

2  
29

01685



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FISIOPATOLOGIA DEL PARAMIXOVIRUS DEL  
OJO AZUL DEL CERDO A NIVEL TESTICULAR

T E S I S

que para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS  
(Patología Animal)  
presenta

HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA

Asesor: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

6366



México, D. F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

| <b>Temas</b>                                       | <b>Páginas</b> |
|----------------------------------------------------|----------------|
| <b>Resumen</b>                                     | 1              |
| <b>Abstract</b>                                    | 2              |
| <b>Introducción</b>                                | 4              |
| <b>Antecedentes</b>                                |                |
| Etiología                                          | 5              |
| Estructura del virus                               | 7              |
| Aspectos generales de la inmunidad frente al virus | 9              |
| Características de la respuesta inmune del cerdo   | 11             |
| Especies susceptibles                              | 13             |
| Epidemiología                                      | 14             |
| Semiología                                         | 15             |
| Lesiones                                           | 16             |
| Fallas reproductivas ocasionadas por otros virus.  | 17             |
| Espermatogénesis                                   | 18             |
| <b>Hipótesis</b>                                   | 20             |
| <b>Objetivo</b>                                    | 20             |
| <b>Material y Métodos</b>                          |                |
| <b>I. Aislamiento y caracterización del virus</b>  |                |
| a) Efecto citopático                               | 21             |
| b) Hemaglutinación                                 | 22             |
| c) Hemadsorción                                    | 22             |
| d) Inmunofluorescencia                             | 23             |
| e) Purificación viral                              | 23             |
| f) Microscopía electrónica                         | 24             |
| g) Inoculación de embriones                        | 24             |
| h) Inoculación de los lechones                     | 24             |

## **II. Infección experimental de los verracos**

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| 1. Signos clínicos                         | 26 |
| 2. Medición de la Dimensiones testiculares | 26 |
| 3. Espermatobioscopías                     | 26 |
| 4. Hematología                             | 27 |
| 5. Serología                               | 27 |
| 6. Inmunotransferencias                    | 29 |
| 7. Respuesta proliferativa                 | 30 |
| 8. Citometría de flujo                     | 30 |
| 9. Necropsia                               | 31 |
| 10. Aislamiento viral                      | 31 |
| 11. Histopatología                         | 32 |
| 12. Microscopía electrónica                | 32 |
| 13. Radioinmunoanálisis                    | 32 |

## **Resultados**

### **I. Aislamiento y caracterización del virus**

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| a) Efecto citopático           | 34 |
| b) Hemaglutinación             | 34 |
| c) Hemadsorción                | 35 |
| d) Inmunofluorescencia         | 35 |
| e) Purificación viral          | 35 |
| f) Microscopía electrónica     | 37 |
| g) Inoculación de embriones    | 38 |
| h) Inoculación de los lechones | 38 |

## **II. Infección experimental de los verracos**

|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| 1. Signos clínicos                         | 39         |
| 2. Medición de la Dimensiones testiculares | 39         |
| 3. Espermatobioscopías                     | 42         |
| 4. Hematología                             | 43         |
| 5. Serología                               | 46         |
| 6. Inmunotransferencias                    | 48         |
| 7. Respuesta proliferativa                 | 49         |
| 8. Citometría de flujo                     | 51         |
| 9. Necropsia                               | 53         |
| 10. Aislamientos virales                   | 55         |
| 11. Histopatología                         | 56         |
| 12. Microscopía electrónica                | 63         |
| 13. Radioinmunoanálisis                    | 69         |
| <b>Discusión</b>                           | <b>80</b>  |
| <b>Conclusiones</b>                        | <b>95</b>  |
| <b>Referencias</b>                         | <b>98</b>  |
| <b>Publicación</b>                         | <b>108</b> |

A mis progenitores *José e Imelda*. Por enseñarme que la función de ser padres es hasta el último momento de la vida.

A mi esposa *Teresita del Niño Jesús*. Por ser la compañera en los momentos mas difíciles y agradables.

A mis hijos *Ricardo Humberto y Georgina*. Por ser los mejores maestros que he tenido.

## **Agradecimientos.**

To Dr. Joe Kresse. You are a great pearson. Thank you for help me.

Al Dr. Edgar Zenteno. Por ser asesor, camarada, maestro y verdugo.

Al Dr. Pablo Hernández Jauregui. Por su apoyo incondicional para la elaboración de este trabajo de investigación. Mil gracias.

Al Biólogo Joaquín Herrera. Gracias por su valiosa ayuda

Al Dr. Alberto Stephano H. Por su amistad. Gracias.

Al Dr. Hector Castillo J. y Ángeles Mendoza. Es impresionante que nuestra amistad perdure a pesar del tiempo y la distancia.

Al Dr. Jesús Hernández L. Como compañero y amigo en el vía crucis de la investigación.

Al Dr. Antonio Porras A. Otro gran compañero y amigo del posgrado

A los Drs. Jorge López, Roberto Martínez, Marco A. Herradora, y Elda Jiménez. Porque siempre han confiado en mí.

A los Drs. Francisco Trigo T., Juan Montaña H., Fernando Constantino C., Javier Valencia, Julio Reyes L., Edgar Zenteno G. y Jorge Moreno L. Miembros del comité tutorial. Sus comentarios fueron valiosos y se encuentran plasmados en este documento. Gracias.

A mi excelente equipo de trabajo. Carmen Mercado y Rosalba Carreón. Aunque el destino nos alcance seguiremos juntos.

A mis ex-compañeros del INIFAP. Francisco Morales, Guadalupe Espino<sup>†</sup>, Hector Sanchez-Mejorada, Dante González, Germán Valero, Juan Monroy, Orlando Zepeda, Francisco Rosales, Juan Rentería, Julian Armada, René Marquez, Francisco Aguilar, Laura Jaramillo. Ana Ma. Anaya, Ma. Antonieta Coba. Gracias por su amistad.

A mis compañeros de trabajo del DPA: Cerdos. Mario Haro, Ma. Elena Trujillo, Esperanza Galvan, Pedro Pradal, Martha Soto, German Borbolla, Jesús Rodríguez<sup>†</sup>, Gerardo Ramírez, Alejandra Mercadillo, Roxana Mendoza, Susana Espinosa, Lucia Ruíz, Rosalinda Rodríguez, Martha Contreras, Rosa Elena Miranda, Alejandro Leguizano, Román Vasquez. Gracias por apoyarme.

## RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES.

Este trabajo se realizó en las siguientes instituciones:

Departamento de Producción Animal: Cerdos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. D.F.

Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Puebla, Pue.

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. D.F.

Departamento de Investigación en Bioquímica. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Secretaría de Salud. Tlalpan D.F.

Esta tesis contó con el apoyo financiero de:

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica. Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. D.F. Proyecto número IN 209295.

Fondo para el Fomento a la Investigación. Instituto Mexicano del Seguro Social. Proyecto número FP-0038/67.

Programa de Cooperación Científica Internacional de la Unión Europea. Contrato número CII\*-CT93-0045.

El autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.



# RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El autor agradece a las siguientes instituciones:

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Pue.  
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, D.F.

Departamento de Biología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, D.F.

Departamento de Investigación en Biología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Secretaría de Salud, Tlalpan, D.F.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, D.F. Proyecto número IN 209202.

Esta tesis contó con el apoyo financiero de:

Fondo para el Fomento a la Investigación, Instituto Mexicano del Seguro Social, Proyecto número IP-003867.

Programa de Cooperación Científica Internacional de la Unión Europea, Contrato número CIP-CT93-0043.

El autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## Resumen

La enfermedad del ojo azul en el cerdo fue diagnosticada en México por primera vez en 1980. Es causada por un rubulavirus de la familia *Paramyxoviridae*. Esta enfermedad provoca problemas reproductivos en cerdas y verracos, signos nerviosos en lechones y opacidad corneal en cerdos de cualquier edad. La patogenia de este virus en el tracto genital del verraco no había sido investigada anteriormente. Se tuvieron dos grupos experimentales de cinco animales de nueve meses de edad cada uno de ellos. En el primer grupo se sacrificaron cuatro animales a los 5, 15, 30 y 45 días de infección; en el segundo grupo se sacrificaron dos animales en el día 70 y dos más en el día 80 de infección. En ambos grupos se tuvo un animal testigo. En la mayoría de los animales se observó aumento de tamaño testicular alrededor del día 15 de infección. En un verraco se detectó reducción de la motilidad y de la concentración espermática e incremento de anomalías en el eyaculado a partir del día 21 de infección. A la necropsia se observaron nódulos en la cabeza del epidídimo en la mayoría de los animales a partir del día 15 de infección. En dos animales se observó a los 30 y 80 días, atrofia del testículo derecho. A la histopatología se observaron alteraciones en el epidídimo, granulomas espermáticos y degeneración vacuolar. En el epitelio pseudoestratificado de epidídimo las lesiones fueron asociadas con infiltración de células inflamatorias mononucleares y fibroplasia intersticial. Los verracos no manifestaron otros signos de enfermedad, tampoco perdieron la libido durante todo el periodo experimental. Estos resultados indican que el virus de la enfermedad del ojo azul induce la generación de severas lesiones en epidídimo y testículo en verracos y altera la calidad del semen sin que se observe modificación de la libido. Se identificaron niveles de anticuerpos en los animales infectados a través de la inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización. Los anticuerpos se generaron contra las proteínas HN, M y P. Existió inmunodominancia por la proteína HN. Los monocitos de los cerdos infectados proliferaron *in vitro* ante la estimulación del virus. Se obtuvo mejor respuesta en la quinta semana de infección. El virus indujo la expresión de los linfocitos CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. Se evaluaron los niveles plasmáticos de androstendiona, testosterona y 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona, los valores de estas hormonas no se modificaron durante el experimento.

## Abstract

Blue eye disease of pigs in Mexico is caused by porcine rubulavirus and characterized by infertility in sows and boars, nervous signs in young pigs, and corneal opacity in pigs of all ages. The pathogenesis of reproductive tract lesions in rubulavirus-infected boars has not previously been investigated. In a first experiment, four 9-month-old boars were inoculated with porcine rubulavirus and killed 5, 15, 30 or 45 days post inoculation (pi). In a second experiment, four similar boars were inoculated with same virus and two animals were killed on each of days 70 and 80 pi. Swelling of the head of the epididymis developed in all inoculated boars at approximately day 15 pi. Reduced spermatozoan motility and concentration were detected in semen samples collected from one boar from day 21 pi. At post-mortem examination, nodules were seen in the head of the epididymis of the boars killed 15, 30 or 45 days pi and the right testis of the pig killed 30 days pi was atrophic. Corresponding histopatological epididymal alterations included formation of spermatic granulomas and vacuolar degeneration of ductular epithelium. These lesions were associated with mononuclear cell infiltration and interstitial fibroplasia. Degeneration of seminiferous tubules and interstitial mononuclear cell infiltration were seen in the atrophic testis of the pig killed 30 days pi. There was fibrosis of the head of the epididymis in all boars killed 70 or 80 days pi and one of this animals also had right testicular atrophy associated with degeneration of seminiferous tubules, lymphocytic infiltration and giant cell formation. Porcine rubulavirus antigen was detected by immunofluorescence labeling in the head of the epididymis of pigs killed 15, 30 or 45 days pi and in one animal killed on day 70 pi. This results indicate that porcine rubulavirus can cause severe epididymo-orchitis and reduced semen quality in sexually mature boars. High titers virus neutralizing and hemagglutinating inhibitory antibodies were identified in infected animals. The antibody specificity was directed towards HN, M, and NP proteins and immunodominance to HN proteins was demonstrated. Peripheral blood mononuclear cells from infected, but not from non-infected pigs proliferated *in vitro* in response to virus-antigen stimuli, showing a bell shaped plot with the highest peak at 5 week postinfection. Virus induced lymphoblasts

expressed CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> phenotype. Plasma androstendione, testosterone and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone hormone levels after virus injection were evaluated. Hormones values revealed no modification during this time. The libido of the boars were normal.

## **Introducción.**

La enfermedad del ojo azul (EOA) constituye un padecimiento de los cerdos, fue descubierta en México en 1980 (Stephano *et al.*, 1981; Stephano *et al.*, 1988a). Este padecimiento es uno de las más graves en el centro del país, en la actualidad provoca fuertes estragos. Este padecimiento es de origen viral y afecta a cerdos de diferentes edades. La EOA causa encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea. Los signos dependen de la edad del animal (Stephano *et al.*, 1985a).

Las primeras descripciones de la enfermedad se refieren a casos que se presentaron en la Piedad, Michoacán, en el año de 1980. En ese momento se observaron brotes de encefalitis y opacidad de la córnea en lechones. El cuadro nervioso presentó características clínico patológicas diferentes a los cuadros de encefalitis previamente descritos en México (Moreno *et al.*, 1986; Stephano *et al.*, 1988a).

La enfermedad ha sido diagnosticada únicamente en México, la zona más afectada es el centro del país, esta última comprende los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato. Además se ha diagnosticado en los estados de México, Querétaro, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla. En Yucatán se tomaron muestras serológicas de cerdos sacrificados en el rastro, procedentes del centro del país, varias de estas muestras resultaron positivas a través de la técnica de la inhibición de la hemaglutinación (Fuentes *et al.*, 1992; Stephano *et al.*, 1988a). Últimamente se han encontrado evidencias serológicas en otros estados, sin que la información sea concluyente. Aunque la enfermedad es autolimitante (en granjas cerradas y con manejo adecuado), hay gran cantidad de granjas en que se padece de manera continua.

## **Antecedentes.**

### **Etiología.**

Desde 1981 Stephano asoció la enfermedad con un virus hemaglutinante (Stephano *et al.*, 1981). Debido a la dificultad inicial de reproducir los signos en animales, aquél denominó al problema como síndrome del ojo azul. Al tener certeza de que la enfermedad era generada por un paramixovirus porcino, denominó la infección como EOA.

En estudios serológicos, Stephano observó que el aislamiento no estaba relacionado con los siguientes virus: Sendai, Newcastle, PMV2, PMV3, PMV4, PMV6 y PMV7. Tampoco estaba relacionado con los virus de parainfluenza 1, 2, 3, 4 y 5. No existió reacción entre sueros hiperinmunes contra el paramixovirus porcino y el coronavirus de la encefalitis hemaglutinante. En animales que mostraron signos de la enfermedad se realizaron estudios de inmunofluorescencia. Los resultados fueron negativos cuando se usaron conjugados contra gastroenteritis transmisible, parainfluenza-3, coronavirus bovino, virus respiratorio sincitial, seudorrabia y encefalitis hemaglutinante (Stephano *et al.*, 1985c; Stephano *et al.*, 1986b).

En 1986 Moreno *et al.*, caracterizaron el virus aislado por Martínez *et al.*, 1985. Lo denominaron virus LPM (La Piedad, Michoacán). Al estudiar sueros hiperinmunes contra algunos otros paramixovirus (virus de parainfluenza humana tipos 1, 2 y 3, virus de las paperas, virus del sarampión, el virus respiratorio sincitial y virus de la enfermedad de Newcastle), éstos no reaccionaron con el virus LPM en pruebas de seroneutralización, fijación del complemento, inmunodifusión e inhibición de la hemaglutinación (Moreno *et al.*, 1986).

El patrón de electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas del virus LPM, fue comparado con los virus de la parainfluenza-3, cepa U-23 y el virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Montana. Se encontró similitud del virus LPM con ambos virus de la familia *Paramyxoviridae* (Moreno *et al.*, 1986).

El virus muestra poca especificidad de huésped *in vitro*. Se puede replicar en embrión de pollo y en las siguientes líneas celulares: PK-15 (riñón de cerdo), ST (testículos de cerdo), VERO (riñón de mono verde africano), riñón de gato, embrión bovino, BHK (riñón de hámster lactante) y dermis equina, así como en cultivos primarios de riñón de cerdo y de tiroides de bovino. En todas estas células causa cambios citopáticos (Stephano, 1986b). Otros autores han encontrado que también causa efecto citopático en los siguientes tipos celulares: células de plexo coroideo porcino, cornete de cerdo, BT (cornete de bovino), MDBK (riñón de bovino), testículo de bovino, plexo coroideo de bovino, células GMK de origen primate, pulmón de visón. se han observado cuerpos de inclusión citoplásmicos en la línea celular PK-15 (Moreno *et al.* 1986).

El virus puede multiplicarse en líneas celulares homólogas y heterólogas. El título no se ve afectado si estas células son de alto o bajo pasaje (Flores *et al.*, 1992).

La hemaglutinación se ha presentado con eritrocitos de ave, cobayo, ratón, rata, conejo, hámster, caballo, cerdo, cabra, gato y perro. Este fenómeno también se ha presentado con eritrocitos de humanos de los grupo (A, AB, B y O). La elución se presenta a los 30-60 minutos a 37°C. La hemadsorción se ha hecho con eritrocitos de ave en células PK-15 (Stephano 1985c; Stephano 1986b; Stephano 1986c).

En una investigación se realizaron hemaglutinaciones en donde se confrontó al virus con eritrocitos de diferentes especies. Las aglutinaciones con eritrocitos de bovino y equino tuvieron títulos inferiores a los realizados con eritrocitos de ave. Pero la reacción con los eritrocitos de estos mamíferos fue más estable debido a que se conservó durante 24 h a 4° y 25° C. Al utilizar los glóbulos rojos de conejo siempre se observó aglutinación sin que se definiera la sedimentación. Con los eritrocitos tipo B de humano, perro y cobayo no se pudo diferenciar con claridad entre hemaglutinación y sedimentación. Se presentó confusión entre ambos fenómenos (Ramírez *et al.*, 1996). Las conclusiones a las que llegaron los autores para la prueba de inhibición de la hemaglutinación fueron las siguientes: usar eritrocitos de bovino al 0.5% con 8 UHA de virus proveniente de cultivos celulares y la prueba debe llevarse a cabo a una temperatura no superior a los 25° C

El virus se inactiva con éter, cloroformo, formalina y beta propiolactona. La formalina inactiva su multiplicación y sus propiedades hemaglutinantes. El virus también se inactiva a 56° C durante 4 h (Stephano *et al.*, 1985c).

### **Estructura del virus.**

El virión de este paramixovirus porcino está constituido por seis proteínas: la hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), fosfoproteína (P), nucleoproteína (NP), una proteína de matriz (M) y una proteína de alto peso molecular (L) (Sundvist *et al.*, 1990).

Las proteínas L, NP y P junto con el ARN viral forman la nucleocápside de los paramixovirus. La proteína P forma un complejo con la proteína L en la replicación de ARN viral. Al parecer la proteína NP sólo posee función estructural (Ray *et al.*, 1990).

La proteína M de los paramixovirus se encuentra en la parte interna de la envoltura viral, la función principal consiste en organizar a la nucleocápside en las zonas de la membrana celular donde abundan las glicoproteínas virales, también se le implica en la regulación de la síntesis del ARN (Morrison *et al.*, 1988). En el virus del sarampión, la proteína M está relacionada con la inducción del daño a la membrana celular de neuronas y en la presentación de encefalitis esclerosante subaguda (Ray *et al.*, 1990).

La proteína M del virus del ojo azul es rica en aminoácidos básicos, lo que confiere una carga neta positiva que puede ser importante en su interacción con otros componentes virales y celulares durante el ensamblaje del virión (Berg *et al.*, 1991).

La proteína HN de los paramixovirus forma parte de la envoltura viral y se ha implicado en el reconocimiento y enlace con gran afinidad a estructuras celulares que contienen ácido siálico. Las proteínas HN forman dímeros y tetrámeros unidos por puentes disulfuro, estos últimos se observan como proyecciones en la superficie del virión. Estos complejos presentan un grupo de sitios de adhesión a los receptores celulares que incrementan la probabilidad de interacción. El análisis de las secuencias nucleotídicas ha demostrado que la proteína HN es constante entre los diferentes paramixovirus (Morrison, 1988; Zenteno *et al.*, 1998). La proteína HN presenta también



un dominio con capacidad para eliminar los residuos de ácido siálico (neuraminidasa) de los receptores celulares, al parecer la eliminación de estos residuos permite un mayor acercamiento con estructuras celulares que actúan como receptores secundarios (Huang 1980b). Recientemente se ha propuesto que existe gran homología en aminoácidos funcionales entre la proteína HN de los paramixovirus con la neuraminidasa del virus de la influenza tipo A (Colman *et al.*, 1993). Así mismo, la proteína HN del virus de la EOA conserva gran homología en la secuencia de aminoácidos de sus dominios funcionales con otros paramixovirus (Sundvist *et al.*, 1990; Sundvist *et al.*, 1992). La glicoproteína F de los paramixovirus realiza funciones esenciales en la penetración de la célula. A esto se debe a que logra la fusión de la envoltura viral a la porción externa de la membrana celular. También es expresada sobre la superficie de la célula vecina no infectada, en donde produce la formación de sincitios. La proteína F se sintetiza en forma de dos precursores (F1 y F2) unidos por un puente disulfuro para formar un heterodímero con actividad biológica (Kingsbury, 1990).

El análisis de los genes para las proteínas HN (Sundqvist 1992), M (Berg *et al.* 1991) y P (Berg *et al.* 1992) ha mostrado la estrecha relación existente entre el virus LPM y los virus de la parotiditis humana (MuV), virus símico 5 (SV5), parainfluenza-2 y parainfluenza-4. Se encontró alrededor de 40% de homología en secuencia de aminoácidos con estos virus; así mismo, existió 30% de homología con los virus Sendai (SV), PI-1, PI-3 bovino y el que provoca la enfermedad de Newcastle (NDV). Al parecer, la relación genética del virus de la EOA con los virus de los géneros Morbillivirus (virus del sarampión, MV) y Pneumovirus (virus sincitial respiratorio) es escasa (Linne *et al.*, 1992).

La proteína P del virus de la EOA está involucrada en la replicación viral, sufre un proceso postranscripcional similar al ocurrido con el virus de la parotiditis humana. Este proceso conduce a la expresión diferencial de proteínas P, V o C (Berg *et al.*, 1992).

Con base en los datos acumulados, el virus de la EOA ha sido clasificado como nuevo miembro de la familia *Paramyxoviridae*. Se ha propuesto recientemente que el virus de la EOA sea clasificado junto con el virus SV5, parotiditis humana, PI-2 y PI-4 como un nuevo género de esta familia, llamado Rubulavirus.

La nueva clasificación es la siguiente: orden Mononegavirales, familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxoviridae, genero Rubulavirus, especie rubulavirus porcino (Murphy *et al.*, 1995).

Es evidente que la presencia de receptores celulares constituye un factor determinante en la susceptibilidad a una infección viral, sin embargo existen otros mecanismos que favorecen, inhiben e incluso regulan el proceso de infección. Se ha demostrado que no siempre la presencia del receptor para cierto tipo de virus es sinónimo de infección productiva. De la misma forma se ha logrado infectar células que no expresan el receptor celular del virus en cuestión (Markwell 1984 *et al.*). En el control, regularización o erradicación de una infección viral, los mecanismos inmunológicos son indispensables. No obstante diversos virus han logrado evolucionar evadiendo o controlando el sistema inmunitario de su hospedero.

#### **Aspectos generales de la inmunidad frente al virus.**

Los virus inician su proceso de infección al reconocer a un receptor específico como una célula blanco la cual puede o no ser susceptible de ser infectada (Roizman *et al.*, 1990). Cuando un virus infecta a una célula subsecuentemente altera sus funciones metabólicas. El primer paso en la infección viral es el reconocimiento de un receptor en una célula blanco, el cual varía de acuerdo con el tipo de virus involucrado. Para el caso de los paramixovirus se ha demostrado que reconocen moléculas que contienen ácido siálico. El receptor del virus del sarampión es el CD46 (Doring *et al.*, 1993). El virus de la EOA reconoce preferentemente moléculas que contienen sialil alfa-2,3-lactosa (Reyes 1993a, Reyes *et al.*, 1993b). Una vez que el virus reconoció el receptor en la célula blanco, se interna para después fusionarse con la membrana plasmática. Dentro de la célula el virus inicia la transcripción de sus proteínas y utiliza las enzimas de las células infectadas, en estas últimas le permiten la producción de partículas víricas capaces de infectar a nuevas células blanco (Kingsbury 1990).

Existen diferentes virus capaces de infectar células del sistema inmune, de esta manera evaden la respuesta del huésped. Este comportamiento puede generar infecciones severas de otros agentes infecciosos. Los mejores ejemplos que se tienen son: el virus VIH (virus de la inmunodeficiencia humana); virus de la enfermedad de Gumboro en aves; virus de PRRS (síndrome disgénico y respiratorio del cerdo). Para el caso de los paramixovirus, se ha notificado que el virus del sarampión es inmunodepresor y es capaz de infectar principalmente a los monocitos y a linfocitos, esta situación ocasiona una inmunodeficiencia transitoria (Griffin *et al.*, 1994).

Una eficaz respuesta inmune celular y humoral son condiciones necesarias para el control y erradicación de las infecciones virales. La reacción que se genera también depende del tipo de virus, vía de entrada, la dosis infectante, tipo de célula presentadora y estado general del huésped (Doherty, 1995). La respuesta inmune frente al virus se inicia con la producción de interferón- $\alpha$  por las células infectadas, lo que aumenta el potencial lítico de células NK y la expresión del MHC-I (Murray *et al.*, 1992). El aumento en la expresión del MHC-I facilitará la acción de los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>. Estas células son importantes en la erradicación del virus del sarampión (Binnendijk *et al.*, 1990) así como de otras infecciones virales. La presencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con actividad citotóxica se ha demostrado en diferentes modelos de infecciones virales, se sugiere que juegan un papel importante para el control de la infección (Koszinowski *et al.*, 1991).

El resultado de la actividad citotóxica de las diversas células efectoras (NK, linfocitos CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>) sobre las células infectadas, provoca que se liberen antígenos virales endógenos. Estos pueden ser fagocitados, procesados y presentados como antígenos exógenos por el MHC-II. Este proceso induce la proliferación de linfocitos cooperadores CD4<sup>+</sup>. Estos responden con la producción de citocinas como la IL-2 e interferón- $\gamma$  o IL-4 e IL-10. Durante la infección aguda no es posible discriminar entre una respuesta Th<sub>1</sub> o Th<sub>2</sub> ya que predomina la producción de ambas. En los procesos crónicos es posible identificar un patrón de producción Th<sub>2</sub> que favorecen muchas de las infecciones persistentes (Biron, 1994).

Como se puede observar existen diversos mecanismos efectores, que participan en el control y erradicación de las infecciones virales. La eficacia de cada una de ellas dependerá del virus involucrado y de la susceptibilidad del huésped. Es frecuente observar que la respuesta específica contra antígenos virales provoque daño inespecífico al tejido circundante. Este evento ha sido observado en el momento de establecerse una respuesta citotóxica específica contra el virus del sarampión, la cual se caracteriza por producir exantema generalizado y meningitis esclerosante (Schneider-Schaulies *et al.*, 1991).

### **Características de la respuesta inmune del cerdo.**

En este apartado se describen brevemente las características más importantes de la respuesta inmune celular del cerdo. El enfoque es hacia los linfocitos T los cuales han mostrado diferencias importantes con los de otras especies.

Los linfocitos T se dividen en cooperadores (linfocitos CD4<sup>+</sup>) y citotóxicos (CD8<sup>+</sup>). Los primeros regulan la respuesta inmune con la producción de citocinas como la IL-2, el INF $\gamma$  la IL-4 y la IL-10, en algunas infecciones virales tienen efectos citotóxicos con restricción para el MHC de clase II. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> son citotóxicos con restricción para el MHC de clase I. Ambos linfocitos maduran en el timo. Cuando salen de éste pierden el marcador de superficie CD1. El marcador los identifica como linfocitos inmaduros y conservan el CD2 a diferencia de otros tipos celulares. Durante el proceso de maduración otros marcadores de superficie se expresan en los linfocitos; por ejemplo, el receptor del linfocito T (TcR $\alpha\beta$  y TcR $\gamma\delta$ ) y las moléculas CD4 y CD8, entre otros. En las primeras etapas de maduración de los linfocitos, se observa la coexpresión de las moléculas CD4 y CD8, pero antes de poblar los órganos linfoides secundarios se pierde una de las moléculas. En sangre periférica bajo condiciones normales no se observan altos porcentajes de linfocitos con doble marca en las células humanas y murinas. El cerdo es la única especie que expresa altos porcentajes de linfocitos dobles positivos en sangre periférica (entre 10% y 60%). Estos porcentajes se conservan en

órganos linfoides secundarios en condiciones normales (Saalmüller *et al.*, 1987; Saalmüller *et al.*, 1994).

Saalmüller y Pescovitz fueron los primeros en identificar la presencia de linfocitos  $CD4^+CD8^+$  en el cerdo y en proponer dos hipótesis de sus posibles actividades biológicas, la primera: estas células pueden representar linfocitos inmaduros que emigraron del timo sin perder alguno de sus marcadores y la segunda: estas células representen linfocitos  $CD4$  que han adquirido el marcador  $CD8$  después de su sensibilización y lo retienen para convertirse en linfocitos pequeños. La primera hipótesis fue rechazada, ya que estos linfocitos no expresan el marcador  $CD1$  que identifica a timocitos; la segunda hipótesis es la más aceptada. Los resultados indican que los linfocitos  $CD4^+$  adquieren el marcador  $CD8$  para convertirse en linfocitos  $CD4^+CD8^+$  después de una respuesta *in vitro* a estímulos alérgicos, virales y parasitarios (Saalmüller *et al.*, 1989; Pescovitz *et al.*, 1994; Saalmüller *et al.*, 1994). Esta respuesta está restringida al MHC-II. (Summerfield *et al.*, 1996)

Una población enriquecida de linfocitos  $CD4^+$ , provenientes de cerdos inmunizados con el virus de la enfermedad de Aujeszky, fue estimulada *in vitro* durante varias semanas con el antígeno viral y con IL-2. Provocó que los linfocitos  $CD4^+$  adquirieran y conservaran el marcador  $CD8$ . Para después convertirse en linfocitos  $CD4^+CD8^+$ . Los dos tipos de linfocitos presentaron el marcador de superficie  $CD21$ , marcador que representa poblaciones de células de memoria. Lo interesante fue observar que los porcentajes fueron inversos en estas dos poblaciones de linfocitos. La población de  $CD21$  en linfocitos  $CD4^+CD8^+$  fue de 75%, mientras que en linfocitos  $CD4$  fue sólo del 23%, con lo cual los autores concluyen que un alto porcentaje de esta población doble positiva corresponde a células de memoria (Zuckermann *et al.*, 1996b).

### **Especies susceptibles.**

Hasta hoy el cerdo es la única especie en donde se han observado signos clínicos de la EOA en condiciones naturales (Stephano *et al.*, 1985a).

Al infectar de forma experimental ratones adultos con el virus cepa LPM por vía intracerebral, se observó temblor y excitación. La muerte ocurrió entre los tres y cinco días después de la inoculación. El virus cepa LPM se pudo aislar nuevamente de cerebro, pulmón, hígado y bazo. Cuando se inocularon macerados de estos encéfalos en células PK-15, el virus resultó ser altamente letal para ratones y para cerdos muy jóvenes. El agente infeccioso tuvo tropismo hacia el sistema nervioso central y el tracto respiratorio (Correa *et al.*, 1986; Moreno *et al.*, 1986).

El conejo es resistente a la infección intramuscular y no presenta signos de la enfermedad; sin embargo hay desarrollo de anticuerpos (Stephano y Gay, 1985a ).

Se realizó un estudio en donde se utilizaron siete perros localizados en tres diferentes granjas porcinas en las que previamente se diagnosticó el virus de la EOA. A los siete cánidos se les dio de comer carne de cerdo de animales que murieron con signos de la EOA. Se observó que los perros permanecieron sin signos durante un periodo de 30 días y en ninguno se detectó la presencia de anticuerpos contra la EOA. Los autores concluyeron que la EOA no afecta clínicamente a los perros y que la ausencia de anticuerpos indica que el virus no se replica en ellos (Gay *et al.*, 1985).

En otra investigación, se inocularon tres pécaris de collar adultos vía intranasal, con el virus de la EOA. Se detectaron anticuerpos en los animales a partir del día 14 de infección. Durante los 2 primeros días de infección, los animales mostraron apatía y abundante secreción nasal. A partir de hisopos nasales se pudo detectar la presencia del virus por inmunofluorescencia en los días 14 y 30 de infección. No se observaron otros signos relevantes y se concluyó que los pécaris tuvieron una infección subclínica (Flores *et al.*, 1992).

Ratas de laboratorio, cepa Wistar, fueron inoculadas vía intramuscular con 1 ml del virus de la EOA. Se detectaron anticuerpos a partir del décimo día de infección. De macerados de encéfalo, pulmón y tonsila se pudo recuperar el virus hasta el día 35 de

infección; sin embargo, la rata no manifestó signos clínicos, ni tampoco se observaron lesiones a la histopatología (Cuetero *et al.*, 1995).

La población felina tiene amplia distribución en las granjas porcinas para el control de roedores. Al inocular vía oronasal a un grupo de 15 gatos, se les pudo detectar anticuerpos a partir del día 14. En el día del sacrificio (día 21 de infección) no se pudo aislar al virus, ni observarlo por inmunofluorescencia en encéfalo, pulmón y tonsila; tampoco tuvieron lesiones a la histopatología ni mostraron signos clínicos de la enfermedad (Arellanes *et al.*, 1994).

### **Epidemiología.**

Algunos miembros de la Familia *Paramixoviridae* han sido aislados en otros países, como sucedió en Israel. En cerdos utilizados con propósitos de investigación se aisló un paramixovirus a partir de hisopos nasales de animales sanos (Lipkind *et al.*, 1986). En Canadá también se aisló un paramixovirus a partir de encéfalo de cerdo en un brote de la enfermedad de encefalomiелitis hemaglutinante. Este aislamiento viral se inoculó en cerdos y no se pudieron generar signos y lesiones en los animales (Greig *et al.*, 1971). Hasta la fecha no se ha podido establecer ninguna relación entre el virus de la EOA y otros paramixovirus.

En México, el primer informe de la enfermedad fue hecho en 1980 en La Piedad, Michoacán, en una granja de 2 500 hembras (Stephano *et al.*, 1981). En ese mismo año también se observaron signos clínicos en los estados de Jalisco y Guanajuato. En 1982 la enfermedad fue diagnosticada en el Estado de México. A partir de 1983 se le ubicó en el Distrito Federal, Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Yucatán y Tabasco. El diagnóstico que corresponde a los dos últimos estados fue a nivel de rastro, de cerdos provenientes del Bajío. Para 1985 la enfermedad ya había sido diagnosticada en 12 estados de la República Mexicana (Stephano *et al.*, 1986d).

En un estudio de prevalencia se obtuvo que en 13 estados, de 27, se encontraron cerdos positivos a la serología, este muestreo fue realizado en los años de 1989 y 1990 (Fuentes *et al.*, 1992).

### **Semiología.**

Los signos clínicos dependen principalmente de la edad del animal.

**Lechones de dos a 15 días de edad son los más susceptibles.** Los signos se presentan súbitamente, los animales se ven postrados, deprimidos o con problemas nerviosos. Los primeros signos son: fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado, esta semiología se acompaña de constipación y en ocasiones diarreas. Posteriormente los animales presentan signos nerviosos progresivos como incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, temblores musculares, posturas y marchas anormales. Más tarde hay postración, letargia, con algunos movimientos involuntarios, mirada perdida, pupila dilatada, ceguera y en ocasiones nistagmo. La muerte se presenta entre las 30 y 48 horas después de la postración. En algunos casos el curso es de 48 horas, pero lo más frecuente es de tres a cinco días. Simultáneamente, algunos animales presentan conjuntivitis, ojos hinchados, lagrimeo, párpados pegados y en 1 al 10% de los afectados hay opacidad de córnea uni o bilateral. Con frecuencia sólo se observa la opacidad corneal sin signos nerviosos en lechones (Pérez. *et al.*, 1988. Stephano *et al.*, 1985a. Stephano. 1985c).

**Cerdos de más de 30 días.** Los signos nerviosos son raros y pocos animales mueren debido el único cambio observado es la opacidad de la córnea en 1 al 4% de los cerdos. Cuando llegan a presentarse los signos nerviosos existe: anorexia, depresión, incoordinación, marcha en círculo y movimientos pendulares de la cabeza, entre otros. También se presenta conjuntivitis y opacidad de la córnea. Se ha sugerido retraso en el crecimiento y disminución en el consumo de alimento (Stephano *et al.*, 1985 a; Stephano 1985b; Stephano 1985c).

**Animales del pie de cría.** Es poco frecuente que los animales adultos desarrollen opacidad corneal. Las cerdas con camadas afectadas pueden no presentar semiología. Con frecuencia manifiestan anorexia uno o dos días antes de los signos clínicos en los lechones, también puede aparecer opacidad de la córnea (Stephano *et al.*, 1985a; Stephano, 1985c). Al analizar los diferentes parámetros productivos en las granjas afectadas se observó incremento en el número de hembras repetidoras, lo que ocasionó una caída en 15 al 20% de la fertilidad de la piara. Este efecto persiste hasta por seis a



ocho meses. Hay un incremento en el número de lechones nacidos muertos (2 al 24%) y fetos momificados (1 al 5%). En las camadas que nacen durante el brote la morbilidad es del 20 al 50%; en estos lechones afectados, la mortalidad es del 87 al 99%. Este efecto en la maternidad dura entre dos y nueve semanas (Stephano, 1985b; Stephano, 1986d).

Cuando se analizó un brote en una granja comercial de 760 vientres, en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México. En él se hicieron las siguientes observaciones: elevación crítica de los mortinatos, del 4% se incremento al 32%; la mortalidad en lactantes de cuatro a 10 días de edad fue del 56%, murieron 100% de los que animales que manifestaron los signos. Los cerdos destetados, de 8 a 15 Kg, desarrollaron opacidad corneal, con algunas bajas. En 15% de los cerdos de engorda y reproductores se presentó ojo azul, predominantemente unilateral. Las reproductoras que se inseminaron durante las semanas posteriores al brote, presentaron repeticiones del estro en 20%. El retraso del ciclo estral en las hembras inseminadas que no quedaron gestantes fue de 45 a 50 días. El 25% de las reproductoras entraron en un anestro prolongado durante cuatro o cinco meses (Guillén, 1984).

En una granja en el estado de Jalisco se notificó que durante un brote de la EOA el promedio de lechones nacidos vivos disminuyó de 9.5 al 7.3%; el porcentaje de nacidos muertos aumentó de 3.3 a 12, por su parte las momificaciones al momento del parto aumentaron del 1.1 al 14%. La repercusión económica anual de este brote representó 20% menos de utilidad (CONASA, 1995).

En sementales, sólo existen reportes de campo en donde se asocian los trastornos reproductivos de los verracos a la presencia del virus de la EOA (Campos HR y Carbajal SM; Stephano *et al.*, 1990).

### **Lesiones.**

Los cambios macroscópicos que se le atribuyen a la infección por el virus de la EOA son escasos y ocasionalmente están ausentes. Frecuentemente se observa congestión meníngea con aumento variable del volumen del líquido cerebroespinal y neumonía, la cual se aprecia en los bordes ventrales de los lóbulos craneales y con extensión del 1 al 5% del parénquima. Los pulmones no se colapsan (Stephano, 1986d; Stephano *et al.*, 1988a). La opacidad de la córnea por edema se aprecia con baja

frecuencia en los cerdos muertos por la enfermedad, ésta generalmente es unilateral. En cerdos mayores de 30 días y convalecientes, la córnea edematosa llega a tener un grosor de hasta 3mm, el humor acuoso es escaso. En raras ocasiones se ulcera la capa externa de la córnea y eventualmente se forma queratocono. Los principales cambios histológicos se localizan en el sistema nervioso central. En animales infectados se presenta meningoencefalitis no supurativa que afecta principalmente al tálamo, cerebro medio y corteza cerebral. Hay gliosis focal y difusa, así como infiltración perivascular, en donde se observan linfocitos, células plasmáticas y células reticulares, neurofagia, necrosis neuronal, glial y coroiditis. No se aprecian cuerpos de inclusión en casos naturales. En el pulmón, se observan áreas multifocales de neumonía intersticial, cuya característica es la infiltración de células mononucleares en la pared alveolar. El examen histológico de los ojos afectados indica cambios moderados. El edema corneal rara vez es prominente. En diferentes partes del ojo, tales como el ángulo iridocorneal, la unión cornoescleral, la lamina limitante posterior o interna (membrana de Decement), iris y en el nervio óptico hay macrófagos y neutrófilos infiltrados. En la córnea edematizada se aprecian vasos de nueva formación. En la mayoría de los animales estudiados se aprecia tonsilitis moderada con epitelio descamado y células inflamatorias en las criptas (Pérez *et al.*, 1988; Stephano, 1986d; Stephano *et al.*, 1988a).

#### **Fallas reproductivas ocasionadas por otros virus.**

Los órganos genitales del cerdo y de otros animales son la vía de entrada y eliminación de algunos virus (Kahrs *et al.*, 1977; Larsen *et al.*, 1980; Phillips *et al.*, 1972). El virus de Aujeszky se ha podido aislar del prepucio y también en el semen de verracos (Phillips *et al.*, 1972); en este mismo padecimiento se han observado lesiones histológicas (Comeriah, 1965; Larsen *et al.*, 1980). En la parvovirus porcina existe controversia entre si ocurre o no la eliminación del virus por medio del semen (Gradil; 1990 ; Thacker *et al.*, 1980), el paramixovirus no genera lesión alguna en el parénquima testicular. Algunos serotipos de enterovirus han sido aislados en tejido testicular y la inoculación del virus en semen provoca la muerte embrionaria en hembras serológicamente negativas (Huang *et al.*, 1980a). En la fiebre aftosa se tiene confirmación de la eliminación del virus a través del semen (Madin, 1980).

En la infección de la parotiditis en humanos el comportamiento de la patogenia, manifestaciones clínicas e inmunidad, es similar al virus de la EOA en cerdos.

La parotiditis es una enfermedad que afecta a los niños y a adolescentes con inflamación de las glándulas salivales con complicaciones de orquitis y meningoencefalitis (Wolinsky *et al.*, 1990).

En la parotiditis existe un solo serotipo, es un virus que contiene hemaglutinina neuraminidasa. Se puede multiplicar en embrión de pollo, como lo hace también el virus de la EOA. Las células Vero son monoestratos que permiten fácilmente la multiplicación de ambos virus.

El virus de la parotiditis ha sido aislado de biopsias de testículo a los 4 días de presentarse los síntomas, existen escasos informes respecto de sitios de multiplicación.

Se desconoce si la orquitis en adolescentes está asociada a la edad o la susceptibilidad de las células epiteliales o está controlada por los cambios hormonales (Wolinsky *et al.*, 1990).

### ***Espermatogénesis***

El verraco contribuye con 50% del material genético de la descendencia y cada semental se expresa en su progenie entre 15-25 veces más que la hembra; por estos motivos las repercusiones por poca libido o infertilidad son altas.

La pubertad en el verraco se presenta cuando los espermatozoides están presentes en los túbulos seminíferos y en la cola del epidídimo, es el momento en que el semental es capaz de inseminar a una hembra, independientemente de que la fertilidad sea baja. Este fenómeno se presenta a las 20 semanas de edad, aproximadamente; sin embargo, se obtienen niveles aceptables de fertilidad hasta las 35 semanas de edad (Hughes *et al.*, 1980).

Las tres hormonas de importancia involucradas en la reproducción del verraco son LH, FSH y la testosterona; las dos primeras son producidas en la hipófisis y reguladas por el hipotálamo. La testosterona es la hormona que se produce en las gónadas del semental y es sintetizada en las células intersticiales o de Leydig. El testículo también produce otras hormonas esteroides, como son los estrógenos y androstendiona; sin embargo, su actividad está restringida (Hughes *et al.*, 1980).

Al nacimiento, los testículos están aún indiferenciados. Los precursores de los túbulos seminíferos conocidos como cordones sexuales, están sólidos; debido a que no tienen un lumen central, contienen células germinales indiferenciadas y precursores de las células sustentaculares o de Sertoli, pero las células intersticiales son abundantes en ese momento.

En el periodo prenatal la proliferación de células intersticiales es abundante, esto último genera que la mayor parte de las células del testículo al nacimiento sean de esa naturaleza. Entre el nacimiento y la pubertad existen cambios drásticos en las proporciones de las células testiculares, lo anterior se debe a que en el momento del nacimiento, 84% corresponde a tejido intersticial (células de Leydig) y 16% lo constituyen cordones. Al llegar a la pubertad las proporciones se invierten en 37% y 62 %, respectivamente.

El término de espermatogénesis es usado para describir el proceso en donde las células germinales del testículo se transforman en espermatozoides maduros; este proceso dura 34 días, aproximadamente, en el verraco. La etapa inicial corresponde a la de espermatozocito primario que dura 12.3 días. La siguiente etapa es la de espermatozocito secundario con duración de 0.4 días. La etapa de espermátides con núcleo redondo es de 6.3 días. El tiempo de espermátides con núcleo alargado es 1.5 días y de espermatozoide con 6.2 días en promedio. El tránsito del espermatozoide a través del epidídimo es de 10.2 días en esta especie.

La testosterona es la hormona responsable de la actividad secretora de las glándulas accesorias como lo son las vesículas seminales, próstata y las glándulas bulbouretrales. Estas últimas son glándulas accesorias que constituyen el fluido seminal, el cual es abundante en el verraco con un volumen de 150 a 200 ml (Holtz *et al.*, 1976; Hunter *et al.*, 1976).

**Hipótesis.**

La inoculación experimental con el virus de la EOA es capaz de participar en la generación de daños a nivel testicular en verracos

**Objetivo.**

Evaluar los signos y lesiones que pueda generar el virus de la EOA en verracos inoculados experimentalmente con la cepa de campo PAC 3.

**Hipótesis.**

La inoculación experimental con el virus de la EOA es capaz de participar en la generación de daños a nivel testicular en verracos

**Objetivo.**

Evaluar los signos y lesiones que pueda generar el virus de la EOA en verracos inoculados experimentalmente con la cepa de campo PAC 3.

## **Material y métodos.**

### ***Aislamiento y caracterización del virus.***

Se trabajó con un aislamiento de campo del año de 1990. Esta cepa provoca signos de incoordinación y muerte en lechones, reabsorciones y momificaciones en cerdas gestantes, además de orquitis en machos.

Para realizar el aislamiento viral, se obtuvo el encéfalo de un animal de destete que manifestó signos nerviosos.

Para la caracterización del virus se llevaron a cabo diversos estudios: a) Efecto citopático; b) hemaglutinación; c) hemadsorción; d) inmunofluorescencia; e) purificación viral; f) microscopía electrónica; g) inoculación en embriones; h) inoculación de los lechones.

### ***Efecto citopático***

Se obtuvo el encéfalo de un lechón en condiciones asépticas. Un gramo de tejido se suspendió en 9 partes de medio de cultivo celular. Se hizo un macerado del tejido y posteriormente se centrifugó a 2 000 g durante 10 min.

El sobrenadante que se obtuvo se filtró a través de una membrana Millipore con poro de 0.45 micrometros y se colocó en un tubo estéril. Se le agregaron 1 000 UI de penicilina y 1 mg de estreptomycin por ml. Una vez que se realizó este procedimiento se colocó el inculo en células de riñón de mono verde (Vero) y células de riñón de cerdo (PK-15), las cuales tenían medio de cultivo MEM con 2% de suero fetal bovino.

Los monoestratos se revisaron desde las 24 horas hasta completar 7 días de inoculación (Burlenson *et al.*, 1992; Freshney *et al.*, 1994).

### *Inmunofluorescencia.*

Se prepararon monoestratos celulares de la línea PK15 con  $1 \times 10^6$  células por ml en cubre objetos colocados en tubos de Leighton. Cuando las células tuvieron confluencia del 90% se inocularon con 200  $\mu$ l del sobrenadante que se obtuvo a partir del macerado de tejido encefálico. El inóculo permaneció 2 h sobre el monoestrato, éste se retiró y se agregó medio de mantenimiento al monoestrato.

A las 24 horas de incubación los cubreobjetos con los monoestratos se retiraron y se lavaron con solución salina. Se fijaron con acetona durante 10 min. Se colocó albúmina bovina al 0.5% durante 15 min. Se lavó con solución salina.

Se agregó un conjugado con isotiocianato de fluoresceína elaborado en conejo diluido 1:100. Se dejó incubar 30 minutos a 37° C. Se lavaron las laminillas 2 veces con solución salina y una tercera con agua destilada. Finalmente las laminillas se montaron en portaobjetos con glicerina y solución salina v/v. (Gardner *et al.*, 1980; Harlow *et al.*, 1988).

Se preparó un monoestrato sin el inóculo y se le agregó el conjugado. El conjugado se elaboró a partir del aislamiento que se hizo en el año de 1981.

### *Purificación viral.*

El sobrenadante de cultivos infectados fue clarificado por centrifugación a 3 000 g durante 20 minutos y almacenado a -20°C hasta su uso. El virus contenido en los sobrenadantes fue precipitado con polietilenglicol 6 000 (10% p/v), durante 4 h a 4° C con agitación leve y se centrifugó a 3000 g por 20 min. El botón se suspendió nuevamente en solución NTE (NaCl 150 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM) con un volumen equivalente al 5% del volumen original. Se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo en congelación a -190°C. Posteriormente el virus fue purificado por centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (25% y 50%), 1 h a 100 000 g. Después, se recuperó la interfase viral. Se diluyó 1:10 y se centrifugó 4 h más a 100 000 g en un gradiente lineal de sacarosa (10%-60%).



Al final el virus se obtuvo por sedimentación a través de una solución de sacarosa al 30%. El virus se tituló por pruebas de hemaglutinación (HA). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford. El grado de homogeneidad del material purificado se analizó por el patrón electroforético de poliacrilamida bajo condiciones reductoras (Hames *et al.*, 1990).

#### *Microscopía electrónica.*

El sobrenadante de monoestratos con 72 h de infección fue centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 2000 g. Este sobrenadante se volvió a centrifugar durante 3 h a 30000 g. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue suspendido nuevamente en una pequeña cantidad de acetato de amonio al 1%. Para ser montado en rejillas de carbono sobre las que se tñó con ácido fosfotúngstico al 2%.

Para la observación de las partículas virales a través de microscopía electrónica se utilizó la técnica de tinción negativa con un microscopio Phillips EM300 (Dalton *et al.*, 1973; Robinson *et al.*, 1987; Sandborn 1969).

#### *Inoculación de embriones.*

Del sobrenadante del macerado de encéfalo se inocularon embriones de pollo de 9 días de edad vía cavidad alantoidea (Senne, 1989).

#### *Inoculación de lechones.*

A partir de la descripción del brote de campo, se obtuvo el encéfalo de un animal enfermo. Se hizo un macerado para inocular monoestratos de células. Estas presentaron efecto citopático y a partir de los sobrenadantes de estos monoestratos, se decidió inocular 5 lechones de 4 días de edad con 5ml del virus; con una dosis infectante cultivo celular de  $10^{6.3}$  por ml (Burlenson *et al.*, 1992)

### ***Infección experimental de los verracos.***

Se inocularon 8 verracos con el virus que previamente se había caracterizado. La edad de los animales fue de 9 meses; además se contó con 2 animales testigo bajo el siguiente esquema:

| <u>Primer grupo</u> |             | <u>Segundo grupo</u> |            |
|---------------------|-------------|----------------------|------------|
| semental            | sacrificio* | semental             | sacrificio |
| 1                   | 5           | 6                    | 70         |
| 2                   | 15          | 7                    | 70         |
| 3                   | 30          | 8                    | 80         |
| 4                   | 45          | 9                    | 80         |
| 5                   | 0           | 10                   | 0          |

\*Días de infección.

Al primer grupo de animales se les administró 2 ml del virus por vía oronasal y 2 ml vía intramuscular. Al segundo grupo de animales se les administró 4 ml del virus por vía oronasal

De cada grupo se realizaron las siguientes evaluaciones:

1. Signos clínicos.
2. Medición de las dimensiones testiculares.
3. Espermatobioscopías.
4. Hematología.
5. Serología.
6. Inmunotransferencias.
7. Respuesta proliferativa.
8. Citometría de flujo.
9. Necropsia.
10. Aislamiento viral.
11. Histopatología.
12. Microscopía electrónica.
13. Radioinmunoanálisis

### *Signos clínicos.*

Se realizó una evaluación diaria de los signos clínicos. Se midió la temperatura corporal de los animales cada tercer día antes y después de la inoculación.

### *Medición de las dimensiones testiculares.*

Para ambos grupos de animales se midió largo y ancho testicular. Las medidas se obtuvieron con un vernier. Al momento del sacrificio, los testículos se pesaron y también se midieron.

### *Espermatobioscopías.*

Los animales del primer grupo se entrenaron para que subieran al maniquí y así poder colectar el semen. Los animales del segundo grupo se retrasaron para ser sacrificados, debido a que también se estuvieron entrenando para la colección de semen, sin embargo no fue factible obtener eyaculados de manera constante como sucedió con el primer grupo.

Las espermatobioscopías se realizaron con la finalidad de evaluar la calidad del semen después de la inoculación de los verracos.

Se evaluó motilidad, concentración y volumen del eyaculado.

Motilidad: Se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos a 37° C para después colocar el cubre objetos . La observación fue a 100 aumentos.

Volumen: Se utilizó una probeta graduada.

Concentración: Se utilizó el hemocitómetro. El procedimiento es similar al que se usa para el conteo de glóbulos rojos, en donde se utilizan los 25 cuadros centrales de la cámara.

La fórmula para realizar los cálculos fue la siguiente:

Número de espermatozoides por ml. = ( espermatozoides ) ( 10 ) ( 200 ) ( 1 000 ).

Espermatozoides = Número de espermatozoides en 25 cuadros o en 1 mm<sup>2</sup>.

10 = Profundidad de la cámara, 0.1 mm.

200 = Dilución 1 : 200.

1 000 = Conversión de mm<sup>3</sup> a ml.

La observación fue a 400 aumentos. (Huges *et al.*, 1980)

### *Hematología.*

Las técnicas que se emplearon fueron las siguientes. Para hematocrito: micro hematocrito; para hemoglobina: cianohemoglobina; para la cuenta total de leucocitos y eritrocitos: pipetas de Thomas y la cámara de Neubauer; para volumen corpuscular medio: índice de la cuenta eritrocítica basada a partir del volumen del paquete celular y la cuenta eritrocítica; para el conteo de plaquetas se utilizó el método directo. (Schalam *et al.*, 1975).

Tanto en la hematología como en la serología del segundo grupo, se tiene un seguimiento de dos meses previos a la inoculación. Esto último se debió a que los sementales estaban entrenándose para la colección de semen. Esta situación permite tener un grupo de datos previos a la inoculación y un segundo grupo de datos que corresponden al periodo de infección. De esta manera se tienen dos grupos, lo cual es favorable para hacer una comparación entre ambos.

### *Serología.*

Se tomaron muestras sanguíneas a todos los animales, antes y después de la inoculación, con diferentes intervalos. Todas las muestras fueron analizadas mediante las pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IHA) con eritrocitos de bovino al 0.5% y microseroneutralización (MSN) en células PK15, para el diagnóstico de la EOA.

*al.*, 1981). Finalmente se agregaron 50 µl de eritrocitos de bovino al 0.5% a cada pozo. La lectura se hizo a los 60 minutos.

A todos los animales se les midieron anticuerpos contra: fiebre porcina clásica, enfermedad de Aujeszky, gastroenteritis transmisible, influenza porcina, síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo, coronavirus respiratorio y parvovirus porcino

### *Inmunotransferencias*

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras con 10% de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) del aislamiento de campo. Las proteínas que se obtuvieron se transfirieron a papel de nitrocelulosa, en donde se aplicó una corriente de 0.6 Volts durante 1 h con 30 minutos. Después se bloqueó la membrana con PBS (pH7.2) y leche al 5% 1 h a 37°C, toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS (pH7.2)-BSA(5%)-Tween (0.1%) y tres veces con PBS (pH7.2)-Tween (0.1%). Una vez bloqueada la membrana se cortaron tiras de 0.5 cm de ancho, y se incubaron con los diferentes sueros. Como punto siguiente, se incubó con un anticuerpo de conejo antigama de cerdo biotinilado y finalmente se incubó con estreptoavidina-peroxidasa. Las tiras se revelaron con diamino-bencidina y la reacción se detuvo lavando exhaustivamente con agua. Todas las incubaciones se realizaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Los sueros fueron diluidos previamente en PBS (pH7.2)-BSA (5%)-Tween (0.1%). Después de cada incubación las tiras se lavaron seis veces con un espacio de tiempo de cinco minutos en cada uno de los lavados. En los primeros lavados se utilizó PBS (pH7.2)-BSA (5%)-Tween (0.1%) y en los siguientes PBS (pH.2)-Tween (0.1%) (Burlenson *et al.*, 1992; Harlow *et al.*, 1988).

*Respuesta proliferativa.*

*Respuesta proliferativa de células mononucleares (CMN) en presencia del virus de la enfermedad del ojo azul.*

Estas células se obtuvieron a partir de los animales infectados. Los ensayos de proliferación se realizaron por triplicado en placas de microcultivo de 96 pozos. A cada pozo se adicionaron 100  $\mu$ l de la suspensión de CMN (500 000 células/ 100 microlitros) y de 10-12  $\mu$ g del virus PAC3. Las células se mantuvieron en cultivo durante 6 días a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. Dieciocho horas antes de cosechar las células, se marcaron con Ci de timidina tritiada (HdTR) por cada pozo. Las células se cosecharon con un colector múltiple (Cell Harvester, Brandel, EUA). Con el uso de un papel filtro (Brandel, EUA) que se deshidrató durante 48 horas a temperatura ambiente. Para determinar la incorporación de HdTR, el papel filtro se colocó en viales de centelleo y se adicionaron 3 ml de líquido de centelleo. Los viales se leyeron en un contador de radiación beta y los resultados se expresaron en índices de estimulación (I.E).

*Respuesta proliferativa de células mononucleares a la fitohemaglutinina (PHA) y a la concanavalina (Con A).*

La proliferación de CMN con PHA (8  $\mu$ g/ml) y Con A (1  $\mu$ g/ml) se realizó como se describió con la estimulación del virus, pero la estimulación fue de 42 h (Klaus, 1987).

*Citometría de flujo.*

*Marcaje fenotípico de las poblaciones celulares de linfocitos T, linfocitos B y monocitos/ de sangre periférica.*

Se analizaron las poblaciones celulares de linfocitos T, linfocitos B y monocitos de sangre periférica una semana antes y cada semana después de la infección. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CD2, anti-IgM, antimonocitos y segundos anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína o ficoeritrina. Finalmente las células se analizaron por citometría de flujo. Se utilizaron histogramas para determinar la intensidad de fluorescencia de cada marcador.

*Marcaje fenotípico de las subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>.*

Las muestras sanguíneas se obtuvieron una semana antes de la infección y durante 4 semanas después de ésta. Los anticuerpos monoclonales fueron: un IgG2a anti CD4 y un IgG2a anti CD8 (Klaus, 1987; Owens *et al.*, 1995)

*Necropsia.*

Se realizó la necropsia de cada verraco y se hizo una revisión general de todos los órganos. Se tomaron muestras de órganos genitales con sus glándulas accesorias así como de órganos con tejido parenquimatoso. Estas muestras se procesaron para histología, microscopía electrónica, el aislamiento viral y radioinmunoanálisis (López, 1997).

*Aislamiento viral.*

Se realizaron macerados de diversos órganos, así como de órganos reproductivos (testículo epidídimo, próstata, glándulas bulbouretrales y vesículas seminales) de cada semental. El sobrenadante de los macerados fue filtrado, para así obtener el inóculo libre de bacterias. Las líneas celulares seleccionadas para realizar el aislamiento, fueron: PK15 células BT y MDBK. Las dos últimas a pesar de ser tejidos heterólogos al virus, resultan susceptibles a la infección. Cuando se tuvo el 90% de confluencia en los monoestratos celulares, se eliminó el medio de cultivo y se procedió a infectar con 1 ml del inóculo (1:10) en botellas de 25 cm<sup>2</sup>. Para favorecer la adsorción, el inóculo se dejó sobre los monoestratos celulares durante una hora a 37°C. Después de este tiempo se decantó el medio de infección y para finalizar se colocó medio de mantenimiento (99% MEM y 1% de suero fetal). A partir de 96 horas de inocular al monoestrato, se evaluó el efecto citopático, la hemaglutinación y la hemadsorción (Burlenson *et al.*, 1992; Mahy, 1991).

### *Histopatología.*

Todos los tejidos fueron fijados en formalina al 10% amortiguada con fosfatos. Posteriormente se procesaron para el análisis histológico mediante la técnica rutinaria de inclusión en parafina; se realizaron cortes de 5µm. de espesor y los tejidos fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) (Valero *et al.*, 1997).

### *Microscopía electrónica*

Las muestras de tejido (1.0 mm) fueron fijadas en solución de Karnovsky durante una hora. Para después ser colocadas en tetraóxido de osmio al 1% durante una hora. Posteriormente se deshidrataron en alcoholes de concentraciones ascendentes, infiltrados e incluidos en resina epóxica. De las muestras se realizaron dos tipos de cortes con el ultramicrotomo. El primero de ellos fue un corte semi-fino y teñido con azul de toluidina al 1%. Una vez seleccionados los tejidos se obtuvieron cortes finos para después ser contrastados con metales pesados de uranio y plomo. Al final los tejidos se observaron en un microscopio Phillips EM 300 (Dalton *et al.*, 1973; Robinson *et al.*, 1987; Sandborn, 1969).

### *Radioinmunoanálisis.*

La actividad esteroideogénica fue medida en suero sanguíneo, epidídimo y testículo. Las hormonas que se evaluaron; fueron androstendiona, testosterona y 5 - dihidrotestosterona.

El procedimiento fue el siguiente: se agregaron 1 000 cpm de cada esteroide a cuantificar en un tubo, de 50 ml, estas hormonas estaban tritadas. Posteriormente se añadieron 2ml del suero o 1 gr del tejido a evaluar. Después de mezclar se realizó la extracción con 10 ml de éter y se adicionó un volumen igual de agua bidestilada. Nuevamente se colocaron en hielo seco y las dos fases se separaron por congelación. El éter no se congeló y en él estaban las hormonas. El éter se evaporó a 45° C en baño



maría el residuo se disolvió en 1 ml de etanol absoluto. Los residuos se transfirieron a cromatoplacas de sílica-gel, en donde también se colocaron esteroides de referencia. Este proceso se inició con benceno como solvente, posteriormente fue con benceno-acetato de etilo y finalmente benceno-metanol. Una vez identificados los esteroides se desprendió el área de sílica que los contenía. Los esteroides se eluyeron con solución de éter etílico y metanol. Los esteroides purificados fueron analizados con el uso anticuerpos específicos contra éstos. Después de 20 minutos se agregó la hormona radioactiva en concentración de 7 000-10 000 cuentas por minuto en 100 ml. Hasta este momento se tenía a un antígeno en concentración desconocida un anticuerpo conocido y un antígeno en concentración conocida. Para separar el complejo se usó carbón-dextran. El sobrenadante fue leído en un contador de centelleo (Catty *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 1974).

## **Resultados.**

### *Caracterización del virus.*

#### *Efecto Citopático.*

A partir del encéfalo del lechón que manifestó signos nerviosos, se obtuvo un macerado y el sobrenadante se filtró en forma estéril para finalmente inocular monoestratos celulares de células Vero y PK15. Se observó desprendimiento de células a partir del segundo día en ambos monoestratos celulares y fue mas abundante en las células PK15. Los sincitios fueron evidentes en las células Vero a partir del tercer día. El efecto fue completo al quinto y sexto días, respectivamente. El título que se obtuvo en cultivo celular fue de  $10^{5.25}$  para el virus aislado en las células PK15 y de  $10^{3.75}$  en las células Vero.

#### *Hemaglutinación.*

Se inocularon 3 monoestratos de PK 15 y se congelaron a las 48, 72 y 96 horas de infección, después se titularon los sobrenadantes con eritrocitos de ave, cobayo y bovino.

El sobrenadante con los eritrocitos de ave se obtuvo un título hemaglutinante (UHA) de 128, con los eritrocitos de cobayo de 64 (UHA) y con los de bovino de 16 UHA. Estos títulos fueron similares a las 48 y 72 horas. Para corroborar si esta aglutinación era específica del virus de la EOA, los sobrenadantes fueron utilizados en una prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) diluidos a 8 UHA y confrontados con sueros testigos positivos (título 1:128) y negativos. Se observó que el título del suero positivo se conservó y en el suero negativo no se identificaron anticuerpos

### *Hemadsorción.*

Se prepararon 3 placas con cultivo celular, en la primera la hemadsorción fue a las 72 h, en la segunda también se hizo hemadsorción pero a las 96 h, la tercera placa se fijó con metanol cristal violeta a los 6 días de infección. El título obtenido fue de  $10^{5.25}$  para las 2 primeras placas y de  $10^{5.37}$  para la última.

### *Inmunofluorescencia.*

Se pudo observar fluorescencia en los monoestratos que fueron inoculados con el aislamiento viral. Lo anterior muestra una reacción de identidad viral entre éste aislamiento y los realizados en años anteriores. Se observaron marcas fluorescentes concentradas en ciertas zonas del citoplasma celular que corresponden a acúmulos de partículas virales.

### *Purificación viral.*

A través del perfil electroforético se determinaron las 6 proteínas que constituyen al virus: Hemaglutinina-neuraminidasa HN (65 KDa), fosfoproteína P (52 KDa), nucleoproteína NP (68 KDa), proteína L (200 KDa), proteína M (40 KDa) y la proteína de fusión F (59 KDa). Estos resultados son similares a los patrones electroforéticos del aislamiento LPM (Figura 1).

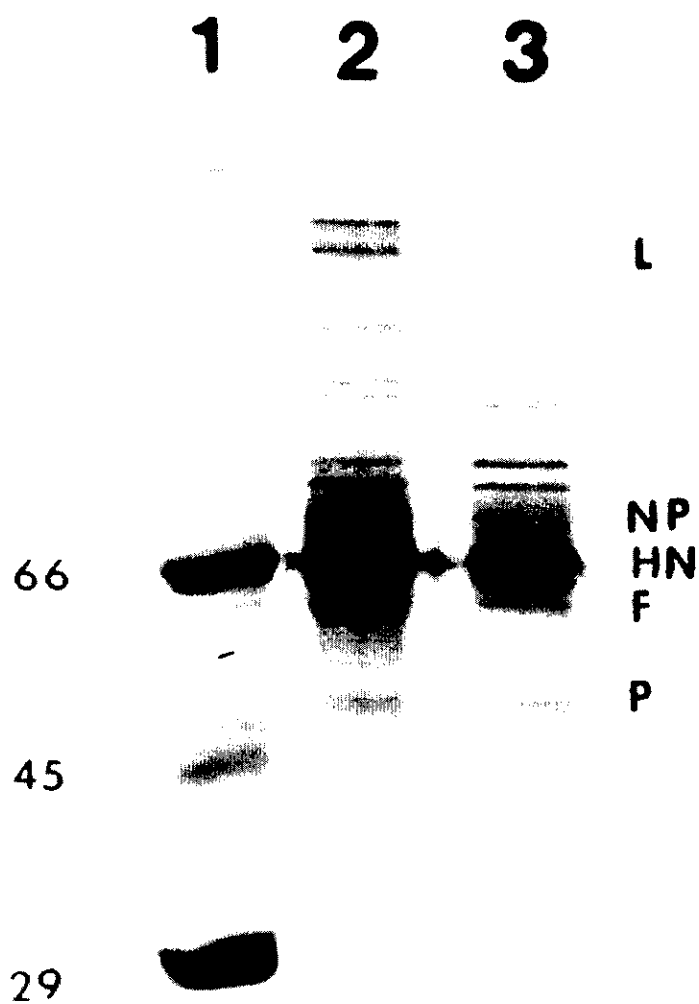


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La línea 1 representa el marcador de peso molecular, la línea 2 es la cepa LPM y la línea 3 es la cepa PAC-3 que corresponde al aislamiento realizado en esta investigación.

### *Microscopía electrónica.*

A partir del sobrenadante de células PK-15 con 18 horas de infección se realizó una tinción negativa (ácido fosfotúngstico). Se observaron estructuras pleomórficas características de la familia *Paramyxoviridae* (Figura 2). Se observaron proyecciones sobre la superficie del virus que corresponden a las glicoproteínas externas HN y F. En la parte central está la nucleocápside conformada por las proteínas estructurales NP y las proteínas asociadas al genoma P y L. En la parte interna de la envoltura se encuentra la proteína M. También se observan partes de la nucleocápside separadas debido a la fragilidad de la envoltura viral.

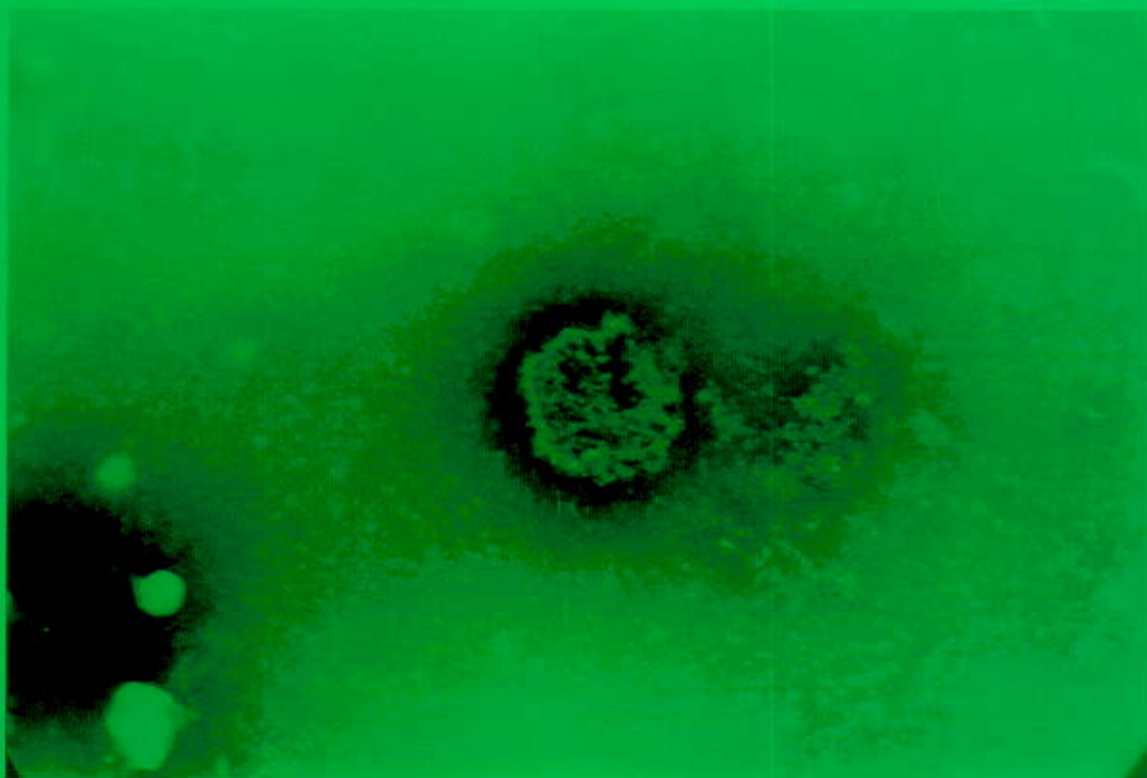


Figura 2. Microscopía electrónica del virus de la EOA. PAC-3, a partir del sobrenadante de células PK-15 con 18 horas de infección, 320 000 X. Se realizó una tinción negativa (ácido fosfotúngstico).

### *Inoculación de embriones.*

Se inocularon embriones con el sobrenadante del macerado de encéfalo de un animal que manifestó signos de la EOA. No pudo ser recuperado el virus a partir del líquido alantoideo ni causó muerte embrionaria. Al inocular embriones con el sobrenadante de un monoestrato celular infectado, sí generó hemaglutinación a partir del líquido alantoideo y muerte embrionaria a partir de 72 horas de infección.

### *Inoculación de lechones.*

Tres de los animales inoculados murieron al tercer día, la causa fue una diarrea profusa; sin embargo, los 2 animales restantes mostraron signos de incoordinación, torticolis, tremor muscular, movimientos de carrera y postración. Se manifestaron estos signos hasta el sexto y séptimo días de infección en ambos animales y se pudo recuperar el virus a partir de los macerados de encéfalo (Figura 3).



Figura 3. Lechón con 6 días de infección inoculado con el virus de la EOA. PAC-3. Manifiesta signos nerviosos de incoordinación.

### ***Resultados de la inoculación experimental en verracos.***

#### *Signos clínicos.*

En el primer grupo de animales tres de ellos manifestaron fiebre de 41°C, anorexia y depresión durante el segundo y tercer días de infección. Estos mismos signos los tuvieron 2 animales del segundo grupo.

Durante la primer semana después de la inoculación se presentó tos y lagrimeo en todos los animales. Después de este periodo el apetito, comportamiento y líbido no se modificaron. Se observaron alteraciones en las dimensiones testiculares a partir del día 12 de infección.

#### *Medición de las dimensiones testiculares.*

Se realizó el seguimiento cronológico de las dimensiones testiculares del segundo grupo de animales. En general los animales tuvieron aumento del tamaño testicular a partir de la segunda semana de infección. En algunos animales este aumento persistió durante todo el experimento, otros recuperaron su tamaño original mientras que otros más adquirieron un tamaño inferior al original, esta diferencia se observó de manera evidente después del día 30 de infección ( Figura 4 y 5).

A la necropsia, en el primer grupo se observó que el animal que más diferencias tuvo en el tamaño testicular fue el tercero y correspondió al día 30 de infección. Este animal tiene una diferencia de peso entre cada testículo de 150 g esto representó que un testículo es 30% más pesado que otro. El cuarto animal de dicho grupo (45 días de infección) tuvo una diferencia menor en el peso testicular (50 g). Pero esta diferencia de peso representó un 12%.



En el segundo grupo el animal testigo tuvo una diferencia en el peso testicular de 15 g y las dimensiones de ambos testículos fueron similares. La diferencia representó 3% entre el peso de un testículo y otro. El animal 8 que fue sacrificado con 80 días de infección, tuvo una diferencia de 330 g. En este caso el testículo izquierdo es 40% más pesado que el derecho. Sin embargo, el animal 7 con 70 días de infección tenía sus dimensiones testiculares muy similares al animal no inoculado (Cuadros 1 y 2).

**Cuadro 1.** Tamaño y peso testicular del primer grupo de animales inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul.

| Cerdo | DS | Derecho  |          |        | Izquierdo |          |        | g. de diferencia | % de diferencia |
|-------|----|----------|----------|--------|-----------|----------|--------|------------------|-----------------|
|       |    | Largo cm | Ancho cm | Peso g | Largo cm  | Ancho cm | Peso g |                  |                 |
| 1     | 5  | ND       | ND       | 490    | ND        | ND       | 500    | ND               | 2               |
| 2     | 15 | 18       | 5.5      | 375    | 17        | 5.0      | 400    | 25               | 6               |
| 3     | 30 | 19       | 7.0      | 350    | 15        | 4.75     | 500    | 150              | 30              |
| 4     | 45 | 18       | 6.3      | 350    | 18        | 5.0      | 400    | 50               | 12.5            |
| 5     | 0  | ND       | ND       | 490    | ND        | ND       | 510    | ND               | 4               |

ND= no determinado

DS= días de sacrificio

**Cuadro 2.** Tamaño y peso testicular del segundo grupo de animales inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul.

| Cerdo | DS | Derecho  |          |        | Izquierdo |          |        | g. de diferencia | % de diferencia |
|-------|----|----------|----------|--------|-----------|----------|--------|------------------|-----------------|
|       |    | Largo cm | Ancho cm | Peso g | Largo cm  | Ancho cm | Peso g |                  |                 |
| 6     | 70 | 18       | 4.5      | 450    | 16        | 4        | 620    | 170              | 27              |
| 7     | 70 | 17       | 5        | 625    | 16        | 5        | 600    | 25               | 4               |
| 8     | 80 | 21       | 5        | 810    | 15        | 4        | 480    | 330              | 40              |
| 9     | 80 | 16.5     | 4.8      | 660    | 16        | 5        | 580    | 80               | 13              |
| 10    | 0  | 16       | 4        | 520    | 15        | 4        | 535    | 15               | 3               |

DS= días de sacrificio





Figura 4. Verraco inoculado con el virus de la EOA. Aislamiento PAC-3 con 15 días de infección. El aumento de tamaño del testículo derecho corresponde a una edematización.

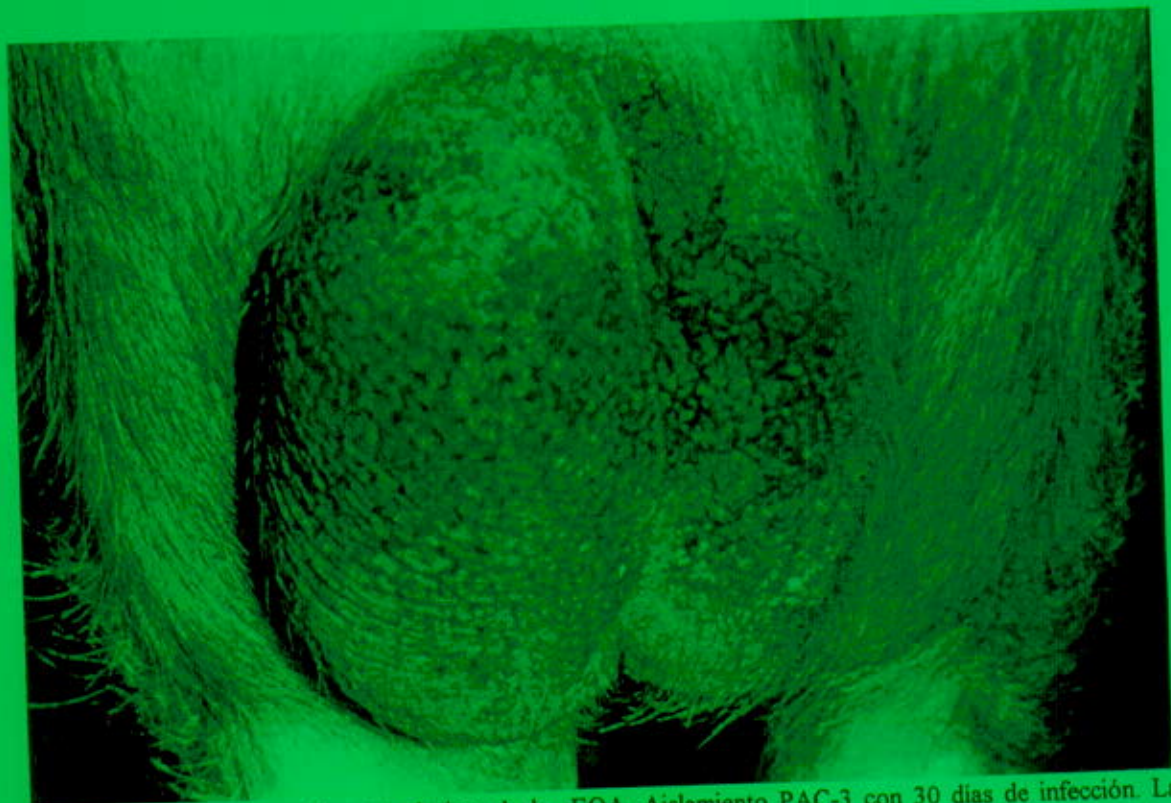


Figura 5. Verraco inoculado con el virus de la EOA. Aislamiento PAC-3 con 30 días de infección. La disminución de tamaño del testículo derecho corresponde a pérdida de estructuras celulares en túbulos seminíferos

### Espermatobioscopías.

Sólo se pudo realizar la evaluación del semen de los animales del primer grupo, debido a que los verracos del segundo grupo no montaron sobre el potro de entrenamiento. Durante el periodo de experimentación se observó que el volumen del eyaculado y de la libido se conservaron; sin embargo, alrededor del día 21 de infección se apreció ausencia de espermatozoides con un volumen del eyaculado normal. Los resultados se presentan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Espermatobioscopías de cerdos adultos infectados con el virus de la EOA

| Días pi | Motilidad |    |    | Volumen |     |     | Concentración        |     |     | Número total    |      |      |
|---------|-----------|----|----|---------|-----|-----|----------------------|-----|-----|-----------------|------|------|
|         | %         |    |    | ml      |     |     | 10 <sup>6</sup> / ml |     |     | 10 <sup>9</sup> |      |      |
|         | C2        | C3 | C4 | C2      | C3  | C4  | C2                   | C3  | C4  | C2              | C3   | C4   |
| 0       | 90        | 80 | 90 | 100     | 115 | 90  | 200                  | 270 | 250 |                 |      |      |
| 3       | 80        | 80 | 90 | 110     | 83  | 90  | 205                  | 365 | 475 | 22.5            | 30.2 | 42.7 |
| 7       | 90        | 80 | 90 | 125     | 150 | 110 | 450                  | 375 | 375 | 56.0            | 56.2 | 41.2 |
| 11      | 95        | 90 | 90 | 120     | 150 | 105 | 425                  | 440 | 260 | 51.0            | 66.0 | 27.3 |
| 14      | 95        | 90 | 90 | 100     | 140 | 73  | 380                  | 185 | 465 | 38.0            | 29.5 | 33.9 |
| 18      | ND        | 95 | 95 | ND      | 140 | 115 | ND                   | 205 | 285 | ND              | 28.7 | 32.7 |
| 21      | ND        | 2  | 85 | ND      | 160 | 67  | ND                   | 40  | 345 | ND              | 6.4  | 55.2 |
| 30      | ND        | 0  | 90 | ND      | 150 | 105 | ND                   | 0   | 300 | ND              | 0    | 31.5 |
| 40      |           |    | 90 |         |     | 115 |                      |     | 280 |                 |      | 32.2 |

Día pi: Días posinoculación

C2, C3, y C4: cerdos 2, 3 y 4, respectivamente

ND: No determinado

Los cerdos a los que se les pudo evaluar semen, se sacrificaron a los 15, 30 y 45 días de infección, respectivamente.

El cerdo 2 no mostró alteración en sus valores normales de semen; sin embargo, antes del sacrificio los testículos se observaron aumentados de tamaño y a la necropsia ambos testículos tenían las mismas dimensiones, pero se recuperó abundante líquido localizado en la túnica albugínea.

El cerdo número 3 presentó alteraciones en su espermatobioscopia y éstas se iniciaron a partir del 21. Las anomalías persistieron hasta el día 30 (que correspondió al momento del sacrificio); este animal nunca perdió la libido. El volumen del eyaculado

fue normal, pero la cuenta espermática fue nula en el día 30 de infección. A la necropsia, en ambos epidídimos existieron granulomas prominentes. En este animal el testículo izquierdo pesó 30% más que el derecho.

El cerdo número 4 fue el último en sacrificarse en este grupo. Su evaluación espermática corresponde a la de un animal normal, sus valores no se vieron alterados; sin embargo, a la necropsia se observaron múltiples granulomas en epidídimo, de 0.5-1.0 cm.

### *Hematología.*

Los animales de ambos grupos no mostraron diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en ninguna de las variables analizadas, tampoco se observó alteración alguna durante la primera semana de infección. En el segundo grupo de animales se tiene mayor número de datos antes de la inoculación y tampoco se observó variación en los valores hemáticos. En algunas otras infecciones virales del cerdo es factible observar leucopenia pero en esta infección viral no se observó esta situación.

Para los valores hemáticos se estableció una curva de regresión entre el tiempo como variable independiente y cada uno de los valores hemáticos como variable dependiente.

Los resultados para cada grupo están en los Cuadros 4, 5, 6 y 7.

**Cuadro 4. Biometría hemática de verracos infectados con el virus de la EOA. Grupo 1.**

| Días pi | n | Leucocitos<br>10 <sup>3</sup> | Eritrocitos<br>10 <sup>6</sup> | Hemoglobina<br>g/dl | Hematocrito<br>% |
|---------|---|-------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------|
| 0       | 3 | 15.633 +/- 0.393              | 8.590 +/- 0.349                | 15.233 +/- 0.664    | 49.933 +/- 2.202 |
| 5       | 3 | 15.300 +/- 1.277              | 8.353 +/- 0.627                | 15.500 +/- 0.289    | 50.500 +/- 1.150 |
| 11      | 3 | 14.186 +/- 1.418              | 8.267 +/- 0.890                | 15.171 +/- 1.514    | 49.486 +/- 5.055 |
| 17      | 3 | 19.233 +/- 2.126              | 6.617 +/- 1.053                | 13.700 +/- 0.586    | 37.667 +/- 6.766 |
| 30      | 2 | 14.700 +/- 2.500              | 8.150 +/- 0.350                | 15.000 +/- 0.500    | 50.000 +/- 1.500 |
| 35      | 2 | 13.150 +/- 0.750              | 8.510 +/- 0.790                | 16.400 +/- 0.500    | 49.800 +/- 0.900 |
| 45      | 3 | 18.933 +/- 3.129              | 8.287 +/- 1.021                | 15.900 +/- 1.102    | 58.000 +/- 4.661 |

Días pi: días posinoculación.

n: número de animales.

Valores medios +/- error estándar

**Cuadro 5. Biometría hemática de verracos infectados con el virus de la EOA. Grupo 1.**

| Días pi | n | Plaquetas<br>10 <sup>3</sup> | Volumen<br>corpúscular medio/fl | Linfocitos<br>%  | Linfocitos<br>10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> |
|---------|---|------------------------------|---------------------------------|------------------|------------------------------------------------|
| 0       | 3 | 105.000 +/- 15.011           | 58.100 +/- 0.208                | 63.967 +/- 2.019 | 9.967 +/- 0.917                                |
| 5       | 3 | 184.000 +/- 30.105           | 60.933 +/- 3.384                | 74.367 +/- 3.243 | 11.267 +/- 0.921                               |
| 11      | 3 | 189.143 +/- 35.924           | 60.086 +/- 1.874                | 78.686 +/- 1.985 | 11.100 +/- 1.031                               |
| 17      | 3 | 572.333 +/- 212.97           | 56.500 +/- 1.385                | 58.000 +/- 3.403 | 11.233 +/- 1.770                               |
| 30      | 2 | 125.000 +/- 40.000           | 61.400 +/- 0.800                | 76.650 +/- 3.550 | 11.300 +/- 2.400                               |
| 35      | 2 | 226.000 +/- 123.00           | 59.900 +/- 5.700                | 56.000 +/- 1.200 | 7.250 +/- 1.050                                |
| 45      | 3 | 128.333 +/- 16.737           | 70.767 +/- 3.055                | 72.467 +/- 3.656 | 13.500 +/- 1.572                               |

Días pi: días posinoculación

n: número de animales

Valores medios +/- error estándar

**Cuadro 6. Biometría hemática de verracos infectados con el virus de la EOA. Grupo 2.**

| Días pi | n | Leucocitos<br>10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> | Eritrocitos<br>10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> | Hemoglobina<br>g/dl | Hematocrito<br>% |
|---------|---|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------|------------------|
| -60     |   | 10.25 +/- 2.05                                 | 6.74 +/- 1                                      | 12.7 +/- 1.85       | 44.47 +/- 5.14   |
| -30     | 5 | 14.12 +/- 3.71                                 | 7.22 +/- 0.03                                   | 15.08 +/- 1.05      | 46.66 +/- 2.17   |
| -15     |   | 14.45 +/- 4.37                                 | 7.17 +/- 0.1                                    | 15.52 +/- 1.1       | 47.05 +/- 2      |
| -2      | 4 | 11.42 +/- 4.39                                 | 6.65 +/- 1.33                                   | 13.45 +/- 2.98      | 42.42 +/- 4.12   |
| 6       | 4 | 12.92 +/- 1.77                                 | 7.16 +/- 0.18                                   | 14.62 +/- 1.30      | 45.82 +/- 2.70   |
| 12      | 2 | 13.65 +/- 1.06                                 | 7.03 +/- 0.02                                   | 14.90 +/- 0.141     | 46.80 +/- 1.13   |
| 19      | 3 | 15.06 +/- 1.02                                 | 7.49 +/- 5.76                                   | 16.20 +/- 0.790     | 47.03 +/- 2.97   |
| 25      | 4 | 10.95 +/- 1.44                                 | 6.95 +/- 0.55                                   | 14.37 +/- 2.08      | 43.57 +/- 4.52   |
| 39      | 4 | 13.30 +/- 1.55                                 | 7.03 +/- 0.51                                   | 14.65 +/- 1.54      | 46.15 +/- 3.15   |
| 47      | 4 | 14.70 +/- 1.60                                 | 7.14 +/- 0.37                                   | 14.30 +/- 0.31      | 44.20 +/- 1.51   |
| 64      | 4 | 11.07 +/- 2.83                                 | 6.75 +/- 0.76                                   | 13.72 +/- 0.74      | 40.00 +/- 2.59   |

Días pi: días posinoculación.

n: número de animales.

Valores medios +/- error estándar

**Cuadro 7. Biometría hemática de verracos infectados con el virus de la EOA. Grupo 2.**

| Días pi | n | Plaquetas<br>10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> | Volumen corpuscular<br>medio/fl | Linfocitos<br>%             | Linfocitos 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> |
|---------|---|-----------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|
| -60     | 4 | 147.5 <sup>+</sup> /-22.4                     | 61.2 <sup>+</sup> /-3.6         | 56.8 <sup>+</sup> /- 13.21  | 9.5 <sup>+</sup> /-0.81                     |
| -30     | 5 | 147 <sup>+</sup> /- 20.78                     | 62.80 <sup>+</sup> /- 2.86      | 65.82 <sup>+</sup> /- 15.41 | 11.52 <sup>+</sup> /- 2.00                  |
| -15     | 4 | 150 <sup>+</sup> /-19.88                      | 58.17 <sup>+</sup> /-3.6        | 65.3 <sup>+</sup> /-14.61   | 11.92 <sup>+</sup> /-1.55                   |
| -2      | 4 | 151 <sup>+</sup> /- 25.62                     | 66.50 <sup>+</sup> /- 3.87      | 57.60 <sup>+</sup> /- 13.98 | 9.45 <sup>+</sup> /- 0.50                   |
| 6       | 4 | 159 <sup>+</sup> /- 22.20                     | 65.25 <sup>+</sup> /- 3.77      | 58.17 <sup>+</sup> /- 8.44  | 9.42 <sup>+</sup> /- 1.69                   |
| 12      | 2 | 120 <sup>+</sup> /- 4.24                      | 65.00 <sup>+</sup> /- 1.41      | 72.05 <sup>+</sup> /- 2.47  | 12.10 <sup>+</sup> /- 0.28                  |
| 19      | 3 | 131 <sup>+</sup> /- 16.86                     | 62.66 <sup>+</sup> /- 4.04      | 79.76 <sup>+</sup> /- 1.33  | 15.00 <sup>+</sup> /- 2.21                  |
| 25      | 4 | 141 <sup>+</sup> /- 18.42                     | 60.50 <sup>+</sup> /-1.73       | 61.5 <sup>+</sup> /- 2.10   | 10.22 <sup>+</sup> /- 1.82                  |
| 39      | 4 | 152 <sup>+</sup> /- 30.80                     | 64.50 <sup>+</sup> /- 2.64      | 62.17 <sup>+</sup> /- 12.57 | 10.40 <sup>+</sup> /- 1.86                  |
| 47      | 4 | 135 <sup>+</sup> /- 20.31                     | 62.02 <sup>+</sup> /- 3.48      | 60.37 <sup>+</sup> /- 4.46  | 11.75 <sup>+</sup> /- 3.12                  |
| 64      | 4 | 154 <sup>+</sup> /- 26.25                     | 59.52 <sup>+</sup> /- 2.98      | 63.42 <sup>+</sup> /- 8.32  | 10.22 <sup>+</sup> /- 1.82                  |

Días pi: días posinoculación.

N: número de animales.

Valores medios <sup>+</sup>/- error estándar.

Las curvas de regresión para cada valor hemático se presentan en el Cuadro 8. Estos valores carecen de un valor significativo para la correlación ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 8. Regresión y correlación entre el tiempo de infección y los valores hemáticos de verracos inoculados con el virus de la EOA.**

| Leucocitos<br>10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> | NS para r      | Eritrocitos<br>10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> | NS para r      | Hgb<br>g/dl                  | NS para r      | Ht<br>%                                              | NS para r      |
|------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|------------------------------------------------------|----------------|
| 1-grupo                                        | NO<br>(P>0.05) | a=8.09<br>b=-3.04<br>r=0.05                     | NO<br>(P>0.05) | a=15.05<br>b=-.007<br>r=.11  | NO<br>(p>0.05) | a=45.96<br>b=0.170<br>r=.43                          |                |
| a= 15.04                                       |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| b= 0.065                                       |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| r= 0.30                                        |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| 2- grupo                                       | NO<br>(p>0.05) | a=7.01<br>b=5.39<br>r=0.07                      | NO<br>(p>0.05) | a=14.45<br>b=4.48<br>r=0.16  | NO<br>(p>0.05) | a=45.48<br>b=-0.01<br>r=-0.14                        | NO<br>(p>0.05) |
| a=12.18                                        |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| b=6.97                                         |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| r= 0.30                                        |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| VCM<br>fl                                      | NS para r      | Plaquetas                                       | NS para r      | Linfoci-<br>tos/%            | NS             | Linfoci-<br>tos/10 <sup>3</sup> /<br>mm <sup>3</sup> | NS para r      |
| 1-grupo                                        | NO<br>(P>0.05) | a=239.27<br>b=-1.37<br>r= -0.14                 | NO<br>(P>0.05) | a=69.1<br>b=-0.02<br>r=-0.04 | NO<br>(P>0.05) | a=10.26<br>b=0.04<br>r=0.30                          |                |
| a= 56.64                                       |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| b= 0.25                                        |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| r= 0.45                                        |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| 2- grupo                                       | NO<br>(P>0.05) | a=144.5<br>b=-0.03<br>r=-0.09                   | NO<br>(P>0.05) | a=63.60<br>b=0.03<br>r=0.16  | NO<br>(P>0.05) | a=11.13<br>b=8.74<br>r=0.16                          | NO<br>(P>0.05) |
| a=62.56                                        |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| b=.0013                                        |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |
| r= 0.018                                       |                |                                                 |                |                              |                |                                                      |                |

NS= Nivel de significancia

### Serología.

En las muestras analizadas, se detectó la presencia de anticuerpos hasta el día 10 de infección, con títulos bajos a través de las técnicas de IHA y VSN. Los niveles de anticuerpos se mantuvieron altos después del día 19 (Cuadros 9 y 10).

**Cuadro 9.** Inhibición de la hemaglutinación (IHA) y virus seroneutralización(VSN) de verracos inoculados experimentalmente con el virus de la EOA, Grupo 1

| Día pi | n | Título IHA*   | Título VSN     |
|--------|---|---------------|----------------|
| -10    | 5 | 0             | 0              |
| 0      | 5 | 0             | 0              |
| 3      | 4 | 0             | 0              |
| 5      | 4 | 0             | 0              |
| 10     | 3 | 3.66 +/- 0.57 | 2.00 +/- 2.00  |
| 15     | 3 | 6.33 +/- 1.52 | 5.66 +/- 4.16  |
| 30     | 2 | 7.00 +/- 1.41 | 10.50 +/- 2.12 |
| 38     | 1 | 6             | 9              |
| 45     | 1 | 8             | 10             |

Día pi: días posinoculación.

N: número de muestras.

Valor promedio +/- error estándar

\*Todos los resultados están transformados a Log base 2.

**Cuadro 10.** Inhibición de la hemaglutinación (IHA) y virus seroneutralización (VSN) de verracos inoculados con el virus de la EOA, Grupo 2.

| Día pi | n | Título IHA*   | Título VSN*   |
|--------|---|---------------|---------------|
| -60    | 5 | 0             | 0             |
| -30    | 5 | 0             | 0             |
| -15    | 5 | 0             | 0             |
| 5      | 4 | 0             | 3             |
| 13     | 4 | 2.75 +/- 3.77 | 6.25 +/- 2.50 |
| 19     | 3 | 5.60 +/- 2.00 | 6.66 +/- 2.08 |
| 27     | 4 | 6.25 +/- 1.70 | 9.00 +/- 2.94 |
| 33     | 4 | 5.75 +/- 1.50 | 7.75 +/- 1.50 |
| 47     | 4 | 6.25 +/- 0.95 | 6.75 +/- 1.50 |
| 61     | 4 | 6.00 +/- 1.41 | 7.25 +/- 1.70 |

Día pi: días posinoculación.

N: número de muestras.

Valor promedio +/- error estándar.

\*Todos los resultados están transformados a Log base 2.

**Cuadro 11. Regresión y correlación entre el tiempo y los valores serológicos de la inhibición de la hemaglutinación y virus seroneutralización.**

| 1- Grupo |           |        |           |
|----------|-----------|--------|-----------|
| IHA      | NS para r | VSN    | NS para r |
| a= 0.92  |           | a=0.07 |           |
| b=0.16   | SI        | b=0.25 | SI        |
| r=0.89   | (P<0.05)  | r=0.94 | (P<0.05)  |

| 2- Grupo |          |        |           |
|----------|----------|--------|-----------|
| IHA      | NS       | VSN    | NS para r |
| a= 2.56  |          | a=3.82 |           |
| b=0.06   | SI       | b=0.08 | SI        |
| r=0.85   | (P<0.05) | r=0.86 | (P<0.05)  |

A través de una tabla de contingencia de 2 x 2 y considerando la prueba de VSN como técnica de referencia se calculó la sensibilidad y especificidad. Los valores para ambas fueron de 91% y 89%, respectivamente (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Comparación de las pruebas de VSN e IHA a partir de sueros de verracos inoculados experimentalmente con el virus de la EOA.**

| Virus seroneutralización |          |          |       |
|--------------------------|----------|----------|-------|
| Inhibición de la HA      | Positivo | Negativo | Total |
| Positivos                | 31       | 4        | 35    |
| Negativos                | 3        | 35       | 38    |
| Total                    | 34       | 39       | 73    |

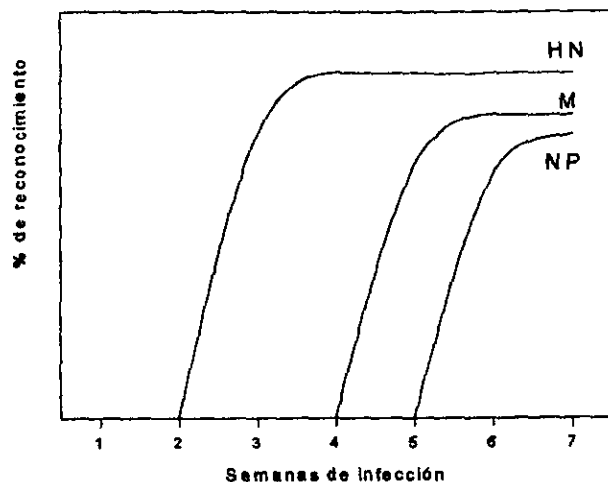
Sensibilidad, 91%.

Especificidad, 89%.

### *Inmunotransferencias.*

Se identificaron las proteínas virales a través de inmunoglobulinas que generaron los cerdos infectados.

Los resultados indican que la proteína inmunodominante del virus de la EOA es la hemaglutinina- neuraminidasa (HN). A partir de la segunda semana esta proteína fue reconocida por todos los sueros; en la cuarta semana los anticuerpos reconocieron, además, a la proteína M; en la quinta semana de infección, reconocieron a la proteína NP (Figura 6).



**Figura 6 .** Porcentajes de reconocimiento de las proteínas del virus de la EOA. Después de realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS. Las proteínas virales se transfirieron a papel de nitrocelulosa, se bloquearon y cortaron en tiras de 0.5 cm de ancho. Las tiras se incubaron con los sueros de cuatro cerdos con diferentes tiempos de infección y con un anti-IgG de cerdo biotinilado, posteriormente se incubaron con estreptavidina-peroxidasa y se revelaron con 4-cloroalfanaftol. La reacción se detuvo lavando exhaustivamente con agua.



### Respuesta proliferativa.

a) Respuesta proliferativa de células mononucleares (CMN) en presencia del virus de la Enfermedad del Ojo Azul.

La inducción de la respuesta proliferativa de las células mononucleares ante la presencia del virus de la EOA fue muy evidente en la segunda semana de infección. La respuesta más importante la alcanza en la cuarta semana, con valores de 14 I.E. Los valores disminuyeron gradualmente en las siguientes semanas del experimento. La estimulación de células mononucleares de cerdos testigos con el antígeno viral no indujo incremento alguno en los valores basales de proliferación (Figura 7).

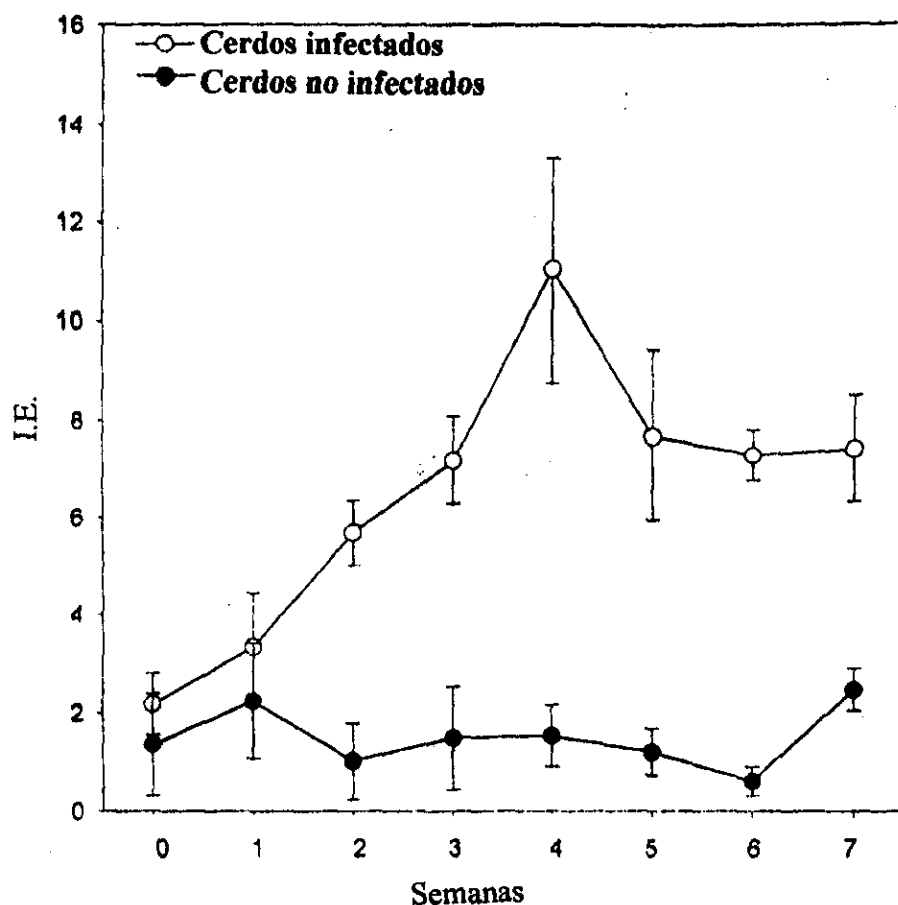
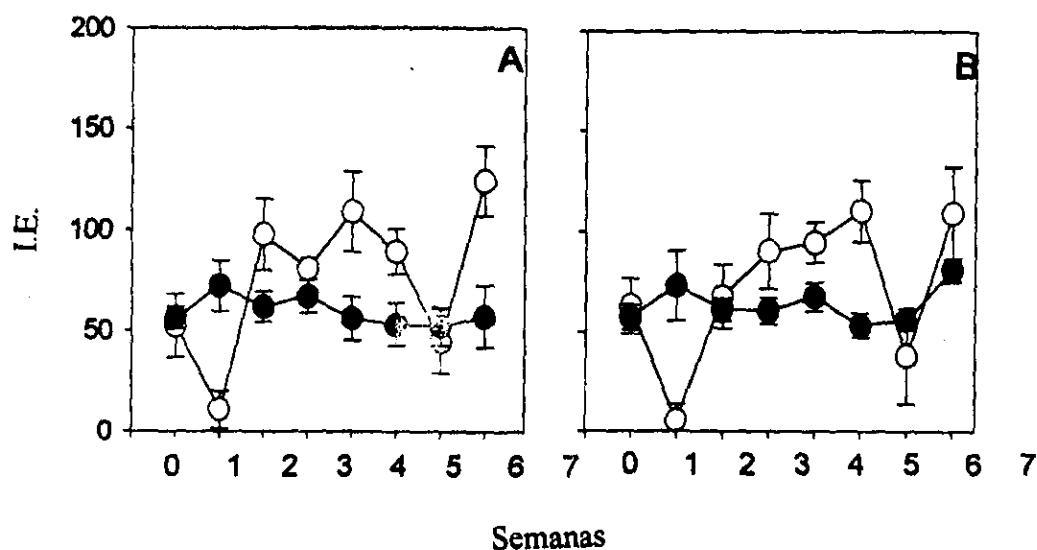


Figura 7. Respuesta proliferativa de células mononucleares. Cada semana se separaron células mononucleares. Se estimularon durante 72 h con el virus de la enfermedad del ojo azul (10-12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se marcaron con  $1\mu$  de  $^3\text{HdTR}$  durante las últimas 18 h. Los resultados representan la media  $\pm$  y la desviación estándar de los índices de estimulación, de los ensayos que se realizaron por triplicado.

b) Respuesta proliferativa de células mononucleares inducida por P.H.A. y Con A.

La respuesta proliferativa después de estimular a las células mononucleares con PHA y con Con-A de cerdos no infectados fue de 40 a 80 I.E. En los cerdos infectados esta respuesta fue irregular, debido a que existieron incrementos y decrementos de los valores durante el seguimiento cronológico.

Durante la primera semana se presentó un decremento inferior a 20 I.E. Entre la segunda y quinta semanas los valores fueron superiores a 80 I.E., posteriormente descendieron durante la sexta semana (Figura 8).



**Figura 8.** Respuesta proliferativa de células mononucleares a Con A (A) y PHA (B). Los puntos representan la media y desviación estándar de los índices de estimulación. Los ensayos se realizan por triplicado. El tiempo de estimulación fue de 72 h. En las últimas 18 h las células se marcaron con timidina tritiada. Los círculos claros corresponden a las células de siete cerdos infectados. Los círculos oscuros corresponde a células de tres cerdos no infectados.

### *Citometría de flujo.*

a) Marcaje fenotípico de las poblaciones celulares linfocitos T, linfocitos B y macrófagos de sangre periférica de animales infectados con el virus de la EOA.

Los valores que se obtuvieron una semana antes de la infección para los tres diferentes tipos celulares, fueron similares tanto en los animales testigo como en los cerdos que estarían por infectarse.

Para las células linfocitos T los valores de los animales testigo oscilaron entre 39.0% y 41.5 %.(columna 1, Cuadro 13 ). El virus indujo la proliferación *in vivo* de las células T. Esta reacción fue evidente con base en los incrementos de los valores de las células T en los cerdos infectados. Antes de la infección los cerdos inoculados tuvieron un valor de 39.0% en esta población linfocitaria. Durante la infección, los porcentajes oscilaron entre 44.7% y 50.2% (columna 2, Cuadro13).

En la población de linfocitos B, los resultados que se obtuvieron en los cerdos no infectados fueron de 25.6% a 29.0% (columna 3, Cuadro13). En los animales inoculados también se observó que antes de la infección, los valores eran similares a los animales testigo; sin embargo en la tercera y cuarta semanas de infección se observó un decremento entre el 19.1% y 16%, respectivamente (columna 4, Cuadro13).

La población de monocitos tuvo valores entre 14.6% y 17.3% en los cerdos del grupo testigo (columna 5, Cuadro 13). Esta población celular tuvo mayor variación en los animales inoculados con respecto a las otras dos poblaciones analizadas. Durante la primera semana, los porcentajes se incrementaron a 32.6, después tuvieron un descenso en la segunda y tercera semanas en 8.24% y 7%, respectivamente. En la cuarta semana se recuperaron los porcentajes originales ( columna 6, Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Poblaciones celulares de sangre periférica. A partir de células mononucleares se determinó el porcentaje de linfocitos T, linfocitos B y monocitos. Las muestras se obtuvieron cada semana de 7 animales infectados (I) y de tres animales testigo (T).

| Semanas | T Linfocitos |          | B Linfocitos |           | Monocitos |           |
|---------|--------------|----------|--------------|-----------|-----------|-----------|
|         | T            | I        | T            | I         | T         | I         |
| 0       | 39.0±2.0     | 39.0±2.0 | 27.0±2.1     | 27.6±5.2  | 16.0±2.6  | 17.6±3.3  |
| 1       | 41.5±1.8     | 50.2±6.1 | 27.0±2.6     | 25.0±4.4  | 17.3±4.6  | *32.6±5.6 |
| 2       | 40.3±2.5     | 44.7±4.3 | 25.6±4.0     | 29.5±3.2  | 16.5±4.9  | 8.24±4.4  |
| 3       | 39.3±3.0     | 32.7±3.3 | 27.0±2.0     | 19.1±3.6  | 16.3±2.3  | 7.7±4.6   |
| 4       | 41.0±3.0     | 48.7±2.7 | 29.0±2.7     | *16.0±4.9 | 14.6±2.3  | 12.3±4.2  |

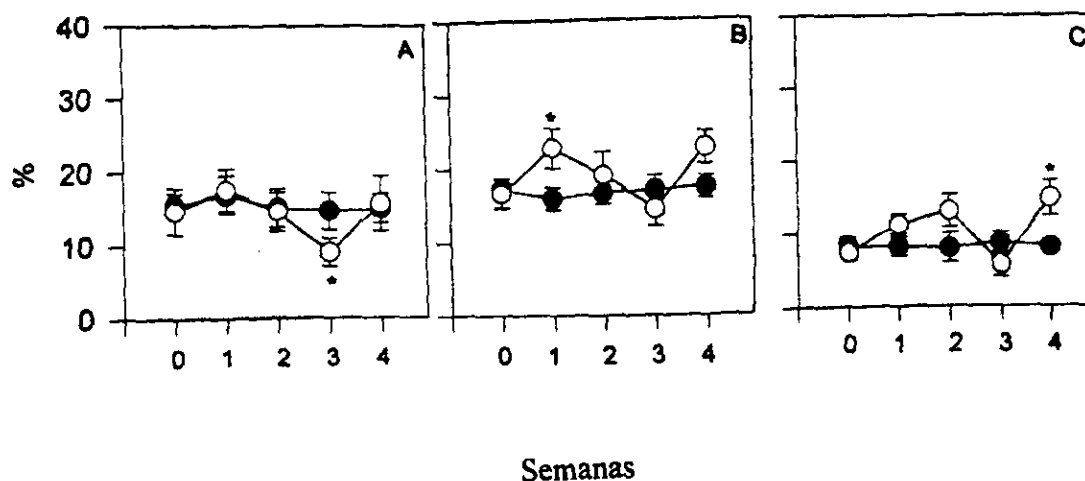
b) Marcaje fenotípico de las subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.

Al comparar los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> de los animales testigo con los porcentajes de los linfocitos de los animales antes de la inoculación, se observó que aquellos eran similares.

En la población de linfocitos CD4<sup>+</sup> de los animales inoculados no se observó variación con respecto a los linfocitos de los animales no infectados con excepción de la tercera semana (Figura 9 A).

Los porcentajes de linfocitos CD8<sup>+</sup> durante las primeras semanas de infección fueron superiores a los porcentajes de linfocitos CD8<sup>+</sup> que tuvieron los animales testigo. En la tercera semana de infección descienden estos valores, pero en la cuarta semana nuevamente se incrementan (Figura 9 B).

La población de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> de los animales inoculados tuvieron un comportamiento similar a los linfocitos CD8<sup>+</sup>. En las dos primeras semanas de infección tuvieron incrementos superiores a los linfocitos de los animales testigo, pero en la tercera semana descendieron. En la última semana se incrementaron los porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Figura 9 C).



**Figura 9.** Determinación de subpoblaciones de linfocitos T a través de citometría de flujo. Población de linfocitos CD<sub>4</sub><sup>+</sup> (A). Población de linfocitos CD<sub>8</sub><sup>+</sup> (B). Población de linfocitos CD<sub>4</sub><sup>+</sup> CD<sub>8</sub><sup>+</sup> (C). Los círculos claros corresponden a las células de siete cerdos infectados. Los círculos oscuros corresponden a células de tres cerdos no infectados.

### *Necropsia.*

Todos los animales fueron sacrificados humanitariamente con descarga eléctrica, se desangraron y posteriormente se les practicó la necropsia. A todos los animales, después de los 15 días de infección se les detectaron anticuerpos. En dos cerdos del primer grupo se observó ligera congestión en tonsilas (cerdos 1 y 2) y en tres de ellos congestión en meninges (cerdos 1, 2 y 3). Solo en un animal se observó opacidad corneal (cerdo 4).

Tres cerdos (1, 2 y 7) presentaban pequeñas áreas de consolidación de color rojo, en los lóbulos anteriores del pulmón.

Se recuperó abundante líquido serofibrinoso en la bolsa escrotal del animal que tenía 15 días de infección. Este líquido también se recuperó de los cerdos tres y cuatro (30 y 45 días de infección) pero fue escaso. En parénquima testicular se observó un área hemorrágica de aproximadamente 7 cm de diámetro (cerdo 3).

En epidídimo se observaron nódulos de 1-7 cm de diámetro. Su coloración era blanquecina o amarillenta. Estos nódulos estuvieron presentes desde el día 15 de infección, de ellos se recuperó material caseoso (Figura 10).

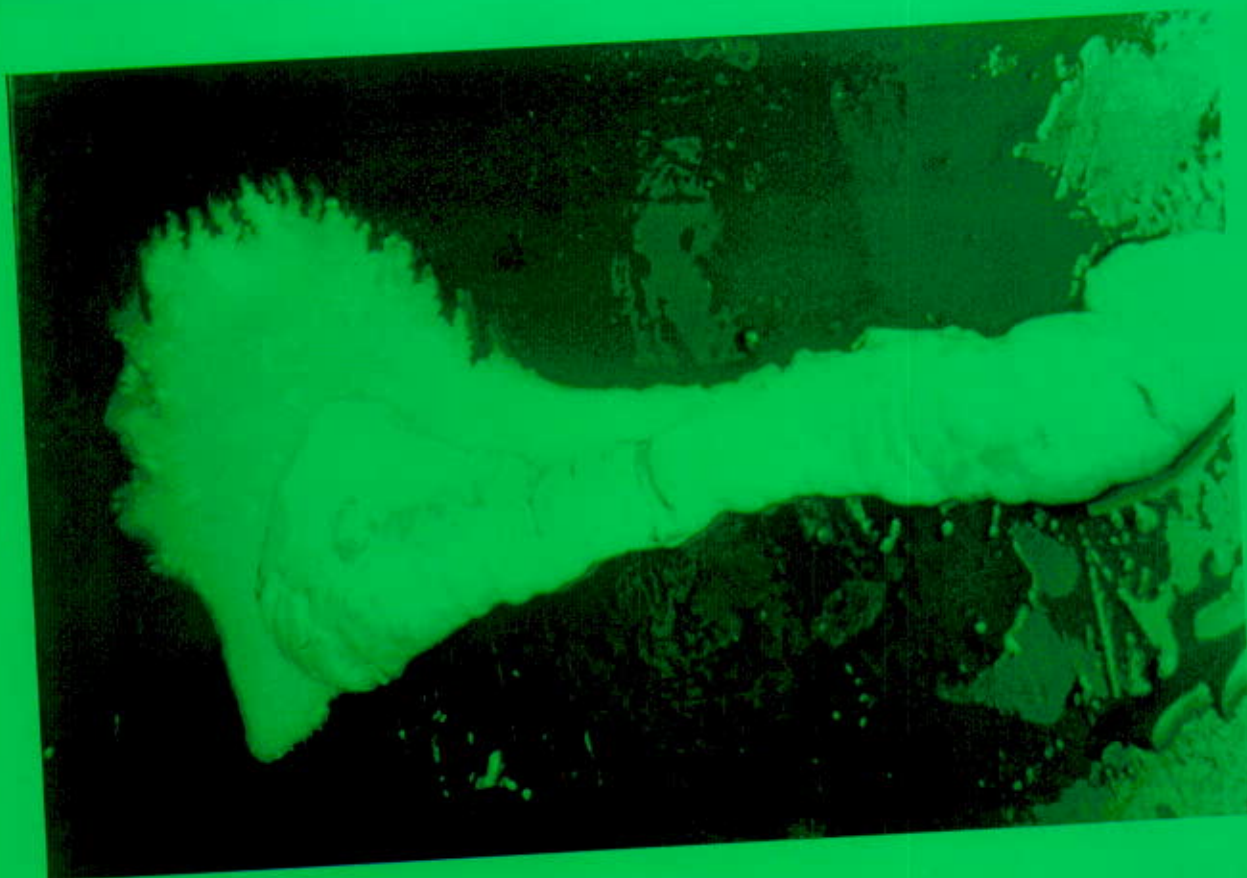


Figura 10. Presencia de material caseoso proveniente de cabeza de epidídimo, animal con 30 días de infección con el virus de la EOA

Cuadro 14. Lesiones macroscópicas en cerdos inoculados con el virus de la EOA.

| Identificación.                          | 1 | 2  | 3   | 4  | 5 | 6   | 7   | 8  | 9   | 10 |
|------------------------------------------|---|----|-----|----|---|-----|-----|----|-----|----|
| Días de infección.                       | 5 | 15 | 30  | 45 | 0 | 70  | 70  | 80 | 80  | 0  |
| Títulos de anticuerpos al sacrificio IHA | - | 16 | 256 | 64 | - | 128 | 512 | 32 | 256 | -  |
| Congestión de tonsilas.                  | + | +  | -   | -  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Congestión en meninges.                  | + | +  | +   | -  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Opacidad corneal.                        | - | -  | -   | +  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Áreas de consolidación oscura en pulmón. | + | +  | -   | -  | - | -   | +   | -  | -   | -  |
| Líquido serofibrinoso en bolsa escrotal. | - | ++ | +   | +  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Hemorragia testicular.                   | - | -  | +   | -  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Nódulos en epidídimo.                    | - | +  | ++  | +  | - | +   | +   | +  | +   | -  |

*Aislamientos virales.*

A partir del día 5 se logró aislar el virus de testículo, de epidídimo, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales, así como de encéfalo, tonsila, riñón, hígado y bazo. Después de ese día los aislamientos fueron menos frecuentes; sin embargo, se pudieron realizar hasta el día 45 de infección. No se pudieron realizar aislamientos en los días 70 y 80. Es notable que los aislamientos realizados en las glándulas bulbouretrales fueron constantes en las diferentes líneas celulares durante 45 días. Los resultados se presentan en el Cuadro 15.

**Cuadro 15.** Actividad hemaglutinante del sobrenadante de diversas líneas celulares, inoculadas con macerados de tejidos infectados con el virus de la EOA.

| CERDO        | 2 (5 dpi) |    |    | TEJIDO | 3 (15 dpi) |    |    | 4 (30 dpi) |    |    | 5 (45 dpi) |    |    |    |
|--------------|-----------|----|----|--------|------------|----|----|------------|----|----|------------|----|----|----|
|              | BT        | BK | PK |        | BT         | BK | PK | BT         | BK | PK | BT         | BK | PK |    |
| ENCÉFALO     | +         |    |    |        |            |    |    |            |    |    |            |    |    |    |
| TONSILA      | ++        | ++ | ++ | +      |            |    |    |            |    |    |            | +  |    |    |
| PULMÓN       |           |    |    |        |            |    |    |            |    |    | +          | +  |    |    |
| HÍGADO       | +         |    | ++ |        |            |    |    |            |    |    | ++         | +  | +  |    |
| BAZO         | +         |    | ++ |        |            |    | ++ |            |    |    |            |    | +  |    |
| RIÑÓN        | ++        |    | ++ |        |            |    |    |            | ++ |    |            |    |    |    |
| GANGLIO MED. |           |    |    |        |            |    |    |            |    |    | +          | +  | +  |    |
| TESTÍCULO    | ++        |    | +  |        |            |    |    |            |    | +  | +          |    |    |    |
| CABEZA EP.   | ++        |    | +  |        |            |    |    |            |    |    |            |    |    |    |
| CUERPO EP.   | +         |    | ++ |        |            |    |    |            |    |    |            |    | +  |    |
| COLA EP.     | +         |    | ++ |        | +          |    |    |            |    |    |            | +  |    |    |
| VES. SEMINAL | ++        |    | ++ |        |            |    |    |            |    |    |            |    |    |    |
| BULBOURETRAL | ++        | +  | ++ |        | ++         | ++ | ++ |            | ++ | ++ |            | ++ | +  | ++ |
| PRÓSTATA     | ++        | +  | +  |        | ++         |    | ++ |            |    |    |            | +  |    |    |

\*\* Actividad hemaglutinante muy evidente

\* Actividad hemaglutinante evidente

### *Histopatología.*

Los resultados de los análisis histológicos mostraron procesos degenerativos e inflamatorios, principalmente en testículos y epidídimos de los verracos infectados.

En dos de los animales sacrificados en corteza cerebral se observó gliosis difusa y moderada, satelitosis neuronofagia e infiltrado de linfocitos a nivel perivascular (cerdos 1 y 2) (Figura 11). En los cortes histológicos de pulmón, en tres cerdos (1, 2 y 7) se apreció un infiltrado multinodular de leve a moderado de linfocitos. La disposición de éstos era peribronquial. Sólo en un caso se observó en tejido renal un infiltrado multifocal moderado de linfocitos a nivel intersticial (cerdo 3)

A nivel de epidídimo, al inicio del proceso infeccioso se observó de leves a moderados cambios degenerativos, con vacuolización citoplásmica, cromatina granular en el núcleo y pérdida parcial de estereocilios (cerdo 2) (Figuras 12, 13, 14, 15 y 19).

Además se vio la presencia de espermatozoides en vasos sanguíneos (cerdo 2) (Figura 16).

También en epidídimo se observaron áreas de necrosis licuefactiva, rodeadas de un infiltrado de macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfocitos y plasmocitos (cerdos 2, 3 y 4) (Figuras 17 y 18).

A la necropsia y en testículo se observó un área hemorrágica en dos cerdos (3 y 8). A nivel microscópico, esta área presentaba como característica una degeneración en túbulos seminíferos con infiltración intersticial de células mononucleares. Los túbulos con degeneración contenían principalmente células sustentadoras o de Sertoli. Fue difícil observar la presencia de espermatogonias, espermatozoides primarios y secundarios, así como espermátides (Figura 20).

Después de formado el granuloma se observaron cambios reparativos consistentes en la formación de una cápsula fibrinosa con la proliferación de fibroblastos (cerdos 6, 7, 8 y 9).



**Cuadro 16.** Lesiones histológicas en cerdos inoculados con el virus de la EOA.

| Identificación                                                 | 1 | 2  | 3   | 4  | 5 | 6   | 7   | 8  | 9   | 10 |
|----------------------------------------------------------------|---|----|-----|----|---|-----|-----|----|-----|----|
| Días de infección                                              | 5 | 15 | 30  | 45 | 0 | 70  | 70  | 80 | 80  | 0  |
| Título de Ac a sacrificio (IHA)                                | - | 16 | 256 | 64 | - | 128 | 512 | 32 | 256 | -  |
| Encefalitis no supurativa                                      | + | +  | -   | -  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Neumonía linfoproliferativa                                    | + | +  | -   | -  | - | -   | +   | -  | -   | -  |
| Abundantes células intersticiales en testículo                 | - | -  | -   | +  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Nefritis intersticial no supurativa                            | - | -  | +   | -  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Vesículas seminales quísticas                                  | - | -  | +   | -  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Próstata granuloma                                             | - | -  | ++  | -  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Infiltración intersticial de células mononucleares (epidídimo) | - | ++ | ++  | ++ | - | +   | -   | -  | -   | -  |
| Granuloma espermático (epidídimo)                              | - | ++ | ++  | ++ |   |     |     |    |     | -  |
| Presencia de espermatozoides en capilares de epidídimo         | - | +  | -   | -  | - | -   | -   | -  | -   | -  |
| Degeneración y necrosis en túbulos seminíferos (epidídimo)     | - | ++ | ++  | ++ | - | -   | -   |    | -   | -  |
| Fibroplasia intersticial (epidídimo)                           |   | +  | +   | +  |   | ++  | ++  | ++ | ++  |    |
| Degeneración de túbulos seminíferos (testículo)                |   |    | +   |    |   |     |     | +  |     |    |
| Infiltración intersticial de células mononucleares (testículo) | - | -  | ++  | -  | - | -   | -   | ++ | -   | -  |

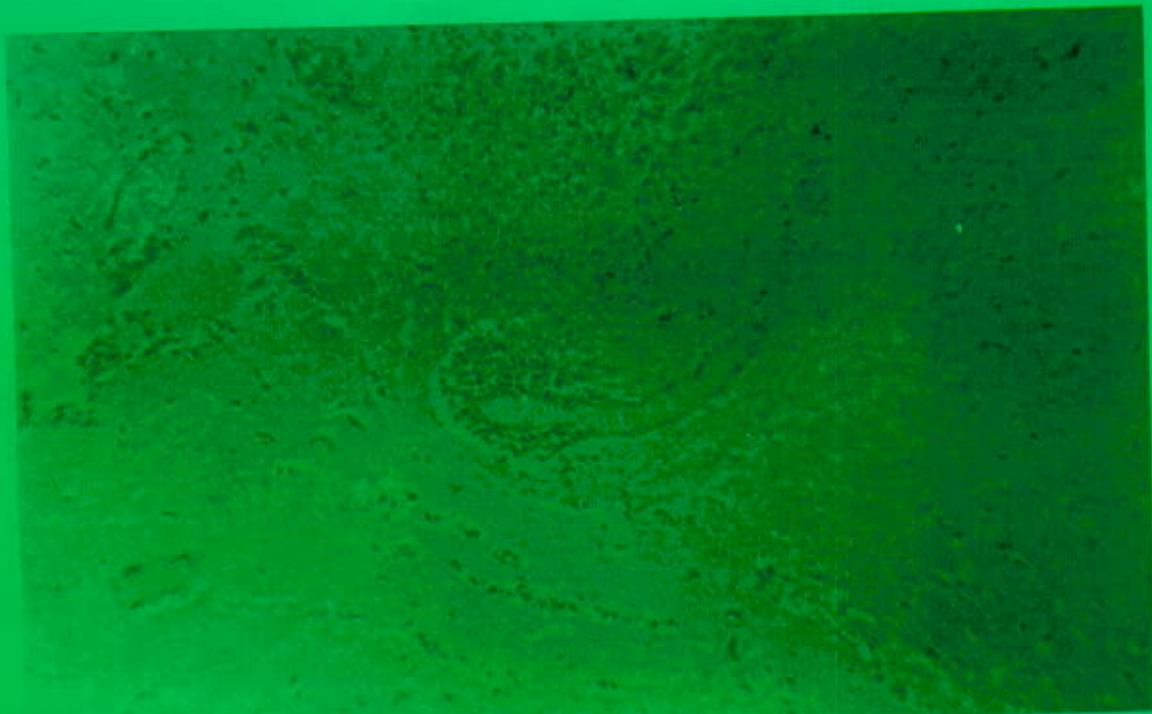


Figura 11. Infiltración linfocitaria perivascular con leve gliosis en un cerdo sacrificado a los cinco días de infección con el virus de la EOA, tinción con H.E. 100 X.

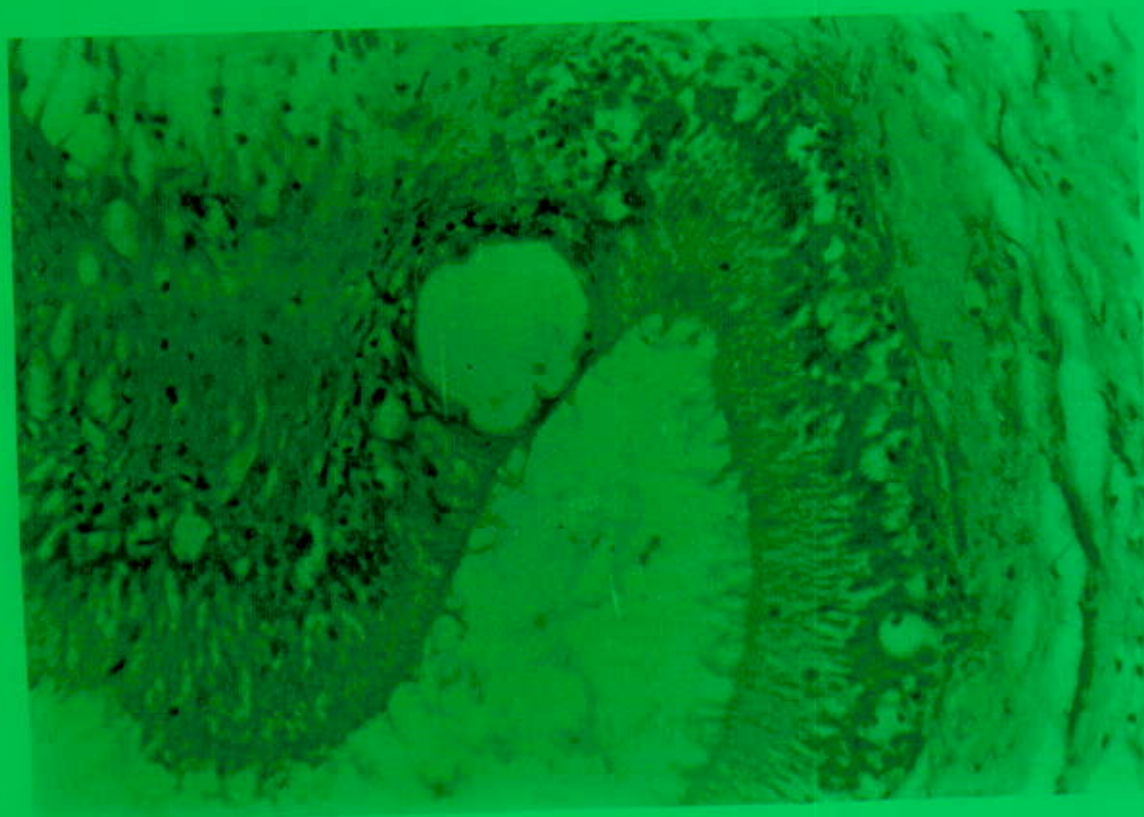


Figura 12. Vacuolización en epitelio seudoestratificado en epididimo, animal sacrificado a los 15 días de infección con el virus de la EOA. 100 X.

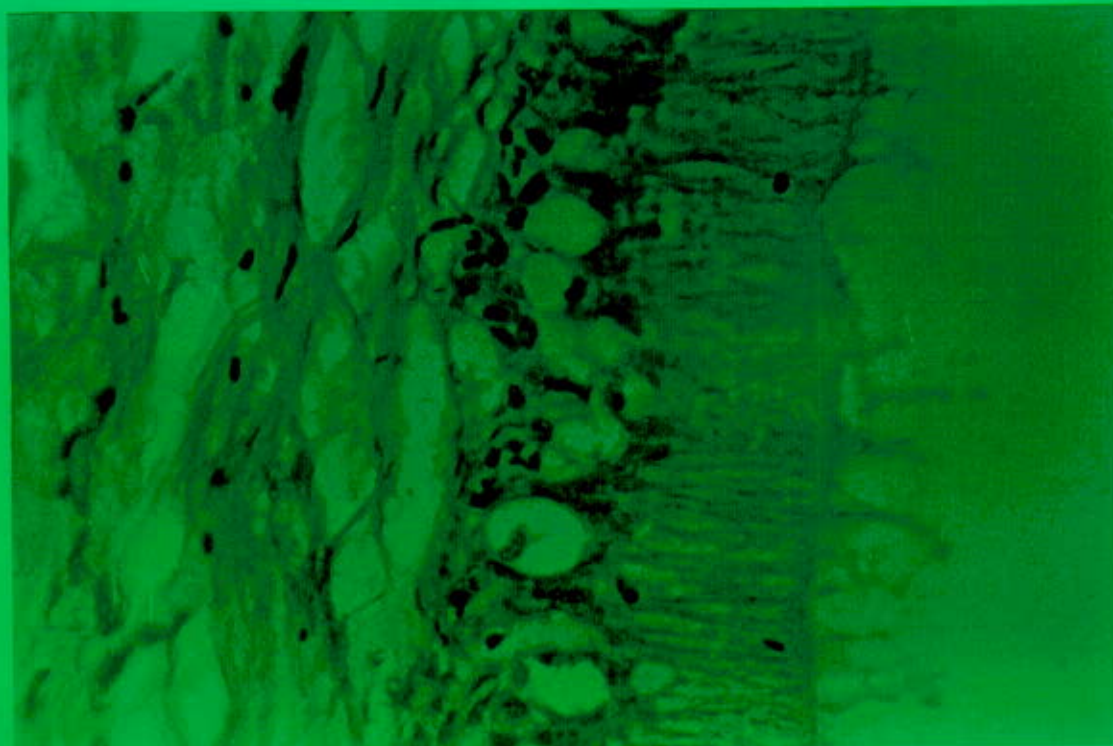


Figura 13 Detalle de la vacuolización del epididimo de un cerdo con 15 días de infección con el virus de la EOA. Tinción con HE. 400 X

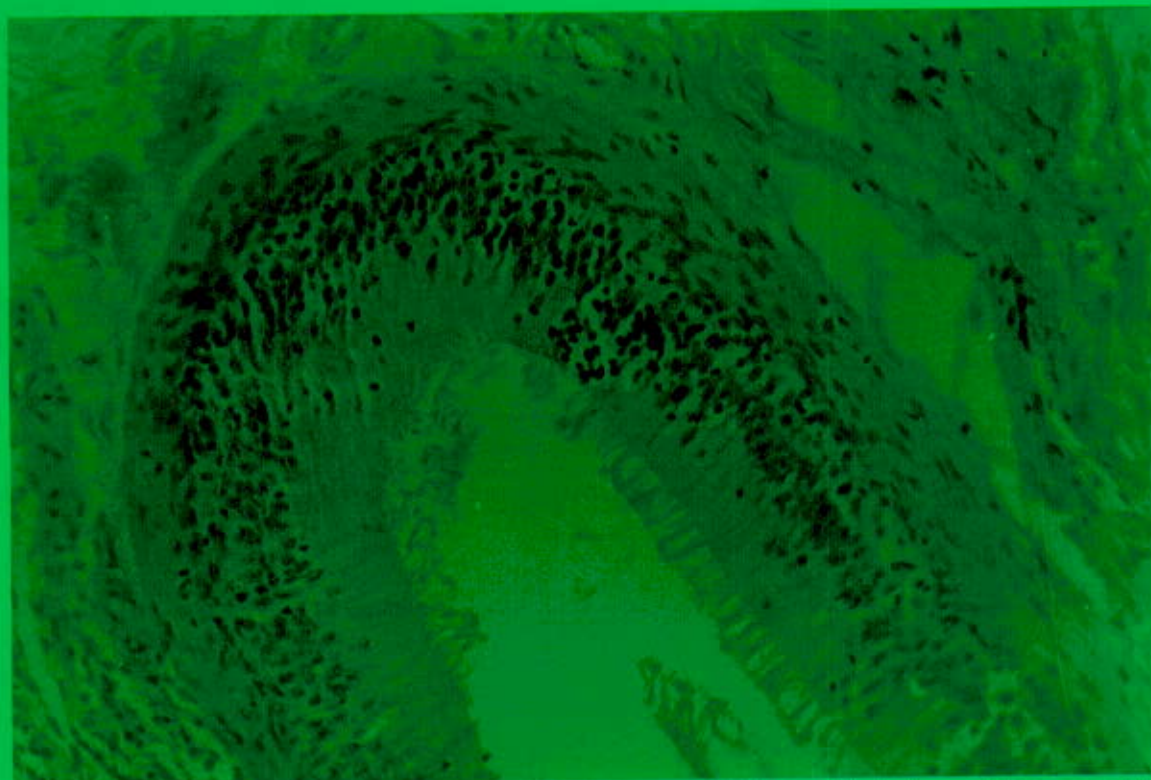


Figura 14. Células, inflamatorias (macrófagos, linfocitos) cerca de la luz del túbulo y pérdida parcial de estereocilios. Animal con 15 días de infección con el virus de la EOA. Tinción con HE. 100 X



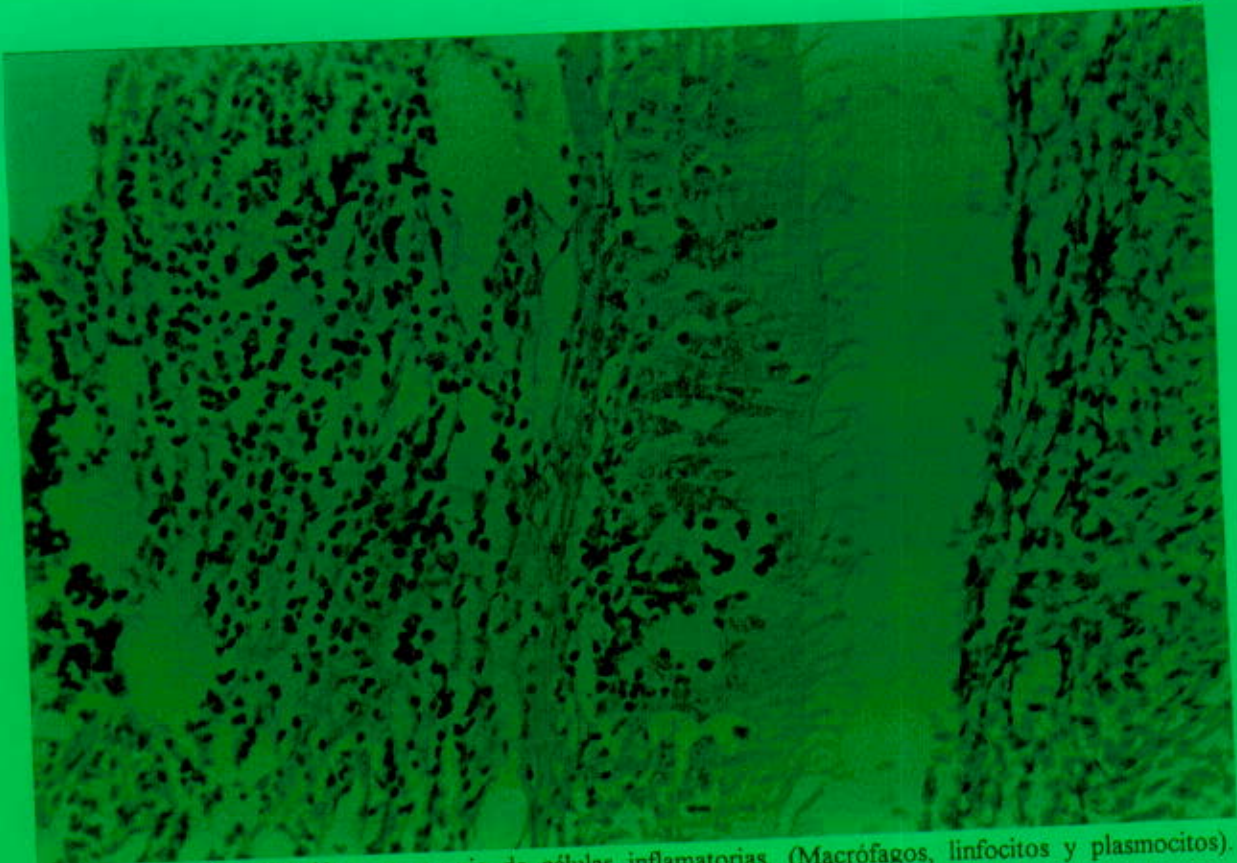


Figura 15. Vacuolización y presencia de células inflamatorias. (Macrófagos, linfocitos y plasmocitos). Animal con 15 días de infección con el virus de la EOA. Tinción con HE. 100 X

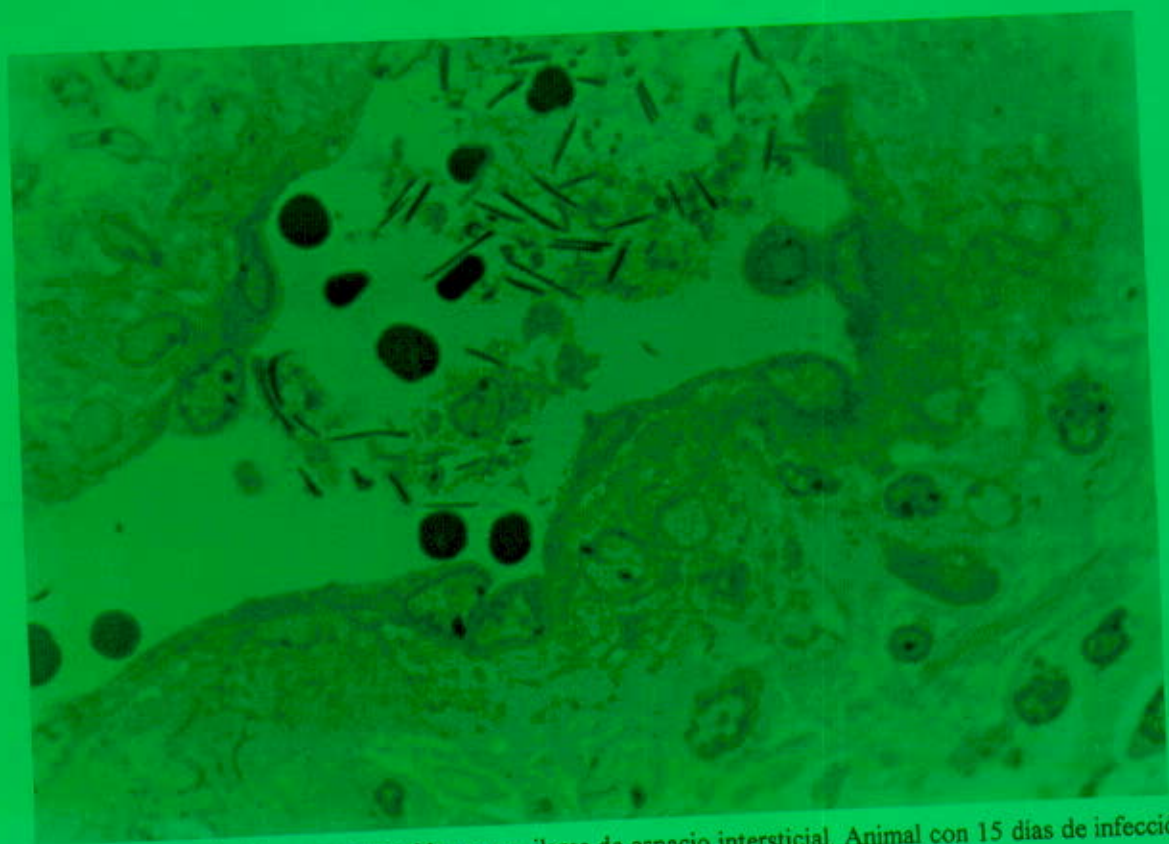


Figura 16. Presencia de espermatozoides en capilares de espacio intersticial. Animal con 15 días de infección con el virus de la EOA. Corte semifino. Tinción con azul de toluidina. 400 X



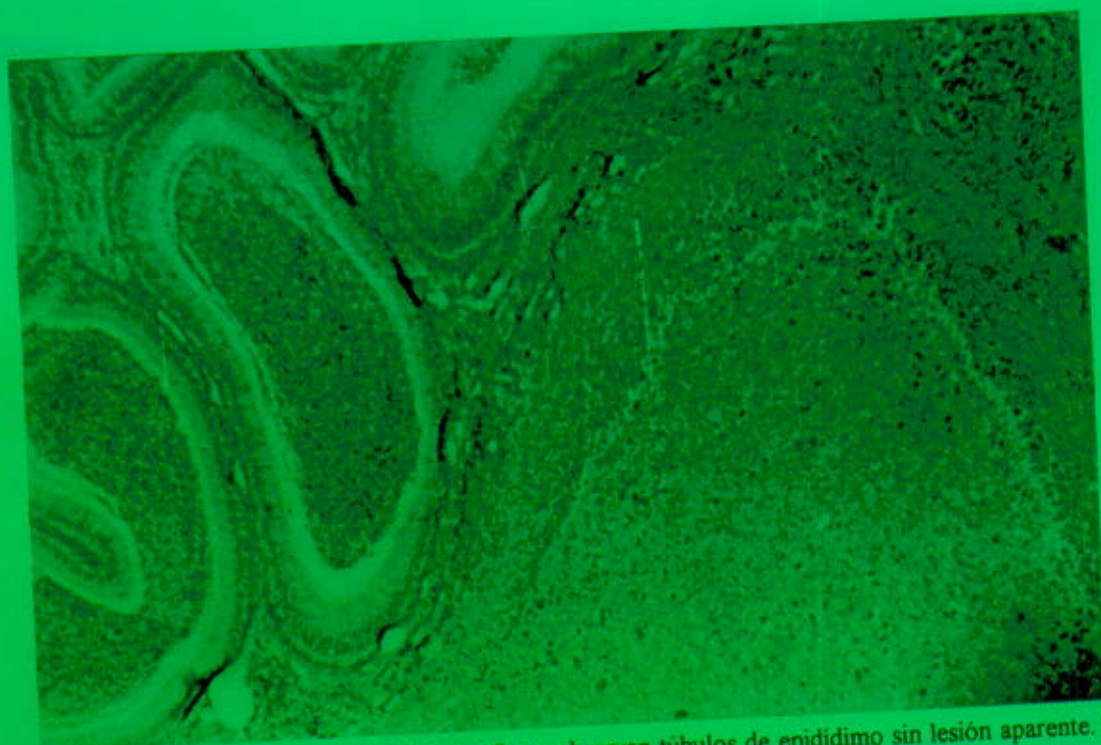


Figura 17. En la parte izquierda de la fotografía se observan túbulos de epidídimo sin lesión aparente. En la parte derecha se observa la presencia de un granuloma espermático. Animal con 30 días de infección con el virus de la EOA. Tinción con HE. 100 X.

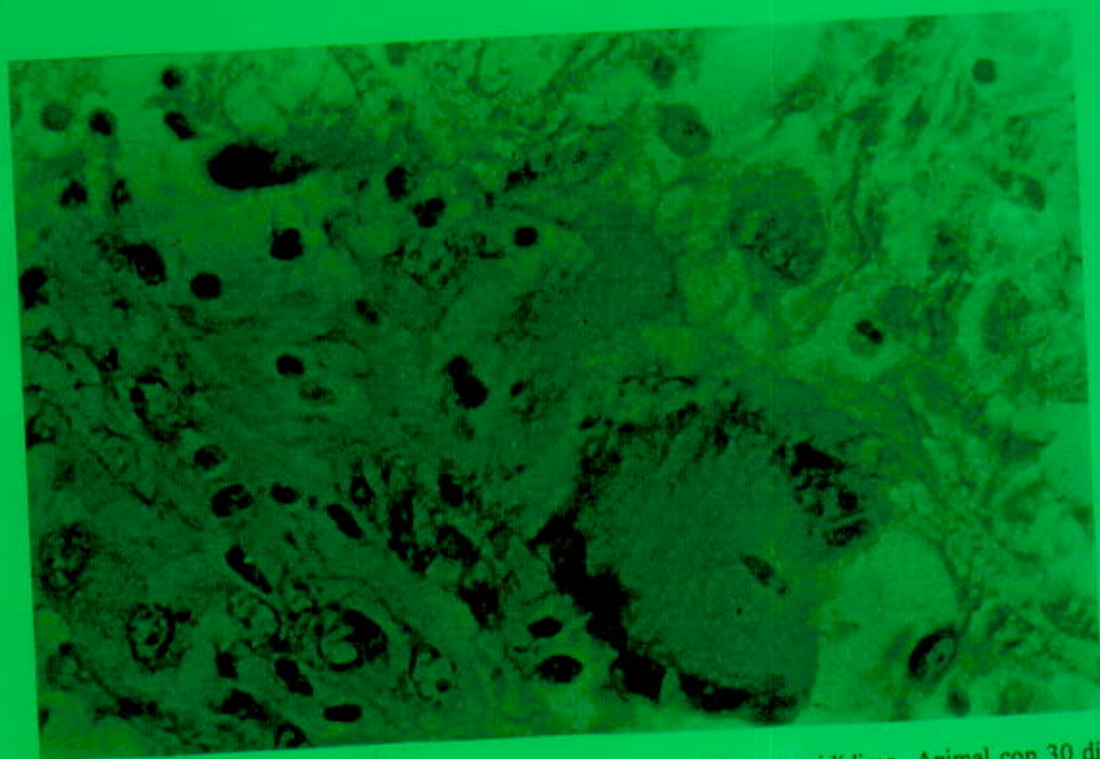


Figura 18. Presencia de células gigantes en el granuloma espermático en epidídimo. Animal con 30 días de infección con el virus de la EOA. Tinción con HE. 400 X.



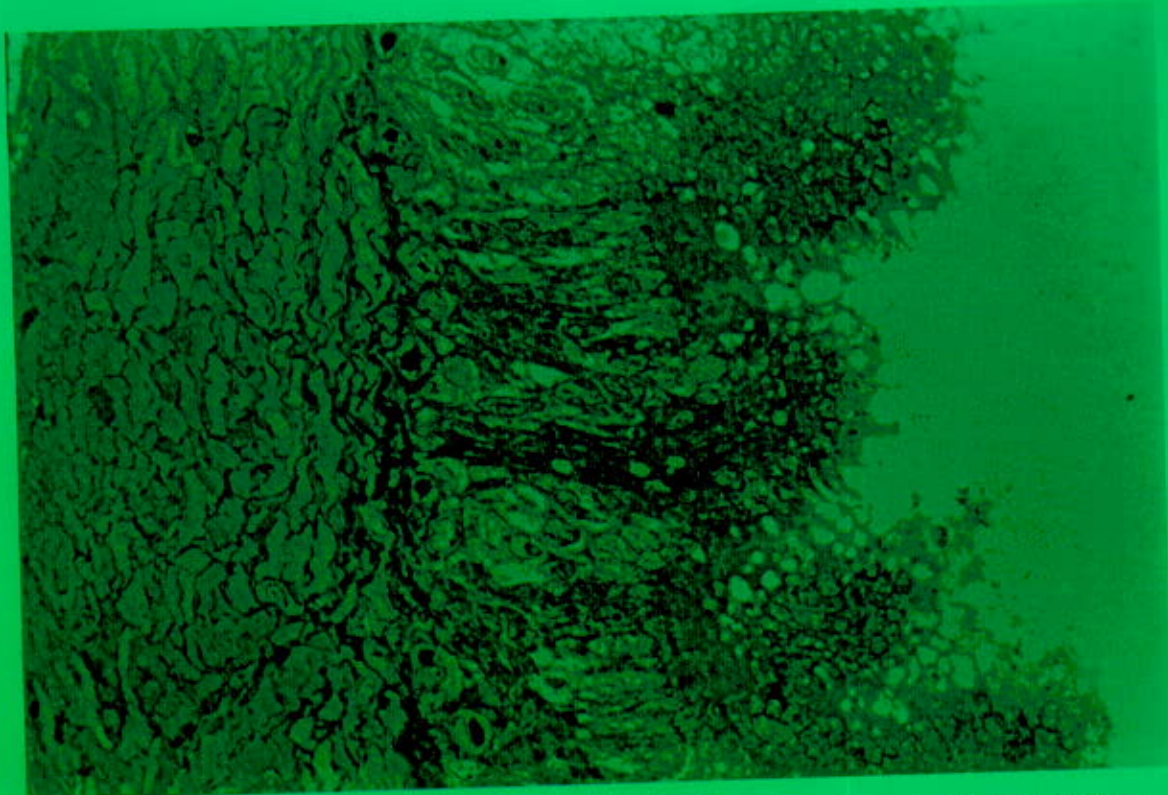


Figura 19. Pérdida de la conformación de estereocilios del epidídimo . Animal con 45 días de infección con el virus de la EOA. Tinción con HE. 400 X

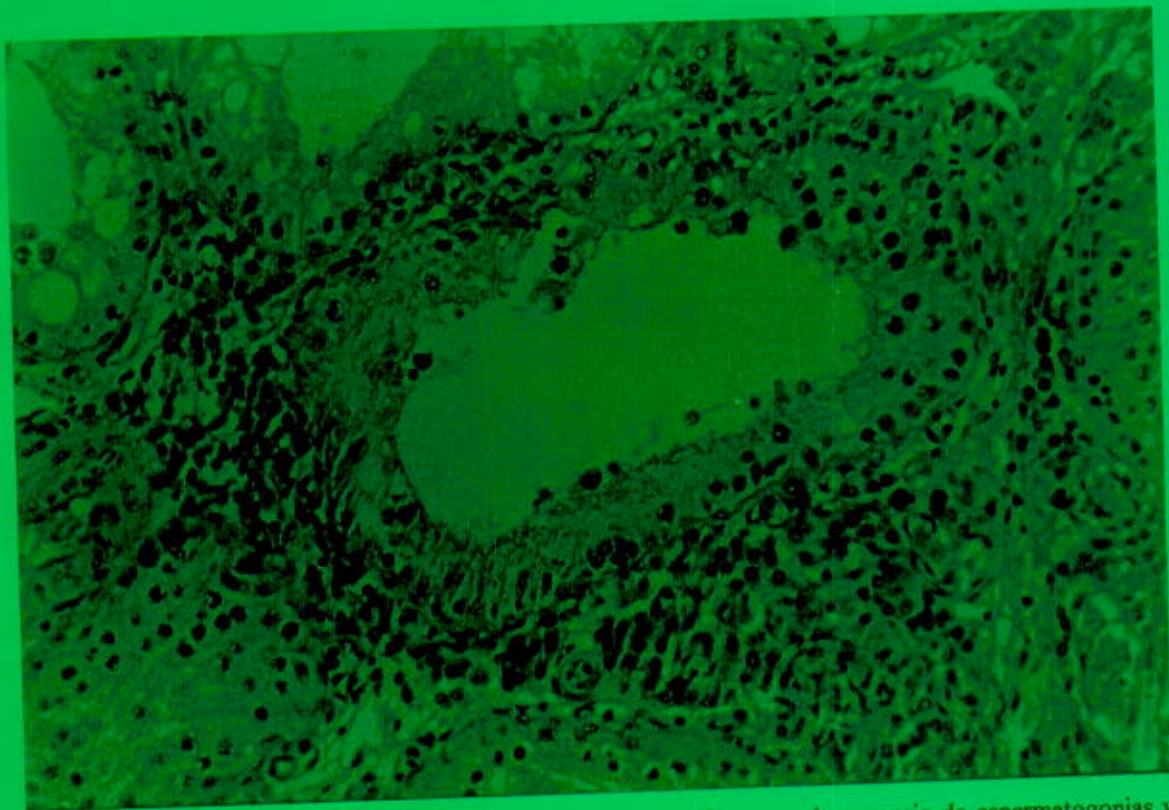


Figura 20. Degeneración de epitelio germinal de túbulos seminíferos con la ausencia de espermatogonias y espermátides. Animal con 30 días de infección con el virus de la EOA. Tinción con HE. 100 X.

### *Microscopía electrónica.*

En epidídimo se observó en los animales testigo, la presencia de estereocilios con ramificaciones con un tallo común que se origina a partir del citoplasma. La impresión era de proyecciones digitiformes hacia el lumen tubular, las cuales estaban en contacto con espermatozoides (Figuras 21, 22 y 23).

El animal que presenta el proceso evolutivo de la infección es el cerdo con 15 días de infección en donde se observó la presencia vesículas de diferente tamaño en el citoplasma y pérdida de esterocilios (Figuras 24, 25 y 26). En el mismo animal y en citoplasma del tejido pseudoestratificado, se observó presencia de inclusiones densas que correspondían a acúmulos de nucleocápsides (Figuras 27 y 28).

Se observó que a partir de las inclusiones densas localizadas en el citoplasma, se originaban múltiples vesículas con estructuras pleomórficas, las cuales fueron liberadas del citoplasma (Figuras 29 y 30).



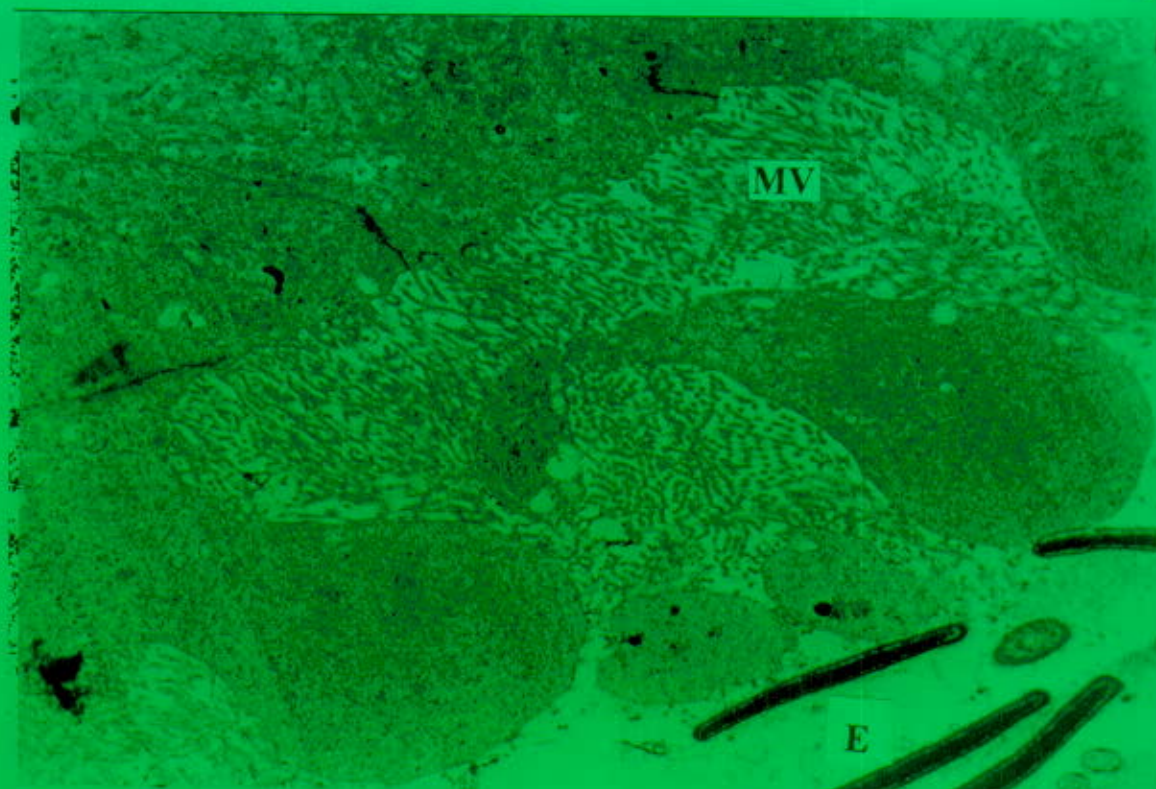


Figura 21. Micrografía electrónica de células epiteliales en el borde del lumen tubular de epidídimo, de un animal no infectado. Nótese las proyecciones digitiformes del citoplasma de las células apicales. En el borde libre se localizan múltiples microvellosidades (MV). Nótese la presencia de espermatozoides (E) en contacto con las células epiteliales. El corte se contrastó con metales pesados de uranio y plomo. 12 500 X.

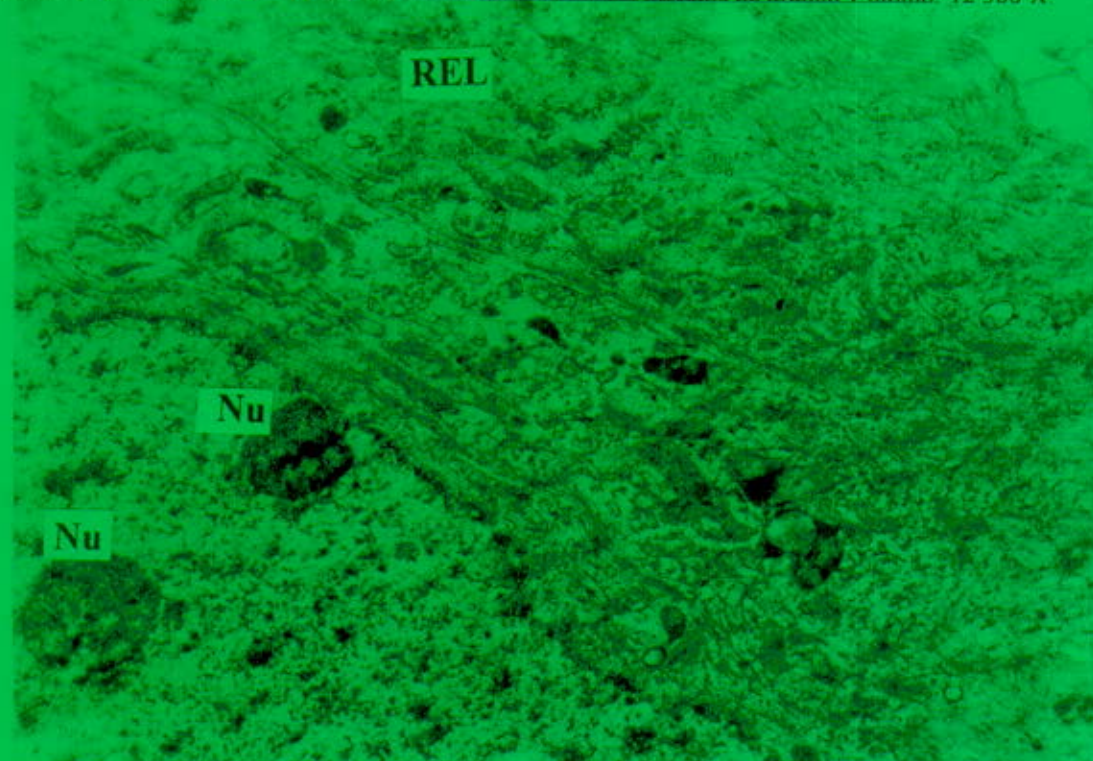


Figura 22. Micrografía electrónica de células de epidídimo de un cerdo testigo. Se observa un núcleo con 2 nucleolos (Nu) y cromatina finamente dispersa. En el citoplasma se observan cisternas de retículo endoplásmico liso (REL) en forma abundante, que corren en dirección al eje longitudinal de la célula. El corte se contrastó con metales pesados de uranio y plomo. 50 000X.



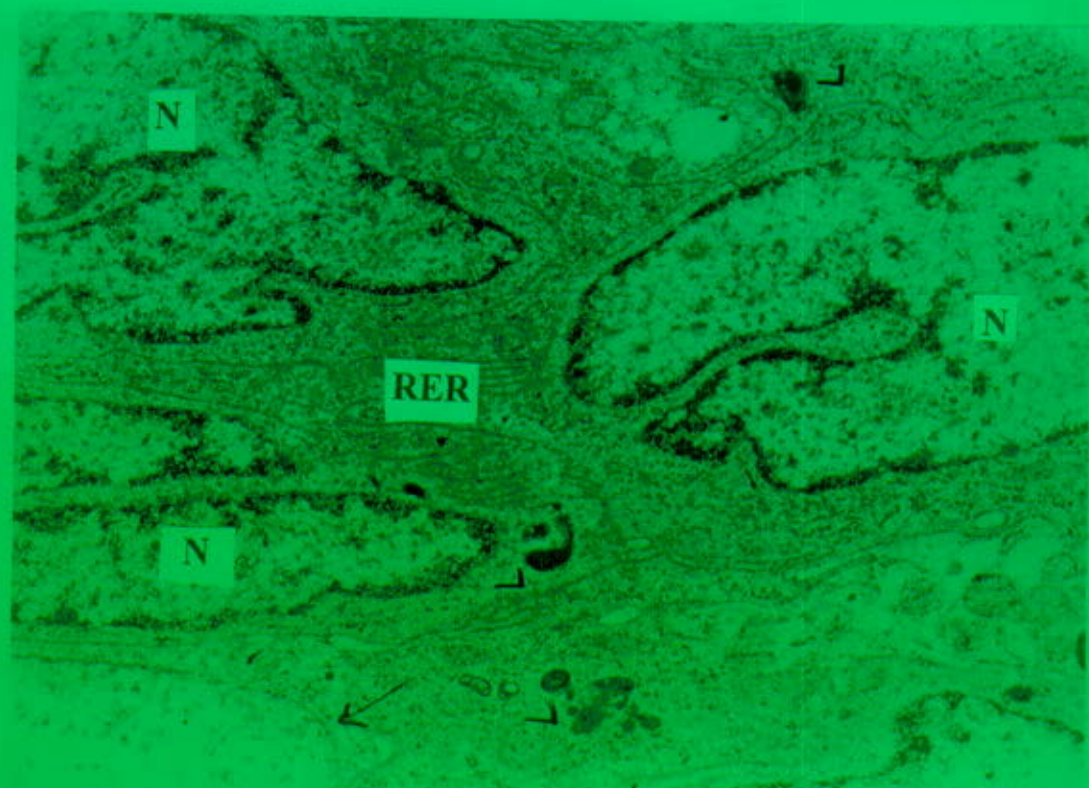


Figura 23. Micrografía electrónica en donde se ilustran varias células epiteliales de epidídimo de un cerdo testigo. Se observan núcleos densos y dentados (N). Nótese la presencia de abundante ribosomas y cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER). El corte se contrastó con metales pesados de uranilo y plomo. 20 000 X.

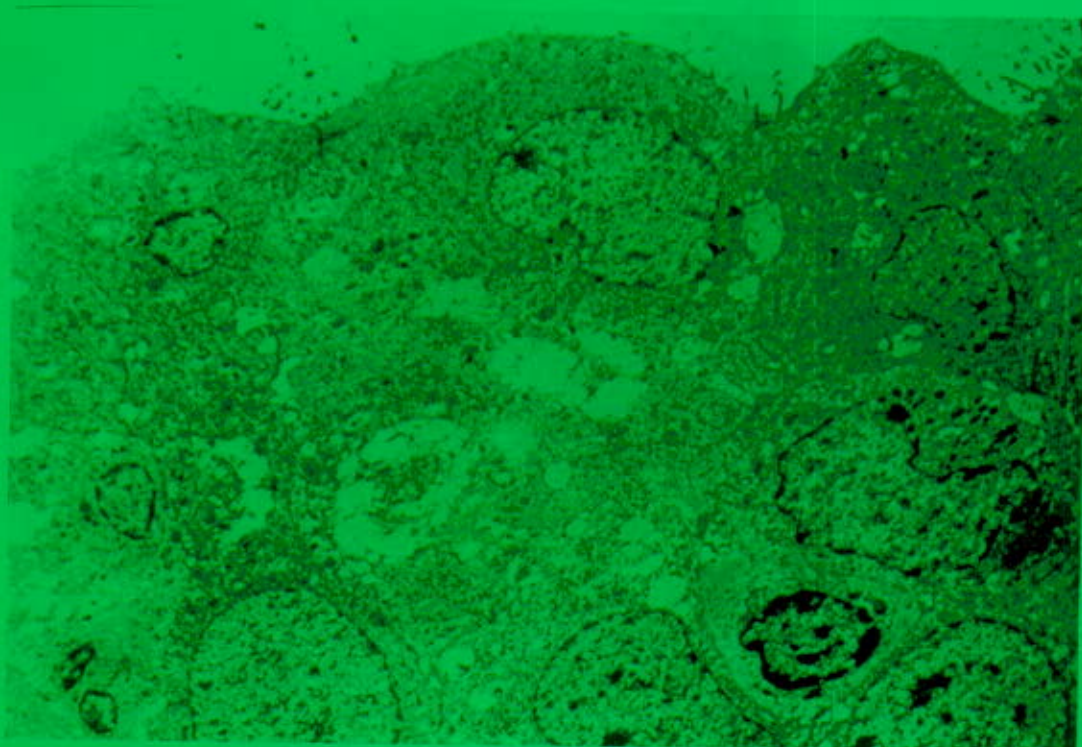


Figura 24. Micrografía electrónica en donde se observan vesículas de diferente tamaño y pérdida de estereocilios en el citoplasma del epitelio seudoestratificado del epidídimo. Animal con 15 días de infección con el virus de la EOA. El corte se contrastó con metales pesados de uranilo y plomo. 6 300X



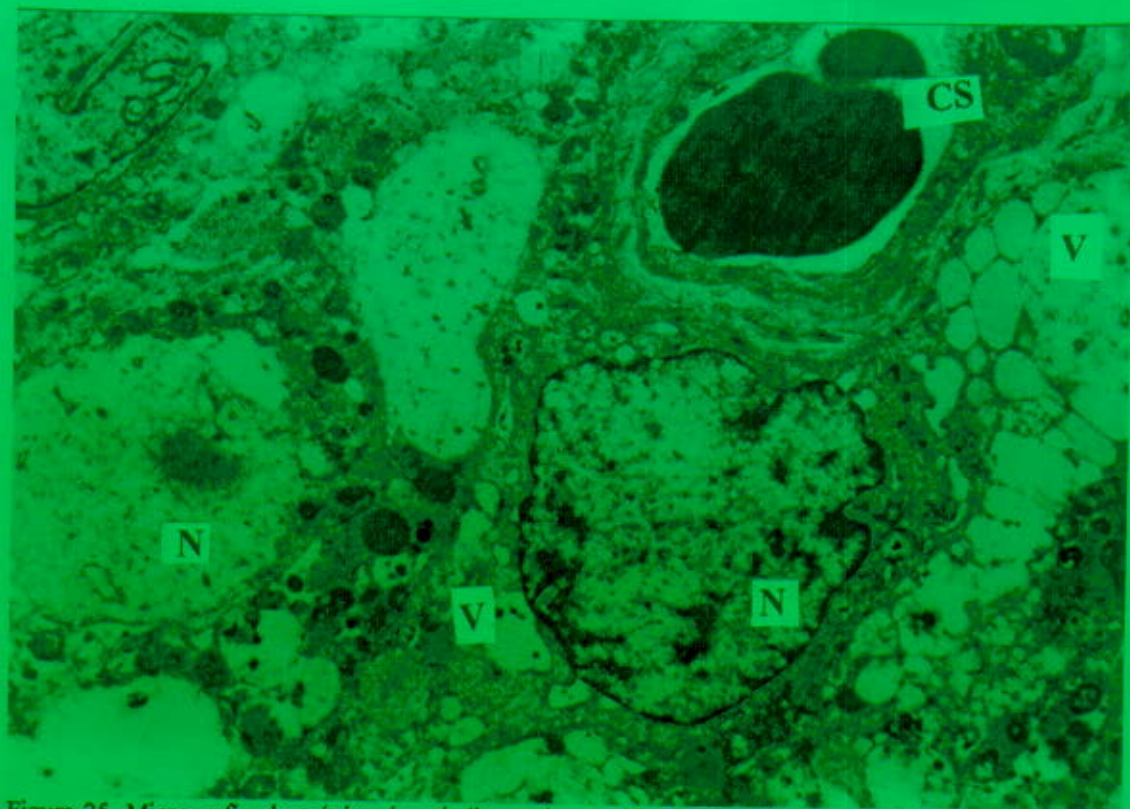


Figura 25. Micrografía electrónica de epitelio pseudoestratificado de epidídimo. En él se observa un capilar sanguíneo (CS) y vesículas (V) en citoplasma en varias de las células, como resultado del daño que genera el virus de la enfermedad del ojo azul. También se observan los núcleos (N) de dos células. Animal con 15 días de infección. El corte se contrastó con metales pesados de uranilo y plomo. 8 750 X.

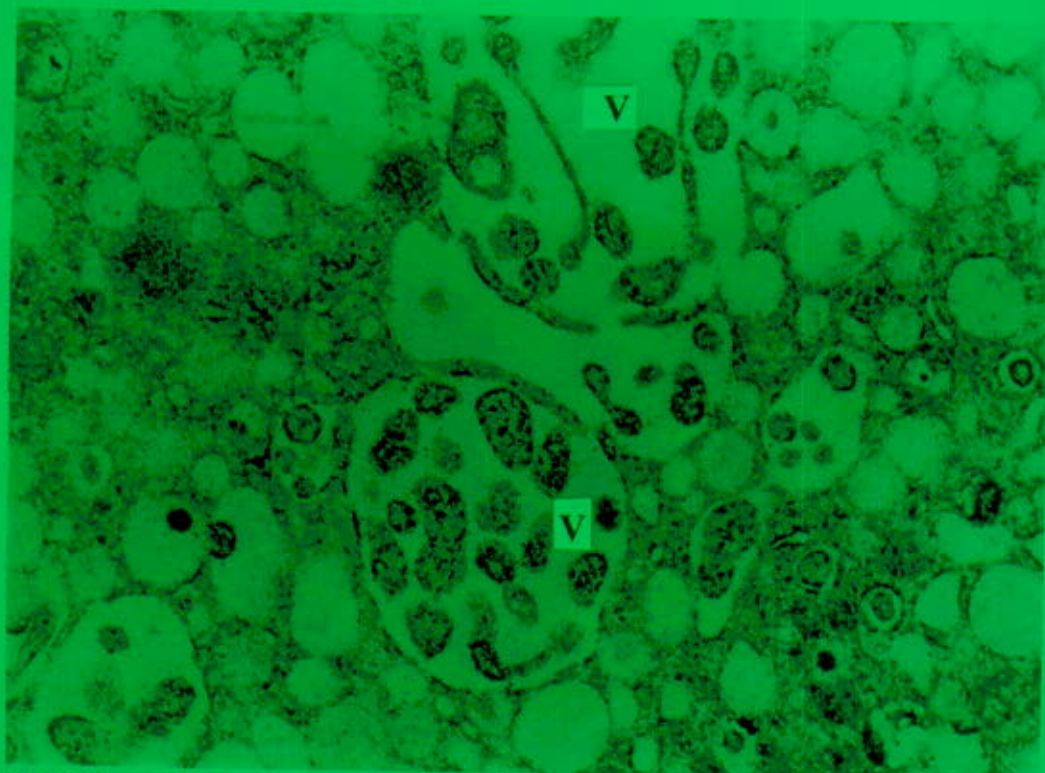


Figura 26. Micrografía electrónica en donde se observa parte del citoplasma de una célula del epitelio pseudoestratificado de epidídimo que muestra dilatación del retículo endoplásmico rugoso, con formación de múltiples vesículas (V) intracitoplásmicas. Verraco con 15 días de infección con el virus de la EOA. El corte se contrastó con metales pesados de uranilo y plomo. 25 000 X



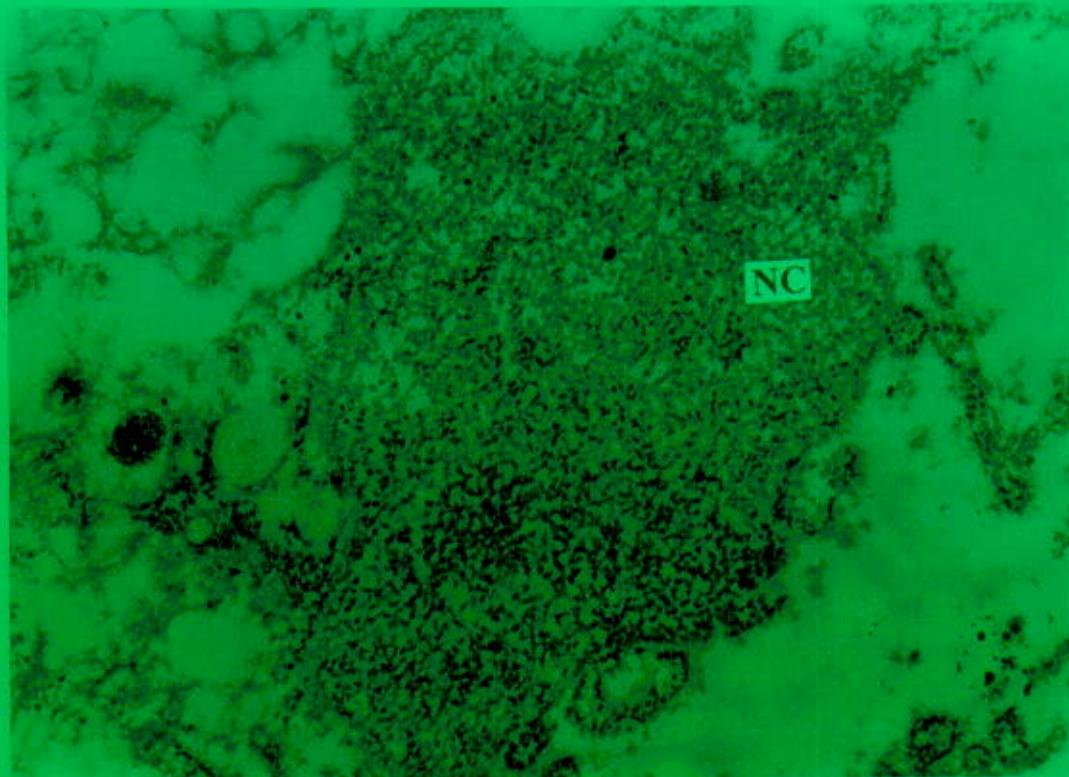


Figura 27. Micrografía electrónica en donde se observa el citoplasma de células epiteliales de un ducto epididimario con una inclusión intracitoplásmica viral. Nótese la formación de estructuras esféricas que corresponden a acúmulos de nucleocápsides (NC) en liberación. Animal con 15 días de infección con el virus de la EOA. El corte se contrastó con metales pesados de uranilo y plomo. 50 000 X

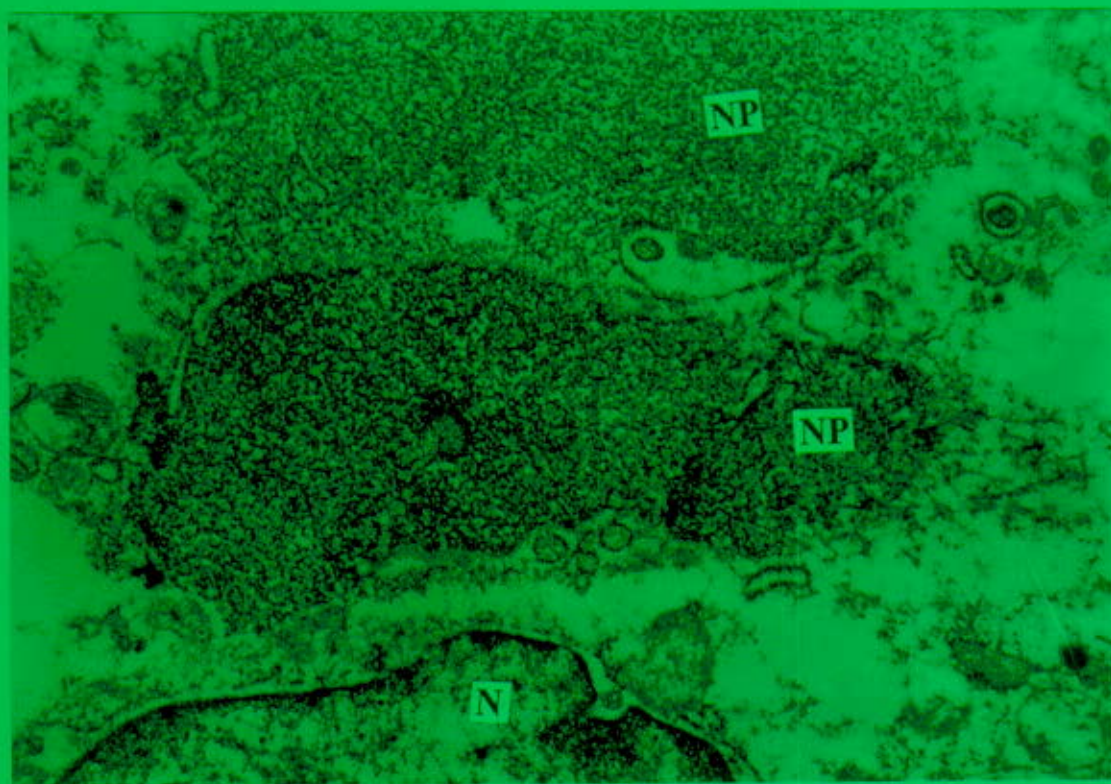


Figura 28. Micrografía electrónica en donde se observa parte del núcleo ( N ) y citoplasma de una célula del epitelio pseudoestratificado de epididimo. Se observan 2 estructuras densas en citoplasma que corresponden a la nucleoproteína viral (NP). Animal con 15 días de infección con el virus de la EOA. El corte se contrastó con metales pesados de uranilo y plomo. 25 000 X



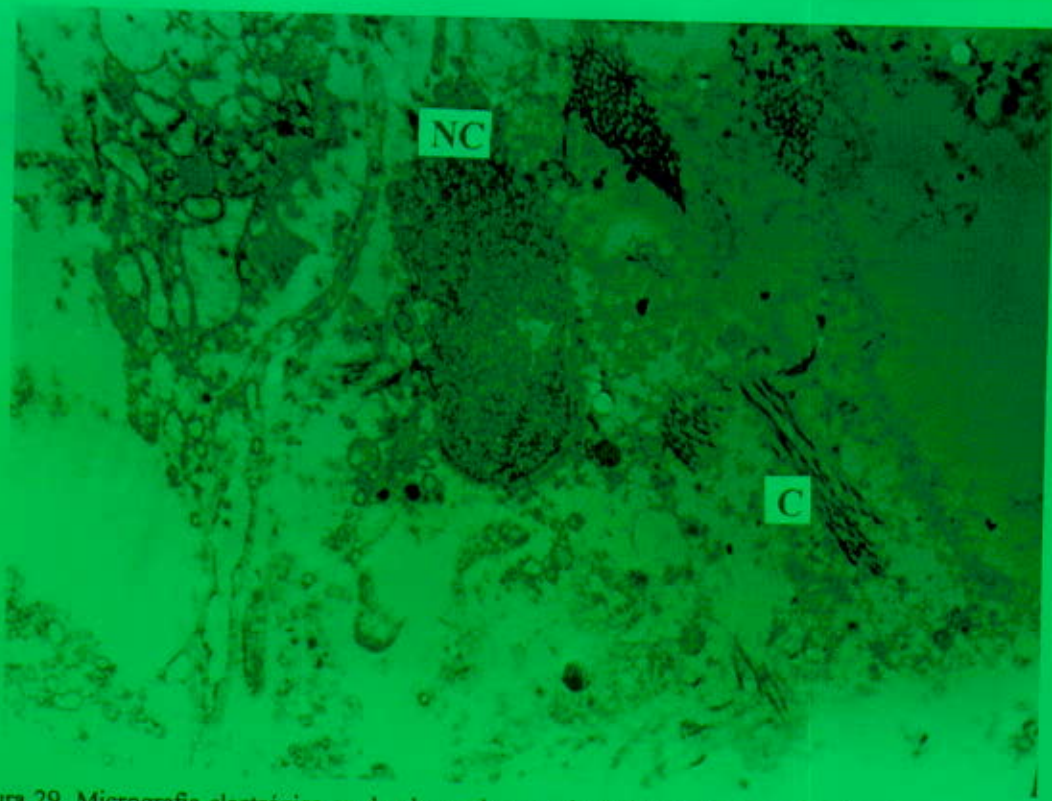


Figura 29. Micrografía electrónica en donde se observan inclusiones densas en el citoplasmas de una célula del epitelio pseudoestratificado de epididimo que corresponden a acúmulos de nucleocápsides NC del virus de la EOA. A un lado se observan fibras de colágena C. El corte se contrastó con metales pesados de uranilo y plomo. 10 000 X.

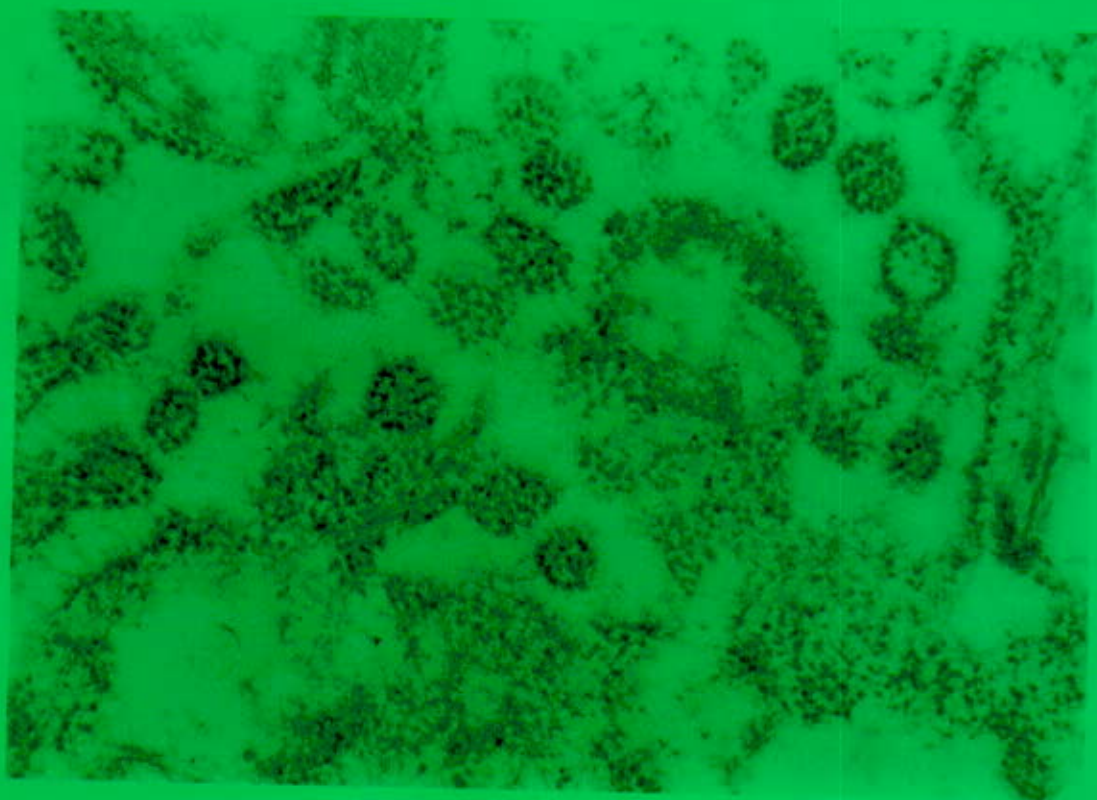


Figura 30. Micrografía electrónica de citoplasma de epitelio pseudoestratificado de epididimo de un animal con 15 días de infección. Se observan amplias áreas de vacuolización en retículo endoplásmico rugoso. Algunas de estas estructuras tienen forma circular que corresponden a acúmulos de nucleocápsides. El corte se contrastó con metales pesados de uranilo y plomo. 30 000 X.

### *Radioinmunoanálisis.*

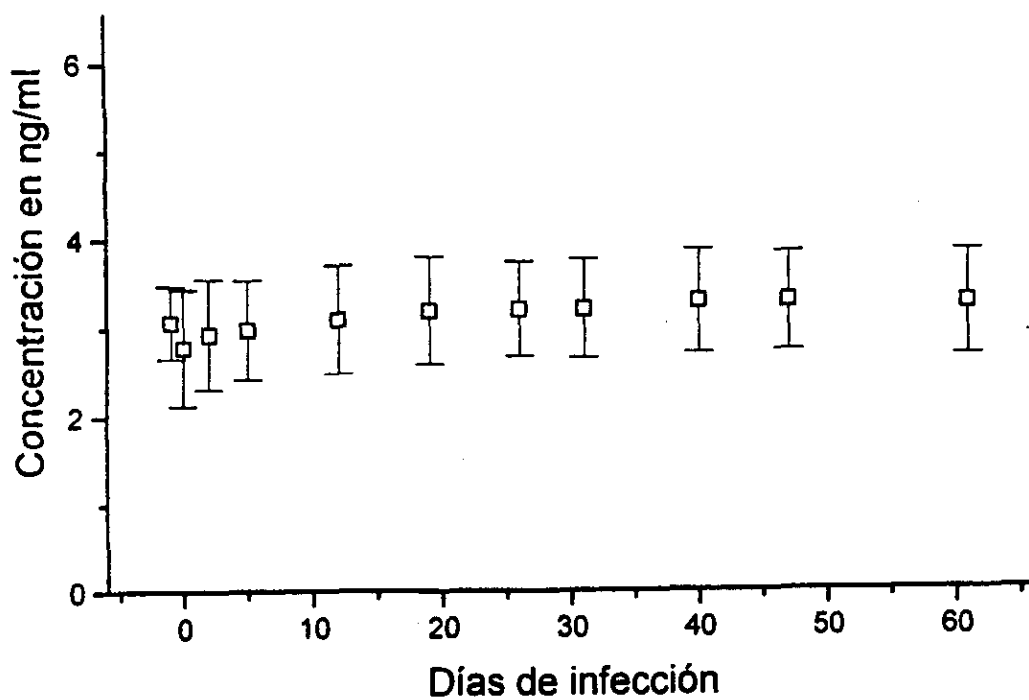
Se evaluó el nivel sérico de androstendiona , testosterona y dihidrotestosterona del segundo grupo de animales inoculados. Debido a que a estos animales se les entrenó con un maniquí para la colección de semen, se les realizó muestreos serológicos con 2 meses de anticipación a la inoculación del virus. Esta situación permitió tener 2 grupos de muestras. El primero de ellos correspondió al periodo de 60 días antes de la inoculación; por su parte el segundo grupo correspondió al seguimiento serológico de estas hormonas durante 61 días de infección.

Ambos grupos de muestras se compararon para determinar si existió diferencia en los niveles séricos de estas hormonas como respuesta a la presencia del virus. No se encontró cambio de manera significativa ( $P > 0.05$ ). Los niveles de estas hormonas se observan en los Cuadros 17, 18, y 19 y el las Figuras 31, 32 y33.

**Cuadro 17.** Niveles de androstendiona sérica(ng/ml) en verracos inoculados con el virus de la EOA. Grupo 2.

|                             | 60 días antes de la inoculación | 61 días después de la inoculación |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Número de muestras          | 14                              | 27                                |
| Promedio                    | 3.14                            | 3.41                              |
| Desviación estándar         | 0.62                            | 0.57                              |
| Coefficiente de variación/% | 19                              | 16                                |
| Mínimo                      | 4.11                            | 2.19                              |
| Máximo                      | 3.12                            | 4.38                              |

No existió diferencia significativa ( $P>0.05$ ).

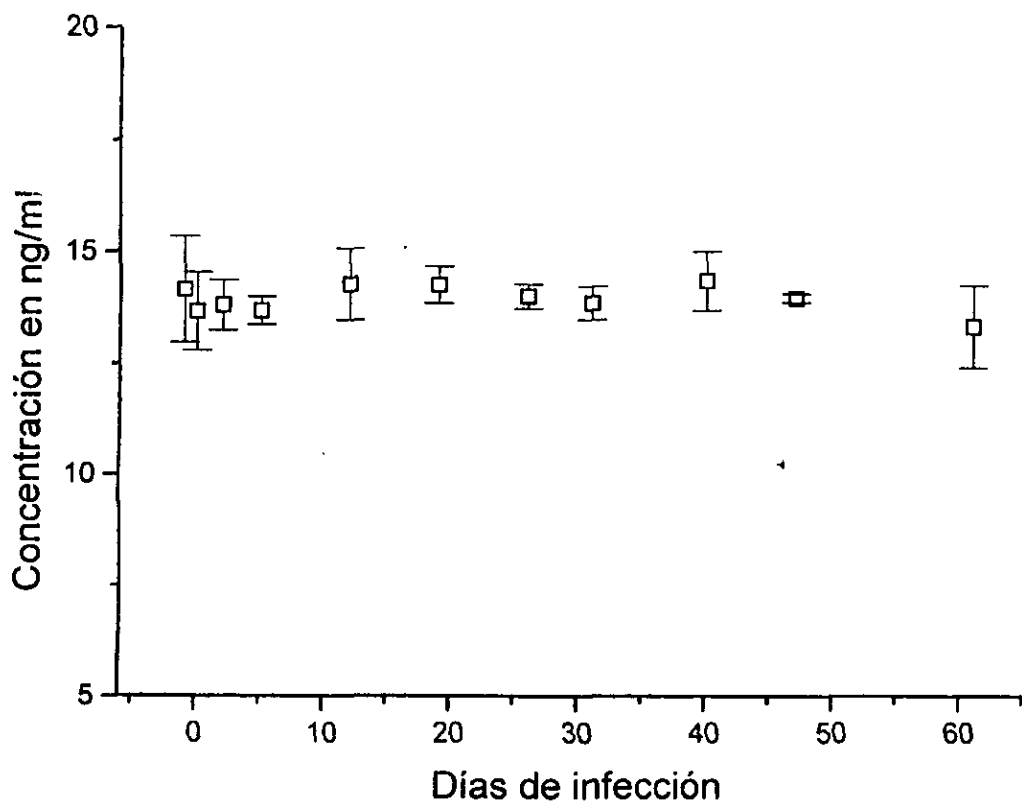


**Figura 31.** Niveles de androstendiona sérica (ng/ml) en verracos inoculados con el virus de la EOA, Grupo 2.

**Cuadro 18.** Niveles de testosterona sérica (ng/ml) en verracos inoculados con el virus de la EOA, Grupo 2.

|                             | 60 días antes de la inoculación | 61 días después de la inoculación |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Número de muestras          | 14                              | 27                                |
| Promedio                    | 13.85                           | 13.99                             |
| Desviación estándar         | .84                             | .57                               |
| Coefficiente de variación/% | 6                               | 4                                 |
| Mínimo                      | 12.51                           | 12.25                             |
| Máximo                      | 15.36                           | 14.94                             |

No existió diferencia significativa ( $P>0.05$ ).

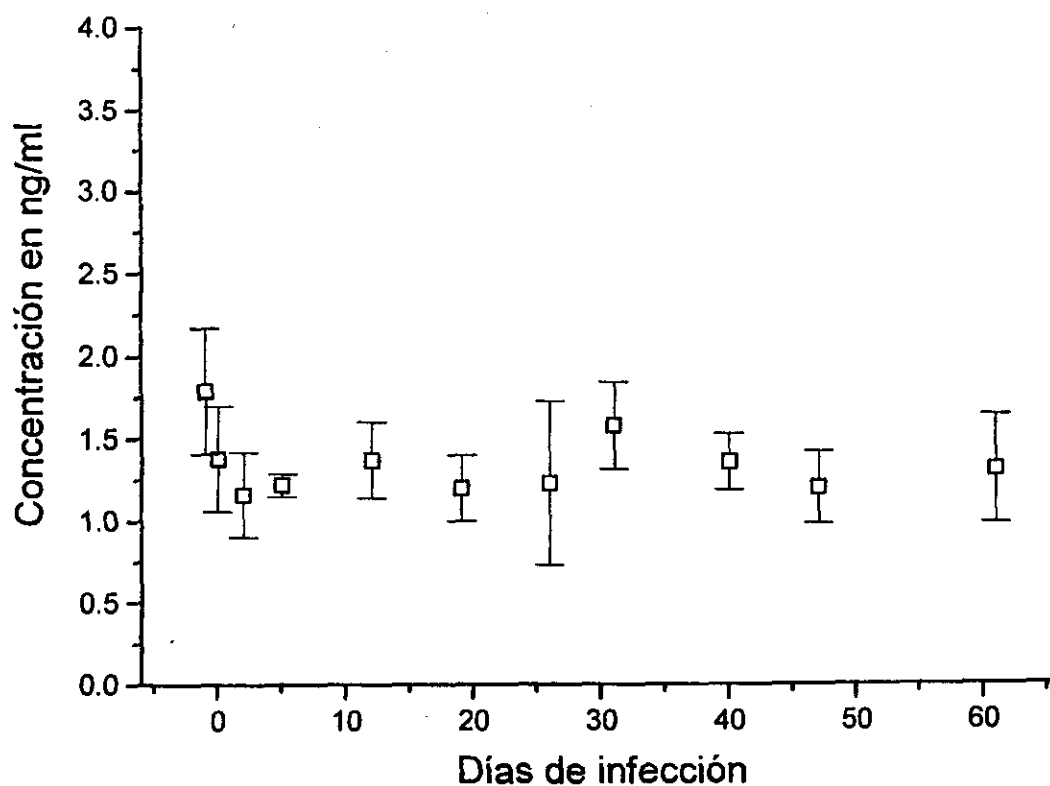


**Figura 32.** Niveles de testosterona sérica (ng/ml) en verracos inoculados con el virus de la EOA, Grupo 2.

**Cuadro 19.** Niveles de dihidrotestosterona sérica (ng/ml) en verracos inoculados con el virus de la EOA, Grupo 2.

|                             | 60 días antes de la inoculación | 61 días después de la inoculación |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Número de muestras          | 14                              | 27                                |
| Promedio                    | 1.39                            | 1.31                              |
| Desviación estándar         | .37                             | .26                               |
| Coefficiente de variación/% | 26                              | 19                                |
| Mínimo                      | .89                             | .67                               |
| Máximo                      | 2.11                            | 1.84                              |

No existió diferencia significativa ( $P>0.05$ ).



**Figura 33.** Niveles de dihidrotestosterona sérica (ng/ml) en verracos inoculados con el virus de la EOA, Grupo 2.



Con el propósito de verificar los datos anteriores se realizó una curva de regresión lineal y su correlación. La variable independiente fue el tiempo y la variable dependiente los niveles séricos de estas hormonas. De acuerdo con el análisis estadístico, se observó que los valores de la correlación ( $r$ ) carecen de significancia estadística ( $P > 0.05$ ) para estas 3 hormonas (Cuadro 20).

**Cuadro 20.** Correlación entre el tiempo y niveles hormonales.

| Androstendiona | NS para r | Testosterona | NS para r | Dihidrotestosterona | NS para r |
|----------------|-----------|--------------|-----------|---------------------|-----------|
| a=3.29         |           | a=13.94      |           | a=1.35              |           |
| b=3.02         | NO        | b=2.85       | NO        | b=-1.40             | NO        |
| r=.17          | P>0.05    | r=0.015      | P>0.05    | r=-0.16             | P>0.05    |

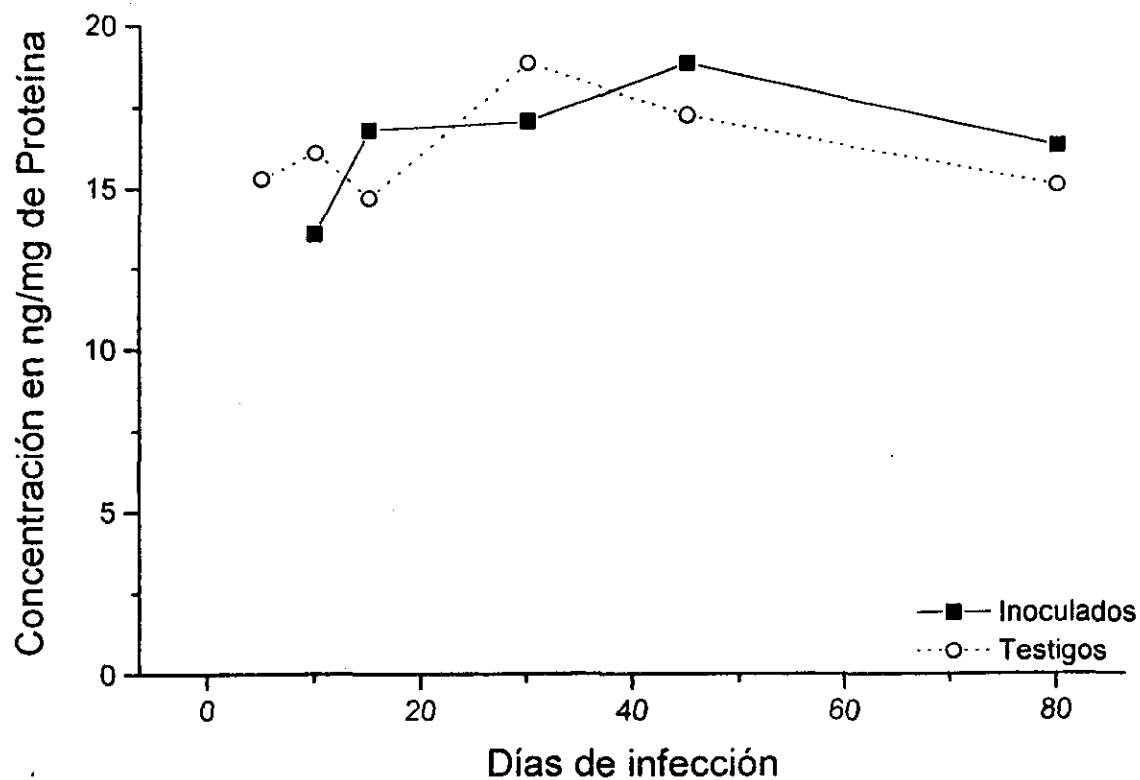
NS = nivel de significancia

Se determinaron los niveles de androstendiona, testosterona y dihidrotestosterona, tanto en testículo como en epidídimo de los animales sacrificados. Debido a que sólo se pudo cuantificar un solo valor en el momento del sacrificio, se obtuvieron seis pares de testículos con sus respectivos epidídimos de animales contemporáneos no infectados, más un animal testigo del grupo original, con la finalidad de comparar los resultados de estos animales con los resultados de los animales infectados. Al realizar las comparaciones entre los animales infectados y los animales testigo, se obtuvo que en epidídimo los niveles de estas hormonas no tienen diferencia ( $P > 0.05$ ) entre ambos grupos. Los niveles de estas hormonas se observan en los Cuadros 21, 22 y 23 y en las Figuras 34, 35 y 36. En testículo si se observó diferencia ( $P < 0.05$ ). Cuadros 24, 25 y 26 y Figuras 37,38 y 39.

**Cuadro 21.** Niveles de androstendiona (ng/mg de proteína) en epidídimo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

|                             | Grupo infectado | Grupo testigo |
|-----------------------------|-----------------|---------------|
| Número de muestras          | 7               | 7             |
| Promedio                    | 16.85           | 16.08         |
| Desviación estándar         | 1.86            | 1.51          |
| Coefficiente de variación/% | 11              | 9             |
| Mínimo                      | 13.6            | 14.7          |
| Máximo                      | 19.3            | 18.9          |

No existió diferencia significativa ( $P > 0.05$ ).

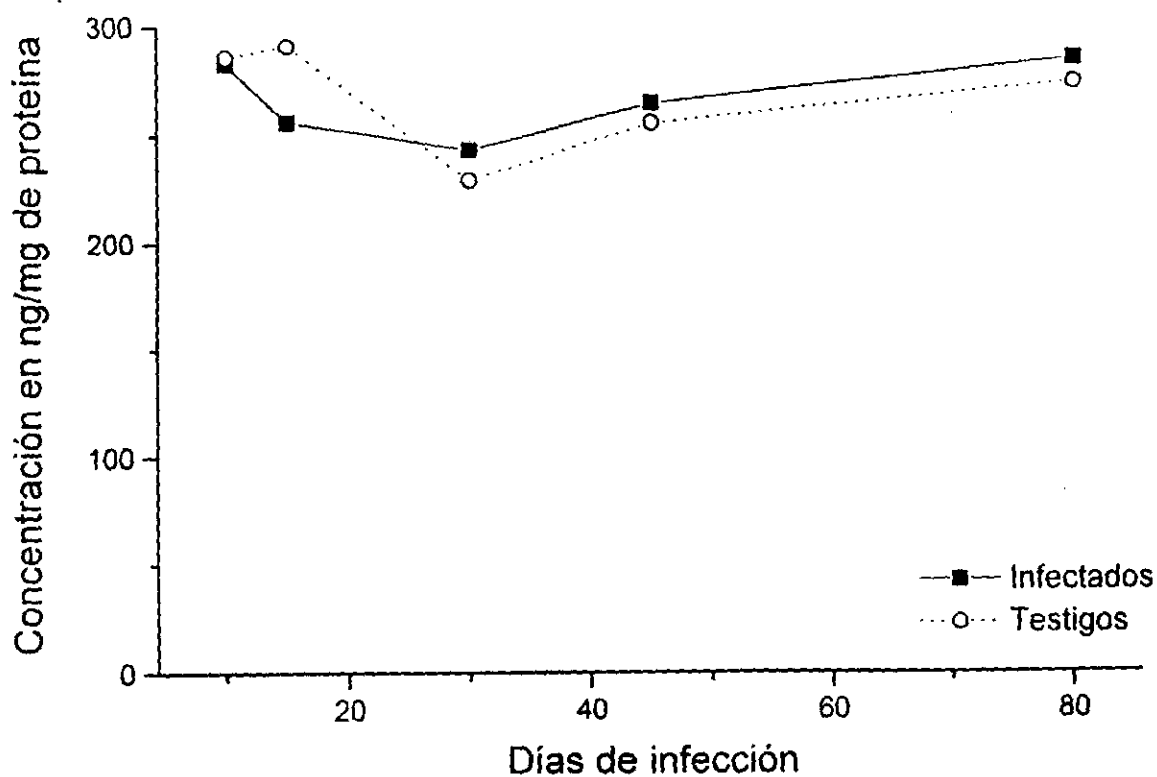


**Figura 34.** Niveles de androstendiona (ng/mg de proteína) en epidídimo de verracos inoculados con el virus de la EOA

**Cuadro 22.** Niveles de testosterona (ng/mg de proteína) en epidídimo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

|                             | Grupo infectado | Grupo testigo |
|-----------------------------|-----------------|---------------|
| Número de muestras          | 7               | 7             |
| Promedio                    | 268.7           | 258.28        |
| Desviación estándar         | 17.14           | 25.4          |
| Coefficiente de variación/% | 6               | 9             |
| Mínimo                      | 243             | 229           |
| Máximo                      | 296             | 291           |

No existió diferencia significativa ( $P > 0.05$ ).

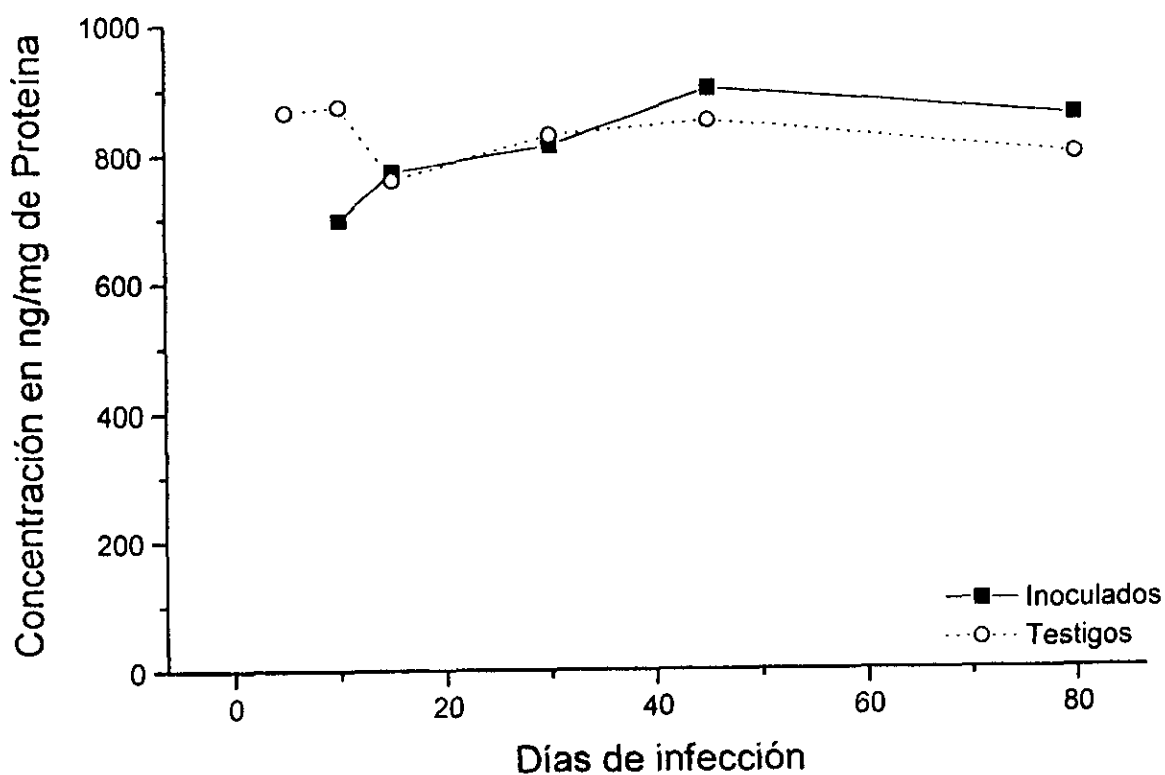


**Figura 35.** Niveles de testosterona (ng/mg de proteína) en epidídimo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

**Cuadro 23.** Niveles de dihidrotestosterona (ng/mg prot) en epidídimo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

|                               | Grupo infectado | Grupo testigo |
|-------------------------------|-----------------|---------------|
| Número de muestras            | 7               | 7             |
| Promedio                      | 828.57          | 835.85        |
| Desviación estándar           | 100.41          | 42.81         |
| Coefficiente de variación (%) | 12              | 5             |
| Mínimo                        | 697             | 761           |
| Máximo                        | 963             | 874           |

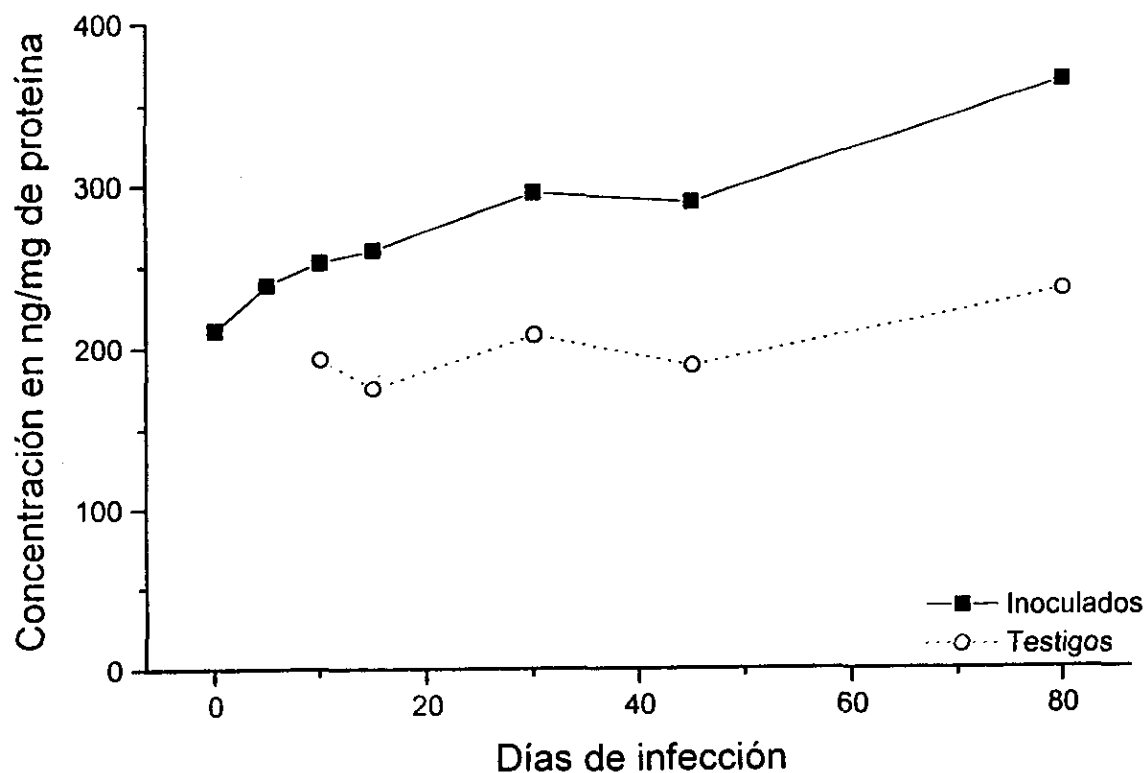
No existió diferencia significativa ( $P>0.05$ ).



**Figura 36.** Niveles de Dihidrotestosterona (ng/mg de proteína) en epidídimo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

**Cuadro 24.** Niveles de androstendiona (ng/mg prot) en testículo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

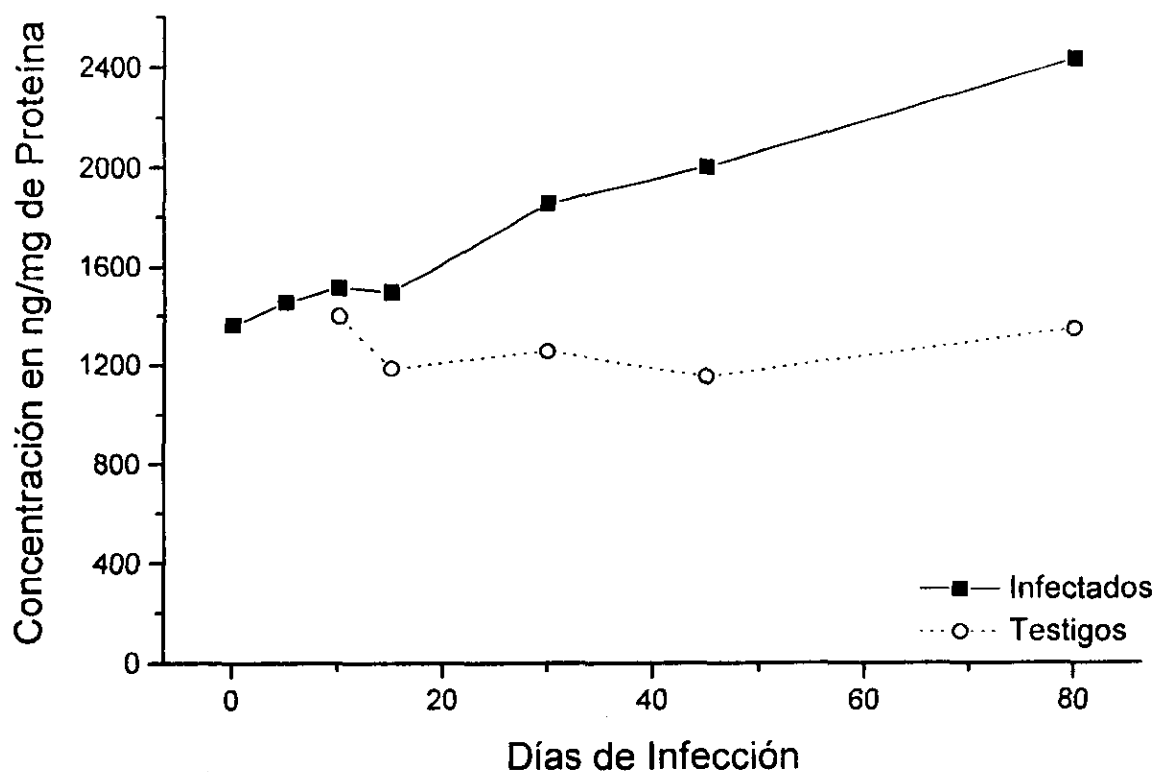
|                             | Grupo infectado | Grupo testigo | Nivel de significancia para "t" |
|-----------------------------|-----------------|---------------|---------------------------------|
| Número de muestras          | 8               | 8             |                                 |
| Promedio                    | 294.66          | 203.71        |                                 |
| Desviación estándar         | 49.35           | 19.72         | SI                              |
| Coefficiente de variación/% | 16              | 9             |                                 |
| Mínimo                      | 239             | 175           | p<0.05                          |
| Máximo                      | 385             | 235           |                                 |



**Figura 37.** Niveles de androstendiona (ng/mg de proteína) en testículo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

**Cuadro 25.** Niveles de testosterona (ng/mg de proteína) en testículo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

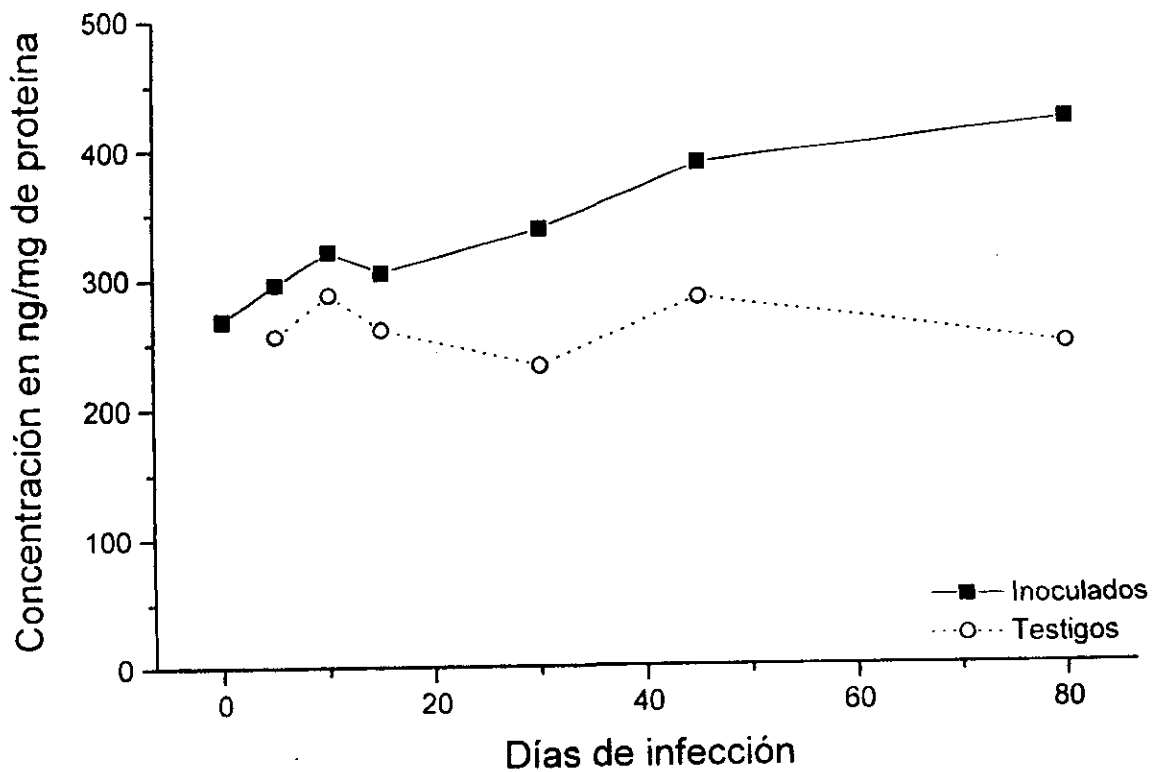
|                             | Grupo infectado | Grupo testigo | Nivel de significancia para "t" |
|-----------------------------|-----------------|---------------|---------------------------------|
| Número de muestras          | 8               | 7             |                                 |
| Promedio                    | 1897            | 1312          |                                 |
| Desviación estándar         | 413.75          | 117.68        | SI                              |
| Coefficiente de variación/% | 21              | 8             |                                 |
| Mínimo                      | 1453            | 1156          | P<0.05                          |
| Máximo                      | 2658            | 1483          |                                 |



**Figura 38.** Niveles de testosterona (ng/mg de proteína) en testículo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

**Cuadro 26.** Niveles de dihidrotestosterona (ng/mg de proteína) en testículo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

|                             | Grupo infectado | Grupo testigo | Nivel de significancia para "t" |
|-----------------------------|-----------------|---------------|---------------------------------|
| Número de muestras          | 8               | 7             |                                 |
| Promedio                    | 360.12          | 258.71        |                                 |
| Desviación estándar         | 51.91           | 17.10         | SI                              |
| Coefficiente de variación/% | 14              | 6             |                                 |
| Mínimo                      | 296             | 233           | P<0.05                          |
| Máximo                      | 438             | 2083          |                                 |



**Figura 39.** Niveles de dihidrotestosterona (ng/mg de proteína) en testículo de verracos inoculados con el virus de la EOA.

## Discusión.

La enfermedad del ojo azul está asociada a un virus cuyas características morfológicas y fisicoquímicas corresponden a las de un virus hemaglutinante de la familia *Paramyxoviridae* y del género *rubulavirus* (Murphy *et al.*, 1995).

Hasta hoy la única especie donde se ha descrito la enfermedad es el cerdo. Experimentalmente se han infectado ratones y embriones de pollo. Los humanos que han estado en contacto con el virus no enferman y serológicamente han sido negativos (Stephano, 1991).

La enfermedad es de origen viral y afecta a cerdos de diferente edad, causa encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea.

La EOA se denominó originalmente como síndrome del ojo azul por la dificultad de reproducir los signos experimentalmente. Un comportamiento similar tuvo parvovirus porcino y enterovirus porcino; para ambos agentes infecciosos el reproducir los signos de muerte embrionaria y fetal en condiciones experimentales no siempre fue factible. En las primeras investigaciones sobre la patogenia de parvovirus porcino se requería que la infección fuera en líquido alantoideo para provocar la muerte fetal. Cuando la inoculación se realizaba por vía oronasal, intramuscular o intravenosa no se podían generar los signos de falla reproductiva. Esto se debió a que el virus se atenúa fácilmente al ponerlo en cultivos celulares (Cropper *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 1973; Mengeling *et al.*, 1975, 1976, 1981).

Ante la imposibilidad de identificar un sólo agente etiológico, que estuviera involucrado en la falla reproductiva de las cerdas; se denominó el término de Stillbirth, Mummification, Embryonic Death and Infertility (siglas en el idioma inglés) a la serie de eventos presentes durante la gestación que generaban reabsorción embrionaria y muerte fetal. (Dunne 1978).

Posteriormente se pudo diferenciar, que los principales responsables de éste síndrome eran el parvovirus porcino y enterovirus porcino.



También en el caso de la enfermedad de hepatitis con cuerpos de inclusión en aves se presentó algo similar. Actualmente se sabe que esta enfermedad es causada por un adenovirus. Al agente infeccioso, por ser ubicuo, se le asoció con agentes inmunodepresores, como micotoxinas, pesticidas en el alimento, hacinamiento, enfermedad de Marek, enfermedad de Gumboro y bronquitis infecciosa. Como consecuencia de lo difícil que resulta reproducir el cuadro infeccioso, se consideró que este virus constituía un agente patógeno secundario oportunista. Fue hasta 1989 cuando Christensen en Nueva Zelanda notificó un brote que fue ocasionado por el virus de la hepatitis con cuerpos de inclusión. En ese caso se estableció una relación entre los signos clínicos y el virus. Después de ese informe, la enfermedad dejó de considerarse como síndrome (Christensen *et al.*, 1989).

En el caso de la EOA los primeros brotes se observaron en 1980, (Stephano 1981). Inicialmente, los brotes se relacionaron con una deficiencia de riboflavina, generada por una intoxicación por compuestos órgano clorados y por esa razón esta enfermedad fue denominado síndrome del ojo azul o de cerdos zarcos (Campos 1981). De manera simultánea se describió un cuadro de encefalitis y opacidad de la córnea asociado a un virus con actividad hemaglutinante (Stephano 1981). A pesar de que se logró aislar al virus no fue fácil reproducir los signos clínicos en animales infectados, ya que cuando se inocularon animales susceptibles, no siempre se pudo generar el cuadro clínico completo de la enfermedad; es hasta 1985 cuando al inocular animales vía intratraqueal se logra reproducir la opacidad de la córnea y signos nerviosos en los lechones (Stephano *et al.*, 1982; Stephano 1984; Stephano y Gay 1986b; Stephano *et al.*, 1988a; Stephano *et al.*, 1988b).

Estos antecedentes permiten visualizar que la descripción de la enfermedad se efectuó en 1980 y se tuvo pleno conocimiento del agente etiológico hasta 1986. En ese lapso a la enfermedad se le identificó como un síndrome, ante la falta de conocimiento del agente infeccioso causal.

Para esta investigación, se utilizó un aislamiento de campo. Se procedió a caracterizar al virus y se denominó PAC-3. El virus fue aislado en el estado de Jalisco en el año de 1990. En dicha región existen varias enfermedades que generan signos clínicos

es un virus que produce efecto citopático en células PK-15 y Vero. Esta situación permite diferenciarlo del virus de fiebre porcina clásica, este último no produce efecto citopático en monoestratos celulares. Al confrontar al aislamiento viral con eritrocitos de ave, bovino y cobayo, se observó hemaglutinación y hemadsorción. Estas reacciones no se presentan en la enfermedad de Aujeszky o fiebre porcina clásica, ambos virus no tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos. Se elaboró un conjugado para inmunofluorescencia. El suero hiperinmune se obtuvo en conejos y el antígeno que se les administró correspondió al virus que aisló Stephano en 1981. Esta situación refuerza la identidad que existe entre este aislamiento (PAC-3) y los aislamientos realizados en años anteriores.

Al realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, se observó que la migración de proteínas del PAC-3 era similar a la que describió previamente Sundquist en 1990. En tinción negativa y a nivel de microscopía electrónica, los viriones se observaron pleomórficos con un tamaño aproximado de 120 nm. Fue necesario hacer la caracterización del virus de la EOA y el diagnóstico diferencial con fiebre porcina clásica y enfermedad de Aujeszky debido a que en la zona del Bajío de la República Mexicana la frecuencia de estas tres enfermedades es alta.

Una vez que se tuvo la certeza de que se estaba trabajando con el rubulavirus porcino de la familia *Paramixoviridae*, se decidió inocular a los verracos. Sin embargo existía la duda de que al inocular al virus por la vía oronasal se generaran los signos clínicos, debido a que en múltiples enfermedades virales no siempre es factible reproducir los signos a pesar de tener al virus en concentraciones altas. Por tal motivo, 2 ml del virus fueron inoculados por vía intramuscular y 2 ml por vía oronasal, con el conocimiento previo de que la vía de infección natural es a través del contacto directo entre cerdos.

Este agente infeccioso, al ser inoculado en los verracos, generó signos clínicos que en el ámbito de la granja pueden resultar inapreciables, como la anorexia transitoria y la fiebre temporal; sin embargo, el cambio de las dimensiones testiculares fue muy evidente en la mayoría de los animales, sin que existiera pérdida de la libido.

El aumento del tamaño testicular a los 15 días correspondió a una edematización del tejido escrotal, mientras que el que se observó después de los 30 días de infección correspondió a los granulomas que se generaron en epidídimo. En aquellos animales que tenían el testículo con un tamaño inferior al original, esa situación correspondió a una atrofia testicular.

Es evidente que el tamaño y peso testicular nunca fue el mismo, aún en los animales testigos. En el primer grupo el animal testigo presentó una diferencia de peso de 4% entre ambos testículos. En el segundo grupo el cerdo testigo tuvo una diferencia de 3%. Sin embargo, en los animales con más de 15 días de infección, se observó que la diferencia en el peso testicular fue de 30 ó 40% .

De manera paradójica también hubo animales que tuvieron poca diferencia en dicho porcentaje, a pesar de tener 45 y 80 días de infección. Esta situación es factible debido a que la respuesta individual de cada cerdo fue muy diferente.

Al evaluar las espermotobioscopías se observaron alteraciones en el eyaculado de algunos animales. En el día 30 de infección se obtuvo una muestra del cerdo número 3. El volumen del eyaculado fue similar al de los días anteriores; sin embargo, carecía de espermatozoides. En dicho animal la diferencia del tamaño testicular era evidente aun antes del sacrificio. Esto permite que en la práctica y a nivel de granja se pueda desechar al animal. Sin embargo, existe la factibilidad de que los animales infectados puedan tener una apariencia sana con una libido normal, pero con eyaculados con pocos espermatozoides o con ausencia de éstos. La mayoría de los animales con más de 15 días de infección tenían granulomas en epidídimo desde el tamaño de la cabeza de un alfiler hasta 5-10 cm de diámetro. En la EOA esta es la manera en como participa el semental para que el número de repeticiones del estro en las hembras se incremente, sobre todo cuando éstas resultan negativas a la infección. Esta situación repercute en una disminución del porcentaje de fertilidad de servicio a parto y de manera simultánea se observa que el promedio de lechones al parto disminuye. En las granjas en donde se maneja la inseminación artificial, es más fácil detectar este problema; sin embargo muchas de la explotaciones porcinas en nuestro país no manejan inseminación artificial.

En algunas enfermedades virales del cerdo las biometrías hemáticas son pruebas complementarias para el diagnóstico. Se utilizan con mayor frecuencia para el diagnóstico diferencial en la peste porcina africana en donde provoca leucopenia. En la etapa febril de la fiebre porcina clásica se observa anemia, trombocitopenia y leucopenia. Desciende la cuenta leucocitaria de 9000 a 3000 por  $\text{mm}^3$ , la cual persiste hasta la muerte. Las plaquetas tienen como valores normales de 150 000 a 500 000 por  $\text{mm}^3$  y disminuyen de 50 000 a 5 000 por  $\text{mm}^3$ . También se logra observar ligera leucopenia en otras enfermedades que afectan al cerdo; por ejemplo, diarrea viral bovina o parvovirus porcina (Carbrey *et al.*, 1976; Liess, 1988; Mengeling *et al.*, 1976; Sánchez-Vizcaino, 1992). Se obtuvo un seguimiento cronológico de las biometrías hemáticas de los verracos que se inocularon con el virus de la enfermedad del ojo azul, con la finalidad de detectar cambios que pudiera generar la infección; Sin embargo, éstos no se presentaron. Esa situación generó que las correlaciones entre el tiempo de infección y los diferentes parámetros hemáticos no se presentaran ( $P > 0.05$ ). Esto último indica la no afinidad del virus hacia los diferentes componentes sanguíneos. El virus ingresa por vía oronasal, se aloja en tonsilas y se distribuye en el resto del organismo vía linfática, posteriormente vía arterial y venosa, debido a que se le puede aislar de diferentes tejidos. En el verraco, el ingreso del virus a testículo y epidídimo se efectuó seguramente por vía sanguínea.

En cuanto a la respuesta humoral al virus de la EOA; se han implementado técnicas para detectar anticuerpos específicos contra el virus de la enfermedad del ojo azul (Hernández *et al.*, 1992; Ramírez *et al.*, 1996). Esto ha permitido realizar estudios epidemiológicos para conocer la distribución de la enfermedad en la República Mexicana (Carreón *et al.*, 1989).

En la respuesta inmune a otros paramixovirus como el virus de parainfluenza 3, se ha reportado que los anticuerpos dirigidos contra la proteína HN se identifican desde el primer contacto con el virus y aumentan progresivamente con las reinfecciones. Mientras que los anticuerpos contra la proteína F se detectan solo después de múltiples infecciones. En el caso del virus parainfluenza, se ha observado que el título de anticuerpos séricos dirigidos contra las glicoproteínas virales se correlaciona con el nivel de protección contra la infección (Ray *et al.*, 1990).

Con la infección de los verracos el virus de la EOA fue capaz de inducir la presencia de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación después de la segunda semana. Los títulos más elevados se presentaron después de la formación del granuloma (tercera y cuarta semanas de infección). El análisis de la especificidad de los anticuerpos, que se realizó mediante ensayos de inmunotransferencia; reveló que durante las primeras semanas de infección los anticuerpos están dirigidos contra la glicoproteína HN. En la cuarta y quinta semanas fue cuando se detectó la presencia de anticuerpos contra otras proteínas como son la M y la NP respectivamente. No obstante que otras proteínas fueron reconocidas, la glicoproteína HN se mantuvo como inmunodominante durante todo el experimento. La glicoproteína F no fue posible identificarla debido probablemente a la pobre inmunogenicidad de esta proteína (Ray *et al.*, 1990). Con base en estos resultados, se investigó en torno a esta proteína para la elaboración de vacunas. Los resultados que se obtuvieron se consideraron potencialmente viables (Zenteno, 1998).

Para el diagnóstico serológico del virus de la EOA inicialmente fue empleada la técnica de inhibición de la hemaglutinación. Esta técnica se utilizó por la propiedad hemaglutinante del virus. Además es una técnica rápida, fácil, accesible, económica y que no requiere un medio estéril para su realización. Posteriormente se desarrollaron otras técnicas como la seroneutralización, que es considerada más sensible y específica. También ha sido instrumentada la técnica inmunoenzimática (ELISA), pero aún no se utiliza de manera masiva. Para los seguimientos serológicos a nivel de granja o el diagnóstico regional, siempre se ha utilizado la inhibición de la hemaglutinación. Las técnicas de seroneutralización y ELISA solamente se han realizado de manera aislada debido a la dificultad de reproducir los resultados. Para estandarizar estas técnicas solamente se han utilizado sueros provenientes de granjas que han tenido la infección, por tal motivo se desconoce el inicio de la infección en los animales y el tiempo de convalecencia. En este trabajo experimental se conoce el inicio de la infección y además se pudo reproducir la técnica de seroneutralización en todas las muestras. De esta manera se detectó la presencia de los primeros anticuerpos que se generaron por la infección. Éstos se manifestaron para ambas técnicas en la segunda semana de infección. También

se pudo observar que en la seroneutralización, la inespecificidad del suero se presentó hasta la dilución 1:16. Se consideró un suero positivo a partir de la dilución 1: 32, mientras que para la inhibición de la hemaglutinación un suero positivo se consideró a partir de la dilución 1:16. Los niveles de anticuerpos altos se detectaron a partir del día 19. Existieron animales que seroconvirtieron con un nivel bajo de anticuerpos y así se conservaron durante toda la fase experimental.

Hasta la fecha, las descripciones relacionadas con la respuesta inmune celular al virus de la EOA, refieren observaciones clínicas que sugieren que la enfermedad es autolimitante, ya que después de algún tiempo desaparecen los signos clínicos y es posible detectar anticuerpos contra el virus en los animales que se conservaron en la granja (Stephano *et al.*, 1986a). Sin embargo, no se han realizado estudios que permitan identificar la participación de la respuesta celular como determinante de la autolimitación de la infección. En este trabajo se analizó la respuesta proliferativa de las células mononucleares (CMN) de cerdos infectados a las lectinas fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (Con-A). Estas proteínas son mitógenos que estimulan la proliferación policlonal de los linfocitos T. La PHA estimula a las células T cuando reconoce a la cadena  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  del receptor del linfocito T (TCR) sin reconocer el complejo CD3 (Chilson *et al.*, 1989). Por otro lado, la Con A estimula los linfocitos T cuando reconoce complejo CD3 y las cadenas del TCR (Licastro *et al.*, 1993). También se ha demostrado que en la respuesta proliferativa del linfocito porcino a Con A requiere la participación activa de la porción  $\epsilon$  del CD3, así como algunos mecanismos de activación intracelular como la  $p72^{syk}$  (Takeuchi *et al.*, 1993).

En los cerdos infectados se observó inmunodepresión durante la primer semana. Esto se pudo apreciar ante los bajos índices de estimulación con PHA y Con A durante este periodo. Se ha descrito la susceptibilidad de los cerdos infectados con el virus de la EOA a infecciones secundarias (Stephano *et al.*, 1988a). Un comportamiento similar se ha observado con el virus de las paperas (Griffin *et al.*, 1994). Después de la segunda semana de infección hubo una respuesta específica hacia el virus de la EOA. Esta reacción se observó a través de la respuesta proliferativa de células mononucleares en presencia del virus de la EOA

Los resultados indicaron que el virus de la EOA pudo inducir la proliferación de linfocitos de memoria en los cerdos infectados debido a que estas células fueron reactivadas en las pruebas que se realizaron *in vitro*.

Las células mononucleares que se obtuvieron de los cerdos no infectados no proliferaron en presencia del antígeno. De esta manera se confirmó la especificidad de la respuesta de memoria.

Con respecto al análisis fenotípico se observó que los valores de la población  $CD4^+CD8^+$  se incrementaron durante la primer semana de infección. Estos linfocitos T están asociados a actividad citóxica y se observan frecuentemente en porcentajes elevados en infecciones virales. Aunque en este trabajo no se evaluó actividad citotóxica de las células  $CD4^+CD8^+$ , no se debe de descartar con ésta respuesta de que tuvieron un papel importante ante la infección con el virus de la EOA. Los linfocitos  $CD4^+CD8^+$  mostraron un incremento después de la infección. A la tercer semana se observó una disminución de esta población. Este fenómeno pudo atribuirse a un secuestro de éstas células en tejido linfoide. A pesar de que no se tiene completamente definida la función de los linfocitos  $CD4^+CD8^+$  en el cerdo, algunos autores les atribuyen funciones de células de memoria (Zuckermann *et al.*, 1996b. Summerfield *et al.*, 1996).

La presencia de linfocitos T dobles positivos  $CD4^+CD8^+$  es un evento único en los cerdos, que se presenta en condiciones normales en sangre periférica y en tejidos linfoides (Saalmüller *et al.*, 1987; Zuckermann *et al.*, 1996a; Yang *et al.*, 1996). A diferencia del humano que en condiciones normales expresa <3% de linfocitos dobles positivos y en algunos procesos patológicos expresa hasta un 15% (De María *et al.*, 1987). Resultados recientes sugieren que la población doble positiva del cerdo podría representar una estirpe de células de memoria, ya que estas células expresan altos porcentajes de la integrina  $\alpha 4/\beta 1$ . Estos niveles de integrina en humanos se ha relacionado con células de memoria. (Zuckermann *et al.* 1996b). Además, esta población de linfocitos es capaz de responder al estímulo antigénico *in vitro*, después del estímulo con virus, bacterias o parásitos predominando sobre otras poblaciones celulares (Pescovitz *et al.*, 1994; Kimman *et al.*, 1995; Zuckermann *et al.*, 1996b). La infección con el virus de la EOA en los verracos mostró que los linfocitos  $CD4^+CD8^+$  como los

linfocitos  $CD4^+CD8^+$  son capaces de responder al estímulo *in vitro* con el virus. En los resultados de éste trabajo se observó que el incremento en los porcentajes de las células dobles positivas fue mayor al de las  $CD4^+CD8^-$ . En base a los antecedentes de esta población, se puede suponer que los linfocitos  $CD4^+CD8^+$  podrían estar jugando un papel importante en la respuesta secundaria frente al virus de la EOA.

Estudios realizados en cerdo, infectados con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRS) (Shimizu *et al.*, 1996), con el virus de la fiebre porcina africana (FPA) (Ramiro-Ibáñez *et al.*, 1997) y con el virus de la enfermedad de Aujeszky (Wang *et al.*, 1988; Kimman *et al.*, 1995), han mostrado los cambios en las poblaciones celulares de sangre periférica debidos a la infección. Los resultados de estos estudios revelaron una disminución en los porcentajes de linfocitos  $CD4^+CD8^-$  y aumento de los linfocitos  $CD4^-CD8^+$ . Es importante hacer notar que ninguno de estos estudios ha evaluado la población de linfocitos  $CD4^+CD8^+$ . En cerdos SPF( libres de patógenos específicos) infectados con PRRS, los autores además de analizar los linfocitos  $CD4^+CD8^-$  y  $CD4^-CD8^+$ , determinaron la proporción de linfocitos CD4/CD8. Se observó que esta proporción disminuyó debido a la disminución de los linfocitos  $CD4^+CD8^-$  y al aumento de  $CD4^-CD8^+$  (Shimizu *et al.*, 1996)

En este trabajo se determinó la población de linfocitos  $CD4^+CD8^+$  durante la infección con el virus de la EOA. No se tienen trabajos previos que hayan evaluado esta población celular con infecciones virales del cerdo. La tendencia de las tres poblaciones de linfocitos fue la siguiente: a) los linfocitos  $CD4^+CD8^-$  tuvieron valores similares a los animales testigo o inferiores. b) los linfocitos  $CD4^-CD8^+$  y  $CD4^+CD8^+$  manifestaron un comportamiento similar después de la infección con el virus de la EOA, tuvieron la tendencia de incrementarse.

Una posible explicación a la disminución de los linfocitos  $CD4^+CD8^-$  podría ser de que el virus estuviera eliminando esta población celular, como sucede con el virus del SIDA (Roitt *et al.*, 1993). Sin embargo la población de linfocitos  $CD4^+CD8^-$  tiende a recuperarse. La disminución que se observó pudo deberse a un reclutamiento celular en los órganos blanco de la infección con el virus de la EOA, como se ha propuesto con otras infecciones del cerdo (Page *et al.*, 1992).



El incremento gradual de  $CD4^+ CD8^+$  durante la infección por el virus de la enfermedad del ojo azul, podría deberse a un reflejo normal de esta población. Previamente se ha reportado que esta población incrementa con la edad del animal (Saalmueller *et al.*, 1994). Esta situación es poco probable ya que los cerdos infectados presentaron mayor aumento que los no infectados. Otra posibilidad es que el incremento refleje mayor memoria inmune frente al virus de la EOA y en consecuencia mejor control de la enfermedad.

La población de monocitos ha mostrado ser un importante sitio para la multiplicación del virus del Sarampión (Solonen *et al.*, 1988; Esolen *et al.*, 1993) y el virus de la enfermedad de Aujeszky (Chinsakchai *et al.*, 1994), entre otras infecciones virales. Los resultados que se obtuvieron al inocular los verracos indican que el virus de la EOA también reconoce preferencialmente a los monocitos. Los ensayos *in vitro* de susceptibilidad en las células adherentes de cerdos sanos mostraron que el virus de la EOA reconoció a los monocitos y formó sincitios; provocó lisis celular y se detectó su presencia en el líquido de cultivo después de 72 h de incubación. Esto sugiere un posible papel de las células mononucleares en el transporte sanguíneo del virus hacia sus órganos blanco.

A la necropsia no se pudo observar alteración alguna asociada a la presencia del virus, tanto en cavidad abdominal como torácica. En encéfalo tampoco se observó congestión meníngea como sucede en lechones. El único cambio aparente en algunos animales fue la diferencia del tamaño testicular, la mayoría presentó nódulos en epidídimo cuando éstos tenían más de 15 días de infección. En varios de ellos se observaron áreas de consolidación en pulmón. Algunos también presentaron ligeras adherencias en cavidad torácica. Estas lesiones son difíciles de asociar a la presencia del virus debido a que son muy frecuentes en cerdos y son causadas por otros agentes, aunque es factible que el virus los haya predispuesto o exacerbado. Esto fue factible debido a que en la primera semana de infección fue muy evidente la tos y lagrimeo en la mayoría de los animales, además de que también se pudo aislar al virus del pulmón en 2 animales.

El aislamiento del virus en los tejidos tuvo un comportamiento inverso a la serología y al aumento del tamaño testicular. Esto se debió a que el aislamiento viral se pudo realizar con gran facilidad en el animal que tenía 5 días de infección, aunque conforme transcurría el tiempo de infección el aislamiento fue más difícil realizarlo. Sin embargo, a partir de las glándulas bulbouretrales se aisló de manera constante hasta el día 45 de infección. Lo anterior permite suponer que aunque esta glándula no tuvo daño alguno, el virus estuvo presente en ella y que la eliminación de éste se puede realizar en semen a través de las secreciones de esta glándula. Sobre todo porque los sementales nunca perdieron la libido a pesar de tener aumento del tamaño testicular hasta en 30% más del tamaño original.

A nivel de microscopía electrónica, se pudo determinar el proceso evolutivo del daño celular en epidídimo en el animal que fue sacrificado a los 15 días de infección. En esta etapa aún se podían observar las estructuras celulares y simultáneamente vacuolizaciones, así como acúmulos de nucleocápsides en el citoplasma. No se tienen antecedentes a nivel de microscopía electrónica de tejidos afectados con este virus.

Existen varios virus que se han podido aislar en semen; por ejemplo, el que corresponde al síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo, así como los de la fiebre aftosa, parvovirus porcino y enfermedad de Aujeszky; sin embargo, ninguno de ellos logra la destrucción tan severa que genera el virus de la EOA a nivel de epitelio pseudoestratificado de epidídimo y parénquima testicular. Esta pérdida de estructuras celulares se evidenció en la evaluación hormonal, donde los niveles de testosterona, androstendiona y dihidrotestosterona en testículo de los animales infectados resultaron ser superiores a los animales testigo. A nivel de epidídimo y a nivel sanguíneo estas hormonas no tienen variación. Ante la pérdida de espermatogonias, espermátocitos primarios, secundarios y espermátides, se requirió más tejido de parénquima testicular de los animales infectados para extraer las tres hormonas. La sustitución de las estructuras de los túbulos seminíferos fue aportada por una mayor cantidad de tejido intersticial, en esta zona las células presentes son las de Leyding o intersticiales. Estas células están involucradas en generar la presencia de esteroides sexuales. Al continuar con su producción fisiológica normal, estas hormonas llegaron a epidídimo y a nivel sanguíneo

sin alteración alguna. Esta es la explicación de que a pesar de tener aumento en el tamaño testicular no perdieron la libido, como sucede en el caso de brucelosis.

En este trabajo la reproducción de los signos en los verracos se logró mediante la inoculación del virus por vía oronasal e intramuscular. Cuando el virus fue administrado solo por vía intranasal mediante instilación también se generaron los cuadros de orquitis.

En investigaciones previas se describió que el ingreso de este virus ha sido por vía oronasal en donde se inicio la replicación del virus específicamente en mucosa nasal cornetes y tonsilas. En estos tejidos se pudo aislar al virus y su presencia fue demostrada por la inmunofluorescencia. En estas mismas investigaciones al inocular al virus intratraquealmente, el periodo de incubación se acortó (Stephano 1985c; Stephano *et al.*, 1988 b).

Es evidente que del sitio inicial de replicación; el virus se disemina a varios tejidos. El mecanismo seguramente es a través de una viremia, debido a que se ha podido aislar al virus en diversos tejidos. En animales lactantes se aisló de encéfalo y pulmón. En encéfalo se aisló con mayor abundancia que en ningún otro tejido (Allan *et al.*, 1996. Stephano *et al.*, 1985a). La inoculación intracerebral acorta el periodo de incubación. Los cuadros clínicos que se ocasionaron al inocularlos con este procedimiento; fueron similares a los observados en los casos agudos de lechones infectados naturalmente. En todos éstos animales se presentó encefalomiелitis que afectó principalmente sustancia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral. En pulmón se observaron zonas localizadas de neumonía intersticial. La característica de esta neumonía fue el engrosamiento del septo alveolar por células mononucleares. En estos mismos animales se aisló el virus de sangre, riñón, bazo, hígado y ganglios mesentéricos sin embargo en éstos tejidos no se observaron cambios macroscópicos o histológicos (Stephano *et al.*, 1985 a. Stephano 1985 c).

Un estudio similar se realizó en lechones de 3 y 17 días de edad, estos animales fueron inoculados por vía intranasal. El virus se pudo recuperar de diversos órganos y tejidos, éste experimento duro 8 días y permitió aislar al virus en mucosa nasal, tráquea, mucosa bronquial y pulmón. En sistema nervioso central se presentó una relación directa

entre el tiempo de la manifestación de los signos y el aislamiento del virus. Esto ha permitido corroborar la difusión pantotrópica del virus. (Allan *et al.*, 1996).

Estos antecedentes permiten suponer, que para la infección existe un proceso de tropismo por parte del virus. A pesar de que el aislamiento del virus ha sido difícil a partir de los componentes celulares de la sangre, se considera que este agente infeccioso migra en el organismo animal por vía sanguínea y posteriormente la hemaglutinina del virus reconoce específicamente residuos sacarídicos (sialil-lactosa) en el tejido a infectar (Reyes, 1993a).

En animales adultos como lo son las cerdas gestantes, también se identificó que el virus afectó algunos parámetros reproductivos de la hembra. La infección se manifestó con repetición de ciclos estrales en animales a los cuales ya se habían inseminado de manera natural o artificial. Disminuyó el porcentaje de fertilidad de servicio a parto de 90-92% a 70-65%. De manera simultánea se observó que el promedio de lechones nacidos vivos disminuyó de 9.5 a 7.5%, el porcentaje de nacidos muertos aumentó del 3.3 al 12% y el porcentaje de momificaciones también aumento del 1.1% al 14%. La repercusión de un brote provocó una disminución casi del 20% en las utilidades de los porcicultores (Martínez *et al.*, 1988; CONASA 1995 ).

Como se observa, existen algunos reportes sobre las infecciones experimentales en animales lactantes y en cerdas reproductoras. Estos reportes han permitido conocer más acerca de la patogenia de la infección. Se tiene información de signos clínicos en verracos en brotes infecciosos observados a nivel de campo (Stephano *et al.*, 1990). Sin embargo, se desconocen cuales son las características patológicas de cerdos adultos que han sido infectados con virus de la EOA. En éste trabajo se realizaron infecciones experimentales en verracos adultos, en los cuales fue posible observar la presencia de lesiones granulomatosas características de la enfermedad.

Durante este estudio fue posible aislar al virus de los testículos y el epidídimo en el 50% de los cerdos infectados. También, el virus se logró aislar de las glándulas bulbouretrales, vesículas seminales y próstata. El hecho que el virus se aisle de estos órganos permite suponer la presencia del oligosacárido sialil alfa-2,3 lactosa. El cual ha mostrado ser esencial para la infección *in vitro* de células Vero (Reyes *et al.*, 1993b).

En este experimento, como característica de la infección por el virus de la EOA fue la formación de granulomas en los epidídimos de los verracos. Un granuloma es un proceso inflamatorio en el que participan macrófagos, linfocitos T, células NK, células gigantes. Este proceso es regulado por la participación de citocinas como la IL-2 y el INF- $\gamma$ . En la infección por el virus de la EOA, el proceso inflamatorio se observó alrededor del día 5 de infección. También desde éste día se aisló al virus de los diferentes órganos reproductivos. La presencia del virus activó la respuesta celular, que se reflejó en los elevados porcentajes de linfocitos T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>, los cuales son células especializadas en la lisis de células infectadas por virus. El incremento en los porcentajes de los linfocitos CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> se presentó a partir de la primera semana de infección. Durante los siguientes días de infección, la presencia del virus en estos órganos provocó las primeras lesiones en células germinales de testículo y en el epitelio pseudoestratificado del epidídimo; las cuales se caracterizaron por vacuolización del citoplasma y la presencia de espermatozoides en capilares en uno de los cerdos infectados. La presentación del proceso tuvo dos tipos de reacciones: la exudativa y la proliferativa. La primera se presentó antes del día 15 de infección caracterizada por fenómenos de hiperemia, edema y necrosis por coagulación así como la proliferación de células inflamatorias. La reacción proliferativa se presentó después del día 15 y esta representada por la intervención de linfocitos e histiocitos transformados en células epitelioides. Se presentó una reacción fibroconectiva periférica, conjuntamente con una necrosis central. El material necrótico se dispuso como una masa caseosa, debido a los restos celulares. El incremento de linfocitos CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> en la primera semana de infección y la presencia del virus en los órganos reproductivos explica las lesiones que se han descrito anteriormente. Durante este tiempo, la respuesta humoral generó anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación específicos contra la EOA. Los cuales únicamente reconocen a la proteína HN y es la encargada del reconocimiento del receptor del virus de la EOA.

En el día 15 de infección, el aislamiento del virus de los diversos tejidos fue menor comparado con el día cinco. En las glándulas bulbouretrales y la próstata fue posible aislar el virus con más facilidad. La presencia del virus en glándulas

reproductivas accesorias explica el que los sementales infectados sean un importante factor en la diseminación de la infección dentro de una granja. El hecho de que no fuera posible llevar a cabo el aislamiento viral en este tiempo confirma, que la respuesta inmune estaba llevando a cabo el control de la infección con la eliminación de las células infectadas por el virus, principalmente por linfocitos  $CD4^+ CD8^+$ . Este mecanismo de control, provocó que durante este tiempo se observara un incremento en el tamaño testicular basado principalmente por una edematización. Este aumento se presentó en 75% de los cerdos infectados. Después de éste proceso el análisis microscópico reveló la presencia de lesiones granulomatosas en todos los cerdos infectados, aún en los cerdos que no habían desarrollado nódulos al tacto. Con base en estos resultados, las lesiones granulomatosas características de la infección por la EOA se inician a partir del día 15 de infección.

Postular que el virus sea el único responsable de la formación del granuloma no es factible, ya que tendrían que presentarse lesiones granulomatosas en otros órganos en los cuales se ha observado la presencia del virus. Se ha mencionado que las células blanco para la multiplicación del virus de la EOA son las de la línea germinal del testículo y las del epitelio pseudoestratificado del epidídimo. Las primeras son la fuente de espermatozoides y las segundas favorecen la maduración de estos espermatozoides. El efecto lítico del virus y la actividad citotóxica de linfocitos  $CD4^- CD8^+$ , células NK y la participación del complejo antígeno-anticuerpo-complemento-macrófago, favorecen que los espermatozoides queden expuestos en el espacio intersticial.

En la infección del virus de la EOA en los verracos, el sistema inmune además de enfrentar la presencia del virus, tiene que hacer frente a los espermatozoides. Las células espermáticas por ser un excelente antígeno son capaces incrementar la respuesta inflamatoria que se presenta en estos tejidos por la presencia del virus. Con base en estos resultados resulta mas importante la respuesta inflamatoria en el espacio intersticial que se genera contra los espermatozoides que la que se genera contra el virus. Ambas respuestas participan en la generación de las lesiones granulomatosas.

### **Conclusiones.**

1. Se pudo aislar y caracterizar al virus de la enfermedad del ojo azul.
2. Con la inoculación experimental de este aislamiento se pudieron generar signos de orquitis en verracos
3. Los aislamientos realizados por otros autores no asocian al virus de la EOA con problemas de orquitis.
4. El aumento del tamaño testicular a los 15 días de infección correspondió a una edematización.
5. El aumento del tamaño testicular después de los 30 días de infección correspondió a la presencia de granulomas espermáticos en epidídimo.
6. La disminución del tamaño testicular después de los 30 días de infección correspondió a la pérdida de estructuras celulares en túbulos seminíferos.
7. Las células "blanco" del virus de la enfermedad del ojo azul son espermátogonias y tejido pseudoestratificado de epidídimo.
8. No se pierde la libido del verraco ante la infección por el virus de la enfermedad del ojo azul, debido a que las células de Leyding o intersticiales no se ven afectadas durante la infección del animal.

9. Al no perderse la libido el verraco puede continuar con eyaculaciones sin que el volumen se vea afectado.

10. Las eyaculaciones pueden carecer de espermatozoides, debido a que existe una obstrucción mecánica a nivel de epidídimo por la presencia del granuloma o a la pérdida de espermatogonias

11. Es frecuente observar eyaculados con abundantes malformaciones espermáticas en la enfermedad del ojo azul.

12. Después de la inoculación con el virus de la enfermedad del ojo azul se puede observar fiebre y anorexia durante 24-48 h, lagrimeo y estornudos por 5-7 días.

13. En las biometrías hemáticas no se observó alteración en los valores de la cuenta roja y blanca durante todo el periodo evaluado al inocular a los verracos con el virus de la enfermedad del ojo azul.

14. A la necropsia se observaron nódulos blanco-amarillentos en epidídimo después del día 15 de infección con el virus de la enfermedad del ojo azul. Ante la infección viral se pudo observar diferencia en el tamaño y peso de ambos testículos. No se observaron alteraciones en el resto de los tejidos.

15. Se pudo aislar al virus entre los 5-45 días de infección de diversos tejidos del verraco. Los aislamientos se obtuvieron de forma constante en las glándulas bulbouretrales.

16. A la histopatología se encontró infiltración linfocitaria perivascular en encéfalos de los animales con 5 y 15 días de infección; lesión característica de un proceso infeccioso viral.



17. A los 15 días de infección con el virus de la enfermedad del ojo azul se observó vacuolización en células de tejido pseudoestratificado de epidídimo y en espermatogonias. También se observó la presencia de espermatozoides en capilares intersticiales del parénquima testicular.

18. A la microscopía electrónica se observó daño en el citoplasma de las células del epidídimo con pérdida de estereocilios y vacuolización a partir del día 15 de infección. En éste mismo periodo se observaron acúmulos de nucleocápsides en el citoplasma de estas células.

19. En la infección del virus de la enfermedad del ojo azul se aumentaron los porcentajes de linfocitos  $CD8^+$  y  $CD4^+CD8^+$  en las dos primeras semanas de infección, las cuales debieron de participar en la formación del granuloma.

20. Los niveles de anticuerpos contra el virus de la enfermedad del ojo azul se detectaron a partir de la segunda semana de infección, a través de la técnica de inhibición de la hemaglutinación y virus seroneutralización

## Referencias.

Allan GM., McNeilly F, Walker I, Linne T. Moreno LJ, Hernández JP, Kennedy S, Carrol BP, Herron B, Foster JC, Adair B. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Invest.* 1996; 8: 405-413.

Arellanes AE, Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en el gato doméstico (*Felis catus*). *Rev. Vet. Mex.* 1994;25 :239-241.

Berg M, Sundqvist A, Moreno LJ, Linne T. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses *J. Gen. Virol.* 1991; 72: 1045-1050.

Berg M, Hertner B, Moreno LJ, Linné T. The P gene of the porcine Paramyxovirus LPMV encodes three possible polipeptides, P, V and C; the protein m RNA is edited. *J. Gen. Virol.* 1992;73:1195-1200.

Binnendijk R, Poelen M, Kuijpers K, Osterhaus A, Uytdehaag F. The predominance of CD8<sup>+</sup>T cells after infection with Measles virus suggest a role for CD8<sup>+</sup>class Y MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. *J Immunol* 1990;144 : 2394-2399.

Biron AC. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of virus infection. *Curr Opin Immunol* 1994;6 :530-538.

Burlenson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology: a laboratory manual.* Academic Press, Inc. 1992.

Campos E. Síndrome del ojo azul o cerdos zarcos. *Memorias de la XVII Convención AMVEC . Ixtapa* 1981.

Campos HR y Carbajal SM. Transtornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. *Avances en producción porcina vol.I.ed. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. A.C.* 1992: 243.

Carbrey EA, Stewart WC, Kresse JI, Snyder ML. Natural infection of pigs with bovine diarrhoea virus and its differential diagnosis from hog cholera. *J. Am Vet. Med. Assoc.* 1976; 169:1217-1219.

Carreón R, Fuentes M, Stephano A, Ramírez H. Estudios preliminares del paramixovirus del Ojo Azul en la República Mexicana. *Memorias del curso de actualización de las enfermedades del Cerdo. UNAM-AMVEC. México* 1989:78-82.

Catty D, Murphy G. Immunoassays using radiolabels. In: Catty D. Editors. Antibodies. Vol 2. A practical approach IRL. Press. 1989:77-96.

Colman PM, Hoyne PA, Lawrance MC. Sequence and structure a ligand of paramyxovirus haemagglutinin - neuraminidase with influenza virus neuraminidase. J. Virol 1993;67: 2972 -2980.

CONASA. Situación del Síndrome de Ojo Azul en México: Impacto económico de la enfermedad. 1995:152-164

Comerioh. Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets. Res. Vet. Sci. 1965;6: 337-343.

Correa GP, Martínez LA, Ericsson A, Moreno LJ. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of piglet in México. Proc. 9th IPVS Congress. Barcelona, Spain. July 15-18, 1986:205

Cropper M, Dunne HE, Leman AD. Prevalence of antibodies to porcine enteroviruses and porcine parvovirus in body fluids of fetal pigs from small vs large litters. JAVMA 1976;68:233-235.

Cuetero RS, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. Vet. Mex 1995; 26:231-236

Chilson P, Chilson K. Mitogenic lectins binds to the antigen receptor on human lymphocytes. Eur J Immun 1989; 19: 389-396.

Chinsakchai S, Molitor T. Immunobiology of pseudorabies virus infection in swine. Vet Immunol and Immunopathol 1994; 43: 107-116.

Christensen NH, Saifudin. A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. Avian Dis 1989; 33:622-630.

Dalton AJ, Haguenu F. Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: an atlas. Academic Press Inc. USA. 1973.

De Maria A, Malnati M, Moreta A. CD3<sup>+</sup>4-8- wt31- (T cell receptor  $\gamma\delta^+$ ) cells and other unusual phenotypes are frequently detected among spontaneously interleukin-2 responsive T lymphocytes present in the joint fluid in juvenile rheumatoid arthritis. Eur J Immunol 1987; 17: 1815.

Doherty P. Anatomical environment as a determinant in viral immunity. J Immunol 1995;155:1023-1027.

Doring RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 1993;75: 295-305.

Dunne HW. Abortion, stillbirth, fetal death, and infectious infertility in: *Disease of Swine* fourth edition Iowa State University Press 1978.

Esolen L, Ward B, Moench T, Griffin D. Infection of monocytes during Measles. *Journal of Infectious Diseases* 1993 ;168: 47-52.

Flores JJ, López MR, Fuentes RM, Ramírez MH. Inoculación experimental del paramyxovirus del ojo azul (POA) en el pecari de collar (*Dicotyles tajacu*) XXVII Congreso Nacional AMVEC Acapulco, Gro. México. 1992:8-9.

Freshney RI. *Culture of animals cells*. 3<sup>rd</sup> ed. Wiley-Liss. Inc., New York, USA. 1994

Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo ME, Fraire BI. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del Ojo Azul en cerdos de la República Mexicana. *Vet. Mex* 1992;23:37-37

Gardner PS, Mc Quillen J. *Rapid virus diagnosis application of immunofluorescence*. Butter worth Inc. Great Britain. 1980

Gay GM., Stephano HA, Vergara LI M. Determinación de anticuerpos contra un virus aislado en cerdos afectados con el síndrome del ojo azul en sueros de perros en contacto. *Mem. XX Reunión Nacional AMVEC, Mérida, Yuc.* 1985: 69-70.

Gradil C, Molitor T, Harding M, Crabo B. Excretion of porcine trough the genital tract of boars. *Am. J. Vet. Res.* 1990;51:359-362.

Greig AS, Johnson CM, Boullant AM. Encephalomyelitis of swine caused by haemagglutinating virus. VI. Morphology of the virus. *Res. Vet. Sci.* 1971; 12:305-307.

Griffin D, Ward B, Esolen L. Pathogenesis of Measles virus infection: An hypothesis for altered immune responses. *J. Infect Dis* 1994;170(Suppl1):24-31.

Guillén AH. . Estudio de un brote de una nueva enfermedad denominada Síndrome del Ojo Azul de los porcinos. Tesis Profesional, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Guadalajara 1984.

Hames BD, Rick wood D. *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*. 2nd ed. IRL Press. Oxford England. 1990.

Harlow E, Lanne D. *Antibodies: Laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY. USA. 1988

Hernández-Jáuregui P., Sundqvist A., Fuentes M, Díaz A, Reyes J, Hernández E, Moreno L J. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros de cerdos vacunados y de brote para anticuerpos contra el Paramixovirus del síndrome del Ojo Azul de los cerdos. *Vet Mex* 1992; 23: 217-221.

Herrera J, Morán L, Raudales L, Leon C, Bermúdez JA. Radioinmunoanálisis de pregnelona, 17-hidroxipregnelona y sus formas conjugadas. *Archivos de investigación médica. IMSS*. 1974; 5:617-630.

Holtz W, Smith D. 1976. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J. Reprod. Fertil* 1976; 46:277.

Huang J, Gentry R, Zrkower A. Experimental infection of pregnant sows with porcine enteroviruses. *Am J. Vet. Res.* 1980a; 41:469-473.

Huang J, Rott R, Wahn K, Klenk H-D, Kohama T. The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by Myxoviruses. *Virology* 1980b;107: 313-319.

Hughes P, Varley M. *Reproduction in the pig*. Edited Butterworth and col. publishers Ltd. 1980

Hunter, RHF, Holtz W, Henfrey PJ. Epididymal function in the boar in relation to the fertilizing ability of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1976;46:463.

Kahrs RF, Johnson ME, Bender GM. Studies on the detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in bovine semen. *Annu. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost.* 1977; 20: 187-208.

Kimman T, Bruin T, Voermans J, Peeters B, Bianchi A. Development and antigen specificity of the lymphoproliferation response of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B- and T-cell response. *Immunology* 1995; 86: 372-378.

Kingsbury WD, Paramyxoviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, *et al.* (Eds. ) *Virology*, 2nd de., Raven Press. New York. 1990:945-961.

Klaus GGB. *Lymphocytes: a practical approach*. IRL. Press. Oxford. England 1987.

Koszinowski U, Reddehase M, Jinjic S. The role of CD4 and CD8 cells in viral infections. *Curr Opin Immunol* 1991;3:471-475.

Larsen RE, Shope RE, Leman AD, Kurta HJ. Semen changes in boars after experimental infection with pseudorabies virus. *Am J. Vet Res.* 1980;41:733-739.

Licastro F, Davis L, Morini M. Lectines and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. *Int. J. Biochem.* 1993; 25: 845-852.

Liess B. Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing. 1988.

Ling NR, Catty D. Haemagglutination and hemolysis assays. In: Catty D., editors. *Antibodies. Vol.1. A. Practical approach.* IRL Press. 1989: 169-188

Linne T, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B, Moreno LJ. The Molecular biology of the porcine Paramyxovirus LPMV. *Adv. Vet.* 1992; 33:263-273.

Lipkind M, Shoham D, Shihmanter E. Isolation of a Paramyxovirus from pigs in Israel and its antigenic relationship with avian paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* 1986;67:427-439.

López MA. Inspección de cadáveres y descripción de lesiones macroscópicas. En: Valero G., editor. *Diagnóstico Veterinario. 2ª edición.* Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios AC. 1997.

Madin SH. Vesicular exanthema virus. *Virus infections of porcines*, ed. by Pensaert M.B. 1980: 261-271.

Mahy BWJ. *Virology: a practical approach.* IRL. Press Oxford. England 1991.

Markwell MAK, Fredman P, Svennerholm L. Receptor ganglioside content of three host for Sendai virus MBDK, HeLa, and MDCK cells. *Biochim Biophys Acta.* 1984;775:7-16.

Martínez LA, Correa GP, Colinas TA, Galina PL. Opacidad Corneal Bilateral, en lechones de una cerda inoculada con el paramixovirus porcino de la Piedad, Michoacán (Pp-LPM). *Mem. Reunion Nacional de Investigación Pecuaria en Mexico.* 1988:54

Mengeling WL, Cutlip RC. Pathogenesis of *in utero* infection: Experimental infection of five-week-old porcine fetuses with Porcine Parvovirus. *Am.J.Vet.Res.* 1975;36:1173-1177.

Mengeling WL, Cutlip RC. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to Porcine Parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* 1976; 37:1393-1400.

Mengeling WL, Paul PS. Reproductive performance of gilts exposed to Porcine Parvovirus at 56 or 70 days of gestation. *Am.J.Vet.Res.* 1981; 42 : 2074-2076.

Moreno LJ, Correa GP, Martínez LA, Ericsson A. Characterization of a Paramyxovirus isolate from the brain of a piglet in México. *Arch. Virol.* 1986; 91: 221-231

Morrison TG. Structure, function and intracellular processing of Paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.* 1988;10:113-136.

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.* Vienna, New York: Springer-Verlag. 1995:265-274.

Murray N, Michael A. Antigen presentation in virus infection. *Curr Opin Immunol*,1992;4 :401-407.

Owens MA, Loken MR. *Flow cytometry principles for clinical laboratory practice.* Wiley-Liss NY. USA. 1995.

Page G, Wang F, Hahn E. Interaction of pseudorabies virus with porcine peripheral blood lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 1992; 52: 441-448.

Pecovitz M, Sakopoulos A, Gaddy J, Husmann R, Zuckermann F. Porcine peripheral blood CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dual expressing T-cells. *Vet Immunol and Immunopathol.*1994; 43:53-62.

Pérez F, Stephano A, Gay M. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus del Ojo Azul. XXIII Reunión de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. León, Gto. México 1988:81-83.

Phillips RM, Foley C, Lukert PC. Isolation and characterization of viruses from semen and the reproductive tract of males swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*1972; 161: 1306-1316

Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del Paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet. Mex.*1996;27:257-259.

Ramiro-Ibáñez F, Ortega A, Ruíz-Gonzalvo F, Escibano J, Alonso C. Modulation of immune cell populations and activation markers in the pathogenesis of African swine fever virus infection. *Virus Research.*1997;47:31:40

Ray R, Compans R. Paramyxovirus. In: Van Regenmortel MHV. *Immunochemistry of viruses II. The Basis for serodiagnosis and vaccines.* Elsevier Science Publishers B.V.1990:217-236.

Reyes LJ. Caracterización del receptor celular del Paramixovirus Porcino LPM. Tesis M.C. Fac. Med. UNAM.1993a.

Reyes LJ, Hernández JP, Montañón LF, Zenteno E. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl ( 2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* 1993b; 133: 195-200

Robinson DG, Ehlers U, Herken R, Hermann B, Mayer F, Schürmann FW. Methods of preparation for electron microscopy: an introduction for the biomedical sciences. Springer-Verlag. NY, Berlin, Heidelberg. 1987

Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology 3<sup>rd</sup> Edition De. Mosby 1993: 18.7-18.9

Roizman B. Multiplication of viruses, an overview, In: Fields BN, Knipe DM *et al.* Virology 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, New York. 1990:3-18.

Saalmüller A, Hirt W, Reddehase M, Buhning H, Jonjic S, Koszinowski U. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. Eur J Immunol. 1987;17: 1297-1301.

Saalmüller A., Hirt W, Reddehase. Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> porcine T lymphocytes. Eur J Immunology. 1989;19:2011-2016.

Saalmüller A, Bryant J. Characteristics of porcine T lymphocytes and T cell lines. Vet Immunol and Immunopathol.,1994; 43: 45-52.

Sandborn EB. Cells and Tissues by Light and Electron Microscopy. Academic. Press Inc. NY. USA. 1969.

Sánchez-Vizcaino JM. African Swine Fever. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, Allaire D, Taylor DJ editors. Diseases of Swine. 7<sup>th</sup> edition. IOWA State University Press. IOWA.USA,1992.

Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. Veterinary hematology. 3<sup>rd</sup> ed. Lea and Febiger. Philadelphia, USA. 1975.

Senne DA. Virus propagation in embryonating eggs. In: Purchase HG, Lawrence H, Domermuth CH, Pearson JE, editors. A laboratory manual for the identification of avian pathogens. Kendall Hunt publishing company. 1989: 176-181.

Schneider-Shaulies S, Kreth HW, Hofmann G, Billeter M, Meulen Ter V. Expression of Measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. Virology .1991;182 : 703-711

Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, Ohashi S, Shimizu S, Ogawa T. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Vet Immunol Immunopathol.1996;50: 19-27.



- Snyder ML, Stewart WC, Kresse JI. Microtitration neutralization test for pseudorabies and transmissible gastroenteritis viruses. In: Hedberg G, Reed RL, Snyder KT., editors. Serologic microtitration techniques. National Veterinary Services Laboratories. IOWA. USA. 1981
- Solonen R, Llonen P, Salmi A. Measles virus infection of unstimulated blood mononuclear cells *in vitro*: antigen expression and virus production preferentially in monocytes. Clin. Exp. Immunol. 1988; 71: 224-228.
- Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, Maqueda AJJ. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Memorias XVII Convención AMVEC., Ixtapa, Gro. Méx. 1981.
- Stephano HA, Gay GM. El Síndrome del "Ojo Azul" . Estudio experimental. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. 1982:523-528.
- Stephano HA. Experimental studies of a new viral syndrome in pigs called "Blue Eye" characterized by encephalitis and corneal opacity. Proc 8<sup>th</sup> Int. Congr. Pig Vet. Soc. Ghent. 1984:71.
- Stephano HA, Gay GM. El síndrome del Ojo Azul en cerdos. Avances en las enfermedades del cerdo. AMVEC. 1985:299-311
- Stephano HA. Brotes de encefalitis en cerdos en engorda. Síntesis Porcina. 1985b;4(2): 9-12.
- Stephano HA. El Síndrome del ojo azul en cerdos . Síntesis Porcina . 1985c;4(5):42-49.
- Stephano HA, Doporto JM, Gay M. Estudio epidemiológico de dos granjas afectadas por el síndrome del ojo azul. Proc. 9<sup>th</sup> IPVS Congress, Barcelona, Spain. July 15-18, 1986a: 456.
- Stephano HA, Gay GM. Encefalitis. Falla reproductiva y opacidad corneal. Ojo Azul. Síntesis Porcina. 1986b; 5(12): 25-39.
- Stephano HA, Gay M, Kresse J. Properties of a paramyxovirus associated to a new syndrome (blue eye syndrome) characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proc. 9<sup>th</sup> IPVS Congress, Barcelona, Spain. July 15-18. 1986c : 455.
- Stephano HA, Gay GM. El síndrome de ojo azul. Una nueva enfermedad en cerdos asociados a un paramixovirus. Veterinaria México 1986d;17:120-122

- Stephano HA, Gay GM, Ramírez TCA. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs associated with paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 1988a ;122 : 6-10.
- Stephano HA, Fuentes RM, Hernández JP, Herradora LM, Carreón NR. Encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos destetados inoculados experimentalmente con paramyxovirus del Ojo Azul. *Memorias de la XXIII Reunión AMVEC.* 1988b: 90-92.
- Stephano HA, Hernández D, Pérez C, González CT, Ramírez MH. Boar infertility and testicle atrophy associated with blue eye paramyxovirus infection. *Proc. II<sup>th</sup> Int. Congr. Pig Vet. Soc. Switzerland.* 1990: 45.
- Stephano H.A. Situación actual de la enfermedad del ojo azul en cerdos. *Memorias I-simposium sobre las principales enfermedades nerviosas del cerdo.* Guadalajara, Jal. AMVEC.1991.
- Summerfield A, Rziha HJ, Saalmüller A. Functional characterization of porcine CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> extrathymic T lymphocytes. *Cell Immunol.* 1996;168: 291-296.
- Sundqvist A, Berg M., Hernández JP, Linne T, Moreno LJ. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.* 1990;71:609-613.
- Sundqvist A, Berg M., Moreno LJ, Linne T. The haemagglutinin neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to Simian virus 5 and mumps virus. *Arch. Virology.* 1992;122:331-340.
- Takeuchi F, Taniguchi T, Maeda H, Fuji C, Takeuchi N, Yamamura H. The lectine Concanavalin A stimulates a protein-tyrosine kinase p72syk in peripheral blood lymphocytes. *Bioche. Biophys. Res. Commun.* 1993; 194: 91-96.
- Thacker B, Joo HS, Leman A, Barnes D. Studies on porcine parvovirus infection in boars. *Proc. of the 7th International Pig . Veterinary Society Congress México, July 26-31.* 1980:189.
- Valero EG, Valero EG, Morales AF. Histopatología. En: Valero G, editor. *Diagnóstico Veterinario 2ª edición . Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.* 1997.
- Wang F, Pang V, Hahn E. Flow cytometric analysis of porcine peripheral blood leukocytes infected with pseudorabies virus. *J Leukoc. Biol.* 1988; 43: 256-264.
- Wang JT, Dunne HW, Griel LC, Hokanson JF, Murphy DM. 1973. Mortality, antibody development, and viral persistence in porcine fetuses incubated *in utero* with SMEDI (Enter-) Virus. *Am. J. Vet. Res.* 1973; 34: 785-795.

Wolinsky J, Neal Waxham M. Mumps virus 1990 . In *Virology, Second Edition*, edited by B.N. Fields DM, Knipe *et al.* Raven Press, LTD., New York 1990:989-1011.

Yang H, Parkhouse ME. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology*.1996;89: 76-83.

Zenteno CR, Hernández JP, Espinoza B, Reyes LJ, Zenteno E. Secondary structure prediction of hemagglutinin-neuraminidase from porcine rubulavirus. *Arch. Virol*.1998;143.

Zuckermann F, Gaskins H. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues . *Immunology*.1996a;87:493-499.

Zuckermann FA, Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology*.1996b; 87: 500-512.

## Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus

H. Ramirez-Mendoza\*, P. Hernandez-Jauregui†, J. Reyes-Leyva†, E. Zenteno‡, J. Moreno-Lopez§ and S. Kennedy¶

\* Faculty of Veterinary Medicine and † Faculty of Medicine, National University of Mexico City, University City, Mexico DF, CP 04510, ‡ Centro de Investigacion Biomedica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2 Norte 2004, 2 Piso Ala Sur, Puebla, Mexico CP 72000, § Department of Veterinary Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Biomedical Center, Box 585, S-751 23, Uppsala, Sweden and ¶ Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture for Northern Ireland, Stoney Road, Stormont BT4 3SD, Northern Ireland, UK

### Summary

"Blue eye" disease of pigs in Mexico is caused by porcine rubulavirus and characterized by infertility in sows and boars, nervous signs in young pigs, and corneal opacity in pigs of all ages. The pathogenesis of reproductive tract lesions in rubulavirus-infected boars has not previously been investigated. In a first experiment, four 9-month-old boars were inoculated with porcine rubulavirus and killed 5, 15, 30 or 45 days post-inoculation (pi). In a second experiment, four similar boars were inoculated with the same virus and two animals were killed on each of days 70 and 80 pi. Swelling of the head of the epididymis developed in all inoculated boars at approximately day 15 pi. Reduced spermatozoan motility and concentration were detected in semen samples collected from one boar from day 21 pi. At post-mortem examination, nodules were seen in the head of the epididymis of the boars killed 15, 30 or 45 days pi and the right testis of the pig killed 30 days pi was atrophic. Corresponding histopathological epididymal alterations included formation of spermatic granulomas and vacuolar degeneration of ductular epithelium. These lesions were associated with mononuclear cell infiltration and interstitial fibroplasia. Degeneration of seminiferous tubules and interstitial mononuclear cell infiltration were seen in the atrophic testis of the pig killed 30 days pi. There was fibrosis of the head of the epididymis in all boars killed 70 or 80 days pi and one of these animals also had right testicular atrophy associated with degeneration of seminiferous tubules, lymphocytic infiltration and giant cell formation. Porcine rubulavirus antigen was detected by immunofluorescence labelling in the head of the epididymis of the pigs killed 15, 30 or 45 days pi and in one animal killed on day 70 pi. These results indicate that porcine rubulavirus can cause severe epididymo-orchitis and reduced semen quality in sexually mature boars.

© 1997 W.B. Saunders Company Limited

### Introduction

A novel disease characterized by neurological signs, corneal opacity and high mortality in young pigs, and reproductive disorders in sexually mature pigs,

Correspondence to: S. Kennedy.

was first recognized in the La Piedad, Michoacan region of central Mexico in 1980. It has been termed "blue eye" disease because of the development of corneal opacity in up to 10% of affected piglets (Stephano *et al.*, 1988). Reduced fertility develops in 14–40% of infected boars (Stephano *et al.*, 1990; Stephano, 1992). The disease, which has now spread to many states of Mexico, is currently a cause of major economic loss but has not so far been reported from any other country. No programme for the control of "blue eye" disease is currently available.

A haemagglutinating virus isolated from initial outbreaks of "blue eye" disease in piglets had the morphology of a paramyxovirus (Stephano *et al.*, 1988) and this identification was confirmed by characterization of a virus isolated from affected piglets in 1984 (Moreno-Lopez *et al.*, 1986). The latter isolate was named La Piedad, Michoacan, Mexico virus (LPMV). Inoculation of piglets with a field isolate resulted in a disease clinically and pathologically similar to that seen in field outbreaks, confirming this virus as the cause of "blue eye" disease (Stephano *et al.*, 1988). Sequence analysis of genes encoding the major viral proteins indicated that LPMV is more closely related to mumps virus and simian virus 5 than to any other paramyxovirus (Sundqvist *et al.*, 1990, 1992; Berg *et al.*, 1991, 1992; Linne *et al.*, 1992). It has recently been classified in the genus *Rubulavirus* within the subfamily *Paramyxovirinae* (Rima *et al.*, 1995).

There have been recent advances in elucidation of the pathogenesis of rubulavirus infection in young pigs (Allan *et al.*, 1996), but the development of reproductive tract lesions in sexually mature pigs has not been examined. The aims of this study were to investigate the development of lesions and distribution of viral antigen in the reproductive tract of boars experimentally infected with this virus.

### Materials and Methods

#### *Virus*

Samples of brain tissue were collected aseptically from a young pig which died during an outbreak of "blue eye" disease in central Mexico in 1991 and placed in sterile flasks containing Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), supplemented with penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 µg/ml. After mechanical disruption of the brain tissue with sterile scissors, the supernate was filtered through 0.45 µm and 0.22 µm Millipore membranes and frozen in small aliquots in liquid nitrogen. Aliquots were subsequently thawed and inoculated into a pig kidney cell line (PK-15) which had been grown in monolayers in MEM, supplemented with 10% fetal calf serum containing penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 µg/ml. After inoculation, these monolayers were maintained in MEM without the addition of fetal calf serum. When evidence of a complete cytopathogenic effect was apparent (cytoplasmic vacuolation, necrosis of cells and syncytium formation), the cell cultures were freeze (–20°C)-thawed three times and the cell lysate was centrifuged at 2500 rpm. The supernatant fluid was then removed, dispensed in aliquots and stored at –70°C. The viral infectivity titre was determined by inoculating serial 10-fold dilutions (in MEM) of this supernate into PK-15 cell cultures in 24-well plates, the end points being assessed after 1 h by a standard method of haemagglutination with a 0.5% suspension of bovine erythrocytes. The viral isolate, after purification by passage at limiting dilution in PK-15 cells grown in 24-well plates, was designated PAC-3 (Producción Animal Cerdos, isolate No. 3).

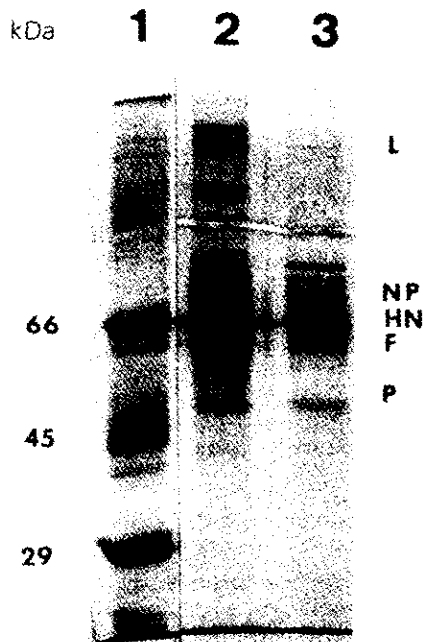


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of LPMV and PAC-3 isolates of porcine rubulavirus. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, LPMV (the prototype strain of porcine rubulavirus); lane 3, PAC-3 isolate used in this study. Five similar protein bands are apparent in both isolates: RNA polymerase or large protein (L); nucleoprotein (NP); haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein (HN); fusion glycoprotein (F); phosphoprotein (P).

The electrophoretic pattern of the PAC-3 isolate was compared with that of the previously characterized LPMV strain of porcine rubulavirus (Sundqvist *et al.*, 1990) by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as previously described (Laemmli, 1970). Electrophoresis was carried out for 2 h at 30 mA in a "Mighty Small" vertical electrophoresis unit (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, California, USA) under denaturing conditions with 12.5% polyacrylamide and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol. Five clearly defined protein bands (Fig. 1), similar to those reported for the LPMV strain, were seen.

#### Experimental Design

Ten 9-month-old sexually mature male York Landrace hybrid pigs were used. These animals were born to sows free of porcine rubulavirus infection, as assessed by serum virus neutralization and haemagglutination inhibition tests.

In a first experiment, four of the boars (nos 1-4) were placed in individual accommodation in an isolation facility, with feed and water *ad libitum*. They were inoculated with 8 ml (4 ml intranasally and 4 ml intramuscularly) of tissue culture supernate containing PAC-3 virus at a titre of  $10^{4.3}$  50% tissue culture infective doses/ml. These pigs were examined clinically each day. Semen was collected by means of an artificial vagina from three (nos 2, 3, 4) of the four pigs. The samples were taken on days 3 (three pigs), 18 (two pigs), 21 (two pigs) and 30 (one pig) post-inoculation (pi), and spermatozoan concentration and motility were assessed by standard methods. One pig was killed on each of days 5, 15, 30 and 45 pi, and tissue samples were collected for histopathological examination and immunofluorescence staining. A fifth boar (no. 5) (uninoculated) was killed on day 0 to serve as a negative control animal.

In a second experiment, four boars (nos 6–9) were each inoculated intranasally with 4 ml of the same cell culture supernate as that used in experiment 1. These animals were examined clinically each day and two pigs were killed on each of days 70 and 80 pi. A fifth boar (no. 10) (uninoculated) was killed on day 0 as a negative control animal.

#### *Histopathology*

Samples of the head, body and tail of the epididymis, testes, seminal vesicles, and bulbourethral and prostate glands from all pigs were fixed in either Bouin's solution or 10% buffered formalin (pH 7.4), dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin wax. Sections were cut at 5  $\mu\text{m}$  thickness and stained with haematoxylin and eosin (HE) for histopathological examination. Small blocks of the head of the epididymis from all pigs in experiment 1 were trimmed into 1 mm cubes before being fixed in Karnovsky's solution, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in araldite resin by standard procedures. Semi-thin (1  $\mu\text{m}$ ) sections were stained with a 50:50 v/v mixture of toluidine blue and basic fuchsin for histopathological examination.

#### *Antiserum Production*

Porcine rubulavirus antisera were produced in six New Zealand White male rabbits and used for immunofluorescence labelling of tissues from the experimental boars. First, PAC-3 virus suspension was freed of contaminating substances by ultracentrifugation in sucrose gradients (Sundqvist *et al.*, 1990). Each rabbit was then inoculated subcutaneously with 1 ml of a mixture containing purified virus 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Freund's complete adjuvant. The rabbits received a second inoculation of the same quantity of virus in Freund's incomplete adjuvant 15 days later. Blood samples were collected after a further 15 days, the immunoglobulins were purified and the IgG fraction was separated by affinity chromatography with protein A sepharose gradients. A pooled solution of IgG fractions from all six rabbits was used for immunofluorescence labelling studies of frozen tissue sections.

#### *Immunofluorescence Labelling*

At post-mortem examination, samples of the head, body and tail of the epididymis, testes, seminal vesicles, and bulbo-urethral and prostate glands from all pigs were quench-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-40^{\circ}\text{C}$  until examined. Cryosections were cut at 4 to 6  $\mu\text{m}$  thickness, placed on glass slides, fixed in acetone and stained by an indirect immunofluorescence method. In this technique, cryosections were incubated with a 1 in 1000 dilution of rabbit anti-porcine rubulavirus IgG solution for 60 min. After washing, fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, USA) was applied to the sections for 60 min and the reaction "visualized" in ultraviolet light. Coverslip preparations of cultured PK-15 cells, which had been inoculated with porcine rubulavirus 72 h previously, were used as positive controls for immunofluorescence labelling.

## Results

### *Experiment 1*

*Clinical signs.* The four inoculated pigs, which had appeared clinically normal before the start of the experiment, were anorexic, coughed frequently and showed evidence of conjunctivitis by day 3 pi. Spermatozoan motility and

concentration in semen from pig no. 3 declined to extremely low levels after day 18 pi (Table 1). All four pigs showed evidence of unilateral or bilateral swelling in the testicular and epididymal regions at approximately 15 days pi. This swelling, which was most severe over the head of the epididymis, was maximal in pigs no. 3 and 4 between days 15 and 19 pi, but subsequently diminished and had disappeared by day 25 pi. Swelling was invariably more severe in the right testicular and epididymal regions than in the left. Right testicular atrophy subsequently developed in pig no. 3. Unilateral corneal opacity, which was apparent in pig no. 4 at day 30 pi, persisted until necropsy.

*Post-mortem findings.* At necropsy, large accumulations of oedema fluid were seen in the scrotum and tunica vaginalis of pigs no. 3 and 4 (Table 2). White to yellow elevated nodules, approximately 2 to 7 cm in diameter, were seen in the head of the epididymis of the right testis of pigs no. 2, 3 and 4 (Fig. 2). These nodules corresponded to cavities that contained a brown free-flowing to highly viscous liquid. The body and tail of the epididymis appeared normal. The testes of pigs no. 2 and 4 were normal in size and weight but the right testis of pig no. 3 was only 70% of the weight of the contralateral one (Table 2). An area of haemorrhage, approximately 7.0 cm in diameter, was seen beneath the tunica albuginea of this atrophic testis, extending into the testicular parenchyma to a depth of 0.2 cm.

No macroscopical changes were seen elsewhere in pigs no. 2, 3 and 4, or in any tissue of the pig (no. 1) necropsied 5 days pi, or of the control pig (no. 5).

*Histopathological findings.* There were severe histopathological changes in the head of the epididymis of pigs no. 2, 3 and 4 (Table 2), including the formation of large spermatic granulomas characterized by spermatozoa-filled cavities bordered by dense infiltrates of macrophages, multinucleated giant cells, lymphocytes and plasmacytes. Macrophages and giant cells frequently contained numerous engulfed spermatozoa (Fig. 3). Intraluminal spermatozoa were occasionally seen in blood vessels in severely damaged regions of the head of the epididymis. There was prominent fibroplasia of interstitial tissue in the vicinity of spermatic granulomas. The cytoplasm of many epithelial cells in intact ductuli was finely vacuolated (Fig. 4). More severe epithelial damage, characterized by formation of large vacuoles, necrosis and mononuclear cell infiltration, was also frequently seen (Figs 5 and 6). Attenuation and loss or complete absence of stereocilia were apparent in degenerate ductuli. Intraluminal macrophages containing phagocytized spermatozoa were frequently seen in apparently normal and degenerate ductuli in the head of the epididymis of these three pigs. Spermatozoa were absent from the ductuli of the head of the epididymis of pigs no. 3 and 4. The lesions in the head of the epididymis were associated with striking mononuclear cell infiltration of interstitial tissue (Fig. 7). The body and tail of the epididymis of pigs no. 2, 3 and 4 showed focal interstitial infiltration of mononuclear cells but no ductular changes.

Interstitial orchitis was seen in the right testis of pig no. 3. These lesions



Table 1  
Semen characteristics of boars experimentally inoculated with porcine rubulavirus

| Days post-infection | Motility (%)<br>in pigs no. |    |    |  | Semen volume (ml)<br>in pigs no. |     |     |  | Spermatozoan concentration<br>(10 <sup>6</sup> /ml) in pigs no. |     |     |  | Total spermatozoa (10 <sup>8</sup> )<br>in ejaculate of pigs no. |      |      |  |
|---------------------|-----------------------------|----|----|--|----------------------------------|-----|-----|--|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|--|------------------------------------------------------------------|------|------|--|
|                     | 2                           | 3  | 4  |  | 2                                | 3   | 4   |  | 2                                                               | 3   | 4   |  | 2                                                                | 3    | 4    |  |
| 3                   | 80                          | 80 | 90 |  | 110                              | 83  | 90  |  | 205                                                             | 365 | 475 |  | 22.5                                                             | 30.1 | 42.7 |  |
| 18                  | ND                          | 95 | 95 |  | ND                               | 140 | 115 |  | ND                                                              | 205 | 285 |  | ND                                                               | 28.7 | 32.8 |  |
| 21                  | ND                          | 2  | 85 |  | ND                               | 160 | 67  |  | ND                                                              | 40  | 345 |  | ND                                                               | 6.4  | 23.1 |  |
| 30                  | ND                          | 0  | ND |  | ND                               | 150 | ND  |  | ND                                                              | 0   | ND  |  | ND                                                               | 0    | ND   |  |

ND = not done.

Table 2  
Main necropsy and histopathological findings in boars experimentally infected with porcine rubulavirus

| Findings                                   | Results obtained              |           |           |           |           |                               |           |           |           |            |
|--------------------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                                            | in experiment 1 from pigs no. |           |           |           |           | in experiment 2 from pigs no. |           |           |           |            |
|                                            | 1<br>(5)†                     | 2<br>(15) | 3<br>(15) | 4<br>(30) | 5*<br>(0) | 6<br>(70)                     | 7<br>(70) | 8<br>(80) | 9<br>(80) | 10*<br>(0) |
| <b>Necropsy findings</b>                   |                               |           |           |           |           |                               |           |           |           |            |
| Weight of right testis (g)                 | 490                           | 375       | 350       | 400       | 510       | 620                           | 600       | 480       | 580       | 535        |
| Weight of left testis (g)                  | 500                           | 400       | 500       | 350       | 490       | 450                           | 625       | 810       | 660       | 520        |
| Scrotal oedema                             | -                             | +         | +         | +         | -         | -                             | -         | -         | -         | -          |
| Nodules in head of epididymis              | -                             | +         | +         | +         | -         | -                             | -         | +         | -         | -          |
| Testicular atrophy                         | -                             | -         | +         | -         | -         | -                             | -         | +         | -         | -          |
| Testicular haemorrhage                     | -                             | -         | +         | -         | -         | -                             | -         | -         | -         | -          |
| <b>Histopathological findings</b>          |                               |           |           |           |           |                               |           |           |           |            |
| Head of epididymis                         | -                             | +         | +         | +         | -         | -                             | -         | -         | -         | -          |
| Spermatid granulomas                       | -                             | +         | +         | +         | -         | -                             | -         | -         | -         | -          |
| Ductular degeneration and necrosis         | -                             | +         | +         | +         | -         | -                             | -         | -         | -         | -          |
| Interstitial mononuclear cell infiltration | -                             | +         | +         | +         | -         | +                             | -         | -         | -         | -          |
| Interstitial fibroplasia                   | -                             | +         | +         | +         | -         | +                             | +         | +         | +         | -          |
| Body and tail of epididymis                | -                             | -         | -         | -         | -         | -                             | +         | +         | +         | -          |
| Interstitial mononuclear cell infiltration | -                             | +         | +         | +         | -         | -                             | -         | -         | -         | -          |
| Testis                                     |                               |           |           |           |           |                               |           |           |           |            |
| Tubular degeneration                       | -                             | -         | +         | -         | -         | -                             | -         | +         | -         | -          |
| Interstitial mononuclear cell infiltration | -                             | -         | +         | -         | -         | -                             | -         | +         | -         | -          |
| <b>Immunofluorescence</b>                  |                               |           |           |           |           |                               |           |           |           |            |
| Antigen in head of epididymis              | -                             | +         | +         | +         | -         | +                             | -         | -         | -         | -          |

\* Uninoculated control pigs.

† Days pi on which pigs were killed are given in parenthesis.

- = No lesions; + = mild lesions; ++ = severe lesions.

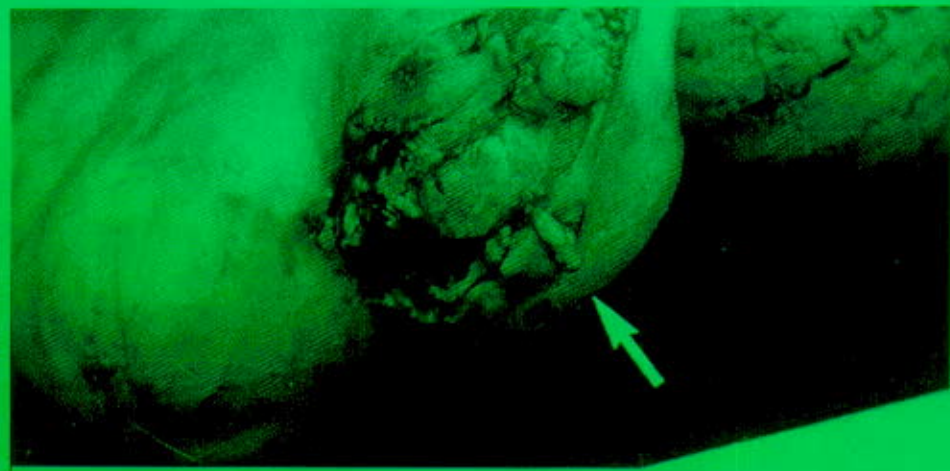


Fig. 2. Testis of boar killed 30 days pi. Note large (incised) swelling (arrow) on head of epididymis.

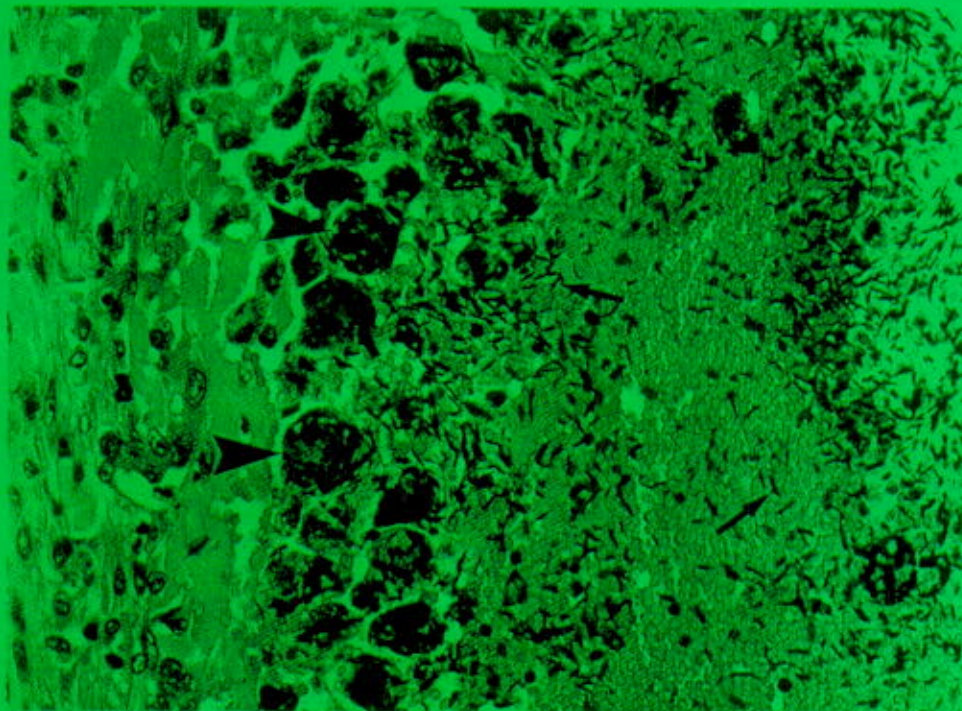


Fig. 3. Head of epididymis of boar killed 45 days pi. Macrophages (arrowheads) at edges of spermic granuloma contain densely packed engulfed spermatozoa. Free spermatozoa (arrows) and haemorrhage are also apparent within granuloma. HE.  $\times 570$ .

were most severe in the sub-albuginea region, in which haemorrhage was macroscopically apparent; they consisted of degeneration of seminiferous tubules and interstitial mononuclear cell infiltration (Fig. 8). Degenerate tubules frequently contained few or no spermatids or secondary spermatocytes, and

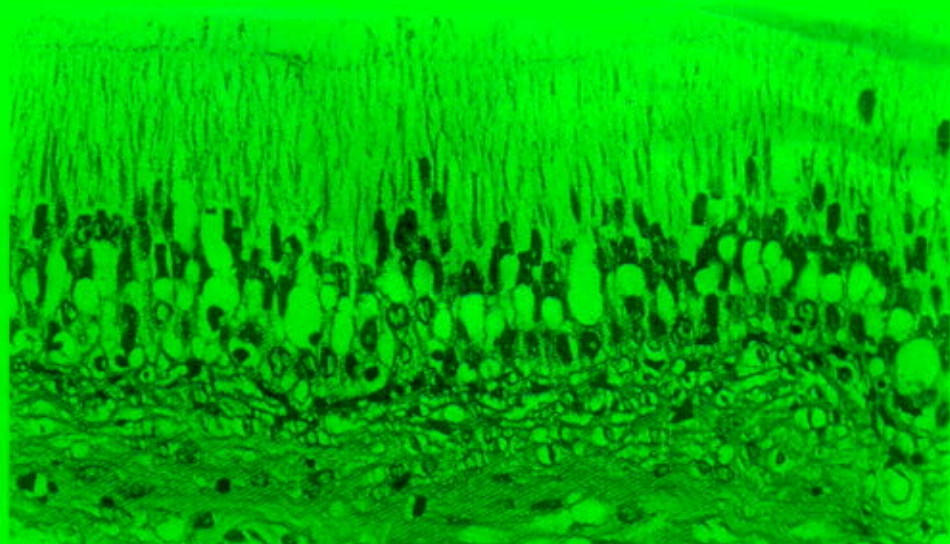


Fig. 4. Head of epididymis of boar killed 45 days pi. Basal cytoplasm of ductular epithelial cells is vacuolated. HE.  $\times 500$ .

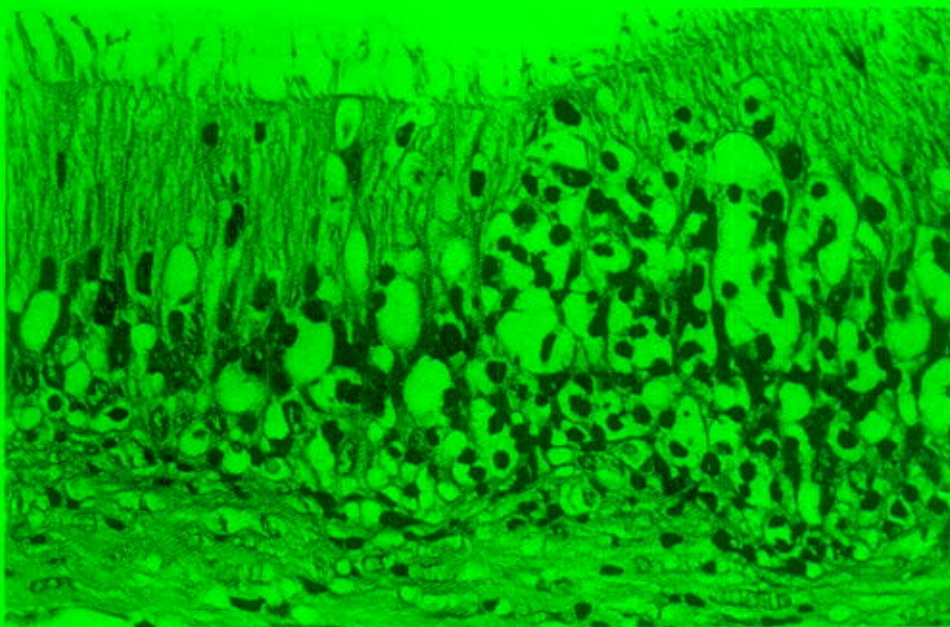


Fig. 5. Head of epididymis of boar killed 45 days pi. Ductular epithelium is vacuolated and infiltrated with mononuclear cells. HE.  $\times 530$ .

tubules containing only Sertoli cells and basal type A or B spermatocytes were frequently seen. Hypoplasia and cytoplasmic vacuolation of Leydig cells were also apparent.



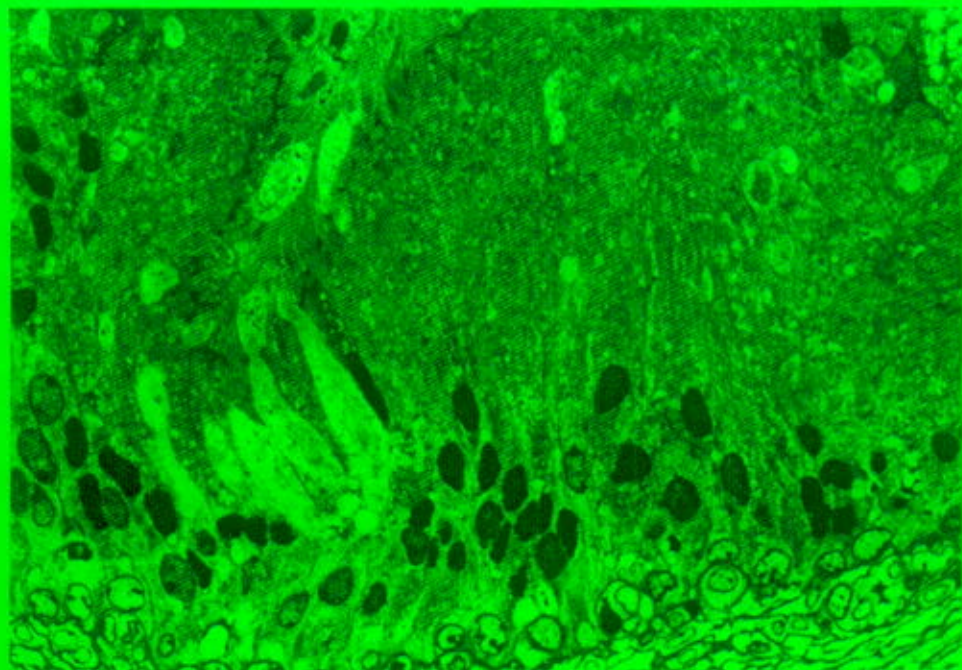


Fig. 6. Head of epididymis of boar killed 45 days pi. Necrosis of ductular epithelium is indicated by nuclear pyknosis and loss of cytoplasmic detail. Resin section (1  $\mu$ m). Toluidine blue and basic fuchsin.  $\times 740$ .

No histopathological alterations were seen in any other tissue of the inoculated pigs or of the control pig.

*Immunofluorescence labelling.* Focal cytoplasmic immunolabelling was seen in ductular epithelial cells adjacent to spermatic granulomas in the head of the epididymis of pigs no. 2, 3 and 4 (Fig. 9; Table 2). Similar labelling was detected in the ductular walls and lumina, adjacent to interstitial blood vessels, and in interstitial mononuclear cells. Intraluminal labelling was frequently associated with spermatozoa. No immunofluorescence was detected in other regions of the epididymis or in any other tissue of the inoculated pigs or the control pig.

#### *Experiment 2*

*Clinical signs.* Anorexia, coughing and conjunctivitis were apparent in all inoculated pigs (nos 6-9) from days 3 to 6 pi approximately. Swelling was apparent in the region of the testis and head of the epididymis in these animals from days 11-25 pi. There was evidence of right testicular atrophy in pig no. 8 from day 15 pi (Fig. 10) until post-mortem examination on day 80, but no other clinical signs were seen (Table 2).

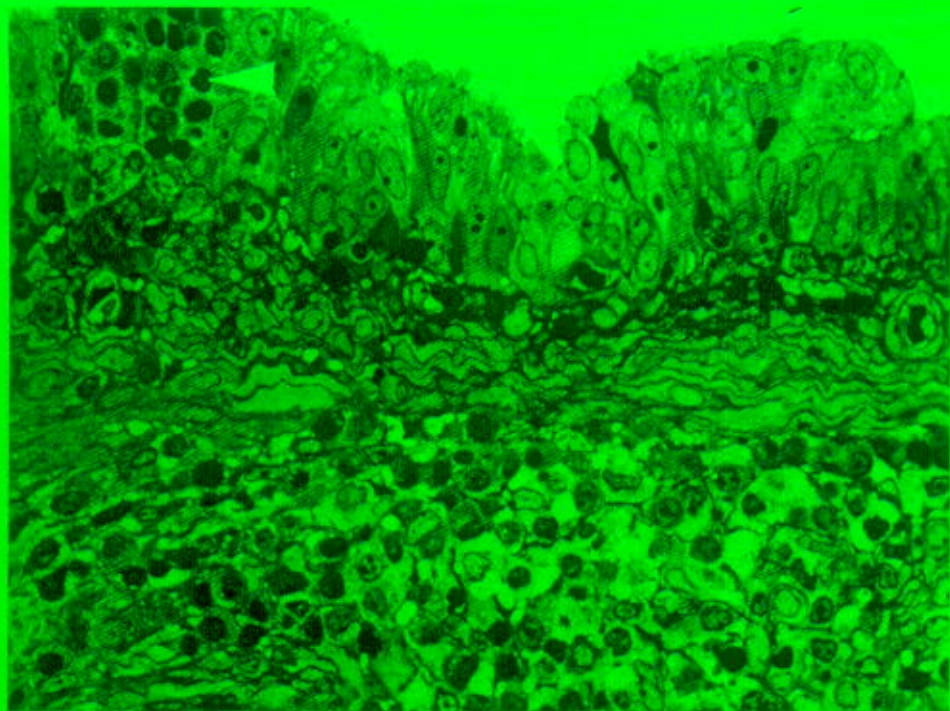


Fig. 7. Head of epididymis of boar killed 15 days pi. There is dense mononuclear cell infiltration of interstitial tissue (bottom) and of ductular epithelium (arrowhead). Resin section (1  $\mu$ m). Toluidine blue and basic fuchsin.  $\times 630$ .

*Post-mortem findings.* Bilateral fibrosis of the head of the epididymis was apparent in all four inoculated boars and the right testis of pig no. 8 was atrophic (Table 2). No other macroscopical changes were seen.

*Histopathological findings.* Focal interstitial fibroplasia was seen in the head of the epididymis of all inoculated boars, and mononuclear cell infiltration was apparent in this tissue in one pig killed 70 days pi (Table 2). There was evidence of severe interstitial orchitis in the right testis of pig no. 8, characterized by degeneration of seminiferous tubules, giant cell formation and intense interstitial lymphocytic infiltration (Fig. 11). Many giant cells appeared to be in the lumina of severely degenerate seminiferous tubules, in which germinal epithelium was no longer apparent. Spermatozoa were frequently seen in interstitial tissue, arterioles and venules. No other histopathological changes were apparent in these pigs or in the control pig (no. 10).

*Immunofluorescence labelling.* Porcine rubulavirus antigen was detected in a few mononuclear cells scattered throughout the interstitium of the head of the epididymis of one of the two inoculated pigs killed on day 70 pi (Table 2). No immunofluorescence was seen in any other tissue of the inoculated pigs or control animal.



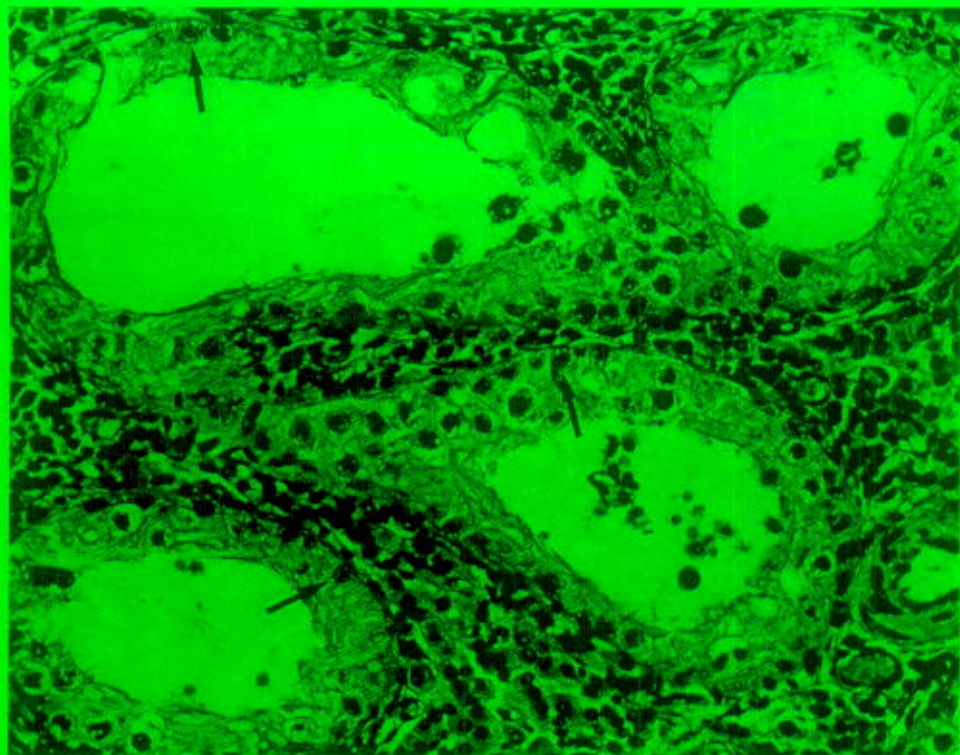


Fig. 8. Testis of boar killed 30 days pi. Degenerate germinal epithelium is vacuolated and seminiferous tubules are almost completely lined by Sertoli cells (arrows). Note complete absence of spermatogenesis and interstitial mononuclear cell infiltration. HE.  $\times 330$ .

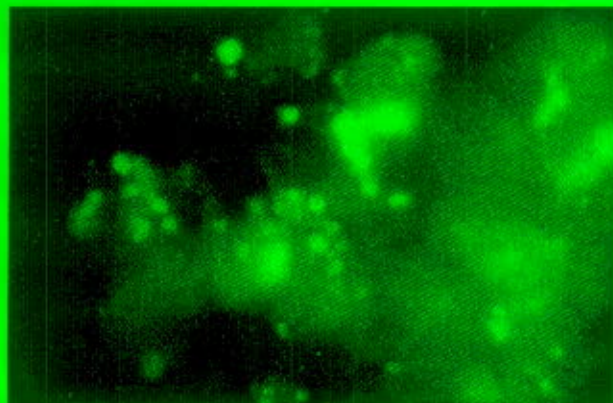


Fig. 9. Immunofluorescence labelling of rubulaviral antigen in head of epididymis of boar killed 30 days pi.

### Discussion

SDS-PAGE of the virus isolate used for the inoculation of boars revealed a protein migration pattern similar to that previously described for the prototype LPMV isolate of porcine rubulavirus (Sundqvist *et al.*, 1990) and confirmed

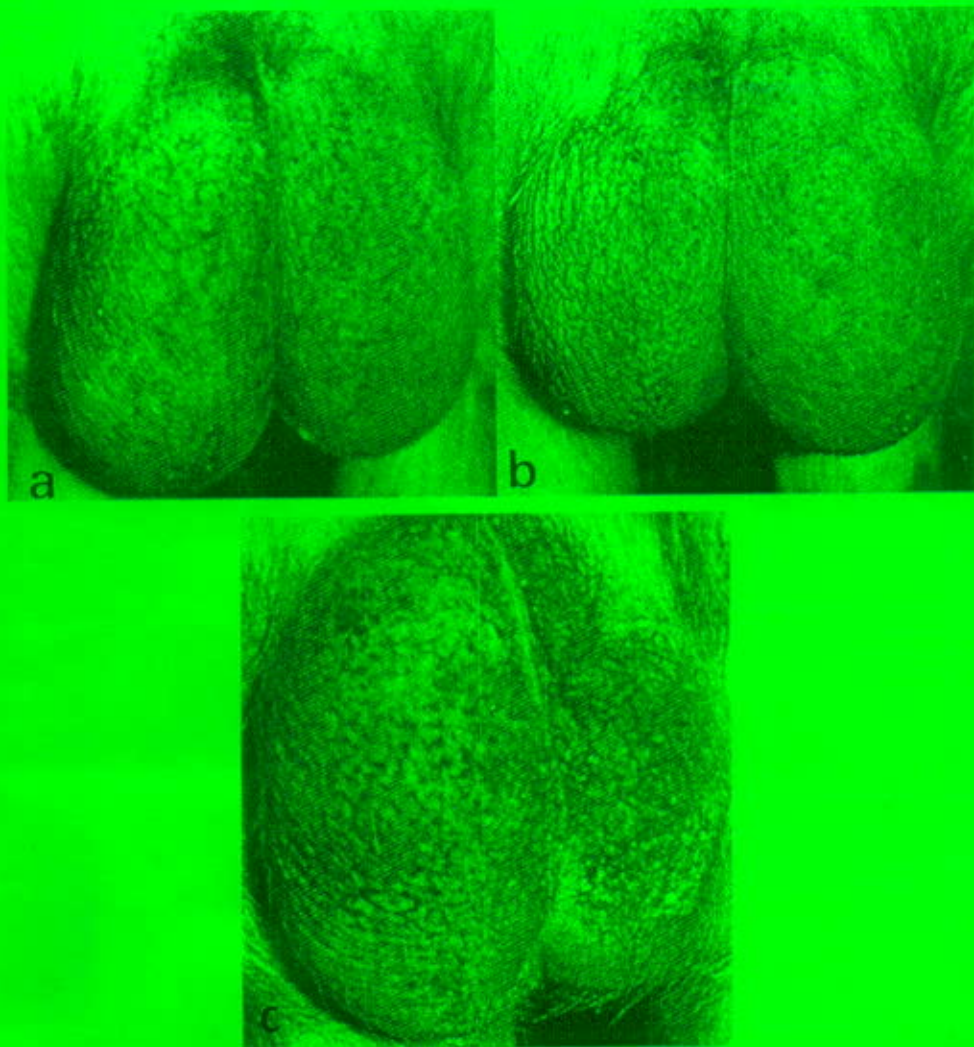


Fig. 10. Sequential photographs of testes of pig no. 8: (a) 8 days pi, (b) 15 days pi, and (c) 30 days pi. There is swelling of the right testis on day 15 pi and atrophy on day 30 pi.

that the isolate was porcine rubulavirus. Inoculation of sexually mature boars with this isolate caused severe damage to the head of the epididymis in all boars killed between days 15 and 80 pi and orchitis in two boars, one killed on day 30 and one on day 80 pi. Epididymo-orchitis in the pig killed on day 45 pi was associated with reduced spermatozoan concentration and motility from day 21 pi. Unfortunately the four boars (nos 6-9) killed on day 70 or 80 pi could not be trained for semen collection and it was therefore impossible to evaluate the effects of chronic epididymitis and orchitis in these animals on semen quality. However, the severe nature of the epididymal and testicular lesions suggested permanent effects on fertility. Epididymitis and testicular atrophy have also been reported in boars naturally infected with porcine



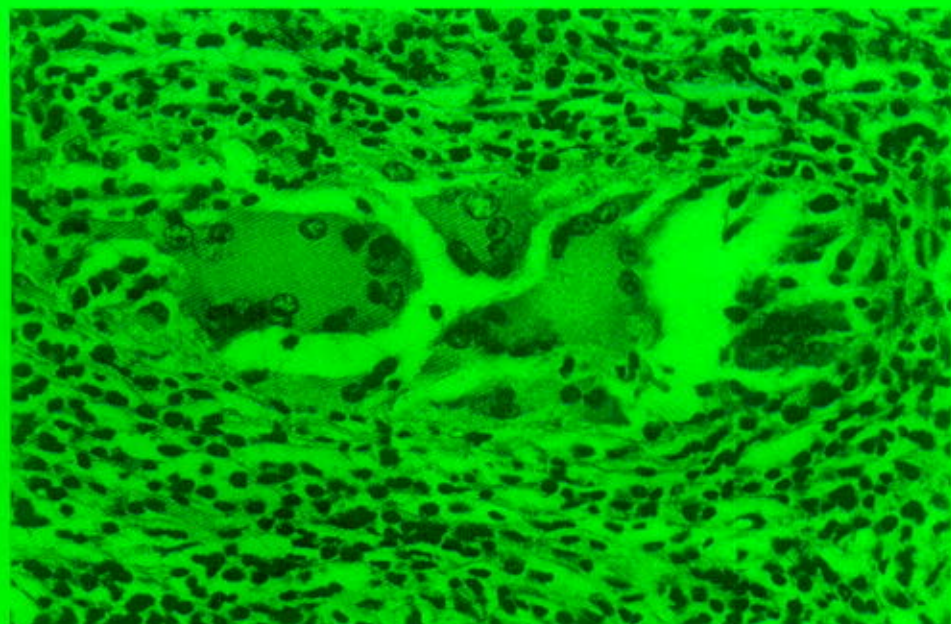


Fig. 11. Testis of boar (no. 8) killed 80 days pi. Note giant cells and severe lymphocytic infiltration of interstitial tissue. HE.  $\times 510$ .

rubulavirus (Stephano *et al.*, 1990; Stephano, 1992), but the effects on semen quality and fertility of such animals have not been assessed.

The study revealed a tropism of porcine rubulavirus for the head of the epididymis in sexually mature boars. The earliest change observed in ductuli in the head of the epididymis was fine vacuolation of epithelial cells. More severe damage included mononuclear cell infiltration and severe vacuolar degeneration and necrosis of the ductular epithelium. These lesions were associated with the presence of rubulavirus antigen in the ductular epithelium and lumina and in interstitial inflammatory cells. It appears that virus-induced damage to ductules resulted in leakage of spermatozoa into the epididymal interstitium, with consequent formation of large spermatocytic granulomas. Although rubulavirus antigen was not detected in the testes of the two boars (nos 3 and 8) that had orchitis, the severity of the lesions indicated that they were probably caused by viral infection of the testis. However, some of the testicular damage may have been secondary to blockage of epididymal ductuli.

We previously demonstrated a high affinity of the LPMV strain of porcine rubulavirus for sialyl  $\alpha$  2, 3 lactose moieties. High concentrations of these molecules are found in lung and central nervous system tissues, which are targets for porcine rubulavirus infection in young pigs (Reyes-Leyva *et al.*, 1993, 1994; Kennedy *et al.*, 1994; Allan *et al.*, 1996). The tropism of porcine rubulavirus for the head of the epididymis, and to a lesser extent testis, in adult boars may also be due to a relatively high content of sialyl  $\alpha$  2, 3 lactose moieties in these sites. Inoculated boars in this study did not develop neurological lesions and there are no reports of neurological signs or changes



in adult pigs in field outbreaks of "blue eye" disease. Elucidation of the distribution of specific glycoprotein receptors in adult pig tissues may in due course explain the apparent age-related differences in the susceptibility of various tissues to porcine rubulavirus.

The detection of rubulavirus antigen in the lumina of epididymal ductuli of inoculated boars suggests that this virus is excreted from the genital tract. It also raises the possibility of venereal transmission. Rubulavirus antigen persisted in epididymal interstitial tissue for up to 70 days pi, suggesting that boars remain infective for at least 10 weeks.

In view of the genomic relatedness of porcine rubulavirus to mumps virus, it is not surprising that both viruses have tropisms for a similar range of tissues. Mumps infection in man can cause epididymo-orchitis, parotitis, pancreatitis and meningoencephalitis (Gnann, 1992). With the exception of salivary gland, viral antigen and lesions have been reported in these tissues in rubulavirus-infected pigs (Kennedy *et al.*, 1994; Allan *et al.*, 1996). Epididymo-orchitis occurs in approximately 25 to 30% of postpubertal men with mumps infection (Gnann, 1992). In the present experiment, all inoculated boars developed epididymitis, and orchitis occurred in 25% of these animals. As in human mumps infection, orchitis was usually unilateral in the rubulavirus-infected boars. Testicular atrophy, which is a consequence of orchitis in approximately 35 to 50% of cases of mumps in postpubertal men (Gnann, 1992), developed in two (25%) rubulavirus-inoculated boars in the present investigation. Porcine rubulavirus infection in sexually mature boars may therefore be a useful model of mumps infection in the reproductive tract of postpubertal human males.

#### Acknowledgments

This study was supported by the European Union (International Scientific Cooperation Programme, Framework 3: Contract CII\*-CT93-0045), the Mexican National Council for Science and Technology (grant no. 264100-5-3228PB) and the Programme for Support of Research and Technological Innovation of the National University of Mexico City (grant no. IN 209295). Dr. Hernandez-Jauregui was supported by a scholarship from CONACT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia 0064P-M).

#### References

- Allan, G. M., McNeilly, F., Walker, I., Linne, T., Moreno Lopez, J., Hernandez, P., Kennedy, S., Carroll, B. P., Herron, B., Foster, J. C. and Adair, B. (1996). A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **8**, 405-413.
- Berg, M., Hjertner, B., Moreno-Lopez, J. and Linne, T. (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides, P, V and C: the P protein mRNA is edited. *Journal of General Virology*, **73**, 1195-1200.
- Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-Lopez, J. and Linne, T. (1991). Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *Journal of General Virology*, **72**, 1045-1050.
- Gnann, J. W. (1992). Mumps. In: *Cecil Textbook of Medicine*, 19th Edit., J. B. Wyngaarden, L. H. Smith, J. C. Bennett, Eds, W. B. Saunders, London, pp. 1829-1831.
- Kennedy, S., Carroll, B., McConnell, S., Herron, B., McNeilly, F., Allan, G., Walker,

- I., Adair, B., Hernandez-Jauregui, P. and Linne, T. (1994). Experimental LPM paramyxovirus infection in pigs; histological and immunohistochemical findings. *Proceedings of the First International Symposium On Pig Paramyxovirus*, Puebla, Mexico.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Linne, T., Berg, M., Bergvall, A. C. and Moreno-Lopez, J. (1992). The molecular biology of porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*, **33**, 263-273.
- Moreno-Lopez, J., Correa-Giron, P., Martinez, A. and Eriksson, A. (1986). Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of Virology*, **91**, 224-231.
- Reyes-Leyva, J., Hernandez-Jauregui, P., Montago, L. F. and Zenteno, E. (1993). The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl ( $\alpha$  2,3) lactose-containing structures. *Archives of Virology*, **133**, 195-200.
- Reyes-Leyva, J., Lascrain, R., Robles-Robles, A., Hernandez-Jauregui, P. and Zenteno, E. (1994). Cellular surface oligosaccharides are target molecules in the porcine LPM paramyxovirus infection. *Archives of Medical Research*, **25**, 78.
- Rima, B., Alexander, D. J., Collins, P. L., Kingsbury, D. W., Lipkind, M. A., Nagai, Y., Orvell, C., Pringle, C. R. and ter Meulen, V. (1995). Paramyxoviridae. In: *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo and M. D. Summers, Eds, *Archives of Virology*, Suppl. 10, Springer-Verlag, New York, p. 272.
- Stephano, A. H. (1992). Blue eye disease. In: *Diseases of Swine*, 7th Edit., A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire and D. J. Taylor, Eds, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 237-241.
- Stephano, H. A., Gay, M. and Ramirez, T. C. (1988). Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Veterinary Record*, **122**, 6-10.
- Stephano, H.A., Hernandez, D., Perez, C., Gonzalez, C. T., Ramirez, M. H. and Cervantes, A. (1990). Boar infertility and testicle atrophy associated with blue eye paramyxovirus infection. *Proceedings of the 11th International Congress of the Pig Veterinary Society*, Barcelona, p. 456.
- Sundqvist, A., Berg, M., Hernandez-Jauregui, P., Linne, T. and Moreno-Lopez, J. (1990). The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *Journal of General Virology*, **71**, 609-613.
- Sundqvist, A., Berg, M., Moreno-Lopez, J. and Linne, T. (1992). The haemagglutinin neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Archives of Virology*, **122**, 331-340.

[ Received, May 19th, 1997 ]

[ Accepted, August 26th, 1997 ]