



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA
EN PERROS**

TESIS

Que para optar por el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

LUIS ALFONSO RAMÍREZ MARTÍNEZ

TUTOR

Dr. HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dr. JESÚS HERNÁNDEZ LÓPEZ
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

Dr. ARMANDO PÉREZ TORRES
Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO D.F. DICIEMBRE 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

Dedico esta tesis no solo a las personas que ayudaron a la realización de mis estudios, también a quienes han contribuido durante toda mi vida para ser hoy una mejor persona.

A mis padres, porque lo que tengo se los debo a ellos, y que me han dejado la mejor herencia de todas. A mi madre que me ha enseñado que no existen limitaciones y el valor del amor, a mi padre que me dio valores y es modelo a seguir.

A mis hermanos, porque siempre podré contar con ustedes.

A ti Mary, apoyo incondicional, motivo para superarme día con día, que pacientemente me acompañas en mis logros y tropiezos, mi razón para crecer.

A mi abuelo, pilar indispensable en mi formación académica y personal.

A Lola por permitirme estar a tu lado y ser una amistad incondicional y noble.

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada para la realización de mis estudios.
- A los proyectos que financiaron mi investigación: CONACYT SSA- 2009-C02-126709 y PAPIIT IN224611.
- Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para la presentación de mi trabajo en congresos.
- A mi tutor el doctor Humberto Ramírez Mendoza, por la oportunidad, la confianza, sus consejos y conocimientos, que me brindó para realizar mis estudios.
- A los miembros de mi comité tutorial; el doctor Armando Pérez Torres y el doctor Jesús Hernández López. Por el apoyo brindado durante el desarrollo de mi proyecto.
- A los miembros del jurado, por su disponibilidad y el tiempo dedicado a revisar mi tesis.
- A los doctores Ivette Rubio Gutiérrez y Manuel Corro Morales, por su valioso apoyo desde mis estudios de licenciatura y por su amistad sincera.
- A los profesores de las materias que cursé durante mis estudios de maestría, en especial al doctor Carlos Gutiérrez Aguilar por sus valiosos comentarios para la escritura de mi artículo.
- A la doctora María Eugenia Manjarrez por su contribución en este trabajo.
- A todas las personas y sus mascotas que contribuyeron en este proyecto, que sin su apoyo no se hubiera podido realizar.
- A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, mi alma máter, siempre orgulloso.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue demostrar la seroprevalencia del virus de influenza equina (H3N8) y tres subtipos de influenza humana (H1N1pdm09, hH1N1, hH3N2) en perros domésticos de la ciudad de México, y analizar su posible asociación con factores predisponentes. Para la detección de anticuerpos en muestras de sueros de perros se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) y se emplearon como antígenos tres cepas de influenza humana: A/México/LaGloria-3/2009 H1N1 (H1N1pdm09) (número de acceso del GenBank: CY077595), A/México/INER1/2000 H1N1 (hH1N1) (número de acceso del GenBank: JN086908) y A/Hong Kong/68 H3N2 (hH3N2) (ATCC VR1679 strain) y dos cepas de influenza equina: A/equine/2/Miami/63 H3N8 (ATCC VR317 strain) y A/equino/Kentucky/97 H3N8 (número de acceso del GenBank: AF197249). También se analizaron muestras de secreción nasal de perros para identificar RNA de virus de influenza A. Se evaluó con una prueba estadística la asociación en la seropositividad de perros con diferentes factores (edad, sexo, permanecen todo el tiempo en casa y la seropositividad en sus dueños). La seroprevalencia para influenza humana (hH1N1 pdm09, hH1N1 y hH3N2) en perros fue de 0.9% (1/113) y 4% (5/113) para influenza equina. No se encontró asociación significativa ($p > 0.05$) entre la seropositividad con algún factor evaluado. No se detectó RNA viral en las muestras de secreción nasal. Los resultados sugieren la primera evidencia serológica de la infección del virus de influenza A en perros domésticos en la Ciudad de México.

Palabras clave: influenza canina, influenza equina, influenza humana, transmisión entre especies, factores de riesgo

ABSTRACT

The aim of this work was to demonstrate the seroprevalence of equine influenza virus (H3N8) and three subtypes of human influenza (H1N1pdm09, hH1N1, hH3N2) in domestic dogs in Mexico City, and analyze their possible association with predisposing factors. For detection of antibodies in serum samples from dogs were used the technique of hemagglutination inhibition (HAI) and used as antigens three strains of human influenza: H1N1 A/México/LaGloria-3/2009 (H1N1pdm09) (number GenBank accession: CY077595) A/México/INER1/2000 H1N1 (hH1N1) (GenBank accession number: JN086908) and A / Hong Kong/68 H3N2 (hH3N2) (ATCC VR1679 strain) and two strains of equine influenza: A/equine/2/Miami/63 H3N8 (strain ATCC VR317) and A/equino/Kentucky/97 H3N8 (GenBank accession number: AF197249). Samples were also analyzed runny nose dogs to identify influenza virus RNA A. Was evaluated with a statistical test the association of seropositivity of dogs with different factors (age, sex, stay all the time at home and seropositivity to their owners). The seroprevalence for human influenza (hH1N1 pdm09, hH1N1 and hH3N2) in dogs was 0.9% (1/113) and 4% (5/113) for equine influenza. No significant association was found ($p > 0.05$) between seropositivity with some factor evaluated. No viral RNA was detected in nasal secretion samples. The results suggest the first serologic evidence of infection with influenza virus in domestic dogs in Mexico City.

Key words: canine influenza, equine influenza, human influenza, cross species transmission, risk factors

PERMISO DE REIMPRESIÓN

27/11/13

Rightslink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 27, 2013

This is a License Agreement between LUIS RAMIREZ ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3277201142886
License date	Nov 27, 2013
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	Influenza and Other Respiratory Viruses
Licensed content title	Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners
Licensed copyright line	© 2013 John Wiley & Sons Ltd
Licensed content author	Luis A. Ramirez-Martinez, Maria Contreras-Luna, Jazmin la Luz, Maria E. Manjarez, Dora P. Rosete, Jose F. Rivera-Benitez, Manuel Saavedra-Montañez, Humberto Ramirez-Mendoza
Licensed content date	Aug 30, 2013
Start page	1292
End page	1296
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Total	0.00 USD

CONTENIDO

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
PERMISO DE REIMPRESIÓN	V
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	2
REVISIÓN DE LITERATURA	2
CAPÍTULO 2	11
Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners		
BACKGROUND	12
INTRODUCTION	12
MATERIAL AND METHODS	13
RESULTS	14
DISCUSSION	14
REFERENCES	15
CAPÍTULO 3	16
DISCUSIÓN GENERAL	16
REFERENCIAS	20

INTRODUCCIÓN

En la Ciudad de México existen alrededor de un millón 200 mil perros, de los cuales más de un millón está en estrecha convivencia con humanos y en contacto con virus de influenza. Es importante conocer la seroprevalencia contra diferentes subtipos del virus de influenza A en los perros domésticos que conviven con el humano. Debe de considerarse de importancia la infección con virus de influenza en los perros y vigilar la circulación de estos virus en esta especie.

CAPÍTULO 1

FAMILIA ORTHOMYXOVIRIDAE

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* que quiere decir “correcto” (*orthos*) y “moco” (*myxa*).¹ De esta familia existen cinco géneros: influenzavirus A, B y C, Isavirus y Thogotovirus². Los géneros A, B y C; están asociados con problemas respiratorios en humanos³. Los virus de influenza son pequeños de 80 a 120 nm de diámetro, son partículas pleomórficas que luego se vuelven generalmente esféricas⁴. El virus de influenza tiene un genoma RNA segmentado de ocho moléculas de una sola cadena en sentido negativo que codifican 11 o 12 proteínas virales⁵.

Clasificación y subtipos

La estructura segmentada del genoma del virus de influenza y la rápida evolución característica de este virus generan nuevos subtipos o linajes genéticos⁶. Los mecanismos que permiten la evolución y generan la variabilidad de este virus son las mutaciones puntuales o deriva antigénica *drift*, el reordenamiento genético *shift*, partículas defectivas interferentes y la recombinación del ARN⁴. Estos mecanismos generan cambios estructurales en la superficie de las glicoproteínas virales o en cualquier otro segmento⁷. Los virus de influenza A se han dividido en subtipos de acuerdo a la reactividad serológica de las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA)³. Actualmente se conocen 17 HA (H1-H17)⁸ y 9 NA.

TRANSMISIÓN INTER-ESPECIE

El género de influenza A infecta a una variedad extensa de animales domésticos y aves silvestres⁴. En los humanos causa afectaciones clínicas en el 5 al 10% de la población mundial debido principalmente por los subtipos H1, H2 y H3⁹. Las interacciones entre un patógeno viral y un hospedador son un proceso complejo que conducen a una especificidad, aunque las transmisiones entre especies son un proceso difícil esporádicamente los virus cruzan las barreras e infectan a otras especies¹⁰. Sin embargo, la mayoría de infecciones de transmisión directa del virus de influenza de una especie

huésped natural a una nueva especie huésped no resultan en la transmisión sostenida ¹¹. Por lo tanto, el establecimiento de nuevos linajes de larga duración del virus de influenza es poco común y difícil ⁴. Cuando un nuevo subtipo que se originó en especies animales se introduce entre la población humana se generan las pandemias ¹². Por lo tanto la capacidad del virus de influenza para evolucionar e infectar a diferentes especies animales es de suma importancia.

Frecuentemente los virus de influenza pueden infectar nuevos hospedadores pero no es común que se establezcan y continúen infectando a esta nueva especie ¹³. Existen barreras que no permiten la transmisión inter-especie de los virus de influenza, aunque diversos factores como el crecimiento de la población y los hábitos de consumo favorecen a que se reduzcan estas barreras que limitan el contacto entre especies ¹⁴. Para que un virus se vuelva endémico en una nueva población intervienen las interacciones entre la especie donante y el receptor, la interacción individual del virus en el hospedador de la especie receptora y las interacciones dentro de la especie receptora ¹⁴. La adaptación y perpetuidad en los humanos, de los virus de influenza con nuevos reordenamientos, se pueden dar por transmisión directa o indirectamente en especies *punte* ¹⁵. Los virus de influenza infectan a estas especies *punte* antes de transmitirse al humano. Esto facilita la infección de nuevos virus de influenza, ya que pueden existir modificaciones en los virus para su adaptación al humano ¹². Las aves silvestres se consideran como el reservorio natural de los virus de influenza A ¹⁶. Los cerdos pueden infectarse con la mayoría de virus de influenza aviar ¹⁷ por lo que se consideran como una especie puente donde se llevan a cabo reordenamientos de diferentes subtipos ¹⁸. La exposición de los humanos a virus de influenza de aves silvestres es muy rara, sin embargo es muy frecuente la exposición y convivencia con estas especies puente ¹². Aunque no se ha reportado la transmisión de virus de influenza de caballos o perros a humanos, se sabe que los carnívoros domésticos podrían representar una nueva especie puente ¹².

Un factor importante en la transmisión inter-especies es la capacidad de la proteína hemaglutinina (HA) del virus de influenza para unirse a ciertos receptores en las células huésped antes de que se internaliza el virus. La unión del virus de influenza a las células

blanco está mediada por la HA viral, que reconoce glicoconjugados de superficie de la célula que contienen residuos de ácido siálico terminal ¹⁹. La especificidad por el receptor varía; se cree que las diferencias específicas de la especie en la distribución de los enlaces en las células epiteliales respiratorias, influyen en la capacidad de los virus de influenza A para transmitirse entre las especies ²⁰. La proteína HA viral se une a receptores celulares con oligosacáridos que terminan en ácido siálico- α -2,6-galactosa (α -2,6-Gal) o α -2,3-galactosa (α -2,3-Gal). Hay diferencias entre especies en la topografía celular de la densidad de receptores celulares con ácido siálico α -2,6-Gal y α -2,3-Gal en el tracto respiratorio. Los virus de influenza pueden unirse predominantemente a receptores α -2,6-Gal y α -2,3-Gal, aunque algunos virus pueden unirse a ambos ¹⁹. Los virus de influenza aviar se unen preferentemente al ácido siálico ligado a la galactosa por una conformación α -2,3 que se encuentra en altas concentraciones en las células epiteliales del intestino de aves acuáticas ²¹. Los virus de influenza humana (subtipos H1 a H3) se unen más fácilmente a receptores que contienen terminación α -2,6-Gal que se encuentran en el epitelio del tracto respiratorio humano ²².

INFLUENZA CANINA

La infección con virus de influenza en perros es una enfermedad reciente; también el considerar a los perros como nuevos hospedadores de diferentes virus de influenza. En 2004 se identificó la infección y manifestación de un cuadro clínico, en esta especie, con un virus de influenza A de origen equino subtipo H3N8 ¹¹. Se ha documentado la circulación de este subtipo en perros domésticos en Estados Unidos de América ²³, en perros de la raza galgo utilizados en las carreras ²⁴ y también en perros bajo resguardo en centros de control canino ²⁵. Aparentemente la infección no está relacionada a una edad, raza o sexo específicos ^{23, 25}. Se ha demostrado la transmisión, de manera experimental, del subtipo H3N8 entre perros, los cuales desarrollan un cuadro clínico una vez que se infectan al estar en contacto con otros perros ²⁶.

Epidemiología

Se ha demostrado que un virus de influenza tipo canina estuvo circulando entre los perros desde el año 2000 ²⁷. El análisis filogenético del virus de influenza canina

determinó que este virus se adaptó en los perros a partir de la transmisión entre especies de un virus de influenza equina H3N8 el cual no tuvo algún tipo de reordenamiento genético ^{11, 28}. Este virus tuvo una adaptación en los perros, y aunque el virus de influenza canina H3N8 es muy similar genéticamente a los aislamientos posteriores al año 2003 de influenza equina con los que se ha comparado ²⁹, existen diferencias, principalmente en el gen HA, que favorecieron la adaptación a una nueva especie huésped y que se producen de manera transitoria en el huésped donante, para proporcionar un reservorio transitorio de mutaciones pre-adaptadas ³⁰. Además, estas mutaciones, favorecen que el virus se mantenga de manera eficiente entre la población de perros por la transmisión horizontal ²⁸. Y también le han conferido una especificidad de especie al no permitir re infectar a los caballos ³¹.

En el año de 2008 se identificó un virus de influenza en perros que daría origen a un nuevo subtipo H3N2. Este se aisló en Corea del Sur a partir de perros con un cuadro respiratorio severo. El análisis filogenético de este virus indicó que los aislamientos del virus de influenza, procedentes de Corea del Sur, pertenecen a un grupo diferente a los del subtipo H3N8 de equinos y caninos ³². Los ocho genes del subtipo H3N2 de influenza canina son de origen aviar, se cree que la transmisión se generó por la alimentación de perros con carne sin tratar de patos y pollos, también es posible que la transmisión entre especies del virus se produjo directamente por la transmisión de aerosol a partir de aves infectadas a perros susceptibles como consecuencia de un contacto estrecho entre las dos especies ³². Este subtipo H3N2 también se ha podido aislar en diferentes regiones de China ³³⁻³⁹. También se ha demostrado la transmisión horizontal entre perros que están en contacto con perros infectados con virus de influenza H3N2 ⁴⁰.

Manifestación clínica

Los signos asociados a influenza canina no son patognomónicos y más del 20% de los perros infectados son asintomáticos ⁴¹. Los signos clínicos asociados a la infección por influenza canina son similares a los producidos por otros agentes, en especial a los que producen la traqueo bronquitis infecciosa ⁴². La mayoría de signos clínicos se presentan

durante los primeros cinco días posteriores a la infección. La mayoría de los casos graves de neumonía se debe a una infección bacteriana secundaria. Los casos de neumonía hemorrágica en perros de raza Greyhound no se han reportado en perros domésticos ¹¹

Las manifestaciones clínicas en los perros por la infección del virus de influenza son parecidas aunque existen diferencias entre los dos subtipos, H3N8 y H3N2. Los signos clínicos, en la infección experimental en perros por el subtipo H3N2, incluyen estornudos, secreción nasal y tos que se observan de 2-8 días post inoculación (dpi) ^{32, 40}. Los animales presentan fiebre a las 24 h después de la inoculación, que se prolonga de 3-6 dpi. La eliminación del virus en las secreciones nasales se puede detectar desde el 1 dpi y continúa hasta por cinco días más. Se alcanzan títulos hasta de $10^{6.1}$ hasta 10^7 dosis infectantes embrión pollo 50%/ 0.1 ml ^{32, 40}. Las lesiones macroscópicas en órganos descritas en animales infectados experimentalmente con virus de influenza H3N2 son consolidaciones multifocales y coalescentes en pulmón a los 7 dpi ^{32, 40}. Las lesiones microscópicas se pueden observar desde los 3 dpi, y se encuentran en la tráquea y los pulmones. Son necrosis e inflamación de vías respiratorias superiores (tráquea y bronquios) e inferiores (bronquiolos y alvéolos) También se puede observar traqueobronquitis necrotizante difusa o multilobular con inflamación supurativa del epitelio traqueobronquial, bronquiolitis necrotizante difusa o multilobular y broncoalveolitis ³². La infección por el subtipo H3N8 de influenza canina en perros genera cuadro clínicos diversos, se ha reportado fiebre en los animales durante uno o dos días posteriores a la inoculación y sin mostrar signos respiratorios como tos y secreción nasal ^{11, 43}, en otro estudio los signos clínicos de fiebre, tos y secreción nasal han estado ausentes en perros bajo condiciones experimentales ⁴⁴. Se ha reportado la presencia de tos como el principal signo clínico en la infección experimental en perros, desde el segundo día post inoculación y hasta por cuatro días ⁴⁵. La excreción viral en los perros, que se han infectado experimentalmente, también es muy variable, se ha reportado desde el día 1 y 2 con títulos de 1.0 a 2.5 Log₁₀ unidades formadoras de placa, y también por cuatro días consecutivos desde el día posterior a la inoculación ¹¹. En otro estudio se han reportado títulos virales en secreción nasal, desde el día 1 post inoculación con un promedio de $10^{1.0}$ dosis infectante cultivo celular (DICC) 50%/ml, y hasta por cinco días

más con títulos de $10^{2.0}$ DICC50%/ml, el título más alto se obtiene el día 4-5 del desafío con títulos que alcanzan $10^{4.0}$ DICC50%/ml ⁴³. Las lesiones histológicas causadas por el virus de influenza subtipo H3N8 en perros infectados experimentalmente son traqueítis necrotizante, bronquitis y bronquiolitis, desde el quinto día post inoculación ¹¹, también se ha descrito necrosis multifocal de epitelio celular de la tráquea y bronquios desde el primer día post inoculación, estas lesiones se incrementan durante los siguientes cinco días más y tienden a desaparecer para el sexto día, también se describe neumonía desde el día 1 y hasta por 3 días después de la inoculación en la zona cráneo ventral y se caracteriza por infiltrados de células inflamatorias ⁴⁴.

Diagnóstico

La infección por el virus de influenza en perros se presenta comúnmente como brotes de enfermedad respiratoria. Así como en otras cepas el virus de influenza en perros puede ser diagnosticado por aislamiento viral o por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa ^{11, 28, 46}. Esta última es más sensible comparada con el aislamiento viral en embrión de pollo ⁴². La prueba actual de elección para detectar virus de influenza es la RT-PCR, que tiene como objetivo amplificar un segmento del gen que codifica la proteína de matriz, esta puede ser la misma secuencia que se utiliza para detectar virus de influenza aviar ⁴⁷. Aunque se puede utilizar un ensayo de RT-PCR específico para H3, se prefiere hacer un muestreo exploratorio para detectar si algún virus de influenza está involucrado en el cuadro clínico ⁴⁷. Si el resultado es positivo se puede determinar el subtipo de virus de influenza, con iniciadores específicos para H3 y N8 ^{28, 46}. Estas técnicas tienen la desventaja de mostrar resultados negativos si las muestras clínicas se colectan fuera del periodo de excreción viral, el cual suele ser muy corto ^{40, 43, 44, 48}. La serología es uno de los métodos de diagnóstico más útil para confirmar la infección o como herramienta de vigilancia epidemiológica del virus de influenza ^{42, 47}. El ensayo de inhibición de la hemaglutinación es considerado el método estándar de elección para el diagnóstico serológico del virus de influenza ^{49, 50}. Esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad, ya que puede detectarse la respuesta de anticuerpos en perros desde los 7 días después de la infección ^{40, 44, 48, 51}. Esta prueba es de elección debido a la ausencia de otros subtipos de virus de influenza que circulen en perros ⁴⁷.

Vacunación

Existe, en los Estados Unidos de América, una vacuna inactivada contra el virus de influenza canina subtipo H3N8, la cual ha demostrado de manera experimental reducir el tiempo de excreción del virus, la severidad de los signos clínicos y las lesiones en el aparato respiratorio ⁴⁵, también se demostró que reduce la excreción bacteriana en estudios de coinfección con influenza canina y *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ⁴³. De manera experimental se ha probado una vacuna inactivada contra el subtipo H3N2, que reduce los signos clínicos como la fiebre, disminuye la carga viral, el tiempo de excreción y las lesiones en pulmón ⁵². Aunque ninguna de estas vacunas protegen contra la infección se recomendaría utilizarla en perros con un alto grado de riesgo de presentar infecciones respiratorias ⁴⁷.

INFLUENZA HUMANA EN PERROS

Los virus de influenza humana se unen a receptores celulares que contienen terminación α -2,6-Gal que se encuentran en el epitelio del tracto respiratorio humano ²². Los perros presentan en las células del aparato respiratorio inferior, bronquios y bronquiolos, el receptor celular de ácido siálico en conformación α -2,3-Gal específico para la infección con virus de influenza equina y aviar ^{20, 32, 53}. Se ha documentado que los perros poseen el receptor α -2,6-Gal en algunas secciones del aparato respiratorio. En la tráquea y bronquios la distribución de este receptor es muy similar, específicamente en células de la mucosa, submucosa y lámina propia, se encuentra de manera difusa y en focos. En bronquiolos y alveolos no se encuentra ácido siálico en conformación α -2,6-Gal ⁵³. Daly et al., ²⁰ reporta que se encuentra este oligosacárido de ácido siálico α -2,6-Gal en el tracto respiratorio de los perros.

Existen datos serológicos y virológicos de la infección esporádica en perros con virus de influenza humana subtipo H3N2 ⁵⁴⁻⁵⁷. Estos reportes mostraban una infección subclínica sin la presencia de signos clínicos en los perros, además de que no se podía demostrar la transmisión sostenida del virus de influenza humana en los perros.

En estudios más recientes se han identificado anticuerpos contra el virus de influenza A H1N1 pandémico, en perros domésticos, en muestras tomadas durante la circulación de este virus ⁵⁸. También hay datos de la infección natural y manifestación de un cuadro clínico respiratorio en perros y gatos con virus de influenza H1N1 pdm09 ⁵⁹⁻⁶¹. De manera experimental el virus de influenza humana H1N1 pdm09 se ha podido infectar en los perros reproduciendo los signos clínicos, pero la transmisión entre los mismos no se da de manera eficiente ⁶¹. Recientemente se demostró un nuevo virus H3N1 con reordenamientos a partir de genes del virus de influenza humana y aviar en la especie canina ⁶². Esto sugiere que los virus de influenza humana no están circulando en los perros y que las infecciones son esporádicas y por contacto con humanos infectados, aunque estos podrían representar un papel importante en la transmisión inter especie de diferentes subtipos del virus de influenza A, porque pueden servir como especies puente para la infección del virus.

INFLUENZA AVIAR EN PERROS

La replicación de los virus de influenza aviar en mamíferos, como cerdos, gatos y hurones se ha documentado en diversos estudios de manera experimental ^{17, 63}. Antes de la aparición del virus de influenza aviar de alta patogenicidad (Highly Pathogenic Avian Influenza Virus) los reportes de la transmisión inter especie del virus de influenza aviar a especies mamíferas era poco frecuente ⁶⁴. Desde el año 2003, la influenza aviar HPAIV subtipo H5N1 se ha transmitido a una amplia gama de especies de mamíferos domésticos y silvestres, incluido el humano ⁶⁵⁻⁶⁸. La transmisión de este virus se ha dado de manera esporádica en los mamíferos, sin embargo la infección se ha considerado de importancia debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad y al potencial de zoonosis ⁶⁹. El primer reporte de influenza HPAIV H5N1 en perros fue en el año 2004. El virus se pudo aislar del pulmón, hígado y riñones de un perro que mostró signos clínicos como fiebre, jadeos y letargia. La probable infección fue por la ingesta, previa a los signos clínicos, de un cadáver de un pato en una zona donde se habían reportado casos de HPAIV H5N1 en esta especie ⁷⁰. A partir de esto se han realizado infecciones de manera experimental en la especie canina con el virus HPAIV H5N1 ⁷¹⁻⁷³. Los resultados obtenidos difieren en los distintos estudios. Giese et al., han demostrado la excreción

viral del tracto respiratorio, la presencia de signos clínicos como fiebre, anorexia y conjuntivitis, pero no pudieron re aislar el virus en órganos, tampoco la transmisión horizontal entre perros se logró establecer ⁷². Resultados similares obtuvieron Chen et al., en la reproducción de signos clínicos en perros inoculados con el HPAIV H5N1. También lograron identificar el virus en pulmón y tráquea, además de lesiones histopatológicas en estos órganos ⁷³. Esto difiere a los reportado por Maas et al.2007, donde solo pudieron identificar el virus en excreciones pero no evidenciaron la presencia de signos clínicos en los perros inoculados con HPAIV H5N1 ⁷¹. Esto sugiere que la replicación del virus de influenza aviar en perros varía de acuerdo a las diferentes cepas utilizadas en la inoculación, además de que pudieran existir diferencias en la susceptibilidad de la infección en distintas razas de perros. Se ha demostrado que los virus aislados en perros son muy cercanos filogenéticamente al virus HPAIV H5N1 identificado en aves ⁷⁴. Los virus de influenza HPAIV H5N1 que infectan a los perros domésticos tienen características de alta virulencia y potencial de transmitirse de perros a humanos ⁷⁴. Los factores que influyen en la capacidad de los virus de influenza aviar que se transmiten entre mamíferos, y que de esta forma se puedan establecer entre la población, son poco conocidos. El conocimiento de estos factores es crucial en los esfuerzos por mitigar los efectos de la transmisión entre especies de virus de influenza aviar a los mamíferos, incluidos los humanos ⁶⁴.

CAPÍTULO 2

Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners

Artículo publicado

DOI:10.1111/irv.12162
www.influenzajournal.com

Original Article

Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners

Luis A. Ramírez-Martínez,^a María Contreras-Luna,^a Jazmín De la Luz,^a María E. Manjarrez,^b Dora P. Rosete,^b José F. Rivera-Benitez,^a Manuel Saavedra-Montañez,^a Humberto Ramírez-Mendoza^a

^aDepartamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México. ^bInstituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan, México.

Correspondence: Dr Humberto Ramírez-Mendoza, Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM. Av. Universidad No. 3000 Copilco, Del. Coyoacán, CP 04510, Distrito Federal, México. E-mail: betosram@yahoo.es

Accepted 3 August 2013. Published Online 30 August 2013.

Reimpresión autorizada por John Wiley and Sons

Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners

Luis A. Ramírez-Martínez,^a María Contreras-Luna,^a Jazmín De la Luz,^a María E. Manjarrez,^b Dora P. Rosete,^b José F. Rivera-Benitez,^a Manuel Saavedra-Montañez,^a Humberto Ramírez-Mendoza^a

^aDepartamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México. ^bInstituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan, México.

Correspondence: Dr Humberto Ramírez-Mendoza, Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM. Av. Universidad No. 3000 Copilco, Del. Coyoacán, CP 04510, Distrito Federal, México. E-mail: betosram@yahoo.es

Accepted 03 August 2013. Published Online 30 August 2013.

Background The possible transmission of influenza A virus between dogs and humans is important, as in Mexico City there are approximately 1.2 million dogs. We present the first evidence of influenza A virus infection in household dogs in Mexico.

Objectives The objective of this study was to identify the presence of antibodies against influenza A virus in dogs and their owners, as well as the presence of RNA of influenza A virus in nasal exudates of dogs and, thereby, assess the possible transmission of the virus between humans and dogs.

Methods Serum samples from household dogs and their owners were analyzed to detect the presence of antibodies against three subtypes of human influenza virus (H1N1pdm09, H1N1, and H3N2), as well as subtype H3N8 of equine influenza. We analyzed dog nasal exudates to detect influenza viral RNA. The relationship between the seropositivity of dogs and various factors (age, sex,

constantly at home, and seropositivity of owners) was statistically analyzed.

Results Seroprevalence for human influenza in dogs was 0.9% (1 of 113), and it was 4% (5 of 113) for equine influenza. In humans, seroprevalence was 22% for subtype H1N1pdm09, 20% for subtype H1N1, and 11% for subtype H3N2. No significant association ($P > 0.05$) was found between seropositivity and any of the assessed factors. Furthermore, no viral RNA was detected in the nasal exudate samples.

Conclusions Results revealed seroprevalence of the influenza virus in household dogs in Mexico City. It can be assumed that dogs are currently becoming infected with different subtypes of influenza viruses.

Keywords Canine influenza, cross-species transmission, human influenza, risk factors.

Please cite this paper as: Ramírez-Martínez et al. (2013) Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7(6), 1292–1296.

Introduction

The constant evolution of the influenza virus favors genetic variability and transmission to other species. Interspecies transmission of influenza viruses is a difficult process because there are barriers that hinder infection; however, diverse factors such as population growth and consumption habits have reduced these barriers by increasing contact among species.¹ Antigenic drift and antigenic shift generate structural changes in the virus and allow evolution and variability,² thereby encouraging infection and adaptation in different animal species.³ The clinical disease associated with the influenza virus in dogs has only been recently observed. In 2004, an equine-origin subtype H3N8 influenza A virus was isolated from dogs with respiratory disease,⁴ and, in 2008, an avian-origin subtype (H3N2) was also isolated.⁵ Subsequently, the circulation of these subtypes has been documented in the canine population in diverse countries.^{6–9}

The influenza virus in these animals can lead to health problems related to respiratory syndromes and complications due to bacteria, and although horizontal transmission among dogs has been demonstrated, the rate of infection does not appear to be altered by age, breed, or sex.^{10,11} In their respiratory tract, dogs possess specific receptors for infection with human and avian influenza viruses,¹² thereby suggesting that dogs could play an important role in interspecies transmission of different subtypes of influenza A virus. Although no transmission of the virus from dogs to humans has been reported, dogs could represent a new bridging species for the infection.¹³

There is serological evidence of the presence of subtypes H1N1 and H3N2 of human influenza virus in dogs; a virus similar to subtype H1N1pdm09 of humans has also been isolated from dogs.^{14,15} In 2012, a new subtype H3N1 was identified as a result of reassortment in the canine genes of human H1N1pdm09 and canine H3N2 influenza viruses.¹⁶

The possible transmission of influenza A virus between dogs and humans is important, as in Mexico City there are approximately 1.2 million dogs, of which 1 million live in close contact with humans and other animals.¹⁷ The objective of this study was to identify the presence of antibodies against influenza A virus in dogs and their owners, as well as the presence of RNA of influenza A virus in nasal exudates of dogs and, thereby, assess the possible transmission of the virus between humans and dogs.

Material and methods

Study population

The experimental protocol and sampling methods were approved by the Committee of Science and Bioethics in Research of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER B35-12). We utilized a prospective convenience sampling method. The study was limited to dog owners and none had horses. Between July and November 2012, 113 blood samples were collected from household dogs in Mexico City, as well as a blood sample from each owner. We used the Cannon and Roe¹⁸ formula to calculate the sample size and taking as reference the seroprevalence reported in previous studies for canine influenza in other countries^{10,19} and human influenza virus in dogs.¹⁵ Age, breed, and sex of the dog were not considered as exclusion or inclusion criteria. Seventeen nasal exudate samples were also collected from dogs with suggestive signs of respiratory disease. A sterile cotton swab was used to collect the sample from each animal, and the swabs were immediately placed in 1 ml of transport medium at 4°C after sampling.

Viral subtypes

Three human influenza strains were used: A/Mexico/LaGloria-3/2009 (H1N1)pdm09 (GenBank accession no. CY077595), A/Mexico/INER1/2000 (H1N1) (GenBank accession no. JN086908), and A/Hong Kong/8/68 (H3N2) (ATCC VR1679 strain) as well as two equine influenza strains: A/equine/2/Miami/63 (H3N8) (ATCC VR317 strain) and A/equine/Kentucky/97 (H3N8) (GenBank accession no. AF197249).

Antibody detection

The hemagglutination inhibition (HI) test was used to detect antibodies against equine influenza in dog sera as described by Anderson et al²⁰ with the following modifications: sera were heat-inactivated at 56°C and adsorbed with kaolin and 5% chicken erythrocytes. Double serial dilutions were made from 1:10 to 1:1240; the titer of the antibodies inhibiting hemagglutination was expressed as the maximal dilution at which the serum inhibited the hemagglutination activity of the virus. Sera were considered positive starting at the 1:40 dilution. To detect antibodies against human influenza virus in the sera of dogs and owners, the HI test was used

according to the WHO manual,²¹ with the following modifications: the antigen was adjusted to eight hemagglutinating units (HAU). Sera were heat-inactivated at 56°C and adsorbed on kaolin and 5% chicken erythrocytes. Double serial dilutions were made from 1:10 to 1:1240, and titers of sera were considered positive at ≥ 40 . The tests with the H1N1pdm09 influenza virus were performed in a level 2 biosafety laboratory of the INER.

Detection of viral RNA

Nasal exudate samples from dogs with probable respiratory infections were analyzed to identify viral RNA of human and canine influenza. RNA extraction was achieved using the TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) technique according to the manufacturer's instructions. To construct the complementary DNA, the reverse-transcriptase SuperScriptII (Invitrogen) enzyme was used. Real-time RT-PCR was used with primers addressed to a fragment of the gene NP, according to Lu *et al.*²² To identify the viral RNA of human influenza A, the primers and probe were identical to those used for the real-time RT-PCR previously described for gene M of most influenza A subtypes.²³ Primers used in this research were designed to align most type A influenza viruses originating from multiple species. To confirm the amplification of a type A influenza virus different from the human subtype pdm09, the products were subjected to agarose gel electrophoresis.

Data collection and statistical analysis

A questionnaire was completed by dog owners who had voluntarily agreed to donate their pet's blood. The questionnaire included information regarding the dog's age, breed, and sex, their vaccination status, habits of the pet: whether it cohabits with other dogs in the same home and whether it remains at home all the time or is taken out (to parks or street walking). In addition, we gathered information specific to the owners that included age, gender, and vaccination status in the last 6 months against human influenza virus. The collected information was analyzed using contingency tables. An independent test was performed to determine the association between seropositivity to the equine subtypes in dogs and predisposing factors, such as age (>2 years, <2 years), sex (male, female), and whether the dog constantly remains in the home (yes, no). We also evaluated the seropositivity against human subtypes in the dogs (positive, negative) and compared this to the seropositivity of their respective owners (positive, negative), to analyze the role of cohabitation of dogs and humans as a possible factor for infection.

To assess whether seropositivity in humans against the influenza virus was due to recent vaccination or to natural infection, we analyzed the association of the presence of antibodies (positive, negative) with the vaccination status (vaccinated, not vaccinated).

Table 1. Frequency of the antibody titers in dogs against the different subtypes of influenza A virus

Viral subtype	HAU 25 μ l				
	<20	20	40	80	160
H3N8_63	113	0	0	0	0
H3N8_97	106	2	3	0	2
H1N1pdm09	112	0	1	0	0
H1N1	108	4	0	0	1
H3N2	110	2	0	0	1

Values are expressed as hemagglutination units (HAU) at 25 μ l. Sera were considered positive when titers \geq 40 were obtained.

For both cases, a chi-square test (with continuity correction for frequencies $<$ 5) was used. Statistical significance was determined as $P < 0.05$. For all analyses, the statistical SPSS 16.0 software was used (SPSS for Windows, Version 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Seroprevalence

Of the 113 dogs, 48 (42.5%) were males and 65 (57.5%) were females, and the average age was 5.3 years (range 3 months to 13 years). The seroprevalence was 4% (5 of 113) for subtype H3N8 A/equine/Kentucky/97 and 0% for subtype H3N8 A/equine/2/Miami/63. We detected one dog positive to subtype H1N1pdm09 (0.9%) and one positive (0.9%) to the two seasonal subtypes H3N2 and H1N1. The frequency of the antibody titers in the dogs against the different subtypes is shown in Table 1.

Of the dog owners included in the study, 45.7% (21) were men and 54.3% (25) were women, with an average age of 36.5 and 38.6 years, respectively. The detected seroprevalence in the sera of the dog owners was 22% for subtype H1N1pdm09, 20% for subtype H1N1, and 11% for subtype H3N2.

Detection of viral RNA

The real-time RT-PCR results revealed that no samples were positive for canine influenza or influenza A.

Risk factor analysis

We found no evidence associating seropositivity in dogs with any of the assessed factors, including age ($P = 0.868$), sex ($P = 0.564$), and whether they leave the home ($P = 0.063$; Table 2). In addition, no statistically significant association existed between seropositivity against any subtype of human influenza in dogs and the seropositivity against human influenza in their owners ($P = 0.373$; Table 3).

Table 2. Association between seropositivity in dogs against equine influenza subtype A/equine/Kentucky/97 H3N8 and various factors

Variable	Category	No. of seropositive dogs	No. of seronegative dogs	P value
Age	<2 years	0	14	0.868
	>2 years	5	94	
Sex	Male	1	47	0.564
	Female	4	61	
Constantly home	Yes	2	7	0.063
	No	3	101	

Statistically significant $P < 0.05$.

Table 3. Association between seropositivity in dogs against any subtype of human influenza and seropositivity of their owners

Variable	Category	No. of seropositive dogs	No. of seronegative dogs	P value
Owner positive	Yes	1	94	0.373
	No	0	18	

Statistically significant $P < 0.05$.

Table 4. Assessment of vaccination status and seropositivity against influenza in dog owners

Variable	Category	No. of seropositive owners	No. of seronegative owners	P value
Vaccinated against H1N1	Yes	2	8	0.969
	No	7	29	
Vaccinated against H1N1pdm09	Yes	5	3	0.002*
	No	5	33	

*Statistically significant $P < 0.05$.

Assessment of the vaccination status and seropositivity in dog owners revealed that the only statistically significant factor ($P = 0.002$) associated with the presence of antibodies was vaccination in the last 6 months against subtype H1N1pdm09 (Table 4).

Discussion

Seroprevalence in dogs against subtype H3N8 A/equine/2/Miami/63 was nil. In Mexico, the presence of antibodies in

horses against different isolates of the subtype H3N8 equine influenza virus has been reported²⁴; comparatively, variation in the hemagglutinin gene of this virus has been reported in isolations performed before 1992.⁶ It can be assumed that, in Mexico, something similar occurred in the equine influenza virus and, therefore, dog sera do not present antibodies against old isolates of this subtype due to antigenic drift. Seropositivity in dogs against subtype H3N8 A/equine/Kentucky/97 was 4%. Anderson *et al.*²⁰ discussed that contemporary subtypes of equine and canine influenza viruses are phylogenetically close and therefore can be used as diagnostic antigens. The positive results in dogs suggest that interspecies transmission of the equine influenza virus has occurred. Seroprevalence of the equine influenza virus was low, but similar to that in studies with pet dogs from other countries^{10,25,26} where canine and equine influenza subtypes were used. The low seropositivity could be explained by the fact that we analyzed pet dogs, because prevalence of canine influenza in dogs held in canine control shelters has been reported to be up to 42%, and the only associated factor was the number of permanent days in the shelter.²⁷ Seroprevalence in these dogs against the three subtypes of human influenza (H1N1pdm09, H1N1, and H3N2) was 0.9%. This is similar to that reported by Dundon *et al.*,¹⁵ who found a 0.7% seroprevalence in dog sera that were collected during the circulation time of the H1N1pdm09 human influenza virus. Damiani *et al.*²⁸ also found a 0.13% seroprevalence against the H1N1pdm09 human influenza virus. Our results differ from prevalence data found in Brazil,⁹ which was 15.27%, but this study was against an isolate of an old human influenza virus, and not the 2009 variant, which could explain the difference in the proportion of positive results.

The percentage of seropositivity against the H1N1pdm09 human influenza virus detected in the owners is similar to other reports (39% and 33%) from previous studies performed in Mexico.^{29,30} Circulation of subtype H1N1 among dog owners was not associated with their vaccination status, thereby suggesting that dogs were in contact with the human influenza virus and that there is interspecies transmission.

We did not find sufficient statistical evidence to associate the seropositivity against the equine influenza virus in dogs with age, sex, or constant presence inside the home; this is similar to a previous study in which the only factor associated with seropositivity for canine influenza was their lodging in veterinary facilities in the previous 6 months.¹⁰ We did not find a statistical association between seropositivity against the human influenza virus in the dogs and their owners. Therefore, we can assume that the observed seropositivity in dog owners does not pose a risk for seropositivity against human influenza in their dogs. However, subtypes H1N1pdm09 and H1N1 of human influenza are infecting dogs and their owners. There may be factors

directly associated with the infection, but these have not yet been studied. We did not find any nasal exudates positive to RNA of human influenza A virus. In previous studies^{4,6,16,31} performed in other countries, isolates were obtained from samples of dogs with severe respiratory clinical signs. The disease is probably not frequently presented by dogs in Mexico or the number of dogs that are infected is low, and consequently, the number of dogs that develop the disease is also low. We will continue to search for a strain in Mexico City that can be analyzed and compared with other isolates.

These are the first results from household dogs in Mexico. However, it is necessary to continue to study influenza virus circulation in dogs from different places. The seropositivity results revealed that the influenza virus is currently infecting household dogs in Mexico City. We have no information regarding when this virus was first present in dogs, but it can be assumed that dogs are currently in contact and becoming infected with different subtypes of human and equine influenza viruses. We do not presently have an isolate of canine influenza in Mexico City that could generate more information related to the circulation among the canine population, but we will continue to study the implications to animal and human health.

Conflict of interests

Authors declare no conflict of interests.

Acknowledgements

We thank the owners who voluntarily agreed to blood sampling of their pets. This study was partially funded by the following projects: CONACYT SSA-2009-C02-126709 and PAPIIT IN224611. L.A. Ramírez-Martínez is a recipient of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (ID 423802).

References

- 1 Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT. Host species barriers to influenza virus infections. *Science* 2006; 312:394–397.
- 2 Webby R, Hoffmann E, Webster R. Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens. *Nat Med* 2004; 10: S77–S81.
- 3 Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56:152–179.
- 4 Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL *et al.* Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science* 2005; 310:482–485.
- 5 Song D, Kang B, Lee C *et al.* Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:741–746.
- 6 Payungporn S, Crawford PC, Kouo TS *et al.* Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:902–908.

- 7 Yoon KJ, Cooper VL, Schwartz KJ *et al.* Influenza virus infection in racing greyhounds. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1974–1976.
- 8 Crispe E, Finlaison DS, Hurt AC, Kirkland PD. Infection of dogs with equine influenza virus: evidence for transmission from horses during the Australian outbreak. *Aust Vet J* 2011; 89(Suppl 1):27–28.
- 9 Mancini DA, Mendonca RM, Pereira AS *et al.* Influenza viruses in adult dogs raised in rural and urban areas in the state of Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012; 54:311–314.
- 10 Barrell EA, Pecoraro HL, Torres-Henderson C, Morley PS, Lunn KF, Landolt GA. Seroprevalence and risk factors for canine H3N8 influenza virus exposure in household dogs in Colorado. *J Vet Intern Med* 2010; 24:1524–1527.
- 11 Jirjis FF, Deshpande MS, Tubbs AL, Jayappa H, Lakshmanan N, Wasmooen TL. Transmission of canine influenza virus (H3N8) among susceptible dogs. *Vet Microbiol* 2010; 144:303–309.
- 12 Daly JM, Blunden AS, Macrae S *et al.* Transmission of equine influenza virus to English foxhounds. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:461–464.
- 13 Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus AD. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine* 2012; 30:4419–4434.
- 14 Lin D, Sun S, Du L *et al.* Natural and experimental infection of dogs with pandemic H1N1/2009 influenza virus. *J Gen Virol* 2012; 93:119–123.
- 15 Dundon WG, De Benedictis P, Viale E, Capua I. Serologic evidence of pandemic (H1N1) 2009 infection in dogs, Italy. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:2019–2021.
- 16 Song D, Moon HJ, An DJ *et al.* A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea. *J Gen Virol* 2012; 93:551–554.
- 17 Secretaría de Salud. Sé un Dueño Responsable. 2013. Available at http://www.salud.df.gob.mx/ssdf/index.php?option=com_content&task=view&id=5457 (Accessed March 2013).
- 18 Cannon RM, Roe RT; Industry ABoAHDOP. *Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians*. Canberra: Australian Government Pub. Service, 1982.
- 19 Serra VF, Stanzani G, Smith G, Otto CM. Point seroprevalence of canine influenza virus H3N8 in dogs participating in a flyball tournament in Pennsylvania. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238:726–730.
- 20 Anderson TC, Crawford PC, Katz JM, Dubovi EJ, Landolt G, Gibbs EP. Diagnostic performance of the canine Influenza A Virus subtype H3N8 hemagglutination inhibition assay. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24:499–508.
- 21 World Health Organization. Serological diagnosis of influenza by haemagglutination inhibition testing; in: WHO Global Influenza Surveillance Network, (eds): *Manual for the Laboratory Diagnosis and Virological Surveillance of Influenza*. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2011; 59–62.
- 22 Lu Z, Dubovi EJ, Zylich NC *et al.* Diagnostic application of H3N8-specific equine influenza real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of Canine influenza virus in clinical specimens. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22:942–945.
- 23 Lorusso A, Faaberg KS, Killian ML, Koster L, Vincent AL. One-step real-time RT-PCR for pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 matrix gene detection in swine samples. *J Virol Methods* 2010; 164:83–87.
- 24 Lorusso A, Faaberg KS, Killian ML, Koster L, Vincent AL. Antibodies to influenza and West Nile viruses in horses in Mexico. *Vet Rec* 2010; 166:22–23.
- 25 Said AW, Usui T, Shinya K *et al.* A sero-survey of subtype H3 influenza A virus infection in dogs and cats in Japan. *J Vet Med Sci* 2011; 73:541–544.
- 26 An DJ, Jeoung HY, Jeong W *et al.* A serological survey of canine respiratory coronavirus and canine influenza virus in Korean dogs. *J Vet Med Sci* 2010; 72:1217–1219.
- 27 Holt DE, Mover MR, Brown DC. Serologic prevalence of antibodies against canine influenza virus (H3N8) in dogs in a metropolitan animal shelter. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 237:71–73.
- 28 Damiani AM, Kalthoff D, Beer M, Muller E, Osterrieder N. Serological survey in dogs and cats for influenza A(H1N1)pdm09 in Germany. *Zoonoses Public Health* 2012; 59:549–552.
- 29 Elizondo-Montemayor L, Alvarez MM, Hernandez-Torre M *et al.* Seroprevalence of antibodies to influenza A/H1N1/2009 among transmission risk groups after the second wave in Mexico, by a virus-free ELISA method. *Int J Infect Dis* 2011; 15:e781–e786.
- 30 Elizondo-Montemayor L, Hernandez-Torre M, Ugalde-Casas PA *et al.* Clinical and epidemiological features of 2009 pandemic H1N1 influenza differ slightly according to seroprevalence status during the second wave in the general population in Mexico. *Respir Care* 2012; 57:1586–1593.
- 31 Teng Q, Zhang X, Xu D *et al.* Characterization of an H3N2 canine influenza virus isolated from Tibetan mastiffs in China. *Vet Microbiol* 2012; 162:345–352.

CAPÍTULO 3

DISCUSIÓN GENERAL

El virus de influenza se ha aislado de diferentes especies como los humanos, cerdos, caballos, mamíferos acuáticos, aves domésticas y silvestres. El reconocer a la influenza canina como una entidad clínica en perros es relativamente reciente. Estudios diversos en Estados Unidos de América demuestran claramente la presencia del subtipo H3N8 entre la población canina, sin embargo en México se desconoce cuál es la situación de este virus en los perros. Los datos de la infección con virus de influenza humana en especies domésticas como los perros y gatos, sugieren que los animales se infectan de manera esporádica a partir del contacto con humanos infectados, pero no se conoce claramente que factores, del huésped y virales, intervienen en la transmisión y circulación de este virus entre los humanos y los perros. Los resultados de este estudio evidencian la infección con virus de influenza en perros de la Ciudad de México.

La seroprevalencia en perros contra el aislamiento de influenza A/equino/2/Miami/63 subtipo H3N8, fue nula. El virus de influenza equina comenzó a circular en perros en el año del 2000²⁷ hasta tener una adaptación y transmisión sostenida desde el año 2004. El virus de influenza equina que se transmitió a los perros fue de aislamientos recientes, aunque existe evidencia de antigenicidad cruzada entre los virus de influenza equina y canina esto se da entre aislamientos contemporáneos⁵¹. La variación antigénica del virus de influenza equina subtipo H3N8 ha desarrollado tres grupos genéticos o *cluster* con variaciones en el gen de la hemaglutinina de influenza equina, debido a estas mutaciones no existe antigenicidad cruzada entre los grupos⁷⁵⁻⁷⁷. Por lo que los aislamientos de influenza equina anteriores al año 1988 no presentarán antigenicidad cruzada en sueros de perros. En México existe evidencia de la infección de virus de influenza equina en caballos^{78, 79}, se podría sugerir que los subtipos de influenza equina que estarían transmitiéndose a los perros son también aislamientos recientes, por lo que los sueros de perro no presentan anticuerpos contra el aislamiento A/equino/2/Miami/63.

La seropositividad contra el subtipo H3N8 A/equino/Kentucky/97 fue del 4%, Anderson *et al* ⁵¹ mencionan que los subtipos de influenza equina y canina contemporáneos, son cercanos filogenéticamente, por lo tanto se pueden utilizar como antígenos de diagnóstico. Los resultados positivos sugieren que en México existe transmisión de influenza equina en perros, aunque no se puede asegurar que se presente de manera sostenida entre la población canina. La seroprevalencia de influenza equina en perros es baja, esto es similar a los reportes de otros países en estudios con el virus de influenza canina ^{23, 80, 81}. El porcentaje de seropositividad contra influenza equina en este trabajo difiere con los reportes en Brasil y Australia que son del 90% y 37% respectivamente ^{82, 83}, en donde se utilizó el antígeno de influenza equina. La seropositividad baja se podría explicar por tratarse de perros domésticos, ya que se ha estudiado la prevalencia de influenza canina en centros de control canino, y se ha encontrado que es de hasta 42% ²⁵. También hay estudios en perros rurales donde la prevalencia de influenza equina es hasta del 90% ⁸³. Todo esto plantea la posibilidad de que los perros domésticos no están altamente expuestos al virus de influenza equina y que la frecuencia con que se infectan es menor que los perros en poblaciones rurales. De igual manera los perros en centros de control canino presentarán mayor prevalencia contra el virus de influenza canina que los perros domésticos. Estados Unidos de América es el único país que ha demostrado una circulación del subtipo H3N8 de influenza canina de manera endémica en algunos estados ⁸⁴. En México se desconoce si existe una infección esporádica del virus de influenza equina en los perros, por contacto con animales enfermos. O si el virus de influenza canina se ha transmitido por comercio y circulación de especies entre países. Aunque es menor la cantidad de perros que viajan internacionalmente, se considera como una especie susceptible ya que la vacunación contra influenza canina no se realiza como una práctica rutinaria en los perros.

Poco después de la detección en los seres humanos, del virus de influenza H1N1 2009, se determinó mediante análisis filogenéticos que surgió a partir de combinaciones de virus que previamente infectaron humanos, cerdos y aves ⁸⁵. La especie canina ha cobrado interés como una especie que pudiera facilitar la infección con múltiples subtipos de virus de influenza y por lo tanto reordenamientos con virus de influenza humana. La seroprevalencia contra influenza humana en perros fue de 0.9% (1/110) para

los subtipos H1N1 pandémico y H1N1 estacional, además del subtipo H3N2 estacional. Esto es similar a lo reportado por Dundon *et al*⁵⁸ donde encontraron una seroprevalencia del 0.7% en sueros de perros tomados durante la circulación del virus de influenza humana pandémico en el 2009, y a lo reportado recientemente por Damiani *et al*⁸⁶ utilizando la técnica de inmuno ensayo enzimático de captura (por sus siglas en inglés ELISA) con 0.13% de sueros positivos. El resultado de este estudio difiere a la prevalencia encontrada en Brasil⁸³, que fue de 15.27%, donde utilizaron un antígeno de influenza humana pero no el subtipo H1N1 del 2009, lo que podría explicar las diferencias en la proporción de positivos. Se menciona que las infecciones con virus de influenza humana en perros se dan de manera esporádica y que el virus no se encuentra circulando actualmente en esta especie. En este estudio son dos perros los que se identificó que tenían anticuerpos contra los subtipos humanos, aunque los perros están en contacto con humanos no se ha podido establecer la transmisión sostenida en esta población. Algunos estudios han demostrado que existen diferencias específicas en la virulencia de los diferentes aislamientos del subtipo H1N1pdm 09 de acuerdo con hospederos en los que se infecta. Estas variaciones sugieren que existen diferencias en la susceptibilidad de la infección con el subtipo H1N1⁸⁷. Los perros podrían estar infectándose con virus de influenza humana y equina de acuerdo a la susceptibilidad por edad, sexo o raza, sin embargo no se encontró evidencia estadística suficiente que asocie la seropositividad contra influenza equina con la edad, el sexo de los perros, ni si salen a la calle, y tampoco la seropositividad contra influenza humana en perros con la seropositividad en sus dueños. Podrían existir factores que estén asociados directamente a la infección, sin embargo no se han estudiado, por lo que podemos concluir que la infección en perros con virus de influenza humana se presenta de manera esporádica pero la convivencia con humanos positivos no es un factor de riesgo.

REFERENCIAS

1. Cheung TK and Poon LL. Biology of influenza A virus. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1102: 1-25.
2. King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ and Carstens EB. Part II: The negative sense single stranded RNA viruses. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* Elsevier Science, 2011.
3. Fields BN, Knipe DM and Howley PM. *Fields' Virology.* Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
4. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM and Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992; 56: 152-79.
5. Medina RA and Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9: 590-603.
6. Tsai K-N and Chen G-W. Influenza genome diversity and evolution. *Microbes Infect.* 2011; 13: 479-88.
7. Palese P. Influenza: old and new threats. *Nat Med.* 2004; 10: S82-7.
8. Tong S, Li Y, Rivaller P, et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 4269-74.
9. WHO. Influenza (seasonal) fact sheet N 211, Revised April 2009. 2011.
10. Webby R, Hoffmann E and Webster R. Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens. *Nat Med.* 2004; 10: S77-81.
11. Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, et al. Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science.* 2005; 310: 482-5.
12. Reperant LA, Kuiken T and Osterhaus AD. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine.* 2012; 30: 4419-34.
13. Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, et al. Influenza: emergence and control. *J Virol.* 2004; 78: 8951-9.
14. Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS and Grenfell BT. Host species barriers to influenza virus infections. *Science.* 2006; 312: 394-7.
15. Kuiken T, Fouchier R, Rimmelzwaan G, van den Brand J, van Riel D and Osterhaus A. Pigs, poultry, and pandemic influenza: how zoonotic pathogens threaten human health. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 719: 59-66.
16. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD and Fouchier RA. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science.* 2006; 312: 384-8.
17. Kida H, Ito T, Yasuda J, et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol.* 1994; 75 (Pt 9): 2183-8.
18. Scholtissek C. Pigs as 'Mixing Vessels' for the Creation of New Pandemic Influenza A Viruses. *Medical Principles and Practice.* 1990; 2: 65-71.
19. Tumpey TM, Maines TR, Van Hoeven N, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission. *Science.* 2007; 315: 655-9.
20. Daly JM, Blunden AS, Macrae S, et al. Transmission of equine influenza virus to English foxhounds. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 461-4.

21. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol.* 1998; 72: 7367-73.
22. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol.* 2000; 74: 8502-12.
23. Barrell EA, Pecoraro HL, Torres-Henderson C, Morley PS, Lunn KF and Landolt GA. Seroprevalence and risk factors for canine H3N8 influenza virus exposure in household dogs in Colorado. *J Vet Intern Med.* 2010; 24: 1524-7.
24. Yoon KJ, Cooper VL, Schwartz KJ, et al. Influenza virus infection in racing greyhounds. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1974-6.
25. Holt DE, Mover MR and Brown DC. Serologic prevalence of antibodies against canine influenza virus (H3N8) in dogs in a metropolitan animal shelter. *J Am Vet Med Assoc.* 2010; 237: 71-3.
26. Jirjis FF, Deshpande MS, Tubbs AL, Jayappa H, Lakshmanan N and Wasmoen TL. Transmission of canine influenza virus (H3N8) among susceptible dogs. *Vet Microbiol.* 2010; 144: 303-9.
27. Anderson TC, Bromfield CR, Crawford PC, Dodds WJ, Gibbs EP and Hernandez JA. Serological evidence of H3N8 canine influenza-like virus circulation in USA dogs prior to 2004. *Vet J.* 2012; 191: 312-6.
28. Payungporn S, Crawford PC, Kouo TS, et al. Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 902-8.
29. Rivaille P, Perry IA, Jang Y, et al. Evolution of canine and equine influenza (H3N8) viruses co-circulating between 2005 and 2008. *Virology.* 2010; 408: 71-9.
30. Hoelzer K, Murcia PR, Baillie GJ, et al. Intrahost evolutionary dynamics of canine influenza virus in naive and partially immune dogs. *J Virol.* 2010; 84: 5329-35.
31. Yamanaka T, Nemoto M, Bannai H, et al. No evidence of horizontal infection in horses kept in close contact with dogs experimentally infected with canine influenza A virus (H3N8). *Acta Vet Scand.* 2012; 54: 25.
32. Song D, Kang B, Lee C, et al. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 741-6.
33. Li S, Shi Z, Jiao P, et al. Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China. *Infect Genet Evol.* 2010; 10: 1286-8.
34. Teng Q, Zhang X, Xu D, et al. Characterization of an H3N2 canine influenza virus isolated from Tibetan mastiffs in China. *Vet Microbiol.* 2013; 162: 345-52.
35. Su S, Cao N, Chen J, et al. Complete genome sequence of an avian-origin H3N2 canine influenza A virus isolated in farmed dogs in southern China. *J Virol.* 2012; 86: 10238.
36. Lin Y, Zhao YB, Zeng XJ, Lu CP and Liu YJ. Complete genome sequence of an H3N2 canine influenza virus from dogs in Jiangsu, China. *J Virol.* 2012; 86: 11402.
37. Wang H, Jia K, Qi W, et al. Genetic characterization of avian-origin H3N2 canine influenza viruses isolated from Guangdong during 2006-2012. *Virus Genes.* 2013; 46: 558-62.
38. Sun Y, Sun S, Ma J, et al. Identification and characterization of avian-origin H3N2 canine influenza viruses in northern China during 2009-2010. *Virology.* 2013; 435: 301-7.

39. Su S, Yuan Z, Chen J, et al. Short communication: isolation and phylogenetic analysis of an avian-origin H3N2 canine influenza virus in dog shelter, China. *Virus Genes*. 2013; 46: 554-7.
40. Song D, Lee C, Kang B, et al. Experimental infection of dogs with avian-origin canine influenza A virus (H3N2). *Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 56-8.
41. Beeler E. Influenza in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2009; 39: 251-64.
42. Dubovi EJ and Njaa BL. Canine influenza. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2008; 38: 827-35, viii.
43. Larson LJ, Henningson J, Sharp P, et al. Efficacy of the canine influenza virus H3N8 vaccine to decrease severity of clinical disease after cochallenge with canine influenza virus and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18: 559-64.
44. Castleman WL, Powe JR, Crawford PC, et al. Canine H3N8 influenza virus infection in dogs and mice. *Vet Pathol*. 2010; 47: 507-17.
45. Deshpande MS, Jirjis FF, Tubbs AL, et al. Evaluation of the efficacy of a canine influenza virus (H3N8) vaccine in dogs following experimental challenge. *Vet Ther*. 2009; 10: 103-12.
46. Lu Z, Dubovi EJ, Zyllich NC, et al. Diagnostic application of H3N8-specific equine influenza real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of Canine influenza virus in clinical specimens. *J Vet Diagn Invest*. 2010; 22: 942-5.
47. Dubovi EJ. Canine influenza. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2010; 40: 1063-71.
48. Deshpande M, Abdelmagid O, Tubbs A, Jayappa H and Wasmoen T. Experimental reproduction of canine influenza virus H3N8 infection in young puppies. *Vet Ther*. 2009; 10: 29-39.
49. World Health Organization. Serological diagnosis of influenza virus infections by hemagglutination inhibition. *WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*. Geneva, Switzerland.: WHO Press, 2002, p. 37-9.
50. World Health Organization. Serological diagnosis of influenza by haemagglutination inhibition testing. *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2011, p. 59-62.
51. Anderson TC, Crawford PC, Katz JM, Dubovi EJ, Landolt G and Gibbs EP. Diagnostic performance of the canine Influenza A Virus subtype H3N8 hemagglutination inhibition assay. *J Vet Diagn Invest*. 2012; 24: 499-508.
52. Lee C, Jung K, Oh J, et al. Protective efficacy and immunogenicity of an inactivated avian-origin H3N2 canine influenza vaccine in dogs challenged with the virulent virus. *Vet Microbiol*. 2010; 143: 184-8.
53. Ning ZY, Wu XT, Cheng YF, et al. Tissue distribution of sialic acid-linked influenza virus receptors in beagle dogs. *J Vet Sci*. 2012; 13: 219-22.
54. Chang CP, New AE, Taylor JF and Chiang HS. Influenza virus isolations from dogs during a human epidemic in Taiwan. *Int J Zoonoses*. 1976; 3: 61-4.
55. Houser RE and Heuschele WP. Evidence of prior infection with influenza A/Texas/77 (H3N2) virus in dogs with clinical parainfluenza. *Can J Comp Med*. 1980; 44: 396-402.

56. Kilbourne ED and Kehoe JM. Demonstration of antibodies to both hemagglutinin and neuraminidase antigens of H3N2 influenza A virus in domestic dogs. *Intervirology*. 1975; 6: 315-8.
57. Nikitin A, Cohen D, Todd JD and Lief FS. Epidemiological studies of A-Hong Kong-68 virus infection in dogs. *Bull World Health Organ*. 1972; 47: 471-9.
58. Dundon WG, De Benedictis P, Viale E and Capua I. Serologic evidence of pandemic (H1N1) 2009 infection in dogs, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16: 2019-21.
59. Campagnolo ER, Rankin JT, Daverio SA, et al. Fatal pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus infection in a Pennsylvania domestic cat. *Zoonoses Public Health*. 2011; 58: 500-7.
60. Lohr CV, DeBess EE, Baker RJ, et al. Pathology and viral antigen distribution of lethal pneumonia in domestic cats due to pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *Vet Pathol*. 2010; 47: 378-86.
61. Lin D, Sun S, Du L, et al. Natural and experimental infection of dogs with pandemic H1N1/2009 influenza virus. *J Gen Virol*. 2012; 93: 119-23.
62. Song D, Moon HJ, An DJ, et al. A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea. *J Gen Virol*. 2012; 93: 551-4.
63. Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC and Bean WJ, Jr. Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect Immun*. 1981; 34: 354-61.
64. Reperant LA, Rimmelzwaan GF and Kuiken T. Avian influenza viruses in mammals. *Rev Sci Tech*. 2009; 28: 137-59.
65. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11: 201-9.
66. Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, et al. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology*. 2006; 344: 480-91.
67. Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, et al. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 681-3.
68. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10: 2189-91.
69. Thiry E, Zicola A, Addie D, et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Vet Microbiol*. 2007; 122: 25-31.
70. Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, et al. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 1744-7.
71. Maas R, Tacken M, Ruuls L, Koch G, van Rooij E and Stockhofe-Zurwieden N. Avian influenza (H5N1) susceptibility and receptors in dogs. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 1219-21.
72. Giese M, Harder TC, Teifke JP, et al. Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 308-10.
73. Chen Y, Zhong G, Wang G, et al. Dogs are highly susceptible to H5N1 avian influenza virus. *Virology*. 2010; 405: 15-9.
74. Amonsin A, Songserm T, Chutinimitkul S, et al. Genetic analysis of influenza A virus (H5N1) derived from domestic cat and dog in Thailand. *Arch Virol*. 2007; 152: 1925-33.

75. Daly JM, Lai AC, Binns MM, Chambers TM, Barrandeguy M and Mumford JA. Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J Gen Virol.* 1996; 77 (Pt 4): 661-71.
76. Lai AC, Chambers TM, Holland RE, Jr., et al. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Arch Virol.* 2001; 146: 1063-74.
77. Lewis NS, Daly JM, Russell CA, et al. Antigenic and genetic evolution of equine influenza A (H3N8) virus from 1968 to 2007. *J Virol.* 2011; 85: 12742-9.
78. Blitvich BJ, Ibarra-Juarez LA, Cortes-Guzman AJ, et al. Seroprevalence of equine influenza virus in north-east and southern Mexico. *Vet Rec.* 2010; 166: 565-6.
79. Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, Garcia-Rejon JE, et al. Antibodies to influenza and West Nile viruses in horses in Mexico. *Vet Rec.* 2010; 166: 22-3.
80. Said AW, Usui T, Shinya K, et al. A sero-survey of subtype H3 influenza A virus infection in dogs and cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 2011; 73: 541-4.
81. Serra VF, Stanzani G, Smith G and Otto CM. Point seroprevalence of canine influenza virus H3N8 in dogs participating in a flyball tournament in Pennsylvania. *J Am Vet Med Assoc.* 2011; 238: 726-30.
82. Kirkland PD, Finlaison DS, Crispe E and Hurt AC. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 699-702.
83. Mancini DA, Mendonca RM, Pereira AS, et al. Influenza viruses in adult dogs raised in rural and urban areas in the state of Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012; 54: 311-4.
84. Anderson TC, Crawford PC, Dubovi EJ, Gibbs EP and Hernandez JA. Prevalence of and exposure factors for seropositivity to H3N8 canine influenza virus in dogs with influenza-like illness in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 2013; 242: 209-16.
85. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 2009; 325: 197-201.
86. Damiani AM, Kalthoff D, Beer M, Muller E and Osterrieder N. Serological survey in dogs and cats for influenza A(H1N1)pdm09 in Germany. *Zoonoses Public Health.* 2012; 59: 549-52.
87. Memoli MJ, Tumpey TM, Jagger BW, et al. An early 'classical' swine H1N1 influenza virus shows similar pathogenicity to the 1918 pandemic virus in ferrets and mice. *Virology.* 2009; 393: 338-45.