

Establecimiento de la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de la fiebre porcina clásica en México

Establishment of RT-PCR for classical swine fever diagnosis in Mexico

Guadalupe Socci Escatel^a, Fernando Diosdado Vargas^a, Elvira Carrera Salas^a, Martha Macías García^b, Camila Arriaga Díaz^a, Antonio Morilla González^a

RESUMEN

La fiebre porcina clásica (FPC) es una enfermedad que se encuentra de manera endémica en la mayor parte del país, provocando pérdidas económicas importantes para la porcicultura. En México el diagnóstico se efectúa mediante las pruebas de inmunofluorescencia (IF) y aislamiento viral (AV), y en otros países también se utiliza la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La RT-PCR seguida de secuenciación nucleotídica ha sido ampliamente utilizada para la tipificación de un gran número de cepas y aislados del virus de la FPC, así como para estudios epidemiológicos moleculares. Con objeto de contar con otra técnica de diagnóstico en nuestro país, se estableció la RT-PCR y se comparó con IF y AV. Para esto se utilizaron tejidos de tres cerdos inoculados experimentalmente con 10^6 DL₅₀/2ml de la cepa ALD de FPC por vía intramuscular y tres testigos. Por RT-PCR se amplificó un producto de 308 pares de bases (pb) correspondiente a un fragmento del gen que codifica para la glicoproteína E2 (gp55) a partir de órganos de los animales inoculados, mientras que de los órganos de los animales testigo no se observó ninguna amplificación. Los resultados de la RT-PCR concordaron con los obtenidos por IF y AV. Se concluyó que la RT-PCR puede ser utilizada como una prueba complementaria para el diagnóstico de la fiebre porcina clásica debido a su sencillez, rapidez y alta sensibilidad.

PALABRAS CLAVE: Cerdos, Fiebre porcina clásica (FPC), Diagnóstico, RT-PCR.

ABSTRACT

Classical swine fever (CSF) is an endemic disease in most of Mexico and results in large financial loss to the swine industry. Diagnosis is usually done with direct immunofluorescence (IF) and virus isolation (VI), though molecular techniques such as reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) have been used in other countries. RT-PCR followed by nucleotide sequencing has been widely used for genetic typing of CSF virus strains, as well as for molecular epidemiologic studies. To add another CSF diagnostic tool to those already used in Mexico, RT-PCR was established and compared with IF and VI. Tissue samples were taken from various organs of three pigs inoculated with 10^6 DL₅₀/2ml ALD strain of CSF virus, via intramuscular injection, and three non-inoculated pigs were used as controls. A specific 308 bp amplification product, corresponding to an E2 (gp55) gene fragment, was obtained from tissue samples of the inoculated animals, while no amplification was observed with tissue samples from uninfected pigs. The RT-PCR results agreed with those obtained with IF and VI. Because RT-PCR is highly sensitive, easy to perform and provides rapid results, it can be used as a complementary classical swine fever diagnosis test.

KEY WORDS: Pigs, Classical swine fever (CSF), Diagnosis, RT-PCR.

La fiebre porcina clásica (FPC) es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a cerdos de todas las edades y que puede cursar en una forma aguda, subaguda, crónica, atípica o inaparente. El virus

Classical swine fever (CSF) is a highly contagious disease affecting pigs at all ages and which can occur in acute, subacute, chronic, atypical and asymptomatic forms. The virus causing CSF belongs

Recibido el 1 de abril de 2002 y aceptado para su publicación el 24 de julio de 2002.

^a Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-SAGARPA). Carretera México-Toluca km 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa 05110. México, D.F. Tel 52572235 socci@micro.inifap.conacyt.mx

^b Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, Dirección General de Salud Animal (CENASA, DGSA-SAGARPA).

causante de esta enfermedad pertenece al género *Pestivirus*, el cual también incluye al de la diarrea viral bovina (DVB) y al de la enfermedad de la frontera. Estos virus guardan una relación génica muy estrecha, por lo que estructural y antigénicamente son muy parecidos con el virus de la FPC, y al igual que éste pueden infectar a los cerdos⁽¹⁾. La FPC tiene distribución mundial y aunque en muchos países se ha logrado erradicar, en otros como en México es endémica en gran parte del territorio. Por medio de una campaña de control y erradicación basada en la vacunación intensiva y el sacrificio de las pjaras en donde se diagnosticó la enfermedad, se había logrado una reducción importante de la incidencia para 1995. Sin embargo a partir de 1997 reapareció la actividad viral provocando brotes en cerdos de explotaciones de traspatio y de granjas tecnificadas^(2,3). La vacunación masiva que se implementó durante 1994 a 1996 probablemente indujo una selección por cepas virales de baja patogenicidad, por lo que en los últimos años se modificó el cuadro clínico, lo que ha provocado que a la enfermedad se le dé menor importancia, se subdiagnostique o se le atribuya a cepas vacunales que revirtieron a la virulencia, o a otros virus como el PRRS^(4,5). Además el que en ocasiones la enfermedad se presente con signos clínicos vagos, ha hecho que los productores no manden los cerdos al laboratorio, por lo que la frecuencia del diagnóstico de la FPC se ha reducido.

Para el diagnóstico de la FPC la técnica más utilizada es la inmunofluorescencia directa (IF), que detecta el antígeno viral en los tejidos y se corrobora con aislamiento viral (AV) en cultivos celulares o en cerdos susceptibles.

Recientemente en diversos países se han implementado técnicas moleculares como la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para complementar el diagnóstico, debido a su rapidez, alta sensibilidad y a que permite la detección del virus en sangre en forma muy temprana (a los tres días post-infección)⁽⁶⁾, además de servir de base para estudios epidemiológicos moleculares^(7,8,9,10). En México no se ha desarrollado la metodología de tipo molecular para el diagnóstico de la FPC, por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer la técnica de RT-PCR y

to the *Pestivirus* genus, which also includes bovine viral diarrhea (BVD) and border disease. These viruses have a close genetic relationship, are thus both structurally and antigenically very similar to CSF, and as a result can also infect pigs⁽¹⁾. CSF has worldwide distribution, and though some countries have eradicated it, it remains endemic in others, including Mexico.

A significant reduction in CSF had been attained in Mexico by 1995 through an intensive vaccination campaign and killing of herds diagnosed with the disease. By 1997, however, CSF viral activity reappeared, causing outbreaks in both, farm and individually-raised pigs^(2,3). The massive vaccination implemented from 1994 to 1996 likely induced selection for low pathogenic viral strains. As a result, the clinical profile has been modified in recent years which have caused the disease to be considered less important. This results in subdiagnosis or in its attribution to newly virulent viral strains or other viruses, such as PRRS^(4,5). In addition, the fact that the disease occasionally has only vague clinical signs has caused producers to stop sending pigs to laboratories and CSF diagnoses have consequently declined.

The most frequently used CSF diagnosis technique is direct immunofluorescence (IF), which detects the viral antigen in the tissues and is corroborated with viral isolation (VI) in cell cultures or susceptible pigs. Molecular techniques, such as reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), have recently been implemented in a number of countries to complement CSF diagnosis. It has proven to be fast and highly sensitive and allows very early detection of the virus in the blood (three days post-infection)⁽⁶⁾. It also provides a foundation for molecular epidemiological studies^(7,8,9,10). Despite its promise, however, a molecular-type methodology for CSF diagnosis has not yet been established in Mexico. In response, this study focuses on establishing the RT-PCR technique and comparing it to direct immunofluorescence and viral isolation. Use of this technique will provide a complementary and confirming diagnostic technique that can also help to better understand the epidemiology of CSF by serving as a foundation for later CSF viral strain molecular classification studies.

compararla con inmunofluorescencia directa y aislamiento viral. De esta manera se podrá contar con una técnica diagnóstica complementaria y confirmatoria y que además sirva de base para posteriores estudios de clasificación molecular de cepas del virus de FPC, para un mejor conocimiento de su epidemiología.

Para tal propósito se utilizaron seis cerdos de dos meses de edad; tres fueron inoculados con 10^6 DL₅₀/2ml de la cepa ALD de FPC por vía intramuscular y tres se dejaron como testigo. Los animales inoculados desarrollaron fiebre, signos clínicos característicos y cuando murieron, los testigos también se sacrificaron. De todos los cerdos se colectaron muestras de tonsila, bazo, ganglio, riñón y válvula ileocecal, y fueron mantenidas a -70 °C hasta ser analizadas por RT-PCR, inmunofluorescencia directa y aislamiento viral.

Para el desarrollo de la técnica de RT-PCR, se llevó a cabo la extracción del ARN total a partir de los diferentes órganos utilizando el reactivo de Trizol® siguiendo el protocolo descrito por el fabricante⁽¹¹⁾. Para esto, 100 mg de tejido se homogeneizaron con 1 ml de trizol y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una extracción con cloroformo y la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio. Para precipitar el ARN se añadieron 0.5 ml de alcohol isopropílico, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm en una centrifuga refrigerada. El precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75 % y se dejó secar por 10 min, se resuspendió en agua libre de ARNasas, se incubó por 10 min a 60 °C y se congeló a -70 °C hasta su uso. Para la obtención de ADN complementario y la amplificación, se siguió el método descrito por Zamora⁽¹²⁾ con algunas modificaciones. Los oligonucleótidos seleccionados fueron diseñados por Katz *et al.*⁽¹⁵⁾ cuya secuencia es: a) 5'-ATATATGCTCAAGGG CGAGT-3' y b) 5'-ACAGCAGTAGTATCCATTTTCTTTA-3'. Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 308 pares de bases (pb) a partir de una región conservada del virus de la FPC en el gen E2 (gp55). Por otra parte complementan pobremente con la secuencia homóloga del virus de la DVB. En un

A total of six, two-month old pigs were used in this study. Three were given intramuscular inoculation of the ALD strain of CSF (10^6 DL₅₀/2ml), and the other three were used as controls. The inoculated animals developed fever and clinical signs characteristic of CSF. When the inoculated animals died of the disease, the control animals were also killed. Tonsil, spleen, lymph node, kidney and distal part of ileum samples were taken from all experimental animals and stored at -70 °C until subjected to either RT-PCR, IF, or VI.

To carry out the RT-PCR, Trizol® reagent was used to do a total RNA extraction from the different organs, following the procedure described by the manufacturer⁽¹¹⁾. Briefly, 100 mg of tissue was homogenized with 1 ml trizol and incubated at room temperature for 5 min. An extraction was then done with chloroform and the aqueous phase transferred to a clean test tube. To precipitate RNA, 0.5 ml isopropyl alcohol was added, left to incubate for 10 min at room temperature and then centrifuged for 10 min at 10,000 rpm in a refrigerated centrifuge. The resulting precipitate was washed with 1 ml of 75 % ethanol and left to dry for 10 min. It was then resuspended in RNase-free water, incubated for 10 min at 60 °C and frozen at -70 °C until use. Complementary RNA recovery and amplification was done using the method of Zamora⁽¹²⁾, with some modifications. The selected oligonucleotides were designed as per Katz *et al.*⁽¹⁵⁾, with the following sequences: a) 5'-ATATATGCTCAAGGGCGAGT-3' and b) 5'-ACAGCAGTAGTATCCATTTCTTTA-3'. These amplify a 308 base pair (bp) fragment from a region of the CSF virus conserved in the E2 (gp55) gene, though they only poorly complement the homologous sequence in the BVD. The following were placed in a single tube (values in parenthesis are those from the original protocol), with a final volume of 25 μ l: 2.5 mM de MgCl₂ (2.0 mM); 100 μ M of each deoxynucleotide (50 μ M); 5 U of RNase inhibitor; 12.5 U reverse transcriptase; 0.75 U Taq polymerase; 1X reaction buffer; 0.2 μ M of each oligonucleotide; and 0.5 μ l target RNA (2 μ l). This mix was submitted to a single cycle at 48 °C 30 min and at 95 °C 10 min, followed by 35 cycles at 94 °C 15 sec, 58 °C 30 sec and 72 °C 30 sec and one cycle at 72 °C 7 min. RNA extracted

solo tubo se adicionaron 2.5 mM de MgCl₂ (2.0 mM), 100 μM de cada desoxinucleótido (50 μM), 5 U de inhibidor de ARNasas, 12.5 U de transcriptasa reversa, 0.75 U de Taq polimerasa, 1X de Buffer de reacción, 0.2 μM de cada uno de los oligonucleótidos y 0.5 μl de ARN blanco (2 μl), en un volumen final de 25 μl (Los valores que se presentan entre paréntesis son los indicados en el protocolo original). La mezcla se sometió a un ciclo de 48 °C 30 min y 95 °C 10 min, 35 ciclos a 94 °C 15 seg, 58 °C 30 seg y 72 °C 30 seg, y un ciclo a 72 °C 7 min. Como control positivo se empleó ARN extraído de la cepa ALD del virus de FPC y como negativo agua libre de ARNasas. Ocho μl de cada producto de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA (TAE) conteniendo bromuro de etidio. Para determinar la sensibilidad de la técnica se realizaron diluciones décuples a partir de la cepa de desafío (10⁶ DL₅₀/2ml) desde 10⁵DL₅₀/2ml hasta 10¹DL₅₀/2ml, y de cada una se tomaron alícuotas de 400 y 200 μl. De cada alícuota se realizó la extracción del ARN total como se describió arriba y se ensayó la amplificación a partir de 0.5 μl de ARN total.

La técnica de inmunofluorescencia directa se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Coba y Correa⁽¹³⁾. A partir de tonsila, bazo, ganglio, riñón y válvula ileocecal procedentes de los tres animales inoculados y de los tres sin inocular, se realizaron cortes en crióstato, que se fijaron a portaobjetos con acetona fría por 20 min, se incubaron con un conjugado específico durante 30 min, se lavaron y se observaron con un microscopio de luz UV.

Para el aislamiento viral, los órganos se maceraron, se filtraron a través de un filtro millipore de 0.45 μm y se inocularon a monoestratos de células ST. La infección celular por el virus de FPC se detectó mediante la técnica de inmunoperoxidasa⁽¹⁴⁾

En total se examinaron 30 muestras por RT-PCR de bazo, riñón, ganglio, tonsila y válvula ileocecal. En un primer ensayo se amplificó el producto esperado de 308 pb, a partir de la cepa de referencia ALD (Figura 1, carril 11), usada como control positivo y de la mayoría de las muestras de los cerdos infectados. Sin embargo, en algunos casos

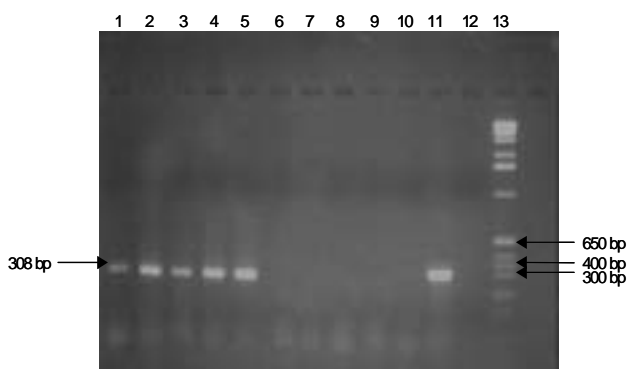
from an ALD strain of CSF was used as a positive control and RNase-free water as a negative control. A total of 8 μl of each amplification product were analyzed by electrophoresis in 1.5 % agarose gel in Tri-acetate-EDTA (TAE) buffer solution containing ethidium bromide. To determine technique sensitivity, decuple dilutions were done, beginning with the challenge strain (10⁶ DL₅₀/2ml), from 10⁵DL₅₀/2ml to 10¹DL₅₀/2ml, with 400 and 200 μl aliquots taken from each. A total RNA extraction, as described above, was done on each aliquot and the amplification tested from 0.5 μl total RNA.

The immunofluorescence technique was done following the procedure of Coba and Correa⁽¹³⁾. Cryostatic cuts were made of the tonsils, spleens, lymph nodes, kidneys and distal parts of ileum collected from the inoculated and control animals. These were fixed on slides with cold acetone for 20 min, incubated with a specific conjugate for 30 min, washed and then observed with a UV light microscope.

Viral isolation was done by macerating the organ samples, filtering them through a 0.45 μm millipore and inoculating them in ST cell monolayers. CSF cell infection was detected using the immunoperoxidase technique⁽¹⁴⁾.

Figura 1. Resultados obtenidos por medio de la RT-PCR a partir de diferentes órganos

Figure 1. RT-PCR results from different pig organs



Rows 1 to 5: samples from pigs inoculated with ALD strain of CSF virus (1 spleen, 2 lymph node, 3 tonsil, 4 kidney, 5 distal part of ileum). Rows 6 to 10: samples from non-inoculated pigs (6, spleen, 7 lymph node, 8 tonsil, 9 kidney, 10 distal part of ileum). Row 11 is the (+) control ALD strain; 12 is (-) control, and 13 is the size marker.

fue necesario realizar diluciones dobles del ARN total previo a la reacción de amplificación. En esas muestras, el producto de amplificación esperado se obtuvo en un rango de dilución desde 1:8 hasta 1:64. En ninguna de las muestras provenientes de animales sin inocular hubo amplificación de algún tipo de producto (Figura 1 carriles 6-10). En el ensayo de sensibilidad se pudo obtener un producto de amplificación visible hasta la muestra extraída a partir de 200 μ l de la dilución 10^3 DL₅₀/2ml. Por lo que en las condiciones establecidas, la técnica de RT-PCR fue capaz de detectar hasta 2 DL₅₀ de la cepa ALD del virus del desafío (Figura 2 carril 4). En todas las muestras de órganos de los animales inoculados se pudo detectar también el virus por inmunofluorescencia directa y aislamiento viral.

Los resultados indicaron que la RT-PCR fue comparable a la inmunofluorescencia directa y al aislamiento viral en la detección del virus a partir de muestras de cerdos inoculados experimentalmente con la cepa oficial de desafío. La técnica permitió detectar de una manera rápida (6 a 8 h) y sencilla, el ARN viral a partir de diferentes órganos, por lo que puede ser utilizada como una prueba confirmatoria para el diagnóstico de la FPC debido a su alta sensibilidad y a que se ha descrito que es específica para el virus de la FPC⁽¹⁵⁾. Esto ha permitido utilizarla junto con otras técnicas de detección de antígenos virales en los programas de erradicación de la fiebre porcina clásica⁽¹⁶⁾. La utilización de esta prueba en México permitirá realizar un diagnóstico más rápido y preciso de la FPC, lo que contribuirá a un mejor control de la enfermedad. En un estudio posterior se continuará con la validación de la técnica utilizando muestras de campo y comparando los resultados con los de las pruebas oficiales, con el propósito de que pueda ser incluida en la Norma Oficial Mexicana. Así mismo, esta técnica servirá de base para estudios futuros sobre clasificación y diferenciación molecular entre cepas y aislados del virus de la FPC.

AGRADECIMIENTOS

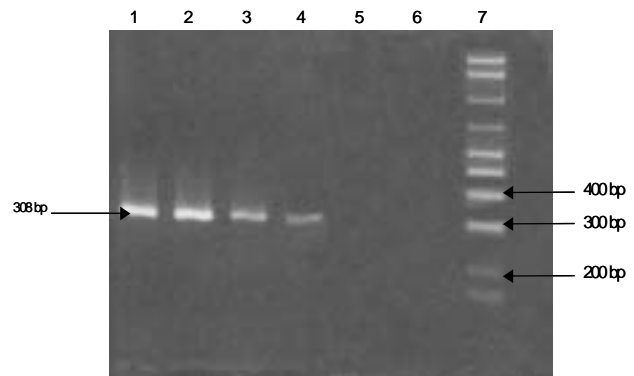
Se agradece a la Fundación Guanajuato Produce A.C. por el financiamiento otorgado a este trabajo

A total of 30 tonsil, spleen, kidney, lymph node and distal part of ileum samples were examined using RT-PCR. In a preliminary assay the expected 308 bp product from the majority of the infected pig samples was amplified from the ALD reference strain (Figure 1, Row 11). In some cases, however, it was necessary to do additional dilutions of the total RNA before the amplification reaction. The expected amplification product was obtained from these samples in a dilution range between 1:8 and 1:64. No amplification of any product occurred in any of the samples from the control animals (Figure 1, rows 6-10). A visible amplification product was obtained in the sensitivity trial up to the sample extracted from 200 μ l of the 10^3 DL₅₀/2ml dilution. Given this, the RT-PCR technique was able to detect up to 2 LD₅₀ of the challenge virus strain (ALD) under the conditions established in this trial (Figure 2, row 4). The virus was also detected with direct immunofluorescence and viral isolation in the inoculated animals.

The results indicate that RT-PCR is able to detect the official CSF challenge virus in samples from experimentally inoculated animals at an accuracy comparable to direct immunofluorescence and viral isolation. The RT-PCR technique resulted in rapid (6 to 8 h) and simple detection of viral RNA from

Figura 2. Sensibilidad del RT-PCR para la detección de la cepa ALD del virus de la FPC

Figure 2. RT-PCR sensitivity in detection of ALD strain of CSF virus



Rows 1 to 6: 2000, 200, 20, 2, 0.2 and 0.02 LD₅₀, respectively; Row 7: size marker.

y a la Dra. Luvia Enid Sánchez Torres por la revisión del manuscrito.

Este trabajo es parte de la tesis de maestría del primer autor.

LITERATURA CITADA

1. Van Oirschot JT. Hog Cholera. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ editors. *Diseases of Swine*. 7th ed. Iowa, USA: Iowa State University;1992:274-292.
2. Estrada SE, Diosdado VF, Arriaga RE, Avila SE, Hernández CA, Morilla GA. Evaluación de algunos factores que pudieron influir en el incremento de la fiebre porcina clásica en el Estado de México, México, durante 1997. *Vet Méx* 2001;32(1):47-53.
3. Morilla GA, Estrada SE, Diosdado VF. Factores de riesgo que han contribuido a la difusión del virus de la fiebre porcina clásica en México. En: Morilla GA editor. *La fiebre porcina clásica en las Américas*. México, DF: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Fundación Produce Puebla, 2000:207-218.
4. Kamijo Y, Ohkuma SI, Shimizu M, Shimizu Y. Differences in pathogenicity and antigenicity among hog cholera virus strains. *Natl Inst Anim Health Q* 1977;17:133-140.
5. Morilla GA. El control de la fiebre porcina clásica por medio de la vacunación. En: Morilla GA editor. *La fiebre porcina clásica en las Américas*. México, DF: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Fundación Produce Puebla, 2000:289-300.
6. Romero L, Gómez T, Arias M, Montserrat A, Sánchez-Vizcaíno JM. Diagnóstico laboratorial de la peste porcina clásica. *Porci Aula Vet* 1998;47:51-67.
7. Lowings JP, Paton DJ, Sands JJ, De Mía GM, Rutili D. Classical swine fever: genetic detection and analysis of differences between virus isolates. *J Gen Virol* 1994;75:3461-3468.
8. Hofmann MA, Brechtbuhl K, Stauber N. Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch Virol* 1994;139:217-229.
9. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ. Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 1994;136:309-323.
10. Díaz de Arce H, Núñez JI, Ganges L, Barreras M, Frías MT, Sobrino F. Molecular epidemiology of classical swine fever in Cuba. *Virus Res* 1999;64:61-67.
11. Chomczynski PY, Sacci N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
12. Zamora ME. Detección de peste porcina clásica por PCR. En: *Curso de aplicaciones de la biotecnología al diagnóstico y*

different organs. Because of its sensitivity, and its specificity for the CSF virus, as has been described, it can be used as a confirmatory test for CSF diagnosis⁽¹⁵⁾. This has allowed its use together with other viral antigen detection techniques in CSF eradication programs⁽¹⁶⁾. It will also help in more rapidly and precisely diagnosing CSF in Mexico and thus will contribute to improved disease control. Future studies will continue validating the technique using field samples and comparing the results to the official trials with the goal of including this technique in the Official Mexican Regulations (Norma Oficial Mexicana). The use of this technique will also serve as a foundation for future studies of classification and molecular differentiation among CSF strains and isolates.

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks to the Fundación Guanajuato Produce A.C. for financial support of this study, and to Luvia Enid Sánchez-Torres for reviewing the manuscript. This study forms part of the Masters thesis of GSE.

End of english version

-
-
- erradicación de enfermedades en animales. Agencia Española de Cooperación Internacional. Centro Iberoamericana de Formación. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, 1999.
 13. Coba AMA, Correa GP. Diagnóstico de fiebre porcina clásica (FPC) por la técnica directa de inmunofluorescencia. México, DF: CENID-Microbiología, INIFAP;1993.
 14. Macías GM, Guerrero JA, Miranda SA, González SC, Delgadillo AJ. Aislamiento del virus de la fiebre porcina clásica en microplacas, evidenciado por inmunoperoxidasa. En: Morilla GA editor. *La fiebre porcina clásica en las Américas*. México, DF: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Fundación Produce Puebla, 2000:353-356.
 15. Katz JB, Ridpath JF, Bolin SR. Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhoea and border disease virus by using a cDNA nested-amplification approach. *J Clin Microbiol* 1993;31:565-568.
 16. Arias M. La serología en el control y erradicación de enfermedades. ANAPORC: Trabajo seleccionado. Disponible en: <http://www.revista-anaporc.com/serol.htm>