

# Estudio epidemiológico de la fiebre porcina clásica en granjas del altiplano en México

## Epidemiological study of classical swine fever in farms of the central Mexican highland

Ángel Lozada de Gante<sup>a</sup>, Eder Estrada Salmerón<sup>b</sup>, Fernando Diosdado Vargas<sup>b</sup>, Guadalupe Socci Escatel<sup>b</sup>, Elvira Carrera Salas<sup>b</sup>, Dolores González-Vega y Aguirre<sup>b</sup>, Hilario García Nieto<sup>c</sup>, Antonio Morilla González<sup>b</sup>

### RESUMEN

En México se ha promovido la vacunación de los animales y las medidas de bioseguridad, para reducir el riesgo de entrada del virus de la fiebre porcina clásica (FPC) a las granjas. Con objeto de establecer la asociación entre diversos factores de riesgo que pudieran haber influido en la infección a partir de una piara infectada índice en una zona porcícola del altiplano, se compararon 14 piaras en las que había animales enfermos de FPC y 23 en las que no los había. Se determinó que la cercanía de una piara susceptible a menos de dos kilómetros del caso índice fue el único factor de riesgo estadísticamente significativo (Razón de momios = 28.5; intervalo de confianza = 3.6 a 301.8). No hubo asociación con relación a las medidas de bioseguridad, número de animales en la piara, tipo de explotación, origen de los reemplazos, alimento de los animales, atención médica, vacunación, edad y años de estudio de los dueños y encargados de las granjas. Por medio de una encuesta serológica se pudo determinar que en algunas de las granjas en donde no estaban vacunando y consideradas como negativas clínicamente a FPC, había animales seropositivos, lo que sugería que el virus de campo se encontraba de manera endémica. Se determinó que la eficacia de la vacuna cuando había sido aplicada en los animales en cuatro granjas fue del 39 %. Se concluyó que a partir de la piara índice, el virus de la fiebre porcina clásica se difundió a las vecinas en un radio de 2 km, sin que las medidas de bioseguridad ni la vacunación hubieran sido protectoras.

**PALABRAS CLAVE:** Cerdos, Fiebre porcina clásica, Epidemiología.

### ABSTRACT

In Mexico vaccination and biosecurity measures have been promoted among hog farmers to reduce the risk of classical swine fever virus (CSF) infection of herds. A study was done of the association between risk factors that may have lead to a CSF outbreak in a hog farming zone in the Mexican highland. Of a total of 37 studied herds, 14 were found to have CSF cases and 23, had none. Only a proximity of less than 2 km between a herd and the index case was determined to be statistically significant (Odds ratio = 28.5, Confidence level 95 %; 3.61 to 301.85). No statistically significant association was found between CSF infection and biosecurity measures, number of animals in the herd, exploitation type, origin of replacement animals and feed, medical assistance, vaccination and age and education level (years) of the farm owner and manager. A serological survey showed that seropositive animals were found in some non-vaccinated herds without reported CSF cases, suggesting that the field virus was present in the herds. Vaccine efficacy was 39 % when applied to animals at four farms and tested with a challenge test. It is concluded that the classical swine fever virus spread from the index case to neighboring herds within a 2 km radius and neither biosecurity measures nor vaccination protected the herds.

**KEY WORDS:** Pigs, Classical swine fever, Epidemiology.

---

Recibido el 19 de septiembre de 2002 y aceptado para su publicación el 17 de marzo de 2003.

a Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

b Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 15.5 Carretera México-Toluca. Col. Palo Alto. Cuajimalpa 05110. México, DF. Tel 52572235 diosdado@micro.inifap.conacyt.mx Correspondencia y solicitud de separatas al tercer autor.

c Programa Potencial Productivo, CE-Bajío, INIFAP.

## INTRODUCCIÓN

En México se implementó una campaña de control y erradicación de la fiebre porcina clásica (FPC) en 1973, y para principios de los noventa ya se había eliminado la enfermedad del estado de Sonora y la península de Yucatán, los que actualmente están certificados internacionalmente como libres de la enfermedad<sup>(1)</sup>. Por medio de la vacunación intensiva y el control de la movilización, a mediados de los noventa la zona centro-occidente se declaró en erradicación, y el virus permaneció en la zona del centro en etapa de control. Debido a la falta de recursos económicos para apoyar a la campaña, para 1997 el virus nuevamente apareció y se dispersó en la zona en erradicación. Actualmente, la campaña de control y erradicación consiste en promover la vacunación de los animales y las medidas de bioseguridad para reducir el riesgo de que entre el virus a la granja; sin embargo, la enfermedad ha continuado afectando las piaras comerciales y a los cerdos de explotaciones de traspatio<sup>(1)</sup>.

Existen diversas vías que utiliza el virus para difundirse entre las piaras. Se ha determinado que los factores de riesgo más importantes son la densidad de cerdos, el número de granjas en una zona y una distancia al caso índice menor de 500 m. Al respecto, se ha definido como una área densamente poblada a aquélla que tiene más de 3,000 cerdos/km<sup>(2,3,4)</sup>. Otro factor de riesgo importante lo constituye la alimentación de cerdos con desechos de comida de restaurantes, hospitales, etc. que contengan carne de cerdo contaminada<sup>(5)</sup>; esta fue la causa del brote de 1988 en La Paz, Baja California, México, donde los cerdos eran alimentados con desechos de comida; así como de los brotes en Alemania<sup>(6)</sup> y probablemente del brote del Reino Unido en el año 2000<sup>(7)</sup>. También el contacto con personas y vehículos contaminados con virus de la FPC se consideran factores de alto riesgo<sup>(8)</sup>.

Se ha estimado que a partir del caso índice, el número promedio de piaras que se infectan en una semana fue de 1.09, y durante todo su periodo infeccioso llega a infectar un total de 6.8. Estas tasas van a variar con relación al número de granjas porcinas que se encuentren en la región<sup>(8,9)</sup>.

## INTRODUCTION

In 1973, a classical swine fever (CSF) control and eradication campaign was begun in Mexico. By the early 1990's the disease had been eliminated in the state of Sonora and the Yucatan Peninsula, both of which are currently internationally certified as free of CSF<sup>(1)</sup>. After intensive vaccination and control of animal movement, east-central Mexico was declared in eradication by the mid-1990, though CSF remained in the control stage in central Mexico. By 1997, however, the virus had reappeared and dispersed into the eradication zone, largely due to lack of funding for the eradication campaign. The control and eradication campaign currently consists of promoting animal vaccination and biosafety measures to reduce the risk of virus entry into farms. Despite these efforts CSF has continued spreading into commercial herds and backyard pigs<sup>(1)</sup>.

There are a number of ways the virus can spread between herds. The most important risk factors are pig density, the number of farms in the zone and a distance of less than 500 m to the index case. Densely populated areas have been defined as those with more than 3,000 pigs/km<sup>(2,3,4)</sup>. Another significant risk factor is the feeding of pigs with food waste from restaurants, hospitals, etc. that contain contaminated pork<sup>(5)</sup>. This led to an outbreak in 1988 in La Paz, Baja California Sur, México, some outbreaks in Germany<sup>(6)</sup>, and it was probably responsible for the outbreak in the United Kingdom in 2000<sup>(7)</sup>. Contact with CSF-contaminated people and vehicles is also considered a high risk factor<sup>(8)</sup>.

Estimates indicate that the number of herds infected in one week from an index case was 1.09, and that during the entire infectious period it reached a total of 6.8 herds. These rates can vary depending on the number of pig farms in a region<sup>(8,9)</sup>.

Constant and systematic immunization has allowed eradication of the disease in geographic zones such as The Netherlands in the 1980's<sup>(10)</sup> and regionally in the Rivas Department of Nicaragua<sup>(11)</sup>. Vaccination does not provide absolute protection and can even allow the virus to endemically establish

La inmunización constante y sistemática ha permitido la erradicación de la enfermedad de zonas geográficas como en Holanda en los ochentas<sup>(10)</sup> y de manera regional en el Departamento de Rivas en Nicaragua<sup>(11)</sup>. Se ha mencionado que la vacunación no proporciona una protección absoluta, e incluso permite que el virus se establezca de manera endémica en la piara infectada. Geerts *et al.*<sup>(12)</sup> evaluaron el efecto de la vacunación junto con la eliminación de animales enfermos de piaras infectadas y encontraron que después de un año, el virus continuaba presente en la granja.

Los estudios epidemiológicos de FPC que se han hecho en México han mostrado que el 87 % de los brotes ocurren en cerdos de traspatio y el 13 % en granjas comerciales<sup>(13)</sup>; esto es debido a que el sistema de comercialización en traspatio promueve la mezcla de animales y por consiguiente, el mantenimiento del virus en esa población sirve de fuente para las granjas comerciales<sup>(14,15)</sup>.

El objetivo de este estudio fue analizar la asociación entre diversos factores de riesgo que pudieran haber influido en la infección de las piaras con el virus de la FPC, a partir de una piara infectada en una zona porcícola del altiplano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Área de estudio*

Se trabajó en una zona porcícola del altiplano donde había 83 granjas, y junto con las explotaciones de traspatio se estimó la población en 130,000 cerdos, dando una densidad de población de 5,200 cerdos/km<sup>2</sup>.

Para analizar los factores de riesgo que permitieron la difusión de la fiebre porcina clásica se hizo un estudio descriptivo en mayo de 2001. Las piaras afectadas de FPC tenían un incremento de la mortalidad y más animales con el pelo hirsuto y de bajo peso, y los animales de la granja resultaron positivos a alguna de las pruebas de diagnóstico para FPC. Como piaras no afectadas se seleccionaron aquéllas en las que el dueño informó que no había habido mayor mortalidad o animales con el pelo hirsuto y de bajo peso, que la normal

itself in an infected herd. Geerts *et al.*<sup>(12)</sup> evaluated the effect of vaccination and diseased animal elimination in infected herds and found that the virus was still present in the farm one year later.

Epidemiological studies of CSF in Mexico have shown that 87 % of outbreaks occur in pigs raised in house yards and 13 % on commercial farms<sup>(13)</sup>. This is because the marketing system for backyard pigs promotes mixing of animals, which maintains the virus in the population and serves as an infection source for commercial farms<sup>(14,15)</sup>.

The present study objective was to analyze a number of risk factors that may have affected the infection of herds with CSF virus from an infected herd in the pig farming zone of the Mexican highland.

## MATERIALS AND METHODS

### *Study area*

The study area is located in the hog farming zone of the Mexican highland, which contains 83 hog farms. The swine populations at the farms, together with yard-raised animals, form an estimated swine population of 130,000, and a population density of 5,200 animals/km<sup>2</sup>.

A descriptive study was done in May 2001 to analyze the risk factors that allowed spread of CSF. The herds affected by CSF experienced an increase in mortality, contained more animals with rough hair and low weight and the farm animals were positive for some of the CSF diagnostic tests. The herds selected as unaffected were those for which the owner said there had been no increase in mortality neither animals with rough hair and low weight compared to normal conditions during the past three months and for which the animals killed for diagnosis resulted negative for the diagnostic test.

### *Classical swine fever diagnosis*

Direct immunofluorescence was done as described by Coba and Correa<sup>(16)</sup>. Cryostat cuts were made of the tonsils, spleen, ganglia, kidneys and ileocecal valve and fixed to slides with cold acetone for 20

en los últimos tres meses, y que los animales de la granja que se sacrificaron para el diagnóstico resultaron negativos a todas las pruebas de diagnóstico.

#### *Diagnóstico de fiebre porcina clásica*

Inmunofluorescencia directa. Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Coba y Correa<sup>(16)</sup>. A partir de tonsila, bazo, ganglio, riñón y válvula ileocecal se realizaron cortes en crióstato, que se fijaron a portaobjetos con acetona fría por 20 min, se incubaron con un conjugado específico durante 30 min, se lavaron y se observaron con un microscopio de luz UV.

Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa. La extracción del ARN total a partir de los diferentes órganos se llevó a cabo con Trizol<sup>®</sup> siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para la obtención del ADN complementario y la PCR se utilizaron los oligonucleótidos a) 5'-ATATATGCTCAAGGGCGAGT-3' y b) 5'-ACAGCAGTAGTATCCATTTCTTTA-3' que amplifican un fragmento de 308 pares de bases correspondiente al gen que codifica para la glicoproteína E2 (gp55) del virus de la FPC<sup>(17,18)</sup>.

Elisa de captura. Se prepararon macerados de órganos 1:10 en PBS, los cuales se analizaron mediante el kit comercial CSF-VIRUS-II (Dr. Bommeli AG. Stationsstrasse 12, CH-3097 Liebefel-Bern) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

ELISA competitiva. Se utilizó la prueba ELISA E2 (Lelystad, Holanda) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se consideró a un suero positivo cuando el porcentaje de inhibición fue de 51 % o mayor.

Se consideró una piara infectada cuando al menos un animal resultó positivo a alguna de las pruebas de diagnóstico.

#### *Encuesta*

Se llevó a cabo una encuesta entre los productores en la que se determinó: 1) Nivel de bioseguridad, que se evaluó por medio de la suma de: barda

min. They were then incubated with a specific conjugate for 30 min, washed and read with a UV light microscope.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Trizol<sup>®</sup> was used for total RNA extraction from different organs as per the manufacturer's instructions. For complementary DNA recovery and PCR, the oligonucleotides a) 5'-ATATATGCTCAAGGGCGAGT-3' and b) 5'-ACAGCAGTAGTATCCATTTCTTTA-3' were used, which amplify a 308 base pair fragment corresponding to the gene coding for the E2 glycoprotein (gp55) of the CSF virus<sup>(17,18)</sup>.

Capture ELISA. Organ macerates were prepared at 1:10 with PBS and analyzed with a commercial CSF-VIRUS-II kit (Dr. Bommeli AG. Stationsstrasse 12, CH-3097 Liebefel-Bern), following manufacturer's instructions.

Competitive ELISA was done using the ELISA E2 (Lelystad, The Netherlands) test following manufacturer's instructions. A sample was seropositive when the inhibition percentage was 51 % or greater.

A herd was considered as infected when at least one animal was positive for one of the diagnostic tests.

#### *Survey*

A survey was conducted among the hog producers to determine: 1) Biosafety level as evaluated with the sum of the factors: perimeter fence (value = 2); shower upon entry (value = 1); disinfectant carpets (value = 0.5); clean work clothes (value = 0.5); and animal loading/unloading outside of farm (value = 1). The total biosafety measures values ranged from between 0 (no measures) to 5 (all measures implemented). 2) The origin of replacement males and females, whether they are from the same farm (self-replacement) or external sources. 3) Exploitation type, whether it is farrow-to-finish, for sale of weanlings, feeder-to-finish or stocking. 4) Animal feed, whether it is from the same farm, commercial or food waste from restaurants, hospitals, etc. 5) Number of animals

perimetral (valor = 2), regadera para entrar (valor = 1), tapetes con desinfectante (valor = 0.5), ropa limpia de trabajo (valor = 0.5) y embarcadero para animales afuera de la granja (valor = 1); el valor total de las medidas de bioseguridad que se obtuvo fue de 0 = ninguna, hasta 5 en donde todas estuvieran implementadas. 2) Origen de los machos y hembras para reemplazo: propios de la granja (autoreemplazos), o externos. 3) Tipo de explotación: ciclo completo, vendían lechones, o compraban cerdos de diferentes orígenes para engordarlos, o acopiador. 4) El alimento para los animales: propio, comercial o desechos de restaurante, hospital, etc. 5) Número de cerdos en la granja. 6) Vacunación de los cerdos contra la fiebre porcina clásica. 7) Mortalidad en los últimos tres meses. 8) Atención técnica externa de la granja. 9) Edad del dueño de la granja. 10) Años de estudio del dueño de la granja. 11) Edad del encargado de la granja. 12) Años de estudio del encargado de la granja.

De las 83 granjas porcinas sólo se encuestaron 37 (44.6 %), de las cuales 14 fueron consideradas como afectadas y 23 no. En el resto de las granjas los productores no cooperaron en el estudio.

#### *Localización geográfica de las granjas*

Por medio de un geoposicionador (GPS Garmin) se obtuvieron las coordenadas geográficas de las granjas, que se transformaron en grados y decimales y se convirtieron en un mapa de puntos en el sistema ARC/INFO. A cada granja se le adicionó su base de datos y el mapa se desplegó y editó en Arc/View 3.2 en donde se midieron las distancias entre piaras<sup>(19)</sup>.

El análisis de la asociación entre los parámetros y la presencia de FPC se hizo por medio de la razón de momios (RM) con intervalo de confianza (IC) de 95 %<sup>(20)</sup>.

#### *Encuesta serológica*

Con objeto de determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de la fiebre porcina clásica, se obtuvieron muestras de sangre de cinco cerdos de engorda y cinco del pie de cría de cada granja, de

on farm. 6) Vaccination of animals against classical swine fever. 7) Mortality during last three months. 8) External technical assistance at farm. 9) Age of farm owner. 10) Years of education of farm owner. 11) Age of farm manager. 12) Years of education of farm manager.

Of the 83 hog farms in the zone only 37 were surveyed, of which 14 were affected by CSF and 23 were not. The producers at the unsurveyed farms chose not to partake in the survey.

#### *Geographical location of farms*

A Garmin GPS was used to obtain the geographical coordinates of the farms, which were transformed into degrees and decimals and converted into a map using the ARC/INFO system. The database for each farm was added to the map and the map was implemented and edited in Arc/View 3.2 to measure the distance between herds<sup>(19)</sup>.

Analysis of the association between the risk parameters and CSF presence was done using the odds ratio (OR) with a 95 % confidence interval (CI)<sup>(20)</sup>.

#### *Serological survey*

To determine the presence of CSF virus antibodies, blood samples were taken from five grow-finish and five feeder pigs from each farm, for a total of 290 samples. Antibody level was determined with a competitive ELISA test.

#### *Classical swine fever vaccine efficacy test*

The vaccine efficacy test was done in the isolation units of the National Center for Disciplinary Research in Veterinary Microbiology (Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria - CENID) of the National Institute for Forest, Agricultural and Livestock Research (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias - INIFAP). At some farms where vaccination was done there were pigs with clinical signs of CSF, indicating that the vaccine was not providing protection to the immunized animals. It was decided to carry out a vaccine efficacy test when applicable under farm

un total de 29. El nivel de anticuerpos fue determinado por medio de la prueba de ELISA competitiva.

*Prueba de eficacia de la vacuna de fiebre porcina clásica*

La prueba de eficacia de la vacuna se llevó a cabo en las unidades de aislamiento del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Debido a que en algunas granjas en que estaban vacunando había cerdos con signos clínicos de FPC, se sospechó que la vacuna no estuviera dando protección en los cerdos inmunizados. Se decidió efectuar una prueba de eficacia de la vacuna cuando era aplicada en condiciones de la granja. Para esto se utilizaron cuatro lotes de cinco cerdos cada uno, que habían sido vacunados con la cepa PAV-250 en la granja tres semanas antes, junto con dos lotes de cinco cerdos vacunados en condiciones de laboratorio con la vacuna diluida 1:100 y cinco cerdos testigo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana<sup>(21)</sup>. Se utilizó la cepa de desafío ALD 10<sup>6</sup> DL<sub>50</sub>/ml. A cada cerdo se le tomó la temperatura rectal y los signos clínicos y en caso de muerte se hizo la necropsia y el diagnóstico de fiebre porcina clásica.

La eficacia (E) de la vacuna se obtuvo por medio de la fórmula<sup>(20)</sup>:

$$E = \frac{\% \text{ de mortalidad de la prueba oficial} - \% \text{ de mortalidad de las pruebas de campo}}{\% \text{ de mortalidad en la prueba oficial}}$$

**RESULTADOS**

El virus de FPC fue introducido a la piara índice debido a que el dueño compró cerdos de diversos orígenes, probablemente algunos infectados, en diciembre del 2000. A partir de esa piara el virus se difundió a otras piaras en la zona.

Los signos clínicos que tuvieron los animales en las granjas afectadas fue variable, y en conjunto se observó anorexia, pelo hirsuto, fiebre, neumonía, diarrea, eritema en piel y orejas, incoordinación, amontonamiento, postración, convulsiones, retraso

conditions. Efficacy tests were done using four lots of five pigs that had been vaccinated at a farm with the PAV-250 strain three weeks before, two lots of five pigs vaccinated under laboratory conditions with the 1:100 diluted vaccine and 1 lot of five vaccinated control animals as stipulated in the Official Mexican Regulations (Norma Oficial Mexicana)<sup>(21)</sup>. The challenge strain was ALD 10<sup>6</sup> DL<sub>50</sub>/ml. Rectal temperature and clinical signs were taken for each pig and a necropsy and CSF diagnosis done in case of death.

Vaccine efficacy (E) was determined using the formula<sup>(20)</sup>:

$$E = \frac{\% \text{ mortality in official test} - \% \text{ mortality in field tests}}{\% \text{ mortality in official test}}$$

**RESULTS**

The CSF virus was introduced into the index herd because its owner purchased pigs from different sources, probably including some infected animals, in December 2000. The virus spread to other herds in the zone from this index herd.

Clinical signs manifested by the animals at the affected farms were variable and included anorexia, rough hair, fever, pneumonia, diarrhea, skin and ear erythema, lack of coordination, piling, prostration, convulsions, retarded growth and mortality. Females suffered reduced fertility, abortions, mummification, vomiting in suckling pigs and a larger number of low weight pigs at weaning.

*CSF Diagnosis*

Using immunofluorescence, RT-PCR and capture ELISA it was determined that 14 farms had CSF-infected animals that were considered cases and 23 had no detected diseased animals or CSF was not diagnosed. The latter were used as controls.

*Survey results*

The results for association between different risk factors for CSF to be present in 14 herds and absent in 23 are shown in Table 1. The only factor found to be statistically significant (28.5 OR) was

ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA

en el crecimiento y mortalidad. Se redujo la fertilidad de las hembras y se presentaron abortos, momificación, vómito en lechones y un mayor número de cerdos de bajo peso al destete.

a proximity of less than 2 km of a herd to the index herd. The remaining evaluated parameters were not significant risks or protections for the appearance of CSF in a herd. Average mortality in

Cuadro 1. Nivel de asociación entre diferentes factores de riesgo para que se presente la fiebre porcina clásica (FPC) en granjas porcinas del altiplano\*

Table 1. Association level between different risk factors for appearance of classical swine fever (CSF) in hog farms of the Mexican highland\*

Risk factor	Farms with diagnosed CSF	Farms with no diagnosed CSF	Odds ratio	Confidence interval	Probability
Proximity to index case (km)					
≤ 1.990	12	4	28.5	3.6-301.8	0.0001
≥ 2.000	2	19			
Biosafety level (0-5)					
0 – 3.9	11	17	1.29	0.21-8.3	0.940
4.0 – 5.0	3	6			
Number of animals at farm					
≤ 499	4	9	0.62	0.12-3.1	0.7661
≥ 500	10	14			
Exploitation type					
Farrow-to-finish	12	20	0.60	0.05-7.1	0.9518
Sale of weanlings	2	2			
Origin of replacement animals					
External	11	17	1.29	0.21-8.3	0.9404
Self-replacement	3	6			
Feed					
In-house	14	23	0		
Commercial	0	0			
Technical assistance					
Present	7	12	0.92	0.20-4.2	0.8330
Not present	7	11			
CSF vaccination					
Vaccinate	7	13	0.77	0.16-3.5	0.9633
Do not vaccinate	7	10			
Owner age (years)					
≤ 49	10	12	2.29	0.46-12.1	0.4169
≥ 50	4	11			
Owner, years of schooling					
≤ 6	3	8	0.51	0.08-2.9	0.6233
≥ 7	11	15			
Manager age (years)					
≤ 49	14	22	0		
≥ 50	0	1			
Manager, years of schooling					
≤ 6	1	8	0.14	0.01-1.4	0.1322
≥ 7	13	15			

\* Association between parameters was determined via the odds ratio with a 95% confidence interval.

*Diagnóstico de FPC*

Por medio de inmunofluorescencia, RT-PCR, ELISA de captura se determinó que en 14 granjas había animales infectados con virus de FPC que fueron consideradas como casos y en 23 granjas no se detectaron animales enfermos o no se diagnosticó FPC y fueron tomados como controles.

*Resultados de la encuesta*

Los resultados de la asociación entre los diferentes factores de riesgo para que esté presente la FPC en 14 piaras afectadas y 23 no, se presentan en el Cuadro 1. Se encontró que el único factor estadísticamente significativo (RM 28.5) fue la cercanía de una piara al caso índice a menos de 2 km de distancia; el resto de los parámetros evaluados no fueron significativos.

Se determinó que la mortalidad promedio en las piaras afectadas fue de 25 % (rango de 10 al 50) y en las no afectadas de 15 % (rango de 5 al 30).

Para el análisis del muestreo serológico se dividieron a las piaras en aquéllas en las que se vacunaban o no a los cerdos y que había habido casos de FPC o no. Los resultados se muestran en el Cuadro 2.

Los resultados de la prueba de desafío de cerdos vacunados en condiciones de la granja y de laboratorio se presentan en el Cuadro 3. Se

Cuadro 2. Evaluación del porcentaje de cerdos que tenían anticuerpos contra el virus de la fiebre porcina clásica determinados por la prueba de ELISA

Table 2. Evaluation of percentage of animals with classical swine fever antibodies as determined with ELISA

Vaccination	CSF Diagnosis	Number of farms	Seropositive pigs	
			Number/total	%
No	No	8	22/80	27.5
No	Yes	5	42/50	84.0
Yes	No	9	76/90	84.4
Yes	Yes	7	52/70	74.2
Total		29	192/290	66.2

affected herds was 25 % (ranging from 10 to 50) and 15 % in the unaffected herds (ranging from 5 to 30).

For analysis, the serological sampling was divided into herds that had been vaccinated, or not, and those which had had a CSF case, or not. Results are shown in Table 2.

The results for the challenge test of animals vaccinated under farm and laboratory conditions are shown in Table 3. Vaccination efficacy when applied at the farms was 39 % and it was 100 % when applied in the laboratory at the 1:100 dilution.

**DISCUSSION**

In the hog farming zones of the Mexican highland CSF virus is now considered endemic in some commercial herds and in backyard pigs. To protect herds from this disease, health authorities and hog producer associations have suggested that producers vaccinate their animals and increase biosafety measures.

Cuadro 3. Protección de cerdos vacunados contra fiebre porcina clásica cepa PAV 250 en condiciones de granja y de laboratorio y desafiados con cepa ALD 10<sup>6</sup> DL<sub>50</sub>/ml

Table 3. Protection of vaccinated pigs against classical swine fever strain PAV 250 under farm and laboratory conditions, and challenged with strain ALD 10<sup>6</sup> DL<sub>50</sub>/ml

Vaccinated:	Seropositives/ total*	Deaths/ total	Mortality (%)
Farm 1	1/3	3/4	75
Farm 2	0/5	4/5	80
Farm 3	1/4	1/4	25
Farm 4	2/4	3/5	60
Laboratory 1**	3/4	0/4	0
Laboratory 2**	3/5	0/5	0
Controls	0/5	5/5	100

\* Blood samples were taken from animals approximately one month after vaccination and antibodies determined with the ELISA test.

\*\* Animals were vaccinated with a vaccine made with strain PAV-250 at 1:100 dilution as per NOM-36.

determinó que la eficacia de la vacuna aplicada en las granjas fue de 39 % y la aplicada en condiciones de laboratorio, diluida 1:100 fue del 100 %.

## DISCUSIÓN

Actualmente se considera que en las zonas porcícolas del altiplano, el virus de la fiebre porcina clásica se encuentra de manera endémica en algunas piaras comerciales y de explotaciones de traspatio. Con objeto de que las piaras puedan protegerse contra esta enfermedad, las autoridades sanitarias y las asociaciones de poricultores han sugerido a los productores que vacunen a los animales y que incrementen las medidas de bioseguridad.

Se determinó que la infección por virus de FPC se inició con la entrada de los animales en el mes de diciembre de 2000 en la granja índice, y que para enero empezaron a aparecer animales enfermos; los signos clínicos fueron vagos al inicio pero con el tiempo llamaron la atención del productor. El diagnóstico de la fiebre porcina clásica en los animales crónicamente enfermos no fue fácil; a partir de una piara el virus se pudo aislar de los cerdos de una granja, y cuando se inoculó en cerdos susceptibles, sólo la mitad murió y la otra mitad sólo tuvo fiebre ligera y se recuperó, indicando que el virus que estaba circulando en las granjas era de baja patogenicidad; además estos animales desarrollaron anticuerpos contra el virus de la FPC (datos no publicados). Los virus de baja patogenicidad producen infecciones crónicas, que se difunden lentamente en la piara sin que se presenten signos clínicos alarmantes, e inducen cerdas portadoras que hacen que la infección permanezca de manera endémica en las piaras<sup>(5)</sup>. Los productores y veterinarios consideraron que los animales estaban sufriendo una infección por virus del síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS), aunque en algunos casos tuvieron la sospecha de que se trataba de fiebre porcina clásica. Debido a que no hubo notificación no acudieron a las autoridades sanitarias para el diagnóstico, por lo que el virus se difundió a las piaras de la zona, como ha ocurrido en otros países<sup>(3)</sup>.

This CSF outbreak was determined to have begun with introduction of animals in December 2000 in the index farm. Clinical signs were initially vague but the producer noticed them over time. Diagnosis of CSF in chronically ill animals was not easy. The virus was isolated from a pig herd at a farm and when susceptible pigs were inoculated half died and the other half suffered a fever and then recovered. This indicates that the virus circulating in the farms was of low pathogenicity and that the animals developed antibodies against CSF (unpublished data). Low pathogenicity viruses produce chronic infections that spread slowly through a herd without presenting alarming clinical signs and create carrier pigs that make the infection endemic in the herds<sup>(5)</sup>. In this case, both producers and veterinarians thought the animals were suffering porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) disease though there were suspicions that it could be CSF. Because health authorities were not notified, the diagnosis was not done and the virus spread to herds throughout the zone, as has occurred in other countries<sup>(3)</sup>.

Because this study was done in May 2001, the herds subjected to the CSF diagnosis were those that had been infected the longest and which had manifest clinical signs. The farms treated as unaffected were those where the producers claimed there were no sick animals, but it was not certain that no infected animals were present since unvaccinated animals were found with CSF antibodies. Unfortunately, the owners of the other farms in the zone did not allow entrance onto their farms and could not be interviewed.

As far as association between CSF virus presence in a herd and the evaluated risk parameters, the only statistically significant parameter was a proximity of less than 2 km between a susceptible herd and an index case. This is similar to that reported by other researchers<sup>(5,6,22)</sup>, who report that CSF spread to neighboring herds is a high risk at distances of less than 500 m but can still occur at up to 3 km. The geographic information system (GIS) was very useful in determining distance between farms and pig population

Debido a que el estudio fue hecho en mayo de 2001, las piaras en las que se hizo el diagnóstico de FPC, fueron las que llevaban más tiempo infectadas y los signos clínicos eran más manifiestos. En las otras granjas que se tomaron como no afectadas, los productores no manifestaron que hubiera animales enfermos, sin embargo, no se tuvo la certeza de que no hubiera animales infectados, ya que se detectaron animales no vacunados con anticuerpos contra el virus. Desafortunadamente no se pudo entrevistar a los dueños del resto de las granjas de la zona, ya que no permitieron visitar sus instalaciones.

Con relación a la asociación entre la presencia de virus de la fiebre porcina clásica en la piara y los diferentes parámetros que se evaluaron, el único que fue estadísticamente significativo fue la cercanía de una piara susceptible a menos de dos kilómetros del caso índice. Este resultado fue semejante a lo publicado por otros investigadores<sup>(5,6,22)</sup>, indicando que el virus de la FPC se difunde a las piaras vecinas, siendo el mayor riesgo cuando se encuentran dentro de los 500 m, pero pueden alcanzar hasta los 3 km de distancia. El sistema de información geográfica fue muy útil para determinar las distancias entre las granjas y obtener la densidad de población<sup>(19)</sup>. Por otra parte, se ha tratado de cuantificar la tasa de infección y se ha encontrado que a partir de una piara afectada, se infectan 1.09 piaras durante una semana, pero la tasa de difusión se va modificando dependiendo de la densidad de la población porcina<sup>(8,9,22)</sup>.

En general ha sido difícil determinar las vías que sigue el virus para infectar a las piaras vecinas, lo que ha impedido establecer medidas preventivas en las granjas<sup>(23)</sup>. En este estudio no se pudo demostrar una asociación entre algunos factores de riesgo y la protección contra la FPC, que pudieran sugerir una mayor preocupación por la sanidad de la granja. En Holanda se encontró que las granjas de pie de cría y de engorda tenían mayores posibilidades de infectarse que las de ciclo completo<sup>(24)</sup>, pero esto no se observó en el estudio. Es de hacer notar que las medidas de bioseguridad que normalmente se implementan en las granjas del altiplano, no impidieron la entrada del virus de la FPC. Incluso

density<sup>(19)</sup>. Attempts have been made to quantify infection rate, showing that 1.09 herds are infected per week from an affected herd, but diffusion rate is modified depending on swine population density<sup>(8,9,22)</sup>.

It has generally been difficult to determine the paths the virus follows to infect neighboring herds, which has impeded preventative measures at these farms<sup>(23)</sup>. In the present study a clear association could not be shown between some risk factors and CSF protection which could suggest greater care need be taken with farm sanitation. Feeder pig and finish farms in The Netherlands were found to have higher possibilities of becoming infected than farrow-to-finish farms<sup>(24)</sup>, but this was not observed in the present study. Of particular note is that the biosafety measures in place at the farms of the Mexican highland did not prevent the entry of CSF. Indeed, one insemination center had level 5 biosafety measures, but was located within 2 km of the index case, and its animals were infected.

Vaccination was not a protection factor that avoided virus introduction into herds. This is because vaccination increases the animal's infection threshold but does not prevent infection, meaning that when it occurs it just reduces clinical manifestations, virus excretion and mortality. In this way the virus can enter a vaccinated herd and spread through animal management practices, mainly those that pass contaminated blood from one animal to another such as when one needle is used to inject groups of animals<sup>(5,25)</sup>. The virus can thus become endemic in the herd, coexisting with the vaccinated animals as mentioned previously<sup>(12)</sup> and corroborated in the present study.

The endemicity of CSF was manifest in higher mortality in herds with diagnosed cases than in herds with no cases. Other studies have reported that endemic CSF increases mortality from 18 % in the United States<sup>(26)</sup> to 30 % in Nicaragua<sup>(11)</sup>.

The study zone was considered to have a high swine population density (5,200 pigs/km<sup>2</sup>). Virus spread at this density is higher and only sacrifice

en un centro de inseminación que tenía medidas de bioseguridad nivel 5, pero localizado dentro de los 2 km del caso índice, los animales se infectaron.

La vacunación de los animales tampoco fue un factor protector que evitara la entrada del virus en las piaras. Esto es debido a que la vacunación aumenta el umbral de infección de los cerdos, pero no impide la infección, y cuando esto ocurre, sólo reduce las manifestaciones clínicas, la excreción de virus y la mortalidad. Es por este motivo que el virus puede entrar a una piara vacunada y se puede difundir a través del manejo de los animales, principalmente por procedimientos que pasen sangre contaminada de un animal a otro, como es el uso de una aguja para inyectar grupos de cerdos<sup>(5,25)</sup>. De esta manera, el virus permanece en la piara de manera endémica conviviendo con animales vacunados, como ya había sido mencionado<sup>(12)</sup> y que se corroboró en este estudio.

La endemidad de la FPC se vio reflejada en este estudio en una mayor mortalidad en las piaras donde se diagnosticaron los casos, que en las que no se detectaron. En otros estudios se ha mencionado que la FPC endémica incrementa la mortalidad desde 18 % en los Estados Unidos<sup>(26)</sup> hasta el 30 % en Nicaragua<sup>(11)</sup>.

La zona estudiada se consideró de elevada densidad porcina (5,500 cerdos por km<sup>2</sup>) en las cuales hay mayor grado de difusión del virus y sólo el sacrificio de piaras vecinas reduce la difusión del virus en estas zonas<sup>(22,24)</sup>.

La serología mostró que en todas las piaras de la zona, estén vacunadas o no, los animales tenían anticuerpos. Los resultados más interesantes fueron las ocho piaras en las que no se usaba vacuna ni se mencionó que hubiera animales enfermos de FPC. En estos casos el 27.5 % de los animales tenían anticuerpos y en la visita a las granjas, se encontraron animales con pelo hirsuto y de bajo peso, lo que sugeriría que podrían estar padeciendo de fiebre porcina clásica crónica<sup>(6)</sup>. Por otro lado en las granjas en que no vacunaban y había habido brote de FPC, el 84 % de los animales muestreados tenían anticuerpos a títulos elevados, indicando que

of neighboring herds can reduce virus spread in these zones<sup>(22,24)</sup>.

Serology showed that animals in all the herds in the zone, vaccinated or not, had CSF antibodies. The most interesting results come from the eight herds that were not vaccinated and for which CSF was reported in the animals. In these cases 27.5 % of the animals had CSF antibodies and animals with rough hair and low weight were found during the farm visit, suggesting that they may be suffering chronic classical swine fever<sup>(6)</sup>. In contrast, on the farms that did not vaccinate and had reported a CSF outbreak, 84 % of the sampled animals had antibodies at high titers, meaning the field virus was circulating. The same was true at farms where vaccination was done, whether a CSF outbreak was reported or not. These results are similar to those of Geerts *et al.*<sup>(12)</sup>, who used a modified live virus, or to those of Diosdado *et al.*<sup>(27)</sup>, who used a subunitary vaccine. In both cases, vaccination aided in clinically controlling the disease though the herds remained infected. This was reflected in the larger number of animals with high antibody titers with use of the modified virus and the presence of anti-E<sub>rns</sub> with the subunitary vaccine. These results demonstrate that some of the herds considered CSF-free actually have the virus but producers do not suspect that the clinical signs are due to the disease because they have been vaccinating the animals.

The serology results also suggest that the virus had spread to most of the farms in the study area because it was found to be endemic in herds regardless of their vaccination status. The producers complained that vaccination exacerbated clinical signs and mortality one to two weeks after application. This was interpreted as being due to the CSF virus infecting some animals, and then being passed to the remaining animals through use of a single needle for vaccine application. A few days later sick animals began to appear. Other vials of injectable substances (e.g. iron, antibiotics, bacterins and vaccines) had probably also been infected this way, meaning the animals were constantly being reinfected when being injected<sup>(5,25)</sup>.

el virus de campo estaba circulando, al igual que en las granjas en que estaban vacunando, ya sea que hubieran mencionado brote o no. Estos resultados fueron semejantes a los de Geerts *et al.*<sup>(12)</sup> utilizando vacuna de virus vivo modificado, o a los de Diosdado *et al.*<sup>(27)</sup> utilizando vacuna subunitaria; en estos casos, la vacunación ayudó a controlar clínicamente la enfermedad, pero las piaras permanecían infectadas, lo que se reflejó en mayor número de animales con títulos altos de anticuerpos cuando se usó vacuna de virus modificado, y por la presencia de anticuerpos anti E<sup>rns</sup> en caso de vacuna subunitaria. Estos resultados indicaron que algunas de las piaras consideradas como libres de FPC, en realidad el virus estaba presente, aunque los porcicultores no sospecharan que los signos clínicos eran debidos a esta enfermedad, porque estaban vacunando a los cerdos. Los resultados de la serología también indicaron que el virus se había difundido en la mayoría de las granjas de la zona estudiada, y que se encontraba de manera endémica en las piaras independientemente que vacunaran o no. Los porcicultores se quejaban de que la vacunación exacerbaba los signos clínicos y la mortalidad una a dos semanas después. La interpretación fue que debido a que el virus se encontraba infectando a algunos animales, al utilizar una aguja para aplicar la vacuna, ésta pasaba el virus de FPC al resto de los cerdos y pocos días después aparecían animales enfermos. Además, probablemente por medio de la aguja se habían contaminado los frascos de inyectables en la granja, como son el hierro, antibióticos, bacterinas y vacunas, por lo que constantemente se estaban re infectando los animales cuando se aplicaban los inyectables<sup>(5,25)</sup>.

Un resultado que llamó la atención es que la vacuna que se utilizaba en la zona, cuando se aplicó a los cerdos en condiciones de laboratorio, pasó satisfactoriamente la prueba oficial de eficacia<sup>(21)</sup>. Sin embargo cuando las vacunas fueron aplicadas en los animales en condiciones de la granja la protección fue insuficiente. No se pudo determinar la razón por la cual las vacunas aplicadas en el campo no confirieron protección a los animales. Este tipo de falla ya había sido mencionado con anterioridad; en un estudio se encontró una eficacia

Another noteworthy result is that the vaccine used in the zone satisfactorily passed the official efficacy test when applied to pigs under laboratory conditions<sup>(21)</sup>. When applied under farm conditions, however, the protection was insufficient. Why the protection of the vaccines applied under farm conditions was insufficient could not be determined. This same type of efficacy behavior has been reported previously in a study where vaccine efficacy when applied in the laboratory was 64 %, but only 36 % in the field. The reason for the lower efficacy in the vaccine applied in the field could not be determined in this case, either<sup>(28)</sup>. One possibility is that the animals had been vaccinated when they still had maternal antibodies, or the farm pigs were infected with PRRS, blue eye, or some other immune-suppressant factor that impeded development of protective immunity.

Vaccination raises the infection threshold of a herd, and reduces the number of infected animals and possible viral excretion. The effect of vaccination is to establish herd immunity, which can be attained through vaccination of the majority of animals in a zone over a prolonged period. The long term goal is to reduce and eventually eliminate the CSF virus from the environment.

Despite the reduction in vaccine efficacy in the field observed in this study and others<sup>(28)</sup>, it has been shown that strict, systematic vaccination over long periods can reduce the quantity of the virus in the environment and even eradicated CSF in some areas<sup>(10)</sup>. The present results show that immunization coverage was only 54 % (20/38) of the studied herds, which is insufficient, and allowed the CSF virus to spread into the environment.

The CSF outbreaks had both economic and social impacts on the producers. From the time CSF appeared animal production decreased, there were more low weight animals that ate more feed due to lower feed conversion and weight gain. As a result, more medications and vaccines were used to control pneumonia and diarrhetic disorders. In the stock breeding area females had problems with anestrus, abortions and premature births, all of which lead to higher costs.

de la vacuna de 64 % y en otro de 36 %, y no se pudo determinar a qué se debió la menor potencia de la vacuna cuando se aplicaba en el campo<sup>(28)</sup>. Una posibilidad es que se hayan vacunado los animales cuando todavía tenían anticuerpos maternos<sup>(29)</sup>, o que los cerdos de las granjas estaban infectados con virus de PRRS, del ojo azul o existía algún otro factor inmunosupresor que impidió que se desarrollara una inmunidad protectora.

La vacunación eleva el umbral de infección de la pira y reduce el número de animales infectados, así como la posible excreción viral. El efecto de la vacunación es el de establecer la inmunidad de pira, que se alcanza con la inmunización de la mayoría de los cerdos de una zona por un tiempo prolongado. El efecto es de reducir y eventualmente eliminar al virus de FPC del ambiente.

A pesar de la reducción de eficacia de la vacuna en el campo que se observó en este estudio y en otros<sup>(28)</sup>, se ha demostrado que la vacunación estricta y sistemática por largos periodos reduce la cantidad de virus en el medio, y se ha podido llegar a erradicar la enfermedad<sup>(10)</sup>. Los resultados indicaron que la cobertura de inmunización sólo era del 54 % (20/38) de las piras estudiadas, que fue insuficiente, y permitió que el virus de la FPC se difundiera en el ambiente.

Los brotes tuvieron un impacto económico y social en los productores; desde que apareció la fiebre porcina clásica produjeron menor cantidad de animales, hubo más animales de bajo peso, que consumieron mayor cantidad de alimento debido a una menor conversión alimenticia y ganancia de peso; se empezaron a utilizar más medicamentos y vacunas para controlar los cuadros neumónicos y diarreicos. En el área de pie de cría las hembras presentaron problemas de anestros, abortos y partos prematuros, lo que ocasionó mayores gastos.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se concluyó que a partir de la pira índice, el virus de la FPC se difundió a las vecinas en un radio de 2 km, sin que las medidas de bioseguridad ni la vacunación hubieran sido protectoras. Para controlar

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

It was concluded that the CSF virus spread from the index herd to neighboring herds within a 2 km radius, with no protective effect from biosafety measures or vaccination. To control and eradicate the CSF virus in Mexico a new intensive vaccination campaign needs to be implemented to reduce the quantity of virus in the environment. Once its prevalence is reduced an eradication phase should be started with sacrifice of infected herds, herds in contact with infected animals and neighboring herds. Low immunization coverage and allowing CSF-infected herds to remain infected would lead to the CSF virus's spread to other hog farming zones in Mexico and it would eventually reach the CSF-free zones.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks to Carlos Rosales Ortega, M.Sc. for reviewing this manuscript.

*End of english version*

---

y erradicar el virus de FPC en México es necesario establecer nuevamente una campaña de vacunación intensiva para reducir la cantidad de virus en el ambiente; una vez que la prevalencia se reduzca, se deberá pasar a una fase de erradicación por medio del sacrificio de las piras infectadas, las que estuvieron en contacto y las vecinas. La baja cobertura de inmunización y el permitir que las piras permanezcan infectadas con el virus provocaría una mayor difusión a las zonas porcícolas del país, y eventualmente podría alcanzar las zonas libres.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al MS Carlos Rosales Ortega por la revisión del manuscrito.

## LITERATURA CITADA

1. Solis SS. Evolución de la campaña de control y erradicación de la FPC en México. En: Morilla GA editor. La fiebre porcina clásica en las Américas. México, DF: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Fundación Produce Puebla, 2000;185-191.
2. Vannier P, Colcanap M, Carnero R, Costes C, Josse J, Tillon JP. Study of the origin of an epizootic of classical swine fever. *J Vet Med Br* 1986;33:294-302.
3. Koenen F, Van Caenegem G, Vermeersch JP, Vandenheede J, Deluyker, H. Epidemiological characteristics of an outbreak of classical swine fever in an area of high pig density. *Vet Rec* 1996;139:367-371.
4. Staubach C, Teuffert J, Thulke HH. Risk analysis and local spread mechanisms of classical swine fever. *Epidémiol Santé Animal* 1997;31-32:6121-6123.
5. Terpstra C. Hog cholera: an update of present knowledge. *Br Vet J* 1991;147:397-406.
6. Fritzeimer J, Teuffert J, Greiser-Wilke I, Staubach C, Schluter H, Moennig V. Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol* 2000;77:29-41.
7. Sandvik T, Drew T, Paton D. CSF virus in East Anglia: where from? *Vet Rec* 2000;147:251.
8. Stegeman A, Elbers AR, Bouma A, de Smit H, De Jong MC. Transmission of classical swine fever virus within herds during the 1997-1998 epidemic in The Netherlands. *Prev Vet Med* 1999;42:201-218.
9. Stegeman A, Elbers AR, Smak J, De Jong MC. Quantification of the transmission of classical swine fever virus between herds during the 1997-1998 epidemic in The Netherlands. *Prev Vet Med* 1999;42:219-234.
10. Terpstra C. Diagnóstico, control y erradicación de la fiebre porcina clásica con especial referencia a Holanda y a otros países miembros de la Unión Europea. En: Moreno CR editor. *Ciencia Veterinaria*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1996;7:213-239.
11. Zepeda C. The social impact of disease control and eradication programs: Case studies. En: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman J editores. *Trends in emerging viral swine infections*; Iowa State University Press; 2002;17-20.
12. Geerts P, Pensaert M, Sanchez R. A serological study on infection patterns, control and persistence of classical swine fever in infected farms in the Phillipines. *Vet Med Sci* 1995;57:917-920.
13. Rosales OC, Cabrera TA, Castillo MM, Salas M, Ugalde E. Análisis epidemiológico de los brotes de fiebre porcina clásica en México. En: Morilla GA editor. *La fiebre porcina clásica en las Américas*. México, DF: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Fundación Produce Puebla, 2000;193-206.
14. Aguirre F, Aguilar P, Martínez MA, Morilla A. Aspectos epidemiológicos de la campaña de vacunación intensiva contra la fiebre porcina clásica en el estado de Guanajuato 1991-1993. *Téc Pecu Méx* 1994;32(2):98-104.
15. Estrada SE, Diosdado VF, Arriaga RE, Ávila SE, Hernández CA, Morilla GA. Evaluación de algunos factores que pudieron influir en el incremento de la fiebre porcina clásica en el Estado de México, durante 1997. *Vet Méx* 2001;32:47-53.
16. Coba AMA, Correa GP. Diagnóstico de fiebre porcina clásica (FPC) por la técnica directa de inmunofluorescencia. México, DF: CENID-Microbiología, INIFAP; 1993.
17. Katz JB, Ridpath JF, Bolin SR. Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhoea and border disease virus by using a cDNA nested-amplification approach. *J Clin Microbiol* 1993;31:565-568.
18. Socci EG, Diosdado VF, Carrera SE, Macías GM, Arriaga DC, Morilla GA. Establecimiento de la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de la fiebre porcina clásica (FPC). *Téc Pecu Méx* 2003;41(1):105-110.
19. McGinn TJ, III, Cowen P, Wray DW. Geographic information systems for animal health management and disease control. *J Am Vet Med Assoc* 1996;209:1917-1921.
20. Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*. 2<sup>nd</sup> ed. UK: Blackwell Science Ltd; 1995.
21. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-036-ZOO-1996. Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica. Requisitos mínimos para las vacunas contra la fiebre porcina clásica. *Diario Oficial*. México, DF. 1996.
22. Elbers AR, Stegeman JA, Mozer H, De Jong MC, Ekker HM, Smak JA, de Leeuw PW. Effectiveness of preventive culling of pig herds during the Dutch CSF epidemic in 1997. *Proc Int Pig Vet Soc Congr* 1998;15:271.
23. Estrada SE, González-Vega D, Arriaga E, Avila SE, Hernandez A, Morilla A. Risk factors that may increase the number of outbreaks of classical swine fever in the control area of Mexico. *Proceedings of the OIE Symposium on classical swine fever (Hog Cholera)*, 1998.
24. Benard HJ, Stark KD, Morris RS, Pfeiffer DU, Moser H. The 1997-1998 classical swine fever epidemic in The Netherlands a survival analysis. *Prev Vet Med* 1999;42:235-248.
25. Hamdy F. Estrategias de control y erradicación en la fiebre porcina clásica. En: Morilla GA editor. *La fiebre porcina clásica en las Américas*. México, DF: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Fundación Produce Puebla, 2000;122-129.
26. USDA. Hog cholera and its eradication. A review of the U.S. experience. *Animal and Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture, APHIS* 1981;91-55.
27. Diosdado VF, Socci EG, Estrada E, Carrera SE, Rosales C, González-Silva C, Macías M, Aguilera A, Martens M, Macías D, Morilla GA. Field trial of a subunit vaccine against classical swine fever in Mexico [abstract]. *Proc Int Pig Vet Soc Congr* 2000;16:623.
28. Morilla, GA. Control y erradicación de la fiebre porcina clásica. En: Moreno CR editor. *Ciencia Veterinaria*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1994;6:174-206.
29. Corona E, González-Vega D, Arriaga C, Terpstra C, Morilla A. Serological response of swine vaccinated with classical swine fever virus. *Proc Int Pig Vet Soc Congr* 1996;14:103.