



Comparación de dos métodos diagnósticos para la detección del virus de influenza porcina

Comparison of two diagnostic methods for the detection of the porcine influenza virus

Diana Matilde Sánchez Moreno* Rosalba Carreón Nápoles*
Juan Manuel Palacios Arriaga**

Abstract

Due to the lack of a rapid, sensitive and specific test to detect the presence of the porcine influenza virus that offers advantages in field conditions, it is necessary to try different options to obtain a rapid and reliable diagnosis. To do so, samples of nasal mucus, obtained with sterile swabs, were taken from 100 pigs with signs of the presence of such virus. These samples were used to compare two different methods for the detection of the porcine influenza virus. The first one was a commercial test, which is based on a rapid immunochromatography designed to detect the influenza virus type A in poultry. The second method consisted in the viral isolation in cell culture, using MDCK cells sensitized with trypsin; this method, already described in former processes, was compared with the first method, using nasal mucus samples from possible infected pigs with the influenza virus. The results showed that in the immunochromatography test, ten samples were positive, while only eight in the cell culture. Therefore, the immunochromatography was 100% sensitive to detect the influenza virus. The development of this work is important because it offers options in the porcine influenza diagnosis in field conditions, using the rapid immunochromatography test, which suggests that the results must be confirmed in the diagnostic laboratory through viral isolation.

Key words: PORCINE INFLUENZA, DIAGNOSIS, VIRAL ISOLATION, IMMUNOCHROMATOGRAPHY.

Resumen

Debido a la falta de una prueba rápida, sensible y específica para detectar la presencia del virus de influenza porcina, que ofrezca la ventaja de utilizar aquélla en condiciones de campo, es necesario probar diferentes opciones para obtener un diagnóstico rápido y confiable. Para ello se utilizaron 100 cerdos con signos de dicho virus; de cada uno de ellos se tomaron muestras de moco nasal obtenidas con hisopos estériles y se compararon dos métodos diferentes para la detección del virus de influenza porcina. El primero de ellos fue una prueba comercial, que está basada en una inmunocromatografía rápida diseñada para detectar virus de influenza tipo A en aves. El segundo método fue el aislamiento viral en cultivo celular en células MDCK sensibilizadas con tripsina; este método, ya descrito en otros trabajos, se comparó con el primer método a partir de muestras de moco nasal de cerdos sospechosos de estar infectados con el virus. Los resultados mostraron que en la prueba de inmunocromatografía, diez muestras fueron positivas y ocho en cultivo celular; la prueba de inmunocromatografía fue 100% sensible para detectar el virus de influenza. El desarrollo de este trabajo es importante, ya que ofrece opciones para el diagnóstico de influenza porcina en campo con el uso de la prueba rápida de inmunocromatografía y sugiere que los resultados deberán confirmarse en el laboratorio de diagnóstico mediante el aislamiento viral.

Palabras clave: INFLUENZA PORCINA, DIAGNÓSTICO, AISLAMIENTO VIRAL, INMUNOCROMATOGRFÍA..

Recibido el 19 de noviembre de 2008 y aceptado el 9 de noviembre de 2009.

*Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

**Schering-Plough, S. A. de C.V. Av. 16 de Septiembre 301, Col. Xaltocan-Xochimilco, 16090, México, D. F.

Correspondencia: Rosalba Carreón Nápoles, rcn@correo.unam.mx y rcarreonn@prodigy.net.mx Tels.: (55) 5622-58-69, 70 y 71.

Nota: Este trabajo es resultado de la tesis de licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la primera autora.

Introduction

In Mexico, the porcine industry is affected by different sanitary problems and illnesses that influence the swine production. One of these illnesses is the porcine influenza (PI).¹

The PI virus is one of the primary respiratory pathogens in pigs; this means that it can induce lung illnesses and injuries by itself. It is a zoonosis in which pigs act as intermediaries or as hosts of new viral chains.²

Typically, the PI is characterized by affecting pigs in the production line, which present fast development of clinical signs, such as fever, lethargy, cough, sneezing, nasal discharge, hard breathing, bad spermatic quality, miscarriage, diminishing of milk production and loss of appetite. Mortality is low and recovery happens in seven or ten days, reason why it is considered as acute disease.^{2,4}

The PI virus constitutes an important pathogen in pigs, it is associated with the porcine respiratory reproductive syndrome (PRRS); *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* and *Bordetella bronchiseptica* represent the denominated porcine respiratory complex.

The presence of this complex in farms affects production indexes, which decreases growth rates in daily farms regarding food conversion, food intake and final market weight. Measures must be taken in order to avoid this disease to join other factors than can cause severe damage and prolong the illness itself or even cause mortality.^{1,2}

Influenza viruses can infect a whole variety of species, birds, turkeys, horses, and aquatic mammals. It is a fact that the interspecies infection can be a mechanism to introduce new genetic material in a swine population. The principal subtypes that affect these animals are: H1N1, H3N3 and H1N2; therefore, it must be considered that pigs play an important role in the disease epidemiology; it presents receptors for poultry and human viruses, which originates the possibility to create new subtypes that make their manage and control harder.^{5,8} Because of that, the appropriate diagnosis of the PI virus must be considered.

Initially, it will be based on the disease semiotic; however, since it presents a rapid course, the detection becomes difficult because the virus replicates in the lung from three to five days only after the infection; therefore, the samples must be taken in the acute phase of the disease, which makes difficult its rapid detection.^{3,9,10}

The samples used for the isolation of the PI virus are lung and nasal swab.² The swab must be sterile

Introducción

En México, la industria porcina se encuentra afectada por diferentes problemas de tipo sanitario y enfermedades que originan la producción, una de éstas es la influenza porcina (IP).¹

El virus de la IP es uno de los patógenos respiratorios primarios del cerdo, esto significa que puede inducir enfermedad y lesiones pulmonares por sí solo, es una zoonosis en la cual los cerdos actúan como intermediarios o como portadores de nuevas cadenas virales.²

Típicamente, la IP se caracteriza por afectar a los cerdos de la línea de producción, los cuales presentan una rápida aparición de signos clínicos, como fiebre, letargia, tos, estornudo, descarga nasal, respiración difícil, mala calidad espermática, abortos, disminución de producción láctea, pérdida de apetito. La mortalidad es baja y la recuperación ocurre en siete o diez días, por lo cual se considera como enfermedad aguda.^{2,4}

El virus de IP constituye un importante patógeno en los cerdos, se le asocia con el síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRS); *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* y *Bordetella bronchiseptica* representan el denominado complejo respiratorio porcino.

La presencia de este complejo en las granjas afecta los indicadores de producción, ocasionando disminución en la tasa de crecimiento, en la ganancia diaria, en la conversión alimentaria, en el consumo y peso de los cerdos al mercado. Se deben tomar medidas inmediatas para evitar que esta enfermedad se acompañe de otros factores que puedan causar daños severos y prolongar la enfermedad, e incluso presentar mortalidad.^{1,2}

Los virus de influenza pueden infectar a toda una variedad de especies, aves, pavos, caballos y mamíferos acuáticos. 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 principales subtipos que afectan a estos animales son H1N1, H3N2 y H1N2, por lo que hay que considerar que el cerdo juega un papel muy importante en la epidemiología de la enfermedad, ya que presenta receptores para virus humanos y aviáres, originando con ello la posibilidad de generar nuevos subtipos que complican el manejo y el control de aquélla.⁵⁻⁸ Debido a lo anterior, debe considerarse el diagnóstico oportuno del virus de IP.

Inicialmente estará basado en la semiótica de la enfermedad; sin embargo, debido a que presenta un curso rápido, esta detección se dificulta, ya que el virus se replica en pulmón de tres a cinco días únicamente

and after taking the sample it must be suspended in a proper mean of transport and be kept at 4°C until it is processed. If the samples are to take more than 48 hours, they will be stored at a -70°C.^{2,9,10} It is convenient to add an appropriate antimicrobial to the mean of transport in order to control the microbial and mycotic agents that may be present in the sample.^{2,10}

When swine are selected for diagnosis, they must present fever and serous nasal discharge, no mucopurulent since that is not a sign of PI. The samples of these animals must be from lung and be kept in refrigeration at 4°C up to the moment they are processed.^{2,9,10}

Usually, nine days embryonated chicken eggs, free from specific pathogens, are used to carry out the isolation of the virus. These embryos are inoculated via allantoic sac with a preparation of the sample, either in suspension or from a tissue or suspension from a processed swab. The harvest from the embryo is obtained at 72 hours post inoculation to confront it with bird erythrocytes.^{2,9,10}

Another option is to use cell culture. The most used one for the isolation of the PI is Madin Darby Canine Kidney (MDCK).¹⁰ This cellular line was used for first time in 1968 by Gauss; by 1975, the use of MDCK was already more frequent for the isolation of the influenza viruses type A; after discovering that adding trypsin to the culture stimulate the growth of the virus and allow them to stress them and make plaques with great efficiency.

Reina *et al.*¹² carried out a study where they compared several cellular lines: MDCK, VERO (green monkey continuous cell line) and MRC-5 (human lung embryonated cell) for the isolation of the PI virus of nasopharyngeal aspirates, the results showed that the line MDCK was superior in comparison to the other lines, having a 100% sensitivity, that means that the line MDCK is the most recommended for the isolation of the influenza virus type A from respiratory samples

Herman *et al.*¹³ compared the porcine influenza virus culture in different cellular lines added with trypsin or with diethylaminoethyl dextran (DEAE); their results showed that the best cellular line to cultivate the porcine influenza virus was MDCK added with trypsin. In the other cellular lines there was no growth, not even adding trypsin or DEAE.

In the cellular culture, the presence of the PI virus evidences the cytopathic effect, which consists in the rounding of the cells at 72 hours post inoculation and the agglutination of their respective supernatants by using bird erythrocytes.¹⁰⁻¹²

The technique of immunochromatography corresponds to the most modern immunodiagnosis, its principal advantages are its simplicity and quickness. The applications of this technique are becoming

después de la infección, por lo que las muestras deben ser tomadas en la fase aguda de la enfermedad, lo que dificulta su rápida detección.^{3,9,10}

Las muestras que se utilizan para el aislamiento del virus de IP son pulmón e hisopo nasal.² El hisopo debe ser estéril, después de tomar la muestra debe suspenderse en un medio de transporte adecuado y mantenerse a 4°C hasta el momento de ser procesada. Si las muestras van a tardar más de 48 horas, se almacenarán a -70°C.^{2,9,10} Es conveniente agregar al medio de transporte un antimicrobiano apropiado para controlar los agentes microbianos y micóticos que puedan encontrarse en la muestra.^{2,10}

Cuando se seleccionan cerdos para el diagnóstico, éstos deberán presentar fiebre y descarga nasal serosa, no mucopurulenta pues éste no es signo de IP. Las muestras de estos animales deben ser de pulmón y conservarse en refrigeración a 4°C hasta el momento en que sean procesadas.^{2,9,10}

Para realizar el aislamiento del virus, generalmente se utilizan huevos de gallina embrionados de nueve 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, y se obtiene la cosecha del embrión a las 72 horas posinoculación para confrontarlo con eritrocitos de ave.^{2,9,10}

Otra opción es utilizar el cultivo celular, la más usada para el aislamiento de IP es *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK).¹⁰ Esta línea celular fue usada por primera vez en 1968 por Gauss; para 1975 el uso de células MDCK ya era más frecuente para el aislamiento de los virus de influenza tipo 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.¹¹

Reina *et al.*¹² realizaron un estudio donde compararon varias líneas celulares: MDCK, VERO (*green monkey continuous cell line*) y MRC-5 (*human lung embryonated cell*) para el aislamiento viral del virus de IP de aspirados nasofaríngeos, los resultados mostraron que la línea MDCK fue superior a las demás líneas, obteniendo 100% de sensibilidad, ello significa que la línea MDCK es la más recomendable para el aislamiento de virus de influenza tipo A de muestras respiratorias.

Herman *et al.*¹³ 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 MDCK, adicionada con tripsina, en el resto de las líneas celulares no hubo crecimiento, ni adicionando tripsina o DEAE.

more common because it does not require reagents or laboratory equipment.^{14,15} The use of these tests to detect the influenza virus has been limited to birds and humans, due to the relevance this kind of virus has have in public health.^{14,15}

The principle of the technique of rapid immunochromatography consists in using, generally, a nasal swab that is put in contact with the stripe of the commercial product that has a zone with a conjugated, which is impregnated with an antibody against one of the epitopes of the antigen to be detected and a detection reagent. If the sample contains an antigen to be detected, the conjugated will join, make a complex and both will migrate through nitrocellulose membrane. A second specific antibody against another epitopes of the antigen makes the capture zone. When the sample gets to this zone, the complexes made by the join of the antigen and conjugated will be retained and the strip will be colored (positive sample). If the sample does not contain the antigen, the second antibody does not capture anything and the strip remains transparent (negative sample). A third antibody that recognizes the detection reagent makes the control zone in the stripe. When the rest of the sample gets to this zone, the antibody will join the free conjugated that has not been retained in the capture zone. This line is a control that proves that the test has worked properly because it is always colored, with both positive and negative samples.¹⁶

Actually, there are two commercial products based on the previous fundament. One of them* is designed to detect nucleoproteins of the influenza virus type A and B and was evaluated to detect the influenza virus type A in experimentally infected poultry and swine.¹⁷ This kit is a useful and sensitive tool for a rapid influenza A diagnosis in poultry and swine.

The other one** is a test designed to detect the influenza virus type in poultry, which has been recently approved by the FDA (Food and Drug Administration) to be used in the diagnosis of influenza type A in humans; this represents the first product designed for veterinary use approved for human use.¹⁸

The necessity of a rapid diagnose of influenza leads to try different commercial products, even if they are not designed for the species in question;⁹ therefore, the objective of this study was to detect the PI virus by means of the rapid and commercial immunocromatography test, as well as the viral isolation in cellular culture of MDCK cells in suspicious animals to be sick.

Material and methods

Samples were taken from 100 pigs corresponding to the production line in three farms located in the Bajío zone of the Mexican Republic. The selection of the

En el cultivo celular la presencia del virus de IP se evidencia el efecto citopático, éste consiste en el redondeamiento de las células a las 72 horas posinoculación y la aglutinación de sus respectivos sobrenadantes, utilizando eritrocitos de ave.¹⁰⁻¹²

La técnica de inmunocromatografía corresponde al inmunodiagnóstico más moderno, su principal ventajas es que es sencillo y rápido. Cada vez son más las aplicaciones de esta técnica, debido a que no requieren reactivos ni equipo de laboratorio.^{14,15} La utilización de estas pruebas para la detección del virus de influenza se ha limitado al uso en aves y humanos, debido a la importancia que han tenido este tipo de virus en la salud pública.^{14,15}

El principio de la técnica de inmunocromatografía rápida consiste en utilizar, por lo general, un hisopo nasal, que se pone en contacto con la tira del producto comercial que tiene una zona que contiene un conjugado. Ésta se encuentra impregnada 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, formará un complejo y ambos migrarán a través de la membrana de nitrocelulosa. 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 quedarán retenidos y la línea se coloreará (muestras positivas). Si la muestra no contiene el antígeno, el segundo anticuerpo no captura nada y la línea queda transparente (muestra negativa). La zona de control en la tira 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.¹⁶

Actualmente existen dos productos comerciales, basados en el fundamento anterior. Uno de ellos* está diseñado para detectar nucleoproteínas de los virus de influenza tipos A y B, y fue evaluado para detectar el virus de influenza A en aves y cerdos infectados en forma experimental.¹⁷ Este paquete constituye una herramienta útil y sensible para realizar un diagnóstico rápido de influenza A en aves y cerdos.

El otro** es una prueba diseñada para detectar el virus de influenza A en aves, en fecha reciente ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para ser usado en el diagnóstico de influenza A

*Espline® Influenza A & B-N, Japón.

**Flue detect™ Avian Influenza Type A Antigen, Estados Unidos de América

farms was based on the clinic background and positive serology to PI. The selected animals presented signs related to PI, specifically nasal serous discharge and fever, which was detected using a digital thermometer. Samples were taken from each one of the pigs with two swabs, one to carry out the immunochromatography test and another one to perform the viral isolation. These swabs were kept under refrigeration and were taken to the diagnostic laboratory of the Departamento de Cerdos of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

Sample collection

Samples of nasal mucus were taken for the rapid immunochromatography test with sterile swabs, which were rubbed inside the nostrils of the chosen animals and, afterwards, suspended in the transport mean provided by the manufacturer.

For the viral isolation nasal mucus samples were taken with sterile swabs, which were rubbed inside the nostrils of the pigs, afterwards, such swabs were placed in test tubes with minimal essential medium (MEM) and were placed in a polyurethane box with refrigerants in order to keep the sample at 4°C.

Viral detection

Procedure

The immunochromatography test was carried out with commercial equipment.*

Eight drops of buffer solution were placed in a test tube.

The sample was taken from the pig, the swab was placed in the test tube and the swab was rotated from 5 to 10 times in the buffer solution

Before removing the swab from the test tube, the swab was pressed several times against the edge of the tube, until no more liquid came out of the swab.

A strip for analysis was taken out of the tube with desiccant (in each analyzed sample); it was manipulated only on the top.

The strip for analysis was placed directly in the test tube that contained the extracted sample.

The analysis strip was incubated during 15 minutes.

The strip was removed from the test tube to make the reading.

Reading

After 15 minutes, the presence or absence of the pink / purple line was observed in the center of the analysis strip.

The control line appears on top of the analysis strip,

en humanos; éste representa el primer producto diseñado para uso veterinario que es aprobado para uso humano.¹⁸

La necesidad de un diagnóstico rápido de la influenza conduce a probar diferentes productos comerciales, aunque éstos no hayan sido diseñados para la especie en la que se trabaja,⁹ por lo que el objetivo de este estudio fue detectar el virus de la IP por medio de la prueba de inmunocromatografía rápida comercial, así como mediante el aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK en animales sospechosos de la enfermedad.

Material y métodos

Se muestrearon 100 cerdos correspondientes a la línea de producción de tres granjas, ubicadas en la zona del Bajío de la República Mexicana. La selección de la granja se basó en antecedentes clínicos y serologías positivas a IP. Los animales seleccionados presentaban signos relacionados con IP, específicamente escurrimiento nasal de tipo seroso y presentación de fiebre, la cual fue detectada a través de un termómetro digital. De cada uno de los cerdos se tomaron muestras con dos hisopos, uno para realizar la prueba de inmunocromatografía y otro para realizar el aislamiento viral. Estos hisopos se conservaron en refrigeración y se transportaron al Laboratorio de Diagnóstico del Departamento Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

Toma de muestras

Para la prueba de inmunocromatografía rápida se tomaron muestras de moco nasal con hisopos estériles, que se frotaron en las fosas nasales de los animales elegidos y posteriormente fueron suspendidos en el medio de transporte que provee el paquete comercial.

Para el aislamiento viral 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 medio esencial mínimo (MEM), y se colocaron en una caja de poliuretano con refrigerantes para mantener las muestras a 4°C.

Detección viral

Procedimiento

La prueba de inmunocromatografía se llevó a cabo con un equipo comercial.*

*Flue detect™ Synbiotics Corporation, Estados Unidos de América

while the result of the test is read on the bottom of the strip.

The analysis strip was disposed in a container for biological wastes.

Validation

The test is valid if the control line is developed on top of the stripe for analysis. The absence of the control line indicates that the test is not valid, therefore it must be repeated.

Interpretation

Negative result for influenza type A antigen: presence of only the control line on top of the strip for analysis.

Positive result for influenza type A antigen: presence of two pink/purple lines on the strip for analysis.

Isolation in cellular culture

It was carried out according to the protocol by Clavijo *et al.*¹¹ and Reina *et al.*¹²

Procedure

The excess of the medium from the swab collected in MEM was pressed against the walls of the tube.

The supernatant was decanted in a different tube.

The supernatant was centrifuged at 306 *g* at 4°C for ten minutes in order to separate the remaining sediments from the residuals originated by the sample taking.

Afterwards, the supernatant was filtered through nitrocellulose membranes from pre-filter to 22 µm diameter membranes.

All the procedures up the moment to inoculate the cellular samples were carried out keeping the sample cold and in sterile conditions.

Cellular culture preparation

Plates with 24 wells contained confluent monolayers of MDCK cells, which underwent trypsinization and were seeded at an approximated concentration of 10⁶ cells in a volume of 2 mL/well, were prepared 24 hours before entering the samples to the Laboratorio de Diagnostico of the Departamento de Cerdos FMVZ-UNAM. The plate was placed on a stove at 37 °C for 24 hours to the growth of the monolayer.

Cellular culture inoculation

MEM was removed from the plate of 24 well, which contained the monolayer and was washed three times with sterile PBS; afterwards, 200 µL of the

Se colocaron ocho gotas de solución tampón en un tubo de ensayo.

Se tomó la muestra del cerdo, se colocó el hisopo en el tubo de ensayo y se giró el hisopo de cinco a diez 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.

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 que contenía la muestra extraída.

Se incubó la tira de análisis durante 15 minutos.

Se retiró la tira del tubo de ensayo para realizar la lectura.

Lectura

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 de la prueba se lee en la parte inferior de la tira.

Se desechó la tira para análisis en un recipiente para residuos biológicos.

Validación

La prueba es válida 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 la prueba no es válida y, por tanto, debe repetirse.

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 de análisis.

Aislamiento en cultivo celular

Éste se realizó de acuerdo con el protocolo de Clavijo *et al.*¹¹ y Reina *et al.*¹²

Procedimiento

Del hisopo recolectado en MEM, se presionó el exceso del medio del hisopo sobre las paredes del tubo.

Se decantó el sobrenadante en otro tubo.

Se centrifugó el sobrenadante a 306 *g* a 4°C durante

previous sample, processed in sterile and refrigeration conditions, was inoculated.

After the aforementioned, 180 µL of MEM added with trypsin were deposited according to Clavijo *et al.*¹¹ and Reina *et al.*¹²

Validation

In each inoculation, H1N1 and H3N3 viruses were used as positive witnesses, and not inoculated pits were used as negative witnesses in order to make an evaluation in the results interpretation. A control of cells with MEM added with trypsin and another one only with MEM were also used.

Finally, the plaque was sealed with adhesive tape and was incubated on the stove at 37°C.

Execution of the blind pass, reading and interpretation of results

The plates were incubated 72 hours and then observed under the inverted microscope in order to identify the cytopathic effect, which consists in the rounding of cells and their detachment from the monolayer. At 72 hours post-inoculation, 200 µL were taken from each well in order to carry out a blind pass in monolayer of MDCK cells, prepared 24 hours before doing the pass.

After the blind pass, the initial plate was returned again to the stove for its incubation for two more days, to finally carry out an agglutination test and supernatants titration and stain the plate monolayer. A reading at 72 hours post-inoculation of the blind pass was made.

Hemagglutination test

In each one of the readings made of the viral isolation test in cell culture of MDCK cells, supernatants were taken from each one of the samples and a hemagglutination test with bird erythrocytes at 0.5% was performed. For that purpose, 200 µL of supernatants were deposited in each one of the samples, in each well of the plate, afterwards, 20 µL of erythrocyte suspension at 0.5% were added, then the plate was slightly shaken and left for incubation for about 20 to 30 minutes at environment temperature. After incubation, it was observed under the inverted microscope to observe possible hemagglutination.

Sample titration

At the same time the hemagglutination test was carried out, titrations by duplicate on micro-plates in U bottom of 96 wells of each one of the samples were performed, in order to know the titres of the positive samples.

10 minutos para separar el sobrenadante de sedimento de residuos originados por la toma de muestra.

Posteriormente el sobrenadante se filtró mediante 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.

Preparación del cultivo celular

Veinticuatro horas antes de ingresar las muestras al Laboratorio de Diagnóstico, del Departamento Cerdos, de la FMVZ-UNAM, se prepararon placas de 24 pozos que contenían monoestratos confluentes de células MDCK, que fueron sometidos a tripsinización y sembrados a concentración aproximada de 10⁶ células en un volumen de 2 mL/pozo. La placa se colocó en la estufa a 37 °C durante 24 horas para el crecimiento del monoestrato.

Inoculación del cultivo celular

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

Luego de lo anterior se colocaron 180 µL de MEM adicionado con tripsina de acuerdo con el protocolo de Clavijo *et al.*¹¹ y Reina *et al.*¹²

Validación

En cada inoculación se utilizaron como testigos positivos, virus H1N1 y H3N2, y como testigos negativos se dejaron pozos sin inocular con el fin de realizar la evaluación en la interpretación de resultados. También se utilizó un control de células con MEM adicionado con tripsina y otro de células sólo con MEM.

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

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

Fifty μL of PBS were deposited in each well of the plate, afterwards 50 μL of supernatants were added to each well, double serial dilutions were performed, to finally add 50 μL of bird erythrocytes suspension at 0.5%, it was left for incubation for about 20 to 30 minutes at environment temperature. After incubation, a reading of the sample titres was performed.

The obtained information was analyzed through a descriptive statistic test, indicating the number and percentage of the positive and negative samples for each one of the diagnostic methods used.

With the aim to obtain the sensitivity and specificity from the immunocromatography regarding viral isolation, a 2×2 chart was made according to the following model:

		Viral isolation		TOTAL
		+	-	
Rapid test	+	A	B	a + b
	-	C	D	c + d
		a + c	B + d	N

Where:

- a = true positive
- b = false positives
- c = false negatives
- d = true negatives

Sensitivity calculation:

$$S = a / a + c$$

Specificity calculation

$$E = d / b + d$$

Results

Viral detection

Rapid immunocromatography test

The results of the influenza virus detection through the commercial method of rapid immunocromatography were: out of 100 samples, ten were positive; eight of them presented a hard pink / purple strip and the remaining 2, even though they presented a less intense color tone, were visibly positive. Out of the 100 reagent stripes used in this study, 90 were negative and 10 of them were positive

Viral isolation in cell culture

The results of the swine influenza virus detection through viral isolation in cell culture of MDCK cells were: out of 100 samples, eight showed a cytopathic effect, this result represents 8% of the total samples, 92 of the samples did not show cytopathic effect.

Después de realizar el pase ciego, la placa inicial se regresó nuevamente a la estufa para su incubación durante 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 posinoculación del pase ciego

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 a 0.5%, con ese propósito se depositaron 200 μL de sobrenadante de cada una de las muestras en cada pozo de la placa, posteriormente se añadieron 20 μL de suspensión de eritrocitos a 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.

Titulación de las muestras

Al mismo tiempo que se realizó la prueba de hemaglutinación, 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.

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

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.

Con el propósito obtener la sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunocromatografía con respecto al aislamiento viral, se realizó una tabla de 2×2 de acuerdo con el siguiente modelo:

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

Donde:

- a = verdaderos positivos
- b = falsos positivos

While hemagglutinating in the plate, the supernatants of the inoculated cells with erythrocytes of bird and bovine at 0.5%, and guinea pig at 0.75%, did not show any agglutination, which indicates that the cell cultures were free from unspecific hemagglutinants.

The results of agglutination and titrations at 72 hours and five days post inoculation, showed three different situations; positive samples to hemagglutination that gave titre, positive samples to the hemagglutination that did not give titres, and samples that gave titre but that were negative to hemagglutination (Table 1).

The viral isolation was considered as a positive sample, the one that presented cytopathic effect and that resulted positive to agglutination with viral titration. According to this, the results of the rapid immunochromatography tests, viral isolation and titration of positive samples to both tests are summarized in Table 2.

Blind pass results

The samples that presented cytopathic effect in the first phase were the same that presented such effect in the second phase, a slight decrease of the agglutination happened along with supernatant titration (Table 2)

Results analysis

While comparing both methods, the following results were obtained; eight of the ten samples positive to the rapid immunochromatography test were positive to the viral isolation in the cell culture of MDCK cells.

Two of the ten samples positive to the rapid immunochromatography test were negative to the viral isolation in the cell culture of MDCK cells.

None of the samples negative to the rapid immunochromatography test was positive to the viral isolation in the cell culture of MDCK cells.

The results of sensitivity and specificity obtained were:

		Viral isolation		TOTAL
		+	-	
Rapid test	+	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%	

According to this, the rapid immunochromatography test had a 100% sensitivity and 97% specificity.

c = falsos negativos

d = verdaderos negativos

Cálculo de sensibilidad:

$$S = a/a + c$$

Cálculo de especificidad:

$$E = d/b + d$$

Resultados

Detección viral

Prueba de inmunocromatografía rápida

Los resultados de la detección del virus de influenza por el método comercial de inmunocromatografía rápida fueron: de 100 muestras, diez fueron positivas, ocho de éstas mostraron una banda fuertemente púrpura/rosado y dos muestras aunque de un tono menos intenso, fueron visiblemente positivas. El 10% de las muestras fueron positivas; de las 100 tiras reactivas usadas en este trabajo, 90 fueron negativas.

Aislamiento viral en cultivo celular

Los resultados de la detección del virus de influenza porcina por el método de aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK fueron: de 100 muestras, ocho mostraron efecto citopático, este resultado representa 8% del total de las muestras, 92 de 100 muestras no mostraron efecto citopático.

Al hemaglutinar en placa los sobrenadantes de las células inoculadas con eritrocitos de ave y bovino a 0.5% y cuye a 0.75%, aquéllos no mostraron aglutinación alguna, lo cual indica que los cultivos celulares se encontraban libres de hemagglutinantes inespecíficos.

Los resultados de las aglutinaciones y titulaciones a las 72 horas y cinco días posinoculación, mostraron tres 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 hemaglutinación (Cuadro 1).

Se consideró como muestra positiva al aislamiento viral, aquella que presentó efecto citopático y que resultó positiva a la aglutinación con un título viral. De acuerdo con 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 2.

Resultados del pase ciego

Las muestras que presentaron efecto citopático en el primer pase fueron las mismas que lo presentaron

Discussion

The current information clearly indicates that the PI is found widely distributed in the Mexican Republic.¹⁹⁻²² Because of this and the previously said, PI represents a disease considered of emergency; therefore, it is necessary to perform a rapid and accurate diagnosis, so fast that it should be possible to perform it in the farm itself, and thus immediately organize the necessary medical measures to avoid serious complications.¹⁰ This necessity has not been covered and because of that, in this work as well as in some others, rapid tests designed to detect the influenza virus type A in poultry and humans have been used. Since the PI virus is also a virus of this type of influenza, they might also detect influenza virus type A in swine.^{17,23,24}

The results of this study showed ten positive samples through the immunochromatography test (10%), which demonstrated that the test is efficient for the detection of the influenza virus type A, from swine nasal mucus, in contrast with the viral isolation in the cell culture of MDCK cells that only showed eight positive samples.

The fact that only 8% to 10% out of 100 samples were positive in the different used methods maybe due to the time the samples were taken; it is possible that in this time there was no excretion of the virus. This is most likely possible because of the short viremia period, which is shorter than seven days, because of that, the opportune detection of the virus in the animals and the proper diagnosis is very important.³

The selection of the animals must also be considered, since the positive samples corresponded to those that presented increase in the body temperature and serous appearance of nasal secretion when the sample was taken. This result coincides with the described by Olsen *et al.*,² who mention that the animals infected with influenza mainly manifest these signs, reason why the diagnosis must be performed before the apparition of secondary disease of bacterial origin.

Regarding the immunochromatography test, the results of the present study match with those obtained by Bai *et al.*,¹⁷ who evaluated a commercial test of rapid immunochromatography, designed for humans and used in poultry and swine. They report that this test did detect the influenza virus type A in such animals and conclude that the applied test constitutes a useful tool to watch the influenza virus type A in swine populations.

In different studies,^{23,24} these tests have been evaluated and compared with other methods to diagnose influenza in different species, coinciding with the fact that the rapid immunochromatography test is a useful tool to detect the influenza virus, and that it

en el segundo, se presentó ligera disminución en la aglutinación y título de los sobrenadantes (Cuadro 2).

Análisis de resultados

Al comparar ambos métodos, se obtuvieron los siguientes resultados; ocho 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 diez 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.

Los resultados obtenidos de sensibilidad y especificidad fueron:

		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 con lo anterior, la prueba de inmunocromatografía rápida tuvo sensibilidad de 100% y especificidad de 97%.

Discusión

La información actual indica claramente que la IP se encuentra ampliamente distribuida por la República Mexicana.¹⁹⁻²² Aunado a lo anterior, la IP representa 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 instrumentar las medidas médico-zootécnicas necesarias inmediatamente, evitando así complicaciones mayores.¹⁰ Esta necesidad 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 tipo A en aves o humanos, debido a que el virus de IP también es un virus con este tipo de influenza, podrían también detectar virus de influenza tipo A en porcinos.^{17, 23, 24}

Los resultados de este trabajo mostraron diez muestras positivas por la prueba de inmunocromatografía (10%), lo que mostró que la prueba es eficiente para la detección del virus de influenza tipo A, a partir de moco nasal de cerdos, en comparación con el aislamiento

Cuadro 1
AGLUTINACIONES Y TÍTULOS DEL PRIMER PASE A LAS 72 HORAS Y
CINCO DÍAS POSINOCULACIÓN
AGGLUTINATIONS AND TITRATION IN THE FIRST PHASE AT 72 HOURS
AND FIVE DAYS POST-INOCULATION

<i>Sample number</i>	<i>72 h agglutination</i>	<i>72 h titration</i>	<i>Five days agglutination</i>	<i>Five days titration</i>
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	+			

+ light HA, ++ moderated HA, +++ marked HA, ++++ exaggerated HA.

Cuadro 2
MUESTRAS POSITIVAS POR LAS PRUEBAS DE INMUNOCROMATOGRAFÍA RÁPIDA Y
 AISLAMIENTO VIRAL, ASÍ COMO SUS RESPECTIVAS TEMPERATURAS CORPORALES
POSITIVE SAMPLES THROUGH THE RAPID IMMUNOCHROMATOGRAPHY AND VIRAL
ISOLATION TESTS AND THEIR RESPECTIVE BODY TEMPERATURES

<i>Sample number</i>	<i>Temperature, °C</i>	<i>Viral isolation</i>	<i>Rapid immunochromatography</i>	<i>Presence of cytopathic effect</i>	<i>Titration in the first phase</i>	<i>Titration in the second phase</i>
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		+			

Comparison of two diagnostic methods for the detection of the porcine influenza virus

has high sensitivity and specificity, which matches the results obtained in this study.

Regarding the viral isolation test, the results indicate that it is a reliable method for its detection, mainly due to specificity that it shows, such thing is confirmed by Barigazzi *et al.*,²⁵ who carried out a study in which they used different methods to diagnose PI in sows with signs of the disease, the diagnostic method through which they obtained more positive cases was the viral isolation in cellular culture, followed by the cellular culture in chicken embryo. In a different study, Foni *et al.*,¹⁴ performed the PI diagnosis through different methods and obtained 15.2% of positivity through viral isolation in cell culture of MDCK cells, only exceeded by RT-PCR method.

These studies confirm that the method of viral isolation in cell culture is the method to choose to confirm the PI diagnosis, not only because of its specificity and sensitivity but also because, even when the test is carried out in about two weeks, it confirms if the agent is or not present.^{14,25}

It is important to mention that eight samples were positive in both methods and presented hemagglutinant titres from 1:4 to 1:64, which indicates the high sensitivity of both methods. However, two samples, positive to the rapid immunochromatography test, were negative to the viral isolation, which coincides with the results obtained that showed a 100% sensitivity in the rapid immunochromatography test, this indicates that it can be used as rapid test or screening test for swine influenza, as it has been mentioned by other authors.^{17,23,24} However, to confirm the presence of the agent, the ideal is to perform the viral isolation.

According to the aforementioned, it is concluded that the relevance of the sample taking and the selection of possibly infected animals with swine influenza are determining for a successful diagnosis. The most important clinical signs in the selection of the animals are body temperature and the presence of serous appearance of nasal mucus.

In this context, after evaluating the rapid commercial test and comparing it with the viral isolation, even when it is designed to detect the influenza virus type A in poultry, it is sensitive and specific enough to detect the influenza virus in swine, this suggests an alternative for the rapid and opportune detection of the virus in field conditions, providing results in 30 minutes and easy instructions that make possible immediate measures for the control of the virus.

Referencias

1. FLEITES AM, BUENFIL RJ, CARRASCO CA, GUZMÁN RL, TAVERA AG, CORREA SJ. Perfil serológico de

viral en cultivo celular de células MDCK, que mostró solo ocho muestras positivas.

El hecho de que de 100 muestras, sólo se haya detectado de 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 tiempo no había excreción del virus, esto es muy factible debido al corto periodo de la viremia, que es menor a siete días, por ello es muy importante la detección de la enfermedad en los animales para realizar el diagnóstico de la enfermedad.³

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

En relación con la prueba de inmunocromatografía, los resultados del presente trabajo coinciden con los obtenidos por Bai *et al.*,¹⁷ quienes evaluaron una prueba comercial de inmunocromatografía rápida, diseñada para humanos, en cerdos y aves, y notifican que esta prueba utilizada sí detectó el virus de influenza tipo A en dichos animales, concluyen que la prueba utilizada constituye una herramienta útil para la vigilancia de virus de influenza A en poblaciones porcinas.

En diferentes estudios^{23,24} 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 tiene alta sensibilidad y especificidad, resultados que coinciden con los obtenidos en este estudio.

En relación con la prueba de aislamiento viral, los resultados indican que es un método confiable para su detección, debido principalmente a la especificidad que muestra, ello también lo confirman Barigazzi *et al.*,²⁵ quienes realizaron un estudio en el cual usaban diferentes métodos para diagnosticar IP en cerdas con signos de la enfermedad, el método diagnóstico por el cual lograron obtener más casos positivos fue el aislamiento viral en cultivo celular, seguido por el cultivo celular en embrión de pollo. En otro estudio, Foni *et al.*¹⁴ realizaron el diagnóstico de IP por diferentes métodos y obtuvieron 15.2% de positividad por el método de aislamiento viral en cultivo celular de células MDCK, sólo superado por el método de RT-PCR.

Estos estudios confirman que el método de aislamiento viral en cultivo celular es la elección

- influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas de Yucatán, México. Vet Méx 2004; 35: 295-305.
2. OLSEN CW, BROWN IH, EASTERDAY BC, VAN REETH K. Swine Influenza. In: STRAW B, ZIMMERMAN JJ, D'ALLAIRE S, TAYLOR DJ, editors. Diseases of swine. Iowa USA:Blackwell Publishing, 2006: 469-482.
 3. VAN REETH K. Swine Influenza: variations on an old theme. The European Surveillance Network for Influenza in pigs. [serial online] 2007 may [cited: 2007 jun 30] Available from: <http://www.esnip.ugent.be/page4/page4.html>.
 4. SKIBBE D, ZHOU ME, 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. ZHOU ME, SENNE AD, LANDGRAF SJ, SWENSON LS, GENE E, ROSSOW K *et al.* Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. J Virol 1999; 73: 8851-8856.
 6. GRAMER MR. Defining swine influenza virus. J Swine Health Prod 2005; 13: 157-160.
 7. OLSEN WC. Epidemiology of swine influenza. Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference; 1999 september 19-22; Saint Paul Minnesota. Saint Paul Minnesota: University of Minnesota college of Veterinary Medicine, Veterinary Outreach programs, 1999: 255-261.
 8. FESENKO EE, KIREYEV HD, GRYADUNOV DA, MIKHAILOVICH VM, GREBENNIKOVA VT, L'VOV KD *et al.* Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus. Influenza Other Respir Viruses 2007; 1:121-129.
 9. GENE E. H₁N₁ and H₃N₂ swine influenza: optimizing sample selection to confirm your diagnosis and control disease. Proc Am Assoc Swine Pract 200; 311-312.
 10. JANKE BH. Diagnosis of swine influenza. Swine Health Prod 2000; 8: 79-84.
 11. CLAVIJO A, TRENZAN DB, JOLIE R, ZHOU ME. Comparison of embrionated chicken eggs whit MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. Can J Vet Res 2002; 66: 117-121.
 12. REINA J, FERNANDEZ BV, BLANCO I, MUNAR M. Comparison of Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) with 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.
 13. HERMAN M, HAUGERUD S, MALIK SY, GOYAL MS. Improved *in vitro* cultivation of swine influenza virus. Int J Appl Res Vet Med 2005; 3: 124-128.
 14. FONI E, CHIAPPONI C, FRATTA E, GARBARINO C, BARIGAZZI G, MERENDA M. Detection of swine influenza virus by RT-PCR and standard methods. Proceedings 4th International Symposium of Emerging and re-emerging Pig Disease 2003 June 29-July 2; Rome, Italy. Rome, Italy:University of Parma, Faculty of Veterinary Medicine, 2003: 270-271.
- para confirmar el diagnóstico de IP, no sólo por su especificidad y sensibilidad, sino también porque aunque la prueba se realiza, en aproximadamente dos semanas se confirma si el agente está o no presente.^{14,25}
- Es importante mencionar que ocho muestras fueron positivas para ambos métodos y presentaron títulos hemaglutinantes de 1:4 hasta 1:64, indicando la alta sensibilidad de ambos métodos, pero dos muestras positivas a la prueba de inmunocromatografía rápida fueron negativas al aislamiento viral, lo que concuerda con los resultados obtenidos que mostraron una sensibilidad de la prueba de inmunocromatografía rápida de 100%, ello indica que puede utilizarse como prueba rápida o de tamiz para influenza porcina, como ya ha sido mencionado por otros autores,^{17, 23,24} pero para confirmar la presencia del agente, lo ideal es realizar el aislamiento viral.
- De acuerdo con lo anterior, se concluye que 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, así como la presencia de moco nasal seroso.
- En este contexto, al evaluar la prueba comercial rápida, por estar diseñada para detectar virus de influenza del tipo A en aves y al compararla con el aislamiento viral, resultó ser lo suficientemente sensible y específica para detectar el virus de influenza en cerdos, esto último sugiere una alternativa para la detección rápida y oportuna del virus en condiciones de campo, con resultados en 30 minutos e instrucciones sencillas ello permite que se tomen medidas inmediatas de control de este virus.
15. SÁNCHEZ MM. Certificación de la concentración de masa de la isoenzima 2 de la creatinina – quinasa del material de referencia BCR 608 (tesis doctoral). Barcelona, España: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona, 2000.
 16. MARTÍN CM. Práctica 8: Inmunocromatografía. Universidad Autónoma de Madrid. 2005. [serie en línea] 2005 mayo [Citado: 2008 mayo 14] Disponible en: <http://www.uam.es/personal-pdi/ciencias/mariamc/lacteos/practica8.htm>
 17. BAI RG, SAKODA Y, MWEENE SA, KISHIDA N, YAMADA T, MINAKAWA H *et al.* Evaluation of the ESPLINE® INFLUENZA A & B-N Kit for the diagnosis of avian and swine influenza. Microbiol Immunol 2005; 49: 1063-1067.
 18. SYNBIOTICS CORPORATION. Synbiotics corporation announces human submission for flue detect [serial online] 2008 march [cited: 2008 may 12] Available from: <http://www.synbiotics.com/PR.htm>.
 19. CHÁVEZ RS. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H₃N₂ en diferentes

- estados de la República Mexicana (tesis de licenciatura) México, DF: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
20. JIMÉNEZ NJ, MERCADO GC, CARREÓN NR, HERRADORA LMA. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcina subtipo H₃N₂ en cerdos de diferentes sistemas de producción en México. Memorias XLI Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 2006 julio 16-19; Ixtapa (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2006:200.
 21. TRUJILLO OME, CARREÓN NR, MERCADO GC, QUEZADA MF. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza H1N1 y H3N2 en sueros porcinos. Memorias XXXIX Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 2004 julio 28 al 1º agosto ; Puebla (Puebla) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2004: 181.
 22. BELTRÁN FR, TRUJILLO OME, MARTÍNEZ RR, SÁNCHEZ BJI. Identificación del virus de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 mediante RT-PCR. Memorias XLII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 2007 julio 25-28; Querétaro (Querétaro) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 2007: 190.
 23. TSUDA Y, SAKODA Y, SAKABE S, MOCHIZUKI T, NAMBA Y, KIDA H. Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 903-907.
 24. ITO M, WARANABE M, NAKAGAWA N, IHARA T, 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.
 25. BARIGAZZI G, FONI E, CHIAPPONI C, LEOTTI G, LONGO S, JOISEL F. Use of standard kit for the diagnosis of respiratory viral infections in pigs. Proceedings 4th International Symposium of Emerging and re-emerging Pig Disease; 2003 June 29-July 2; Rome, Italy. Rome, Italy: University of Parma, Faculty of Veterinary Medicine, 2003: 268-269.