. Influenza A (H1N1) infection in pigs. *Vet Rec* 2009; 164: 760–761.

Brown I, Hill H, Harris PA, Alexander DJ. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-2. *Epidemiol. Infect.* 1995; 114: 511-520.

Brown IH, Done SH, Spencer YI, Cooley WA, Harris PA, Alexander DJ. Pathogenicity of swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strain. *Vet Rec* 1993; 132: 598-602.

Brown IH, Alexander DJ, Chakraverty P, Harris PA, Manvel RJ. Isolation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. *Vet Microbiol* 1994; 39: 125-134.

Cabello GC, Rosete ODP, Mnajarrez ZME. Efecto de una solución electrolizada de superoxidación cpn pH neutro sobre la infección del virus de infleunza A en células MDCK. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2009; 22 (4): 280-287.

Carrera V, Mercado C, Carreón R, Haro M, Salmeron F. Estudio serológico retrospectivo (2000-2009) de influenza porcina, subtipos H1N1 y H3N2 en el Distrito Fedral. *Memorias del XLV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Acapulco, Guerrrero, México. 2010; 77.

CDC. Summary for Centers for Disease Control and Prevention human influenza virus real-time RT-PCR detection and characterization panel. CDC 2008, Atlanta, GA. http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf8/k080570.pdf.

Chiapponi C, Fallacara F, Foni E. Subtyping of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses by two multiplex RT-PCR in: 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig diseases, Rome, Italy, 2003

Cheng P, Leung E, Ho E, Leung P, Ng A, Lai M, Lim W. Oseltamivir and Amantadine resistant Influenza Viruses A (H1N1). *Emerg Infect Dis* 2009; 15:966-968.

Corzo AC, Gramer M, Lauer D, Davies RP. Prevalence and risk factors H1N1 and H3N2 influenza A virus infections in Minnesota turkey premises. *Avian Dis* 2012; 56:488-493.

De Irala J, Fernandez-Crehuet R, et al. Intervalos de confianza en regresión logística: interpretación de resultados de programas estadísticos. *Rev. Panam. Salud Pública/Pan. Am. J. Public Health* 1997;1(3): 230-23.

Dea S, Bilodeau R, Sauvageau R, Montpetit C, Martineau GP. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 380-392.

Domínguez PL. Utilización de desperdicios procesados y otros subproductos industriales y de la pesca en la alimentación porcina en Cuba. En: Taller "Tratamiento y utilización de desechos de origen animal y otros desperdicios en la ganadería. FAO - Instituto de Investigaciones La Habana, Cuba. 1994: 53-69. Disponible en: <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGA/AGAP/FRG/APH134/cap11.htm>

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.* 2011; 17: 1624–1629.

Ducoin WA, Lecumberry LJ. El control de factores de confusión en estudios epidemiológicos. *Ciencia Veterinaria* 1998; 8: 29-50.

Ellis J, Iturriza M, Allen R, Bermingham A, Brown K, Gray J, Brown D. Evaluation of four real-time PCR assays for detection of influenza A (H1N1) virus. *Eurosurveillance*. 2009; 14 (22).

Flores MME, Vazquez L, Ramos CG. Glicobiología del virus de influenza A. *Rev Latinoam Microbiol*, 2007; 49 (3-4): 74-87.

Forgie SE, Keenliside 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.* 2011; 52: 10–18.

Gallardo NJL. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México 2006. SAGARPA 2006. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg>.

García GJRC. La influenza, un problema vigente en salud pública. *Salud Pública Mex.* 2006; 48, 244-267.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325 (5937):197-201.

Gaydos J, Top F, Hodder R, Russell P. Swine influenza a outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerg Infect Dis* 2006; 12 (1):23–28.

Gene E. H1N1 and H3N2 swine influenza: optimizing sample selection to confirm your diagnosis and control disease. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 2000; 311–312.

Gramer MR. Defining swine influenza virus. *J. Swine Health Prod.* 2005; 13 (3): 157-160.

Gray GC, Baker WS. Editorial commentary: the problem with pigs: it's not about bacon. *Clin Infect Dis* 2011; 52:19–22.

Ha Y, Stevens DJ, Skehel JI, Wiley DC. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptors analogs. *PNAS* 2001; 98: 11181-11186.

Heinen PP, Nieuwstadt AP, Pol Jma, Boer-Luijze EA, Oirschot JT, Bianchi ATJ. Systemic and mucosal isotype specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. *Viral Immunol.* 2000; 13: 237-247.

Hessing MJC, Scheepens CJM, Schouten WGP, Tielen MJM, Wiepkema PR. Social rank and disease susceptibility in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994; 43: 373–87.

Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Pérez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 2001; 146: 2275-2289.

Hofshagen M, Gjerset B, Er C, Tarpai A, Brun E, Dannevig B, Bruheim T, Fostad IG, Iversen B, Hungnes O, Lium B. Pandemic influenza A (H1N1)v: human to pig transmission in Norway?. *Eurosurveill.* 2009; 14: 19406.

Howden KJ, Brockhoff EJ, Caya FD, McLeod LJ, Lavoie M, Ing JD, Bystrom JM, Alexandersen S, Pasick JM, Berhane Y, Morrison ME, Keenlside JM, Laurendeau S, Rohonczy EB. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. *Can Vet J* 2009; 50: 1153–1161.

INEGI. Estadística de sacrificio de ganado en rastros municipales por entidad federativa 2006-2011. Nota técnica. *Boletín de Prensa* 2012; 126/12: 14 pp. Disponible en: http://www.prospecta.org.mx/paises/comunica_inegi_ganado.pdf

Janke BH. Diagnosis of swine influenza. *Swine Health Prod J* 2000; 8 (2): 79-84.

Karasin AI, Olsen CW. H4N6 influenza virus isolated from pigs in Ontario. *Can Vet J* 2000; 41: 938-939.

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* 2004; 42: 4349-4354.

Kitikoon P, Sreta D, Na Ayudhya SN, Wongphatcharachai M, Lapkuntod J, Prakairungnamthip D, Bunpapong N, Suradhat S, Thanawongnuwech R, Amonsin A. Brief report: molecular characterization of a novel reassorted pandemic H1N1 2009 in Thai pigs. *Virus Genes* 2011; 43: 1–5.

Klenk H, Wagner R, Heuer D, Wolff T. Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Res* 2002; 82(1-2): 73-75.

Krug R, Yuan W, Noah D, Latham A. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: The roles of the viral NS1 protein. *Virology*. 2003; 309: 181–189

Kyriakis CS, Brown IH, Foni E, Kuntz-Simon G, Maldonado J, Madec F, Essen SC, Chiaponni 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* 2009.

Lade KS, Sawant SD, Singh MC. Review on influenza with special emphasis on swine flu. *Int J Curr Pharm Res* 2011; 3: 97-107.

Lange E, Kalthoff D, Blohm U, Teifke JP, Breithaupt A, Maresch C, Starick E, Fereidouni S, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Beer M, Vahlenkamp TW. Pathogenesis and transmission of the novel swine origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J. Gen Virol* 2009; 90: 2119–2123.

Lara-Puente J, Quezada-Monroy F, Echeveste-García De Alba R, Cortés-Fernández R, Castro-Peralta F, Sarfati-Mizrahi D, Soto-Priante D, Lozano-Dubernard B. Identificación de un nuevo subtipo de influenza porcina (H1N2) en México. *Memorias del XLVII Congreso*

de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Guadalajara, Jalisco 2012A; 172.

Lara-Puente J, Quezada-Monroy F, Echeveste-García De Alba R, Cortes-Fernández R, Sarfati-Mizrahi D, Soto-Priante D, Lozano-Dubernard B. Detección de anticuerpos por HI contra los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 de influenza porcina (2006-2012) en México. Memorias del XLVII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Guadalajara, Jalisco 2012B; 205.

Larsen DL, Karasin A, Zuckermann F, Olsen CW. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Vet. Microbiol.* 2000; 74: 117-131.

Lee CS, Kang BK, Lee DH, Lyou SH, Park BK, Ann SK, Jung K, Song DS. One step multiplex RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system. *Virology Methods* 2008; 151: 30-34.

Lekcharoensuk P, Lager KM, Vemulapalli R, Woodruff M, Vincent AL, Richt JA. Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 787-794.

López-Robles MG, Montalvo-Corral M, Ramírez-Mendoza H, Rivera-Benítez F, Espinoza-Villalva K, Hernández-López J. Epidemiología serológica y molecular de los subtipos H1N1 y H3N2 de influenza porcina en cerdos de Sonora. Memorias del XLIV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Puerto Vallarta, Jalisco. 2009; 213.

López S, Arias C. Influenza A: Biología, vacunas, y origen del virus pandémico A/H1N1. *Revista Digital Universitaria.* 2010; 11:1-14

Lynch J, Watson E. Influenza: Evolving strategies in treatment and prevention. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28, 144 - 158.

Ma W, Lager KM, Vincent AL, Janke BH, Gramer MR, Richt JA. The role of swine in the generation of novel influenza viruses. *Zoonoses Public Health* 2009; 56: 326–337.

Madec F, Gourreau C, Kaiser J, Aymard M. Appartion de manifestations grippales chez les porcs en association avec un virus A/H3N2. *Bull Acad Vet Fr* 1984; 57: 513-522.

Maes D. Risk indicators for the seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumonie* in slaughter pigs from farrow to finish pig herds. *Epidemiologie et Santé Animale* 1997; 31-32.

Malik PJS, Poon LLM, Guan Y. Emergence of a novel swine-origin Influenza A(H1N1) virus in humans. *J of Clinical Virology* 2009; 45: 169-173.

Mallinga MN, Simard G, Longtin D, Simard C. Single step multiplex conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for simultaneous detection and subtype differentiation of influenza A virus in swine. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22:402-408.

Manjarrez ZME, Arenas LG. Virus influenza: Enigma del pasado y del presente. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1999; 12: 290-299.

Manjarrez ZME, Cabello C, Rosete ODP. Capítulo 2. Biología del virus: familia Orthomixoviridae. In: Pérez PJR, Palomar LA, Salas HJ, Vázquez EJC. *Influenza por el nuevo virus A H1N1. Un Panorama Integral*. Ed. Graphimedica. México 2010: 26-41.

Manjarrez ZME, Rosete D, Higuera A, Ocádiz-Delgado R, Pérez- Padilla JR, Cabello C. Chapter 10. Start of a pandemic: Influenza A H1N1 Virus. In: Ghanei M. *Respiratory Diseases*. Ed. Intech. Croatia 2012: 217-242.

Mastin A, Alarcon P, Pfeiffer D, Wood J, Williamson S, Brown I, Consortium COSI, Wieland B. Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population. *PLoS Curr*. 2011; 3: RRN1209

Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9: 590–603.

Moreno A, Di Trani L, Alborali L, Vaccari G, Barbieri I, Falcone E, Sozzi E, Puzelli S, Ferri G, Cordioli P. First pandemic H1N1 outbreak from a pig farm in Italy. *Virology* 2010; 4: 52–56.

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.* 2011; 149, 472–477.

Morilla GA. Influenza Porcina. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. Edit. Manual Moderno. 2005; 215-219.

Morilla GA. Importancia de la Bioseguridad. 2012. Disponible en: http://www.porcicultura.com/uploads/temp/Articulo_Importancia_de_la_bioseguridad%2849%29.pdf

Munguía J, Rodríguez JC, Alzina A, Gutiérrrez E, Gómez P. Perfil serológico de influenza porcina (H3N2, H1N1) en dos granjas del estado de Yucatán, México. *Memorias del XLV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Acapulco, Guerrero, México. 2010; 79.

Nelson MI, Lemey P, Tan Y, Vincent A, Lam TT, Detmer S, Viboud C, Suchard MA, Rambaut A, Holmes EC, Gerner M. Spatial dynamics of human origin H1 influenza A virus in North American swine. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1002077.

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.* 2011; 85: 8667.

Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng H, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 2006; 439: 490-492.

Olsen CW, Brown IH, Easterday BC, Van Reeth K. Swine influenza. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Diseases of Swine, Blackwell Publishing, Ames, IA. 9th edn. 2006. pp. 469–482.

Organización mundial de la Salud (OIE). Swine Influenza. 2009. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/SWINE_INF_FINAL.pdf

Osores PF, Gómez BJ, Suárez OL, Cabezas SC, Alave RJ, Maguiña VC. Un nuevo virus A/H1N1, una nueva pandemia: Influenza un riesgo permanente para una humanidad globalizada. Acta Med Per 2009; 26: 97-130.

Palacios JM. Epidemiología de la influenza porcina. Mem. XLIII Congreso Nacional AMVEC - 2008. Morelia, Mich., Méx. Pp. 69-72.

PANAFTOSA-OPS/OMS. Diagnóstico de virus de Influenza en mamíferos y aves. Rio de Janeiro 2010.

Pasma T, Joseph T. Pandemic (H1N1) 2009 infection in swine herds, Manitoba, Canada. Emerg. Infect. Dis. 2010; 16: 706–708.

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 2010; 16: 304–307.

Pérez C, Mercado C, Trujillo M, Sánchez J. Determinación de la seroprevalencia e identificación por RT-PCR de los subtipos virales de influenza porcina en cerdos de traspatio de la comunidad de La Gloria, Veracruz. Memorias del XLV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Acapulco, Guerrero, México. 2010; 80.

Plonait H, Bickhardt K. Manual de las enfermedades del cerdo. España: Editorial Acribia S. A., 2001.

Polo GJA. Aspectos moleculares del virus de la influenza A subtipo H1N1. Rev Med Vallejana. 2009; 6 (1): 47-54.

Poland GA, Jacobson RM, Targonoski PV. Avian and pandemic influenza: an overview. Vaccine 2007; 25: 3057-3061.

Poljak Z, Dewey CE, Martin W, Christensen J, Carman S, Friendship RM. Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. Can J Vet Res 2008; 72: 7– 17.

Rabadan R, Robins H. Evolution of the Influenza A Virus: Some New Advances. Evolutionary Bioinformatics Online 2007: 299-307.

Richt JA, Lager KM, Janke BH, Woods RD, Webster RG, Webby RJ. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. J Clin Microbiol 2003; 41: 3198-3205.

Romero-Márquez R, Romero-Zepeda H. Perfil epidemiológico de la influenza A H1N1 en Querétaro. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2010; 48: 377-382.

Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. Virology. 2011; 411: 229– 236.

Saavedra MJM, Carrera AVM, Osas EK, Camarillo PE, Rivera BF, Mercado GMC, Carreón NR, Haro TME, Castillo JH, Rosete DP, Cabello C, Manjarrez ME, Sánchez BJI, Ramírez MH. Estudio serológico retrospectivo contra virus de influenza en cerdos de traspatio de la Ciudad de México. Memorias del XLVII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Guadalajara, Jalisco 2012; 206.

SAGARPA. Norma Oficial Mexicana NOM-06'-ZOO-1999. Especificaciones zoonosológicas para la transformación de despojos animales y su empleo en la alimentación animal. Diario Oficial 2001; (Primera Sección): 15-26

Sánchez MDM, Carreón NR, Palacios AJM. Comparación de dos métodos diagnósticos para la detección del virus de influenza porcina. *Vet. Mex.*, 2010; 41 (1): 45-58.

Sánchez-Betancourt JI, Gutiérrez DR, Macías M, Avalos GP, Trujillo OME, Segalés J, Ramírez MH. Comparación serológica de anticuerpos frente a PCV2 e influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2, en cerdos del Bajío Mexicano. *Memorias del XLIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Morelia, Michoacán 2008; 219.

Sánchez-Betancourt Ji, Avalos GP, López-Charretón S, Arias C, Trigo TF, Beltrán Fr, Harte BP, Juárez DG, Mercado GMC, Carreón NR, Trujillo OME. Actualización en influenza porcina. *Memorias del XLVII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Guadalajara, Jalisco 2012; 51.

Schnitzler SU, Schnitzler P. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. *Virus Genes* 2009; 39: 279–292.

SENASICA. Manual de buenas prácticas de producción en granjas porcícolas. Confederación de Porcicultores Mexicanos, A. C. 2004; 85 pp.

Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu X, Lindstrom S, Gubareva LV, Deyde V, Garten RJ, Harris M, Gerber S, Vagasky S, Smith F, Pascoe N, Martin K, Dufficy D, Ritger K, Conover C, Quinlisk P, Klimov A, Bresee JS, Finelli L. Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1) in Humans in the United States, 2005–2009. *N Engl J Med* 2009; 360:2616-2625

Shope RE. The etiology of swine influenza. *Science* 1931; 20: 214-215.

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

Slomka MJ, Densham AL, Coward VJ, Essen S, Brookes SM, Irvine RM, Spackman E, Ridgeon J, Gardner R, Hanna A, Suarez DL, Brown IH. Real time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 Influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs. *Influenza other respi. Viruses* 2010; 4: 277-293.

Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Guan Y, Rambaut A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009; 459: 1122-1125.

Song MS, Lee JH, Pascua PN, Baek YH, Kwon HI, Park KJ, Choi HW, Shin YK, Song JY, Kim CJ, Choi YK. Evidence of human-to-swine transmission of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in South Korea. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3204–3211.

Spackman E, Senne AD, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3256-3260.

Sreta D, Tantawet S, Ayudhya NNa, Thontiravong A, Wongphatcharachai M, Lapkuntod J, Bunpapong N, Tuanudom R, Suradhat S, Vimolket L, Poovorawan Y, Thanawongnuwech R, Amonsin A, Kitikoon P. Pandemic (H1N1) 2009 virus on commercial swine farm, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1587–1590.

Starick E, Lange E, Fereidouni S, Bunzenthall C, Hoveler R, Kuczka A, Grosse Beilage E, Hamann HP, Klingelhofer I, Steinhauer D, Vahlenkamp T, Beer M, Harder T. Reassorted pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus discovered from pigs in Germany. *J. Gen. Virol.* 2011; 92: 1184–1188.

Stärk DCK. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine-A literature review. *Vet J* 2000; 159: 37-56.

Stephano A. Situación de la porcicultura Mexicana. Ponencia XLVII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Guadalajara, Jalisco 2012.

Strauch D; Bohm R. Limpieza y desinfección de alojamientos e industrias animales. Zaragoza, España. Ed. Acribia. 2003

Straw B, D'allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Enfermedades del cerdo. 8ª ed. Buenos Aires: Ed. Intermédica, 2000.

Suriya R, Hssan L, Omar AR, Aini I, Tan CG, Lim YS, Kamaruddin MI. Seroprevalence and risk factors for influenza A viruses in pigs in Peninsular Malaysia. *Zoonoses Public Health* 2008; 55: 342-351.

Swenson LS, Vincent LL, Lute BM, Janke BH, Lechtenberg FK, Landgraf JG, Schmitt BJ, Kinker DR, Mcmillen JK. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 36-42.

Talledo M, Zumaeta K. Los virus de Influenza y la nueva pandemia A/H1N1. *Rev Peru Biol* 2009; 16: 227-238.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Steker G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011

Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature.* 2005; 437: 889–893.

Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 2010; 7: 440–451.

Thacker E, Janke B. Swine influenza virus: zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenzas. *J Infect Dis* 2008; 197: S19-S24.

Thrusfield M. Demonstrating association. *Veterinary Epidemiology*. Ed. Butterworth Heinemann. Londres 1991. Pág. 141

Tong S, Li Y, Rivaller P, Conrardy C, Alvarez Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS* 2012; 109: 4269-4274.

Torremorell M, Allerson M, Corzo C, Díaz A, Gramer M. Transmission of Influenza A Virus in Pigs. *Transboundary and Emerging Diseases* 2012; 59: 1–17.

Trujillo OME, Carreón NR, Mercado GC, Quezada MF. Determinación de anticuerpos contra el virus de Influenza H1N1 y H3N2 en sueros porcinos. *Memorias del XXXIX Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Mazatlán Sinaloa, México. 2004; 181.

USDA. Rules and regulations. *Federal Register* 2009; 74: 15215-15218.

Van der Meer FJUM, Orsel K, Barkema HW. The new influenza A H1N1 virus: Balancing on the interface of humans and animals. *Can Vet J* 2010; 51: 56-52.

Van Reeth K. Swine Influenza: variations on an old theme. *The European Surveillance Network for Influenza in pigs*, [serial online] 2007.

Vijaykrishna D, Poon LL, Zhu HC, Ma SK, Li OT, Cheung CL, Smith GJ, Peiris JS, Guan Y. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science* 2010; 328: 1529.

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* 2011, 473: 519–522.

Vincent AL, et al. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2010; 4: 53–60.

Vincent A, Awada L, Brown I, Chen H, Claes F, Dauphin G, Donis R, Culhane M, Hamilton K, Lewis N, Mumford E, Nguyen T, Parchariyanon S, Pasick J, Pavade G, Pereda A, Peiris M, Saito T, Swenson S, Van Reeth K, Webby R, Wong F, Ciacci-Zanella J. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health* 2013: 1-14.

Webby R, 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.* 2004; 103:67–73.

Webster R, Bean W, Gorman O, Chambers T, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992; 56: 152-179.

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.* 2010; 166: 642–645.

Wise HM, Foeglein AG, 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* 2009; 83: 8021-8031.

Wisener L, Sargeant JM. Swine Surveillance for Public Health Planning. National Collaborating Centre for Infectious Diseases, 2013.

World Health Organization (WHO). CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). 30 April 2009.

Yoon K, Janke BH, Swalla RW, Erickson G. Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutinin inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 197-201.

Young KC, Goyal SM, Joo HS. Evaluation of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for subtyping hemagglutinin genes 1 and 3 of swine influenza type A virus in clinical samples. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14: 62-65.

Zimmerman JJ, Jin-Yoon K, Morilla A. *Enfermedades víricas emergentes del Cerdo*. Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias, 2004.

Zhang Y, Liu Q, Wang D, Chen S, Wang S. Simultaneous detection of oseltamivir- and amantadine-resistant influenza by oligonucleotide microarray visualization. *Plos One* 2013; 8: e57154.

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

Zhu H, Zhou B, Fan X, Lam TT, Wang J, Che A, Chen X, Chen H, Webster RG, Webby R, Peiris JS, Smith DK, Guan Y. Novel reassortment of Eurasian avian-like and pandemic/2009 influenza viruses in swine: infectious potential to humans. *J. Virol.* 2011; 85: 10432–10439.

9. ANEXOS

9.1 Cuestionario de producción y salud porcina

Fecha _____ Encuestador _____ Folio _____

Nombre de propietario: _____

Dirección: _____

Población donde se ubica: _____

Municipio o Delegación: _____

Estado: _____

1.- ¿Qué tipo de productor es usted?

- Es criador y engordador Solo es engordador
 Es acopiador, compra y revende a rastro Mezcla

2.- ¿Donde tiene usted los cerdos?

- En un chiquero en la casa En una granjita aparte
 En un terreno cerca de la casa.

3.- ¿Donde se ubica la granja o el terreno? _____

4.- Al día de hoy cuantos cerdos tiene? _____

5.- ¿Tiene cerdos que aún maman? Si Cuantos _____ No

6.- ¿Tiene cerdos en engorda? Si Cuantos _____ No

7.- ¿Tiene cerdas reproductoras? Si Cuantos _____ No

8.- ¿Tiene sementales? Si Cuantos _____ No

9.- ¿Quien atiende o cuida a estos cerdos?

- Usted, su esposa o hijos Trabajador Ambos

10.- ¿Contra qué vacunan?

- a) Aujeszky b) PRRS c) Influenza d) Otras _____

11.- ¿Las personas que le ayudan con sus cerdos, también tienen cerdos en su casa?

- Si No No sabe

12.- ¿Tiene usted familiares que también se dedican a la cría, engorda o compraventa de cerdos?

- Si No No sabe

13.- De hace una semana al día de hoy, ¿ha tenido entre sus cerdos alguno que se vea enfermo, que muestre fiebre, estornudos, que tienen moco, con lagañas o que dura enfermo menos de una semana?

- Si No No recuerda

14.- De hace un mes al día de hoy, ¿ha tenido entre sus cerdos alguno que se vea enfermo, con fiebre, estornudos, tos, con moco, con lagañas y que dura enfermo menos de una semana?

- Si No No recuerda

15.- Si enfermaron sus cerdos así, ¿cuánto tiempo duraron enfermos? _____

16.- Los cerdos han presentado algún otro signo de enfermedad: fiebre, diarrea, pérdida de peso, etc?

- No Si, que signos: _____

17.- ¿Usted, alguien de su familia o quien le ayuda a cuidar los cerdos enfermaron de catarro, o enfermedad respiratoria casi al mismo tiempo que sus cerdos?

- Si No No recuerda

18.- Tiene parientes que trabajen o tengan cerdos que hayan tenido gripa al mismo tiempo que los cerdos?
() Si () No () No sabe

19.- ¿Usted o alguien de su familia ¿han viajado a algún otro estado del país?
() Si () No

20.- Si alguno de ustedes viajo ¿regresaron enfermos de gripa o enfermaron de gripa o algo parecido a los pocos días?
() Si () No

Le agradecemos su cooperación, la información que nos proporcionó será utilizada en beneficio de la producción porcina.

21.- ¿Qué tipo de alimento utiliza?
a) Comercial b) Propio c) Ambos d) Otro_____

22.- ¿Utiliza escamocha para alimentar a sus cerdos?
() Si () No

23.- ¿Utiliza mortalidad de aves para alimentar a sus cerdos?
() Si () No

24.- ¿Qué tipo de agua utiliza para dar de beber a sus cerdos?
() Potable () Pozo () Rio Otros: _____

Preguntas para el encuestador de acuerdo a lo observado en esta explotación:

22.- Esta explotación, ¿tiene barda perimetral?
() Si () No

23.- ¿Observó si usan tapetes sanitarios o algo similar para desinfección del calzado?
() Si () No

24.- ¿A esta explotación puede entrar cualquier persona o penetrar desde terrenos o casa aledañas?
() Si () No

25.- ¿En esta explotación usan ropa de trabajo específica para la actividad?
() Si () No

26.- ¿En esta explotación les solicitaron que usaran algún medio de desinfección?
() Si () No

27.- De acuerdo a lo que usted observó en esta explotación, ¿de qué tipo es la explotación?
() Tecnificada () Semitecnificada () Traspatio (chiquero).

28.- La convivencia de las personas que atienden a los cerdos, ¿es muy cercana, esto es, entran a los corrales, les dan de comer en cubetas, etc.?
() Si () No

29.- Las personas que atienden a los cerdos observan medidas de higiene como lavarse las manos continuamente?
() Si () No

30.- ¿Hay granjas de aves cerca?
() Si () No

31.- ¿Hay humedales cerca de la granja?
() Si () No

32.- ¿Está cerca de la carretera?
a) Pie de carretera b) 1 km c) A qué distancia_____

Propietario: _____

Ubicación: _____

Nota: E 1 significa o es igual a Explotación número (progresivo)

M1 es igual o significa número de cerdo o identificación para el muestreo (progresivo)

Ejemplo

Identificación	Sexo	Raza	Vacunado contra influenza		Edad (meses)	Tipo de animal				Origen		Muestra tomada	
			Si	No		Vientre	Semental	Engorda	Destete	Propio	Comprado	Hisopo	Sangre
E1-M1	Macho	Criollo		XXXX	24		XXXX			XXXX		XXX	XXX

9.2 Claves de factores de riesgo

Etapa de prod:	Respecto a la etapa de producción.
Origen:	Si los animales son propios de las UP o si son comprados.
Barda:	Respecto a la presencia de una barda perimetral.
Agua:	Respecto al tipo de agua que se utiliza para dar de beber a sus cerdos.
Cerdos:	Con respecto a las personas que ayudan en las UP también tienen cerdos en su casa.
Desinfección:	Respecto al uso de algún tipo de desinfección en la UP.
Tapetes:	Respecto al uso de tapetes sanitarios para calzado.
Enfermo:	Con respecto a si el productor reportó haber tenido entre sus cerdos alguno que se veía enfermo, mostrando fiebre, estornudos, moco con lagañas o que hubiese estado enfermo menos de una semana.
Escamocha:	Respecto a si utilizan escamocha para la alimentación.
Tipo de UP:	Respecto al tipo de Unidad de Producción.
Tipo de productor:	Respecto al tipo de productor.
Humedales:	Respecto a si hay humedales cerca de la UP.
Mortalidad de Aves:	Respecto a si se utiliza mortalidad de aves para la alimentación de los cerdos.
Personal enfermo:	Respecto a si el personal que atiende a los cerdos enfermaron de catarro al mismo tiempo que los cerdos.
Ropa de trabajo:	Respecto al uso de ropa de trabajo específica.
Personal ajeno:	Respecto a si a la UP puede entrar cualquier persona ajena.
UP de aves:	Respecto a si hay granjas de aves cerca de la UP de cerdos.
Carretera:	Respecto a si la UP esta cerca de la carretera.