



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA
DETECCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

DIANA MATILDE SÁNCHEZ MORENO

**Asesores: M.V.Z., M.C.V., Cert. Rosalba Carreón Nápoles.
M.V.Z., Juan Manuel Palacios Arriaga.**



MÉXICO, D.F.

Mayo de 2008.



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.

Este trabajo está dedicado completa y profundamente a mi amado esposo Alejandro Cruz López, porque eres el amor de mi vida, por darme el privilegio de amarte y la fortuna de amarme.

Te dedico este trabajo en agradecimiento por todo lo hermoso que has traído a mi vida.

Alejandro te amo

Agradecimientos

Un enorme agradecimiento a la institución que me ayudo a formarme como profesionista, gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, específicamente a la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**.

A mi hija Mafe:

Gracias mi amor por llegar a mi vida y hacerme ver las cosas más hermosas, gracias por traer a mi vida más ilusiones y sueños que con todo mi amor, compartiremos juntas.
Te amo Mafe

A mi madre:

Gracias por ser una mujer tan sabia y enseñarme cosas nuevas todos los días. Gracias por confiar en mi e impulsarme con tus palabras y acciones a salir adelante.
Te amo mami

A mi padre:

Muchas gracias por enseñarme que todo se puede obtener con el trabajo, gracias por estar conmigo siempre y por hacer ese esfuerzo por entenderme.
Te amo Papichungaro

A mis hermanos:

Juan, gracias por ser mi hermano, por tu apoyo, compañía y amistad.
Toti, mi más profundo agradecimiento por tu orientación en el proyecto más grande de mi vida “ mi familia “, gracias por ser una luz, una guía en mi vida.
Mago, blanca, gracias por el apoyo incondicional, por sus oídos para escucharme, por su aportación a mi vida. Gracias
Ire: no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mi, gracias por ser mi amiga, madre, hermana, cómplice, gracias por haber estado conmigo en los momentos de confusión, por enseñarme el camino solo con tu ejemplo, gracias por tu apoyo moral y económico, por tu confianza, por ser “mi” hermana. Muchas gracias.
Jorge, coqueto, cactus, gracias por enseñarme que no importa cuanto nos falte por aprender de la vida, “nunca es tarde”

Los quiero

A mis asesores:

Doctora Rosalba Carreón Nápoles, muchas gracias por tenerme la confianza que me tiene, gracias por su apoyo en este proyecto, por su paciencia, por su guía, por su amistad.

Con todo mi cariño doctora muchas gracias.

Al Doctor Juan Manuel Palacios Arriaga, gracias por su tiempo, sus consejos y su confianza.

Quiero agradecer a todas las personas que durante mi paso por mi amada facultad me nutrieron con su amistad y sabiduría.

Gracias a mis profesores que forman parte importante de mi vida, muy especialmente a la profesora Cristina, al doctor Martínez Gamba, al amarillo, el doctor Marín. Muchas gracias.

A mis cuates, a mis remoras los quiero, Abi, Chio, Paulina, baquetón, Daniel, Gabriel, Samuel, Raúl, Héctor, Alejandra, Alexis y tantos más.

Muchas gracias por su amistad.

Finalmente quiero hacer un agradecimiento especial al **DPAC** por el espacio que me brindaron, por su tiempo y confianza.

Muchas gracias a todas las personas maravillosas que conocí en este lugar, Sra. Carmen, Sr. Inocente, Victor, Dra. Carmen, Dra. Esperanza, Dra. Ale, Dr. Pardal, Dr. Gerardo, Dr. Mario, Dr. Marco, Dr. Ivan y muchos más que, por el hecho de no estar en esta lista no

lleven con ellos mi gratitud.

Muchas gracias.

CONTENIDO

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Lista de cuadros.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1.0 Introducción.....	3
1.1 Antecedentes de la enfermedad.....	3
1.2 Historia de la enfermedad.....	4
1.3 Etiología.....	7
1.4 Epidemiología.....	12
1.5 Diagnóstico.....	17
1.5.1 Toma de muestras.....	17
1.5.2 Aislamiento viral.....	17
1.5.3 Detección de anticuerpos.....	18
1.6 Pruebas diagnósticas para detectar el virus, proteínas virales o ácidos nucleicos virales de influenza porcina.....	18
1.6.1 Aislamiento viral en embrión de pollo.....	18
1.6.2 Aislamiento viral en cultivo celular.....	19
1.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	20
1.6.4 Inmunohistoquímica.....	22
1.6.5 ELISA de captura.....	23
1.6.6 Inmunocromatografía.....	23

1.7 Pruebas diagnósticas para detectar la presencia de anticuerpos contra	
influenza porcina en la circulación sanguínea.....	25
1.7.1 Inhibición de la hemaglutinación.....	25
1.7.2 ELISA.....	26
2. Hipótesis.....	27
3. Objetivo general.....	28
4. Materiales y métodos.....	29
4.1 Toma de la muestra.....	29
4.2 Análisis de muestras.....	29
4.2.1 Inmunocromatografía rápida.....	29
4.2.2 Aislamiento viral en cultivo celular.....	29
4.3 Prueba de inmunocromatografía rápida.....	30
4.4 Aislamiento viral en cultivo celular con células MDCK.....	32
5. Resultados.....	39
5.1 Prueba de inmunocromatografía rápida.....	39
5.2 Aislamiento viral en cultivo celular con células MDCK.....	40
5.3 Comparación de resultados.....	43
6. Discusión.....	46
7. Conclusiones.....	50
8. Literatura citada.....	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Subtipos de los virus de influenza.....	12
Cuadro 2. Muestras positivas a la prueba de Inmunocromatografía rápida.....	39
Cuadro 3. Muestras con efecto citopático en la prueba de Aislamiento Viral.....	40
Cuadro 4. Aglutinaciones y títulos del primer pase a las 72 h. y 5 días.....	42
Cuadro 5. Resumen de los resultados de las pruebas de inmunocormatografía rápida y aislamiento viral de muestras positivas a las dos pruebas mostrando sus respectivas temperaturas corporales.....	43
Cuadro 6. Positividad de IP por los métodos de inmunocromatografía y aislamientoviral.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un virus de influenza tipo A.....	7
Figura 2. Representación esquemática de la replicación de los virus de influenza tipo A.....	10
Figura 3. Representación esquemática de los reservorios naturales de los virus de influenza.....	12
Figura 4. Fotografía del kit comercial de inmunocromatografía rápida FLUE DETECT.....	30
Figura 5. Fotografía de la incubación de las tiras reactivas de la prueba rápida.....	31
Figura 6. Fotografía de una tira reactiva positiva a la prueba de inmunocromatografía rápida.....	39
Figura 7. Fotografía de los resultados obtenidos de la prueba de Aislamiento Viral.....	40
Figura 8. Fotografía de la aglutinación del sobrenadante de una muestra positiva a la prueba de Aislamiento Viral.....	41
Figura 9. Fotografía de la titulación del sobrenadante de una muestra positiva a la prueba de Aislamiento viral.....	41

RESUMEN

DIANA MATILDE SÁNCHEZ MORENO. Comparación de dos métodos diagnósticos para la detección del virus de influenza porcina. (Bajo la dirección del M.V.Z. M.C.V., Cert. Rosalba Carreón Nápoles y del M.V.Z., Juan Manuel Palacios Arriaga).

La falta de una prueba rápida, sensible y específica para detectar la presencia del virus de influenza porcina, que ofrezca la ventaja de poder utilizarla en condiciones de campo, nos lleva a probar diferentes opciones para obtener un diagnóstico rápido y confiable. Para ello, se utilizaron 100 muestras de moco nasal obtenida con hisopos estériles, se compararon dos métodos diferentes para la detección del virus de influenza porcina, el primero de ellos es una prueba comercial Flue detectTM (Synbiotics), que está basada en una inmunocromatografía rápida diseñada para detectar virus de influenza tipo A en aves. El segundo método es el aislamiento viral en cultivo celular en células MDCK sensibilizadas con tripsina, este método ya descrito en otros trabajos se comparó con nuestro primer método a partir de muestras de moco nasal de cerdos sospechosos de estar infectados con el virus. Los resultados obtenidos mostraron que en la prueba de inmunocromatografía 10 muestras fueron positivas y 8 en cultivo celular, siendo la prueba de inmunocromatografía 100% sensible para detectar el virus de influenza. El desarrollo de este trabajo es importante ya que nos ofrece opciones para el diagnóstico de influenza porcina en campo con el uso de la prueba rápida de inmunocromatografía, sugiriendo de igual manera que los resultados deberán ser confirmados en el laboratorio de diagnóstico mediante el aislamiento viral.

ABSTRACT

DIANA MATILDE SANCHEZ MORENO. Comparison of two diagnostic methods for the detection of the porcine influenza virus. (Under the supervision of Rosalba Carreón Nápoles, Certified Veterinarian, M.S. and of Juan Manuel Palacios Arriaga, Veterinarian).

The lack of a rapid, sensitive and specific test to detect the presence of the porcine influenza virus, that offers the advantage of being able to use it in field conditions, led us to try different options to obtain a quick and reliable diagnosis. One hundred (100) samples of nasal mucus were used for this purpose, which were obtained using sterile swabs, to compare two different methods for the detection of the porcine influenza virus, the first was a commercial test, Flu detect TM (Synbiotics), which is based on a rapid immunochromatography designed to detect the influenza type A virus in birds. The second method is viral isolation in cell culture, in MDCK cells sensitized with trypsin; this method already described in other papers was compared with our first method using samples of nasal mucus of pigs suspected of being infected with the virus. The results obtained show that in the immunochromatography test 10 samples tested positive vs. 8 in cell culture; due to the aforementioned the immunochromatography test was 100% sensitive to detect the influenza virus. The development of this project is important because it offers us options, on the field, for the diagnosis of porcine influenza using a rapid immunochromatography test, recommending at the same time for the results to be confirmed by means of viral isolation at the diagnostic lab.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes de la enfermedad

En México la industria porcina se ve afectada por diferentes problemas de tipo sanitario y enfermedades que merman la producción, una de éstas es la Influenza Porcina (IP).¹

La IP es uno de los patógenos respiratorios primarios del cerdo, esto quiere decir que el virus puede inducir enfermedad y lesiones pulmonares por si solo, es una zoonosis en la cual los cerdos pueden actuar como intermediarios o como incubadora de nuevas cadenas virales.²

El virus de influenza porcina (VIP) se esparce fácilmente por aire y por contacto con secreciones respiratorias de cerdos infectados, es entonces imposible prevenir la infección de cerdos sanos con el virus solo con medidas sanitarias.³

Típicamente la IP se caracteriza por una rápida aparición de signos clínicos como; fiebre, letárgia, tos, estornudo, descarga nasal, respiración laboriosa, pobre calidad espermática, abortos, reducción de producción láctea, pérdida de apetito. La mortalidad es baja y la recuperación ocurre en siete o diez días, por lo cual se considera una enfermedad aguda.^{2,4}

La infección subclínica es muy común en muchos cerdos infectados con el virus de influenza, en esta presentación no se observan signos clínicos de la enfermedad, una posible explicación a esto podría ser que el virus de influenza porcina por si solo en estos cerdos no induce los signos clínicos, pero en interacción con otros patógenos respiratorios induce enfermedad multifactorial.²

El VIP se ha reconocido como un importante patógeno en los cerdos, asociado con el síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRS), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, y *Bordetella bronchiseptica* como causa del antes llamado complejo respiratorio porcino.

La presencia de este complejo en las granjas tiene efecto en los indicadores de producción, ocasionando disminución en la tasa de crecimiento, en la ganancia diaria, en la conversión alimenticia, en el consumo y peso de los cerdos al mercado. Se debe entonces, tomar medidas inmediatas para evitar que esta enfermedad se acompañe de otros factores que puedan causar mayor severidad y prolongar la enfermedad, e incluso presentar mortalidad.

1,2

1.2 Historia de la enfermedad.

Se considera que la influenza porcina apareció al mismo tiempo que la pandemia de influenza humana llamada entonces “fiebre española”, responsable de la muerte de millones de personas, a pesar de su nombre se cree que el lugar de aparición fue en los Estados Unidos de Norte América y esta fue llevada a Europa por los soldados norteamericanos en la primera guerra mundial en el año de 1918.^{5,6}

El inspector de la oficina de industria animal de E.U.A. describió una enfermedad en cerdos muy parecida en sintomatología a la influenza humana de 1918, pero no fue sino hasta 1928 que se describió el paso de esta enfermedad de un cerdo a otro.⁶

El Dr. Richard Shope del Departamento de Patología Comparativa del Instituto Rockefeller en Princeton, en el año de 1930, fue el primero en reproducir la influenza en cerdos sanos, pudiendo aislar e identificar el virus de influenza porcina que ahora es llamado virus de influenza porcina clásico (H₁N₁), esta fue la primera evidencia de una etiología viral de la influenza porcina.⁶ Posteriormente la enfermedad no fue descrita hasta 1976 cuando surgió nuevamente en el norte de Italia, estos brotes relacionados con el virus H₁N₁ clásico, probablemente habían ingresado a Italia con un embarque de cerdos de los Estados Unidos de Norte América. Los virus aislados en Europa después de 1979 se relacionaron con los

virus H₁N₁ clásico, así como los brotes presentados en Asia a finales de la década de los 70's se debieron a virus H₁N₁ y H₃N₂.²

A inicios de 1976 un virus de influenza porcina causó una severa enfermedad en 13 soldados en Fort Dix, dejando como saldo un muerto, el virus causante de esta enfermedad era un H₁N₁ similar al de la pandemia de 1918.⁷

Desde 1930 hasta mediados de la década de los 90's el virus de la influenza porcina clásico H₁N₁ ha sido la causa de la mayoría de los casos de influenza en Norte América, estudios serológicos hechos en Estados Unidos de Norte América mostraron una alta seropositividad al virus clásico H₁ y una menor seropositividad al virus H₃.^{8,9}

Sin embargo en 1997-1998 se dio un dramático reordenamiento en el genoma del virus de influenza porcina, en estos mismos años se detectó un incremento en la seropositividad de H₃ y comenzó a ser aislado el virus H₃N₂ en cerdos de Estados Unidos de Norte América y Canadá.⁸

En enero de 1997 un nuevo virus de influenza humano H₃N₂ fue aislado de lechones de una semana de edad que murieron de neumonía en Ontario.^{8,10}

En Agosto de 1998 apareció un nuevo virus H₃N₂ resultado de una doble recombinación aislado en Carolina del Norte conteniendo genes de H, N y PB1 de virus de influenza humana y M, NP, NS, PB2 y PA de genes del virus de influenza porcina clásica. La enfermedad en los cerdos infectados se caracterizó no solo por la típica enfermedad respiratoria sino también por altos periodos febriles, abortos y muertes en las marranas.^{8,9,}

10

Finalmente una triple recombinación de los virus apareció en 1998, éste contenía genes de H, N y PB1 de virus de influenza humano, genes de M, NP y NS del virus de influenza porcina clásica y genes de PA y PB2 de virus de influenza aviar.^{8,10}

En Octubre de 1999 en Ontario Canadá estudios genéticos realizados en el laboratorio de Salud de la Universidad de Guelph demostraron que el virus aislado de un cerdo con 3 semanas de edad en una granja cercana a una zona de congregación de aves acuáticas, durante la enfermedad respiratoria, era un virus de influenza completamente aviar (H_4N_6), el seguimiento serológico de la enfermedad demostró que el virus tenía la habilidad de transmitirse de cerdo a cerdo.^{8, 11}

En 1999 el virus de influenza porcina clásico H_1N_1 se recombinó con el virus de influenza porcina H_3N_2 creando un nuevo virus H_1N_2 el cual fue difícil de controlar causando múltiples epidemias incluso en pjaras que fueron vacunadas contra el virus clásico H_1N_1 . Para el año 2002 los genes de la H y N del virus de influenza porcina H_3N_2 fueron reemplazados por los del virus clásico creando un nuevo virus de influenza porcina H_1N_1 con genes aviares internos (PA y PB2).¹⁰

A inicios de Noviembre del 2003 un virus recombinante de influenza humana/porcina H_1N_1 y H_1N_2 fue aislado de tres lechones de 4 semanas de edad con enfermedad respiratoria de una granja porcina en Minnesota, Estados Unidos de Norte América.¹²

Porntippa et. al. 2006, reportaron el aislamiento y la caracterización de un nuevo virus de influenza en cerdos de los Estados Unidos de América, este virus menciona Porntippa, es una recombinación entre un virus de pavo H_3N_2 y un virus humano H_1N_1 que ha estado circulando entre los cerdos. Recientemente los subtipos de virus de influenza aviares H_4N_6 , H_3N_3 y H_1N_1 , han sido aislados en cerdos en Canadá, aunque no hay evidencia de que éstos se mantengan en la población porcina.¹³

1.3 ETIOLOGÍA

El virus de la influenza porcina es un virus envuelto, su membrana lipídica deriva de la célula hospedera en la cual el virus se replica. Tiene forma esférica, es filamentoso, de tamaño medio, con un diámetro de 80-120 nm, segmentado de cadena simple, RNA de sentido negativo, perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*.^{10,2}

La familia *Orthomyxoviridae* consiste de 4 virus:

1. Virus de influenza tipo A¹⁰
2. Virus de influenza tipo B¹⁰
3. Virus de influenza tipo C¹⁰
4. Thogotavirus¹⁰

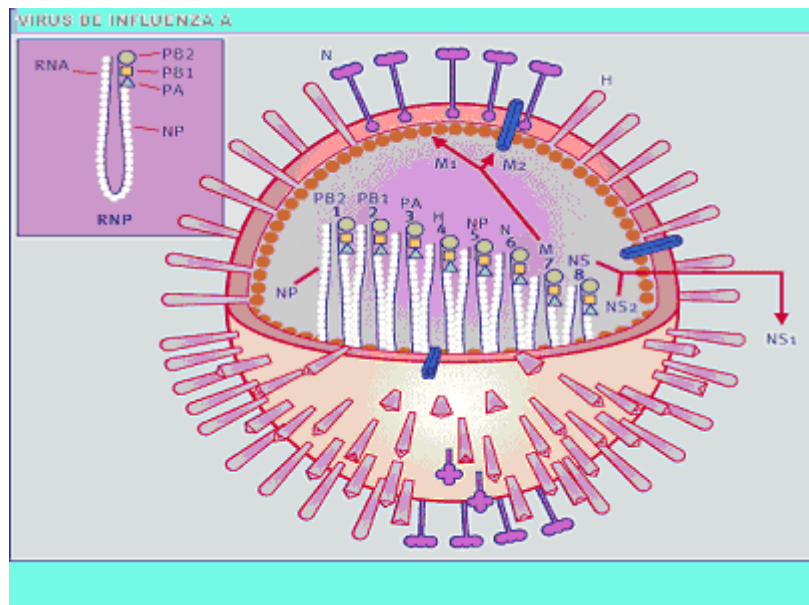


Figura 1: Representación esquemática del virus de influenza tipo A. Tomado de Veterinary Sciences Tomorrow. Swine influenza: a zoonosis. Paul Heinen. 2003

El virus de influenza porcina tiene en su superficie de membrana dos glicoproteínas transmembranales llamadas hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) (fig. 1).^{2,3,8,10}

La H se une a los receptores que contienen ácido siálico y media la infección de las células hospederas, siguiendo la fusión célula a célula se da la ruptura proteolítica de la H en los segmentos H1 y H2. ⁸

El segmento H1 forma la cabeza globular de la proteína, ésta contiene el sitio del receptor, así como los principales sitios antigénicos en los cuales se van neutralizando los anticuerpos directamente. El tetrámero de proteína N es la segunda envoltura glicoproteica, ésta cataliza la división del ácido siálico de los residuos de glucosa adyacentes, anticipa la agregación viral e intensifica la liberación de las partículas virales. La fuerza de la H para unirse y la actividad enzimática de la N funcionan en conjunto para optimizar la replicación viral. Se considera que la N puede ser un factor en el virus de influenza que induce a la apoptosis y puede también ser un factor de virulencia uniendo y activando al plasminógeno haciendo de este modo más fuerte la división de H. ⁸

El virus de influenza contiene otras dos importantes proteínas estructurales, la nucleoproteína (NP) que encapsula al RNA, y la proteína de la matriz (M1) que interactúa con NP y las colas citoplasmáticas de la H y N para proveer un marco estructural de trabajo al virión (fig. 1). La NP y M1 también sirven para diferenciar al virus de influenza en tipos A, B y C. ^{2, 8, 10}

La M2 es una proteína estructural adicional (fig. 1), es un canal iónico que funciona al inicio del ciclo de la infección facilitando el desnudamiento del virus y puede funcionar más tarde en

el montaje del virus para prevenir los cambios conformacionales prematuros inducidos por el pH en la HA. ⁸

Las proteínas restantes que forman parte del virus de influenza, son proteínas del complejo de las polimerasas (PB1, PB2, PA) que median la síntesis de RNA viral (fig. 1). Las

proteínas no estructurales (NS1 y NS2) junto con NP y M regulan la transcripción, replicación, ensamble y transporte nuclear del RNA (fig 1).^{8, 14}

Los genes de la H y N codifican para la superficie de la glicoproteína que se proyecta en la envoltura viral. Estas glicoproteínas poseen distintas propiedades antigénicas y secuencias de nucleótidos que son usados para subclasificar a los virus de influenza en 16 tipos de hemaglutininas y 9 tipos de neuraminidasas.^{2, 3, 8, 10, 14}

El genoma del virus de influenza tipo A está compuesto por 8 segmentos de RNA, estos genes son responsables de la traducción de 10 u 11 proteínas virales.¹⁰

La replicación del virus de influenza comienza con la división de H en H1 y H2 por medio de las enzimas presentes en el tracto respiratorio. Estas enzimas las produce el huésped o pueden ser producidas por bacterias anteriormente establecidas que promueven la infección con el virus de influenza. Después de la división de la H, el receptor de la H1 puede adherirse a una terminal de ácido siálico en la superficie de una célula receptora, una vez unido a la célula receptora el virus es endocitado, la N funciona como una enzima destructora de receptores separando la terminal de ácido siálico del receptor. Esta N libera a los viriones formados de las células donde se originaron, facilitando así el esparcimiento del virus, esta progenie puede infectar a otras células o puede ser transmitido a otro individuo.¹⁴

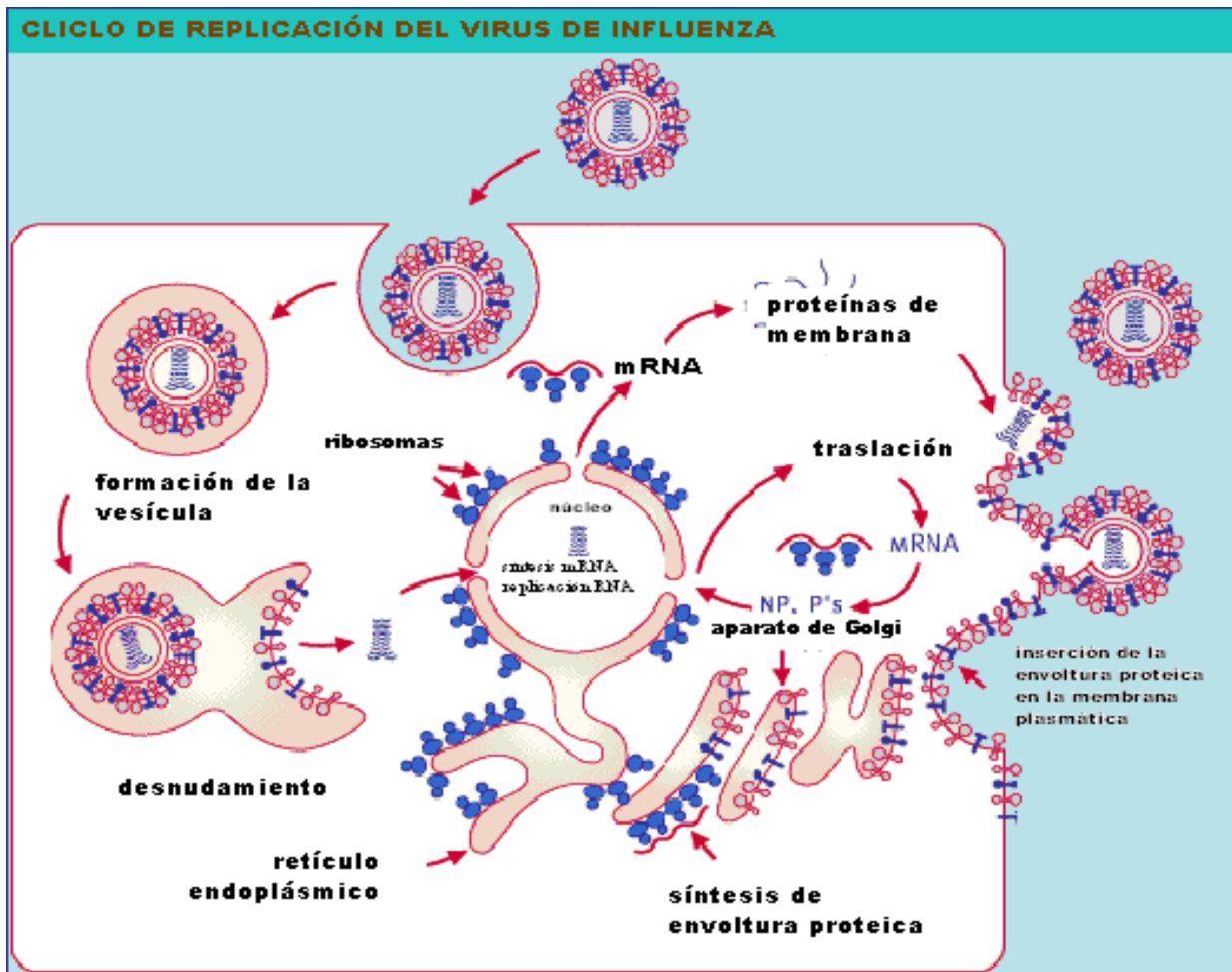


Figura 2. Representación esquemática de la replicación de los virus de influenza. Tomado de Veterinary Sciences Tomorrow. Swine influenza: a zoonosis. Paul Heinen. 2003. <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html>

La replicación se lleva a cabo enteramente en la célula hospedera usando los recursos de ésta para producir cientos de copias de RNA viral, los genes virales son transcritos y trasladados por las enzimas y ribosomas de la célula hospedera (fig. 2).¹⁵

El virus se replica en las células epiteliales de todo el tracto respiratorio desde la nariz hasta las profundidades de los pulmones, casi nunca entra en otros tejidos.³

Estudios basados en las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica han mostrado que las células epiteliales alveolares y bronquiolares son las mejores células

blanco. Procesos como la necrosis de las células epiteliales y la infiltración de neutrófilos en el pulmón son parte de la típica enfermedad respiratoria, las células inflamatorias causan obstrucción de las vías aéreas y producen un daño substancial en el pulmón por la liberación de sus enzimas. La excreción del virus en el fluido nasal y la replicación del virus en los pulmones dura 6 – 7 días. ³

Kristien Van Reeth profesor de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Ghent, Bélgica, ofrece una posible explicación al porqué algunas veces la enfermedad no presenta signos clínicos, según sus experimentos sugiere que la severidad de la enfermedad resulta de cuanto virus se produce en los pulmones y de la liberación de los mediadores de la inflamación por el hospedero. La enfermedad menciona Van Reeth, es fácilmente reproducible, pero para obtener lesiones patológicas y la típica enfermedad respiratoria, se necesita inocular a los cerdos con altas dosis de virus directamente en la tráquea, en animales así inoculados se encontraron altos títulos de virus y altos niveles de citocinas en fluidos de lavados pulmonares. Las citocinas incluyeron IFN (interferón) α , FNT (factor de necrosis tumoral), IL-1 (interleucina 1) e IL-6 (interleucina 6). Estas citocinas son la causa de la inflamación pulmonar, disturbios funcionales en los pulmones, fiebre, letárgia y pérdida del apetito y pueden intensificar fuertemente otros signos. Todos estos signos son vistos 24 horas post inoculación y son asociados a los picos de replicación viral y de citocinas. Según Van Reeth si los cerdos son inoculados por otras vías menos invasivas, los títulos de virus y concentraciones de citocinas son menores y no hay presencia de signos. ³

1.4 EPIDEMIOLOGÍA

Para entender la epidemiología del virus de influenza porcina es importante saber que los virus de influenza pueden infectar a toda una variedad de especies, aves, pavos, caballos, y mamíferos acuáticos (fig. 3). Es un hecho que la infección interespecie puede ser un mecanismo por el cual se introduzca nuevo material genético en una población de cerdos. Los virus de influenza son importantes patógenos en una variedad de especies domésticas y no domésticas.^{9, 10, 16, 17}

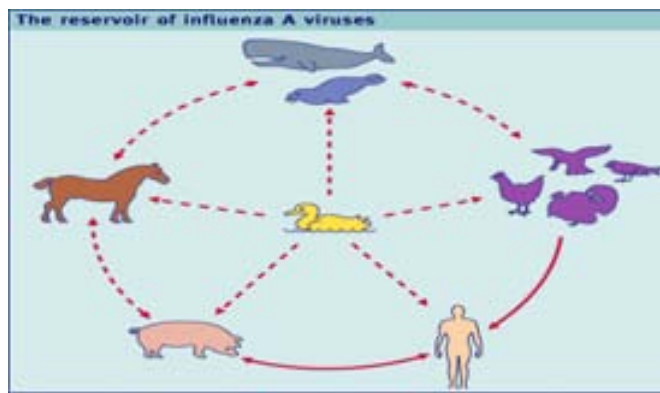


Figura 3. Representación esquemática de los reservorios naturales de los virus de influenza Tomado de Veterinary Sciences Tomorrow. Swine influenza: a zoonosis. Paul Heinen. 2003.

Históricamente solo un número limitado de subtipos de virus de influenza han sido rutinariamente aislados de especies mamíferas, como se muestra en el cuadro 1. En contraste con los patos y otras especies de aves acuáticas que son los principales reservorios de los virus de influenza A, con todos los 16 subtipos de H y 9 de N circulando entre ellos.

^{9, 10, 16, 17}

Cuadro 1. Subtipos de los virus de influenza

HUMANOS	CERDOS	CABALLOS
H ₁ N ₁	H ₁ N ₁	H ₃ N ₈
H ₂ N ₂	H ₃ N ₂	H ₇ N ₇
H ₃ N ₂	H ₁ N ₂	

En las aves acuáticas el virus ataca el tracto gastrointestinal de las aves, raramente ataca el tracto respiratorio y la infección casi sin excepción es subclínica, algunos patos eliminan virus hasta por 30 días, este hecho más su comportamiento migratorio y la habilidad del virus de influenza de permanecer en aguas a muy bajas temperaturas, hacen de las aves acuáticas un inmenso reservorio del virus de influenza en la naturaleza. Existen reportes de la transmisión directa de aves acuáticas a cerdos, caballos, aves domésticas y mamíferos acuáticos.^{9, 13, 14}

En general un virus de influenza infecta solamente a una especie, sin embargo, todos los virus pueden ocasionalmente transmitirse de una especie a otra y la recombinación genética entre los virus de dos diferentes hospederos puede producir un nuevo virus capaz de infectar a un tercer hospedero.⁹

Ocasionalmente cadenas virales humanas o aviarias pueden esparcirse en poblaciones porcinas causando enfermedad clínica severa y subsecuentemente esparcirse por países adyacentes.⁹

El sur de China es el epicentro en el cual son originadas nuevas cadenas de virus de influenza, esto debido a la alta concentración de humanos, cerdos y aves acuáticas que se mantienen en estrecho contacto.¹⁸

El virus de influenza tiene dos formas de evolucionar:

1. Por reordenamientos antigénicos o “drift”
2. Por recombinaciones antigénicas o “shift”

Los reordenamientos antigénicos se refieren a procesos sutiles, a la acumulación de cambios graduales, de mutaciones puntuales en los genes que codifican la H y en menor extensión de N en respuesta a la presión inmune de la población, la presencia de

anticuerpos neutralizantes obligan al virus a cambiar tanto que éste, escapa a la neutralización.^{8, 16}

Los reordenamientos antigénicos ocurren muy comúnmente entre los virus de influenza humana y es la razón por la cual las vacunas tienen que ser actualizadas cada cierto tiempo con nuevas cadenas. En contraste con los virus humanos los virus de influenza porcina históricamente experimentan menos reordenamientos antigénicos.^{8, 16}

El virus A/Swine/Nebraska/1/99(Sw/NEB)40, fue aislado durante una severa enfermedad epizootica en una granja comercial en Nebraska, los signos clínicos fueron diferentes de los que muestra una gripe porcina típica, éstos presentaron fiebre muy alta por periodos prolongados, signos respiratorios leves y muy poca tos.¹⁶

El virus A/QC/5393/9116,33,46, una forma inusual de neumonía fue reconocida en 7 marranas en Quebec, sus signos fueron fiebre y disnea, en estas marranas no se presentó tos, al igual que Sw/NEB se observó que las características antigénicas de estos virus sugerían que estos eran una variante del virus de influenza H₁N₁ clásico.¹⁶

Los recombinamientos o “shift” son una forma de variación viral más dramática y ocurre cuando un virus con un subtipo de H o N completamente diferente aparece en la población. Estos virus se desarrollan como resultado de eventos de recombinación genética.^{8, 16}

Un H₁N₂ recombinante fue aislado de cerdos de Japón en 1978 y 1989/1990, en Francia en 1987 y 1989 y en Reino Unido en 1994. Este virus es una recombinación entre virus humanos y porcinos, sin embargo una múltiple recombinación fue aislada más recientemente en Reino Unido con virus humano, porcino y aviar.¹⁶

Epidemiológicamente el virus francés y japonés no se esparcieron demasiado, sin embargo el H₁N₂ de Reino Unido, se esparció y causó múltiples epidemias respiratorias en cerdos.¹⁶

En 1992 un virus recombinado fue aislado en el Reino Unido, éste fue una recombinación entre virus humano y equino y tiene particular importancia porque el virus equino H₇N₇ no ha sido aislado de caballos en ninguna parte del mundo desde 1980. ¹⁶

Las recombinaciones pueden ocurrir debido a la transmisión interespecie de los virus, los cerdos poseen receptores de ácido siálico para las cadenas de los virus de influenza humana y aviar, este hecho convierte al cerdo en un perfecto hospedero mezclador para la generación de nuevas cadenas humanas y aviares. ^{8, 9, 18, 19}

Los virus de influenza aviar no son transmitidos al humano posiblemente porque el humano no posee el receptor necesario para que el virus se una a las células epiteliales, sin embargo algunos genes virales individuales pueden ser transmitidos entre humanos y especies aviares como fue demostrado en la pandemia de influenza en los años 1957-1968. Esto sugiere la necesidad de un hospedero intermedio para la recombinación genética entre virus humanos y aviares. ^{8, 9, 18}

Existe evidencia de que los cerdos están envueltos en la transmisión interespecie más frecuentemente que cualquier otra especie. ⁹

El potencial del virus de influenza porcina es enorme, con 8 segmentos independientes de RNA es posible obtener 256 diferentes posible genotipos de dos virus emparentados, lo cual hace a la recombinación un mecanismo muy poderoso para la generación de diversidad genética. ⁸

El primer caso de influenza en cerdos fue visto en Estados Unidos de Norte América durante la catastrófica pandemia de influenza humana en 1918-1919. El virus de influenza porcina clásico es genética y antigénicamente similar al virus de la influenza humana en la pandemia de 1918. ⁹

Estudios serológicos en cerdos de los Estados Unidos de Norteamérica a finales de los 80`s indicaron una alta prevalencia del virus de influenza porcina clásico H₁, en contraste con una muy baja prevalencia del virus H₃ antigénicamente similar al humano.⁹

En contraste Gambaryan et. al. 2005, menciona que el genotipo más encontrado en Norte América hasta el 2005 fue el H₃N₂ resultado de una triple recombinación conteniendo H, N y PB1 de virus de influenza de origen humano, M, NS y NP del virus de influenza porcina clásico y PA y PB2 de virus de influenza aviar.¹⁹

La aparición de nuevos virus de influenza complica el manejo y control de la enfermedad, esto puede deberse a que el virus clásico sigue infectando cerdos susceptibles al mismo tiempo que otras cadenas virales circulan por la piara.¹⁰

1.5 DIAGNÓSTICO

Históricamente el virus de influenza ha sido considerado fácil de diagnosticar, el diagnóstico de influenza porcina en su forma típica puede basarse en los signos que produce la enfermedad. Debido a que la enfermedad cursa rápidamente en los cerdos no es considerada un problema significativo y el tratamiento usualmente se considera innecesario. La forma enzoótica de la enfermedad ha aparecido como parte del antes llamado complejo respiratorio porcino, la forma enzoótica de la infección no es clínicamente dramática y el diagnóstico debe ser conducido a detectar la presencia del virus.^{20,21}

1.5.1 TOMA DE LA MUESTRA

Debido a que el virus de influenza porcina se replica en el pulmón por únicamente 6 a 7 días después de la infección, las muestras deben ser tomadas en el periodo agudo de la enfermedad, la muestra que se tome del animal enfermo será diferente dependiendo de la técnica de diagnóstico que se utilice.³

1.5.2 Aislamiento viral

La muestra ideal de un animal vivo para el aislamiento viral es mucosidad nasal obtenida con un hisopo de los pasajes nasales del cerdo, también puede ser mucosidad faríngea.²

El hisopo que debe ser estéril, después de tomar la muestra debe suspenderse en un medio de transporte adecuado, y mantenerse a una temperatura de 4°C hasta el momento de ser procesada. Si las muestras van a tardar más de 48 horas en ser procesadas se deben almacenar a -70°C.^{2,20,21}

Es conveniente agregar al medio de transporte un antimicrobiano apropiado para controlar a los agentes microbianos y micóticos que puedan encontrarse en la muestra.^{2,21}

Si el cerdo va a ser sacrificado para la necropsia, debe presentar fiebre y descarga nasal serosa nasal, los cerdos con descarga nasal mucopurulenta no son buenos candidatos para estar infectados con influenza porcina, las muestras de estos animales deben ser de pulmón conservándose en refrigeración a 4°C hasta el momento en que sean procesadas.^{2, 20, 21}

1.5.3 Detección de anticuerpos

Para el diagnóstico serológico se puede remitir al laboratorio la muestra de sangre entera sin anticoagulante o solamente el suero, éstas deben mantenerse en refrigeración hasta ser procesadas. Todas las muestras deben colectarse con material estéril evitando contaminación del medio.^{2, 20, 21}

Los picos de anticuerpos en suero se dan 2 – 3 semanas después de la infección y estos empiezan a declinar de 3 a 6 meses después. Tomar muestras pareadas de suero es lo más recomendable, una al momento que se detecta la infección y otra aproximadamente 3 semanas después.^{2, 20, 21}

1.6 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECTAR EL VIRUS, PROTEÍNAS VIRALES O ÁCIDOS NUCLÉICOS VIRALES DE INFLUENZA PORCINA EN LA CIRCULACIÓN

1.6.1 Aislamiento viral en embrión de pollo

Para este procedimiento se necesitan huevos de gallina embrionados de 9 días de edad, libres de patógenos específicos, estos embriones son inoculados vía saco alantoideo con una preparación de la muestra ya sea suspensión de un tejido o suspensión de un hisopo procesado.^{2, 21, 22}

Los huevos embrionados ya inoculados son incubados a 37°C con una humedad relativa de 55%, se deben revisar cada 24 horas con un ovoscopio para ver la viabilidad del embrión. Todos aquellos que mueren antes de 24 horas postinoculación son descartados, la mortalidad posterior a las 24 horas postinoculación su fluido alantoideo es colectado de manera aséptica y este se somete a la prueba de hemaglutinación. Si después de 6 días los embriones no mueren son abiertos asépticamente y su fluido sometido a la prueba de hemaglutinación.^{21,22}

1.6.2 Aislamiento viral en cultivo celular

Para este procedimiento es necesario el cultivo de una línea celular, las más usadas para el aislamiento de influenza porcina son Madin Darby Canine Kidney (MDCK) o también en células porcinas de riñón.²¹

Jordi Reina et. al. 1997, realizaron un estudio donde comparaban varias líneas celulares; MDCK, VERO (green monkey continuous cell line) y MRC-5 (human lung embryonated cell), para el aislamiento viral del virus de influenza de aspirados nasofaríngeos, los resultados mostraron que la línea MDCK fue superior a las demás líneas obteniendo el 100% de sensibilidad, lo que quiere decir que la línea MDCK es la más recomendable para el aislamiento de virus de influenza A de muestras respiratorias.²³

Margot Herman et. al. 2005, compararon el cultivo del virus de influenza porcina en diferentes líneas celulares adicionadas con tripsina o con dietilaminoetil dextran (DEAE), sus resultados mostraron que la mejor línea celular para cultivar el virus de influenza porcina fue la línea celular MDCK adicionada con tripsina, en el resto de las líneas celulares no hubo crecimiento, ni adicionando tripsina ni adicionando DEAE.²⁴

El primer uso de la línea celular MDCK para el diagnóstico de influenza A fue en 1968 por Gauss C. R., para 1975 el uso de células MDCK ya era más frecuente para el aislamiento de los virus de influenza A, tras descubrir que la adición de tripsina en el cultivo estimulaba el crecimiento del virus y les permitía tensionarse para formar placas con gran eficiencia.²²

Para el aislamiento viral se necesitan monoestratos de estas células preparadas en placas de 24 pozos, estas son sembradas a una concentración aproximada de 10^6 en un medio esencial mínimo (MEM).^{22, 23}

Las placas son inoculadas a 37°C con 5% CO₂ por 3 a 6 días, estas son revisadas diariamente en busca de efecto citopático, el cual consiste básicamente en el redondeamiento de las células y la aglutinación de sus respectivos sobrenadantes utilizando eritrocitos de ave.^{22, 23}

El éxito de esta prueba depende de varios puntos:

- Calidad de la toma de la muestra
- Carga viral de la muestra
- Adición de tripsina al medio
- Manejo del cultivo celular

A pesar de que esta prueba toma mucho tiempo en arrojar un resultado definitivo se menciona que puede verse efecto citopático en las células a las 48 horas postinoculación.^{21,}

22

1.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta prueba se usa generalmente para identificar el genoma de virus aislados anteriormente, e incluso puede ser usada directamente en especímenes clínicos sin necesidad de un

aislamiento previo, aunque la sensibilidad en este uso no ha sido claramente establecida, la caracterización del virus de influenza es usualmente dirigida a los genes de la H y N. ^{10,21}

Los iniciadores de ácidos nucleicos han sido desarrollados en varios laboratorios, estos hibridizan y detectan ambos virus de influenza, el H₁N₁ y H₃N₂ y diferencian entre ellos.

En estudios preeliminares, los iniciadores contra la nucleoproteína interna detectan el 100 % de los tejidos infectados cuando es comparado con el aislamiento viral. ²¹

El análisis de las secuencias genéticas de los genes de la H y N pueden revelar más que solo el subtipo, si se estudia cuidadosamente se pueden revelar mutaciones en regiones de la molécula que pueden contribuir a la habilidad del virus para evadir al sistema inmune y esparcirse. ¹⁰

La principal ventaja de la PCR es que, es muy específica, no requiere virus viable o cultivo viral como la serotipificación y el procedimiento puede ser automatizado. ^{10,21}

Los inconvenientes que esta prueba presenta es que los reactivos usados en ésta son de alto costo, se requieren habilidades técnicas y equipo especializado, el procedimiento es muy específico y al igual que otras pruebas requieren tiempo para completarla (generalmente 2 días) esta prueba puede verse inhabilitada para detectar RNA si los iniciadores no están bien diseñados. ²¹

E. Foni et. al. 2003 compararon diversos métodos virológicos con la técnica de RT-PCR para detectar el virus de influenza porcina, sus resultados reportaron que el método de RT-PCR fue el mejor, obteniendo el mayor porcentaje de detección del virus. ²⁵

La prueba de PCR se hará más común a medida que ésta identifique o valide las variaciones del virus de influenza que no pueden ser tipificadas por serotipificación. ¹⁰

1.6.4 Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica es una alternativa para confirmar la presencia del virus de influenza in situ en tejido. ^{14, 21, 26}

El método de inmunohistoquímica tiene la ventaja de que el procedimiento se puede completar en un día. La demostración del antígeno por este método se ha realizado generalmente usando secciones de tejido congelado y anticuerpos monoclonales. ²⁶

Este método se mantiene viable para el diagnóstico de influenza porcina aun con muestras de tejido fijadas en formalina y embebidas en parafina, la habilidad de esta prueba para demostrar el virus en este tipo de muestras significa que una sola muestra puede ser usada para dos análisis. ^{21, 26}

Existen muchos anticuerpos comerciales anti-influenza disponibles, diseñados para la detección del virus de influenza A en el humano y estos tienen la capacidad de detectar virus de influenza A en otras especies. ²⁶

Deborah M. et. al. 1993, realizaron un estudio en donde el método de inmunohistoquímica en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina era comparado con el aislamiento viral en cultivo celular, en este trabajo se menciona que el método de inmunohistoquímica es conveniente, sensible y específico para el diagnóstico de influenza A en cerdos que murieron o fueron sacrificados durante la presentación de la enfermedad respiratoria. ²⁶

En este estudio se encontraron 28 positivos de 30 muestras de tejido usando la prueba de inmunohistoquímica con la técnica para tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, estos resultados fueron confirmados con aislamiento viral en cultivo celular. ²⁶

Esta técnica es recomendable en situaciones en las que el productor se encuentra muy lejos del laboratorio de diagnóstico y el mismo puede fijar el tejido en formalina para facilitar el

transporte de la muestra. Finalmente se debe mencionar que la prolongada exposición a la formalina puede tener efectos adversos en la antigenicidad del tejido.²⁶

1.6.5 ELISA de captura

Este tipo de prueba se considera un ensayo rápido en el cual, se puede procesar al mismo tiempo un gran número de muestras. Este tipo de prueba, básicamente se emplea en humanos por la importancia de influenza en la salud pública. Diferentes laboratorios han desarrollado pruebas de ELISA para detectar virus de influenza A en humanos mediante muestras de moco nasal o de garganta tomadas con hisopos, algunas de estas pruebas son usadas en laboratorios de diagnóstico de enfermedades veterinarias principalmente en aves. En este tipo de pruebas la toma de la muestra es muy importante ya que, exceso de moco o sangre en las muestras generalmente interfieren con la prueba, así como la congelación de las muestras reduce la sensibilidad de la prueba.^{3,21}

1.6.6 Inmumocromatografía

La inmunocromatografía es una de las técnicas de inmunodiagnóstico más modernas cuyas principales ventajas son la sencillez y rapidez de la prueba. Cada vez son más las aplicaciones de esta técnica, debido a que no son necesarios reactivos ni instrumentación adicional. El ejemplo más conocido son las pruebas de embarazo que se encuentran en las farmacias.²⁷

La utilización de estas pruebas para la detección del virus de influenza se limita al uso en aves y humanos, esto debido a la importancia en la salud pública que han tenido estos virus. El principio de la técnica de inmunocromatografía rápida se explica de manera sencilla en las siguientes líneas. La muestra se pone en contacto con la zona del conjugado. Esta lleva

impregnada un conjugado formado por un anticuerpo contra uno de los epítomos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno a detectar, se unirá al conjugado formando un complejo y empezarán a migrar a través de la membrana de nitrocelulosa. Si no se unen, migrarán el conjugado y la muestra sin unirse.

La zona de captura está formada por un segundo anticuerpo específico contra otro epítomo del antígeno. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedaran retenidos y la línea se coloreará (muestras positivas). Si la muestra no contenía el antígeno, el segundo anticuerpo no captura nada y la línea queda transparente (muestra negativa). La zona de control está formada por un tercer anticuerpo que reconoce al reactivo de detección. Cuando el resto de la muestra alcanza esta zona, el anticuerpo se unirá al conjugado libre que no ha quedado retenido en la zona de captura. Esta línea es un control de que el ensayo ha funcionado bien porque se colorea siempre, con muestras positivas y negativas.²⁸

La necesidad de un diagnóstico rápido de la influenza nos lleva a probar diferentes productos comerciales aun que éstos no hayan sido diseñados para la especie en la que necesitamos trabajar.²⁰

El kit ESPLINE[®] INFLUENZA A&B-N diseñado para detectar nucleoproteínas de los virus de influenza A y B, fue evaluado para detectar el virus de influenza A en aves y cerdos experimentalmente infectados. Se consideró al kit lo suficientemente sensible y específico para realizar un diagnóstico rápido de influenza A en aves y cerdos.²⁹

El kit FLUE DETECT[™] Avian Influenza Type A Antigen es una prueba diseñada para detectar el virus de influenza A en aves, en reciente fecha ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para ser usado en el diagnóstico de influenza A en

humanos. Siendo este el primer producto diseñado para uso veterinario que es aprobado para uso humano.³⁰

1.7 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA INFLUENZA PORCINA EN LA CIRCULACIÓN SANGUÍNEA

1.7.1 Inhibición de la hemaglutinación.

El ensayo serológico basado en la inhibición de la hemaglutinación (IHA) es históricamente la manera más común de determinar las características antigénicas de los virus de influenza tipo A, esta también sirve como ensayo funcional para la detección de anticuerpos anti-influenza. La IHA explota la habilidad del virus de influenza para aglutinar células rojas.¹⁰

En general la prueba de IHA detecta anticuerpos en la circulación que se unen a la proteína de la H en la superficie del virus, esto prevé que las partículas virales se unan a la superficie de los eritrocitos.²¹

Una concentración estándar del virus de influenza (antígeno) y diluciones seriadas del suero referido al laboratorio de diagnóstico se mezclan y después de un corto periodo de incubación las células rojas se adicionan a la mezcla de antígeno-anticuerpo. Si los anticuerpos del suero se unen a la hemaglutinina viral, la hemaglutinación (HA) es inhibida y las células rojas se asientan en el fondo de la prueba para formar un botón.¹⁰

Los resultados de esta prueba se interpretan observando en que dilución sigue observándose el efecto de la IHA. El título de la IHA será la mayor dilución del antisuero que produzca una inhibición completa de la hemaglutinación. Debido a que se usan antígenos específicos ya sea para H₁ o H₃ es posible observar por medio de esta prueba el subtipo de virus

presente en el suero referido al laboratorio, así es que mientras observamos altos títulos de anticuerpos para H₁, podemos observar bajos títulos de anticuerpos para H₃, pudiéndose presentar el caso contrario e incluso podríamos ver altos títulos de anticuerpos para ambos subtipos. Títulos menores de 1:40 pueden incluir reacciones no específicas, títulos iguales o mayores a 1:80 son considerados positivos y específicos. Los anticuerpos pueden detectarse de 5 a 7 días postinfección, en este periodo de tiempo muchos cerdos exhiben títulos de 1:80, de dos a tres semanas postinfección muestran títulos de 1:320 o 1:640.²¹

El ensayo serológico de la IHA tiene algunas limitaciones, una de ellas es que requiere de la cultivación de virus viable el cual lleva varios días para propagarse, el virus control (antígeno) debe estar debidamente titulado antes de la prueba, las diluciones deben ser correctamente realizadas para que la interpretación de la prueba sea fidedigna y se debe considerar que los títulos bajos pueden deberse a reacciones inespecíficas.^{4, 10, 21}

La prueba de IHA es altamente específica para cada subtipo por ello deben usarse diferentes antígenos de acuerdo a la incidencia de la zona.³

1.7.2 ELISA

Existen actualmente pruebas de ELISA, dirigidas a la detección de los diferentes subtipos de influenza porcina. Estos métodos son altamente sensibles y específicos, aunque su costo resulta elevado, generalmente tienen todos sus reactivos listos para usarse a excepción quizá en algunos casos de la solución de lavado. Una de las ventajas de este tipo de pruebas es que se puede procesar un gran número de muestras al mismo tiempo, por el contrario una desventaja de estas pruebas es que requieren de personal capacitado y aparatos de laboratorio especializados como el lector de ELISA.⁴

2. HIPÓTESIS

Debido a la amplia difusión de la enfermedad de influenza porcina en México, así como a la alta sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunocromatografía rápida Flue detectTM y del aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK, se logrará la detección del virus de influenza porcina por ambos métodos.

3. OBJETIVO GENERAL

Detectar el virus de la Influenza Porcina por medio de la prueba de inmunocromatografía rápida Flue detectTM, así como por el aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK en animales sospechosos de la enfermedad.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Toma de muestras

Las muestras se tomaron de 100 cerdos sospechosos a estar infectados con influenza porcina distribuidos en 4 muestreos, en un periodo de tres meses, se seleccionaron aquellos animales que presentaban algún signo de influenza porcina como: tos, estornudo, escurrimiento nasal seroso, a todos los animales muestreados se les tomo la temperatura corporal, presentando temperaturas desde los 39°C hasta los 41.2°C, algunos de ellos mostraban menor talla y peso que el resto de los animales de la misma etapa, de éstos algunos presentaban un ligero letargo.

4.2 Análisis de las muestras.

4.2.1 Inmunocromatografía rápida

Para la prueba de inmunocromatografía rápida flue detect™ (fig. 4), en cada muestreo se tomaron las muestras de moco nasal con los hisopos estériles proporcionados en el kit, estos se frotaron en las fosas nasales de los animales elegidos, posteriormente fueron suspendidos en el medio de transporte que provee el kit.

4.2.2 Aislamiento viral en cultivo celular con células MDCK

Para el aislamiento viral en cultivo celular en cada muestreo se tomaron muestras de moco nasal con hisopos estériles, frotándolos en las fosas nasales del cerdo, posteriormente los hisopos se depositaron en un tubo de ensayo con MEM, los que se colocaron en una caja de poliuretano con refrigerantes para mantener las muestras a una temperatura de 4°C durante

su traslado al laboratorio de diagnóstico de enfermedades porcinas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma.

4.3 Prueba de Inmunocromatografía rápida

Esta prueba se realizó por medio de un Kit comercial de Inmunocromatografía rápida de nombre flue detectTM (fig. 4).



Figura 4. Fotografía de la prueba rápida de inmunocromatografía flue detectTM synbiotics.

El Flue DetectTM es un test in vitro de inmunocromatografía rápida, diseñado para ayudar a la detección cualitativa del virus de Influenza tipo A.

Este producto está basado en la tecnología de inmunomigración rápida. El Dipstick lleva dos anticuerpos que son específicos del virus de Influenza Tipo A. Un anticuerpo anti-influenza A ligado al antígeno Influenza A presente en la muestra, forma un complejo que migra a lo largo de la tira para análisis y es capturado por el segundo anticuerpo en la zona reactiva. La acumulación de complejo causa la formación de una línea claramente visible de color rosado/púrpura. Una línea de control ubicada antes de la línea de reacción asegura que el test ha sido realizado correctamente.

PROCEDIMIENTO

1.- Preparación de la muestra

- Se colocaron ocho gotas de solución tampón en un tubo de ensayo.
- Se tomó la muestra
- Se colocó el hisopo con la muestra a analizar en el tubo de ensayo y se giró el hisopo 5 a 10 veces en la solución tampón.
- Antes de retirar el hisopo del tubo de ensayo, se presionó varias veces contra el borde del tubo, hasta que no salió más líquido del hisopo.

2.-Análisis de las muestras

- Se sacó una tira para análisis del tubo con desecante, para cada muestra a analizar, manipulándola únicamente de la parte superior.
- Se colocó la tira para análisis directamente en el tubo de ensayo conteniendo la muestra extraída.
- Se incubó la tira de análisis por 15 minutos (fig.5).
- Se retiró la tira para análisis del tubo de ensayo para realizar la lectura.



Figura 5. Fotografía de la Incubación de las tiras reactivas de la prueba rápida.

3.- Lectura de los resultados

- A los 15 minutos, se observó, en el centro de la tira para análisis, la presencia o ausencia de la línea rosada/púrpura.
- La línea control aparece en la parte superior de la tira para análisis, mientras que el resultado del test de la muestra se lee en la parte inferior de la tira.
- Se desechó la tira para análisis en un recipiente para residuos biológicos.

4.- Validación

El test es válido si la línea de control se desarrolla en la parte superior de la tira para análisis. La ausencia de la línea de control indica que el test no es válido, y por lo tanto debe ser repetido.

5.- Interpretación

- Resultado negativo para antígeno influenza A: presencia únicamente de la línea de control en la parte superior de la tira para análisis.
- Resultado positivo para antígeno influenza A: presencia de dos líneas rosadas/púrpuras en la tira para análisis (fig. 6).

4.4 Aislamiento en cultivo celular

1.- Preparación de la muestra

a) Filtración de la muestra.

- Se exprimió el exceso de MEM del hisopo sobre las paredes del tubo.

- Se decantó el sobrenadante separándolo así del sedimento.
- Se centrifugó el sobrenadante a 3000 RPM a 4 °C por 10 minutos.
- Nuevamente se separó el sobrenadante del sedimento.
- El sobrenadante se filtró por membranas de nitrocelulosa desde prefiltro hasta membranas de 22 µm de diámetro

Todos los procedimientos hasta el momento de inocular las muestras en el cultivo celular se realizaron manteniendo la muestra fría y en condiciones de esterilidad.

2.-Preparación del cultivo celular

24 horas antes de ingresar las muestras al laboratorio de diagnóstico de enfermedades porcinas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en cada muestreo se prepararon monoestratos de células MDCK en placas de 24 pozos de la siguiente manera:

Material

- Botella de cultivo con monoestrato de células MDCK.
- Placa estéril de 24 pozos
- MEM
- Tripsina
- Pipetas estériles
- Frasco estéril
- Cinta adhesiva
- Tijeras

Monoestratos confluentes de células MDCK, fueron sometidos a tripsinización. Como primer paso se decantó el medio de crecimiento para posteriormente realizar 3 lavados del monoestrato con PBS (solución buferada de fosfatos), posteriormente se adicionó 3 ml de tripsina sobre el monoestrato, se tapó la botella y se llevó a la estufa por espacio de 10 a 15 minutos para dar tiempo a que se disgregara el monoestrato de la botella.

Posteriormente se sembraron en cada pozo de la placa de 24 pozos, las células a una concentración aproximada de 10^6 células en un volumen de 2 ml/pozo. La placa se colocó en la estufa a 37 °C por 24 horas para su crecimiento.

Cabe señalar que antes de llevar a cabo la preparación del monoestrato en la placa de 24 pozos, las células fueron sometidas a aglutinación de su sobrenadante de crecimiento, confrontándolo con eritrocitos de ave y bovino al 0.5% y de cuye al 0.75% para verificar la ausencia de aglutinaciones inespecíficas.

Todos estos procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad.

3.-Inoculación del cultivo celular

Material

- Hielo frapé
- Papel absorbente
- Frascos estériles
- Placas con monoestrato de células MDCK
- MEM
- Tripsina
- Pipetas estériles

- Cinta adhesiva
- PBS estéril

El MEM se retiró de la placa de 24 pozos que contenía el monoestrato con pipetas estériles y se lavó 3 veces con PBS estéril, posteriormente se inocularon 200 microlitros de la muestra previamente procesada en condiciones de esterilidad y refrigeración.

Posterior a esto, se adicionaron 180 microlitros de MEM tripsinizado de acuerdo al protocolo de Alfonso Clavijo y Jordi Reina ^{22,23}

En cada inoculación se utilizaron controles positivos y como control negativo se dejaron pozos sin inocular, esto con el fin de realizar la evaluación en la interpretación de resultados.

Los controles utilizados fueron los siguientes:

- H₁N₁
- H₃N₂
- Células con MEM tripsinizado
- Células con MEM

Finalmente se selló la placa con cinta adhesiva y se incubó en la estufa a 37 °C

4.-Realización de pase ciego, lectura e interpretación de resultados.

Las placas se dejaron incubar 72 horas y posteriormente se revisaron en el microscopio invertido para identificar el efecto citopático, el cual consiste en el redondeamiento de las células y su desprendimiento de la monocapa. A las 72 horas post inoculación se tomaron

200 microlitros de cada pozo para realizar un pase ciego en monoestrato de células MDCK, preparadas 24 horas antes de realizar el pase.

Después de realizar el pase ciego, la placa inicial se regresó nuevamente a la estufa para su incubación por dos días más, para finalmente volver a realizar la prueba de aglutinación y titulación de sobrenadantes y teñir el monoestrato de la placa. Se realizó una lectura a las 72 horas post inoculación del pase ciego

5.-Prueba de hemaglutinación.

En cada una de las lecturas realizadas a la prueba de aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK, se tomaron sobrenadantes de cada una de las muestras y se realizó la prueba de hemaglutinación con eritrocitos de ave al 0.5%.

Material

- Placas de 24 pozos estériles.
- PBS
- Suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%

Se depositaron 200 microlitros de sobrenadante de cada una de las muestras en cada pozo de la placa, posteriormente se añadieron 20 microlitros de suspensión de eritrocitos al 0.5%, se aplicó una ligera agitación a la placa y se dejó incubar por espacio de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. Después de su incubación se observó al microscopio invertido en busca de hemaglutinación.

6.-Titulación de las muestras

Al mismo tiempo que se realizó la prueba de hemoaglutinación, se realizaron titulaciones por duplicado en microplacas en fondo U de 96 pozos de cada una de las muestras, para conocer los títulos de las muestras positivas.

Material

- Placas de fondo U de 96 pozos
- PBS estéril
- Suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%

Se depositaron 50 microlitros de PBS en cada pozo de la placa, posteriormente se añadieron 50 microlitros de sobrenadante a cada pozo, se realizaron diluciones dobles seriadas, para finalmente agregar 50 microlitros de suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%, se dejó incubar por un espacio de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente, después de su incubación se realizó la lectura de los títulos de las muestras.

7.-Tinción de placas

Material

- Cristal violeta al 1%
- Alcohol al 70%

Después de retirar los sobrenadantes de las placas de 24 pozos, se agregó 3 ml de alcohol al 70% a cada pozo para fijar las células, por un espacio de 4 a 5 minutos, posteriormente se agregó 3 ml del colorante cristal violeta al 0.1% a cada pozo, de manera que el monoestrato quedara cubierto con el colorante, se dejó actuar al colorante por 5 minutos, finalmente la

placa se enjuagó con agua corriente y escurrió en papel absorbente para secarlas. Las placas ya secas se observaron al microscopio invertido buscando el efecto citopático.

8.- Análisis de resultados

La información obtenida fue analizada mediante una prueba de estadística descriptiva, indicando número y porcentaje de muestras positivas y negativas para cada uno de los métodos de diagnóstico utilizados. Realizando también el cálculo de la sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunocromatografía.

5. RESULTADOS

5.1 Prueba de inmunocromatografía rápida

Los resultados de la detección del virus de influenza por el método de inmunocromatografía rápida “FLUE DETECT™” (Synbiotics) fueron los siguientes: de 100 muestras 10 fueron positivas, 8 de éstas mostraron una banda fuertemente purpura/rosado y dos muestras aunque de un tono menos intenso, fueron visiblemente positivas (como se muestra en el cuadro 2). El 10% de las muestras fueron positivas, de las 100 tiras reactivas usadas en este trabajo 90 fueron negativas.

Cuadro 2. Muestras positivas a la prueba de Inmunocromatografía rápida.

Nº de muestra	Positiva
39	+
49	+
50	+
52	+
53	+
54	+
56	+
57	+
73	+

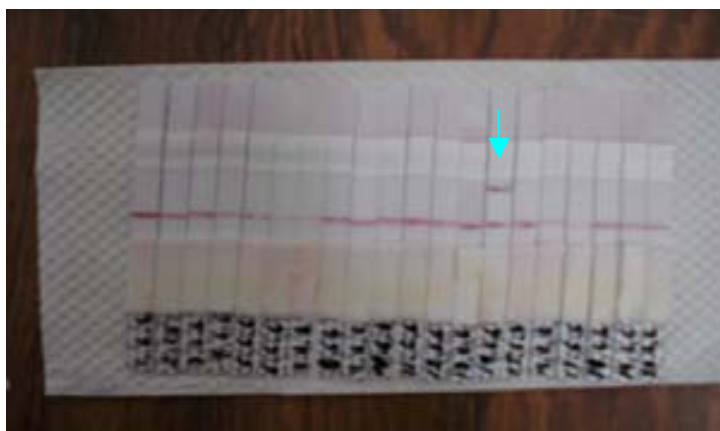


Figura 6. Fotografía de una tira reactiva positiva (flecha) a la prueba de inmunocromatografía rápida.

5.2 Aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK

Los resultados de la detección del virus de influenza porcina por el método de aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK fueron los siguientes: de 100 muestras 8 mostraron efecto citopático (como se muestra en el cuadro 3), representando esto el 8% del total de las muestras, 92 de 100 muestras no mostraron efecto citopático representando estas el 92% del total de las muestras. Una muestra positiva y negativa se muestran en la figura 7.

Cuadro 3. Muestras con efecto citopático en la prueba de Aislamiento viral

N° de muestra	Muestras con efecto citopático
39	+
50	+
52	+
53	+
54	+
56	+
57	+
73	+

A)



B)



Figura 7. Resultados obtenidos de la prueba de Aislamiento viral A) positiva B) negativa.

Los resultados de confrontar en placa los sobrenadantes de las células, con las que se prepararon las placas para la prueba de aislamiento viral, con eritrocitos de ave y bovino al 0.5% y cuye al 0.75%, no mostraron aglutinación alguna, indicando esto que los cultivos celulares se encontraban libres de aglutinantes inespecíficos.

Los resultados de las aglutinaciones y titulaciones (fig. 8) a las 72 horas y 5 días postinoculación mostraron 3 diferentes situaciones; muestras positivas a la hemaglutinación que dieron título, muestras positivas a la hemaglutinación que no dieron títulos y muestras que dieron título pero que fueron negativas a la hemoaglutinación. Detalle de ello se muestra en el cuadro 4.

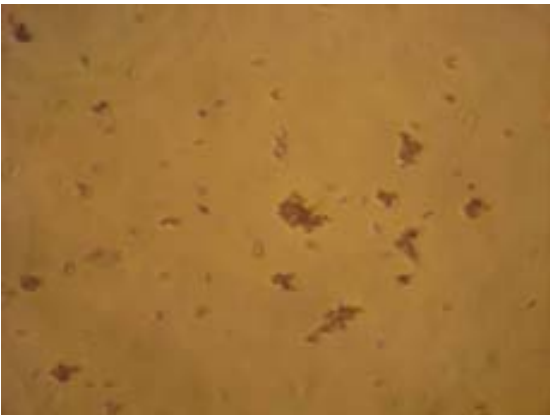


Figura 8. Fotografía de la aglutinación del sobrenadante de una muestra positiva a la prueba de Aislamiento Viral.

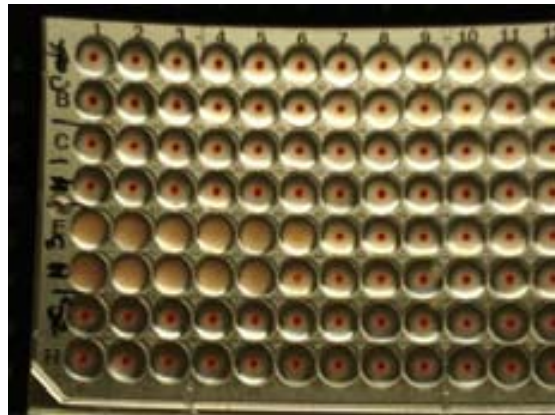


Figura 9. Fotografía de la titulación del sobrenadante de una muestra positiva a la prueba de Aislamiento Viral.

Cuadro 4. Aglutinaciones y títulos del primer pase a las 72h. y 5 días.

N° de muestra	72 h aglutinación	72 h. Titulación	5 días aglutinación	5 días titulación
26	+	1:2	+	1:2
27	+	1:2	+	1:2
28	+	1:2	+	1:2
29	+	1:2	+	1:2
30	+	1:2		
31	+	1:2		
32	+	1:2		
33	+	1:2		
34	+	1:2	+	1:2
35	+	1:2	+	1:2
36	+	1:2	+	1:2
37	+	1:2	+	1:2
38			+	
39	++++	1:64	+	1:32
46	+		+	
47	+		+	
49	+	1:4	+	1:4
50	++	1:8	++	1:8
52	+	1:4	+	1:4
53	+	1:4	+	1:4
54	+++	1:32	++	1:32
56	+++	1:32	++	1:8
57	+++	1:32	++	1:32
58	+			
62	+			
69		1:2		
72	+			

+ ligera HA, ++ moderada HA, +++ marcada HA, ++++ exagerada HA.
na negativo a la aglutinación, s/t sin título

Se consideró una muestra positiva al aislamiento viral, aquella que presentó efecto citopático, un título y que haya sido positiva a la aglutinación. De acuerdo a lo anterior los resultados de las pruebas de inmunocromatografía rápida, aislamiento viral y titulaciones de muestras positivas a las dos pruebas se resumen en el cuadro 5.

Cuadro 5 Resumen de los resultados de las pruebas de inmunocromatografía rápida y aislamiento viral de muestras positivas a las dos pruebas, mostrando sus respectivas temperaturas corporales.

N° de muestra	Tem. °C	Aislamiento Viral	Inmuno cromatografía rápida	Efecto citopatico	título 1er pase	título 2do pase
39	40.4	+	+	+	1:64	1:32
49	40.1	+	+	+	1:4	1:4
50	39.8	+	+	+	1:8	1:4
52	40.6	+	+	+	1:4	1:4
53	40.1	+	+	+	1:4	1:4
54	40.1	+	+	+	1:32	1:8
56	39.5	+	+	+	1:32	1:8
57	40.4	+	+	+	1:32	1:8
73	41.1		+			
77	39.2		+			

Resultados del pase ciego

Las muestras que presentaron efecto citopático en el segundo pase, fueron las mismas que lo presentaron en el primero, se presentó una ligera disminución en la aglutinación y título de los sobrenadantes. Detalle de ello se muestra en el cuadro 5.

5.3 Comparación de resultados

Al comparar ambos métodos, se obtuvieron los siguientes resultados 8 de las 10 muestras positivas a la prueba de inmunocromatografía rápida fueron positivas al aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK.

Dos de las 10 muestras positivas a la prueba de inmunocromatografía rápida fueron negativas al aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK.

Ninguna de las muestras negativas a la prueba de inmunocromatografía rápida fue positiva al aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK. La positividad de ambos métodos se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Positividad de IP por los métodos de Inmunocromatografía y Aislamiento viral.

Método	+	%pos	-	%neg.
Prueba comercial	10	10%	90	90%
Aislamiento viral	8	8%	92	92%

Los resultados obtenidos fueron tabulados en una tabla 2 x 2 calculando la sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunocromatografía rápida de acuerdo al siguiente modelo:

31,32

		Aislamiento viral		TOTAL
		+	-	
Prueba rápida	+	A	b	a+b
	-	C	d	c+d
		a+c	b+d	N

Donde:

1. a son verdaderos positivos
2. b son falsos positivos
3. c falsos negativos
4. d verdaderos negativos

Calculo de sensibilidad:

$$S = a/a+c$$

Calculo de especificidad

$$E = d/b+d$$

Nuestros cálculos:

		Aislamiento viral		TOTAL
		+	-	
Prueba rápida	+	8 ^a	2 ^b	10 ^{a+b}
	-	0 ^c	90 ^d	90 ^{c+d}
		8 ^{a+c}	92 ^{b+d}	100 ^N

$$S=8/8$$

$$E=90/92$$

$$S=100\%$$

$$E=97\%$$

De acuerdo a lo anterior, se obtuvo que la prueba de inmunocromatografía rápida tuvo una sensibilidad de 100% y una especificidad de 97%.

6. DISCUSIÓN

La información actual con la que se cuenta indica claramente que la influenza porcina se encuentra ampliamente distribuida por la República Mexicana, hecho sugerido en diversos trabajos en los cuales se han encontrado títulos de anticuerpos para los subtipos H₁N₁ y H₃N₂ en todos los estados muestreados. ^{33, 34, 35,36}

Aunado a lo anterior la influenza porcina es una enfermedad considerada emergente, lo que hace necesario realizar un diagnóstico rápido y certero de la enfermedad, tan rápido quizá, que se pueda llevar a cabo en la misma granja, para implementar las medidas médico-zootécnicas necesarias inmediatamente, evitando así complicaciones mayores. ²¹

Muchas pruebas se han desarrollado para realizar un diagnóstico de influenza porcina, las que prometen ser más rápidas son las pruebas de ELISA, pero a pesar de la rapidez con la que procesa las muestras se requiere que estas sean enviadas al laboratorio de diagnóstico debido a que en él, se encuentra el equipo necesario y el personal capacitado para realizar estas pruebas y esto implica más tiempo y gasto debido a su costo, además, en esta prueba, sólo sabremos si el animal estuvo expuesto o no a la enfermedad.

La necesidad de una prueba específica para detectar el virus de influenza porcina en la granja no ha sido cubierta, es por ello que en este trabajo, así como en otros se han usado pruebas rápidas diseñadas para detectar virus de influenza A en aves o humanos, debido a que el virus de influenza porcina también es un virus de influenza tipo A, éstas pruebas podrían también detectar virus de influenza tipo A en porcinos. ^{29, 37, 38}

La prueba rápida utilizada en este estudio es una prueba de inmunocromatografía rápida diseñada para detectar virus de influenza tipo A a partir de muestras de la cloaca o tráquea de aves, obtenidas con hisopos.

Los resultados de este trabajo mostraron 10 muestras positivas por la prueba de inmunocromatografía, representando un 10%, lo que mostró que la prueba es eficiente la detección del virus de influenza tipo A, a partir de moco nasal de cerdos, en comparación con el aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK que mostró solo 8 muestras positivas.

El hecho de que de 100 muestras, sólo se haya detectado un 8 a 10% de positividad en los diferentes métodos utilizados, puede deberse al momento en que se realizó la toma de la muestra, ya que posiblemente en ese momento no había excreción del virus, esto es muy factible debido al corto período de la viremia que es menor a 7 días, por esto, es muy importante la detección de los animales para realizar el diagnóstico de la enfermedad.³

También es importante la selección de los animales, ya que las muestras que resultaron positivas correspondieron a animales que presentaron aumento de la temperatura corporal y secreción nasal de apariencia serosa, en el momento de la obtención de la muestra, esto coincide con lo descrito por Olsen, et al., quienes mencionan, que los animales infectados por influenza manifiestan principalmente esta signología, también que el diagnóstico debe realizarse antes de la aparición de enfermedades secundarias de origen bacteriano.²

El presente trabajo coincide con los resultados obtenidos por Gui-Rong Bai, et. al., quien evaluó una prueba comercial de inmunocromatografía rápida diseñada para humanos en cerdos y aves, notificando que la prueba utilizada si detectó el virus de influenza A en cerdos y aves, concluyendo que la prueba utilizada era una herramienta útil para la vigilancia de virus de influenza A, en poblaciones porcinas.²⁹

Las pruebas rápidas de inmunocromatografía se han utilizado ampliamente en la medicina para humanos buscando diferentes tipos de virus de influenza, debido a que la influenza porcina y aviar son problemas de salud pública, anualmente se evalúan diferentes kits

buscando una forma rápida y certera de identificar los virus de influenza en humanos evitando así pandemias de consecuencias catastróficas. El mayor desarrollo de estas pruebas se encuentra en Asia, debido a la gran incidencia de influenza en humanos en esa región.³⁷

En diferentes estudios estas pruebas han sido evaluadas y comparadas con otros métodos diagnósticos de influenza en diferentes especies, coincidiendo en que la prueba de inmunocromatografía rápida es una herramienta útil para detectar virus de influenza, que tienen una alta sensibilidad y especificidad, en algunos casos más alta que el aislamiento viral en cultivo celular o que la técnica de PCR.^{37,38}

El aislamiento viral es considerada la prueba confirmativa para diferentes enfermedades que afectan al ganado porcino. En el caso particular de influenza porcina las células MDCK han demostrado ser un método confiable para su detección.

Barigazzi y col. en el 2003, realizaron un estudio en el cual usaban diferentes métodos para diagnosticar influenza porcina en cerdas con signología sugerente, el método diagnóstico por el cual logró obtener más casos positivos fue el aislamiento viral en cultivo celular, seguido por el cultivo celular en embrión de pollo.³⁹ En otro estudio Foni y col., realizaron el diagnóstico de influenza porcina por diferentes métodos obteniendo el 15.2% de positividad por el método de aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK, sólo superado por el método de RT-PCR.²⁵

Estos estudios al igual que muchos otros, nos aclaran que el método de aislamiento viral en cultivo celular es una muy buena opción para confirmar el diagnóstico de influenza porcina no, solo por su especificidad y sensibilidad, sino también porque a pesar de que la prueba se realiza en aproximadamente 2 semanas, se confirma si el agente esta o no presente^{25,39}

Las pruebas de PCR y RT-PCR, inmunohistoquímica, anticuerpos fluorescentes, aislamiento viral en embriones de pollo o en cultivo celular, han sido utilizadas para detectar el virus de influenza en diferentes especies incluyendo la especie porcina y todas estas pruebas han probado ser sensibles y específicas, pero cada una de ellas requieren de personal capacitado, equipo de laboratorio y bastante tiempo para procesar la muestra, así también, todas estas pruebas requieren que la muestra tomada sea enviada a un laboratorio de diagnóstico, todos estos hechos hacen al diagnóstico de influenza porcina lento y costoso, estas opciones son considerables en caso de que se necesite o desee tipificar el virus detectado en la granja, para cuestiones epidemiológicas o de investigación.

Con la prueba de aislamiento viral y la realización del segundo pase ciego, las muestras positivas se confirmaron ya que siguieron presentando efecto citopático, los títulos persistieron y aquellas muestras que tenían títulos bajos (1:2 a 1:4) o que fueron ligeramente positivas a la HA directa, pero no titularon, desaparecieron o se mantuvieron en los títulos mencionados anteriormente, sugiriendo que posiblemente esto correspondía a hemaglutinantes inespecíficos.

Es importante mencionar que ocho muestras fueron positivas para ambos sistemas y dieron títulos de 1:4 hasta 1:64, dos muestras positivas a la prueba de inmunocromatografía rápida fueron negativas al aislamiento viral, esto concuerda con los resultados obtenidos los cuales nos mostraron una sensibilidad de la prueba de inmunocromatografía rápida del 100%, indicando que esta prueba puede utilizarse como una prueba rápida o de tamiz para influenza porcina como ya ha sido reportado por otros autores,^{29, 37, 38} pero para confirmar la presencia del agente, lo ideal es realizar el aislamiento viral

7. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se obtuvieron cuatro conclusiones:

- 1.- La importancia de la toma de la muestra y la selección de los animales como posibles infectados de influenza porcina son determinantes para el éxito de su diagnóstico. Los signos clínicos más importantes para la selección de los animales, es la temperatura corporal, esta debe ser mayor o igual a 38°C y la presencia de moco nasal seroso.
- 2.- Se evaluó una prueba comercial rápida Flue detectTM (Synbiotics), concluyendo que puede ser utilizada en condiciones de campo con instrucciones sencillas que no requiere personal capacitado, instrumental o equipo de laboratorio, para lograr un diagnóstico certero y expedito.
- 3.- La prueba comercial utilizada en este trabajo “Flue detectTM” (Synbiotics) diseñada para detectar virus de influenza A en aves, resultó ser lo suficientemente sensible y específica para detectar virus de influenza A en cerdos, lo que sugiere una alternativa para la detección rápida y oportuna del virus de influenza porcina en condiciones de campo, obteniendo resultados en 30 minutos, permitiendo de esta manera tomar medidas inmediatas de control.
- 4.- Debido a la alta sensibilidad y especificidad del aislamiento viral en cultivo celular con células MDCK, se sugiere utilizar este método para realizar la confirmación de aquellos casos en que se tenga duda sobre el resultado de la prueba rápida.

8. LITERATURA CITADA

1. Fleites, AM. Buenfil, RJ. Carrasco, CA. Guzmán, RL. Tavera, AG. y Correa, SJ. Perfil serológico de influenza porcina, Mycoplasma hyopneumoniae y Actinobacillus pleuropneumoniae, en granjas de Yucatán, México. Vet. Mex. 2004; 35: 295-305.
2. Olsen, CW. Brown, IH. Easterday, BC. and Van Reeth, K. Swine Influenza. In, Straw. Diseases of swine. 9th edition. 2: (28) 469-482.
3. Kristien Van Reeth. Swine Influenza: variations on an old theme. The European Surveillance Network for Influenza in pigs. <http://www.esnip.ugent.be/index.html>. Available from: <http://www.esnip.ugent.be/page4/page4.html>. Consultada el 30 de junio del 2007
4. Skibbe, D. Zhou, ME. and Janke, HB. Comparison of a commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay with hemagglutination inhibition assay for serodiagnosis of swine influenza virus (H1N1) infection. J. Vet. Diagn. Invest. 2004; 16: 86-89.
5. Fujimura, FS. La muerte púrpura. La gran gripe de 1918. Perspectivas de la salud. Organización Panamericana de la Salud. 2003; 8 (3): Available from: URL: http://www.phao.org/Spanish/DD/PIN/Numero18_article5.htm. Consultada el 30 de junio del 2007
6. Leiva, AG. Influenza: Historia y amenazas. Rev. Chil. Infect. 2004; 21: 162-164.
7. Gaydos, JC. Top, FH. Hodder, RA. and Russell, PK. Swine influenza A outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. J. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12.
8. Olsen, CW. The emergence of novel swine influenza viruses in the North America. Virus Res. 2002; 85: 119-210

9. Zhou, NN. Senne, AD. Landgraf, SJ. Swenson, LS. Gene, E. Rossow, K. Lin Liu. Yoon, JK. Krauss, S. and Webster, GR. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in american pigs. *J. Virol.* 1999; 73: 8851-8856.
10. Gramer, MR. Defining swine influenza virus. *J. Swine Health Prod.* 2005; 13: 157-160.
11. Cross-Canada disease report. H4N6 influenza virus isolated from prigs in Ontario. *Can. Vet. J.* 2000; 41: 938-939.
12. Gramer, MD. Reassortant human/swine H1N1 and H1N2 influenza virus infections in US swine. *Proc. Amér. Assoc. swine vet.* 2006: 463-464.
13. Lekcharoensuk, P. Lager, MK. Vemulapalli, R. Woodruff, M. Vincent, and LA. Richt, AJ. Novel swine influenza virus subtype H3N1, united states. *Emerging infectious diseases.* 2006; 12: 787-794
14. Paul Heinen. Swine influenza: a zoonosis. *Veterinary Sciences Tomorrow.* Sep. 2003: Available from: <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html>
15. Influenza A virus Replication. The National Health Museum. [<http://www.accessexcellence.org>]. Washington, D.C. E.U.A Available for: <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/influenza.html> consultado el 06 de febrero del 20086
16. Olsen, WC. Epidemiology of swine influenza. Allen. D. Lemman Swine Conference. University of Minnesota college of Veterinary Medicine, Veterinary Outreach programs. 1999 Track 5; 255-261.
17. Fesenko, EE. Kireyev, HD. Gryadunov, DA. Mikhailovich, VM. Grebennikova, VT. L'vov, KD. and Zasedatelev, SA. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus. *Influenza and other Respiratory Viruses.* 2007; 1: 121-129.

18. Bruce, HJ. Classic swine influenza. *Large Anim. Pract.* 1998; 45: 24-29.
19. Gambaryan, SA. Karasin, IA. Tuzikov, BA. Chinarev, AA. Pazynina, VG. Bovin, VN. Matrosovich, NM. Olsen, WC. and Klimov, IA. Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. *J.Virus Res.* 2005; 114: 15-22.
20. Gene, E. H₁N₁ and H₃N₂ swine influenza: optimizing sample selection to confirm your diagnosis and control disease. *Proce. Ame. Assoc. Swine Pract.* 200; 311-312.
21. Janke, BH. Diagnosis of swine influenza. *Swine Health Prod.* 2000; 8: 79-84.
22. Clavijo, A. Trenzán, DB. Jolie, R. and Zhou, En-Min. Comparison of embrionated chicken eggs whit MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *Can. J. Vet. Res.* 2002; 66: 117-121.
23. Reina, J. Fernández, BV. Blanco, I. and Munar, M. Comparison of Madin-Darby canine kidney cells(MDCK) whit a green monkey continuous cell line(VERO) and human lung embryonated cells(MRC-5) in the isolation of influenza A virus from nasopharyngeal aspirates by shell vial culture. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 1900-1901.
24. Herman, M. Haugerud, S. Malik, SY. and Goyal, MS. Improved in vitro cultivation of swine influenza virus. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2005; 3: 124-128.
25. Foni, E. Chiapponi, C. Fratta, E. Garbarino, C. Barigazzi, G. and Merenda, M. Detection of swine influenza virus by RT-PCR and standard methods. *Proce. 4th Inte. Symp. Emer. and Re-emerging Pig Dis.* 2003: 270-271.
26. Haines, MD. Waters, HE. and Clark, GE. Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Can. J. Vet. Res.* 1993; 57: 33-36.

27. Sánchez, MM. Certificación de la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatinina – quinasa del material de referencia BCR 608. (Tesis Doctoral). España, Barcelona: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona. 2000. 18-20.
28. Martín, CM. Practica 8: Inmunocromatografía. Universidad Autónoma de Madrid. [<http://www.uam.es>]. 2005. Available from: <http://www.uam.es/personal-pdi/ciencias/mariamc/lacteos/practica8.htm> Consultada el 14 de Mayo del 2008.
29. Bai, RG. Sakoda, Y. Mweene, SA. Kishida, N. Yamada, T. Minakawa, H. and Kida, H. Evaluation of the ESPLINE[®] INFLUENZA A & B-N Kit for the diagnosis of avian and swine influenza. *Microbiol. Immunol.* 2005; 49: 1063-1067.
30. Synbiotics Corporation. Synbiotics corporation announces human submission for flue detect. Kansas, Missouri. E.U.A. [<http://www.synbiotics.com>] Available from: <http://www.synbiotics.com/PR.htm>. Consultada el 12 de Mayo del 2008.
31. Thrusfield, M. Medidas de la frecuencia de la enfermedad y de la producción. en: *Epidemiología veterinaria*. Acribia, 1997: 80-83.
32. Garcia, VZ. Medidas de presición. en: *Epidemiología veterinaria y salud animal*. Limusa, 1990: 129-134.
33. Chávez, RS. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H₃N₂ en diferentes estados de la republica mexicana. (Tesis de Licenciatura) México (D.F.) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de México. 2005. 45.
34. Jiménez, NJ. Mercado, GC. y Herradora, LMA. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H₃N₂ en cerdos de diferentes sistemas

- de producción en México. Mem. XLI Cong. Nal. AMVEC; 2006 julio 16-19; Ixtapa, Guerrero, México: Asoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos, A.C., 2006: 200.
35. Trujillo, OME. Carreón, NR. Mercado, GC. y Quezada, MF. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza H1N1 y H3N2 en sueros porcinos. Mem. XXXIX Cong. Nal. AMVEC; Puebla, Pue., México: Asoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos, A.C., 2004: 181.
36. Beltrán, FR. Trujillo, OME. Martínez RR. y Sánchez, BJI. Identificación del virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 mediante RT-PCR. Mem. XLII Cong. Nal. AMVEC; 2007 julio 25-28; Querétaro, Qro., México: Asoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos, A.C., 2007: 190-190.
37. Tsuda, Y. Sakoda, Y. Sakabe, S. Mochizuki, T. Namba, Y. and Kida, H. Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Microbiol. Immunol.* 2007; 51: 903-907.
38. Ito, M. Waranabe, M. Nakagawa, N. Ihara, T. and Okuno, Y. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation. *J. Virol. Meth.* 2006; 135: 272-275.
39. Barigazzi, G. Foni, E. Chiapponi, C. Leotti, G. Longo, S. and Joisel, F. Use of estándar kit for the diagnosis of respiratory viral infections in pigs. *Proce. 4th Inte. Symp. Emer. and re-emerging Pig Dis. Rome, June 29-July 2 2003*, 268-269.