



IMPLEMENTACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA

IMPROVEMENT OF TWO DIAGNOSTICS METHODS FOR DETECTION OF INFLUENZA SWINE VIRUS

**Gustavo Arbeláez¹, Diana Calderón², María Rincón², Ángela Lora²,
Marcela Mercado¹**

¹ *Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana,
Cra. 7 N° 43 - 82, Bogotá, Colombia*

² *Instituto Colombiano Agropecuario CEISA, Bogotá.
garbela10@yahoo.com*

Resumen

La influenza porcina, es una enfermedad respiratoria aguda viral altamente contagiosa, de morbilidad elevada y capaz de provocar complicaciones letales. Tiene gran importancia en la industria pecuaria debido a las cuantiosas pérdidas económicas que ocasiona su alta morbilidad. Por esta razón, en este trabajo se implementaron las pruebas de cultivo celular y RT-PCR para las proteínas M, H y N para la determinación del virus de influenza porcina.

En este trabajo, se procesaron y analizaron 82 muestras de hisopos nasales, 12 lavados broncoalveolares y 12 tejidos pulmonares, dando resultados negativos para la detección del virus de influenza. Al comparar la RT-PCR de la proteína M con la de cultivo celular como "Gold Standard" se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% e índice Kappa de 1, indicando una concordancia muy buena entre las dos pruebas.

Palabras clave: hemaglutinina, influenza, MDCK, neuroaminidasa y RT-PCR.

Abstract

The swine influenza virus, is an acute disease that affects the respiratory tract of the pig. It is highly contagious and have a raised morbidity ratio also could turn into a fatal end. This disease has a very important roll into the pig production farms since it is a cause of loses of funds. For that reason, this work implemented the cell culture technique and RT-PCR for M, H and N proteins segments for the fast and accurate diagnosis of this virus.

On this work, were tested 82 nasal swabs, 12 broncoalveolars washes, and 12 lung tissues, given negative results for the swine influenza virus. During the compilation of RT-PCR for M protein segment with the cell culture as a gold standard, it attained a sensibility and specificity of 100% and Kappa index of 1 indicating a good concordance between the two probes.

Key words: hemagglutinin, neuroaminidase, influenza, MDCK y RT-PCR

INTRODUCCIÓN

El virus de la Influenza porcina pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, posee un RNA segmentado de polaridad negativa. Con base en sus diferencias antigénicas existentes entre su nucleoproteína y la proteína de matriz, se dividen en los tipos A, B y C. Los virus de Influenza tipo A poseen distintos subtipos de acuerdo a las 16 hemaglutininas y 9 neuraminidasas. El virus influenza presenta variaciones genéticas frecuentes en los segmentos de RNA. Ellas originan cambios en la secuencia nucleotídica de la neuraminidasa y/o de la hemaglutinina, modificando su composición aminoacídica e identidad antigénica (Samson *et al.*, 2006).

Todos los subtipos de influenza aviar se pueden replicar en cerdos y los porcinos pueden ser infectados por virus de influenza humana. En 1986 se demostró la evidencia que el virus de la Influenza porcina en cerdos de Europa tuvieron su origen en aves, se propagó al humano y ocasionó enfermedad (Kida *et al.*, 1994).

Por esta razón, en este estudio se implementaron dos metodologías diagnósticas, para la detección del virus de la Influenza porcina, mediante el análisis de cepas de referencia y en muestras procedentes de granjas intensivas que fueron seropositivas por medio de la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus de referencia

Los virus de Influenza porcina, que se utilizaron para la implementación de las técnicas de cultivo celular y RT-PCR fueron las cepas de referencia internacionales A/Swine/Iowa/73/H1N1 (aislado del tejido de

pulmón) y el virus A/SW/TX/4199/98/H3N2 (aislado de cerdos clínicamente afectados en Texas). Estos virus fueron adquiridos por el ICA a través del National Veterinary Services Laboratories (NVSL) localizado en Estados Unidos.

Línea celular

La línea celular MDCK que se utilizó para la replicación y producción de stock de los virus fue suministrada por el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud.

Muestras

Las muestras que se analizaron en este estudio fueron 86 hisopos nasales de dacrón, 12 tejidos pulmonares de cerdos que presentaron signos y síntomas compatibles con influenza y 12 lavados broncoalveolares.

Las muestras de hisopos nasales se recolectaron y se procesaron de acuerdo a lo descrito en el Manual de vigilancia y diagnóstico de la influenza en animales de la Organización Mundial de la Salud. El sobrenadante se utilizó para realizar el aislamiento viral, y el sedimento se sometió a la prueba de RT-PCR.

Las muestras de tejidos pulmonares se obtuvieron durante la necropsia de cerdos sospechosos de estar infectados con el virus de influenza. Y las muestras de lavados broncoalveolares se obtuvieron de cerdos sacrificados en mataderos, los pulmones mostraron microscópicamente compatibilidad con neumonía intersticial, y fueron analizados mediante la técnica de RT-PCR.

Sensibilidad de la prueba de cultivo celular y RT-PCR

Se realizó inicialmente una prueba para determinar la sensibilidad de las células MDCK

para el aislamiento del virus de influenza, con las cepas de referencia siguiendo la técnica descrita en el manual de la OIE (OIE, 2004). Se tomaron las cepas de referencia correspondientes a los virus H1N1 y H3N2 que tuvieran títulos hemaglutinantes por la técnica HI de: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024 (0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 2.4, 2.7 y 3.0 log virus) y se inoculó cada virus en frascos de cultivos celulares de 25 cm³ con monocapas de células MDCK de 24 horas de cultivo, a razón de 1 ml del virus por frasco.

Cuando se observó la presencia de efecto citopático, se congelaron los frascos a -70°C por 24 horas y luego se realizó la prueba RT-PCR, utilizando una muestra de células suspendidas.

Procesamiento de las muestras

Los sobrenadantes de las muestras de hisopos nasales procedentes de la centrifugación, se inocularon por duplicado en frascos de cultivos celulares de 25 cm³ con células MDCK en monocapa de 24 horas de acuerdo a lo descrito en el manual de la OIE. (OIE, 2004). Las muestras que no presentaron efecto citopático, se congelaron a -70°C durante 24 horas y luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se inoculó en un nuevo frasco de células MDCK utilizando el mismo procedimiento. Las muestras que no presentaron efecto citopático se sometieron a un tercer pasaje en forma similar. Las muestras del tercer pasaje que no presentaron efecto citopático se analizaron mediante la técnica de RT-PCR.

Extracción de RNA viral

La extracción viral de las muestras de hisopos nasales, tejido pulmonar y lavado broncoalveolar se realizó por el método del

Trizol (Gibco BRL), que es una modificación del método del tiocianato de Guanidina descrito por Chomczynski y Sachi, 1987.

Transcripción reversa (RT)

Inicialmente se realizó la transcripción reversa (RT) de la siguiente manera: 5 µl de RNA fueron mezclados con 1.5 µl de random hexamers (Promega, Estados Unidos) de 70 ng/µl y 1.5 µl del primer Uni 12 (Invitrogen life, Technologies) de 25 µM. Esta mezcla se denaturó a 65°C durante 3 minutos en el termociclador (Perkin Elmer Gene PCR system 2400). Luego se agregó la mezcla que contenía los siguientes reactivos con las siguientes concentraciones: Buffer RT (Promega) 1X, dNTPs (Promega) 0.5 mM, RNaseout (Invitrogen) 1U/µl, RT M-MLV (Invitrogen) 5U/µl y agua DEPC hasta completar un volumen final de 25 µl. Esta mezcla se llevó al termociclador a 42°C por 20 minutos y 94°C por 3 minutos. El cDNA que se obtuvo por esta técnica se utilizó para el montaje de la PCR para las proteínas M, H y N.

PCR para la proteína M

Para la PCR, se tomó 3 µL del cDNA obtenido en la RT y se le agregó una mezcla que contenía: MgCl₂ (Promega) 1.5 mM, Buffer de PCR (Promega) 1X, dNTPs (Promega) 0.2 mM, primer MWSN-5 (I) y M1023R (II) (Invitrogen, Life Technologies) 0.6 µM de cada uno, Taq polimerasa (Promega) 0.025U/µl y se agregó agua hasta completar un volumen de 25 µL. Se llevó al termociclador con las siguientes condiciones: denaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos a: 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 72°C por 3 minutos; y una extensión final a 72°C por 8 minutos.

Las secuencias de los primers utilizados Webster *et al.*, 2002 fueron las siguientes:

MWSN-8: 5' GAA GGT AGA TAT TGA AAG
ATG 3'

M1023R: 5'GAA ACA AGG TAG TTT TTT
ACT C 3'

Uni 12: 5' AGC AAA AGC AGG 3'

PCR para la H1 y H3

Para la PCR, se tomó 2 µl del cDNA obtenido en la RT y se adicionó una mezcla que contenía: MgCl₂ (Promega) 1.5 mM, Buffer de PCR (Promega) 1X, dNTPs (Promega) 0.2mM, primers 0.2 µM de cada uno, Taq polimerasa (Promega) 0.02U/µl y se agregó agua DEPC hasta completar un volumen de 25 µl. Se llevó al termociclador con las siguientes condiciones: denaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a: 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Las secuencias de los primers utilizados (Chiapponi *et al.*, 2003) fueron las siguientes:

H1-550F: 5' AAC AAY AAR GRG AAA GAA
GT 3'

H1-1016R: 5' GGG ACD TTY CTT ART CCT
GT 3'

H3-175F: 5' CARATTGAR GTG ACHAATGC 3'

H3-896R: 5'GGT GCA TCT GAY CTC ATTA 3'

N1-617F: 5'TGAAATACAATG GCATAATAA
C 3'

N1-1130R: 5'GGA TCC CAA ATC ATC TCA
AA 3'

N2-575F: 5'GGA AAA GCA TGG CTG CAT 3'

N2-1365R: 5'GTG CCA CAAAAC ACAACA
AT 3'

Electroforesis

La detección de los productos de PCR se realizó en gel de agarosa al 1,5%, éste se coloreó con bromuro de etidio 1 µl por cada 50 ml de agarosa. Se dispensó 2 µl de loading buffer y 10 µl del producto de PCR en el gel. Se utilizó un patrón de talla molecular de 100 bp (Promega). La electroforesis se corrió a 80 voltios. Los productos visualizados fueron de 1015bp para la PCR de la proteína M y de 467bp para H1y 722bp para H3. Para N1 514bp y N2 791bp. Estos productos fueron visualizados y fotografiados bajo luz ultravioleta con una cámara Polaroid.

Análisis de datos

Se determinaron las características operativas: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo con sus intervalos de confianza del 95% para la prueba de RT-PCR de la proteína M, teniendo como "Gold Standard" la prueba de cultivo celular. Los resultados obtenidos se analizaron en el programa Epi-info 6.0d.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cultivo celular

Las cepas de referencia H1N1 y H3N2 con títulos hemaglutinantes 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024 presentaron efecto citopático en todas las diluciones en un período de tiempo de 18 a 24 horas posinfección (Figuras 1A y 1B).

La línea celular MDCK se seleccionó teniendo en cuenta que es la que presenta mayor sensibilidad para la replicación del virus de influenza. En estudios realizados por Youil *et al.* determinaron la sensibilidad de las células MDCK y VERO, utilizando la cepa de Influenza H2N2 y observaron que ambas líneas celulares replicaron eficientemente el virus, obtenien-

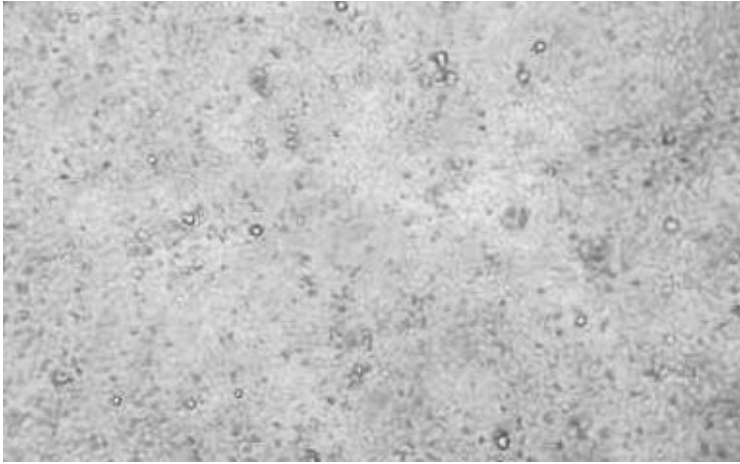


Figura 1A. Control negativo, monocapa normal de las células MDCK.

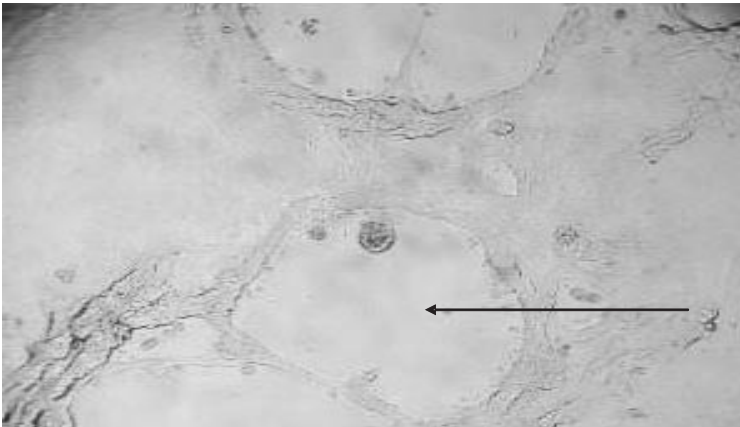


Figura 1B. Cultivo celular MDCK infectado con el virus de la Influenza H1N1 dilución 1:4. Nótese (flecha) el efecto citopático del virus caracterizado por la fusión de la membrana formando sincitios.

do títulos infecciosos hasta de 10^{11} DICC50/ml, siendo la línea MDCK más eficiente en la replicación viral con una diferencia de 2 Log comparada con las células VERO.

Estos resultados, también fueron reportados y sustentados por Govorkova *et al.* y

Merten *et al.*, en 1999 y 1996 respectivamente. Igualmente, Reina *et al.*, en un estudio comparativo utilizaron células de las líneas MDCK, VERO y MRC-5 en pruebas de aislamiento del virus de influenza a partir de muestras de aspirados nasofaríngeos de humanos y encontraron que las células MDCK tenían 100% de sensibilidad com-

parada con un 71,4% de las células VERO y un 57,1% de las MRC-5.

Muestras de campo

Las muestras de los sobrenadantes de los hisopos nasales inoculados en las células MDCK en los 3 pases sucesivos no presentaron efecto citopático cuando se observaron al microscopio invertido.

Estas muestras son adecuadas para el aislamiento del virus de influenza y éste se detecta con relativa facilidad en la fase aguda de la enfermedad, es decir, entre 1-3 días posinfección (Webster *et al.*, 2002, Richt *et al.*, 2003, Heikkinen *et al.*, 2002; Brown, 1999).

La negatividad de las muestras de los hisopos nasales al virus de Influenza porcino, podría atribuirse a que los cerdos no se encontraban en la fase aguda de la influenza, o no fueron tomadas en el momento preciso de la máxima liberación del virus, o que este cuadro clínico pudo ser producido por otros agentes virales o bacterianos presentes en el país como PRRS, *Mycoplasma*, *Pasterella*, *Bordetella*, APP entre otros.

Reacción en cadena de la polimerasa

Sensibilidad de los primers

En el análisis de la RT-PCR de los virus de referencia H1N1 y H3N2 utilizando los primers correspondientes y sus respectivos marcadores de peso molecular de las proteínas M, H y N, se obtuvieron bandas en todas las diluciones del virus, así como en los controles positivos.

La visualización de las bandas correspondientes a las proteínas M, N y H de las diluciones del virus ensayadas, muestran la gran sensibilidad de esta técnica para detectar bajos títulos virales, lo cual asegura la detección de virus en caso de que las muestras seleccionadas en este estudio presenten

baja carga viral. Hecho sustentado en el *Manual de Diagnóstico y Vigilancia de la OMS* (Webster *et al.*, 2002).

De la misma manera, Ellis *et al.* en 1997 probaron la sensibilidad de los primers H1, H3, N1 y N2 para el virus de Influenza A, por medio diluciones seriadas de los virus de referencia y en todas las diluciones visualizaron banda, lo que demuestra que la RT-PCR es un método sensible para detectar pequeñas cantidades de virus, además permite realizar la subtipificación del virus.

Muestras de campo

Todas las muestras de hisopos nasales, lavado broncoalveolar y tejido pulmonar evaluadas dieron resultados negativos cuando se analizaron por la técnica de RT-PCR empleando primers para la proteína M (Figura 2). La sensibilidad de esta técnica, para detectar genoma de virus de influenza ha sido sustentado por varios autores Ellis *et al.*, 1997, Carman *et al.*, 2000, Plakokefalos *et al.*, 2000. Pachucki *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 1991, y Boivin *et al.*, 2001. En un estudio donde se analizaron 1298 muestras de hisopos nasofaríngeos de pacientes humanos con síntomas compatibles con Influenza el 42.4% de las muestras fueron positivas por RT-PCR comparados con 30.9% en cultivos celulares.

Boivin *et al.* en 2001 compararon las técnicas de inmunoensayo, cultivo celular y RT-PCR con muestras de hisopos nasofaríngeos y obtuvieron resultados muy similares entre la RT-PCR y el cultivo celular. Estos hallazgos soportan los resultados obtenidos en este estudio descartándose la posibilidad de infección con virus de influenza en los animales seleccionados en el trabajo.

Chiapponi *et al.* en 2003, realizaron un estudio donde tipificaron los virus de influen-

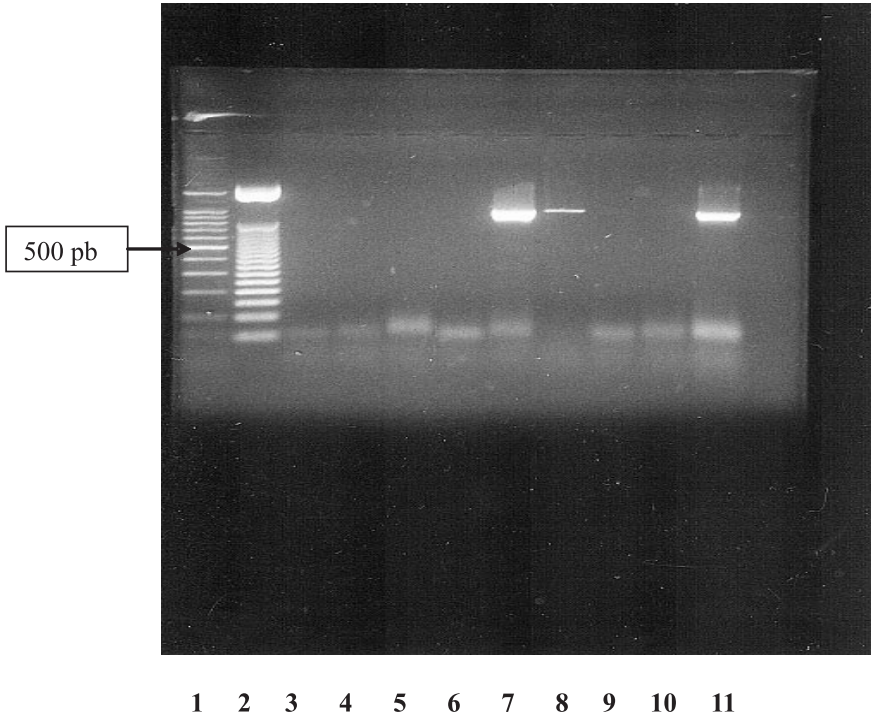


Figura 2. Electroforesis de muestras de campo de hisopos nasales analizadas por la RT-PCR. Línea 1. Patrón de talla molecular de 100pb. Línea 2. Patrón de talla molecular de 50 pb. Línea 3: 4,5,6 y 9 muestras negativas. Línea 7: control positivo. Línea 8: control positivo H1 N1. Línea 10: control negativo (agua DEPC). Línea 11: control positivo H3N2.

za porcina H1N1, H1N2 y H3N2 por medio de la técnica de RT-PCR utilizando 12 cepas de referencia que fueron cultivadas previamente en la línea celular MDCK, las cuales mostraron efecto citopático y a partir de las suspensiones de estos cultivos realizaron la extracción del RNA viral. Los primers utilizados en la RT-PCR, por estos autores, mostraron las proteínas específicas virales y una sensibilidad del 95%, razón por la cual se seleccionaron éstos para la presente investigación.

Con respecto al análisis estadístico, la técnica de cultivo celular y RT-PCR con un intervalo de confianza de 95% demost-

ron una sensibilidad del 100% y especificidad del 100% e índice Kappa de 1. Lo que indica que hay una concordancia muy buena entre las dos técnicas indicando que con RT-PCR se obtienen los mismos resultados que con la prueba de cultivo celular.

Igualmente, Atmar *et al.* en 1996 compararon la técnica de cultivo celular como "Gold Standard" "versus" la RT-PCR y kits comerciales de ELISA para el diagnóstico de Influenza A. Obtuvieron una sensibilidad del 95%, una especificidad del 98% y una eficiencia del 97% con la técnica de RT-PCR. Esta técnica fue la que presentó mejores resultados al compararla con el

aislamiento, lo que permitió aplicar la prueba para el diagnóstico de Influenza A.

Finalmente, a pesar de que en las muestras analizadas no se encontró el virus de la Influenza porcina, se logró la implementación de técnicas para un diagnóstico eficiente y oportuno de la influenza porcina. Teniendo en cuenta, que en Colombia hay evidencias clínicas y serológicas de la enfermedad se requieren confirmar los estudios sobre todo a nivel de granjas porcinas, para aislar y detectar el agente, pues no sólo puede presentar repercusiones económicas a nivel de las explotaciones porcinas, sino también implicaciones en la salud humana.

CONCLUSIONES

La técnica de RT-PCR evaluada para el diagnóstico de la Influenza porcina mostró gran sensibilidad, ya que se detectó banda en todas las diluciones a partir de 1:4 del virus de referencia.

La técnica de RT-PCR para la Proteína M presentó una sensibilidad del 100% y especificidad del 100% comparada con la de cultivo celular como Gold Standard.

El índice de concordancia fue de 1 entre las dos técnicas, esto indica que con RT-PCR se obtienen los mismos resultados que con la prueba de cultivo celular.

Todas las muestras tomadas y analizadas en este estudio, resultaron negativas por medio de las técnicas de RT-PCR y cultivo celular, esto se pudo deber a que no fueron tomadas en la fase aguda de la enfermedad o por infecciones subclínicas.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Colombiano Agropecuario ICA-CEISA, a la Asociación Colombiana de

Porcicultores (ACP) y al Fondo Nacional de la Porcicultura, por hacer posible la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

ATMAR, R.; BAXTER, B. & DOMÍNGUEZ, E. Comparison of reverse transcription PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A Influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996; 34, 2604-2606.

BOIVIN, G.; HARDY, I. & KRESS, A. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001; 39, 730-732.

BROWN, I.; DONE, S.; SPENCER, Y.; COOLEY, W.; HARRIS, P. & ALEXANDER, D. Pathogenicity of a swine Influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Veterinary Record*, 1993; 132, 598-602.

BROWN, I. European experiences with Influenza viruses in pigs. Swine disease conference for swine practitioners. Conference proceeding. 7th annual. *Iowa State University. Ames*, 1999; 311-319.

CARMAN, W.; WALLACE, L.; WALKER, J. Rapid virological surveillance of community influenza infection in general practice. *British Medical Journal*, 2000; 321, 736-737.

CHIAPPONI, C.; FALLACARA, F. & FONI, E. Subtyping of H1N1, H1N2, and H3N2 swine influenza viruses by two multiplex RT-PCR. 4th *International symposium on emerging and re-emerging pig disease*. Roma, 2003; 206-215.

- CHOMZYNSKI, P. & SACCHI N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987; 162, 156-159.
- ELLIS, J.; FLEMING, D. & ZAMBON, M. Multiple reverse transcription-PCR for surveillance of Influenza A and B in England and Wales in 1995 and 1996. *Journal of clinical microbiology*, 1995; 35, 2076-2082.
- GOVORKOVA, E.; KODOHALLI, S.; ALYMOVA, I.; FANGET, B. & WEBSTER, R. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in VERO or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. In: BROWN, R.; ROBERTSON, J.; SCHILD, G. and WOOD, J. Inactivated Influenza Vaccines Prepared in Cell Culture. *Developments in Biological Standardization*, 1999; 98, 39-51.
- HEIKKINEN, T.; MARTILLA, J.; SALMI, A. & RUUSKANEN, O. Nasal Swab versus Nasopharyngeal Aspirate for Isolation of Respiratory Viruses. *Journal Clinical of Microbiology*, 2002; 40 (11), 4337-4339.
- KIDA, H.; ITO, T.; YASUDA, J.; SHIMIZU, Y.; ITAKURA, C.; SHORTRIDGE, K.; KAWAOKA, Y. & WEBSTER, R. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *Journal of General Virology*, 1994; 75, 2183-2188.
- MERTEN, O.; HANNOUN, C.; MANUGUERRA, J.; HANNOUN, C. & WERF, S. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. *Advanced Experimental. Medical Biology*, 1996; 397, 141-151.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. Fifth edition. USA, 2004; 1119 págs.
- PACHUCKI, C.; KHURSHID, A. & NAUROCKI, J. Utility of reverse transcriptase PCR for rapid diagnosis of Influenza A virus infection and detection of amantadine-resistant Influenza A virus isolates. *Journal of clinical microbiology*, 2004; 42, 2796-2798.
- PLAKOKEFALOS, E.; MARKOULATOS, P.; ATENAS, E.; SPYROU, N. & VAMVAKOPOULOS, N. A comparative study of immunocapture ELISA and RT-PCR for screening clinical samples from Southern Greece for human influenza virus types A and B. *Journal Medical Microbiology*, 2000; 49, 1037-1041.
- REINA, J.; FERNÁNDEZ, V.; 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. *Journal Clinical Microbiology*, 1997; 35 (7): 1900-1901.
- RICHT, J.; LAGER K.; JANKE, B.; WOODS, R.; WEBSTER, R. & WEBBY, R. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41, 3198-3205.
- SAMSON, S.; WONG, Y. & YUEN, K. 2. Avian Influenza Virus Infections in Humans. *Chest*, 2006; 12, 156-178.
- WEBSTER, R.; COX, N. & STOR, K. *Who Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*. World Health Organization. Department of communicable disease

surveillance an response. WHO Global Influenza Programme, 2002; 96 págs.

YOUIL, R.; SU, Q.; TONER, T.; SZYMKOWIAK, C.; KWAN, W.; RUBIN, B.; PETRUKHIN, L.; KISELEVA, I.; SHAW, A. & DISTEFANO, D. Comparative study of influenza virus replication in VERO and MDCK cell lines. *Journal of Virological Methods*, 2004; 120, 23-31.

ZHANG W. & EVANS, D. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *Journal Virological Methods*, 1991; 33, 165-189.

Recibido: 29-08-07

Aprobado: 28-02-08