



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

ESTUDIO SEROLÓGICO RESTROSPECTIVO (2000-2009)
DE INFLUENZA PORCINA SUBTIPOS H1N1 Y H3N2 EN EL
DISTRITO FEDERAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

VICTOR MANUEL CARRERA AGUIRRE

ASESORES:

MVZ. MC. María del Carmen Mercado García

MVZ. MC. Rosalba Carreón Nápoles



México, D.F. Junio de 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.

DEDICATORIAS

El principal motor, fuente de vida, que fue capaz de dar un giro total en mi ser y que día con día me demuestra que me ama, tan solo con hacer abrir mis ojos y escuchar que mi corazón vuelve a latir... Gracias **DIOS**.

A mi Familia, mis papas María de Jesús y Heriberto y mis hermanos del alma Viridiana y Heriberto, ya que juntos aprendimos a darnos una nueva oportunidad de vivir, porque a pesar de los obstáculos nunca bajamos los brazos y nuestro Amor le dio caída al dolor para hacernos crecer. Hay tanto por hacer y bien se, que su mano estará tomada de la mía y no estaré solo Gracias por todo Papis, Fachitas y Betortita. Los Amo muchísimo.

Por darme tu confianza y apoyo incondicional, porque juntos hemos crecido y derribado muros a pesar de las adversidades. Eres una razón más para vivir mi niña y confidente fiel. Te Amo Nancy.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad Nacional Autónoma de México, mi casa de estudios que me vio crecer profesionalmente.

Para todos mis amigos de la Facultad que compartieron conmigo tantas risas y buenos momentos que nunca podre olvidar: Alma Servin, Ricardo García, Alejandra Miranda, Agustín Pérez, Gissele López, Marcos Lagunés, Jetzabel Juárez, Víctor del Rio, Raúl Ocampo, José Cruz, Miguel García.

Mis dos amigos entrañables Miguel Ángel Barrientos e Ismael Juárez porque juntos aprendimos que la sincronía de la vida a pesar de sus múltiples cambios, siempre nos mantuvo juntos apoyándonos a pesar de la distancia.

Gracias Sra. Isabel Mendoza y al Sr. Martin León por guiarme y conducirme a cosas hermosas e increíbles y por ayudarme cuando más lo necesite.

Aquí conocí personas que estuvieron pendientes de mi desempeño en la carrera además, de brindarme su amistad y la oportunidad de conocerlas: MVZ. Araceli Lima y la MVZ. Guadalupe Ramírez.

A los Laboratoristas del DPAC las Sras. Carmen Díaz, Evelia Hernández, Natalia Aguilar y el Sr. Inocente Lara, por brindarme su apoyo incondicional en mi trabajo y sobre todo su amistad. Gracias.

Las niñas Celene Cruz y Daniela Gómez que siempre fueron mi compañía y apoyo les agradezco todo.

Le agradezco a las MC. Carmen Mercado y Rosalba Carreón por ofrecerme su apoyo, confianza y compartir sus conocimientos para la realización de este trabajo.

Al MVZ. Mario Haro por darme la oportunidad de realizar este trabajo además, de la oportunidad de entrar al DPAC.

También agradezco a todo el personal del DPAC, principalmente a la MVZ Alejandra Mercadillo y Esperanza Galván por brindarme su apoyo y compañía.

Agradezco a los miembros de mi jurado los MVZ. Mario Haro, MVZ. Humberto Ramírez, MVZ. Alfredo Sahagún, MVZ. Carmen Mercado y el MVZ Iván Sánchez por las aportaciones tan valiosas para la construcción de esta Tesis.

Esto es para ustedes...nuevamente Gracias.

CONTENIDO

RESUMEN.	1
I.- INTRODUCCIÓN.	2
1.1 Antecedentes.	3
1.2 Etiología.	4
1.3 Epidemiología.	6
1.4 Transmisión.	9
1.5 Patogenia.	10
1.6 Signos clínicos.	10
1.7 Lesiones.	11
1.8 Diagnóstico.	11
1.9 Tratamiento, Prevención y Control.	15
1.10 Reportes en México.	15
II.- JUSTIFICACIÓN.	17
III.- HIPÓTESIS.	18
IV.- OBJETIVOS.	19
V.- MATERIAL Y MÉTODOS.	20
5.1 Selección de muestras.	20
5.2 Organización de muestras.	20
5.3 Replicación del antígeno.	21
5.4 Titulación del virus.	21

5.5 Adsorción.	21
5.6 Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH).	22
5.7 Análisis de resultados.	23
VI.- RESULTADOS.	24
6.1 Frecuencias generales.	24
6.2 Frecuencias por delegación para el VIP-H1N1 y H3N2.	24
6.3 Frecuencias por año para el VIP-H1N1 y H3N2.	26
6.4 Prueba de Ji-cuadrada de Pearson (χ^2) para el VIP-H1N1 y H3N2.	28
VII.- DISCUSIÓN.	30
VIII.- CONCLUSIONES.	36
IX.- BIBLIOGRAFÍA.	37

RESUMEN

VICTOR MANUEL CARRERA AGUIRRE. Estudio Serológico Retrospectivo (2000-2009) de Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 en el Distrito Federal. (Bajo la supervisión de: MVZ, MC Ma. Del Carmen Mercado García y MVZ, MC Rosalba Carreón Nápoles).

El Virus de Influenza Porcina (VIP) es un virus RNA que pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* y afecta a una gran variedad de especies incluyendo al humano, además de que interviene en el Complejo Respiratorio Porcino (CRP) como agente primario. Los subtipos más frecuentes que afectan a los cerdos son el H1N1, H1N2 y H3N2. El objetivo de este estudio fue la identificación de la seroprevalencia contra Influenza Porcina en sueros porcinos de traspatio provenientes de diferentes delegaciones del Distrito Federal (D.F.) en el periodo comprendido del año 2000 al 2009. Las muestras fueron trabajadas con la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), de un total de 2094 sueros trabajados, se obtuvo una seroprevalencia del 74% para el subtipo H1N1, mientras que para el subtipo H3N2 fue de 24.1% y una seroprevalencia hacia ambos subtipos del 22.2%.

La delegación Azcapotzalco presentó el mayor porcentaje de seropositividad para ambos subtipos con 81.8% para H1N1 y 35.3% para H3N2. El año 2007 obtuvo el mayor porcentaje de seropositividad con 90% para H1N1, mientras que el año 2000 presentó el mayor porcentaje de seropositividad con 62.8% para el subtipo H3N2.

Se pudo demostrar la coexistencia y una seroprevalencia elevada en ambos subtipos virales del VIP en el sistema de producción de tipo artesanal que se tiene en el Distrito Federal.

I.- INTRODUCCIÓN.

La Influenza Porcina (IP) es una enfermedad respiratoria aguda e infecciosa del cerdo, causada por el virus de influenza tipo A de la familia Orthomyxoviridae,^{1, 2, 3,} ⁴ este virus es un agente primario del Complejo Respiratorio Porcino (CRP)^{5, 6} donde participan varios agentes infecciosos de origen bacteriano como: *Salmonella sp*, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis* *Pasteurella* sp y *S. suis* tipo 2 o virales como el PRRS, Parvovirus y Circovirus Porcino tipo 2 (PCV-2).¹ Estos actúan como agentes infecciosos coinfectantes que pueden provocar un impacto clínico-productivo aun mayor en los cerdos.^{6, 7}

El virus posee un genoma RNA altamente mutable debido a la capacidad que tiene de intercambiar genes entre diferentes subtipos que afectan una misma especie o diferentes especies,^{4, 8} por lo que frecuentemente aparecen nuevas variantes antigénicas de cada subtipo lo que obliga a incluir dichas variantes en las vacunas para brindar una adecuada protección.⁹ Ocurre comúnmente como una epizootia de neumonía altamente transmisible caracterizada por tos seca, fiebre, disnea y anorexia, los más susceptibles son los cerdos en crecimiento y en finalización debido a la caída de los anticuerpos maternos.^{10, 11} La industria porcina actual permite la fácil transmisión viral de cerdo a cerdo ¹² y en las cerdas los estados febriles llegan a provocar abortos en hembras gestantes;⁹ su recuperación se produce después de 7-10 días post-infección pero el impacto en la condición corporal es muy importante.^{10, 11, 13,} La IP se caracteriza por tener una alta morbilidad y baja mortalidad ^{11, 14} y las lesiones generalmente se desarrollan con rapidez en el aparato respiratorio, en algunos casos puede provocar la muerte, por lo tanto, es probable que el curso, naturaleza y magnitud de la enfermedad varíen con la cepa del virus, la edad y estado inmune del cerdo.¹

1.1 ANTECEDENTES.

La primera descripción de un padecimiento identificable como influenza la realizó Hipócrates en el año 492 a.C., más tarde, durante la Edad Media se describió numerosos episodios relacionados con este mal. En América, la primera descripción de un problema respiratorio severo de este tipo se documentó en Texcoco en 1552 y se le denominó “pestilencia catarral”, no obstante la primera pandemia reconocida ocurrió en 1580.¹⁵ En el siglo XV en Italia, pensaban que la causa de la gripe eran ciertas constelaciones estelares que aparecieron en el firmamento precisamente en los meses en que ese padecimiento solía presentarse. Apoyados en esta creencia, los italianos bautizaron a al gripe como “Influenza (influencia) de las estrellas (*Malathia influenzae per le stelle*)”, actualmente la gripe (tomada del francés *grippe*) también se conoce como “influenza” (en inglés *flu*). El virus de la influenza A es el más peligroso, no solo infecta a los humanos, también a una amplia variedad de aves y mamíferos.¹⁶

La influenza porcina esta considerada actualmente como una enfermedad de tipo emergente en cerdos, desde su primera descripción en 1930 por *Shope et al*, en su forma clásica respiratoria.^{17, 18, 19, 20}

La aparición de la enfermedad en los cerdos coincidió con la pandemia de influenza de 1918 en el centro norte de los Estados Unidos que fue causada por un virus de influenza H1N1 que se difundió de aves a humanos y cerdos, que se estima fue responsable de la muerte de 20 millones de personas en todo el mundo.^{2, 18, 21} Los cerdos pueden ser reservorios de antiguas cepas de influenza humana y ser posteriormente re-introducidas a la población humana.^{12, 19}

1.2 ETIOLOGIA.

La IP es una de las enfermedades respiratorias mas comunes que afectan a los cerdos y es causada por el virus RNA de influenza tipo A de la familia *Orthomyxoviridae*.^{2, 3, 4, 22} El genoma vírico consta de 8 segmentos de RNA de cadena simple ^{1, 2, 23} y polaridad negativa.¹⁵ Son viriones pleomorficos, de tamaño mediano ¹ (80-120 nm diámetro),¹⁵ su envoltura lipidica se deriva de la membrana plasmática de la célula infectada,^{13, 15} y contiene dos glicoproteínas que son los antígenos de superficie: la Hemoaglutinina (H) y la Neuraminidasa (N). La hemoaglutinina desempeña varias funciones como: la adherencia a la célula susceptible, fusión de membranas y trae como consecuencia de su proyección al exterior el reconocimiento antigénico que induce la respuesta inmune,^{15, 19} además, produce aglutinación de eritrocitos.¹ La neuraminidasa tiene como función principal catalizar el rompimiento del Ácido Siálico (AS) para liberar los viriones (elusión enzimática) de la célula infectada; también permite el transporte del virus a través de la capa de mucina del tracto respiratorio.¹⁵ Los virus influenza son sensibles al calor (56°C, 30min), al tratamiento con ácidos (pH 3) y al tratamiento con solventes lipídicos y por tanto son muy lábiles en las condiciones ambientales habituales.¹³

Las moléculas de Proteína Matriz (PM) cubren la cara interna de la envoltura, donde se encuentra un complejo helicoidal de moléculas de RNA asociado a la Núcleo Proteína (NP) y Polimerasas (enzimas que inician la replicación).²⁴ La Proteína M2 es una proteína integral de la envoltura viral que forma un poro o canal iónico encargado de controlar el pH intracelular. Las mutaciones que ocurren en el gen que codifica esta proteína determinan la resistencia a los

fármacos antivirales.¹⁵ El receptor celular para los virus de influenza es el AS, que se encuentra en la porción distal que forma el glicocáliz de las células.¹⁵

Los cambios en los virus de influenza son producidos por 2 mecanismos: variación antigénica o “drift” y la variación genética o “shift”.^{2, 18} La variación antigénica o “*drift*”, se da por mutaciones puntuales e individuales en la sustitución de aminoácidos de las proteínas de la envoltura viral (H y N), modificando su composición amínica e identidad antigénica,^{2, 18, 25, 26} mientras que la variación genética o “*shift*”, ocurre cuando un animal sufre una doble infección por mas de un subtipo diferente y los segmentos geonómicos virales se reasocian y desarrolla una nueva combinación en las proteínas de la envoltura (H y N) en una sola partícula viral.^{2, 23, 25}

De los 8 transcritos de RNA primarios producidos, 6 se traducen directamente en las proteínas H, N y NP y en los tres componentes de la polimerasa vírica.²³ Los otros dos transcritos primarios, dan lugar cada uno de ellos a dos RNAm que se traducen siguiendo distintas plantillas de lectura. Por tanto, las 8 moléculas de RNA del virión codifican 10 proteínas: 7 estructurales y 3 no estructurales.^{2, 13}

(Cuadro 1.)

Cuadro 1. Segmentos de RNA del virus de la influenza A que codifican para proteínas virales y su función.

Segmento de RNA	Proteína	Función
1	PB-2	Polimerasa, soporta la formación del CAP, factor de virulencia.
2	PB-1	Subunidad catalítica de la RNA polimerasa, proteína participante en la apoptosis.
3	PA	RNA polimerasa.
4	HA	Ligando del receptor, proteína de fusión, antígenos principales.
5	NP	Nucleoproteína (cápside), participa en la replicación.
6	NA	Rompe el ácido siálico, facilita la liberación del virus y previene la agregación viral.
7	M1	Interactúa con el genoma, apoya el ensamble viral M2.
	M2	Forma el canal iónico, controla el pH intracelular y el desnudamiento.
8	NS1	Controla la postranscripción, antagonista del interferón NS2.
	NS2	Exporta el RNA viral del núcleo, ensamble vírico.

Fuente: Lamb and Krug. 2001²⁸

1.3 EPIDEMIOLOGIA.

Este virus es dividido en tres grupos A, B y C.^{2, 27} Los virus de influenza tipo A se describieron por primera vez en 1933; afectan a animales y al hombre y son causa de epidemias y pandemias. Los virus de influenza tipo B se identificaron en 1940; afectan a los humanos causando epidemias moderadas, aunque tiene poco tiempo que también se encontraron en focas. Los virus de influenza tipo C se describieron en 1950, infectan de manera limitada a humanos y existen evidencias serológicas de infección en cerdos y perros.^{2, 15} Se han identificado 16 hemoaglutininas y 9 neuraminidasas en todos los virus de influenza tipo A, estas

han sido identificadas en humanos, mamíferos y aves.^{1, 2, 4, 27} El sistema actual de nomenclatura del virus de influenza, introducido en 1980, designa tipo, huésped, origen geográfico, número de cepa, año de aislamiento y subtipo antigénico (ejemplo: A/Cerdo/Wis/1/84(H1N1)).^{1, 2, 4, 22}

Los cerdos son el principal reservorio para los virus de influenza subtipo H1N1, H1N2 y H3N2 los cuales son endémicos en esta especie alrededor del mundo y son responsables de una de las enfermedades respiratorias con mayor prevalencia.¹⁸ Existen otros virus detectados en el cerdo: en Europa se encuentra al H1N7 y en Asia al H3N1, además, los virus aviares han sido detectados transitoriamente en los cerdos en muchas partes del mundo, incluyendo el H1N1, H9N2, H4N6 y H5N2 pero no está claro si estos estén estableciendo una transmisión a largo plazo en los cerdos.²⁹

El primer virus de cerdos fue aislado en Iowa en 1930 por Shope *et. al.* y fue un H1N1. Este virus fue muy estable de 1930 a 1998 hasta que en este último año se aisló el subtipo H3N2 en Ontario Canadá, el cual mostraba genes de doble origen (humano y cerdo) y otros con triple origen (ave, cerdo y humano), este último se adaptó rápidamente al cerdo y se diseminó en Norteamérica.^{4, 30} En Estados Unidos el subtipo que prevalecía exclusivamente era el H1N1 y poco tiempo después de aparecer el H3N2 en el este de E.U.,²⁷ surgió el H1N2,⁷ representada por la cepa A/Swine/Indiana/2000, que contiene la H1 clásica y la N2 proveniente de una recombinación triple.^{4, 30}

Los cerdos se pueden infectar con cepas de influenza humana y aviares pues su tracto respiratorio tiene receptores para estos 2 virus.^{2, 18, 19, 20, 31} La unión entre el AS con los azúcares, determinan dos tipos de cadenas: AS- α 2-3-Gal- β -1-3-N-acetil-glucosamina (AS- α 2,3-Gal receptor del virus de influenza en aves y

caballos) y AS- α 2-6-Gal- β -1-4-N-acetilglucosamina (AS- α 2,6-Gal receptor del virus de influenza en humanos), que se encuentran distribuidas de manera diferente en las especies animales.^{2, 15, 18, 19, 20} La importancia de la influenza en la especie porcina radica en la mezcla de los genes de los virus de influenza porcina, humana y aviar; dado que el genoma vírico es segmentado puede haber cambios genéticos o recombinación entre diferentes virus de influenza tipo A, de esta manera aparecen nuevas cepas, que tienen genes de cerdo, humano y aviar que potencialmente pueden llegar a ser mas patógenos para los cerdos, e inclusive para el humano.³¹

Las mezclas de virus de influenza aviares y humanos, conducen a pandemias humanas como la del continente Asiático en 1957 por un virus H2N2 y la de Hong Kong en 1968 por un virus H3N2. La participación de la recombinación entre diferentes virus de influenza en las pandemias de 1957 y 1968 muestran el gran riesgo en humanos; un ejemplo es la presencia en cerdos de un subtipo del virus de influenza H9N2 (similar al virus H5N1) semejantes a los transmitidos de aves a humanos,^{3, 12} por lo tanto la recombinación genética entre los virus de influenza del humano y de origen no humano se considera un mecanismo probable de aparición de nuevas cepas pandémicas humanas.^{18, 24} Existen tres factores los cuales intervienen para considerar esta enfermedad como emergente;

1. La variedad de subtipos descritos debido a su capacidad para alterarse genéticamente por poseer un genoma RNA segmentado.
2. El amplio intercambio inter-especies considerando que el cerdo puede actuar como un factor de recombinación a virus aviares y humanos.
3. Las formas de presentación clínica asociadas a cuadros reproductivos y respiratorios no usuales.¹⁷

1.4 TRANSMISIÓN.

La transmisión de la enfermedad se realiza de forma directa o indirecta. En la directa se disemina rápidamente en la granja por contacto cerdo-cerdo. La indirecta se presenta por aerosoles entre granjas, sobre todo en regiones de alta densidad porcina. Los más susceptibles son los cerdos en crecimiento y finalización debido a la caída de los anticuerpos maternos. La mayor fuente de transmisión del virus son usualmente los cerdos más viejos.^{10, 18} La mayoría de los brotes se presentan en el otoño y se prolongan en el invierno y este carácter estacional de la enfermedad se atribuye al estrés producido por las fluctuaciones de la temperatura ambiental y los cambios de alimentación. En un área determinada, la aparición de la enfermedad es simultánea y afecta prácticamente en todas las piaras. Estos brotes multicéntricos no están en general relacionados con el movimiento de cerdos de una granja a otra, hecho que indicaría que la infección persiste en la piara de una estación a otra.³² Las granjas que manejan auto reemplazos vuelven a introducir el virus al pie de cría cerrando el círculo de infección.¹⁷

El reservorio de los virus de influenza son las aves acuáticas² e infecta muchas especies diferentes en la naturaleza; el hombre, mamíferos inferiores (incluyendo marinos) y aves. Los virus H1N1 del cerdo pueden introducirse en las poblaciones de aves y han sido responsables de la enfermedad en pavos.²⁴ Es un agente zoonótico transmitido entre animales y humanos (Castrucci *et al.* 1993; Webby y Webster 2001).^{33, 34} La infección por el virus de influenza porcina ha ocurrido esporádicamente, (Alexander y Brown 2000; Dacso *et al.* 1984; Top y Russell 1977; Wells *et al.* 1991)^{35, 36, 37, 38} causando enfermedad clínica de diferentes grados de presentación pero en ocasiones los casos son fatales.^{2, 18} La infección

de cerdos con virus humano H3N2 se ha demostrado en forma concluyente. Un virus H3N2, como el virus A/Hong Kong/68, se aisló a partir de cerdos poco después de aparecer en la población humana de Taiwán. Más tarde, se encontró que algunas de las variantes humanas de virus H3N2 habían sido transmitidas a los cerdos (Romvary y Tanyi 1975; Tumova *et. al.*, 1976).^{24, 39, 40} Existe evidencia de que la transmisión de cerdos a humanos se lleva a cabo, ya que se detectaron anticuerpos contra el virus porcino H1 en personas que tenían contacto con cerdos. En 1976 después de una influenza epizootica en cerdos, los virus aislados de humanos y cerdos resultaron ser antigénica y genéticamente virus porcinos H1N1 de influenza (Hinshaw *et al* 1970, Easterday, 1980).^{12, 41, 42}

Esto constituye un indicio claro del potencial zoonótico de los virus de influenza que infectan al cerdo y el papel potencial de este en la transmisión de nuevas cepas pandémicas a los seres humanos.^{19, 24}

1.5 PATOGENIA.

El virus se extiende por todo el tracto respiratorio de uno a tres días.¹³ Se adhiere a los cilios del epitelio nasal y traqueal, se replica en las células, además, se difunde a los bronquios y bronquiolos, provoca pérdida de cilios, salida de moco, exudación de neutrófilos y macrófagos, necrosis y metaplasma del epitelio del tracto respiratorio, lo cual origina la acumulación de exudado serofibrinoso en los alvéolos.⁴³

1.6 SIGNOS CLINICOS.

Tras un periodo de incubación de 1 a 3 días, aparecen repentinamente los signos clínicos. Los cerdos tienden a permanecer juntos, aparece rinitis, flujo nasal y conjuntivitis además, de que los animales enfermos presentan una evidente pérdida de peso, una tos paroxística generalmente acompañada de arqueamiento

del dorso; la respiración es rápida dificultosa y normalmente de tipo abdominal. Son frecuentes la apatía, anorexia, postración y la temperatura alcanza los 41°C.¹³ La eficacia reproductiva tanto de los machos como de las hembras puede verse afectada por el subtipo H3N2.²²

1.7 LESIONES.

En las lesiones macroscópicas los cambios se limitan a menudo a los lóbulos apical y cardiaco de los pulmones. Puede observarse edema interlobulillar y las vías aéreas pueden estar llenas de exudado fibrinoso teñido con sangre, además que los ganglios linfáticos del mediastino y bronquios suelen encontrarse agrandados, mientras que las lesiones a nivel histológico pueden ser necrosis del epitelio de bronquios y bronquiolos. Los espacios bronquiales están llenos de exudado. Hay una extensa atelectasia alveolar, neumonía intersticial y enfisema.²⁴

1.8 DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de IP puede hacerse con base a los signos clínicos, necropsia o pruebas diagnósticas para detectar el virus o anticuerpos para el VIP.²⁷

1.8.1 Aislamiento viral.

Se puede realizar de secreciones respiratorias con un hisopo nasal o muestras de pulmón. Existen 2 opciones para realizar el aislamiento: la primera consiste en la utilización de diversas líneas celulares que permiten el crecimiento del virus para el desarrollo de diagnóstico del VIP como células de riñón de ternero (MDBK), células de pulmón de feto de cerdo, células de riñón canino (MDCK), células de riñón de cerdo, fibroblastos de embrión de pollo, células diploides humanas y conjuntivales de Chang. Otros sistemas incluyen una línea de células de oviducto porcino y una línea de células de testículo de cerdo (ST)²⁴ la segunda opción consiste en utilizar embriones de pollo ya que el virus se multiplica con facilidad

cuando se inocula en embriones de nueve a diez días, éste es el sistema de cultivo utilizado con mayor frecuencia. Puede ser inoculado por vía intra-alantoidea o intra-amniótica con una temperatura que varía entre 35 y 37°C. Los embriones infectados no mueren y la presencia del virus se demuestra después de 48-72 hrs de incubación por la prueba de hemoaglutinación en placa del líquido alantoideo y/o amniótico.^{11, 24} Un diagnóstico más preciso implica la caracterización antigénica del virus de influenza mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) utilizando antisueros específicos para confrontarlos con los aislamientos obtenidos; considerando una significativa reducción mayor o igual a cuatro veces el título del virus a caracterizar.⁴⁴

1.8.2 Detección del virus.

Inmunofluorescencia: Esta prueba proporciona resultados rápidos y fiables. Es el método más barato, pero necesita un nivel elevado de experiencia para su Interpretación y no se puede automatizar. La calidad de los reactivos utilizados es crítica para la obtención de buenos resultados. Los anticuerpos monoclonales han permitido una mejora al atenuar en gran medida los problemas de las reacciones inespecíficas asociadas al uso de antisueros policlonales. La desventaja es la disponibilidad de los anticuerpos monoclonales.⁴⁴

Inmunohistoquímica: Es una técnica rápida que se basa en la detección del virus de influenza en cortes de tejidos fijados en formol o a partir de hisopos nasales, mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra el tipo A y detecta ambos subtipos ya sea de virus de campo o vacunal. Es una prueba con alta sensibilidad y disponibilidad, sin embargo, la limitante es la disponibilidad de los anticuerpos monoclonales para su realización y los resultados se obtienen en 24 hrs. después de recibir el tejido fijado.^{11, 44}

1.8.3 Diagnóstico Molecular.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En la actualidad el uso de técnicas moleculares como la Transcriptasa Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) han proporcionado alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de enfermedades infecciosas lo cual permite su utilización como un complemento de otras pruebas de diagnóstico.^{4, 45}

Se utiliza para evidenciar la presencia del ácido nucleico y determinar el subtipo a partir de pulmón y de hisopos nasales. La elevada sensibilidad y especificidad, la convierten en una excelente herramienta de diagnóstico y es la técnica base para la caracterización genética de estos virus. En su diseño hay que tener presente la gran capacidad de variación de estos virus por lo que, en la identificación de los subtipos A, B y C, la elección de indicadores se ha enfocado sobre genes internos conservados, como el de la PM, mientras que para la determinación del subtipo se buscan las regiones más conservadas dentro de cada gen H o N. Una reciente innovación al diagnóstico por PCR aplicada con éxito a los virus de influenza, constituye la PCR en tiempo real, que ofrece resultados cuantitativos, rápidos y sensibles. La caracterización ha recibido gran impulso gracias a las técnicas moleculares. Los productos de amplificación obtenidos con iniciadores que amplifican regiones de alta variabilidad genética pueden analizarse por secuenciación u otras técnicas, como el análisis del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFPL), Este tipo de análisis con el complemento de los análisis antigénicos, ayudan a decidir el diseño actual de las vacunas en medicina veterinaria y son utilizados para detectar la redistribución de genes o para elucidar el origen y la evolución de los virus de influenza.^{4, 44}

1.8.4 Serología.

El monitoreo serológico ha llegado a ser problemático debido a las múltiples cepas antigénicas de H1N1 y H3N2 que circulan hasta el día de hoy. La serología ha sido útil como un indicador retrospectivo de la presencia del virus de influenza en una piara.¹¹ Los estudios serológicos se basan en demostrar un aumento significativo del título de anticuerpos entre el suero colectado en la fase aguda de la enfermedad y durante la convalecencia del animal.⁴⁴

Fijación del complemento (FC). La técnica de FC mide anticuerpos específicos a la nucleoproteína. Es una técnica laboriosa y con sensibilidad baja, por lo que su uso se ha reducido prácticamente.⁴⁴

Inhibición de la hemoaglutinación (IH). Es una prueba básica que se realiza actualmente en diferentes laboratorios, es rápida, económica y fácil de estandarizar y además tiene la ventaja que es una prueba cuantitativa. Se detectan anticuerpos para la hemoaglutinina y para cada subtipo. Como la IH está basada en el fenómeno de la hemoaglutinación del virus,⁴ una sencilla IH no puede ser usada para detectar ambos subtipos, a menos que se utilicen de manera independiente los antígenos para realizar la prueba. Sus resultados se correlacionan bien con la capacidad neutralizante y protectora contra la reinfección por virus homólogos, por lo cual se utiliza para medir respuestas a la vacunación (frente a antígenos específicos del subtipo). Sus mayores inconvenientes son la sensibilidad a los inhibidores no específicos presentes en los sueros y las reacciones cruzadas entre las cepas del mismo tipo.^{4, 44}

Ensayo Inmunoenzimático (ELISA). La prueba detecta el antígeno del subtipo que está cubriendo las placas. Es una prueba de alta sensibilidad y especificidad, además de ser rápida, fácil y tiene la ventaja de poderse automatizar. Su limitante

es el costo comparado con la prueba de IH. La prueba de ELISA no detecta anticuerpos a todos lo virus de campo H1 con igual sensibilidad.⁴⁴

1.9 TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL.

No existe tratamiento, únicamente se utilizan paliativos tales como expectorantes y antibióticos para evitar complicaciones, así como procurar un medio ambiente adecuado y confortable para los cerdos.⁴⁶ Si los cerdos enfermos se mantienen calientes y no expuestos a condiciones estresantes el curso de la enfermedad puede ser benigno y con muy pocas complicaciones.¹³

Debido a que la vacunación es el principal método de prevención de la enfermedad, es importante evaluarla junto con los calendarios de inmunización utilizados.⁵ La mejor vacuna es la preparada con el subtipo de virus que está circulando.⁴³

1.10 REPORTE EN MÉXICO.

En México se ha reportado la presencia del VIP subtipo H1N1 desde el año de 1982, durante un brote en una granja del Estado de Puebla ⁴⁷ mientras que el subtipo H3N2 se ha reportado que está presente en sueros porcinos desde el año 1979.¹⁴

En México, desde hace algunos años se ha comenzado a monitorear el VIP con lo que se ha evidenciado la presencia de los subtipos H1N1 y H3N2 en la República Mexicana. En zonas rurales en Yucatán del municipio de Maxcanu, el sistema de traspatio es una actividad tradicional de personas indígenas mayas de las cuales se tomaron 115 muestras de sangre y por medio de la técnica de IH se encontró la seroprevalencia de 26.9% a A/Bayern/7/95(H1N1), 40.8% a A/Sidney/5/97(H3N2), 1.7% a A/Swine/Wisconsin/238/97(H1N1) y 79.8% a A/Swine/Minnesota/593/99(H3N2). Este es el primer informe en México del

predominio de anticuerpos al virus de la gripe de los cerdos en los humanos.⁴⁸ También se ha evaluado la seroprevalencia en animales de diferentes sistemas de producción donde se encontró que el 77.8% fueron positivos al subtipo H1N1 y el 44% al H3N2, resultados que variaron de acuerdo al sistema de producción.⁷ En el estado de Yucatán se detectó la presencia de los 2 subtipos y el 56% de las granjas se observó al menos un animal serológicamente positivo, con lo que concluyeron que la enfermedad está ampliamente distribuida en la línea de producción.⁴⁹ Otro estudio reporta la coexistencia de ambos subtipos en diferentes zonas productoras en México (noroeste, noreste, bajío, centro, sureste y Yucatán). En donde la zona centro, con el segundo lugar en seroprevalencia para H1N1 (80%) y el primero para H3N2 (52%).⁵⁰

La IP ha pasado de ser un padecimiento estacional ocasionado por un genotipo viral estable, para convertirse en un enfermedad respiratoria de incidencia constante causada por múltiples genotipos que se encuentran bajo continuo cambio

A mediados del 2009, aparece una nueva variante denominada A/H1N1-2009, y fue detectada en humanos. Los cerdos también son susceptibles a este virus y podría ser incluida en las vacunas destinadas a esta especie.⁵¹

II.- JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad no existen reportes en la Ciudad de México de la seroprevalencia y distribución del Virus de Influenza Porcina a través de los años y en las delegaciones, por lo que es necesario realizar estudios encaminados a conocer la situación sanitaria de los porcinos en esta zona, debido al estrecho contacto que guardan los cerdos con los humanos y otras especies en este sistema de producción.

III.- HIPOTESIS.

Debido a las características de crianza de cerdos en los sistemas de producción artesanal o de traspatio en el Distrito Federal donde la densidad de población porcina por predio es relativamente baja, esperamos encontrar una seroprevalencia menor al 20% hacia ambos subtipos del VIP(H1N1 y H3N2).

IV.- OBJETIVO.

Identificar la seroprevalencia contra Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 en sueros porcinos de traspatio provenientes de las diferentes delegaciones en el Distrito Federal en el periodo comprendido del año 2000 al 2009.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Selección de muestras.

El estudio se realizó con muestras procedentes del D.F. remitidas durante los años 2000 a 2009 al Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPAC) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y que se encuentran almacenadas en el banco de sueros del Laboratorio del DPAC. De acuerdo con la base de datos que se realizó para conocer el inventario general del banco de sueros del D.F., donde se registró la ubicación, procedencia, identificación y número de muestras por casos remitidos al Laboratorio del DPAC, se seleccionaron las muestras de manera aleatoria. En las delegaciones donde se tuvieron más de 100 sueros por año, solo se seleccionaron 50 para este estudio.

(Cuadro 2.)

Cuadro 2: Numero de muestras obtenidas por delegación y por año a partir del banco de sueros del DPAC.

DELEGACIÓN	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL / DEL.
1= Azcapotzalco	50	50	35	50	33	34		50	50	50	402
2= Milpa Alta	50	50	48	50	23				50	50	321
3= Tláhuac	50	50	50	50	27	25		50	50	50	402
4= Tlalpan	50	50	46	29		50	20	50		50	345
5= Xochimilco	50	50	37	24	34	50		50	50	50	395
6= M. Contreras			8				15				23
7= Coyoacán			15	37	37						89
8= Iztapalapa			7	10			11	50			78
9= G.A. Madero			4				3				7
10= Iztacalco							3				3
11= Cuajimalpa						6			14		20
12= A. Obregón									9		9
TOTAL / AÑO	250	250	250	250	154	165	52	250	223	250	2094

5.2 Organización de muestras.

Una vez seleccionadas las muestras, se tomo de cada tubo eppendorff 250µL de suero de forma estéril en la campana de flujo laminar para colocarlo en placas de

96 pozos de fondo plano, en orden consecutivo, por delegación y año correspondiente. Se mantuvieron en congelación a -20°C hasta la realización de la prueba.

5.3 Replicación del antígeno.

Se utilizaron los virus de referencia A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1) y A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2). Se inoculó 200 μL del virus en embriones de pollo de 9 días Libres de Patógenos Específicos (SPF) en cavidad alantoidea y se incubaron a 37°C . Los embriones que murieron a las 24hrs. fueron eliminados. La colecta del líquido corioalantoideo se realizó a las 48 y 72hrs. pos inoculación en tubos de 10ml para después centrifugarlo a 3,500 rpm / 5 min.

5.4 Titulación del virus.

Se tituló por hemoaglutinación de la siguiente manera:

- Se colocó 50 μL de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) con un pH de 7 a 7.2 en una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo en "U".
- Se colocó 50 μL de virus y se realizaron diluciones dobles seriadas desde 2 hasta 4096.
- Se colocó 50 μL por pozo de una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5% (previamente preparados con PBS) a toda la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta que sedimentaron los botones de control de eritrocitos para posteriormente realizar la lectura.
- El virus se ajustó a 8 Unidades Hemoaglutinantes (UH) para la prueba.

5.5 Adsorción.

En una placa de 96 pozos de fondo plano se colocó las siguientes cantidades de suero, caolín y suspensión de eritrocitos de ave, para eliminar hemoaglutininas inespecíficas y posibles contaminantes:

-
- 65µL de suero.
 - 130µL de caolín.
 - 130µL de eritrocitos de ave al 8%.

Se dejó incubando 24hrs en refrigeración (4°C) para que posteriormente se tomara el sobrenadante (diluido 1:5) para realizar la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH).

5.6 Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH).

Esta prueba se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Snyder (1989).⁵²

- Se utilizó placas de microtitulación de 96 pozos de fondo en “U”.
- Se colocó 50µL de PBS a toda la placa.
- Se colocó 50µL de cada uno de los sueros en la fila “A”.
- Se realizaron diluciones dobles seriadas de la fila “A-H”.
- Se colocó 50µL de antígeno de VIP subtipo H1N1 previamente diluido con 8UH de la fila “B-H” y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30min.
- Se colocó 50µL de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5% a toda la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente hasta que sedimentaron los eritrocitos para realizar la lectura.
- Control de virus: 50µL PBS + 50µL de antígeno + 50µL de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%
- Control de eritrocitos: 50µL PBS + 50µL de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%
- ***Se realizó el mismo procedimiento utilizando como antígeno VIP subtipo H3N2.***

Las diluciones de los sueros fueron a partir de 1:10 hasta 1:1280 y se consideraron positivas aquellas muestras con un título mayor o igual a 1:80.

5.7 Análisis de Resultados.

- Se acomodaron las delegaciones de acuerdo al número de muestras trabajadas, de mayor a menor.
- Para el análisis a través del tiempo, se colocaron en orden consecutivo para ver el comportamiento del virus de influenza a través de los años.
- Se utilizó el programa estadístico SPSS® statistics versión 17.0 para analizar conteos y datos de frecuencia:
 - ✓ Frecuencia de muestras seropositivas al VIP subtipos H1N1 y H3N2.
 - ✓ Frecuencia de muestras seropositivas para ambos subtipos del VIP.
 - ✓ Frecuencia de muestras seropositivas por delegación para el VIP subtipos H1N1 y H3N2.
 - ✓ Frecuencia de muestras seropositivas a través de los años para el VIP subtipos H1N1 y H3N2.
 - ✓ Ji-cuadrada de Pearson (χ^2). Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre años o delegaciones.

VI.- RESULTADOS.

6.1 Frecuencias generales.

Se puede observar que de 2094 muestras analizadas por medio de la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación, la seroprevalencia general en el Distrito Federal fue de 74% (1549 muestras) para el subtipo H1N1; mientras que para el subtipo H3N2 fue de 24.1% de las muestras analizadas, es decir, 505 sueros; además, se encontró una seroprevalencia hacia ambos subtipos del 22.2% que representan 465 muestras. (Cuadro 3.)

Cuadro 3. Seroprevalencia general contra Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 en sueros porcinos del Distrito Federal.

Total de sueros	Subtipo	Número y porcentaje de sueros positivos	Número y porcentaje de sueros negativos	Número y porcentaje de sueros positivos para ambos subtipos
2094	H1N1	1549 (74%)	545 (26%)	465 (22.2%)
	H3N2	505 (24.1%)	1589 (75.9%)	

6.2 Frecuencias por delegación para el VIP-H1N1 y H3N2.

De acuerdo con las delegaciones que se trabajaron, la delegación Azcapotzalco representó el mayor porcentaje de sueros positivos para ambos subtipos con 81.8% para el subtipo H1N1 (el equivalente a 329 muestras) y 35.3% (142 muestras) para H3N2; mientras que existe un alto porcentaje (entre el 65-80%) de seropositividad contra VIP subtipo H1N1 en las seis delegaciones que la preceden: Coyoacán, Xochimilco, Tláhuac, Tlalpan, Milpa Alta e Iztapalapa, sucesivamente. El resto de las delegaciones (M. Contreras, Cuajimalpa, Iztacalco, Gustavo A. Madero y A. Obregón, sucesivamente) se encuentran entre el 22-48%. (Cuadro 4.)

Cuadro 4. Número y porcentaje de sueros positivos y negativos por delegación, para la presencia de anticuerpos contra Influenza Porcina subtipo H1N1.

Delegación	Total	(-)	% Delegación	% General	(+)	% Delegación	% General
Tláhuac	403	108	26.8%	5.16%	295	73.2%	14.09%
Azcapotzalco	402	73	18.2%	3.49%	329	81.8%	15.72%
Xochimilco	395	92	23.3%	4.39%	303	76.7%	14.48%
Tlalpan	344	93	27%	4.44%	251	73%	11.99%
Milpa Alta	321	95	29.6%	4.53%	226	70.4%	10.8%
Coyoacán	89	19	21.3%	0.9%	70	78.7%	3.35%
Iztapalapa	78	26	33.3%	1.24%	52	66.7%	2.48%
M. Contreras	23	12	52.2%	0.57%	11	47.8%	0.52%
Cuajimalpa	20	13	65%	0.62%	7	35%	0.34%
A. Obregón	9	7	77.8%	0.33%	2	22.2%	0.09%
G.A.M.	7	5	71.4%	0.24%	2	28.6%	0.09%
Iztacalco	3	2	66.7%	0.09%	1	33.3%	0.05%
	2094	545		26%	1549		74%

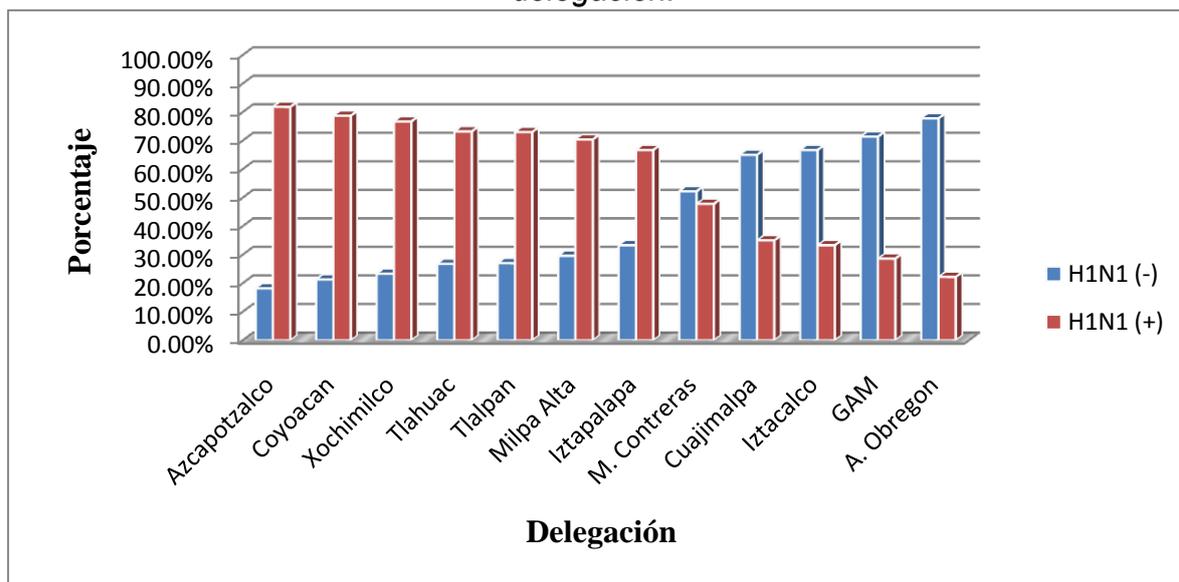
Para el subtipo H3N2 se encontró que la segunda delegación con mayor seropositividad fue Coyoacán con 34.8% (31 muestras), mientras que tres delegaciones cuentan con 24-29% de seropositividad: Tláhuac, Tlalpan y Milpa Alta, en orden descendente. El resto se engloba desde un 0-13%. (Cuadro 5.)

Cuadro 5. Número y porcentaje de sueros positivos y negativos por delegación, para la presencia de anticuerpos contra Influenza Porcina subtipo H3N2.

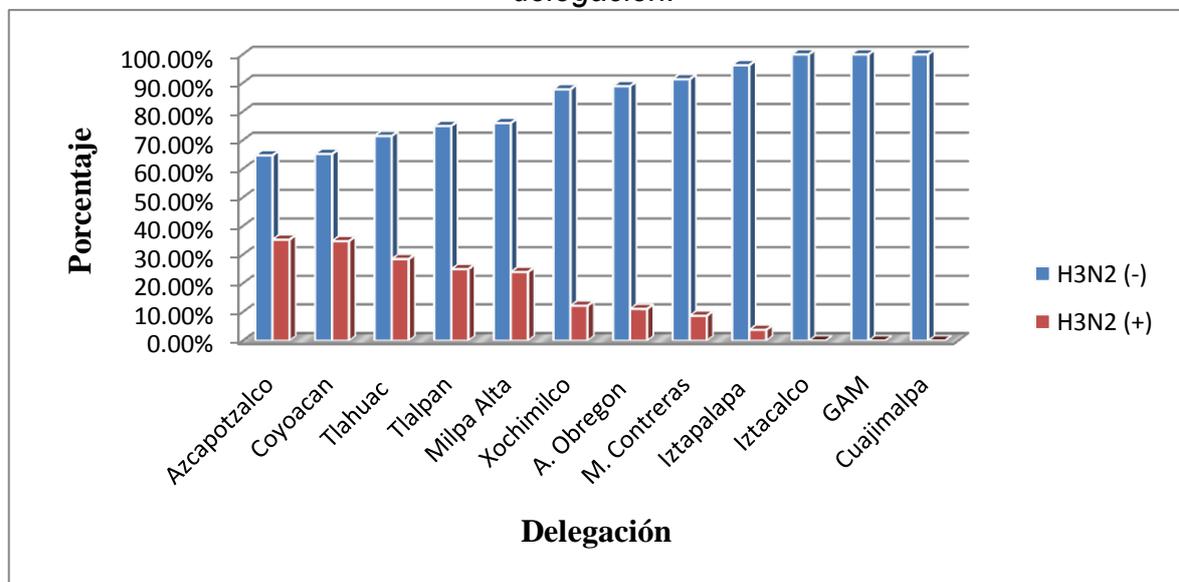
Delegación	Total	(-)	% Delegación	% General	(+)	% Delegación	% General
Tláhuac	403	288	71.5%	13.75%	115	28.5%	5.49%
Azcapotzalco	402	260	64.7%	12.42%	142	35.3%	6.78%
Xochimilco	395	347	87.8%	16.57%	48	12.2%	2.3%
Tlalpan	344	258	75%	12.32%	86	25%	4.1%
Milpa Alta	321	244	76%	11.66%	77	24%	3.68%
Coyoacán	89	58	65.2%	2.77%	31	34.8%	1.48%
Iztapalapa	78	75	96.2%	3.58%	3	3.8%	0.14%
M. Contreras	23	21	91.3%	1%	2	8.7%	0.09%
Cuajimalpa	20	20	100%	0.9%6	0	0%	0%
A. Obregón	9	8	88.9%	0.38%	1	11.1%	0.04%
G.A.M.	7	7	100%	0.34%	0	0%	0%
Iztacalco	3	3	100%	0.15%	0	0%	0%
	2094	1589		75.9%	505		24.1%

En las Gráficas 1 y 2 se observa el orden de las delegaciones de mayor a menor seropositividad para cada subtipo.

Grafica 1. Distribucion de la seropositividad hacia el subtipo H1N1 por delegación.



Grafica 2. Distribucion de la seropositividad hacia el subtipo H3N2 por delegación.



6.3 Frecuencias por año para el VIP-H1N1 y H3N2.

Los resultados obtenidos con respecto a los años 2000 al 2009, indican que el año 2007 obtuvo el mayor porcentaje de sueros positivos con 90% (225 muestras) para el subtipo H1N1. Los años que le precenden y que se encuentran con un porcentaje alto de 60-87% son: 2004, 2000, 2008, 2001, 2005, 2002 y 2003,

sucesivamente. El año 2009 y 2006 muestran porcentajes menores al 48% (120 muestras) y 23.1% (12 muestras) de seropositividad, respectivamente. (Cuadro 6.)

Cuadro 6. Número y porcentaje de sueros positivos y negativos a través de los años, para la presencia de anticuerpos contra Influenza Porcina subtipo H1N1.

Año	Total	(-)	% Anual	% General	(+)	% Anual	% General
2000	250	33	13.2%	1.56%	217	86.8%	10.36%
2001	250	48	19.2%	2.28%	202	80.8%	9.65%
2002	250	79	31.6%	3.76%	171	68.4%	8.17%
2003	250	83	33.2%	3.94%	167	66.8%	7.98%
2004	154	20	13%	0.94%	134	87%	6.4%
2005	165	52	31.5%	2.47%	113	68.5%	5.4%
2006	52	40	76.9%	1.89%	12	23.1%	0.58%
2007	250	25	10%	1.18%	225	90%	10.75%
2008	223	38	15.7%	1.79%	188	84.3%	8.98%
2009	250	130	52%	6.19%	120	48%	5.73%
	2094	545		26%	1549		74%

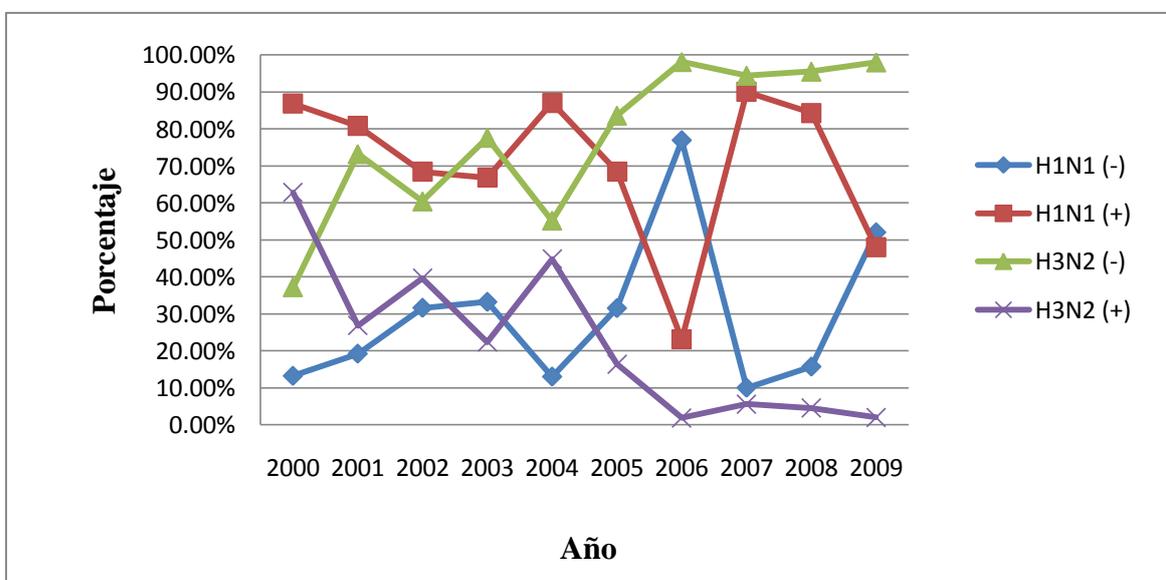
Mientras que el año 2000 representó para el subtipo H3N2 el mayor porcentaje de seropositividad con 62.8% (157 muestras), seguido del año 2004 con 44.8% (69 muestras) y 2002 con 39.6% (99 muestras). Los años 2001, 2003 y 2005 en orden sucesivo, cuentan con un porcentaje entre 16-27%. Por último los años con menor porcentaje de seropositividad se encontraron entre el 1-6% que fueron 2006, 2007, 2009, 2008 y 2009. (Cuadro 7.)

Cuadro 7. Número y porcentaje de sueros positivos y negativos a través de los años, para la presencia de anticuerpos contra Influenza Porcina subtipo H3N2.

Año	Total	(-)	% Anual	% General	(+)	% Anual	% General
2000	250	93	37.2%	4.44%	157	62.8%	7.5%
2001	250	183	73.2%	8.74%	67	26.8%	3.2%
2002	250	151	60.4%	7.21%	99	39.6%	4.72%
2003	250	194	77.6%	9.27%	56	22.4%	2.67%
2004	154	85	55.2%	4.06%	69	44.8%	3.29%
2005	165	138	83.6%	6.59%	27	16.4%	1.28%
2006	52	51	98.1%	2.44%	1	1.9%	0.05%
2007	250	236	94.4%	11.27%	14	5.6%	0.67%
2008	223	213	95.5%	10.18%	10	4.5%	0.48%
2009	250	245	98%	11.7%	5	2%	0.24%
	2094	1589		75.9%	505		24.1%

En la Gráfica 3 se muestra el comportamiento del Virus de Influenza a través de los años para ambos serotipos.

Grafica 3. Comportamiento del Virus de Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 a través de los años.



6.4 Prueba de Ji-cuadrada de Pearson (χ^2) para el VIP-H1N1 y H3N2.

- χ^2 . VIP-H1N1.

Se encontró que existe evidencia estadística significativa ($P < 0.001$) para la distribución del VIP-H1N1 con la delegación y año respectivamente.

Para la comparación entre los años, el análisis estadístico mostró que hay diferencia significativa ($P < 0.001$) en el porcentaje de sueros positivos para los años 2000, 2002, 2005, 2007, 2008 y 2009, sin embargo, para los años 2001, 2003, 2004 y 2006 no se observó evidencia estadística ($P > 0.05$).

Por otro lado se observó que la comparación entre delegaciones mostraron evidencia significativa ($P < 0.001$) en el porcentaje de sueros positivos para Azcapotzalco, Milpa Alta, Tláhuac, Tlalpan, Xochimilco, M. Contreras, Coyoacán e Iztapalapa, mientras que las delegaciones G. A. Madero y Cuajimalpa no se encontró estadística significativa ($P > 0.05$). No se analizaron las delegaciones

Iztacalco y A. Obregón porque solo se tenía la observación del año 2006 y 2008 respectivamente.

- χ^2 . *VIP-H3N2*.

Se pudo demostrar que existe evidencia estadística significativa ($P < 0.001$) para la distribución del *VIP-H3N2* con la delegación y año respectivamente.

Para la comparación entre los años, el análisis estadístico mostró evidencia significativa ($P < 0.001$) en el porcentaje de sueros positivos para los años 2000, 2001, 2002, 2003, 2005 y 2008 pero no para los años 2004, 2006, 2007 y 2009 ($P > 0.05$).

Por otro lado se observó que la comparación entre delegaciones mostraron evidencia significativa ($P < 0.001$) en el porcentaje de sueros positivos para las delegaciones Azcapotzalco, Milpa Alta, Tláhuac, Tlalpan y Xochimilco, mientras que M. Contreras, Coyoacán e Iztapalapa no se encontró evidencia estadística ($P > 0.05$). No se analizaron las delegaciones G. A. Madero, Iztacalco, Cuajimalpa porque todas las muestras fueron positivas y A. Obregón solo se tenía la observación del año 2008.

VII.- DISCUSIÓN.

En la actualidad, existen pocos reportes en México sobre la dinámica del VIP en un sistema de traspatio, ya que es un sector que recibe poca atención por sus limitaciones en la crianza y el fin de sustentabilidad, sin embargo, se ha demostrado la coexistencia de ambos subtipos H1N1 y H3N2 en la República Mexicana, así como en otros países.^{50, 53} Con base en los resultados de este estudio en los cerdos del D.F. podemos observar que ambos subtipos H1N1 y H3N2 del VIP están ampliamente distribuidos con una seroprevalencia general para H1N1 del 74%, 24.1% para H3N2 y 22.2% de las muestras fueron positivas para ambos subtipos en las delegaciones muestreadas en los últimos 10 años.

Carreón (*et. al.*, 2005), reportó la seroprevalencia de IP en cerdos de pie de cría en 16 estados de las distintas zonas productoras de la República Mexicana en el periodo comprendido del 2003 al 2004, siendo la zona noroeste (Sonora y Sinaloa) la primera con mayor porcentaje de animales serológicamente positivos para el subtipo H1N1 con 81% y la zona centro la segunda con 80%. En el mismo estudio se encontró que la zona centro (Estados de México, Morelos, Puebla, Querétaro y Tlaxcala) fue la primera para el subtipo H3N2 con un 52% y la zona noroeste la segunda con 51% de seroprevalencia.⁵⁰ La seroprevalencia obtenida en el D.F. se aproxima con la zona centro y noroeste para el subtipo H1N1 (74%), para el subtipo H3N2 se observó una seroprevalencia menor en este estudio (24.1%), lo cual indica que en algunas zonas productoras puede predominar alguno de los subtipos virales y que la seroprevalencia del D.F. podría verse influenciada por los estados vecinos de la zona centro por el abastecimiento de cerdos hacia esta entidad.

Chávez (*et. al.*, 2005), trabajó con sueros de cerdos de pie de cría procedentes de diferentes estados de la Republica Mexicana donde reportó una seroprevalencia general del 43% para el subtipo H3N2 en diferentes estados obteniendo el 85% en Puebla, 65% en Veracruz, 62% en Jalisco, 60% en Morelos, 60% en Sinaloa, 58% en Estado de México, 40% en Michoacán, 39% en Sonora, 36% en Tabasco, 34% en Nuevo León, 30% en Tlaxcala, 26% en Coahuila, 22% en Yucatán, 21% en Querétaro, 12% en Guanajuato y 6% en Guerrero.⁵⁴ Varios estados tuvieron seroprevalencias más altas que las encontradas en el D.F. (24.1%). La mayoría de los estados son grandes productores de carne a nivel nacional y pertenecen a zonas con diferentes sistemas de producción la cual podría facilitar la presencia de la enfermedad por el grado de hacinamiento de los cerdos, situación que no se comparte con las explotaciones del D.F., pudiendo inferir el resultado de su seroprevalencia, la cual es similar en los estados de Tlaxcala (30%), Coahuila (26%), Yucatán (22%) y Querétaro (21%).

Jiménez (*et. al.*, 2006) y Lozano (*et. al.*, 2006), comprobaron la presencia del VIP subtipo H3N2 y H1N1 respectivamente en muestras de cerdos de pie de cría y engorda de granjas de sitios múltiples, ciclo completo, en un sitio de producción y de traspatio procedentes de diferentes estados de la Republica Mexicana colectadas entre los años 2004 al 2005, encontrando un 44% de muestras positivas para H3N2, donde el 58% de los cerdos de pie de cría de granjas de sitios múltiples fueron positivos y las muestras de cerdos de engorda de los animales de traspatio fue del 55%,¹⁴ mientras que para el subtipo H1N1 tuvo 77.8%, siendo mayor el nivel de anticuerpos en los animales de traspatio que en los cerdos de pie de cría y engorda de granjas de sitios múltiples y de cerdos de ciclo completo en un sitio de producción.⁷ Si bien, con este estudio se comprobó

que en el D.F. se da la presencia de ambos subtipos pese a las condiciones de crianza y estado inmune de los animales; la circulación viral se presentó en menor proporción en el D.F. hacia ambos subtipos H3N2 con 24.1% y 74% para H1N1. Pudimos observar que el tipo de sistema de producción no es un factor que limite la presencia del VIP ya que se observó un comportamiento similar con ambos estudios. Se cree que la circulación viral es menor en animales de traspatio pues suelen ser más resistentes a las adversidades climatológicas y a enfermedades. Sánchez (*et. al.*, 2008), en el año 2007 realizó una comparación serológica entre PCV-2 e IP mediante un muestreo transversal con 658 muestras analizadas en los Estados de Jalisco, Michoacán y Guanajuato. La seroprevalencia para el VIP subtipo H1N1 fue del 81.8% para Jalisco, Michoacán con 81.3% y el Estado de Guanajuato con 40%; mientras que para el subtipo H3N2 el estado de Jalisco obtuvo el 39.8%, Michoacán con 32.6% y Guanajuato con 30%.⁵⁵ En el D.F. la seropositividad para H1N1 (74%) fue elevada al igual que en los estados del bajío y para el subtipo H3N2 (24.1%) el porcentaje es muy próximo al de los tres estados reportados por Sánchez (*et. al.*, 2008). Un dato relevante es que la zona del bajío presenta la mayor concentración y movimiento de cerdos para la comercialización y abastecimiento hacia el D.F. posiblemente sea un factor importante para la prevalencia en esta entidad ya que existe una gran variedad de vías de comunicación que permite la diseminación de enfermedades durante el transporte de animales de un estado a otro.⁵⁵

En diversos países también se han reportado seroprevalencias hacia el VIP. Boulanger (*et. al.*, 2004), demostró la presencia del VIP subtipos H1N1 y H3N2 en granjas de ciclo completo de Venezuela. Trabajo con 305 muestras de animales

de pie de cría y lechones procedentes de 7 estados. El subtipo H1N1 fue detectado en el 7.9% de las muestras analizadas y para el subtipo H3N2 en un 8.2%,⁵⁶ seroprevalencia mucho menor para ambos subtipos en comparación con los resultados del presente estudio e independientemente de los diferentes sistemas de producción. En los cerdos del D.F., así como en Venezuela, no se ha empleado la vacunación, pudiéndose inferir que la presencia de los animales seropositivos, es producto de una infección natural. Mientras que en Europa, un monitoreo en Polonia por Markowska (*et. al*, 2000), determinó la seroprevalencia de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en cerdos domésticos y silvestres (jabalíes). Trabajaron 3945 muestras de granjas porcinas de 48 provincias y 937 muestras de sueros de jabalíes de 42 provincias. El subtipo H1N1 se detecto en 35 % de las muestras de cerdos domésticos y el 27.5% en sueros de jabalíes mientras que para el subtipo H3N2 fue del 29.3% y 7% de seropositividad en cerdos y jabalíes respectivamente, además de una seroprevalencia para ambos subtipos del 12.3% para cerdos domésticos y 3.6% para jabalíes.⁵⁷ La situación seroepidemiológica en este estudio y Polonia difiere para el subtipo H1N1 (74%) ya que es mayor la seropositividad en los cerdos de traspatio del D.F. que para los cerdos de granjas intensivas y jabalíes de Polonia, mientras que para el subtipo H3N2, la seropositividad es más cercana (24.1%) con los cerdos de granjas de Polonia y los animales traspatio del D.F. aunque en jabalíes sea mucho más baja que en este estudio. La seropositividad para ambos subtipos es elevado (22.2%) en comparación con el de Polonia, en este caso el estado inmunológico de los animales juega un papel importante en la infección con ambos subtipos que podría favorecer la variación genética o “*shift*”. Se puede observar la amplia distribución que existe del VIP no solo en animales de

producción intensiva y los cerdos de autoabastecimiento en comunidades rurales, sino también en la población de cerdos silvestres que viven en grupos matriarcales de 3 a 5 animales e incluso esta especie silvestre ha sido introducida en poblaciones autóctonas alrededor del mundo con cerdos domésticos lo cual facilita el contacto interespecies y el desarrollo de nuevos virus de influenza.

Para observar el comportamiento del VIP a través del tiempo, Ramírez (*et. al.*, 2005), realizó un estudio retrospectivo para IP subtipo H3N2, PCV-2 y Rubulavirus Porcino con muestras colectadas entre los años 1972 y 2000 a excepción de los años de 1974-1976, 1978 y 1982 trabajando un total de 706 muestras para IP. Los anticuerpos contra el VIP fueron observados desde el año 1979 con 1.84% equivalente a 13 muestras positivas.⁵⁸ Las muestras utilizadas en este estudio no fueron representativas de algunas delegaciones para los años que se trabajaron como sucedió con el estudio realizado por Ramírez (*et. al.*, 2005), sin embargo, corresponden a sueros que se remitieron al laboratorio del DPAC en los años descritos. Se puede observar que los anticuerpos contra el subtipo H3N2 se pudieron identificar en todos los años en el D.F. aunque no en todas las delegaciones. A través de los años pudimos ver que el VIP subtipo H3N2 se comportó con una transición irregular a partir del año 2000 al 2003 siendo el año 2000, 2002 y 2004 los años con una mayor seropositividad del 62.8%, 39.6% y 44.8% respectivamente; y con una tendencia descendente desde el año 2004 hasta el año 2009. Posiblemente la importación del pie de cría desde EUA hayan facilitado la distribución de este subtipo en diferentes zonas del país, aunque este subtipo H3N2 surgió entre los años 1997-1998, no se tienen registrados brotes de influenza, pero la presencia de anticuerpos ya ha sido reportada por Pacheco (*et.*

al., 2005) a partir del año 2000 y Chávez (*et. al.*, 2005) en el año 2003. Al menos una muestra en el D.F. fue positiva para el subtipo H3N2 como fue el caso del año 2006 que fue uno de los que tiene un menor número de muestras remitidas y también en este año el subtipo H1N1 presentó la menor seropositividad con 23.1%. Para el subtipo H1N1 tuvo un comportamiento oscilatorio pero con seropositividades considerables mínimas a partir del 48%. Los años 2007, 2004 y 2000 con la mayor seropositividad con 90%, 87% y 86.8% respectivamente, colocándolo como el principal subtipo del VIP que está presente en esta zona.

Con relación a las muestras de las delegaciones trabajadas, Ramírez (*et. al.*, 2007), realizó un estudio con 695 muestras para la detección de anticuerpos contra PCV-2 en animales de traspatio de 7 delegaciones (Tlalpan, Azcapotzalco, Coyoacán, Iztapalapa, Milpa Alta, Tláhuac y Xochimilco) del D.F. El 19.54% de las muestras presentaron niveles bajos de anticuerpos, 37.98% niveles medios y 34.82% fueron niveles altos y solo el 7.6% resultó negativo. La delegación Tlalpan presentó el mayor número de muestras con niveles de anticuerpos bajos, medios y altos.⁵⁹ En este estudio se encontró una amplia distribución de anticuerpos contra el VIP en las diferentes delegaciones y a través del tiempo. La delegación Azcapotzalco presentó el mayor porcentaje de sueros positivos para ambos subtipos, con 81.8% para el subtipo H1N1 y 35.3% para H3N2. Si consideramos la cantidad de predios por delegación donde el número de cerdos es variable además, del menor hacinamiento en estas explotaciones de traspatio, deberían resultar con menores muestras serológicamente positivas detectadas con las pruebas serológicas sin embargo, este comportamiento no se presentó.

VIII.- CONCLUSIONES.

- ❖ En este trabajo se demostró la presencia de anticuerpos por medio de la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación contra el Virus de Influenza Porcina en los cerdos de traspatio del Distrito Federal además, de darnos información sobre la distribución del virus en los años de estudio y algunas delegaciones del Distrito Federal.

- ❖ Con base en lo anterior podemos inferir, a través de la detección de anticuerpos, que ambos subtipos coexisten en la zona del Distrito Federal y que han estado presentes a través del tiempo.

- ❖ Contrario a lo que se creía, la seropositividad hacia ambos subtipos se presento de forma elevada con 74% para H1N1 y 24.1%, a pesar de las características de crianza de los cerdos en el Distrito Federal.

- ❖ Los resultados obtenidos son importantes en el contexto epidemiológico debido al papel que juegan los cerdos en la circulación del virus y el estrecho contacto con la población humana y otras especies domésticas, dando las condiciones suficientes para la transmisión interespecies o recombinación viral, además pueden ser útiles en el establecimiento de programas preventivos y de control.

IX.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Straw EB, D'Allaire S, Mengeling LW and Taylor JD. Diseases of swine 8 Edit. Ames, Iowa U.S.A. 2000: 277-290.
2. Gramer M. Influenza Virus: Basic Virology and Pigs, People, and Poultry: Influenza as a Zoonotic Disease.
3. Ducatez M.F., Webster R.G., Webby R.J. Animal influenza epidemiology. Vaccine. 2008: 26: 67 –69.
4. Gramer M. Defining swine influenza virus. Journal Swine Health and Production. 2005:13(3):157–160.
5. Trujillo OME, Carreón NR, Mercado GC, Quezada MF. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza H1N1 y H3N2 en sueros porcinos. Memorias de XXXIX Congreso Nacional de 2004. julio 28 - agosto 1; Mazatlán (Sinaloa) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2004: 181.
6. Dee SA. The porcine respiratory disease complex. Are subpopulations important? Journal Swine Health and Production. 1996; 4:147-149.
7. Lozano HMA, Mercado GC, Carreón NR, Jiménez NJL. Evidencia serológica de los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de Influenza Porcina en tres diferentes sistemas de producción en México. Memorias de XLI Congreso Nacional de 2006. agosto 16-19; Ixtapa (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2006: 251.
8. Carreón R, Palacios JM, Pérez M, Haro M. Detección de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H1N1 variante en sueros porcinos. Memorias de XLII Congreso Nacional de 2007. julio 25-28;

-
- Querétaro (Querétaro) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007: 228.
9. García M, Mercado C, Martínez R, Rosales F, García A. Determinación de los títulos de anticuerpos conferidos por una vacuna comercial para influenza porcina en hembras de pie de cría con una y dos aplicaciones. Memorias de XIX Congreso Nacional de 2007. julio 25-28; Querétaro (Querétaro) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007: 234.
 10. Pérez JA, Palacios JM, Martínez OC, Arias SG, Ortiz EP. Porcentaje de seropositividad de influenza porcina en la zona de los altos. *Acontecer porcino*. 2007, 84 Abril-Mayo: 19-22.
 11. Vincent L. A review of swine influenza diagnostics. *Journal Swine Health and Production*. 1998; 6 (1): 33–34.
 12. Trujano M, Palacios JM. Impacto epidemiológico del virus de influenza en porcinos. Memorias de XL Congreso Nacional de 2005 julio 25-29; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2005: 144-146.
 13. Franck, F. *Virología Veterinaria* Edit. Acribia. 2da edic. 1992: 490-495.
 14. Jiménez L, Mercado C, Carreón R, Herradora M. Determinación de anticuerpos contra el virus de H3N2 en cerdos de diferentes sistemas de producción en México. Memorias de XLI Congreso Nacional de 2006. agosto 16-19; Ixtapa (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2006: 200.
 15. García Juan, Ramos C. La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Publica de México*. 2006; 48: 244-267.

-
16. Cevallos M. La influenza de las estrellas. Breve historia. Revista de divulgación de la ciencia ¿Cómo ves? 2003; 51: 10-17.
 17. Carreón R, Chapa-Bezanilla J, Martínez OC, Pacheco R, Palacios JM. La infección por virus de influenza porcina en México. Memorias de XL Congreso Nacional de 2005 julio 25-29; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2005: 198.
 18. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*. 2000; 74: 29-46.
 19. Thacker E, Janke B. Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas. *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 197:19–24.
 20. Naffakh N, Van der Werf S. April 2009: an outbreak of swine-origin influenza A(H1N1) virus with evidence for human-to-human transmission. *Microbes and Infection* 2009; 11: 725-728.
 21. Avalos GP, Mendoza ES, Macias M, Trujillo ME, Sánchez JI. Seroprevalencia del virus de influenza porcina en el bajío de la República Mexicana. Memorias de XLIII Congreso Nacional de 2008. julio 23-26; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2008: 170.
 22. Morilla A. Jeffrey J. Kyoung-Jin Yoon. Enfermedades víricas emergentes. *Multimedica Ediciones veterinarias edición española* 2004: 29-35.
 23. Geo Vana, Kristi M. Westover. Origin of the 1918 Spanish influenza virus: A comparative genomic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008; 47: 1100 –1110.

-
24. Straw B, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Enfermedades del cerdo. Intermédica. 8ª ed. Tomo I. Buenos Aires Argentina. 2001:161-168.
 25. Stine D, Anderson G, Liem A, Keil D, McCorkendale D. Recent observations of swine influenza disease and prophylaxis in US swine herds. Memorias de XXXXVII Congreso Nacional de 2002; Pto. Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2002: 43-46.
 26. Arbeláez A, Calderón D, Rincón M, Lora A, Marcela Mercado. Improvement of two diagnostics methods for detection of influenza swine virus. Revista de la Facultad de Ciencias. 2008; 13: 65-74.
 27. Spronk. G. Swine Influenza Virus. Advances in Pork Production 2001;12: 51-54.
 28. Lamb R, Krug R. Orthomyxoviridae, in: Fields B, Knipe D, Howley P, eds. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott- Raven; 2001:1487-1532.
 29. Malik Peiris J.S., Leo L.M., Guan Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV)H1N1 virus in humans. Clinical Virology. 2009; 45: 169-173.
 30. Palacios JM. Epidemiología de la influenza porcina. Memorias de XLIII Congreso Nacional de 2008. julio 23-26; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2008: 69-72.
 31. Morilla A. Medidas de bioseguridad y recomendaciones para reducir el riesgo de nuevas cepas de influenza. Acontecer porcino. 2009, 96 Junio-Agosto: 50-54.

-
32. Organización Panamericana de la Salud. Clamidiosis, rickettsiosis y virosis Washington DC EUA Tercera edición vol. II 2003: 329-343.
33. Castrucci M. R., I. Donatelli, L. Sidoli, G. Barigazzi, Y. Kawaoka, R.G. Webster. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology*. 193(1):503-6.
34. Webby R. J. and R.G. Webster. 2001. Emergence of influenza A viruses. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356:1817-1828.
35. Alexander, D. J. and I. H. Brown. 2000. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. *Rev. Sci. Tech.* 19:197-225.
36. Dacso, C. C., R. B. Couch, H. R. Six, J. F. Young, J. M. Quarles, and J. A. Kasel. 1984. Sporadic occurrence of zoonotic swine influenza virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 20:833-5.
37. Top, F. H. Jr. and P. K. Russell. 1977. Swine influenza A at Fort Dix, New Jersey (January-February 1976). IV. Summary and speculation. *J Infect Dis.* 136:S376-80.
38. Wells, D. L., D. J. Hopfensperger, N. H. Arden, M. W. Harmon, J. P. Davis, M. A. Tipple, and L. B. Schonberger. 1991. Swine influenza virus infections. Transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission. *JAMA.* 265(4):478-81.
39. Romvary J, Tinyi J. 1975. Hong Kong Influenza virus infections in animals in Hungary. In Proc 20th World Vet. Congress. PG: 1455-1456.
40. Tumova B, Mensik J, Stumpa A, Fedova B. 1976 Serological evidence and isolation of a virus closely related to the human A / Hong Kong/ 68 (H3N2) strain in swine population in Czechoslovakia in 1969-1972. *Zentralbl Veterinarmed* 23: 590-603.

-
41. Hinshaw V, Bean W, Webster R, Easterday B 1978. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. *Virology* 84: 51-62.
42. Sin autores (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*, 58 (4), 585-91 PMID: 6969132.
43. Morilla A. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. Manual Moderno. 2da ed. México, D.F. 2005: 215-219.
44. Carreón, R. Diagnostico de influenza porcina, una necesidad actual. Los porcicultores y su entorno. 2005, 45 Mayo-Junio: 56-62.
45. Beltrán R, Martínez R, Trujillo M, Sánchez J. Identificación del virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 mediante RT-PCR. Memorias de XLII Congreso Nacional de 2007. julio 25-28; Querétaro (Querétaro) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007: 190.
46. González CT, Ramírez MH, Stephano HA, Espino RG. Evaluación serológica del virus de la influenza porcina en cerdos de 10 granjas de 5 estados de la Republica Mexicana. Memorias de XXV Congreso Nacional de 1990 agosto 15-18; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1990:148-149.
47. Ramírez S.M.A. Aislamiento e identificación del Virus de Influenza Porcina en México. *Veterinaria México*. 1982: 13: 103.

-
48. Talavera G, Burgos J, Armas A. Serologic evidence of human and swine influenza in mayan persons. *Emerging Infections Disease*. 2005; 11(5): 158-160.
 49. Álvarez FM, Rodríguez BJ, Ayora TG, Villegas PS. Estudio transversal de el virus Influenza subtipo H1N1 y H3N2 en granjas porcinas del estado de Yucatán, México. *Memorias de XXXVI Congreso Nacional de 2001 julio 25-29; Querétaro (Querétaro) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2001: 115.*
 50. Carreón NR, Mercado GC, Trujillo OME, Chávez RS. Coexistencia serológica de los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de influenza porcina en diferentes zonas de México. *Memorias de XL Congreso Nacional de 2005 julio 25-29; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2005: 197.*
 51. Palacios JM. Epidemiología de la influenza porcina. *Acontecer porcino*. 2009, 96 Junio-Agosto: 12-14.
 52. Hedberg G, Reed RL, Snyder ML. *Manual of the Diagnostic Virology Laboratory*. National Veterinary Services Laboratories, Ames Iowa 1989.
 53. Álvarez M, Rodríguez J, Ciprian A, Rodríguez L, Ayora G y Segura J. Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas de Yucatán, México. *Veterinaria México*. 2004; 35 (4): 295-305.
 54. Chávez R, Carreón R, Mercado C. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipos H3N2 en diferentes estados de la republica mexicana. *Memorias de XL Congreso Nacional de 2005 julio 25-*

-
- 29; León (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2005: 198.
55. Sánchez J, Gutiérrez R, Macias M, Avalos P, Trujillo M, Segalés J, Ramírez H. Comparación serológica de anticuerpos frente a PCV-2 e Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2, en cerdos del bajo mexicano Memorias de XLIII Congreso Nacional de 2008. julio 23-26; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2008: 168.
56. Boulanger A, Ramírez J, Moscardi A. Serological evidence of swine influenza virus infection on Venezuela pig farm. The 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany, 27 June- 2 July. 2004: 1: 67.
57. Markowska D, Pejsak Z. Monitoring studies of influenza viruses in Poland. The 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, 17-20 Sept. 2000: 662.
58. Quezada M, Castillo J, Segalés C, Correa-Girón P, Ramírez H. Estudio retrospectivo sobre circovirus porcino tipo 2, rubulavirus porcino e influenza porcina en cerdos del año 1972 al 2000 en México. Memorias de IV Congreso Internacional de Epidemiología 2005 octubre 6-8 Morelia (Michoacan) México. México (DF): Asociación Mexicana de Epidemiología, AC, 2005: 1-9.
59. Ramírez M.H. Martínez C, Mercado GC, Castillo HJ, Hernandez J Segalés J, Porcine circovirus type 2 antibody detection in backyard pigs from Mexico city. Research in Veterinary Science 2007: 83: 130 –132.