



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

**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.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

CLAUDIA MARIANA PÉREZ RIVERA

Asesores:

MVZ José Iván Sánchez Betancourt

MVZ María Elena Trujillo Ortega

México, D.F.,

2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA.

A mis padres, Nancy Rivera Ortiz y Mario Alberto Pérez Hernández y a mi hermano Héctor Alberto por su amor, cariño, enseñanzas y por ser el mejor ejemplo en mi vida, por ser parte de esencial de mis logros, por ser mi núcleo y mi equilibrio.

A mi familia entera (abuelos, tíos y primos), por su compañía, porque sin la presencia de cada uno de sus integrantes ésta no sería igual, no sería maravillosa.

A esas personas que afortunadamente son ya parte de mi vida y que han aportado grandes cosas a ella, sobre todo a Beatriz Aburto, Mónica Acuautla, Toxihutl Ochoa, Beto Sánchez, Fran Miguel, Orlando Juárez.

Ayin gracias por tu apoyo, motivación, compañía, por los buenos momentos.

AGRADECIMIENTOS.

A mis asesores, Dra. María Elena Trujillo y Dr. Iván Sánchez por su orientación y consejos, por permitirme formar parte de este proyecto.

A la Dra. Rosalba Carreón y la Dra. Carmen Mercado por mostrarme parte del universo del diagnóstico clínico veterinario, por compartirme sus conocimientos, por su apoyo y lecciones. Gracias al los miembros del departamento de Producción Animal: Cerdos.

Y a todas las personas que han participado en éste trabajo y lo hicieron posible.

A mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por permitirme ser parte de ella, por alimentar mi alma, mi espíritu y mis conocimientos.

Al CFPPDF, por procurar mi crecimiento profesional, por darme la oportunidad de ejercer lo que más me gusta que es la Medicina Veterinaria.

CONTENIDO

CARÁTULA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CONTENIDO.....	IV
RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	2
1.1.1 ANTECEDENTES EN MÉXICO.....	3
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	5
1.3 SIGNOS CLÍNICOS	9
1.4 LESIONES MACROSCÓPICAS.....	10
1.5 LESIONES MICROSCÓPICAS	10
1.6 EPIDEMIOLOGÍA.....	11
1.7 DIAGNÓSTICO	14
2.0 JUSTIFICACIÓN.....	16
3.0 HIPÓTESIS	17
4.0 OBJETIVOS.....	18
5.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 PRUEBA SEROLÓGICA.....	19
5.2 AISLAMIENTO VIRAL.....	20
5.3 EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL	21
5.4 INICIADORES PARA LA RT-PCR MÚLTIPLE	22
5.5 TRANSCRIPTASA REVERSA (RT) Y RT-PCR MÚLTIPLE.....	22
5.6 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	23
6.0 RESULTADOS.....	24
6.1 RESULTADOS DE SEROLOGÍA.....	24
6.1 RESULTADOS DE AISLAMIENTO VIRAL Y RT-PCR.....	27
7.0 DISCUSIÓN	29
8.0 CONCLUSIONES	33

9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS35

FIGURAS.

Figura 1. Estructura del Virus de Influenza.....6

Figura 2. Porcentaje de positivos y negativos para el subtipo H1N124

Figura 3. Distribución de los títulos de anticuerpos contra VIP H1N125

Figura 4. Porcentaje de positivos y negativos para el subtipo H3N2.....26

Figura 5. Distribución de los títulos de anticuerpos contra VIP H3N226

CUADROS.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados22

Cuadro 2. Número de sueros y porcentaje de positivos al VIP24

Cuadro 3. Rango y moda de los títulos de anticuerpos en sueros porcinos positivos a VIP.....25

Cuadro 4. Muestras sospechosas al aislamiento viral en el primer pase27

Cuadro 5. Subtipos virales detectados a través de RT-PCR.....27

RESUMEN

PÉREZ RIVERA CLAUDIA MARIANA. 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. (Bajo la dirección de Dr. José Iván Sánchez Betancourt y Dra. María Elena Trujillo Ortega).

La influenza porcina (IP) es una enfermedad causada por un virus ARN de la familia *Orthomyxoviridae*, que ha cambiado de ser un padecimiento estacional ocasionado por un genotipo viral estable, para convertirse en una enfermedad respiratoria de incidencia constante causada por múltiples genotipos que se encuentran bajo continuo cambio. Los cerdos son afectados principalmente por los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2. En México ésta enfermedad ha sido diagnosticada primordialmente en granjas comerciales, sin embargo a partir del brote epidémico en humanos es necesario identificar el papel que juegan los cerdos de traspatio en la dinámica de infección. El objetivo de éste trabajo fue determinar la seroprevalencia e identificar los subtipos del virus de influenza que afectan a los cerdos de traspatio de la comunidad de La Gloria, en Veracruz mediante las técnicas diagnósticas de inhibición de la hemoaglutinación y RT-PCR a partir de muestras de suero e hisopos nasales respectivamente.

Los resultados de la serología arrojaron los siguientes datos: de 142 sueros analizados, 129 fueron positivos para el subtipo H1N1 representando el 90.8%, mientras que para el subtipo H3N2 hubo una seroprevalencia del 94.4% (134 sueros positivos). La moda de títulos para el primer subtipo fue de 1:80 y 1:320 para el segundo. De 28 aislamientos sospechosos en embrión de pollo de 9 a 11 días de edad, se lograron identificar diez muestras positivas hacia el subtipo H1N1 y siete para H3N2, las once restantes fueron negativas al virus de influenza porcina, utilizando la técnica de RT-PCR.

Podemos concluir que contrario a lo que se creía, en los cerdos de traspatio de La Gloria, Veracruz el VIP se encuentra ampliamente distribuido y su circulación es constante; esto resalta la importancia estudiar las enfermedades de los porcinos en sistemas de producción de traspatio de las comunidades rurales, ya que podrían jugar un papel importante en la dinámica de infección con otras especies.

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.

1.0 INTRODUCCIÓN.

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

La primera referencia de un padecimiento identificable como influenza fue en el año 492 A.C. hecha por Hipócrates (1,2). Más tarde, durante la Edad Media, se describieron numerosos episodios relacionables con este mal (1). En América, la descripción de un problema respiratorio severo de este tipo se documentó en Texcoco, en 1552, y se le denominó "pestilencia catarral" (3,4). La primera pandemia reconocida ocurrió en Italia en 1580, describiéndola como la "influenza planetaria", de ahí se derivó el nombre actual de influenza (2). Sin embargo no fue hasta que se describiera claramente en 1793, después de una epidemia en el mismo año por Robert Johnson que la enfermedad ha recibido considerable atención. Respecto a la etiología, el investigador alemán Richard Pfeiffer estudió la expectoración de pacientes con cuadro clínico de influenza, detectando gran cantidad de bacterias, éste hecho llevó al investigador a plantear erróneamente una etiología bacteriana de la enfermedad (5).

En el año de 1918 en el medio oriente de Estados Unidos una nueva enfermedad aparecía en los cerdos, su presentación fue a la par con la

pandemia gripal que ocasionó la muerte de mas de 20 millones de personas (6). En el mismo año Koen observó la coincidencia del padecimiento de los cerdos con la gripe humana, además del parecido de los signos clínicos, y fue él quien dio el nombre de “*flu*” a este nuevo mal porcino, describiéndola como una enfermedad epidémica enteramente nueva, sugiriendo que la infección de los cerdos procedía de la humana, publicándolo en Journal Veterinary Medicine en 1919. Dorset *et al.*, 1922 y McBryde 1927 fueron quienes describieron diversos aspectos de la enfermedad como signos clínicos, lesiones y ciclo biológico (5,7).

En 1930, el virus de influenza porcina (VIP) fue aislado e identificado por Shope, también fue el primero en reproducir la influenza en cerdos sanos, inoculando material obtenido de cerdos enfermos que había sido filtrado mediante la cámara de Pasteur-Chamberland. Ésta fue la primera evidencia de una etiología viral de la influenza porcina (5).

Los primeros avances en el diagnóstico los dio Burnet, quien introdujo el uso de huevos fecundados como medio de cultivo, y posteriormente Hirst con la hemoaglutinación como método diagnóstico para la infección por influenza (5).

1.1.1 ANTECEDENTES EN MÉXICO.

En el 2003 Álvarez *et. al.*, realizaron un estudio en la zona centro del Estado de Yucatán en 25 granjas porcinas de ciclo completo. El número de cerdos muestreados por granja fue de 40, diez por cada etapa de producción (destete, crecimiento, desarrollo y finalización). Se realizó la prueba de inhibición de la

hemoaglutinación (IH) para los subtipos H1N1 y H3N2. El 56% de las granjas fueron positivas para VIP, mientras que 8.3% y 65.1% de los sueros resultaron positivos a los subtipos H1N1 Y H3N2 respectivamente y el 6.6% de los sueros compartieron los dos subtipos de Influenza Porcina (IP), lo que representa un riesgo de intercambio de material genético, ya que la infección simultánea de una célula con dos diferentes subtipos de VIP podría iniciar un intercambio de segmentos del genoma, originando un subtipo con reacomodo genético (8).

En el 2005 se analizaron sueros de diferentes estados de la República Mexicana para determinar la presencia de anticuerpos contra el VIP subtipo H3N2. Los resultados serológicos del estudio revelaron una seroprevalencia general del 43% (796 sueros positivos), siendo el estado de Puebla el que presentó mayor seroprevalencia (85%) y como segundo lugar el estado de Veracruz reportando un 65% de sueros positivos y también ocupando el segundo lugar en número de sueros con el título más alto, el cual fue de 1:1,280 (9).

En un estudio de seroprevalencia del año 2006 realizado para el subtipo H3N2 del VIP a partir de 600 sueros de cerdos de pie de cría y engorda de tres sistemas distintos de producción, se encontró que de los trescientos sueros analizados por etapa, el 47 % de los animales en pie de cría eran seropositivos y en la etapa de engorda el 47.6 % lo cual no mostró diferencia estadística por etapas, pero para el sistema de traspatio el promedio de los títulos de anticuerpos fue de 1:60 y la seroprevalencia del 50% (10).

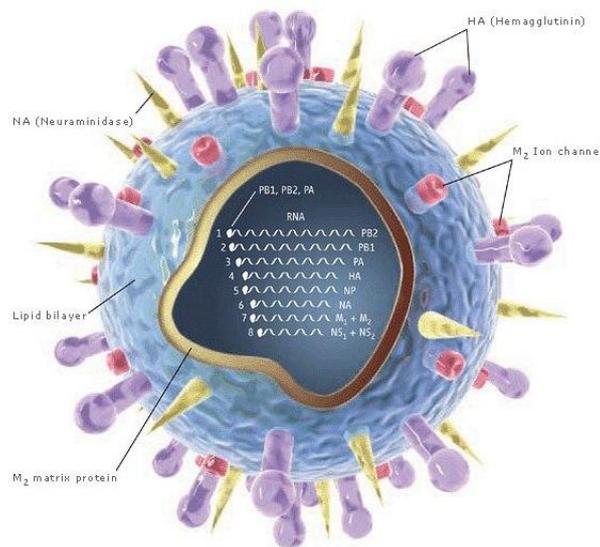
Por otro lado en nuestro país el primer informe del predominio de anticuerpos del VIP en humanos se realizó en el 2005 en el estado de Yucatán en personas de la comunidad “Maxcanu” donde llevan a cabo de forma tradicional la producción de animales de traspatio, principalmente cerdos, pavos, patos y pollos. Se tomaron 115 muestras de sangre y por medio de la prueba de IH se determinó que la seropositividad era: 26.9% a A/Bayern/7/95 (H1N1), 40.8% a A/Sydney/5/97 (H3N2), 1.7% a A/Swine/Wisconsin/238/97 (H1N1), y 79.1% a A/Swine/Minnesota/ 593/99(H3N2) (11).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

El virus de la influenza porcina pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* que comprende tres géneros antigénicamente distintos: Influenza virus A, Influenza virus B e Influenza virus C. La clasificación de los distintos tipos: A, B y C se basa en los antígenos de la nucleoproteína (NP) y de la proteína M (Matriz) (12, 13, 14). La partícula vírica de influenza forma estructuras pleomórficas o esféricas (15) y contiene un genoma de ocho segmentos de ARN (ácido ribonucleico) de cadena sencilla y de polaridad negativa (2), los cuales codifican 10 proteínas víricas. La nucleoproteína (NP) forma parte estructural del virus y se encuentra unida a las cadenas de ARN, que en el microscopio electrónico, se observan como estructuras helicoidales. La envoltura viral es lipídica, se deriva de la membrana plasmática de la célula infectada y contiene 2 glicoproteínas de superficie. Su clasificación en subtipos se debe a éstas 2 proteínas existentes, la hemaglutinina (H), de la que se conocen 16 variedades, y la neuraminidasa (N) de la que existen 9 variedades. (12, 13, 15, 16). Dos

proteínas no estructurales NS1 y NS2 están implicadas en la regulación numerosos aspectos del ciclo de vida de virus, y las proteínas PA, PB1 y PB2 son responsables de la replicación viral y finalmente dos proteínas de membrana, M1 y M2 están involucradas en la exportación nuclear y el mantenimiento del pH, respectivamente, entre muchas otras actividades (17).

Figura 1. Estructura del Virus de Influenza.



FUENTE: http://infoaleph.files.wordpress.com/2009/05/diagram_virus.jpg

Las proteínas que se encuentran en la superficie del virus (HA y NA) son también el objetivo primario de sistema inmune en el humano y cerdo, además de su importancia pues la hemaglutinina, adquiere su nombre porque provoca la aglutinación de los glóbulos rojos, el eritrocito no es la célula que normalmente infecta este virus, pero contiene en su superficie de membrana ácido siálico, el mismo componente que presentan las células de la mucosa del tracto respiratorio y que son blanco del antígeno (13). También la hemaglutinina, es la responsable de la unión del virus a las células así como de la fusión de membranas, además de servir para el reconocimiento antigénico

que induce la respuesta inmune (18). Por otra parte la neuraminidasa es responsable de la elución enzimática del virus de los eritrocitos y puede jugar algún papel en la liberación del virus de las células infectadas. Los anticuerpos antihemaglutinina son de mayor importancia en la prevención de la infección con un virus de influenza que contienen la misma hemaglutinina, mientras que los anticuerpos contra neuraminidasa restringen la diseminación del virus a partir de células infectadas (6).

El virus de influenza experimenta cambios constantes, esto es debido a la continua evolución que le permite adaptarse al hospedero y a las condiciones ambientales; se presenta con mayor frecuencia en las glicoproteínas de superficie, pero también ocurre en cada uno de los 8 segmentos del ARN viral. Estos cambios estructurales son resultado de la acumulación de cambios genéticos y eso puede llegar a ocurrir por un gran número de diferentes mecanismos incluyendo:

1. Mutaciones puntuales (antigenic drift).
2. Reordenamiento genético (genetic shift).
3. Interferencias defectuosas de partículas y recombinaciones de ARN.

Cada uno de estos mecanismos contribuye a la evolución del virus de influenza. Las mutaciones se presentan como sustitución de nucleótidos, deleciones e inserciones de una o más bases que son de los más importantes mecanismos para producir variaciones en el virus. Generalmente la forma de lectura de la ARN polimerasa contribuye a la replicación de errores en el orden de las bases, en contraste con la fidelidad en la replicación de la ADN (ácido

desoxirribonucleico) polimerasa, la primera en cada ciclo de replicación del virus puede causar variantes que muchas de ellas no son viables, pero otras llegan a ser potencialmente ventajosas (14,16, 19).

El virus de la influenza porcina afecta a cerdos de todas las edades, los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 son los más comunes y los de mayor relevancia patológica para la especie y forma parte del Complejo Respiratorio Porcino (CRP) cuando se asocia con otros agentes infecciosos como el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo (PRRS), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Circovirus Porcino 2 (PCV2), entre otros, lo que ocasiona cambios en la conversión alimenticia con la disminución de: la tasa de crecimiento, ganancia diaria de peso, consumo de alimento y el peso de los animales al mercado (8), además de provocar abortos, repeticiones de celo, muertes por neumonías complicadas, entre otras afecciones.

La denominación internacional de los virus de influenza debe indicar: a) el género (tipo) del virus; b) la especie animal (en inglés) de la que se aisló – excepto cuando procede de humanos–; c) el lugar del aislamiento; d) el número de caso del laboratorio; e) el año del aislamiento; y f) el subtipo de HA y NA del virus entre paréntesis (6). Los virus que tienen mezclas de genes de diferentes virus de influenza A se denominan genotipos y las variaciones genéticas dentro de un mismo subtipo de virus se denominan linajes (20).

1.3 SIGNOS CLÍNICOS.

Los signos clínicos que se observan en la actualidad son esencialmente los mismos que cuando se describieron en los años 20 y 30 (Dorset *et al* 1922; McBryde 1927; Shope 1930) (6), pero cabe señalar que la severidad de éstos y el pronóstico varía dependiendo de la dosis infectante, la virulencia de la partícula viral, el estado inmune de los animales infectados (edad, estado fisiológico y salud del hato afectado) (21) y la asociación del VIP con otros virus o bacterias como parte del complejo respiratorio porcino (CRP). La presencia de éste complejo tiene un efecto negativo en los indicadores de producción, ocasionando disminución en la tasa de crecimiento, en la ganancia diaria de peso, afectando la conversión alimenticia y en el consumo y retrasando la llegada de los animales al mercado y con ello pérdidas económicas para los poricultores (8).

Los animales que logran recuperarse de CRP quedan como portadores de éstos agentes, siendo así diseminadores del problema (8).

El comienzo de los signos clínicos es súbito, después de un periodo de incubación de 1-3 días hay anorexia, inactividad, postración, fiebre (42°C), depresión, tos, estornudos, secreción nasal, epifora, disnea y polipnea. La morbilidad es alta (100%), pero la mortalidad suele ser baja (1%) a menos que haya otras infecciones o los cerdos sean demasiado jóvenes. En general la recuperación comienza de cinco a siete días después del inicio y es tan súbita y notable como el comienzo (6, 22). Dependiendo de la fase de gestación, las hembras afectadas pueden presentar repeticiones, abortos, disminución del

tamaño de la camada y baja viabilidad de los lechones recién nacidos, asociada principalmente al subtipo H3N2 (8,14, 23).

En los machos, la elevación de la temperatura corporal puede provocar efectos adversos sobre la espermatogénesis, lo que provoca una fertilidad reducida (14).

1.4 LESIONES MACROSCÓPICAS.

Las lesiones encontradas en la IP no complicada son fundamentalmente las correspondientes a una neumonía vírica. Los cambios se limitan a menudo a los lóbulos apical y cardiaco de los pulmones, aunque en casos graves más de la mitad del órgano puede estar afectada. Las vías aéreas pueden estar llenas de exudado fibrinoso teñido de sangre y los ganglios mediastínicos y los bronquios suelen verse agrandados, edematosos y ocasionalmente congestionados (6, 24, 25).

1.5 LESIONES MICROSCÓPICAS.

Histológicamente se puede observar degeneración diseminada, necrosis del epitelio de bronquios y bronquiolos, alvéolos con exudado e infiltración de neutrófilos, hiperemia con dilatación de capilares, infiltración de los tabiques alveolares con linfocitos y células plasmáticas, proliferación de neumocitos tipo

2 y formación de membrana hialina en la luz de los conductos alveolares (6, 25).

1.6 EPIDEMIOLOGÍA.

La influenza porcina (IP) ha cambiado de ser un padecimiento estacional ocasionado por un genotipo viral estable, para convertirse en una enfermedad respiratoria de incidencia constante causada por múltiples subtipos que se encuentran bajo continuo cambio (26); éstos genotipos están presentes en aves acuáticas silvestres y llegan a diferentes especies de mamíferos de manera directa o a través de aves domésticas; mamíferos marinos como focas y ballenas son afectados al igual que (27,28,29) mamíferos terrestres entre los que se encuentran cerdos (30), caballos (31), tigres y leopardos (32), y en fecha reciente perros (33). Además se sabe que las aves acuáticas fueron el reservorio del virus prototipo y son un reservorio importante para la generación de nuevos subtipos, así mismo se sabe que el virus coloniza las células intestinales sin causar signos de la enfermedad , excretándose en altas concentraciones por las heces siendo un gran riesgo pues éstos virus se han aislado del agua de los lagos, lo que indica que las aves acuáticas tienen gran potencial para transmitir el virus contaminando las fuentes de agua que pueden ser de consumo humano y animal. El virus de influenza es estable por lo menos durante 4 semanas en agua a 4°C y durante 5 días en agua a 20 °C, propiedades que facilitan la transmisión (14, 34).

Así mismo el cerdo sirve como reservorio de H1N1, H1N2 y H3N2, y a menudo está implicado en la transmisión interespecies de estos virus. La prevalencia del agente en los cerdos y la introducción de nuevos a través de otras especies puede ser importante para la generación de subtipos pandémicos, pues el cerdo es el único animal doméstico que es susceptible y permite la replicación de virus de influenza de origen aviar y humano, gracias a que el cerdo posee en su epitelio traqueal ambos receptores específicos para los 2 subtipos virales (35).

En poblaciones porcinas los brotes de influenza suelen asociarse a la movilización de animales y la introducción de pies de cría infectados a una piara susceptible. Usualmente se presenta como un brote explosivo, enfermándose todos los cerdos de la piara al mismo tiempo, dado que la vía de transmisión es directa cerdo a cerdo por vía nasal, la propagación es rápida, pues las secreciones nasales están cargadas de virus durante las fases febriles agudas de la infección que duran aproximadamente 1-3 días, proporcionando una fuente abundante para infectar a animales susceptibles (6).

Una vez que la infección ha aparecido en cualquier lugar donde hay cerdos y no se lleva a cabo despoblación total existe la posibilidad de circulación continua de virus (Madec y col. 1980). En regiones densamente pobladas de cerdos, la diseminación por aire puede contribuir a las epidemias explosivas en grandes áreas geográficas, en particular en áreas con una población inmunológicamente susceptible (6).

De acuerdo a observaciones, estudios e información que se ha obtenido de los virus de influenza A, han puesto en manifiesto un ciclo epidemiológico complejo caracterizado por:

1. Varios grados de relación antigénica entre los virus que afectan a diferentes especies.
2. Diversos niveles de infectividad para diferentes especies y transmisión interespecies.
3. La observación de que diferentes subtipos de influenza que infectan a un solo individuo pueden recombinarse para formar un nuevo subtipo viral (14).

Éstas características nos indican que además de su importancia veterinaria, la influenza es un problema de salud pública debido a su capacidad de transmisión interespecies, entre éstas el hombre, como en el caso de Fort Dix (Nueva Jersey, 1976) donde un virus de influenza derivado de una cepa endémica en los cerdos se aisló de cinco soldados que sufrían cuadro respiratorio agudo, de los que uno murió (14, 35).

Se ha probado que las recombinaciones de los virus de influenza A de las personas, los cerdos, pollos y pavos pueden darse en condiciones que simulaban la de la naturaleza. En una serie de experimentos, se permitió que los virus de influenza se diseminaran de una forma natural desde animales infectados experimentalmente a animales en contacto. En todos los experimentos se aislaron virus recombinantes de los animales en contacto (14).

1.7 DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico clínico de una infección por el virus de influenza sólo puede realizarse de forma presuntiva dado que no existen signos patognomónicos. Además la infección puede presentarse de forma aguda o pueden existir casos subclínicos atípicos, en especial en las poblaciones que poseen inmunidad parcial (14). Por ello hay diferentes pruebas diagnósticas que determinan la presencia del VIP y aunque la detección de éste en secreciones nasales o directamente en el pulmón de animales afectados clínicamente es considerado un diagnóstico definitivo, la serología es una herramienta que nos ayuda a detectar a través de anticuerpos a aquellos animales que estuvieron expuestos al virus, pues debido a que la enfermedad tiene un curso muy corto y el agente se hace prácticamente imperceptible en secreciones nasales o en pulmones, es una opción bastante viable (14).

La serología también es utilizada para obtener datos acerca del estado inmunológico de la pira en diferentes etapas realizando muestreos pareados, así como determinar la respuesta de los animales a la vacunación, entre otras cosas.

Dentro de las pruebas serológicas que existen para la detección de anticuerpos contra el VIP se encuentran: la inhibición de la hemoaglutinación, seronuetralización y la prueba ELISA; pero de éstas la IH ha sido la más utilizada en medicina veterinaria para el diagnóstico en laboratorio del VIP, además de ser considerada la prueba estándar por la Office International des Epizooties (OIE, (14, 36).

La IH se basa en la capacidad del VIP de aglutinar glóbulos rojos y está diseñada para detectar anticuerpos específicos contra la HA, por ello es posible detectar diferentes subtipos como, H1N1 y H3N2, siempre y cuando la prueba se realice de manera independiente con los antígenos adecuados. Sus mayores inconvenientes son la sensibilidad a los inhibidores no específicos presentes en los sueros y las reacciones cruzadas entre las cepas del mismo subtipo (14, 37)

Por otro lado existe una herramienta diagnóstica que se utiliza para identificar de manera rápida el virus a partir de hisopos nasales, de suero o de pulmón, ésta es la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction). Su elevada sensibilidad y especificidad, la convierten en una excelente técnica base para la caracterización genética de los virus, ya que se utiliza para evidenciar la presencia del ácido nucléico vírico, pues consiste en convertir el ARN del VIP a ADN utilizando una enzima conocida como transcriptasa reversa, con ello se logra un ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario), después se inicia el reconocimiento y la amplificación repetitiva de una fracción de ADN utilizando sondas de oligonucleótidos o iniciadores (37). La visualización de los resultados de ésta técnica se realiza en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio dentro de una cámara de luz ultra violeta.

2. JUSTIFICACIÓN.

La enfermedad de influenza porcina en México ha sido diagnosticada principalmente en granjas comerciales, sin embargo a partir del brote epidémico en humanos es necesario identificar el papel que juegan los cerdos de traspatio en la dinámica de infección de los virus de influenza, por tal motivo se pretende determinar si existe circulación viral de los subtipos estacionales en cerdos como el H1N1 y H3N2.

La comunidad elegida para el estudio tiene la particularidad de encontrarse muy cercana al valle de Perote, zona fronteriza entre los estados de Veracruz y Puebla y resulta de gran importancia para la porcicultura pues ahí opera una compañía dedicada a la producción comercial de cerdos para abasto participando anualmente con el 12% de la producción nacional, equivalente a más de un millón de cabezas (40).

3. HIPÓTESIS.

La seroprevalencia de los subtipos de influenza porcina en animales de traspatio es menor al 30%, debido a la falta de vacunación y a la poca diseminación del virus en poblaciones de cerdos en granjas de traspatio, las cuales cuentan con muy pocos cerdos en comparación con granjas tecnificadas.

4. OBJETIVOS.

1. Determinar la seroprevalencia en cerdos de traspatio de la comunidad de La Gloria, Veracruz hacia los subtipos H1N1 y H3N2.
2. Determinar el subtipo viral presente en los cerdos a través de RT-PCR múltiple.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Las muestras del estudio correspondieron al banco de sueros de Departamento de Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, las cuales fueron colectadas durante un censo de población de cerdos de traspatio de la comunidad La Gloria, Veracruz durante el mes de junio del 2009; el total de cerdos muestreados fueron 147, de los cuales se obtuvieron hisopos de exudado nasal y 142 sueros pues 5 de los animales no se logró obtener muestra de sangre, por ser muy pequeños o encontrarse en gestación.

No se tienen antecedentes de vacunación en los animales de la comunidad, contra influenza porcina, ni contra alguna otra enfermedad.

5.1 PRUEBA SEROLÓGICA.

Para la detección de anticuerpos se realizó la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación, conforme al protocolo de Znyder M. 1981. Realizando diluciones seriadas de 1:10 hasta 1:1280, de las cuales se consideraron como positivos aquellos sueros que presentaron sedimentación en la dilución mayor o igual a 1:80 y negativos aquellos con títulos inferiores a 1:80.

5.2 AISLAMIENTO VIRAL.

Para el aislamiento del virus a partir de las 147 muestras de hisopos nasales de cada animal se realizaron los siguientes pasos:

1. Se descongelaron las muestras y se filtraron en prefiltros y microfiltros de Millipore hasta llegar a un diámetro de 0.22 micras, dentro la campana de flujo laminar.
2. Lo que se obtuvo de la filtración se colocó en tubos ependorff estériles y fueron identificados con plumón de tinta indeleble.

Para el aislamiento del VIP se utilizaron embriones de pollo (Libres de Patógenos Específicos) de 9 a 11 días de edad uno por muestra.

- a. Se ovoscopiaron los embriones y la cámara de aire, así como la posición del embrión fueron marcadas.
- b. Se desinfectó con alcohol el área de la cámara de aire y se perforó del lado opuesto al embrión.
- c. Se inocularon 200 μ l del filtrado obtenido de los hisopos nasales y se selló con pegamento líquido.
- d. Se incubaron a 37°C.
- e. A las 24 horas se revisaron y los embriones muertos se eliminaron.
- f. A las 48 horas se revisaron los embriones y se recolectaron aproximadamente 200 μ l de líquido corioalantoideo y se colocó en una placa de 24 pozos para hacer prueba de aglutinación individual para comprobar la presencia de virus.

- g. Para la aglutinación se utilizaron eritrocitos de ave al 0.5% y se colocaron en cada pozo 200 μ l, se dejaron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos y se revisó al microscopio.
- h. En aquellos pozos donde se localizó aglutinación, se identificaron los filtrados y se separaron del grupo, para realizar la detección y subtipificación por RT-PCR que a continuación se describe.

5.3 EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL.

Posterior al aislamiento viral se realizó la extracción de ARN viral a partir de las muestras filtradas de los hisopos nasales que resultaron positivos a la prueba de aglutinación de la siguiente manera:

Se tomaron 200 μ l de muestra y se colocaron en un tubo ependorff, se añadieron 25 μ l de Proteinasa K, 200 μ l de solución de lisis y 5 μ l de RNA acarreador, se homogenizó en el agitador tipo Vortex durante 15 segundos y se dejó incubar 15 minutos a 56°C. Posteriormente se centrifugó a velocidad máxima (14,000 rpm) por 15 segundos, se retiró la muestra de la centrífuga para añadirle 250 μ l de etanol absoluto volviendo a homogenizar en el agitador tipo Vortex. El contenido íntegro del tubo ependorff se transfirió a un tubo con microfiltro, se centrifugó a 6,800 rpm durante un minuto, se desechó el sobrenadante, se agregaron 500 μ l de solución de lavado y se volvió a centrifugar a 6,800 rpm durante un minuto, se desechó el sobrenadante y se repitieron los 2 pasos anteriores, posteriormente se centrifugó a velocidad máxima durante un minuto, se desechó el tubo con el sobrenadante y el microfiltro se cambió a un nuevo tubo ependorff donde se añadieron 40 μ l de agua estéril libre de

RNAasa, finalmente se centrifugó durante un minuto a 14,000 rpm y se desechó el microfiltro, quedando en el tubo ependorff al ARN(Kit PureLink de Invitrogene).

5.4 INICIADORES PARA LA RT-PCR MÚLTIPLE.

Se utilizaron de iniciadores (forward y reverse) para cada uno de los genes H1, N1, H3, N2, descritos en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Iniciadores utilizados.

INICIADOR	NOMBRE DEL VIRUS	SECUENCIA (5`-3`)
H1F	A/swine/NewJersey/11/76 (H1N1)	GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT
H1R		GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A
N1F		TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA
N1R		TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG
H3F		GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G
H3R	A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2)	CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A
N2F		TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C
N2R		CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T

5.5 TRANSCRIPTASA REVERSA (RT) Y RT-PCR MÚLTIPLE.

Se realizaron bajo el protocolo descrito por Beltrán *et al.*, 2008.

5.6 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.

Con los datos arrojados se obtuvieron los: Rangos de los títulos de anticuerpos, la media geométrica, moda, número de animales positivos y negativos y porcentaje de positividad.

Así mismo se obtuvo el número de aislamientos virales del total de las muestras procesadas y porcentaje de aislamientos positivos, que fueron confirmados mediante la técnica de RT-PCR.

6. RESULTADOS.

6.1 RESULTADOS DE SEROLOGÍA.

De las 142 muestras de suero porcino analizadas, se obtuvo el 92.6% global de seropositividad para ambos subtipos (Cuadro 2).

Como se puede observar en el Cuadro 2 y la Figura 2, de las 142 muestras 129 fueron positivas al serotipo H1N1, lo que representa el 90.8%, mientras que para el serotipo 2 se obtuvo el 94.4 % de seropositividad con 134 sueros positivos, como se muestra en la Figura 3.

Cuadro 2. Número de sueros y porcentaje positivos al VIP.

Muestras	H1N1 (%)	H3N2 (%)	Promedio (%)
142	129 (90.8%)	134 (94.4%)	92.6%

Figura 2.

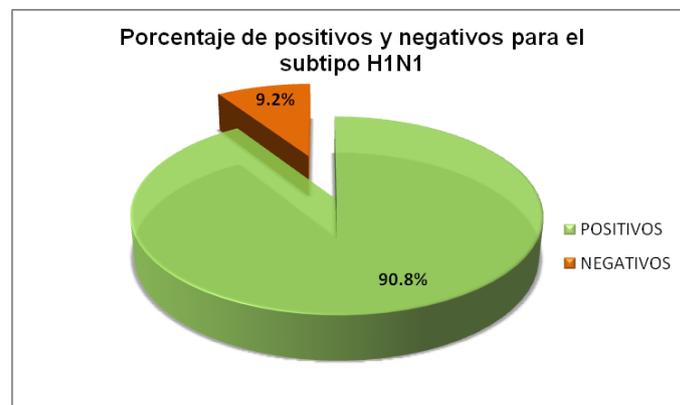


Figura 3.



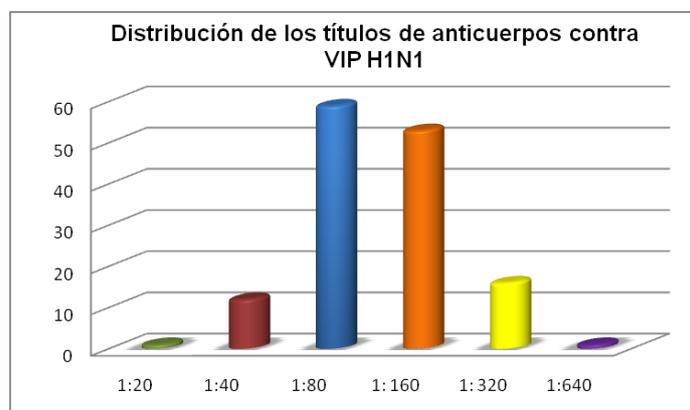
En el Cuadro 3 se puede observar que el rango de títulos para el subtipo H1N1 es menor que para el subtipo H3N2, así como la moda de títulos es de 1:320 para éste último.

Cuadro 3. Rango y moda de los títulos de anticuerpos en sueros porcinos positivos a VIP.

Subtipo	Moda	Título		Desviación Estándar
		Mínimo	Máximo	
H1N1	1:80	1:20	1:640	89.73
H3N2	1:320	1:20	1:1280	305.91

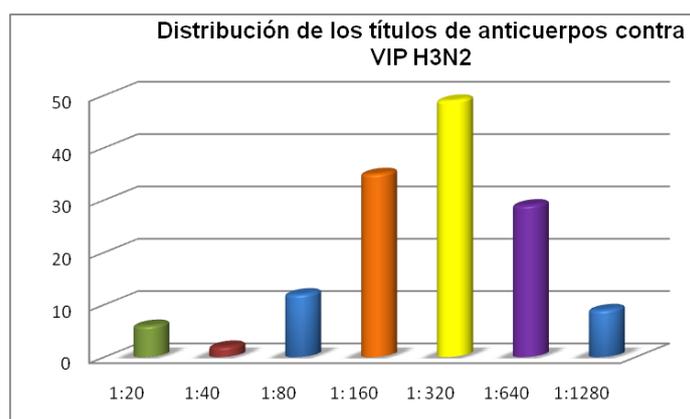
En la Figura 4 se puede apreciar que la distribución de los títulos de anticuerpos para H1N1 se centra en 1:80 y 1:160, abarcando más del 78% de los sueros positivos para dicho subtipo.

Figura 4.



En la Figura 5 se observa que la distribución de títulos de anticuerpos para el subtipo H3N2 se centra en títulos que van de 1:160 a 1:640, viendo así que los títulos obtenidos en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación son más altos en comparación con el subtipo H1N1.

Figura 5.



6.2 RESULTADOS DEL AISLAMIENTO VIRAL Y RT-PCR.

Las pruebas de aislamiento viral realizadas en embriones de pollo a través de los 147 hisopos de exudado nasal, dieron como resultado 28 muestras

positivas para virus aglutinante de eritrocitos aviares. Éstos 28 aislamientos fueron analizados bajo la técnica de RT-PCR múltiple hacia los genes H1, H3, N1 y N2, para así poder identificar los tres subtipos virales presentes en los cerdos (H1N1, H3N2 y H1N2) obteniendo los siguientes datos (Cuadro 4):

Cuadro 4.

Muestras sospechosas al aislamiento viral en el primer pase	Positivos	Totales	%
	28	147	19.95 %

En el cuadro 5 se aprecia que de las 28 muestras que fueron positivas en el aislamiento viral en embrión de pollo, 10 de ellas resultaron mediante la prueba de RT-PCR positivas al subtipo H1N1 y siete al subtipo H3N2, las once restantes fueron negativas al virus de influenza porcina.

Cuadro 5. Subtipos virales detectados a través de RT-PCR

Tipo	Número	Porcentaje
H1N1	10	35.71%
H3N2	7	25%
Negativas	11	39.28%

Las 119 muestras que resultaron negativas en el primer pase del aislamiento viral en embrión de pollo, fueron sometidas a un segundo pase resultando nuevamente negativas.

7. DISCUSIÓN.

Como ya se ha mostrado en diversos estudios, el cerdo es la especie que actúa como el mayor reservorio de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 del virus de influenza, provocando una de las enfermedades de más alta morbilidad que repercute directamente en los parámetros productivos (8), ya que llega a provocar abortos, repeticiones, camadas pequeñas, alteración en la producción

espermática, puede también aumentar los días para alcanzar el peso para la venta, pues disminuye el consumo de alimento y afecta la conversión alimenticia; y cuando la enfermedad se asocia con otros agentes patógenos, ya sean virales o bacterianos éstos signos se agravan y aumenta la mortalidad impactando aun más en la economía de los productores (8,14,23).

En el presente éste patógeno ha recibido mayor atención por la actual pandemia existente. A pesar de ello se hallan pocos reportes acerca de la seroprevalencia de éste agente en animales de traspatio; por éstas razones es importante analizar todas aquellas herramientas diagnósticas aplicables y disponibles hoy en día que faciliten la detección oportuna y mayormente precisa sobre la dinámica de la infección, sobre todo en éste tipo de sistema de producción que no ha sido estudiado con detenimiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos, del total de muestras analizadas (142 sueros), el 90.8% fueron positivas para H1N1 y el 94.4% para H3N2, a pesar de que éstos resultados no coinciden con los obtenidos por Jiménez N. 2006, donde la seropositividad para el subtipo H3N2 fue en promedio del 50% en animales de traspatio; en ambos estudios la seroprevalencia es más alta de lo esperado en un sistema rural, pues se cree que la circulación viral es menor en animales de traspatio, ya que no se lleva a cabo un calendario de vacunación, no se encuentran en hacinamiento y suelen ser más resistentes a las adversidades climatológicas y a enfermedades; sin embargo, en éstos dos casos el nivel de anticuerpos es aproximado al encontrado en sistemas de producción tecnificado y semitecnificado (10).

Así mismo, en un estudio enfocado hacia el subtipo H3N2 en la República Mexicana en el 2005 en granjas tecnificadas, el estado de Veracruz resultó ser la segunda entidad con mayor seroprevalencia en el país, reportando 65% de animales con anticuerpos y rangos de títulos positivos desde 1:80 hasta 1:1280 (9); de acuerdo a éstos resultados se observa que la seropositividad de los animales de La Gloria es más alta que los datos que la anteceden, tomando en cuenta las diferencias entre los sistemas de producción; sin embargo los rangos de los títulos positivos son iguales para ambos estudios (de 1:80 a 1:1280). Esto nos puede sugerir que la circulación viral en Veracruz es activa sin importar el estado inmune de los animales, ni bajo qué condiciones éstos se desarrollan.

Trujillo *et al.* en el 2004 analizaron 474 sueros porcinos de 3 estados de la República Mexicana, donde obtuvieron 45.9% de sueros positivos a la presencia de anticuerpos contra el subtipo H1N1 y 29.74% para el subtipo H3N2, con rangos de títulos positivos desde 1:80 hasta 1:640 (38); la seroprevalencia reportada es notablemente inferior a la obtenida en este estudio, sin embargo, cabe mencionar que al igual que el reporte de éstos autores, existen muchos otros donde la presencia de anticuerpos para el subtipo H1N1 es superior que para el subtipo H3N2, por ello es importante destacar que dicha información no coincide con la obtenida en este trabajo donde la prevalencia para el subtipo H3N2 resultó más alta. Los rangos positivos de éste estudio son cercanos a los presentados por Trujillo *et al* (38).

Es importante para la producción porcina tener en cuenta el papel que juegan los animales de traspatio en la circulación de los diferentes virus, pues por lo general es un sector que recibe poca atención, tal vez porque la producción no es significativa para la industria nacional. Éste sistema también conocido como rural, familiar o de autoabastecimiento, se caracteriza por su rusticidad y falta de manejo, así como nulas medidas de bioseguridad y medicina preventiva pero también se destaca por la cercana convivencia de diversas especies incluidas el hombre, dando las condiciones suficientes para que ocurra transmisión a animales susceptibles, a otras especies o recombinación viral (10, 14, 27, 35).

La detección de anticuerpos no implica necesariamente haber padecido o estar sufriendo la enfermedad (14), o una exposición previa al agente o a la presencia de anticuerpos debido a inmunidad pasiva, sin embargo nos da información valiosa acerca de la dinámica de la enfermedad en una población, por ello las pruebas serológicas tienen tanta importancia en el diagnóstico de enfermedades; sin embargo, el diagnóstico clínico en medicina veterinaria ha ido avanzando junto con las demás áreas de la medicina y así utilizando herramientas como la RT-PCR múltiple para la identificación directa de agentes infecciosos, que en comparación con otros métodos, éste resulta además de rápido, altamente específico y sensible; y con ello una detección e identificación oportuna de agentes que puedan estar afectando en este caso a una población porcina y tener los fundamentos suficientes para implementar estrategias de control y prevención (37). Sin embargo su alto precio y la falta de laboratorios

que tengan disponible la prueba hacen que esta técnica aun no se utilice de manera rutinaria.

En este estudio solo se lograron obtener datos a través de esta técnica de 17 aislamientos virales, 10 para H1N1 y 7 para H3N2, probablemente porque las muestras de exudado nasal fueron obtenidas varios días después de la infección por el VIP y éste solo se localiza en secreciones nasales alrededor de 1-7 días después del primer contacto con el agente (41,42), lo anterior se puede confirmar con la presencia de anticuerpos en el suero, ya que éstos se pueden detectar de cinco a siete días pos infección (41). Sin embargo estos datos representan un gran valor informativo ya que se pensaba que tanto la prevalencia como la circulación viral en sistemas de traspatio era limitado o prácticamente nulo.

8. CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos inferir que en el poblado de La Gloria, Veracruz, donde se lleva a cabo la producción de cerdo de traspatio, el virus de influenza porcino se encuentra ampliamente distribuido (92.6% promedio), en comparación con otras zonas del país y otros sistemas de producción.
2. En éste estudio también se logró, mediante la aplicación de RT-PCR múltiple determinar y corroborar la circulación de los dos subtipos de IP H1N1 y H3N2 en animales de traspatio, sin embargo, cabe destacar que para que se obtuvieran más resultados positivos mediante ésta técnica las muestras de hisopos nasales de debieron haber colectado durante los primeros siete días pos infección, que es cuando el virus es excretado, de estar presente en secreciones nasales.
3. Con lo señalado en los dos puntos anteriores cabe destacar que contrario a lo que se creía, el virus de influenza porcino se encuentra presente y en circulación continua en animales de traspatio; esto resalta la importancia que podría tener éste sector pecuario en la circulación viral y la diseminación de enfermedades hacia otros sistemas de producción y tal vez hacia las demás especies susceptibles, pues generalmente las granjas tecnificadas se encuentran rodeadas por cerdos de traspatio, por lo que entre estas dos poblaciones existen diversas posibilidades de contacto (42).

4. Cabe mencionar que resultan de gran importancia los datos arrojados acerca de la seroprevalencia en una población de traspatio no solo en el aspecto epidemiológico de la enfermedad, sino de la importancia de tener un control más estricto de ella no solo en las grandes producciones, además de la población porcina en general del país, así como de los animales que son importados y/o trasladados dentro del territorio nacional.

9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. KOLATA G. Flu: the story of the great influenza pandemic of 1918 and the search for the virus that caused it. New York: Farrar, Straus and Giroux, 1999:330.
2. MURPHY BR, WEBSTER RG. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM, ed. Fields virology vol. 1. 3a. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
3. VIESCA TC. Medicina prehispánica de México. México, Panorama Editorial, 1996;49-50.
4. VALDÉZ AR. Pandemia de gripe. Sinaloa, 1918-1919. Elementos 2002; 47:37-43.
5. ACUÑA LG. Influenza; historia y amenazas. *Rev Chil Infect* 2004; 21 (2): 162-164.
6. ESTERDAY BC AND VAN REETH K. Swine Influenza. In Straw B. D'Allaire, Mengeling S. Taylor D. Diseases of Swine 8th Edit. Ames, Iowa U.S.A. 2002: 277-290.
7. SHOPE RE. Influenza del cerdo. En Dunne H. Enfermedades del Cerdo. 1^a Edición. Ed. Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana, 1967: 119-137.
8. ÁLVAREZ FM, RODRÍGUEZ BJ, CIPRIÁN CA, RODRÍGUEZ GL, AYORA TG, SEGURA, J. Perfil serológico del virus de la influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuroneumoniae*, en granjas de Yucatán México. *Rev. Vet. Méx.* 2004; 35(4): 295-305.

9. CHÁVEZ SR. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H3N2 en diferentes estados de la República Mexicana (tesis de licenciatura). Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
10. JIMÉNEZ NJ. Determinación de anticuerpos contra el virus de Influenza Porcina serotipo H3N2 en cerdos de diferentes sistemas de producción en México (tesis de licenciatura). Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
11. AYORA TG, CADAVIECO BJM, CANUL AAB. Serologic evidence of human and swine influenza in mayan persons. *Emerg Infec Dis.* 2005; 11(1): 158-160.
12. GRAMER MR. Defining swine influenza virus. *J Sw Heal and Prod.* 2005; 13(3):157-160.
13. FENNER F. BACHMANN PA. MURPHY FA. *Virología Veterinaria.* Zaragoza, España, Acribia, 1992: 489-501.
14. YOON JK, JANKE BH. Influenza Porcina: Etiología, Epidemiología y Diagnóstico. En: Morilla A, Yoon JK, Zimmerman JJ, Editors. *Enfermedades víricas emergentes del cerdo.* Multimédica Ediciones Veterinarias 2004: 29-54.
15. WRIGHT PF, WEBSTER RG. Orthomyxoviruses. En: Knipe DM, Howley PM, Fields virology. Vol.1, 4ªed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001:1533-1579.
16. FOUCHIER RA, MUNSTER V, WALLENSTEN A, BESTEBROER TM, HERFST S, SMITH DR et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; 79:2814-2822

17. REID A., TAUBENBERGER J., The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *J Gen Virol* 2003; 84: 2285-2292.
18. WEBSTER RG, BEAN WJ, GOREN OT, CHAMBERS TM, KAWAOKA Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56:53-179.
19. WEBBY RJ, ROSSOW K, ERICKSON G. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in United States swine population. *Virus Res.* 2004;103: 67-73.
20. BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. The ecology of influenza viruses: a WHO memorandum. 1981; 59 (6): 869-873.
21. CHAPA J. RODRÍGUEZ E. Pruebas de laboratorio e interpretación de resultados para el diagnóstico de enfermedades virales de los cerdos. Memorias del IV Ciclo de Conferencias de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, 2005, 15 Octubre. La Piedad, (Michoacán), México. México, AMVEC A.C. 2005.
22. BARIGAZZI G. DONATELLI I. Swine Influenza in Italy. *Vet Res Commun.*2003; 27: 93-99.
23. LANDOLT G. KARASIN A. PHILIPHS L. AND OLSEN C. Comparison of the pathogenesis of two genetically different H3N2 influenza A viruses in pigs. *J Clin Microb* 2003; 41 (5):1936-1941.
24. TRIGO TFJ. Aparato Respiratorio. Patología Sistémica Veterinaria 3a Ed. McGraw-Hill Interamericana. México,1998.
25. MCGAVIN D. AND ZACHARY J. Pathologic basis of veterinary disease. 4 ed. EUA, 2007: 535.

26. REALPE M, FIERRO N, Potencial zoonótico de la Influenza Porcina. 2009. Consultado el 6 de octubre de 2009 en: <http://literaturainfluenza.blogspot.com/2009/05/el-potencial-zoonotico-de-la-influenza.html>
27. COX NJ, SUBBARAO K, Global epidemiology of influenza: Past and Present. *Annu. Rev. Med.* 2000; 51: 407-421.
28. GERACI JR, ST AUBIN DJ, BARKER IK, WEBSTER RG, HINSHAW VS, BEAN WJ et al. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science* 1982; 215:1129-1131.
29. HINSHAW VS, BEAN WJ, GERACI JR, FIORELLI P EARLY G. et al. Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol* 1986; 58:655-656.
30. GAYDOS JC, HODDER RA, TOP FH. Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). Ill transmission and morbidity in units with cases. *J Infect Dis.* 1977;136: 363-368.
31. SOVINOVA O, TUMOVA B, POUŠKA F, NEMEC J. Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol* 1958; 2 :52-61.
32. KEAWCHAROEN J, ORAVEERAKUL K, KUIKEN T, FOUCHIER RAM, AMONSIN A, PAYUNGPORN S. et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2189-2191.
33. CRAWFORD PC, DUBOVI EJ, CASTLEMEN WL, STEPHENSON I, GIBBS EP, CHEN L. et al. Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science.* 2005; 310: 482-485.

34. DIAZ A, GOÑI M, RUOCCO G, SAVIO E, RUSSI J, BAGATTINI JC. Gripe: Guía práctica. *Publ. Clínica Médica* 2. Montevideo, 2000.
35. BROWN IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet. Microb.* 2000; 74: 29-46
36. OIE. Standards Commission: 2000, Manual of standards for diagnostics tests and vaccines 4th ed. Office International des Épizooties, Paris, Francia.
37. CARREÓN R. Diagnóstico de influenza porcina, una necesidad actual. *Los Porcicultores y su entorno.* 2005, (45) Mayo-Junio: 56-62
38. TRUJILLO OME, CARREÓN NR, MERCADO GMC, 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 2004.* Mazatlán, (Sinaloa), México. México AMVEC A.C. 2004; 181.
39. MALIK PJS, POON LLM, GUAN Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J Clin Virol*, 2009; 45: 169 -173.
40. <http://www.granjascarroll.com/esp/historia.php>. Sitio web visitado el 2 de Octubre de 2009.
41. MORILLA GA. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. 2ª Ed. México, Manual Moderno: 2005: 77-89, 215-219.
42. MORILLA GA. Las enfermedades virales emergentes de los cerdos. *Cien Vet* 2003; 9 : 197-227.