



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

**PERSISTENCIA DEL *RUBULAVIRUS* PORCINO EN
SEMEN DE VERRACOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

P R E S E N T A

JOSÉ FRANCISCO RIVERA-BENITEZ

TUTOR: HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA

COMITÉ TUTORAL: JESÚS HERNÁNDEZ LÓPEZ

JULIO REYES-LEYVA

MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

El principio del camino fue más difícil de lo que parecía, existía una necesidad incesante de confianza y apoyo para poder desarrollar todo lo que tú misma me enseñaste e hiciste ver que podía lograr, sin ningún interés, me llevaste en ese camino y aun cuando me has soltado de la mano, continúas llevándome y enseñándome, demostrándome que todo lo que veíamos en el horizonte es posible. Ahora puedes ver todo lo que sembraste en mí y comienza a rendir frutos... a tú memoria Carmen.

El presente me ha puesto de vuelta en el camino, ahora es más difícil que en un principio, me he encontrado contigo en el momento justo y me doy cuenta que los retos jamás cesan, ahora tú me tomas de la mano y me llevas hacia adelante, ahora tú me llevas al extremo y me demuestras que aún existe demasiado por hacer, ahora he regresado, tengo la confianza suficiente para poder sentirlo, ahora me toca a mí, ahora puedo ofrecer algo de mí y he decidido dártelo a ti... por ti Lilian.

AGRADECIMIENTOS

A mi más grande Maestro en el ámbito científico, a mi mejor compañero de laboratorio, ¡Gracias Humberto!, por tu confianza y amistad y por la inmensa cantidad de conocimientos que desinteresadamente me compartiste.

A mi más grande Maestra en el ámbito científico, a mí Madre académica, ¡Gracias Adelfa!, por confiar en mí y por todo el apoyo y amistad que me has brindado desde siempre.

A Jesús Hernández por todo el apoyo y conocimientos que me proporcionaste, por darme la oportunidad de desarrollarme y por todas tus aportaciones para la elaboración de la tesis.

A Julio Reyes-Leyva por todo el apoyo que me brindaste para la realización de este trabajo, por todos los comentarios y observaciones que influyeron positivamente en la elaboración del mismo.

A todo el equipo que hizo posible el desarrollo de esta investigación, Rebeca, Malú, Yas, Silvia, Alonso, Miriam, Karen.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Virología: Miguel, Manuel, Alberto, Rosalba, Rodrigo, Dr. Iturbe, Karina.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo de Hermosillo, Sonora: Mony, Mary, Lupita, Era, Chava, Alex.

A todo el personal y compañeros del Departamento de Producción Animal: Cerdos y del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ que de alguna forma apoyaron la elaboración de la presente investigación.

A los miembros del jurado, Dr. Roberto Martínez, Dra. Susana Mendoza, Dr. Iván Sánchez y Dra. Elizabeth Loza, por sus valiosos comentarios y por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis.

A Diego, Mary, Lupe y Beto, mis hermanos, a los que siempre les agradeceré el confiar en mí y apoyarme en todo momento.

A mis abuelos Ángela y Francisco†, los cuales me han apoyado y confiado en mí desde siempre.

Por último, a Gerardo y Teresa, mis padres, quienes siempre me apoyan y confían en mí, por todo su amor ¡sigo y voy por más!

El presente trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: PAPIIT-IN211308 “Evaluación del Rubulavirus porcino en semen de verracos”. CONACYT AC-90024 “Estandarización de técnicas de diagnóstico para la enfermedad del ojo azul en cerdos”. PAPIME-PE/202709. “Apoyo a la docencia en las prácticas de laboratorio de la materia virología y enfermedades virales de los animales domésticos de la FMVZ-UNAM”.

El alumno fue becario de Sistema Nacional de Becas de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 207402.

RESUMEN

JOSÉ FRANCISCO RIVERA-BENITEZ. **PERSISTENCIA DEL *RUBULAVIRUS* PORCINO EN SEMEN DE VERRACOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.**

El *Rubulavirus* porcino (RVP) es el agente etiológico de la enfermedad del ojo azul (EOA) en porcinos. Los signos clínicos son dependientes de la edad. En los machos adultos, se presenta orquitis, epididimitis y disminución de la calidad seminal. El objetivo del presente estudio fue detectar la persistencia del RVP en semen de verracos infectados experimentalmente. Se infectaron 12 machos porcinos con 5 ml del RVP cepa PAC-3 a 10^5 DICC₅₀/ml, manteniéndolos por 142 días posinfección (dpi). Se evaluó la respuesta humoral posterior a la infección. Para la detección del RVP se realizó aislamiento en cultivo celular y RT-PCR. La infección con el RVP provocó signos clínicos a partir del quinto dpi, mostrando aumento del tamaño testicular y alteraciones a nivel de epidídimo. La concentración espermática disminuyó significativamente. A la necropsia, tres verracos presentaron lesiones a nivel de testículo y epidídimo. Los anticuerpos contra el RVP fueron detectados a la segunda semana posinfección, manteniendo títulos altos hasta la finalización del experimento. El aislamiento del RVP en muestras de semen fue positivo desde el quinto día y hasta los 48 dpi. En los órganos genitales se logró aislar el RVP hasta los 142 dpi. El ARN del RVP en suero se detectó desde el día dos hasta los 64 dpi. En semen pudo ser detectado hasta los 142 dpi. Por lo tanto, se confirma que el ARN del RVP persiste en semen y el virus se encuentra presente en órganos genitales por periodos prolongados de la infección. Los animales infectados persistentemente, son un factor de alto riesgo para la diseminación la EOA en la población porcina, ya sea por contacto directo o a través del uso de semen contaminado en la práctica de inseminación artificial.

Palabras clave: *Rubulavirus* porcino, infección persistente, semen, verracos.

ABSTRACT

JOSÉ FRANCISCO RIVERA-BENITEZ. PERSISTENCE OF PORCINE RUBULAVIRUS IN SEMEN OF EXPERIMENTALLY INFECTED BOARS. Porcine Rubulavirus (PoRV) is the etiological agent of blue eye disease (BED) in pigs. The clinical signs are age-dependent. Orchitis, epididymitis and decrease of seminal quality are presented in boars. The objective of the present investigation was to detect PoRV persistent in semen of experimentally infected boars. Twelve boars were infected with 5 ml of 10^5 DICC₅₀/ml PoRV-PAC-3 strain and kept for 142 day post inoculation (dpi). Humoral response was evaluated post infection. For PoRV detection RT-PCR and isolation in cell culture were performed. PoRV infection caused clinical signs in 5 dpi, showed testicular swelling and pathological changes in epididimys were observed. The spermatic concentration decreased significantly. At necropsy, three boars showed testicular and epididymal lesions. Antibodies against PoRV were detected in the second week post inoculation, showing a high titer until the end of the experiment. PoRV isolation in semen samples was positive from the fifth day to 48 dpi. In the reproductive tract organs PoRV was isolated until 142 dpi. PoRV RNA in serum was detected from second day to 64 dpi and it could be detected in semen up to 142 dpi. Thus, this results confirm that PoRV RNA persists in semen and the virus is present in genital organs during prolonged periods of infection. Persistently infected animals are a high risk factor for the spread of BED in the swine population, either by direct contact or through use of contaminated semen in artificial insemination practice.

Key words: Porcine Rubulavirus, persistent infection, semen, boars.

CONTENIDO

	Páginas
DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes históricos de la enfermedad del ojo azul	2
1.2. Impacto productivo y económico de la EOA en la producción porcina	5
1.3. Agente etiológico	6
1.4. Patogenia y virulencia	16
1.5. Respuesta inmune	21
1.6. Epidemiología	22
1.7. Signos clínicos	23
1.8. Lesiones	27
1.9. Diagnóstico	27
1.10. Prevención y control	28
1.11. ANTECEDENTES	30
2. JUSTIFICACIÓN	36
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVO GENERAL	38
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5. MATERIAL Y MÉTODOS	39
6. RESULTADOS	49
7. DISCUSIÓN	72
8. CONCLUSIONES	84
9. ABREVIATURAS	86
10. REFERENCIAS	89

LISTA DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 2.3.1. Clasificación taxonómica de la familia <i>Paramyxoviridae</i>	8
Cuadro 2.3.2. Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos del RVP con otras especies del género <i>Rubulavirus</i>	9
Cuadro 2.7.1. Parámetros reproductivos afectados durante un brote de la EOA	26
Cuadro 2.8.1. Lesiones asociadas a la infección por el RVP	29
Cuadro 4.9.1. Características de los iniciadores a empleados en la RT-PCR	48
Cuadro 5.2.1. Periodos en los que se observaron alteraciones clínicas a nivel testicular y epididimario	50
Cuadro 5.2.2. Análisis comparativo de las dimensiones testiculares promedio medidas a lo largo de la fase experimental.	53
Cuadro 5.3.1. Análisis comparativo de los promedios de volumen, motilidad y concentración espermática grupal durante la fase experimental	56
Cuadro 5.3.2. Análisis comparativo de los promedios del porcentaje de espermatozoides vivos, anomalías y grado de aglutinación espermática grupal durante la fase experimental	57
Cuadro 5.4.1. Lesiones macroscópicas observadas en los grupos sacrificados a diferentes intervalos posinfección	59
Cuadro 5.6.1. Detección del RVP en muestras de suero y semen de los animales infectados experimentalmente	63
Cuadro 5.6.2. Aislamiento del RVP a partir de testículos y epidídimos de los verracos infectados experimentalmente	66

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 2.3.1. RVP observado en tinción negativa al microscopio electrónico	10
Figura 2.3.2. Organización del genoma del RVP	13
Figura 2.3.3. Conformación proteica del RVP	14
Figura 5.2.1. Cambios en las dimensiones testiculares presentadas previo a la infección y por 19 semanas posteriores	52
Figura 5.3.1. Promedio de la concentración espermática individual previo y posterior a la infección con el RVP	55
Figura 5.5.1. Seroconversión demostrada por IHA y VSN para el RVP	60
Figura 5.6.1. Aislamiento del RVP en células MDCK	62
Figura 5.6.2. Inmunofluorescencia indirecta para detectar el RVP en cultivos de células MDCK a partir de muestras de tejidos	67
Figura 5.7.1. Distribución de muestras de suero analizadas por RT-PCR para el RVP	69
Figura 5.7.2. Distribución de muestras de semen analizadas por RT-PCR para el RVP	70
Figura 5.7.3. Electroforesis de productos de RT-PCR del RVP en gel de agarosa al 2%	71

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del ojo azul (EOA) en porcinos, es un padecimiento de origen viral que afecta a cerdos de todas las edades (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006). El agente etiológico pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, género *Rubulavirus*, especie *Rubulavirus* porcino (RVP) (Rima *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2000). Fue descubierto por primera vez en granjas de La Piedad, Michoacán a principios de 1980 (Stephano *et al.*, 1981). Actualmente, la EOA se encuentra distribuida en la región Centro y Bajío de México, en donde ocasionalmente es reportada (Morilla *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 2006; Kirkland & Stephano, 2006).

Las manifestaciones clínicas de la EOA son dependientes de la edad y de la distribución de receptores específicos en los órganos blanco (Reyes-Leyva *et al.*, 1997; Vallejo *et al.*, 2000). En lechones lactantes es capaz de producir daños a nivel de sistema nervioso, llegando a ocasionar la muerte hasta en el 100% de los animales infectados. En cerdos destetados se han descrito cuadros preferentemente respiratorios, sin dejar de lado las manifestaciones nerviosas. En las hembras adultas afecta la capacidad reproductiva, aumentando el número de repeticiones, disminuyendo la fertilidad y provocando abortos espontáneos. En los verracos, el daño se presenta a nivel de tracto reproductor, ocasionando epididimitis y orquitis, disminuyendo la calidad seminal, llegando a provocar infertilidad. La opacidad de la córnea se presenta en el 1-10% de los animales afectados (Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano *et al.*, 1988; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004; Kirkland & Stephano, 2006).

El cuadro clínico en los verracos puede cursar de forma temporal, en condiciones de campo se ha observado que las alteraciones más evidentes son el aumento en el tamaño testicular, disminución en la calidad seminal y lesiones a nivel epididimario (Campos & Carvajal, 1989; Kirkland & Stephano, 2006). En la infección experimental, se ha descrito que el RVP puede infectar los órganos del tracto reproductor de machos adultos, de la

misma forma se ha identificado la excreción del virus a través del semen (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Solís *et al.*, 2007).

En verracos, la enfermedad puede cursar sin signos clínicos aparentes y las alteraciones en la calidad seminal no son del todo concluyentes. El monitoreo serológico es una herramienta para detectar animales que han entrado en contacto con el agente, sin embargo, el tiempo en que se desarrolla una respuesta inmune observable, es mucho mayor al requerido para detectar la excreción del virus en el semen. La viremia por el RVP ha sido demostrada en cerdos infectados experimentalmente (Reyes-Leyva *et al.*, 2004), el tiempo en que se ha observado la presencia del antígeno en células sanguíneas es corto, debido a la breve duración de los experimentos. La excreción del RVP vía seminal ha sido demostrada hasta los 49 días pi (Solís *et al.*, 2007), sin embargo, las técnicas utilizadas son poco sensibles debido a las características de las muestras.

La viremia y excreción del RVP ha sido detectada en el periodo de infección clínica en verracos, llegando a observar animales positivos hasta los 20 y 49 días pi, respectivamente, sin embargo, no se ha demostrado que el virus pueda estar presente por periodos prolongados en la infección.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue detectar la persistencia del RVP en semen de verracos infectados experimentalmente.

1.1. Antecedentes históricos de la enfermedad del ojo azul

En el año de 1980, en una granja de 2,500 hembras reproductoras, localizada en La Piedad, Michoacán, comenzaron a describirse los primeros casos de meningoencefalitis, acompañada de opacidad de la córnea en lechones. Las manifestaciones clínicas y patológicas que se presentaron eran diferentes a las que se habían descrito en otras infecciones que afectan el sistema nervioso de cerdos en México. Los signos clínicos iniciales se manifestaron principalmente, como incoordinación, temblores musculares, postración, movimientos de carrera y opacidad de la córnea. Los lechones morían a la primera semana de presentar el cuadro clínico (Stephano *et al.*, 1981; Stephano *et al.*, 1988).

Los estudios histopatológicos demostraron la presencia de meningoencefalitis no supurativa y neumonía intersticial. Además, se logró recuperar un virus con capacidad hemaglutinante y que producía efecto citopático con formación de sincitios en cultivos celulares de riñón de cerdo (PK-15; *Porcine kidney*), la enfermedad fue conocida entonces como “Síndrome del Ojo Azul” (SOA) (Stephano *et al.*, 1981; Stephano *et al.*, 1982). En esa misma época, comenzaron a reportarse brotes del SOA en diferentes Estados, principalmente Jalisco y Guanajuato (Stephano *et al.*, 1988).

Un par de años después de haber hecho la primera descripción del síndrome, se identificó al agente etiológico como un paramixovirus hemaglutinante (Stephano *et al.*, 1982). A partir de los aislamientos, se iniciaron las primeras infecciones experimentales con la finalidad de cumplir con los postulados de Koch, los resultados que se obtuvieron fueron similares a los observados en condiciones de campo (Stephano & Gay, 1983).

Al estudiar los primeros brotes de la enfermedad en condiciones naturales, se descubrió que los anticuerpos contra el virus del SOA (vSOA) persistían hasta por 15 meses después de las primeras manifestaciones clínicas y que la enfermedad era autolimitante (Stephano *et al.*, 1985).

Stephano & Gay (1985), evidenciaron por primera vez la presencia del vSOA en cerdos de más de 30 días de edad, encontrando una alta mortalidad y presencia de meningoencefalitis no supurativa y opacidad de la córnea en cerdos de 15 a 45 kg, además se logró identificar la asociación con otras enfermedades que afectan a los cerdos.

Moreno-López *et al.* (1986), realizaron la primera caracterización del virus asociado al SOA, el cual presentó propiedades biológicas y morfológicas parecidas a los virus que se agrupan en la familia *Paramyxoviridae*, se le nombró virus de La Piedad Michoacán (vLPM). A partir de entonces, se comienza con una serie de investigaciones enfocadas a describir la estructura y biología molecular del vLPM, la mayoría de los trabajos se realizan con el apoyo de centros de investigación de Suecia.

En 1990, Sundqvist *et al.*, identificaron las proteínas estructurales del vLPM, al compararlas con otros paramixovirus (Sendai, de la enfermedad de Newcastle y virus de la parainfluenza humana-3) y evidenciar las diferencias en las seis proteínas, afirman que el virus de LPM es genuinamente porcino y proponen que sea clasificado como un nuevo miembro del género *Paramyxovirus*. Los trabajos respecto a la biología molecular del vLPM continuaron desarrollándose, se obtuvieron las secuencias de los genes que codifican a las proteínas de matriz (M), fosfoproteína (P), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y de fusión (F), y se asume que, las diferencias en las secuencias descritas anteriormente indican que el vLPM es un paramixovirus que no se había descrito y que tiene una relación muy estrecha con el virus de la parotiditis humana y el virus símico-5 (Berg *et al.*, 1991; Sundqvist *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 1992; Lineé *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 1997).

En 1995, el vLPM es reconocido como una nueva especie, debido a su similitud con el virus de la parotiditis humana, virus de la parainfluenza humana-2 y -4 y el virus símico-5 y -41, quedó clasificado en el nuevo género de los *Rubulavirus*. Así, la clasificación taxonómica del *Rubulavirus* porcino (RVP) es la siguiente, orden: *Mononegavirales*, familia: *Paramyxoviridae*, subfamilia: *Paramyxovirinae*, género: *Rubulavirus* (Rima *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2000).

El análisis de bancos de sueros ha permitido evidenciar la presencia de anticuerpos contra el RVP en cerdos al menos desde 1972, lo cual demostró que el virus circulaba mucho antes de que se reportaran los primeros cuadros clínicos del SOA (Rosales *et al.*, 1988).

La enfermedad del ojo azul (EOA) ha sido diagnosticada en varios Estados de la República Mexicana, principalmente en las regiones del Centro y del Bajío (Morilla *et al.*, 2002; Kirkland & Stephano, 2006). En 1990 se tenía evidencia serológica de su presencia en 10 Estados (Fuentes *et al.*, 1990). En 1992 aumentó a 16 Estados positivos (Fuentes *et al.*, 1992), desde entonces, la enfermedad se ha establecido y ocasionalmente se presentan brotes esporádicos en los Estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Distrito Federal y Querétaro, los cuales son reportados en trabajos de investigación presentados en congresos nacionales (Morilla *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 2006; Kirkland & Stephano, 2006; Wang *et al.*, 2007).

La EOA es reconocida por los signos clínicos que incluyen alteraciones del sistema nervioso, opacidad de la córnea (en cerdos lactantes y mayores a 30 días), falla reproductiva en hembras (incremento en el número de repeticiones y abortos espontáneos), orquitis, epididimitis y baja en la calidad seminal en verracos (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004; Kirkland & Stephano, 2006). Sin embargo, recientemente Sánchez-Betancourt *et al.* (2008), reportaron un cambio en la virulencia del RVP de cuatro aislamientos, encontrando cuadros clínicos con manifestaciones nerviosas en cerdos en la línea de engorda y en animales adultos.

1.2. Impacto productivo y económico de la EOA en la producción porcina

Pérez (1995), analizó el impacto económico generado tras la infección con el RVP en un complejo constituido por cinco granjas de producción porcina, con un total de 3,620 reproductoras en el Estado de Jalisco, tras analizar los registros de producción, encontró que la enfermedad afectaba los parámetros productivos de manera importante por etapa.

En las hembras, disminuyó la fertilidad a servicio (hasta 80%), aumentándose el número de retornos al estro hasta por cuatro periodos tras la infección, el efecto persistió por seis a ocho meses. La fertilidad a parto se afectó con la aparición de abortos y repeticiones fuera de ciclo, disminuyendo la fertilidad hasta un 69%. El efecto sobre el porcentaje de lechones nacidos fue notable, aumentando el número de lechones nacidos muertos (LNM) hasta 11.7% y de lechones momificados (13.5%), asociado a una disminución en el número de lechones nacidos totales (9.00 LNT en promedio). La mortalidad de lechones en lactancia llegó hasta el 28% y está se mantuvo hasta nueve semanas. La pérdida económica estimada únicamente por concepto de cerdos vendidos fue del 8% del margen de utilidad sobre el costo de producción anual. Aunado a esto, se suma el costo por el desecho de sementales infectados con problemas de orquitis y baja calidad seminal. Los costos de medicación para prever infecciones secundarias aumentaron en un 20% (Pérez, 1995).

La tecnificación de la industria porcina, asociada a la implementación de medidas de bioseguridad más estrictas y de manejo sanitario, principalmente enfocadas a controlar enfermedades como fiebre porcina clásica (FPC), enfermedad de Aujeszky (EA), síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) y las enfermedades asociadas a la circovirus porcina, han participado de manera indirecta a disminuir el impacto de la EOA, sin embargo, en condiciones prácticas no han contemplado planes específicos para monitorear, controlar y erradicar la enfermedad.

1.3. Agente etiológico

Clasificación taxonómica. En 1995, el virus de la EOA (vEOA) fue clasificado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, se incluyó en el nuevo género *Rubulavirus* y se le nombró *Rubulavirus* porcino (Rima *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2000). En este género también se encuentra clasificado el virus de la parotiditis humana (MuV), el de la parainfluenza humana (hPIV)-2 y -4, el virus del simio (SV)-41 y -

5, *Mapuera* (MPRV), *Menangle* (MenPV) y *Tioman* (TioPV) (Rima *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2000; Calisher *et al.*, 2006; ICTV, 2007).

Los miembros de la familia *Paramyxoviridae*, son virus envueltos que poseen una cadena sencilla de ARN no segmentada en sentido negativo, se dividen en dos subfamilias, *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae* (Rima *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2000). La clasificación taxonómica actualizada de la familia *Paramyxoviridae* se muestra en el cuadro 2.3.1.

Las especies del género *Rubulavirus* comparten propiedades biológicas y moleculares únicas, todos poseen actividad hemaglutinante y neuraminidasa, el grado de similitud en sus secuencias genéticas es muy alto. En particular, el RVP está relacionado estrechamente con el MPRV, MuV, SV-5 y el hPIV-2 y -4 (cuadro 2.3.2) (Moreno-López *et al.*, 1986; Berg *et al.*, 1991, 1992; Linné *et al.*, 1992; Sundqvist *et al.*, 1992; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007).

Tamaño y morfología. Las características morfológicas del RVP observado al microscopio electrónico son, estructura pleomórfica, generalmente esférica, no filamentosa, de 150 a 300 nm de diámetro, presenta una envoltura lipoproteica cubierta con proyecciones de 8-12 nm, las cuales corresponden a las proteínas HN y F. La nucleocápside se observa como una hélice simple de 20 nm de diámetro y 1000-1630 nm de longitud (Figura 2.3.1) (Moreno-López *et al.*, 1986; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2001; Kirkland & Stephano, 2006).

Cuadro 2.3.1. Clasificación taxonómica de la familia *Paramyxoviridae*.

Subfamilia	Género	Especie	Hospederos
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Avulavirus</i>	<i>Paramyxovirus aviar</i> -2 a -9	Aves
		<i>Virus de la enfermedad de Newcastle</i> (<i>Paramyxovirus aviar</i> -1)	Aves
	<i>Henipavirus</i>	<i>Virus Hendra</i>	Humanos
		<i>Virus Nipah</i>	Humanos, murciélagos, equinos, cerdos
	<i>Morbillivirus</i>	<i>Virus del moquillo canino</i>	Caninos
		<i>Morbillivirus de los cetáceos</i>	Cetáceos
		<i>Virus del sarampión</i>	Humanos
		<i>Virus de la peste de los pequeños rumiantes</i>	Rumiantes
		<i>Virus del moquillo de las focas</i>	Focas
	<i>Respirovirus</i>	<i>Virus de la peste de los bovinos</i>	Rumiantes
		<i>Virus de la parainfluenza bovina</i> -3	Rumiantes
		<i>Virus de la parainfluenza humana</i> -1, -3	Humanos
		<i>Virus Sendai</i>	Humanos, roedores
	<i>Rubulavirus</i>	<i>Virus símico</i> -10	Simios
		<i>Virus de la parainfluenza humana</i> -2, -4	Humanos
		<i>Virus Mapuera</i>	Murciélagos
		<i>Virus de la parotiditis humana</i>	Humanos
		<i>Rubulavirus porcino</i>	Cerdos
		<i>Virus símico</i> -5, -41	Simios
<i>Virus Tioman</i>		Murciélagos, cerdos	
	<i>Virus Menangle</i>	Murciélagos, cerdos	
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Metapneumovirus</i>	<i>Metapneumovirus aviar</i>	Aves
		<i>Metapneumovirus humano</i>	Humanos
	<i>Pneumovirus</i>	<i>Virus respiratorio sincitial bovino</i>	Rumiantes
		<i>Virus respiratorio sincitial humano</i>	Humanos
		<i>Virus de la neumonía de los murinos</i>	Murinos

Adaptado de Rima *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2000; Calisher *et al.*, 2006; ICTV, 2007.

Cuadro 2.3.2. Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos del RVP con otras especies del género *Rubulavirus*.

Proteína	MPRV	MuV	SV-5
N	56-67*	ND	ND
P/V	38/36	43/60	35/56
M	56	46	36
F	ND	42	45
HN	ND	41	43
L	60	56.3	53.7

*Aumenta a este porcentaje si el C-terminal no es utilizado en la comparación. ND: No determinado.

Adaptado de Berg *et al.*, 1991; Lineé *et al.*, 1992; Sundqvist *et al.*, 1992; Svenda *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007.

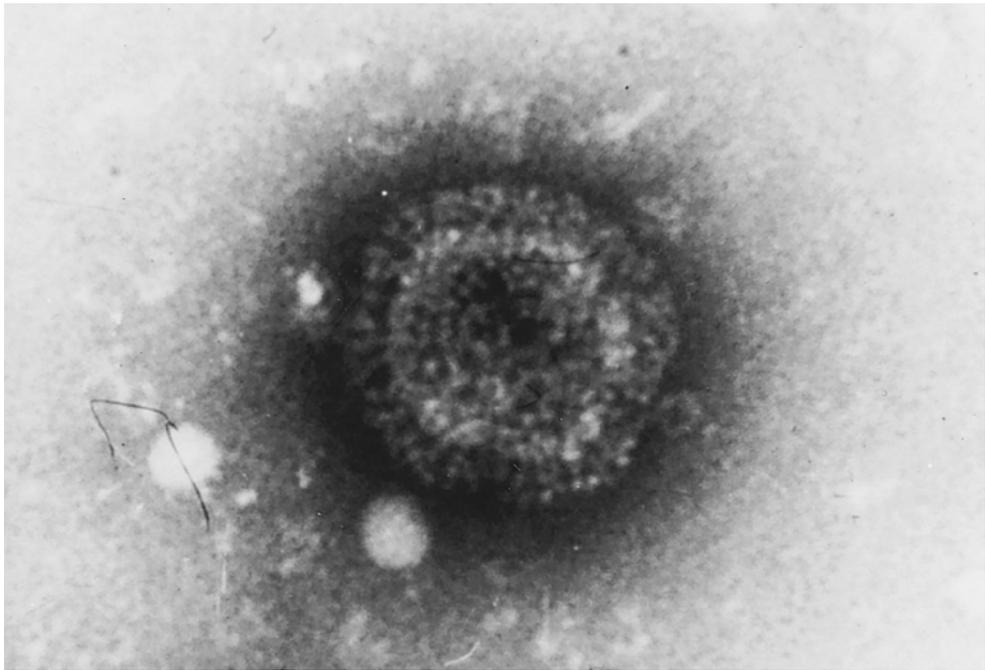


Figura 2.3.1. RVP observado en tinción negativa al microscopio electrónico ($\times 108,200$)
(Modificado de: Kirkland & Stephano, 2006).

Organización genómica. El genoma del RVP esta constituido por una cadena sencilla de ARN de 15,180 nt, de polaridad negativa sin segmentar, no poliadenilada. La estructura genómica comprende seis genes en el siguiente orden, 3'-N-P/V-M-F-HN-L-5' (Figura 2.3.2), el 92.6% del genoma es codificante. El orden de los genes es similar para los descritos en otros paramixovirus. Los seis genes involucrados codifican 10 proteínas, las cuales tienen funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas. Los genes N (1785 nt), M (1340 nt), HN (1862 nt) y L (6786 nt) codifican una sola proteína, el gen F (1838 nt) codifica un polipéptido llamado F₀ que es dividido por una proteasa celular en las proteínas F₁ y F₂, el gen P (V: 1372 nt; I: 1373 nt; P:1374 nt; C: 1372 nt) codifica varias proteínas dependiendo del sitio de edición del ARNm (Berg et al., 1991; Lineé *et al.*, 1992; Sundqvist *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 1997; Svenda *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007).

Organización proteica. El virión está compuesto por seis proteínas estructurales y tres no estructurales. Dentro de las proteínas estructurales, la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular (L) se encuentran asociadas a la nucleocápside. La proteína matriz (M) y las dos glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) se localizan en la envoltura viral. Las proteínas no estructurales (V, I y C) son producto de la edición del ARNm del gen P y actúan principalmente en eventos de regulación de la transcripción y de respuesta antiviral (Figura 2.3.3) (Moreno-López *et al.*, 1986; Sundqvist *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 1997; Santos-López *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

La NP está constituida por 545 aa, el perfil electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) reveló una proteína con un peso molecular de 68 kDa, sin embargo, la masa molecular calculada es de 60.1 kDa, con un punto isoeléctrico (pI) de 5.12. La NP forma parte integral de la nucleocápside y se encuentra asociada al genoma del RVP, no se desprende durante los procesos de replicación y transcripción, cada molécula de la NP se encuentra unida a seis nucleótidos y su afinidad es tan alta que impide que el genoma del RVP se encuentre desnudo dentro de la célula hospedadora, lo cual protege al

ARN viral de un posible reconocimiento antiviral en la célula (Sundqvist *et al.*, 1990; Kolakofsky *et al.*, 1998; Santos-López *et al.*, 2004).

La proteína P se encuentra asociada a la proteína L por su extremo N-terminal y con la NP a partir de su C-terminal. Su tamaño es de 404 aa y su masa molecular calculada es de 42.4 kDa, en SDS-PAGE se ubicó en un peso de 52 kDa, el pI es de 5.33. En conjunto la proteína P y L forman el complejo con actividad polimerasa que se encarga de la transcripción y replicación del genoma viral (Sundqvist *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 1992; Svenda *et al.*, 2002; Santos-López *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

La proteína L está relacionada con la actividad catalítica de la ARN polimerasa y en diversas actividades de la transcripción del genoma viral, tales como, iniciación, elongación, metilación, edición y poliadenilación, dichos eventos realizados en el citoplasma celular, permiten que la proteína L sea la responsable de sintetizar el ARN genómico y mensajero para poder transcribir y replicar partículas virales sin necesidad de ingresar al núcleo celular. La proteína L es la más grande del RVP y está constituida por 2251 aa, con un peso molecular calculado de 255.3 kDa y de 200 kDa en SDS-PAGE, su pI es de 6.31 (Sundqvist *et al.*, 1990; Svenda *et al.*, 1997; Santos-López *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

La proteína M se localiza en la parte interna de la envoltura viral, es rica en aa básicos, lo cual le confiere una carga positiva neta de +17.5, esto permite que la proteína interactúe con los componentes virales y celulares para permitir el ensamblaje y gemación de los viriones de una forma más eficiente. Su tamaño es de 369 aa, su peso molecular calculado es de 41.7 kDa, en SDS-PAGE mostró un peso de 40 kDa, su pI es de 9.72 (Sundqvist *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 1991, 1992; Santos-López *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

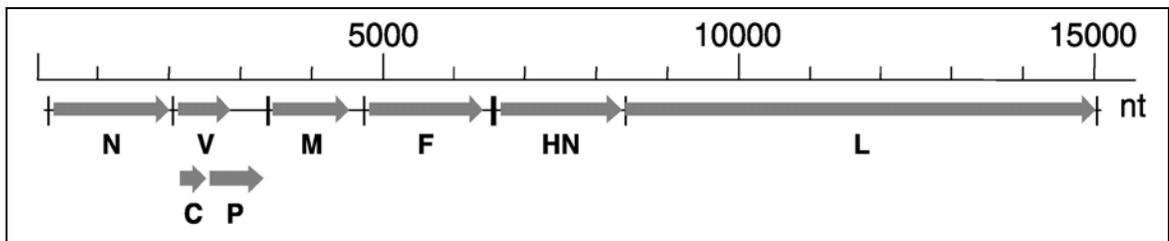


Figura 2.3.2. Organización del genoma del RVP (las líneas verticales indican las regiones intergénicas) (Modificado de Wang *et al.*, 2007).

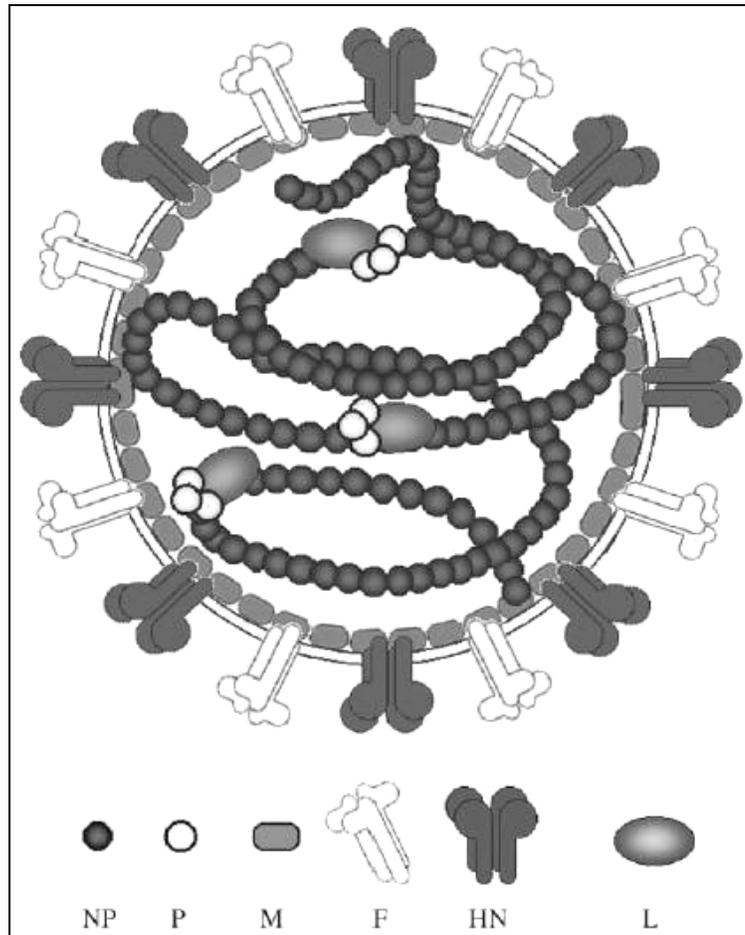


Figura 2.3.3. Conformación proteica del RVP
(Modificado de Santos-López *et al.*, 2004).

La glicoproteína transmembranal HN es la responsable de reconocer y adherirse al receptor específico en la célula, particularmente una forma isomérica de ácido siálico, el ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3Gal), dicho receptor suele expresarse de manera importante en tejidos del SNC de cerdos neonatos y en tejidos del tracto reproductor de cerdos adultos, el dominio de reconocimiento a este receptor es altamente conservado en los paramixovirus (Reyes-Leyva *et al.*, 1997; Zenteno-Cuevas *et al.*, 1998; Vallejo *et al.*, 2000). Se ha demostrado la capacidad hemaglutinante y neuraminidasa de la proteína. El tamaño de la HN es de 576 aa, su peso molecular calculado es de 63.3 kDa, en SDS-PAGE se ubica en los 66 kDa, esta diferencia se debe a los cuatro sitios potenciales N-glicosilación que presenta, su punto isoelectrónico es de 7.99 (Moreno-López *et al.*, 1986; Sundqvist *et al.*, 1990, 1992; Santos-López *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). La HN es la proteína inmunodominante en la infección al RVP (Hernández *et al.*, 1998), recientemente se han identificado los epitopos de la HN que son reconocidos por anticuerpos de cerdos infectados naturalmente o de murinos inmunizados con estos determinantes acoplados a albúmina sérica bovina (Zenteno-Cuevas *et al.*, 2007).

La glicoproteína F también es transmembranal y participa activamente en la fusión del virus a la célula y entre células, esto último con la participación de la HN, la fusión entre células infectadas da lugar a la generación de células gigantes multinucleadas o sincitios. El polipéptido F₀ es dividido por acción de una enzima proteolítica de origen celular y se da origen a los péptidos F₁ y F₂, los cuales tienen un peso molecular de 59 y 12 kDa en SDS-PAGE, respectivamente; la proteína completa tiene 541 aa y su peso molecular calculado es de 58.3 kDa, su pI es de 6.15 (Sundqvist *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 1997; Santos-López *et al.*, 2004).

Las proteínas no estructurales del RVP son sintetizadas a partir del gen P el cual contiene cuatro marcos de lectura abierta y puede dar origen a cuatro productos, la proteína V (249 aa; 26.1 kDa; 5.06 pI), I (174 aa; 18.1 kDa; 4.95 pI), P (404 aa; 42.4 kDa; 5.33 pI) y C (126 aa; 14.7 kDa; 10.39 pI). Las proteínas V, I y C han sido asociadas a la regulación de la transcripción y a la inhibición de las cascadas de activación de interferón- γ en la

célula hospedadora, como respuesta a la infección de algunos paramixovirus. (Lineé *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 1992; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Santos-López *et al.*, 2004; Kubota *et al.*, 2005; Hagmaier *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Características fisicoquímicas y biológicas. El RVP puede ser purificado en gradientes de sucrosa con una densidad de 1.21g/ml. La infectividad puede ser eliminada mediante tratamientos con éter, cloroformo, formalina (también elimina la capacidad hemaglutinante) y β -propiolactona. Es inactivado a 56° C después de 4 h (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006).

Se ha demostrado la capacidad hemaglutinante al confrontar el virus y la proteína HN purificada, con eritrocitos de cerdo, carnero, caprino, bovino, equino, perro, conejo, rata, ratón, hamster, cobayo, pollo, pavo y humano tipos A, B, AB y O. La elusión se presenta entre los 30 a 50 minutos de incubación a 37° C (Stephano *et al.*, 1988; Reyes-Leyva *et al.*, 1999; Kirkland & Stephano, 2006).

La multiplicación del RVP en cultivo celular se ha realizado en diferentes líneas celulares, en términos generales no muestra especificidad *in vitro*. Las líneas celulares empleadas en la multiplicación del RVP, han sido, PK-15, ST, Pt, MDBK, BT, Bt, BHK-21, GMK, Vero, CK, BEK, IBRs y en cultivos celulares de riñón de gato, embrión bovino, dermis equina, fetales humanas, plexo coroideo porcino, plexo coroideo bovino y de pulmón de visón, en todas estas células causa efecto citopático. El RVP también puede ser replicado en embrión de pollo (Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano *et al.*, 1988; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2001; Kirkland & Stephano, 2006).

1.4. Patogenia y virulencia

Vía de ingreso y sitios de replicación. La vía de entrada natural del RVP es la cavidad oronasal, la transmisión se produce principalmente por inhalación de aerosoles contaminados, los cuales, dependiendo del tamaño de la partícula, será el sitio de

replicación inicial. Así, cuando las partículas conteniendo el virus son grandes, el sitio de replicación inicial es la cavidad oronasal, básicamente en la mucosa nasofaríngea y tejido linfático asociado (tonsilas). Cuando las partículas son muy pequeñas, el virus ingresa con la aspiración hasta el interior del pulmón y se deposita en los conductos aéreos superiores en donde la replicación es abundante. A partir de ahí, el RVP se disemina por vía sanguínea transportado por eritrocitos y leucocitos, iniciándose así, la infección sistémica, propagación y replicación en diversos sitios inmunoprivilegiados de órganos linfáticos y reproductivos. El virus puede ingresar al SNC a través de las terminaciones del nervio olfatorio en la mucosa nasal, posteriormente se puede diseminar al hipocampo, tallo cerebral y cerebelo (Allan *et al.*, 1996; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Santos-López *et al.*, 2004; Reyes-Leyva *et al.*, 2004).

De manera experimental se ha producido la infección al inocular el RVP a los cerdos por vía intranasal, intratraqueal, intraocular, intracraneal, intraperitoneal e intramuscular (Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano *et al.*, 1988; Allan *et al.*, 1996; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1998; Ramírez-Herrera *et al.*, 2001; Reyes-Leyva *et al.*, 2004).

Viremia. El estado de viremia ha sido detectado en los animales infectados experimentalmente con el RVP, en un estudio realizado por Reyes-Leyva *et al.* (2004), se observó por inmunofluorescencia indirecta (IFID), positividad al antígeno viral en eritrocitos a partir del cuarto día posinfección (pi) permaneciendo positivos hasta el doceavo día pi. En los leucocitos fue detectado el antígeno a partir del día 12 y hasta el 20 pi. Sin embargo, debido a la corta duración del experimento (20 días), se desconoce que tan prolongado puede ser el tiempo en que el RVP se encuentre promoviendo el estado de viremia.

Susceptibilidad dependiente de la edad. Se ha identificado que el RVP tiene una distribución variable dependiendo la edad de los cerdos infectados. En cerdos neonatos se ha observado que el sitio de mayor replicación viral es el SNC y estructuras del tracto

olfatorio. En cerdos destetados, la infección se establece predominantemente en el tracto respiratorio y en SNC (Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano *et al.*, 1988; McNeilly *et al.*, 1996; Hernández-Jáuregui, 2003). En la infección experimental de cerdas gestantes, se logró aislar con mayor frecuencia al RVP en tracto respiratorio, ovarios y tonsilas, en los fetos de las cerdas infectadas también se reaisló el RVP, lo cual sugiere que el virus atraviesa la barrera placentaria y se produce la transmisión de forma vertical (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004). En los machos adultos se ha recuperado el RVP a partir de testículo y epidídimo a 30 y 45 días pi, respectivamente, se ha sugerido que el RVP ingresa en estos órganos utilizando células sanguíneas y que en estos sitios inicia una replicación abundante (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Ramírez, 1998). Se ha demostrado que el RVP se excreta en el semen de verracos infectados experimentalmente, aún se desconoce cuál es exactamente la vía de entrada del virus en el semen, se ha observado que el RVP puede estar de forma libre en el plasma seminal o en la fracción celular del eyaculado, de la misma forma se ha identificado que el virus tiene una alta afinidad por testículo, epidídimo y glándulas accesorias, pudiendo ser estos órganos los que aporten la carga viral en el semen, el papel que desempeñan las células sanguíneas en la diseminación del RVP a este nivel es desconocido (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Solís *et al.*, 2007). Estos datos proporcionan evidencia de que el RVP tiene una distribución variable en los cerdos, dichas variaciones en los sitios de replicación son influenciadas por el receptor celular que confiere el tropismo al virus, más adelante se describen estos mecanismos con mayor detalle.

Persistencia viral. La persistencia viral se define como la capacidad de un virus para permanecer dentro del organismo afectado por periodos prolongados, ocasionando así, una infección crónica. Todos los miembros de la familia de los paramixovirus poseen la capacidad de generar infecciones persistentes. El estado de persistencia está influenciado por una baja tasa de replicación viral, producción de partículas virales defectuosas y baja expresión de las proteínas virales, sin embargo, la replicación viral puede reactivarse de manera efectiva y ocasionar una nueva infección aguda (Puglielli & Ahmed, 1999; Cuevas-Romero, 2002; Santos-López *et al.*, 2004).

La persistencia del ARN genómico y el ARNm del RVP ha sido demostrada tras la infección experimental en cerdos convalecientes e inmunosuprimidos a 53 días pi, a partir de tejidos del sistema nervioso central (SNC) se amplificó ARN del gen que codifica a la NP y a la P, el ARNm se identificó analizando los sitios de edición del gen P. Sin embargo, no se logró detectar al antígeno viral por medio de IF y tampoco se pudo aislar al RVP en ninguno de los diversos tejidos analizados, lo anterior puede deberse a que existe una carga viral muy baja o a la producción de partículas virales defectuosas incapaces de multiplicarse eficientemente *in vitro* (Wiman *et al.*, 1998).

En cerdos infectados de forma natural, Cuevas-Romero (2002), detectó con una RT-PCR anidada el ARN genómico (N) y ARNm (P) del RVP en SNC, tonsila, glándula salivar, pulmón y páncreas, de cerdos convalecientes hasta 13 meses después de la exposición al virus. Al introducir cerdos centinelas, se evidenció la transmisión al detectar el ARN genómico y ARNm del RVP; sin embargo, en ninguno de los cerdos en los que se detectó el genoma viral se logró aislar al virus y solamente en los cerdos convalecientes se detectó el antígeno por medio de inmunohistoquímica. Se concluyó que el RVP genera un estado de persistencia prolongado en el SNC y en órganos, como tonsilas, los cuales son sitios iniciales de replicación viral, los animales que se han recuperado de la infección aguda pueden mantenerse sin cuadros clínicos aparentes y funcionar como reservorios capaces de transmitir el RVP a cerdos susceptibles.

En un estudio experimental, se infectaron cerdos vietnamitas de 17 días de edad con el vLPM (cepa prototipo del RVP), los cerdos exhibieron los signos característicos de la EOA, sin embargo, sólo un cerdo de seis infectados, murió al día 11 pi, los cinco cerdos restantes se recuperaron de la enfermedad y fueron sacrificados a los 277 días pi, se detectó por RT-PCR anidada, el ARNm de los genes N y P en bulbo olfatorio, médula oblonga, cerebelo, linfonodos (mesentérico, cervical, submaxilar y parotídico), páncreas y epidídimo, el RVP no se pudo aislar en cultivo celular. Los autores concluyeron que el ARN del RVP que persiste en linfonodos (como evidencia indirecta de la presencia del

virus), estimula continuamente el sistema inmune, generando una respuesta celular y humoral constante durante la infección crónica del RVP (Cuevas *et al.*, 2009).

Bajo condiciones *in vitro*, la persistencia del RVP se ha podido establecer en células PK-15, la cual se observó hasta por un año en cultivos con pases continuos, la capacidad lítica del virus se modificó y permitió la multiplicación viral a títulos bajos (Hjertner *et al.*, 1997). Al evaluar la cantidad de transcritos del RVP en las células persistentemente infectadas, se encontró que la expresión de la proteína L disminuía considerablemente, así mismo, la expresión de la proteína P se vio reducida, estos cambios indicaban que la replicación y transcripción del RVP era afectada, ya que estas proteínas forman el complejo con actividad polimerasa indispensable para la replicación del virus, con estos datos se asumió que estas alteraciones en la expresión favorecían el estado de persistencia. También se observó que la expresión de la proteína V era mucho mayor que la de P, dicha proteína está relacionada con el control de la replicación viral. La presencia de ARN subgenómico, puede inducir también el estado de persistencia al competir por la replicación con el ARN estándar (Hjertner *et al.*, 1998).

Tropismo celular y tisular. El tropismo celular del RVP está influenciado por la expresión de receptores en la célula, en específico el ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3Gal), componente terminal de diversas glicoproteínas celulares (Reyes-Leyva *et al.*, 1997). Este receptor ha sido identificado abundantemente en tejidos del SNC (bulbo olfatorio, corteza del lóbulo piriforme, hipocampo, tálamo, tallo cerebral y cerebelo), del sistema respiratorio (mucosa nasal, tráquea, bronquios y pulmón) y en el sistema linfático (tonsilas y nódulos linfáticos) de cerdos neonatos, en cerdos machos adultos se identificó principalmente en tejidos del sistema respiratorio y del tracto reproductor (testículo y epidídimo) (Vallejo *et al.*, 2000). Coincidentemente, los estudios de infección experimental realizados, indican que el RVP se presenta con mayor frecuencia en estos tejidos (Allan *et al.*, 1996; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002).

Virulencia. Desde el primer aislamiento del RVP, los factores asociados a la virulencia han sido estudiados. Reyes-Leyva *et al.* (2002), realizaron una extensa revisión de los cuadros clínicos asociados a diferentes aislamientos realizados por el equipo del Dr. Ramírez-Mendoza en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los virus aislados fueron denominados POA¹-2 (Puebla/1988), PAC²-1 (Michoacán/1990), PAC-2 (Jalisco/1990), PAC-3 (Jalisco/1992), PAC-4 (Michoacán/1993) y PAC-5 (Texcoco/1994). El estudio de los cuadros clínicos relacionados con cada aislamiento permitió definir tres grupos de virus, en el primero, el LPM, POA y POA-2 provocando alteraciones nerviosas exclusivamente en lechones; en el segundo grupo, PAC-1, PAC-4 y PAC-5, presentando cuadros neurológicos y mortalidad alta en lechones, cuadros nerviosos en cerdos de 3-4 meses de edad y alteraciones reproductivas en adultos; y el tercer grupo, PAC-2 y PAC-3 como causantes de problemas reproductivos en adultos y cuadros nerviosos escasos en lechones.

Recientemente, Sánchez-Betancourt *et al.* (2008), han reportado nuevos cambios en la virulencia del RVP en cuatro aislamientos (PAC-6, PAC-7, PAC-8, PAC-9), encontrando cuadros clínicos con manifestaciones nerviosas en cerdos en la línea de engorda y en animales adultos. El cambio en la virulencia se relacionó con alteraciones en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica a la proteína HN, el análisis del árbol filogenético construido a partir de las secuencias disponibles, mostró una clara división en tres grupos, en los cuales el grupo uno se conforma por el LPM y PAC-4, el grupo dos PAC-2, PAC-3 y C³I-IV, y el grupo tres formado por los aislados PAC-6 a PAC-9.

1.5. Respuesta inmune

La respuesta inmune del cerdo frente a este agente es rápida, suelen presentarse anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación en la primera y segunda semana posinfección, respectivamente, y principalmente están dirigidos contra la glicoproteína de superficie HN y la NP, que se encuentra en la parte interna del RVP (Hernández *et al.*,

¹ POA: Paramixovirus del Ojo Azul.

² PAC: Producción Animal Cerdos.

³ C: CIVESTAV.

1998). Sin embargo, la respuesta celular es deficiente en las primeras fases de la infección, observándose que el virus es capaz de suprimir la proliferación de células mononucleares estimuladas con mitógenos *in vitro* (Hernández *et al.*, 2001). Lo cual, en condiciones naturales, podría predisponer a infecciones secundarias por virus o bacterias. En general, la respuesta celular con fenotipo CD4+CD8 se presenta en la fase aguda de la infección y la respuesta con fenotipo CD4+CD8+ en la respuesta de memoria teniendo un perfil de citocinas principalmente de IL-10 (Hernández *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2001; Cuevas *et al.*, 2009).

1.6. Epidemiología

Especies hospedadoras. El cerdo es el único animal que se ha reportado como hospedador del RVP en condiciones naturales. Experimentalmente el virus ha sido inoculado en ratones, ratas (cepa Wistar), embriones de pollo, conejos, perros y gatos, ninguno de estos animales presentó signos asociados a la infección. Los pecaríes infectados experimentalmente, desarrollaron un cuadro subclínico. Sin embargo, se han encontrado anticuerpos en ratas, conejos, perros, gatos y pecaríes, infectados experimentalmente y naturalmente en un murciélago frugívoro de la especie *Rhogeessa parvula*, por lo cual, recientemente se ha sugerido que el RVP puede tener su origen en murciélagos, tal y como se ha descrito en otras infecciones por paramixovirus (Moreno-López *et al.*, 1986; Arellanes *et al.*, 1994; Cuetero *et al.*, 1995; Salas-Rojas *et al.*, 2004; Kirkland & Stephano, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Distribución geográfica. En el año de 1980, en La Piedad, Michoacán, comenzaron a describirse los primeros casos de la EOA. Desde entonces, la enfermedad ha sido diagnosticada en varios Estados, principalmente en las regiones del Centro y del Bajío, la EOA sólo ha sido descrita en México. Para 1990 se tenía evidencia serológica de que al menos 10 Estados eran positivos (Fuentes *et al.*, 1990) y en 1992 aumentó a 16 Estados (Fuentes *et al.*, 1992). Actualmente, la enfermedad se ha establecido y se reporta ocasionalmente en los Estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de

México, Hidalgo, Distrito Federal y Querétaro (Morilla *et al.*, 2002; Kirkland & Stephano, 2006; Rivera *et al.*, 2006).

Recientemente, los reportes del curso clínico de la enfermedad han disminuido y frecuentemente se encuentran casos seropositivos. Quezada *et al.* (2005), en un estudio retrospectivo, encontraron nueve casos positivos de 438 sueros analizados de 1990 al 2000. En el periodo comprendido del año 1999 al 2000, se realizó un análisis a nivel nacional, en el cual se encontró un 16% ($n = 27,733$ sueros) de casos con anticuerpos contra la EOA en 10 de 19 Estados muestreados (Morilla *et al.*, 2002).

Vías de transmisión y excreción. Las vías de transmisión más comunes del RVP son el contacto directo entre cerdos infectados y cerdos susceptibles. Los aerosoles, personas, vehículos, equipo contaminado, el viento y las aves posiblemente jueguen un papel determinante en la transmisión de la enfermedad. Así mismo, los cerdos son susceptibles a la infección experimental por vía oral, intranasal, intramuscular e intraperitoneal (Kirkland & Stephano, 2006). Experimentalmente, la transmisión vertical fue evidenciada al aislar el RVP de tejidos de los fetos de las cerdas gestantes infectadas experimentalmente (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004).

Se ha observado que el RVP es excretado de manera importante en secreciones nasales, de orina y heces (Allan *et al.*, 1996). De la misma forma, se ha demostrado que los machos infectados experimentalmente excretan el RVP en semen, sin embargo, la transmisión a cerdas a partir de semen de verracos infectados natural o experimentalmente no ha sido demostrada (Espinosa, 2001; Kirkland & Stephano, 2006; Solís *et al.*, 2007).

1.7. Signos clínicos

Los signos clínicos de la EOA más comunes incluyen alteraciones del SNC y elevada mortalidad en lechones en lactancia, falla reproductiva en animales adultos y opacidad de la

córnea en cerdos de cualquier edad, los signos clínicos son dependientes de la edad del animal (Kirkland & Stephano, 2006).

Los lechones de 2-15 días de edad son más susceptibles a la infección por el RVP, los animales presentan los signos súbitamente, generalmente se encuentran postrados, deprimidos o muestran alteraciones del SNC. El cuadro se puede presentar inicialmente con fiebre, pelo erizado y lomo arqueado, generalmente acompañado por constipación o diarrea.

Posteriormente, los animales muestran un cuadro nervioso progresivo que incluye incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, principalmente de los miembros posteriores, temblores musculares, posturas anormales. Algunos lechones se vuelven hiperexcitables y muestran movimientos involuntarios (pedaleo), permanecen letárgicos puede existir una ceguera aparente y en ocasiones nistagmo, algunos animales presentan conjuntivitis, ojos hinchados, lagrimeo y exudado en párpados. El 1-10% de los lechones infectados muestran opacidad de la córnea. Frecuentemente la opacidad desaparece y los animales afectados no presentan más signos (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006).

Por lo general, al inicio de la infección la muerte se presenta 48 horas posterior a la aparición de los signos, sin embargo en algunos casos puede presentarse hasta 4-6 días después. Durante el brote de la enfermedad, el porcentaje de camadas afectadas oscila entre el 20 al 65%, la morbilidad puede ser del 20 al 50% y la mortalidad puede ascender desde un 87 a 90% de los cerdos afectados; la mortalidad puede prolongarse hasta por nueve semanas (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006).

En cerdos destetados mayores a 30 días, los signos clínicos se presentan en raras ocasiones y la mortalidad oscila entre el 1 al 4%, el cuadro se puede presentar como anorexia, depresión, incoordinación, marcha en círculo y movimientos pendulares de la cabeza, puede presentarse o no conjuntivitis y opacidad de la córnea. En cerdos de 15-45 kg

se han presentado cuadros nerviosos severos. La mortalidad alcanzada fue del 20% (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006).

Recientemente, se han hecho nuevas descripciones de la enfermedad. En brotes ocurridos entre los años 2000 al 2003, Sánchez-Betancourt *et al.* (2008), reportan la EOA en cerdos de 3-4 meses, un 60% de animales presentó signos respiratorios y un 20% encefalitis, la mortalidad derivada de este brote fue del 30%.

El cuadro clínico en cerdas se presenta como falla reproductiva, aumentándose el número de cerdas que retornan al estro, reducción en la tasa de partos, se incrementa el intervalo de días destete-primer servicio y por consiguiente los días no productivos (Cuadro 2.7.1). El aborto no es una característica particular, pero se ha observado ocasionalmente durante brotes agudos. Algunas hembras suelen presentar opacidad de la córnea, se han descrito nuevas presentaciones en las cerdas manifestándose principalmente los signos nerviosos hasta en un 10% de las cerdas afectadas (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Cuando se presenta el cuadro en las naves de maternidad suele observarse un incremento en el número de lechones nacidos muertos y momificados, al mismo tiempo el número total de lechones nacidos se ve disminuido, las cerdas con camadas afectadas no presentan alteraciones aparentes, se han llegado a manifestar con cuadros de anorexia temporal (1-2 días antes de la aparición de los signos en lechones) y opacidad de la córnea (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006).

La mortalidad en cerdas se había reportado como baja (incrementándose el 0.1 al 0.8%), sin embargo, en brotes de la EOA recientes se ha encontrado un incremento de la mortalidad mayor al 15% (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Cuadro 2.7.1. Parámetros reproductivos afectados durante un brote de la EOA.

Parámetro	Efecto	Rango	Duración (meses)
Repeticiones (%)	Incremento	5.8-22.1	2-6
Tasa de pariciones (%)	Disminución	6.0-30.2	1-4
Intervalo destete-1er servicio (días)	Incremento	1.0-2.9	2-8
Servicio a 7 días (%)	Disminución	10.0-26.1	2-8
Abortos (%)	Incremento	0-4.7	0-2
Cerdas muertas (%)	Incremento	0.1-0.8	0-2
LNT/ camada	Disminución	0-2.1	1-4
Lechones nacidos vivos/ camada	Disminución	0.8-4.1	4-8
LNM (%)	Incremento	4.5-19.6	2-11
Momias (%)	Incremento	6.8-36.2	3-12
Mortalidad predestete (%)	Incremento	32.0-51.8	1-7

Tomado de Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006.

Los signos clínicos en machos adultos son pocos, puede presentarse anorexia y opacidad de la córnea. Los parámetros seminales se ven seriamente afectados, en granjas infectadas se ha reportado el 29 al 73% de infertilidad, la cual puede ser temporal o permanente, la concentración espermática se ve disminuida y el porcentaje de anomalías espermáticas aumenta, en algunos casos el eyaculado puede obtenerse sin espermatozoides. Los eyaculados de los animales infectados pierden viabilidad al ser diluidos y almacenados para su uso en la inseminación artificial. Algunos sementales presentan inflamación testicular, los testículos se observan turgentes con marcado edema; posteriormente pueden adquirir una textura granulosa y pueden atrofiarse (generalmente unilateral), la orquitis y epididimitis por lo general esta presente. Los animales con lesiones severas pueden llegar a perder la libido (Stephano *et al.*, 1988; Campos & Carvajal, 1989; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Kirkland & Stephano, 2006; Solís *et al.*, 2007).

1.8. Lesiones

Los cambios generados a nivel macroscópico son moderados y generalmente no se observan. A nivel microscópico, las lesiones se presentan en SNC, sistema respiratorio, ojo y en órganos del tacto reproductor de cerdos adultos (Cuadro 2.8.1).

1.9. Diagnóstico

El diagnóstico de la EOA puede realizarse a partir de la observación de las manifestaciones clínicas, tales como encefalitis en lechones, falla reproductiva en cerdas, epididimitis en machos adultos y opacidad de la córnea en cualquier edad. La evaluación a nivel histológico puede ayudar a establecer el diagnóstico, las lesiones a observar son, encefalitis no supurativa, uveítis anterior, queratitis, orquitis y epididimitis. La presencia de cuerpos de inclusión en tejido nervioso y epitelio córneo confirman el diagnóstico (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006).

Las pruebas serológicas utilizadas más comúnmente son, la inhibición de la hemaglutinación (IHA), virus seroneutralización (VSN) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Para la detección del antígeno se han utilizado el aislamiento viral en cultivo celular (AV), hemaglutinación (HA), inmunofluorescencia (IF) directa e indirecta, RT-PCR y RT-PCR anidada (Allan *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 1996; McNeilly *et al.*, 1997; Wiman *et al.*, 1998; Nordengrahn *et al.*, 1999).

El diagnóstico diferencial de la EOA debe hacerse para enfermedades que cursen con encefalitis y fallas reproductivas, especialmente PRRS y EA. Cabe señalar que solamente la EOA produce opacidad de la córnea y epididimitis en machos adultos (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland & Stephano, 2006).

1.10. Prevención y control

La correcta aplicación de medidas de bioseguridad permite mantener las granjas libres de la EOA, sin embargo, el monitoreo serológico constante es indispensable y permite tomar medidas adecuadas para el control de la EOA (Kirkland & Stephano, 2006).

Se ha descrito la elaboración de una gran cantidad de vacunas contra la EOA. La vacunación de cerdos con una vacuna comercial basada en virus inactivado ha logrado disminuir la presentación de la enfermedad, sin embargo los resultados no son del todo concluyentes. Al emplear una vacuna inactivada con rayos gamma, se ha demostrado que se obtiene una buena inmunidad frente al desafío, pero la protección es variable dependiendo de la edad de los animales (Martínez *et al.*, 2006). En verracos inmunizados con la vacuna anteriormente mencionada, se obtuvo una protección del 80% para prevenir alteraciones testiculares, sin embargo, no evitó la presencia del RVP en testículo y epidídimo posterior al desafío (Coba *et al.*, 2006).

Cuadro 2.8.1. Lesiones asociadas a la infección por el RVP.

Sitio afectado	Lesiones macroscópicas	Lesiones microscópicas
SNC	Congestión cerebral Incremento del líquido cerebroespinal	Meningoencefalitis no supurativa, gliosis focal y difusa, infiltración perivascular, en donde se observan linfocitos, células plasmáticas y células reticulares, neurofagia, necrosis neuronal, glial y coroiditis
Pulmón	Neumonía (bordes de lóbulos craneales)	Áreas multifocales de neumonía intersticial, con infiltración de células mononucleares en la pared alveolar
Ojo	Conjuntivitis Opacidad de la cornea (generalmente unilateral) Queratocono	Uveítis anterior, infiltración de neutrófilos, macrófagos o células mononucleares, vesículas citoplasmáticas
Órganos del tracto reproductor	Bolsa escrotal: edema, presencia de líquido seroso Testículo: marcado incremento y cambio de la textura (orquitis), atrofia, hemorragia de la túnica albugínea Epidídimo: incremento, formación de nódulos Útero: congestión y hemorragia de placenta y endometrio	Testículo: degeneración y necrosis del epitelio germinal, infiltración intersticial de células mononucleares, fibrosis Epidídimo: formación de vesículas, degeneración y necrosis de los túbulos seminíferos, infiltración intersticial de células mononucleares, fibroplasia, granulomas espermáticos
Otros	Hemorragia pericárdica Hemorragia en riñón Tonsilitis	Descamación del epitelio y presencia de células inflamatorias en las criptas tonsilares

(Stephano *et al.*, 1988; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004; Kirkland & Stephano, 2006).

1.11. ANTECEDENTES

Impacto de las infecciones virales en la inseminación artificial en porcinos

Una gran diversidad de agentes patógenos han sido implicados en la presentación de enfermedades que afectan directa o indirectamente la reproducción del cerdo, siendo las enfermedades de origen viral, las que ocasionan el mayor impacto. Entre los patógenos más relevantes se encuentran, el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (vPRRS), de la enfermedad de Aujeszky (vEA), de la fiebre porcina clásica (vFPC), de la enfermedad asociada a la circovirus porcina (PCV-2), de la peste porcina africana (vPPA), de la fiebre aftosa (vFA), de la encefalitis-B japonesa (VvEJB), de la estomatitis vesicular (vEV), de la enfermedad del ojo azul (vEOA), de la diarrea viral bovina (vDVB) y de la parvovirus porcina (vPP) (Larrochelle *et al.*, 2000; Guerín & Pozzi, 2005; Maes *et al.*, 2008).

La presencia de dichos agentes ha sido identificada en órganos del tracto reproductor y en el semen de machos porcinos infectados natural o experimentalmente. Aunque, la transmisión venérea de estos virus no ha sido demostrada en su totalidad y en muchos casos se han detectado en ausencia de signos de la enfermedad, la mayoría de estos agentes infecciosos, presentes en el semen, pueden ocasionar desórdenes reproductivos en las hembras (infertilidad, abortos, disminución en la tasa de parición), resultando en pérdidas económicas considerables. Aunado a esto, el semen contaminado es una fuente potencial de infección en poblaciones susceptibles a la enfermedad (Dejuqc & Jégou, 2001; Guerín & Pozzi, 2005; Maes *et al.*, 2008) .

La creación de programas específicos para prever la diseminación de los agentes infecciosos en semen y la implementación de la inseminación artificial (IA) en los porcinos ha ayudado a controlar en parte la transmisión de las enfermedades en la población porcina, sin embargo, la presencia de virus en el semen de animales que cursan por cuadros

subclínicos han propiciado la emergencia de nuevos brotes de enfermedades (Leiding, 2000; Skov, 2005; Guerín & Pozzi, 2005).

Para lograr un adecuado control de las enfermedades virales, es necesario generar información que aporte respuestas acerca de la diseminación y persistencia de los agentes involucrados. Por lo tanto, los sementales porcinos necesitarán ser monitoreados constantemente para evaluar el riesgo epidemiológico y poder prever la entrada de los agentes virales a los centros de inseminación o a las granjas en donde el uso de la IA sea una practica habitual (Leiding, 2000; Prieto & Castro, 2005; Skov, 2005).

Agentes virales que comprometen la integridad reproductiva en el verraco

La fuente de los virus en el semen, por lo general implica una infección sistémica o local y la excreción de los agentes infecciosos puede provenir de los órganos reproductores, glándulas accesorias o excreciones prepuciales. El periodo más importante para detectar la diseminación de los agentes es la fase en que se manifiesta clínicamente la enfermedad y la viremia esta presente (Guerín & Pozzi, 2005).

El impacto que tienen los agentes virales en la integridad reproductiva del semental porcino han sido estudiados ampliamente, se han descrito alteraciones importantes en los órganos del tracto reproductor asociadas a la infección por el vEA, vPRRS, vEBJ, enterovirus y el vEOA.

Los daños a nivel testicular ocasionados por el vEA tras la infección experimental, consisten en degeneración del parénquima y un incremento en las anormalidades espermáticas, la cuál es pasajera y ha sido asociada a la fiebre que se presenta posterior a la inoculación (Hall *et al.*, 1984a; Hall *et al.*, 1984b; Guerín & Pozzi, 2005).

En la infección por el vEBJ se ha descrito la presentación de orquitis, disturbios en la espermatogénesis, disminución de la concentración y motilidad espermática e invasión

viral de los órganos reproductivos, el virus se eliminó en semen por 5 semanas. En condiciones naturales ha sido posible detectar el genoma viral en cerdos machos salvajes de Japón (Guerín & Pozzi, 2005; Maes *et al.*, 2008; Nidaira *et al.*, 2008).

En la infección por el vPRRS, se han encontrado daños a nivel tisular en testículo, llegando a provocar una disminución en la capacidad espermatogénica e inclusive apoptosis de células germinativas, los animales pueden llegar a presentar infertilidad temporal (Sur *et al.*, 1997). Los parámetros seminales fueron afectados principalmente en motilidad y morfología (Prieto *et al.*, 1996).

En la infección experimental con el RVP en machos adultos, se lograron identificar daños importantes en epidídimo, como la presencia de granulomas espermáticos y fibroplasia intersticial, en testículo, se observó la presencia de infiltrados de CMN y degeneración del epitelio germinal, en los casos más severos; Además se observó una disminución de la concentración de espermatozoides en el eyaculado y descenso de la motilidad espermática, el semen procedente de verracos infectados perdió la motilidad al ser diluido y almacenado por más de 24 horas (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Solís *et al.*, 2007).

Diseminación de virus a través de la inseminación artificial en porcinos

La presencia de virus en semen de machos porcinos infectados natural o artificialmente ha sido utilizada para demostrar la transmisión venérea de los agentes infecciosos. La transmisión a cerdas susceptibles ha sido demostrada en la infección por el vFPC, vPRRS y vEBJ (Prieto *et al.*, 1996; de Smit *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha sugerido que el vEA, vPPA, vPP, RVP y el PCV-2, entre otros, son potencialmente capaces de transmitirse en semen contaminado con la práctica de IA, sin embargo, en cualquiera de los dos casos, la infección de las cerdas susceptibles será dependiente de la dosis infectante que contenga el semen diluido. Se ha comprobado en la infección por el vPRRS, que las cerdas no seroconvierten ni presentan la enfermedad al ser inseminadas con semen conteniendo una

baja cantidad de virus (2×10^2 DICCC₅₀) (Prieto & Castro, 2005; Guerin & Pozzi, 2005). La transmisión venérea del RVP no ha sido demostrada (Solís *et al.*, 2007; Maes *et al.*, 2008).

Duración de la viremia en algunas enfermedades virales que afectan a los machos porcinos

La viremia se refiere a la presencia de virus circulante por vía sanguínea en el organismo de los animales infectados, puede ser identificada directamente mediante AV o indirectamente usando técnicas de inmunofluorescencia que reconocen antígenos virales o mediante PCR, al detectar ácidos nucleicos virales.

La detección de la viremia en el PRRS ha sido evaluada a través del análisis de suero y células mononucleares de cerdos adultos infectados experimentalmente, logrando aislar el virus en cultivo celular desde el día 1 hasta el 23 pi (Christopher-Hennings *et al.*, 2001; Prieto *et al.* 2003). La identificación del genoma del vPRRS a partir de una PCR anidada fue más prolongada, hasta 39 días pi (Christopher-Hennings *et al.*, 2001). Wasilk *et al.* (2004), utilizando una RT-PCR en tiempo real lograron la detección y cuantificación del vPRRS hasta el día 79 pi con una concentración de 8×10^1 copias de ARN/ml, en suero sanguíneo.

Hernández *et al.* (1998), evidenciaron la presencia del RVP (PAC-3) por IF en frotis sanguíneos de machos adultos, la viremia fue detectada desde el día 6 hasta el 15 pi. En un estudio realizado por Reyes-Leyva *et al.* (2004), utilizando IFID para detectar la viremia por el RVP en cerdos pospúberes, encontraron al antígeno viral asociado a eritrocitos y leucocitos de animales infectados experimentalmente hasta por 20 días pi.

Hasta el momento no existen reportes que indiquen la presencia del ARN del RVP en la viremia de machos adultos.

Determinación de la persistencia y excreción de diferentes virus en el tracto reproductor y en semen de verracos infectados experimentalmente

La persistencia del vPRRS en el semental ha sido detectada en tejidos del tracto reproductor en la infección experimental. Christopher-Hennings *et al.* (2001), lograron detectar mediante una PCR anidada, ARN del virus en glándula seminal y bulbouretral en el día 47 pi y en tejido linfoide asociado, hasta por 61 días pi.

En la infección experimental con el RVP (PAC-3) se identificó la persistencia, logrando el AV en tejidos del tracto reproductor (testículo, epidídimo y glándulas accesorias) desde el día 30 hasta el 45 pi (Ramírez, 1998). A partir de cortes de cabeza de epidídimo se realizó inmunofluorescencia indirecta, encontrando el antígeno hasta el día 70 pi (Ramírez-Mendoza *et al.* 1997).

Coba *et al.* (2006), realizaron un estudio con sementales vacunados y no vacunados, después del desafío con el vLPM, no pudieron aislar el RVP de semen de los machos desafiados. Sin embargo, se evidenció el virus en cultivo celular (PK-15) mediante hemoadsorción, a partir de macerados de epidídimo y testículo hasta 121 días pi.

La excreción de diversos virus que afectan a los machos porcinos ha sido reportada. Los virus que causan mayor impacto y son excretados vía seminal son, el vPRRS, vEA, vFPC, vEBJ, y RVP. El tiempo de excreción y la cantidad de partículas virales han sido evaluados a partir de infecciones experimentales.

Christopher-Hennings *et al.* (1995a), pudieron aislar el vPRRS en semen hasta 11 días pi. La identificación por medio de una RT-PCR anidada, pudo detectar el ARN del virus hasta los 92 días pi. (Christopher-Hennings *et al.*, 1995b)

En un estudio realizado por van Rijn *et al.* (2004), se logró la identificación por medio de una PCR en tiempo real del vEA (2-21 dpi), vFPC (3-18 dpi), vFA (1-11 dpi),

vEV (4-18 dpi) y vPRRS (6-45 dpi), en semen porcino de machos infectados experimentalmente, obteniendo resultados positivos de todos los virus en diferentes tiempos.

Con la misma técnica, Wasilk *et al.* (2004), lograron detectar hasta por 32 días pi el vPRRS (3×10^3 copias de ARN/ml) en semen de verracos infectados experimentalmente.

Espinosa (2001), utilizó anticuerpos específicos para detectar el antígeno por medio de citometría de flujo en los espermatozoides de machos infectados experimentalmente con el RVP (PAC-3). Observando positividad desde el día 9 al 39 pi. Solís *et al.* (2007), pudieron evidenciar el RVP (PAC-3) por medio de HA e IF en cultivo celular, en semen de machos desde el día 2 hasta el 49 pi.

No existen estudios en donde se haya demostrado la persistencia del ARN del RVP en semen.

2. JUSTIFICACIÓN

La EOA es un padecimiento que afecta severamente la capacidad reproductiva de los cerdos, las manifestaciones clínicas son el indicio de la infección, sin embargo, la enfermedad puede pasar desapercibida al manifestarse subclínicamente. La excreción intermitente del RVP es un factor de alto riesgo en la reproducción de los porcinos, hasta el momento no se tenía conocimiento si el RVP podía persistir en semen por periodos prolongados de la infección y cual era su dinamica de excreción a este nivel.

3. HIPÓTESIS

La viremia, excreción y persistencia del RVP ha sido detectada en el periodo de infección clínica, no se ha demostrado que el antígeno pueda estar presente en periodos prolongados de la infección, en este estudio será posible detectar la persistencia del RVP en un periodo prolongado y en altas proporciones en la infección subclínica.

4. OBJETIVO GENERAL

Detectar la persistencia del RVP en semen de verracos infectados experimentalmente

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar el genoma del *Rubulavirus* porcino en semen y suero
- Aislar el RVP de muestras de semen y tejidos del tracto reproductor

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Para la infección experimental se emplearon 12 machos porcinos híbridos Yorkshire × Landrace; con un rango de edad de 8-10 meses (Identificación: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13), los cuales se obtuvieron de una granja negativa serológicamente al RVP. A su llegada y por un periodo de cuatro semanas previas a la infección se corroboró la seronegatividad de los animales por medio de inhibición de la hemaglutinación. Se contó con un animal testigo (ID: T), el cual permaneció en la granja de origen y fue sacrificado al finalizar el tiempo del experimento.

Los verracos fueron alojados en los aislamientos del Departamento de Producción Animal: Cerdos, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, los animales se mantuvieron separados en tres grupos de cuatro cerdos por unidad de aislamiento, en cada corral se colocaron dos animales, todos contaron con agua a libre acceso y alimentación estándar para su etapa. Después de un periodo de adaptación de dos semanas, los machos fueron entrenados para colecta de semen.

Cepa viral

Virus de desafío. Se empleó el aislamiento PAC-3 (Jalisco/1992; No. Acceso *GenBank*: EF413173) del RVP (RVP-PAC3), el cual fue caracterizado por provocar alteraciones reproductivas en hembras y daño testicular y epididimario en verracos (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997), el virus se multiplicó en cultivos de la línea celular BHK-21 (células de riñón de hámster neonato), manteniéndolo con medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco/F-12 (EMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), suplementado con 5% de suero fetal bovino y 0.1% de gentamicina (500mg ml⁻¹). El sobrenadante de las células infectadas se clarificó por centrifugación a 3,000 × g durante 40 min a 4° C. La capacidad infectante del virus fue evaluada en cultivos celulares en microplacas, usando diluciones decuples

seriadas del virus en EMEM, finalmente la titulación del virus se determinó por el método de Kärber, el resultado se obtuvo en dosis infectantes en cultivo celular 50% (DICC₅₀). Para la producción del lote de desafío, el virus contenido en el sobrenadante de cultivos celulares infectados fue centrifugado a $100,000 \times g$ por 4 h a 4° C, se filtró en membranas de 0.45µm, se prepararon alícuotas y fueron conservadas a -70° C hasta su uso (Ramírez, 1998; Hernández *et al.*, 1998).

Virus para pruebas serológicas. Se utilizaron células PK-15 y Vero en botellas de cultivo de 25cm², una vez obtenido el 80-90% de confluencia del cultivo celular, se agregó 1ml del RVP-PAC3 (10⁵ DICC₅₀/ml), se mantuvieron con EMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10% de tripticaseína fosfato (TPB), 1% de L-glutamina (200mM), 1% de NaHCO₃ al 10% y 0.1% de gentamicina (500mg ml⁻¹), los cultivos fueron monitoreados diariamente hasta por cuatro días, una vez observado el efecto citopático fueron congelados a -70° C, posteriormente se descongelaron y se titularon con eritrocitos de bovino y ave al 0.5%, obteniendo un título de 1:16 unidades hemaglutinantes (UH), el producto de la multiplicación en estos cultivos fue utilizado por dos ocasiones más en la misma línea celular. Posteriormente, el total de los sobrenadantes fue mezclado y homogenizado, se tituló con eritrocitos de ave y bovino y se almacenó en alícuotas de 5 ml a -70° C y de 1.5ml a -196° C. Se obtuvo un volumen total de 400 ml con un título 1:32 con eritrocitos de ave y 1:16 UH con eritrocitos de bovino y de 10⁶ DICC₅₀/ml.

Infección experimental

Cada uno de los sementales fue infectado instilando por vía intranasal 5 ml de la cepa PAC-3 del RVP a una dosis de 10⁵ DICC₅₀/ml. Los animales fueron monitoreados diariamente para detectar cambios en su estado físico general y manifestación de signos clínicos (pirexia, anorexia, apatía, pérdida de libido), semanalmente fueron registradas las medidas testiculares y alteraciones a la palpación en testículos y epidídimos.

Colecta de muestras

Muestras sanguíneas. Se tomaron muestras sanguíneas asépticamente a partir de la vena cava superior o de la vena yugular, una vez por semana durante cuatro semanas antes de la infección ($n = 20$) y durante toda la fase experimental ($n = 165$). Se empleó sangre sin anticoagulante para la obtención de suero, se centrifugó a $800 \times g$ por 10 minutos a 4°C , posteriormente se almacenó a -70°C .

Muestras de semen. El eyaculado completo de cada verraco fue colectado dos veces por semana por 13 semanas previas a la infección ($n = 103$) y hasta la quinta semana pi, posteriormente sólo se colectaron una vez por semana hasta la finalización del experimento ($n = 160$).

El eyaculado fue colectado en recipientes térmicos, manteniendo a temperatura de 37°C , la fracción gelatinosa se descartó con una gasa estéril. Se realizó la evaluación completa al semen, se registró la temperatura, volumen, color, motilidad, concentración, morfología, porcentaje de células vivas y grado de aglutinación, el análisis se basó en pruebas convencionales (Martín-Rillo, 1996; Anónimo, 2003; Quintero, 2003; Rozeboom, 2003). Una alícuota de 50 ml se mantuvo a 4°C , posteriormente se centrifugó a $600 \times g$ por 20 minutos a 4°C , se separó el plasma seminal y el botón de la fracción celular, fueron congelados a -70 y -196°C hasta su uso.

Necropsia y colecta de órganos. Los animales fueron sacrificados siguiendo los lineamientos establecidos por el Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM. Se seleccionaron cuatro grupos, el primer sacrificio se realizó a los 64 días pi (semana 10), el segundo grupo a los 110 días pi (semana 16), el tercer grupo el día 142 pi (semana 20) y el verraco testigo un mes después de finalizar la fase de desafío. Se llevó a cabo la inspección completa de los órganos en busca de cualquier alteración y se obtuvieron muestras de testículo y epidídimo, las cuales se mantuvieron a -196°C hasta su análisis.

Serología

Inhibición de la hemaglutinación. Los sueros obtenidos de los verracos fueron colocados en placas de 96 pozos con fondo redondo (Nunc, Roskilde, Denmark), conteniendo 50µl de PBS, a partir del primer pozo se realizaron diluciones dobles seriadas, las cuales fueron de 1:2 hasta 1:2048. A continuación se agregaron 50µl del RVP-PAC3 titulado a 8 unidades hemaglutinantes. Se dejó reposar 60 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 50µl de eritrocitos de bovino al 0.5%, la lectura se realizó a los 60 min. El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se expresó como la máxima dilución en la que el suero fue capaz de inhibir la capacidad hemaglutinante del RVP. Los resultados obtenidos fueron convertidos a logaritmo base dos (Hernández *et al.*, 1998; Ramírez, 1998).

Virus seroneutralización. Se hicieron diluciones dobles seriadas del suero con EMEM, desde 1:2 hasta 1:2048. En placas de 96 pozos fondo plano (Nunc, Roskilde, Denmark), se mezclaron 50µl del suero con 50µl del RVP-PAC3 ajustado a 300 DICC₅₀. Se incubaron por 60 min a 37° C, posteriormente, se agregaron 150µl de células MDCK (células de riñón de perro) en suspensión (1×10^6 /ml). Las placas fueron incubadas por 72 h a 37° C. Una vez concluido el tiempo de incubación, 50µl de los sobrenadantes fueron colectados y mezclados con un volumen similar de eritrocitos de bovino al 0.5%, se colocaron en placas de fondo redondo y se incubaron por 60 min a temperatura ambiente. El título de anticuerpos neutralizantes se expresó como la máxima dilución en la que el suero fue capaz de neutralizar la multiplicación del RVP en el cultivo celular, evidenciado por su capacidad hemaglutinante. Los resultados obtenidos fueron convertidos a logaritmo base dos (Hernández *et al.*, 1998; Ramírez, 1998). Ambas pruebas serológicas se realizaron por duplicado.

Aislamiento viral

Semen. Las muestras de semen fueron diluidas 1:5 en EMEM, posteriormente fueron centrifugadas a $3,000 \times g$ durante 10 min, se tomó el sobrenadante y se filtró en membranas estériles de $0.22\mu\text{m}$. La línea celular empleada fue MDCK (células de riñón de perro), el cultivo se realizó en placas de 24 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark). Una vez obtenido el 80% de confluencia en los monoestratos celulares, se eliminó el medio de cultivo y se procedió a inocular con $400\mu\text{l}$ de la dilución del semen, se dejó incubar 60 min a 37°C , posteriormente se desechó el inóculo y se agregó 1ml de EMEM fresco suplementado con 5% de SFB, los cultivos se incubaron por 72 h a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% y fueron observados diariamente en busca de efecto citopático. Se realizó un segundo pase en la misma línea celular, siguiendo el mismo esquema antes señalado.

Adicionalmente se elaboraron placas de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark) con el mismo procedimiento para los dos pases, se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS, posteriormente, las placas fueron fijadas con $50\mu\text{l}$ de paraformaldehído por 10 min a temperatura ambiente, se lavó nuevamente con PBS, se decantó y se agregó $50\mu\text{l}$ de metanol absoluto a cada pozo, las placas fueron congeladas a -20°C hasta la realización de la IFID.

Los sobrenadantes de cada pase (placas de 24 y 96 pozos) fueron confrontados a eritrocitos de bovino y ave para comprobar la hemaglutinación producida por el RVP en caso de que los cultivos hubieran resultado positivos. El procedimiento fue el siguiente, se tomaron $50\mu\text{l}$ del sobrenadante de las placas a las 72 h de incubación y de los sobrenadantes de las placas después de la congelación, se colocaron en placas de fondo redondo y se mezclaron con $50\mu\text{l}$ de eritrocitos de bovino o ave al 0.5%, el tiempo de incubación a temperatura ambiente fue de 30 min para la prueba con los eritrocitos de ave y de 60 min para los eritrocitos de bovino. La lectura se considera positiva sólo si en el pozo se produce hemaglutinación específica y los testigos (pozo control de antígeno y pozo

control de eritrocitos) funcionan correctamente (Hernández *et al.*, 1998; Ramírez, 1998; Solís *et al.*, 2007).

Muestras de órganos. Se analizaron las muestras de testículo y cola y cabeza de epidídimos (derechos e izquierdos de cada uno). Se realizaron macerados utilizando una porción de aproximadamente 1g de cada tejido, se homogenizó en 5ml de EMEM, se centrifugó y se filtró, el procedimiento fue similar al descrito para las muestras de semen, con excepción del número de pases, que en esta ocasión fueron tres. También fueron preparadas placas de 96 pozos de cada pase y se analizaron por IFID, Algunos pozos de las muestras positivas fueron teñidos con cristal violeta-etanol al 4% para evidenciar la formación de los sincitios. Los sobrenadantes fueron empleados para comprobar la hemaglutinación bajo la misma metodología que en el caso de las muestras de semen. En todas las pruebas se contó con un control testigo positivo (RVP-PAC3) y testigo negativo.

Inmunofluorescencia indirecta (IFID)

Para la detección de las células positivas a la infección del RVP en cultivo celular se empleó la IFID, el procedimiento fue el siguiente, se utilizó como anticuerpo primario un suero hiperinmune contra el RVP elaborado en cerdo, teniendo un título de 1:128 en IHA y 1:256 en VSN, el suero se trabajó a una dilución de 1:32. Las placas de 96 pozos empleadas en el aislamiento viral fueron lavadas tres veces con 150µl de PBS (pH 7.4), posteriormente se agregaron 50µl por pozo del anticuerpo primario, se dejó incubar 30 min a 37° C, se lavó con PBS y se agregaron 50µl del anticuerpo secundario (1:160), anti-IgG (H + L) de cerdo elaborado en conejo, el cual estaba conjugado con isotiocionato de fluoresceína (Zymed, Labs, Invitrogen, Carlsbad, CA), se incubó 30 min a 37° C, posteriormente se decantó y se lavó con PBS, se dejó secar al aire y se observó en un microscopio invertido con lámpara de fluorescencia (Olympus IX71 S8F-3; Tokio, Japan), en algunos casos se realizó la contratinción empleando azul de Evan's al 0.01%. Las muestras se consideraron positivas al observar fluorescencia intensa intracitoplasmática granular.

Extracción del ácido ribonucleico

Extracción de ARN a partir de muestras de suero. Se realizó la extracción del ARN de las muestras de suero con el *QIAamp Viral RNA[®] Mini Kit* (Qiagen, Duesseldorf, Germany). El protocolo se basa en aislamiento de ARN viral en columnas de sílica gel. El procedimiento se desarrolló de acuerdo a las especificaciones del fabricante. A partir de 140µl de suero se obtuvieron 60µl de ARN total.

Extracción de ARN a partir de muestras de semen. El ARN total se extrajo y purificó utilizando el *Rneasy[®] Mini Kit* (Qiagen). El protocolo esta basado en la purificación selectiva de ARN total en columnas de membrana de sílica. El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron 50µl de ARN total a partir de 350µl de la fracción celular del semen.

La cuantificación del ARN del suero y semen, se realizó por espectrofotometría. Se empleó un equipo automatizado que utiliza la tecnología de retención de muestra y tensión superficial (NANODROP, ND-1000; Wilmington, DE), por medio de lectores de fibra óptica y pulsación con lámpara de xenón. Se cuantificó utilizando una longitud de onda de 260nm y el resultado se expresó en ng/µl, la integridad del ARN se determinó con la relación de la lectura OD_{260}/OD_{280} , el parámetro para la inclusión en la prueba fue una relación mayor a 1.8.

Selección y diseño de los iniciadores

Se analizaron las secuencias de los genes HN y N para el RVP y el MuV, se utilizó la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A partir de los alineamientos de las secuencias (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) disponibles los genes HN y N, se observó que las secuencias del gen N del MuV tenían regiones altamente conservadas (No. de acceso: AJ937822.1; M37750.1; X57997.1; AY376473.1). Aún cuando sólo se cuenta con una secuencia del gen N para el RVP en la base de datos, se optó por amplificar fragmentos de este gen ya que es el que se transcribe de forma más abundante, según

observaciones anteriormente realizadas (Hjertner *et al.*, 1998). Bajo condiciones experimentales, se determinó la sensibilidad de cinco diferentes juegos de iniciadores (P, L, F, HN y N), encontrando que para N se obtenía una mayor sensibilidad. Los iniciadores fueron sintetizados por una casa comercial (Life Technologies, Co. Invitrogen, Carlsbad, CA).

El diseño y las características de los iniciadores del gen N para el RVP se muestran en el cuadro 4.9.1. La especificidad fue comparada con la secuencia disponible en el *GenBank*, para el gen N del RVP (No. acceso: EF095537) y mediante ensayos experimentales empleando diferentes cepas del RVP. La temperatura de hibridación de los iniciadores se determinó experimentalmente mediante ensayos de gradientes de temperatura de 2° C.

Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se empleó el *kit* comercial *AffinityScriptTM QPCR cDNA Synthesis Kit* (Agilent Tech. Stratagene, Cedar Creek, TX). El procedimiento fue el siguiente, en un microtubo se agregaron 10µl de la *master mix*, 1µl de N2-antisentido (200nM), 1µl de la enzima (*AffinityScript RT/Rnase Block enzyme mixture*) y 500ng de ARN total, ajustando a un volumen final de 20µl. Se colocó en un termociclador (MasterCycler[®]Gradient; Eppendorf, AG, Hamburg) con el siguiente programa, 5 min a 25° C, 15 min a 42° C y 5 min a 95° C.

Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación del ADNc se empleó el *kit GoTAQ[®] DNA Polymerase* (Promega. Madison, WI). El procedimiento fue el siguiente, en un microtubo se colocaron 10µl del Buffer 5X (1.5mM MgCl₂), 1µl de dNTP (200µM), 0.25µl de enzima *Taq* (5U/µl), 1.5µl de cada iniciador (N2+sentido y N2-antisentido; concentración final 300nM), 5µl de cDNA y agua DEPC (volumen final 50µl). El programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo

de 3 min a 94° C y 35 ciclos de 30 seg a 94° C, 30 seg a 58° C y 60 seg a 72° C, finalmente un ciclo de 8 min a 72° C; los productos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador, los resultados fueron documentados fotográficamente. La sensibilidad de la RT-PCR fue determinada experimentalmente mediante ensayos con el RVP, se pudo obtener una sensibilidad de 0.01DICC₅₀/ml (dilución 10⁻⁷ de un *stock* de RVP titulado a 10⁵DICC₅₀/ml). En todos los ensayos se contó con un control testigo positivo (RVP-PAC3) y controles testigos negativos (cultivo celular sin infectar, suero negativo, semen negativo, control sin templado y H₂O DEPC).

Análisis estadístico

Los promedios de las mediciones de los testículos y de la evaluación seminal previo y posterior a la infección experimental fueron analizadas estadísticamente utilizando la prueba de *t*-de *Student* para comparación de medias pareadas (SPSS 10.0 for windows, Chicago, IL; Prism 5, Graphpad Software Inc. San Diego, CA).

Cuadro 4.9.1. Características de los iniciadores empleados en la RT-PCR.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Posición	Tamaño del fragmento (pb)	GC (%)	T _M	Nt
N2+sentido	TCCCCCGATGCGATTATTGAG	424	375	52.38	58	21
N2-antisentido	CCCCTTCGAGCTGGATTCTG	799		61.9	58	21

6. RESULTADOS

Animales de experimentación

Doce verracos fueron entrenados para colección manual de semen en la granja de origen, logrando la colecta en todos ellos. Una vez que los verracos fueron instalados en las unidades de aislamiento de la Universidad, se reinició con el entrenamiento para la colecta de semen. Sin embargo, bajo las condiciones de aislamiento y el potro de colecta, en tres de los animales no fue posible volver a colectar semen, por lo tanto, estos animales quedaron fuera del análisis de las variables analizadas.

Infección experimental

Los verracos fueron inoculados utilizando 5 ml del RVP-PAC3 (10^5 DIC_{C50}/ml), ningún animal presentó signos clínicos de la enfermedad (anorexia, apatía), cambios en su temperatura corporal, ni en su comportamiento (pérdida de libido) durante los primeros cuatro días posteriores a la infección.

Alteraciones clínicas a nivel testicular y epididimario. Un cerdo (ID-5) presentó aumento del tamaño testicular a partir del quinto día pi. Posteriormente cinco verracos más (ID: 1, 2, 3, 8 y 11) presentaron aumento entre el séptimo y noveno día pi, en todos los casos la alteración se manifestó de forma unilateral. El verraco ID-5 mostró una marcada reducción de tamaño del testículo izquierdo a partir del día 30 pi y hasta la finalización del experimento (142 días pi). Los otros verracos que presentaron aumento de tamaño testicular se regresaron a sus valores normales en promedio al día 40 pi. Tres cerdos (33.3%) infectados no mostraron cambios en las dimensiones de los testículos durante toda la fase experimental (ID: 7, 9 y 13).

Todos los animales infectados presentaron aumento de tamaño en epidídimo a partir de los 14 y hasta los 81 días pi (cuadro 5.2.1). Este cambio se observó de forma unilateral o bilateral y a nivel de cola o cabeza de epidídimo.

Cuadro 5.2.1. Periodos en los que se observaron alteraciones clínicas a nivel testicular y epididimario.

ID	Testículos		Epidídimos	
	Día de inicio	Día de termino	Día de inicio	Día de termino
1	9	42	9	64*
2	7	49	15	93
3	7	30	14	86
5	5	142*	13	25
7	-	-	16	65
8	9	30	15	86
9	-	-	15	93
11	7	49	12	114
13	-	-	16	86
Promedio	8	40	14	81

*mostraron alteración hasta el sacrificio.

-no mostraron alteraciones visibles o a la palpación.

Mediciones testiculares. Las mediciones testiculares fueron registradas diariamente una semana antes de la infección y por seis semanas *pi*, posteriormente una vez por semana. Las alteraciones individuales más evidentes se presentaron en el verraco ID-5, el cual mostró una reducción del tamaño del testículo izquierdo del 40% de la longitud inicial al momento del sacrificio (Fig. 5.2.1).

El análisis grupal mostró que existieron diferencias ($P < 0.05$) en la longitud del testículo izquierdo en las primeras dos semanas posinfección incrementándose su tamaño de 25.0 a 26.5 cm. En la semana 15 se presenta una disminución significativa ($P < 0.05$) en la longitud del tamaño, mostrando una reducción de 1.8 cm con respecto a su medida original.

La longitud del testículo derecho mostró marcadas diferencias ($P < 0.05$) en la semana 12 y 15, observándose una disminución en la longitud de 1.7 y 1.5 cm, respectivamente, comparado con las evaluaciones iniciales.

En el diámetro promedio del testículo izquierdo se observaron diferencias ($P < 0.05$) únicamente en la segunda y tercera semana, aumentando su tamaño 0.9 y 0.5 cm respectivamente, para posteriormente volver a su tamaño original. En el testículo derecho se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) del diámetro en la primera semana posinfección, incrementándose 1 cm, con respecto a la evaluación previa a la infección. El análisis completo de los promedios de las medidas del grupo se muestra en el cuadro 5.2.2.

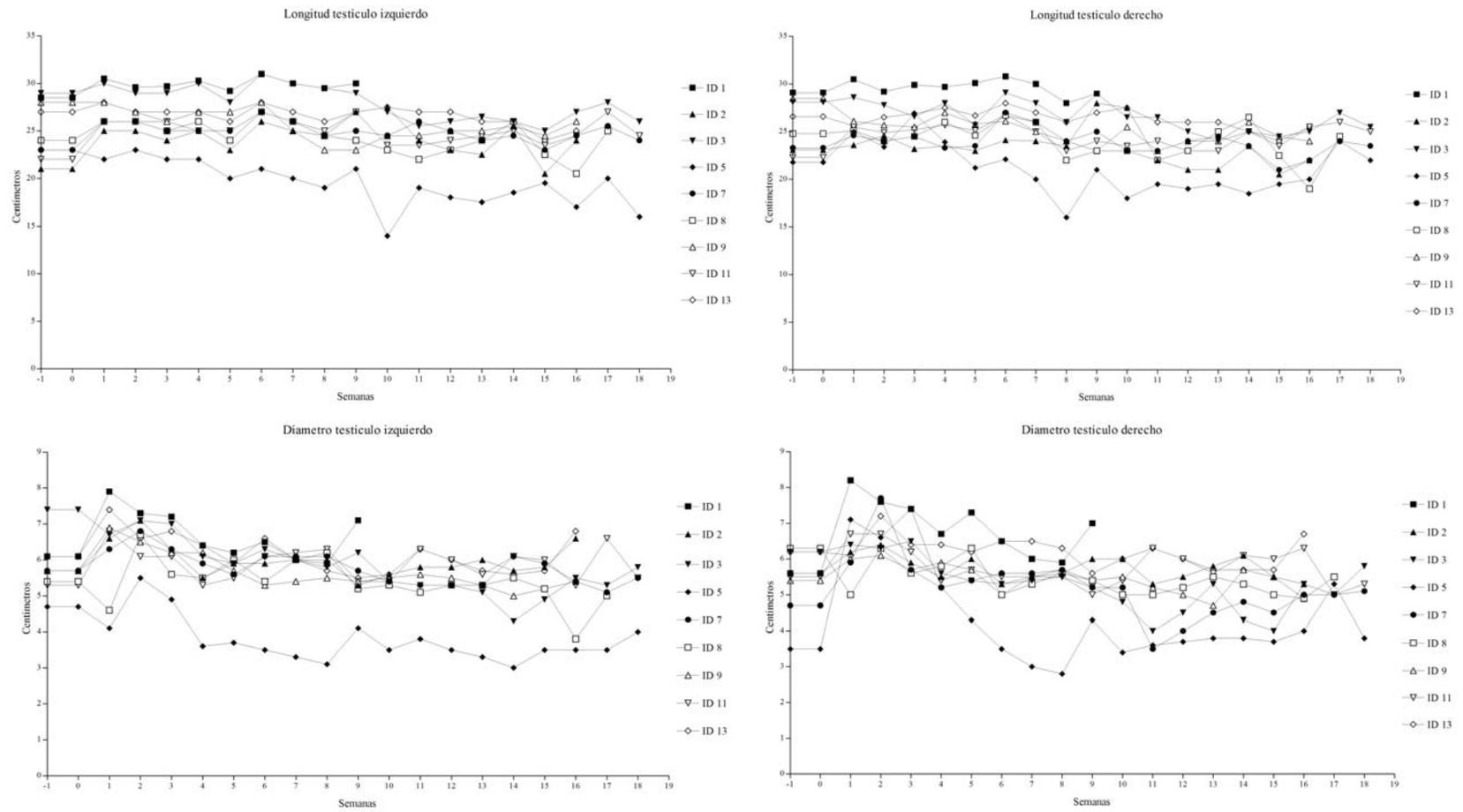


Figura 5.2.1. Cambios en las dimensiones testiculares presentadas previo a la infección y por 19 semanas posteriores (Nótese la marcada disminución de tamaño del testículo izquierdo del verraco ID-5).

Cuadro 5.2.2. Análisis comparativo de las dimensiones testiculares promedio medidas a lo largo de la fase experimental.

Semana	Longitud testículo izquierdo (cm)					Longitud testículo derecho (cm)					Diámetro testículo izquierdo (cm)					Diámetro testículo derecho (cm)				
	<i>n</i>	Pre ¹	DE ³	PI ²	DE	<i>n</i>	Pre	DE	PI	DE	<i>n</i>	Pre	DE	PI	DE	<i>n</i>	Pre	DE	PI	DE
1	9	25.0 ^a	3.06	26.8 ^b	2.62	9	25.2	2.84	26.0	2.14	9	5.7	0.74	6.3	1.24	9	5.4 ^a	0.88	6.4 ^b	0.89
2	9	25.0 ^a	3.06	26.5 ^b	1.98	9	25.2	2.84	25.5	1.93	9	5.7 ^a	0.74	6.6 ^b	0.56	9	5.4	0.88	6.7	0.59
3	9	25.0	3.06	25.9	2.39	9	25.2	2.84	25.9	1.94	9	5.7 ^a	0.74	6.2 ^b	0.71	9	5.4	0.88	6.3	0.69
4	9	25.0	3.06	26.3	2.60	9	25.2	2.84	26.0	2.20	9	5.7	0.74	5.6	0.87	9	5.4	0.88	5.7	0.52
5	9	25.0	3.06	25.2	2.76	9	25.2	2.84	25.0	2.52	9	5.7	0.74	5.6	0.74	9	5.4	0.88	5.8	0.81
6	9	25.0 ^a	3.06	27.3 ^b	2.96	9	25.2	2.84	26.7	2.56	9	5.7	0.74	5.7	0.95	9	5.4	0.88	5.3	0.89
7	9	25.0	3.06	26.1	2.98	9	25.2	2.84	25.6	2.78	9	5.7	0.74	5.6	0.92	9	5.4	0.88	5.3	0.96
8	9	25.0	3.06	25.0	3.20	9	25.2	2.84	23.6	3.39	9	5.7	0.74	5.6	0.98	9	5.4	0.88	5.4	1.01
9	9	25.0	3.06	25.8	2.89	9	25.2	2.84	25.4	2.92	9	5.7	0.74	5.5	0.80	9	5.4	0.88	5.4	0.74
10	8	24.6	2.97	23.9	4.39	8	24.8	2.64	24.3	3.17	8	5.7	0.78	5.2	0.70	8	5.4	0.94	5.1	0.83
11	8	24.6	2.97	23.9	2.53	8	24.8	2.64	23.2	2.27	8	5.7	0.78	5.4	0.80	8	5.4	0.94	4.9	1.11
12	8	24.6	2.97	23.8	2.75	8	24.8 ^a	2.64	23.1 ^b	2.23	8	5.7	0.78	5.3	0.80	8	5.4	0.94	4.9	0.86
13	8	24.6	2.97	23.7	2.81	8	24.8	2.64	23.3	2.15	8	5.7	0.78	5.2	0.82	8	5.4	0.94	5.1	0.71
14	8	24.6	2.97	24.6	2.53	8	24.8	2.64	24.1	2.50	8	5.7	0.78	5.1	1.06	8	5.4	0.94	5.2	0.85
15	8	24.6 ^a	2.97	22.8 ^b	1.92	8	24.8 ^a	2.64	22.5 ^b	1.94	8	5.7	0.78	5.2	0.82	8	5.4	0.94	4.9	0.84
16	8	24.6	2.97	23.5	3.26	8	24.8	2.64	22.8	2.52	8	5.7	0.78	5.2	1.16	8	5.4	0.94	5.3	0.85
17	4	24.2	3.20	25.1	3.57	4	23.8	2.88	25.2	1.50	4	5.7	1.15	5.1	1.27	4	4.9	1.15	5.0	0.15
18	4	24.2	3.20	22.6	4.50	4	23.8	2.88	24.0	1.58	4	5.7	1.15	5.2	0.81	4	4.9	1.15	5.0	0.85

¹Pre: Promedio preinfección.

²PI: Promedio posinfección.

³DE: Desviación estándar.

^{a, b}: valores con distinta literal por fila son diferentes ($P < 0.05$).

Evaluación seminal

La evaluación de los eyaculados se realizó por un periodo de 33 semanas (13 previas y 20 pi), no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en el volumen promedio de los eyaculados analizados, el valor se mantuvo en promedio en 155.81 ml. El porcentaje de motilidad disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en la segunda semana pi, de 88.8 a 86.2%, posteriormente no se presentó ningún efecto negativo.

La concentración espermática promedio disminuyó drásticamente, mostrando marcadas diferencias ($P < 0.05$) en las 10 primeras semanas pi, en las semanas 11, 12 y 17 se muestra sin diferencias con respecto a la evaluación previa, de la semana 13 a la 16 nuevamente disminuye y finalmente de la 18 a la 20. La concentración espermática disminuyó un 63.9% comparado con los valores promedio obtenidos previo a la infección, el efecto individual de la concentración espermática en los verracos se presenta en la figura 5.3.1.

El porcentaje de espermatozoides vivos no se vio afectado negativamente, sin embargo si se presentan diferencias ($P < 0.05$) entre los promedios de las evaluaciones, encontrando una mayor cantidad de células vivas a las 7, 11-14, 17 y 18 semanas pi. De la misma forma, el porcentaje de anomalías espermáticas se vio disminuido significativamente ($P < 0.05$), no se encontraron valores superiores comparado con el periodo previo a la infección.

El grado de aglutinación se incrementó en dos semanas pi, encontrando diferencias ($P < 0.05$) en la semana 4 y 13 pi. Los valores promedio de cada evaluación se muestran en los cuadros 5.3.1. y 5.3.2.

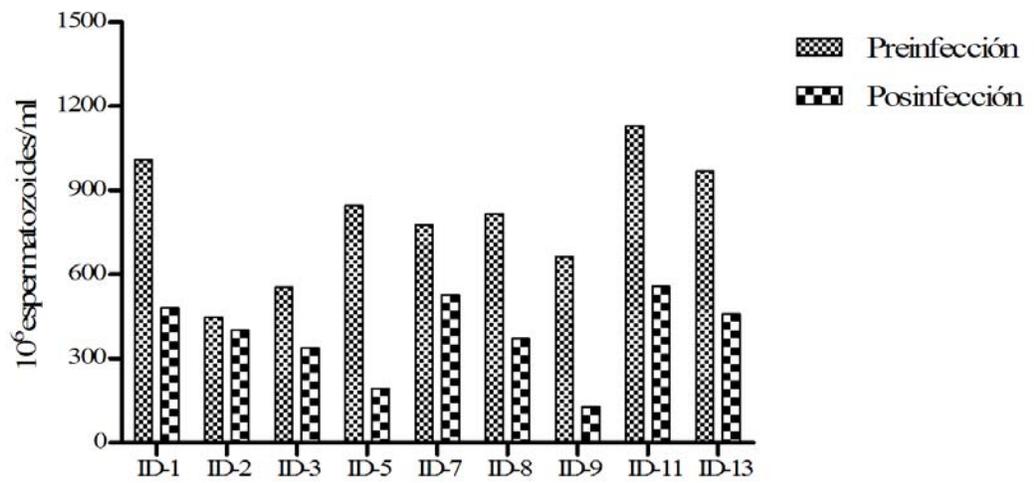


Figura 5.3.1. Promedio de la concentración espermática individual previo y posterior a la infección con el RVP.

Cuadro 5.3.1. Análisis comparativo de los promedios de volumen, motilidad y concentración espermática grupal durante la fase experimental.

Semana	Volumen (ml)					Motilidad (%)					Concentración (10 ⁶ Spz/ml)				
	<i>n</i>	Pre ¹	DE ³	PI ²	DE	<i>n</i>	Pre	DE	PI	DE	<i>n</i>	Pre	DE	PI	DE
1	4	170.6	34.69	162.5	35.00	4	83.3	3.04	86.2	7.50	4	950.5 ^a	146.35	406.2 ^b	186.88
2	8	155.6	36.49	153.7	43.32	9	88.8 ^a	4.17	86.2 ^b	7.50	9	801.2 ^a	220.43	474.4 ^b	203.84
3	9	161.3	38.22	126.6	44.79	9	88.8	4.16	85.0	5.00	7	752.0 ^a	209.60	409.2 ^b	194.43
4	9	161.3	38.22	147.5	39.33	9	88.8	4.16	83.3	5.73	9	801.2 ^a	220.43	333.8 ^b	210.89
5	7	165.4	41.48	160.0	52.68	9	88.8	4.16	83.3	5.59	9	801.2 ^a	220.43	245.5 ^b	165.63
6	9	161.3	38.22	149.1	43.41	9	88.8	4.16	85.0	7.91	9	801.2 ^a	220.43	295.0 ^b	164.34
7	9	161.3	38.22	152.7	77.54	9	88.8	4.16	84.4	9.82	9	801.2 ^a	220.43	327.2 ^b	182.21
8	8	155.1	35.69	143.7	50.12	9	88.8	4.16	88.3	5.59	9	801.2 ^a	220.43	377.7 ^b	172.32
9	9	161.3	38.22	160.0	36.14	9	88.8	4.16	85.0	10.0	5	849.7 ^a	258.71	362.0 ^b	179.12
10	8	159.4	40.38	155.6	47.17	4	80.7 ^a	3.55	88.7 ^b	2.50	8	775.2 ^a	220.39	362.5 ^b	248.58
11	ND	ND	-	ND	-	7	83.0	3.99	83.5	4.76	7	769.2	237.34	427.1	265.86
12	4	160.9	46.55	181.7	57.84	8	82.9	3.71	86.2	5.18	8	775.2	220.39	621.8	471.12
13	ND	ND	-	ND	-	7	83.0	3.99	87.1	3.93	7	769.2 ^a	237.34	425.7 ^b	281.93
14	ND	ND	-	ND	-	7	83.0	3.99	87.1	5.67	7	769.2 ^a	237.34	476.4 ^b	256.01
15	ND	ND	-	ND	-	4	82.4	4.05	86.2	4.79	4	826.5 ^a	237.49	353.7 ^b	129.64
16	4	149.4	48.39	136.7	90.99	4	82.4	4.05	88.7	4.79	4	826.5 ^a	237.49	388.7 ^b	122.16
17	ND	ND	ND	ND	-	4	82.4	4.05	90.0	7.07	4	826.5	237.49	415.0	152.48
18	4	149.4	48.39	137.5	65.89	4	82.4	4.05	87.5	2.89	4	826.5 ^a	237.49	232.5 ^b	93.14
19	ND	ND	ND	ND	-	4	82.4	4.05	85.0	4.08	4	826.5 ^a	237.49	352.5 ^b	170.90
20	4	149.4	48.39	173.7	93.40	ND	ND	ND	ND	ND	4	826.5 ^a	237.49	341.2 ^b	203.61

¹Pre: Promedio preinfección.

²PI: Promedio posinfección.

³DE: Desviación estándar.

^{a, b}: valores con distinta literal por fila son diferentes ($P < 0.05$).

Cuadro 5.3.2. Análisis comparativo de los promedios del porcentaje de espermatozoides vivos, anomalías y grado de aglutinación espermática grupal durante la fase experimental.

Semana	Espermatozoides vivos (%)				Anormalidades espermáticas (%)				Grado de aglutinación						
	<i>n</i>	Pre	DE	PI	DE	<i>n</i>	Pre	DE	PI	DE	<i>n</i>	Pre	DE	PI	DE
1	9	79.9	2.35	75.1	11.47	8	3.4 ^a	0.97	0.8 ^b	0.32	3	1.5	0.15	1.3	0.58
2	8	80.2	2.35	75.5	8.21	8	3.8 ^a	0.78	2.1 ^b	1.10	7	1.4	0.29	1.1	0.38
3	9	79.9	2.35	80.6	8.77	8	3.4 ^a	1.00	1.3 ^b	0.57	7	1.4	0.23	1.7	0.76
4	4	80.3	2.81	80.0	4.49	5	3.6 ^a	1.14	1.5 ^b	0.99	9	1.4 ^a	0.26	1.9 ^b	0.53
5	6	80.4	2.74	79.6	9.98	5	3.6	0.83	2.7	3.37	7	1.4	0.23	1.5	0.79
6	9	79.9	2.35	81.6	6.15	9	3.5 ^a	0.99	1.8 ^b	1.94	8	1.4	0.22	1.6	0.92
7	9	79.9 ^a	2.35	85.8 ^b	3.37	8	3.5	1.06	3.3	6.42	7	1.3	0.29	1.7	0.49
8	9	79.9	2.35	81.3	7.60	8	3.6 ^a	1.03	1.8 ^b	1.09	7	1.4	0.29	1.2	0.49
9	8	80.2	2.35	82.7	13.04	8	3.8	0.78	3.1	2.63	7	1.3	0.27	1.2	0.49
10	8	80.0	2.50	86.3	8.88	7	3.9	0.76	2.9	3.08	3	1.5	0.10	2.3	1.15
11	7	79.4 ^a	1.94	85.6 ^b	4.60	7	3.4	1.04	2.4	2.01	3	1.5	0.16	1.3	0.58
12	6	78.8	1.37	83.2	16.76	4	3.0	1.15	1.3	0.85	6	1.4	0.25	1.8	0.41
13	7	79.4 ^a	1.94	91.0 ^b	3.75	7	3.6	1.11	2.2	2.34	5	1.4 ^a	0.26	2.0 ^b	0.00
14	6	79.6 ^a	1.96	87.2 ^b	6.74	6	3.9 ^a	0.83	1.1 ^b	0.54	6	1.4	0.23	1.5	0.55
15	6	79.6	1.96	84.0	4.47	6	3.9	0.83	2.5	2.44	4	1.4	0.30	1.7	0.96
16	3	79.7	2.83	88.1	2.02	3	4.3	0.39	5.2	7.12	4	1.4	0.30	2.0	0.82
17	4	79.8 ^a	2.31	90.8 ^b	4.19	4	4.1 ^a	0.57	1.1 ^b	0.24	4	1.4	0.30	2.2	0.96
18	3	79.9 ^a	2.81	87.5 ^b	1.32	3	3.9	0.54	2.1	0.99	3	1.3	0.27	2.0	1.00
19	ND	ND	-	ND	-	2	3.9	0.76	5.1	0.18	4	1.4	0.30	1.50	0.58
20	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	-

¹Pre: Promedio preinfección.

²PI: Promedio posinfección.

³DE: Desviación estándar.

^{a, b}: valores con distinta literal por fila son diferentes ($P < 0.05$).

Necropsia y lesiones macroscópicas

Se realizó la necropsia de los verracos en cuatro grupos, se detectaron lesiones en los tres grupos de animales infectados. Dos animales (ID-1, 64dpi, ID-2, 110dpi) presentaron formaciones granulomatosas a nivel de epidídimo, el verraco ID-5 presentó una marcada disminución de tamaño del testículo izquierdo (Cuadro 5.4.1). El verraco ID-T no presentó lesiones macroscópicas.

Serología

Inhibición de la hemaglutinación. Se comprobó la seroconversión en todos los animales infectados. A partir de la segunda semana pi se identificaron anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación a título de $2.85 \log_2$ en promedio para el grupo, alcanzando su máximo pico en la novena semana ($5.0 \log_2$), posteriormente se conservan estables formando una meseta (Fig. 5.5.1).

Virus seroneutralización. Los anticuerpos neutralizantes contra el RVP fueron detectados al mismo tiempo que los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, el título obtenido fue de $4.33 \log_2$ en promedio en la segunda semana pi, casi el doble que en IHA. Se alcanzó un primer pico a las seis semanas ($6.89 \log_2$), el título se mantuvo hasta la semana 19 en donde ocurrió un repunte importante ($8.25 \log_2$), la curva de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y neutralizantes se muestra en la figura 5.5.1. Las muestras de suero del animal ID-T permanecieron sin respuesta de anticuerpos durante todo el experimento.

Cuadro 5.4.1. Lesiones macroscópicas observadas en los verracos sacrificados a diferentes intervalos posinfección.

Grupo	Dpi	Cerdos con lesión	Sitio de la lesión	Tipo de lesión
1	64	1 (ID-1)	Cabeza de epidídimo izquierdo	Nódulos con contenido caseoso
2	110	1 (ID-2)	Túnica Cola y cabeza epidídimo izquierdo	Líquido seroso Nódulos con contenido caseoso
3	142	1 (ID-5)	Testículo izquierdo	Disminución del tamaño Degeneración del parénquima testicular
3	142	1 (ID-8)	Estómago	Úlcera

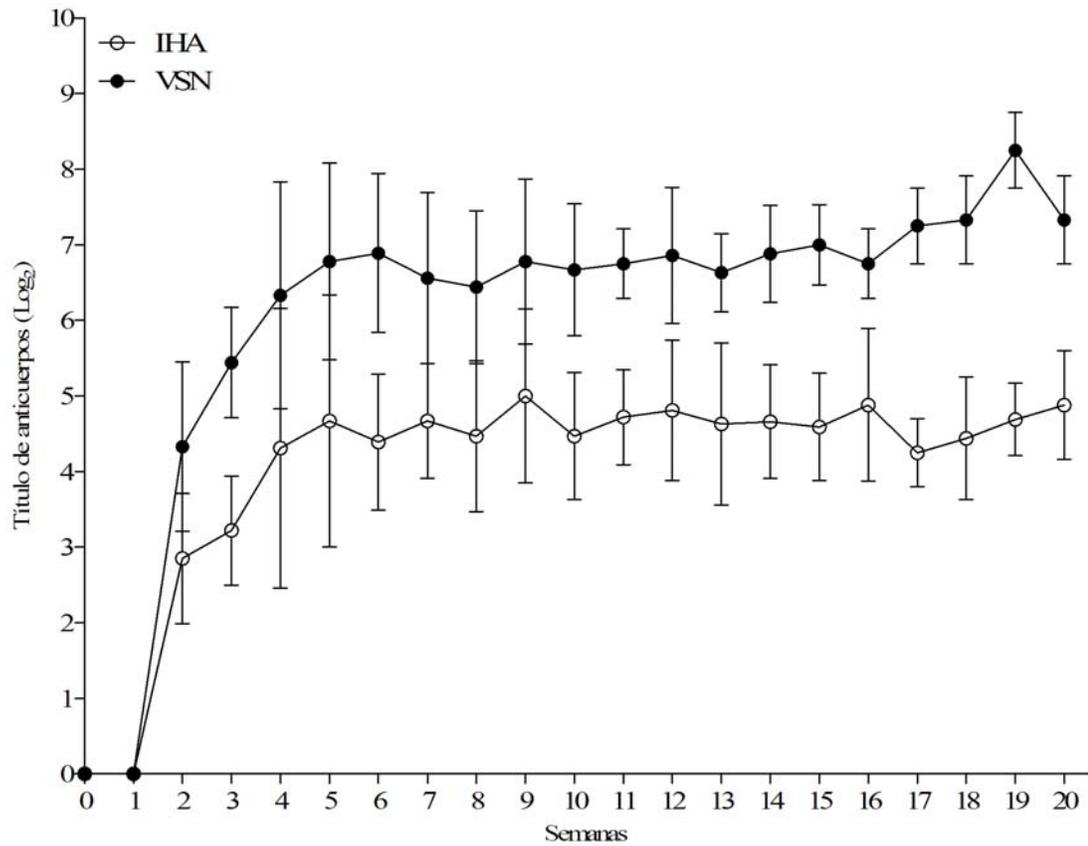


Figura 5.5.1. Seroconversión demostrada por IHA y VSN para el RVP. Los puntos claros representan el título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, los puntos oscuros representan el título de anticuerpos neutralizantes, cada punto incluye su respectiva desviación estándar.

Aislamiento viral

Semen. Se logró el aislamiento del RVP en muestras de semen, se analizaron un total de 74 muestras de los nueve animales infectados, ocho muestras (10.81%) resultaron positivas, de las cuáles, tres resultaron positivas desde el primer pase en cultivo celular y el restante hasta el segundo pase (Fig. 5.6.1). La distribución de las muestras positivas (62.5%) fue más elevada en los primeros 14 días. Los resultados obtenidos por HA resultaron confusos y no se lograron registrar valores francamente positivos en las muestras.

Por IFID se detectó aislamiento positivo a partir del quinto día pi y hasta el día 48 pi en semen del verraco ID-8, en los demás positivos (ID-1, 2, 5, 7 y 13), osciló entre el día 8 y 29 pi. En los animales ID-3, 9 y 11 no se pudo evidenciar virus con capacidad infectante en cultivo celular en ninguna de las muestras, los resultados completos se detallan en el cuadro 5.6.1.

Muestras de órganos. El aislamiento viral evidenciado por HA e IFID resultó positivo en siete de los nueve animales infectados. Se encontraron muestras positivas en los tres grupos de verracos sacrificados (Fig. 5.6.2), los aislamientos fueron más frecuentes en epidídimo, sin embargo, al menos una muestra resultó positiva en todos los tipos de tejidos analizados (testículos, cola y cabeza de epidídimo). El animal del primer grupo fue positivo (ID-1; 64 dpi), del segundo grupo los positivos fueron los verracos ID-8, 9 y 13 (110 dpi), del tercer grupo (142 dpi) se logró aislar al RVP en tres (ID-3, 7 y 11) de cuatro animales analizados (Cuadro 5.6.2), los animales ID-2, ID-5 e ID-T resultaron negativos.

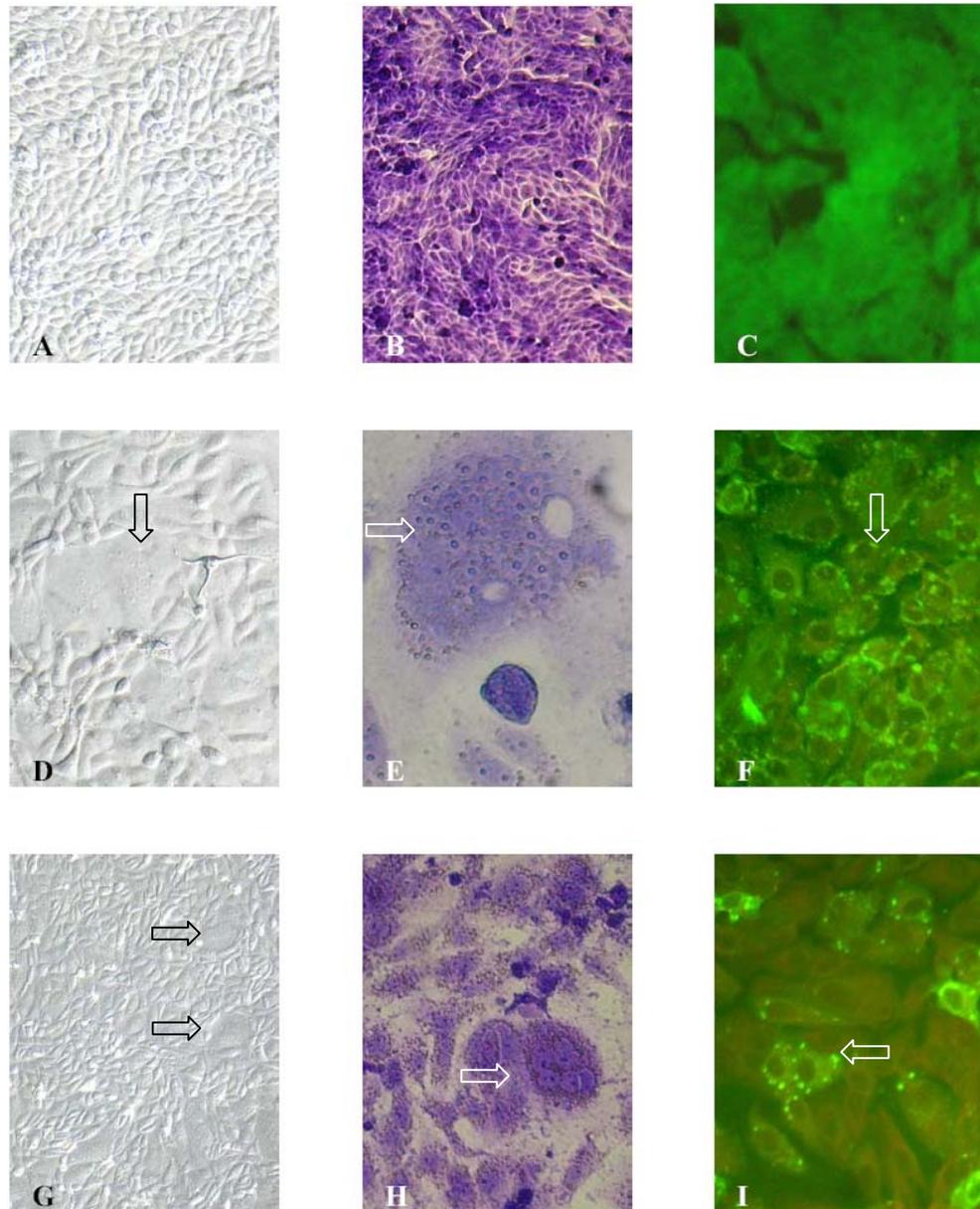


Figura 5.6.1. Aislamiento del RVP en células MDCK. Primera columna: observación del efecto citopático mediante contraste de fases. Segunda columna: presencia de sincitios, tinción con cristal violeta. Tercera columna: gránulos intracitoplasmáticos fluorescentes, IFID (A, B y C: Control de células sin infectar. D, E y F: Control células RVP positivas. G, H e I: Muestra de semen positiva ID-2; 14 dpi).

Continuación.

DPI	51	55	56	57	58	61	62	64	65	67	69	72	75	76	77	79	86	89	90	91	93	97	100	104	105	114	118	128	131	142
SPI	8		9			10			11			12		13		14		15		17		18		20						
ID	Muestra/prueba																													
1	Semen/RT-PCR			-				+	*																					
	Suero/RT-PCR	-						+																						
	Semen/AV-IFID							-																						
2	Semen/RT-PCR			-																						-	*			
	Suero/RT-PCR	-						ND																						
	Semen/AV-IFID			ND			ND							ND			ND								ND					
3	Semen/RT-PCR		-																											
	Suero/RT-PCR	-						ND																						
	Semen/AV-IFID		ND				ND							ND			ND								ND		ND		ND	ND
5	Semen/RT-PCR			-					+	+																				
	Suero/RT-PCR	-						ND																						
	Semen/AV-IFID						ND																							
7	Semen/RT-PCR		-																											
	Suero/RT-PCR	-						ND																						
	Semen/AV-IFID		ND				ND						ND				ND							ND		ND		ND	ND	
8	Semen/RT-PCR			-																							*			
	Suero/RT-PCR	-						ND																						
	Semen/AV-IFID						ND							ND			ND							ND		ND		ND	ND	
9	Semen/RT-PCR		-																								*			
	Suero/RT-PCR	-						ND																						
	Semen/AV-IFID		ND				ND							ND			ND							ND		ND		ND	ND	
11	Semen/RT-PCR			-																										
	Suero/RT-PCR	-						ND																						
	Semen/AV-IFID			ND			ND							ND			ND							ND		ND		ND	ND	
13	Semen/RT-PCR		-																								*			
	Suero/RT-PCR	-						ND																						
	Semen/AV-IFID		ND				ND							ND			ND							ND		ND		ND	ND	

+¹IFID positiva en primer pase en cultivo celular MDCK. +²IFID positiva en segundo pase en cultivo celular MDCK. ND: no determinado.

*animal sacrificado

ND: no determinado

Cuadro 5.6.2. Aislamiento del RVP a partir de testículos y epidídimos de los verracos infectados experimentalmente.

ID	1	2	8	9	13	3	5	7	11
Día de sacrificio	<i>64</i>		<i>110</i>				<i>142</i>		
Testículo derecho	+ ³	-	+ ²	-	-	+ ²	-	-	-
Testículo izquierdo	+ ²	-	-	-	+ ²	-	-	-	-
Cola de epidídimo derecha	+ ²	-	-	-	-	-	ND	+ ³	+ ³
Cola de epidídimo izquierda	-	-	-	-	+ ³	-	ND	-	-
Cabeza de epidídimo derecha	-	-	-	-	+ ²	-	ND	-	-
Cabeza de epidídimo izquierda	-	-	-	+ ²	+ ³	+ ³	ND	-	-

+²IFID positiva en segundo pase en cultivo celular MDCK. +³IFID positiva en tercer pase en cultivo celular MDCK. ND: no determinado.

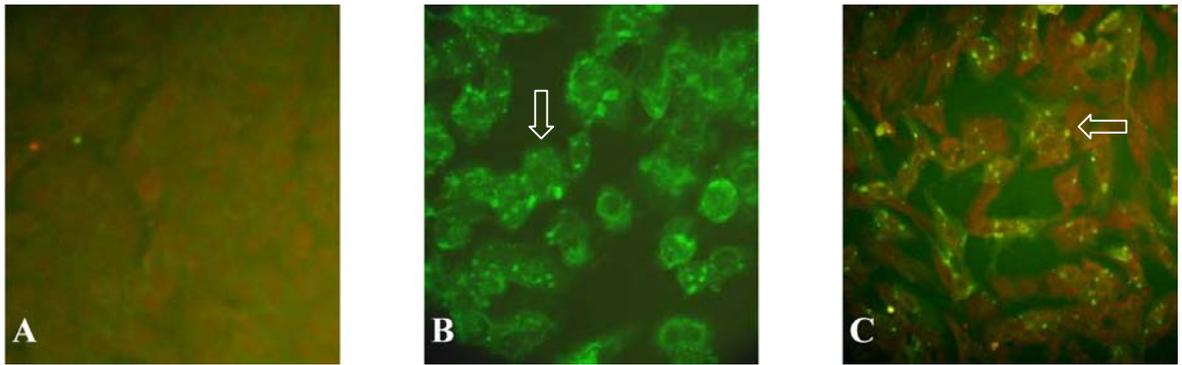


Figura 5.6.2. Inmunofluorescencia indirecta para detectar el RVP en cultivos de células MDCK a partir de muestras de tejidos. A: Control sin infectar. B: Control RVP positivo. C: Inoculo, macerado de cabeza de epidídimo derecho, verraco ID-13 (110dpi).

RT-PCR

En las muestras de suero sanguíneo, se pudo detectar el ARN del RVP a partir del segundo día y hasta el día 64 pi, la proporción de muestras positivas fue del 8.8% (11/125), sólo se detectaron tres animales positivos (ID-1, 5 y 11). La distribución de las muestras positivas fue más amplia en las primeras siete semanas pi, encontrando 10 de los 11 sueros (Fig. 5.7.1), únicamente el animal ID-1 presentó una muestra positiva el día 64 pi (Fig. 5.7.3). No se detectaron sueros positivos en los animales ID-2, 3, 7, 8, 9 y 13 (cuadro 5.6.1).

El ARN del RVP fue detectado en muestras de semen de todos los animales. Se encontraron muestras positivas a partir del segundo día y hasta los 142 pi, la proporción de muestras positivas por animal fue variable (Fig. 5.7.2), para los animales ID-2, 3, 9 y 13 sólo fue detectado en una muestra (entre el día 13 y 23 pi). En general, la mayoría de las muestras positivas (82.75%) se distribuyen en las primeras siete semanas pi, excepto el verraco ID-1 el cual presentó una muestra positiva el día 64 pi y el verraco ID-5 en el que se detectó hasta los días 67, 69, 97 y 142 pi (Fig. 5.7.3), los resultados completos se observan en el cuadro 5.6.1. El animal ID-T fue negativo en suero y semen.

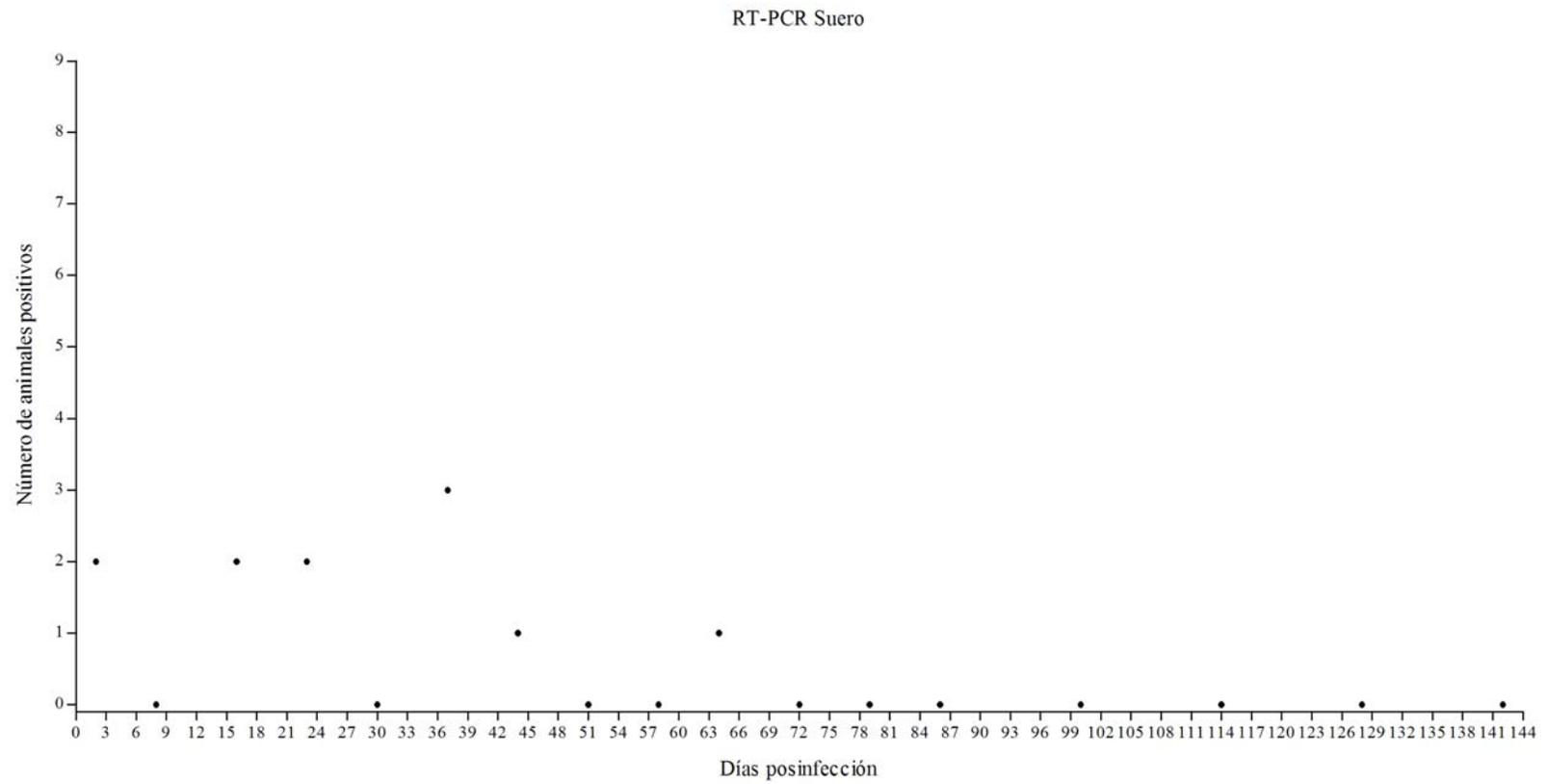


Figura 5.7.1. Distribución de muestras de suero analizadas por RT-PCR para el RVP.

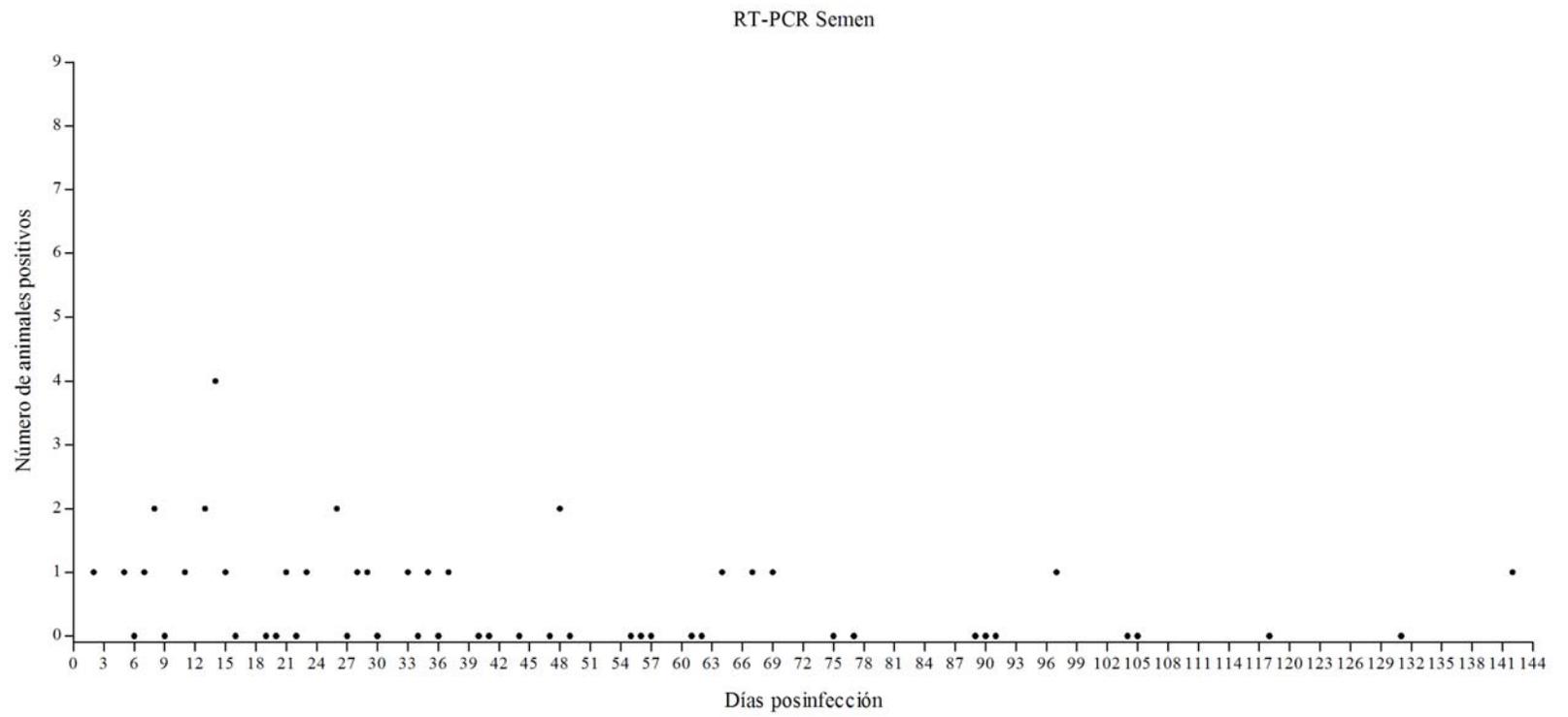


Figura 5.7.2. Distribución de muestras de semen analizadas por RT-PCR para el RVP.

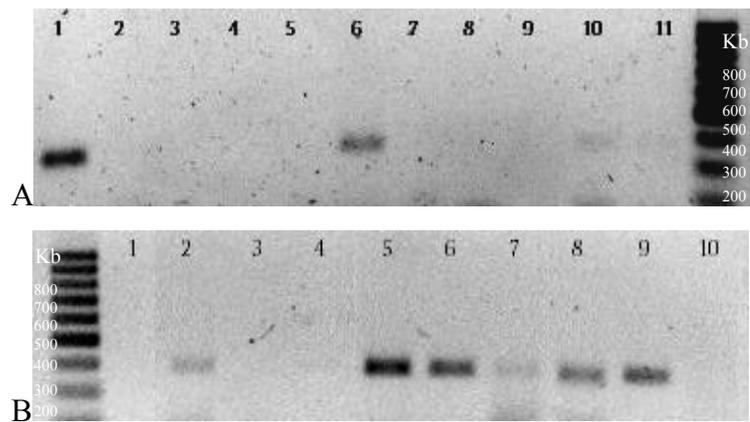


Figura 5.7.3. Electroforesis de productos de RT-PCR del RVP en gel de agarosa al 2%. A) Productos amplificados a partir de muestras de suero. Carril 1: ID-1. 2: ID-2. 3: ID-3. 4: ID-7. 5: ID-8. 6: ID-5. 7: ID-9. 8: ID-11 (carril 1 al 8 a 2 dpi). 9: ID-T. 10: ID-1 a 64 dpi. 11: control negativo. B) Productos amplificados a partir de muestras de semen. Carril 1: control negativo. 2: ID-1 a 23 dpi (AV+). 3: ID-2 a 5 dpi. 4: ID-T. 5: ID-5 a 8 dpi (AV+). 6: ID-5 a 37 dpi. 7: ID-5 a 142 dpi. 8: ID-7 a 13 dpi (AV+). 9: ID-8 a 5 dpi (AV+). 10: control negativo.

7. DISCUSIÓN

La enfermedad del ojo azul en porcinos ha sido identificada como un padecimiento que afecta de forma contundente la reproducción de los cerdos. Las alteraciones más importantes en los machos adultos se localizan en el tracto reproductor y se asocian con una baja en la calidad seminal. La viremia del RVP se ha detectado en un periodo corto durante la infección aguda asociado a células sanguíneas, el aislamiento viral a partir de suero sólo se ha realizado durante los primeros días de la infección. La distribución del RVP en semen se ha comprobado mediante el aislamiento viral durante la fase aguda de la enfermedad, sin embargo, no se conocía si el ARN del RVP podía estar presente en la infección durante periodos prolongados en suero y semen de verracos infectados experimentalmente. El RVP ha sido identificado en tejidos del tracto reproductor durante periodos prolongados, bajo las condiciones de algunos estudios no había sido posible el aislamiento a partir de dichas muestras.

La primera descripción de la EOA se realizó en 1981, sin embargo las manifestaciones clínicas en verracos fueron detectadas hasta finales de esa década, las primeras observaciones detallaban alteraciones tales como orquitis, epididimitis y baja en la calidad seminal (Campos & Carvajal, 1989; Stephano *et al.*, 1990). Bajo condiciones experimentales, Ramírez-Mendoza *et al.* (1997), lograron reproducir el cuadro clínico previamente reportado, además pudieron describir con mayor detalle las lesiones a nivel macro y microscópico, generando conocimientos que en la actualidad son básicos acerca de la patogenia del RVP en el macho porcino. Posteriormente fue descrita la respuesta inmune frente al RVP en la infección en machos adultos (Hernández *et al.*, 1998). Hasta el momento no se tenía conocimiento acerca de la persistencia del RVP en semen.

La infección experimental del RVP en los animales estudiados no generó alteraciones clínicas durante los primeros días posinfección, contrario a lo reportado por Ramírez-Mendoza *et al.* (1997), los cuales encontraron signos como anorexia, conjuntivitis y fiebre en los primeros tres días pi (Ramírez, 1998).

Las alteraciones a nivel de tracto genital se pudieron observar a partir del quinto día pi, dichos cambios consistieron en aumento del tamaño testicular y epididimario.

El aumento del tamaño testicular pudo observarse en seis de los nueve animales infectados (66.6%), reportes previos indican que la orquitis se había presentado en un 25% en la infección experimental (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997), lo anterior indica que existió un aumento en la susceptibilidad de los verracos frente a esta condición. La presentación de la orquitis fue de manera unilateral, afectando el testículo izquierdo con mayor frecuencia (83.3%). Sólo un verraco (11.1%) presentó atrofia testicular, comparado con un 25% reportado por Ramírez-Mendoza *et al.* (1997).

El RVP está estrechamente relacionado con el virus de la parotiditis en humanos y las manifestaciones clínicas son muy similares, por tal motivo se hace la comparación con respecto a los hallazgos descritos en el presente trabajo.

En la infección por el MuV en humanos, la orquitis se presenta hasta en un 30% de los pacientes afectados, la condición se manifiesta en los primeros seis a 11 días del periodo de incubación. La presentación unilateral se observa en el 70-85% de los casos y la atrofia testicular puede observarse en un 40-70% de los pacientes (Gupta *et al.*, 2005; Hviid *et al.*, 2008).

Las alteraciones a nivel de epidídimo fueron más contundentes, todos los animales presentaron aumento de tamaño o presencia de zonas firmes en cabeza o cola de epidídimo, dichas alteraciones comenzaron a notarse al noveno día pi, en promedio los animales se recuperaron al día 81 pi. Sólo un animal presentó aumento de tamaño hasta los 114 días pi. Esta observación es similar a la realizada por Ramírez-Mendoza *et al.* (1997) y Espinosa (2001), por lo cual se confirma que la epididimitis es una alteración que se presenta de manera constante en cerdos infectados experimentalmente. A nivel de campo, dicha alteración podría pasar desapercibida, ya que la inspección de la integridad epididimaria no es una práctica habitual en las postas porcinas.

En el caso de la epididimitis humana provocada por el MuV, se ha reportado que el comienzo de los síntomas es alrededor del día 14 pi, la condición es comúnmente observada y se ha asociado a disminución o pérdida de la fertilidad en hombres pospúberes infectados (Wharton *et al.*, 2006; Hviid *et al.*, 2008).

La medición cuantitativa de las alteraciones a nivel testicular mostraron marcadas diferencias ($P < 0.05$), presentando un aumento de la longitud del testículo izquierdo en las dos primeras semanas pi. El diámetro se vio afectado de la misma forma y se observó un aumento ($P < 0.05$) desde la primera hasta la tercera semanas pi. Los datos obtenidos coinciden con lo reportado por Espinosa (2001), además, confirman las observaciones realizadas a través de la evaluación clínica. Sólo un animal presentó atrofia testicular, la disminución en la longitud y diámetro del testículo izquierdo se confirmó a la necropsia.

El análisis grupal de la evaluación seminal mostró que hay una disminución significativa ($P < 0.05$) en la concentración espermática en las primeras 10 semanas pi y en las semanas 13 a 16 y 18 a 20. En las semanas 11, 12 y 17 no se observaron diferencias comparado con la evaluación previa a la infección. Espinosa (2001) y Solís *et al.* (2007) observaron una disminución en la concentración espermática a partir de la segunda semana pi, manteniéndose baja hasta la novena semana posinfección. Ramírez (1998), detectó disminución en la concentración a los 21 días pi, llegando a observar azoospermia en una animal a los 30 días pi. Lo anterior confirma que la disminución en la concentración espermática es una característica que se presenta de forma constante en los verracos infectados experimentalmente.

La motilidad disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en la semana dos pi, posteriormente este valor no se altera negativamente. En otros experimentos se ha observado que la motilidad se ve seriamente afectada a lo largo de la infección, encontrando reducción de la motilidad hasta los 46 días pi (Espinosa, 2001). Solís *et al.* (2007), observaron marcados efectos individuales, encontrando en un animal motilidad nula al día 25 pi, en la presente investigación no se observaron efectos que puedan confirmar

que la motilidad sea un parámetro que se vea relacionado en su totalidad a la infección por el vEOA.

El porcentaje de espermatozoides vivos y anormalidades no se vieron afectados negativamente. Los datos obtenidos en el presente estudio no coinciden con los reportado previamente (Espinosa, 2001; Solís *et al.*, 2007), ya que en otros experimentos estos parámetros analizados en cada verraco habían sido afectados negativamente, llegando a observar efectos individuales marcados, los cuales al ser analizados de forma grupal perdían valor estadístico. El volumen no se vio disminuido en el eyaculado de los verracos analizados, esta misma observación se había realizado con anterioridad, ya que aparentemente, las glándulas accesorias no resultan con daños que comprometan su función (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Espinosa, 2001; Solís *et al.*, 2007).

Bajo las condiciones en las que fue desarrollada la presente investigación se puede confirmar que existe una baja en la calidad seminal de los verracos infectados con el RVP, el valor que se ve afectado principalmente es la concentración espermática, sin embargo, existe un periodo en que la concentración retorna a los valores normales, aunado a esto otros parámetros evaluados no se ven afectados, esto indica que en condiciones prácticas, si no se tiene un programa adecuado y constante de evaluación andrológica de los verracos, estos parámetros podrían pasar desapercibidos, ya que en algunos casos, estos pueden ser efectos individuales.

En la infección por el MuV, se ha reportado disminución en la concentración espermática y de la motilidad, la cual se manifiesta en el 13% de los pacientes que cursaron con orquitis bilateral y en un 25% de los pacientes que cursaron con atrofia testicular (Gupta *et al.*, 2005; Wharton *et al.*, 2006; Hviid *et al.*, 2008).

La inspección macroscópica a la necropsia, reveló daños importantes a nivel genital en tres verracos. El verraco ID-1 (necropsia a 64 dpi) e ID-2 (a 110 dpi) presentaron formaciones granulomatosas a nivel epididimario, además este último, presentó líquido

seroso en túnica albugínea en cantidad moderada, estos hallazgos son similares a los encontrados por otros autores, los cuales observaron la presentación del granuloma en 42.8% de los verracos a los 49 días pi (Hernández, 1997), 37.5% a los 30 días pi (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997), 100% a los 80 días pi (Ramírez, 1998) y 60% a los 65 días pi (Espinosa, 2001), en el presente estudio se observó este patrón en un 22.2% de los verracos. Considerando la duración del experimento y los tiempos en los que se sacrificaron a los verracos, se puede observar que las lesiones a nivel de epidídimo permanecen por periodos prolongados y es una condición que no se resuelve por lo menos hasta los 110 días pi.

La atrofia testicular se presentó en un caso, el verraco ID-5 (necropsia a 142 dpi), mostró una reducción cercana al 50% del testículo izquierdo comparado con el derecho, esta misma lesión se había presentado en estudios realizados previamente (Hernández, 1997; Ramírez *et al.*, 1997). La atrofia testicular sólo se ha reportado en un 11.1%, en la infección causada por el MuV, se ha descrito que el daño se puede observar en el 40-70% de los pacientes que han desarrollado orquitis (Gupta *et al.*, 2005).

La presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IHA) y de anticuerpos neutralizantes se pudo detectar en la segunda semana pi, obteniendo títulos de 2.85 y 4.33 \log_2 , respectivamente, los títulos de anticuerpos aumentan conforme transcurren los días de infección, hasta llegar al pico máximo a la novena semana, para los anticuerpos IHA (5.0 \log_2) y a la sexta semana (6.89 \log_2) para los anticuerpos neutralizantes.

Hernández *et al.* (1998), detectaron anticuerpos neutralizantes desde la primera semana pi (4 \log_2), llegando a observar títulos de 8.5 \log_2 a la quinta semana pi, al finalizar el experimento (siete semanas) no se logra establecer una meseta, por lo cual este comportamiento queda como una incógnita. En el presente estudio se observa que si existe un límite de producción de anticuerpos neutralizantes y se forma una meseta, misma que permanece sin alteraciones importantes hasta las 18 semanas pi. Los mismos autores reportan que los anticuerpos IHA se presentan hasta la segunda semana pi (5 \log_2) y tienen

un comportamiento de meseta a partir de la tercera semana pi, este comportamiento fue similar a lo encontrado en la presente investigación.

Ramírez (1998), reporta la presencia de anticuerpos neutralizantes a partir del décimo día pi ($2.0 \log_2$), alcanzando la máxima producción a la sexta semana pi ($10 \log_2$). Espinosa (2001), detecta anticuerpos IHA a partir de los nueve días pi ($4.66 \log_2$), el pico máximo lo reporta a la semana nueve pi ($7.6 \log_2$), los títulos de anticuerpos son más elevados a los encontrados en este estudio, sin embargo, tienen el mismo comportamiento y se mantienen hasta la finalización del experimento (65 dpi). Los datos antes mencionados coinciden con lo descrito en la presente investigación, aún cuando los títulos de anticuerpos no sean tan elevados, la cinética en la respuesta humoral es similar.

Todos los animales tuvieron un comportamiento similar, sólo existió un verraco (ID-5), que mostró una mayor respuesta, presentando títulos de anticuerpos más elevados, comparado con el promedio grupal (datos no mostrados). La respuesta serológica fue constante en todos los animales, en investigaciones previas, se describió que los animales que presentaban lesiones en epidídimo (granuloma), montaban una mayor respuesta de anticuerpos en la fase aguda de la enfermedad, comparados con los verracos que no tuvieron ese tipo de lesión (Hernández, 1997). Contrariamente, Solís (2002), reporta en la infección experimental del RVP en verracos, que existen animales que no presentan anticuerpos en la fase aguda de la enfermedad y los primeros títulos se detectan hasta los días 31 y 56 pi, los animales que no reaccionaron en ese estudio correspondían a verracos con granuloma epididimario. Bajo las condiciones en las que se desarrolló la presente investigación, no se observó alguna relación entre el tipo de lesión y la respuesta serológica.

Recientemente, Cuevas *et al.* (2009), sugieren que la respuesta humoral que se presenta frente a la infección persistente por el RVP, al detectar la presencia del ARN del virus en los linfonodos, los autores suponen que el virus se encuentra en este mismo sitio y que esté interactúa continuamente con las poblaciones de linfocitos, promoviendo la

respuesta inmune celular y humoral de manera constante. Esta información respalda los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que la respuesta de anticuerpos IHA y neutralizantes, se mantiene aún en la fase crónica de la enfermedad y con títulos altos.

La presencia del virus en las muestras de semen, fue detectada por IFID, en 6/9 (66.6%) de los verracos infectados. La distribución de las muestras positivas inicia en el quinto día pi y finaliza el día 48 pi, observando una mayor proporción de muestras positivas (62.5%) en los primeros 14 días. El aislamiento viral se realizó empleando únicamente la fracción celular del eyaculado.

Solís (2002), al analizar la fracción espermática de eyaculados de verracos infectados experimentalmente, encontró muestras positivas al aislamiento, detectando hemaglutinación y cultivos positivos por IFID, hasta los 64 días pi en un primer pase en cultivo celular, al segundo pase en los cultivos, encuentra muestras positivas hasta los 49 días pi, el resultado puede estar influido por las características de las muestras analizadas. Bajo condiciones experimentales, en el presente estudio, se realizaron diversas pruebas para determinar el punto en que la fracción celular de los eyaculados no provocaba efecto tóxico a los cultivos, además de este efecto, se presenta hemaglutinación no específica al RVP en las muestras seminales, comportamiento observado cuando las muestras no son filtradas. Una vez consideradas estas condiciones, el procesamiento de las muestras de la fracción celular de los eyaculados fueron analizadas, los cultivos presentaron efecto citopático poco evidente, en la mayoría de las muestras la hemaglutinación no pudo determinarse de forma contundente, por esta razón no se incluyó como resultado en este estudio.

Solís *et al.* (2007), reportan títulos de 1:256 UHA al aislamiento en muestras de semen a los 38 días pi, cuando analizan la fracción plasmática y celular de la misma muestra, resultan negativas, lo que indica la poca sensibilidad de la prueba. Aún cuando los resultados son confirmados por IFID, la realización de la HA como prueba para evidenciar el RVP en cultivo celular, desde la perspectiva del presente estudio, no es recomendable.

Cabe mencionar, que títulos de 1:64 a 1:128 UHA, son ocasionalmente obtenidos al realizar lotes de antígeno viral del RVP.

En un estudio experimental realizado por Coba *et al.* (2006), emplearon 20 verracos para la evaluación de una vacuna contra el RVP, los animales fueron distribuidos en cuatro grupos de cinco machos cada uno, tras la vacunación se desafiaron con la cepa de referencia (LPM), en ningún grupo (controles sin vacunar y no desafiados, vacunados desafiados, vacunados sin desafiar y desafiados sin vacunar) se logró evidenciar el RVP en cultivo celular utilizando muestras de semen como inóculo, la duración del experimento fue de 121 días, lo anterior indica que la cepa de referencia (LPM) no tuvo la capacidad de excretarse en semen. Dicha capacidad podría estar relacionada directamente con la cepa involucrada, en el presente estudio la infección experimental se llevó a cabo con una cepa (PAC3) que se reconocía por su capacidad de generar daños a nivel testicular y epididimario en verracos.

Las muestras de la fracción celular de los eyaculados positivas al aislamiento, muestran una distribución variable e intermitente en los verracos infectados, además en tres animales no se logró el aislamiento en ninguna de las muestras analizadas. La sensibilidad de la prueba para detectar al RVP, puede considerarse baja, sin embargo, la posibilidad de poder observar la capacidad infectante del RVP en cultivo celular, refleja un resultado de gran relevancia, ya que esta capacidad infectante en los cultivos, se considera como un factor de alto riesgo en la diseminación del RVP en la reproducción de los porcinos.

El aislamiento viral, en las muestras de tejidos (testículos y epidídimos), fue positivo en el 77.7% de los verracos, se consiguió el reaislamiento en los tres tiempos de muestreo (64, 110 y 142 dpi). Cabe señalar que el presente estudio es el primero que reporta aislamiento viral positivo en un periodo prolongado de la infección por el RVP. El AV fue más frecuente en las muestras de epidídimo. Ninguna muestra con daños macroscópicos resultó positiva al AV, lo cual indica que los animales sin lesiones a nivel de tracto reproductor, se encuentran persistentemente infectados y que el virus puede ser

recuperado aún por periodos prolongados , esto, en condiciones de campo podría reactivar la excreción viral y presentarse nuevos brotes dentro de una población en donde se ha perpetuado la infección.

Ramírez (1998), logra detectar la capacidad HA del RVP en cultivo celular a partir de muestras de testículo y epidídimo a los 30 y 45 días pi , respectivamente. En cerdos de la raza pelón Mexicano, Ramírez *et al.* (1999), reportan resultados similares. Coba *et al.* (2006), evidencian al RVP por hemoadsorción en cultivos celulares (PK-15), a partir de macerados de testículo y epidídimo de verracos vacunados y desafiados y sin vacunar, hasta el día 121 pi.

Los resultados del presente estudio y los de reportes previos, confirman que existe persistencia del RVP en tejidos del tracto reproductor y que la capacidad infectante del virus es conservada, sin embargo, en otros estudios, se ha reportado la presencia del antígeno o el ARN del virus en epidídimo y testículo de verracos infectados experimentalmente, sin que haya sido posible el aislamiento.

Hernández (1997), encontró cuatro positivos de siete verracos originalmente infectados con el RVP cepa PAC-3, empleando la inmunofluorescencia directa (IFD) a partir de cortes de epidídimo al día 49 pi. Ramírez *et al.* (1997), detectaron el RVP por IFD en cortes de epidídimo (cabeza), desde el día 15 al 70 pi. Cuevas *et al.* (2009), detectaron el ARNm del RVP cepa LPM, en epidídimos de animales infectados experimentalmente, hasta los 277 días pi, en ninguno de estos estudio se logró el aislamiento del RVP, en el presente estudio, el empleo de la línea celular MDCK permitió que el virus presente en las muestras se multiplicará de una forma eficiente, haciendo posible su detección con las técnicas empleadas, hasta el momento no se había reportado que la línea celular MDCK fuera permisiva a la infección con el RVP y que esta fuera altamente susceptible.

La presencia del RVP en tejidos del tracto reproductor esta influenciada por la expresión de los receptores específicos (NeuAc α -2,3Gal), los cuales confieren el tropismo

celular y tisular (Reyes-Leyva *et al.*, 1997). Previamente, se ha demostrado que dichos receptores se encuentran de forma abundante en el tracto reproductor en los machos adultos (Vallejo *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en la detección del ARN del RVP en suero, muestran que sólo tres verracos presentaron muestras positivas, desde el segundo día hasta los 64 días pi. En los verracos ID-1 e ID-5 se observaron la mayor cantidad de muestras positivas. La viremia más prolongada (64 dpi) se detectó en el verraco ID-1, este mismo animal fue positivo al AV en tejidos en tres de seis muestras analizadas y a la necropsia presentó la lesión característica (granuloma epididimario) de la infección por el RVP. En el animal ID-5 se encontraron muestras de suero positivas por RT-PCR hasta los 44 días pi, este verraco presentó una mayor cantidad de muestras positivas por RT-PCR en semen y por el tiempo más prolongado (142 dpi). El tercer animal (ID-11) positivo en suero, sólo se detectó en una muestra, la cual corresponde al día 37 pi. Los datos obtenidos indican que la duración de la viremia, detectada por RT-PCR en suero, es prolongada y se presenta de forma intermitente. La identificación del ARN del RVP en suero, en la fase aguda de la enfermedad, pudo verse afectada por el tiempo de muestreo, el cual fue semanal.

No existen reportes que indiquen cual es la distribución del ARN en suero en la infección experimental o natural del RVP en cerdos, sin embargo, en la infección del MuV en humanos, se ha logrado detectar el ARN viral en suero hasta por seis meses en una paciente que cursó por una infección crónica de parotiditis, aún cuando la paciente presentaba anticuerpos neutralizantes contra el genotipo D, no fueron protectivos al genotipo A, cabe señalar que el caso fue aislado y no se han realizado estudios más extensos (Nöjd *et al.*, 2001).

La presencia de anticuerpos IHA y neutralizantes no impide la viremia, al menos en el 33.3% de los animales infectados. En un estudio realizado por Mercado (2003), logró aislar el RVP a partir de muestras de suero hasta los 11 días pi, el tiempo coincide con la

aparición de anticuerpos IHA, lo cual sugiere que la presencia de virus con capacidad infectante en cultivo celular, esta limitada por la producción de anticuerpos contra el virus.

La detección de la viremia en la infección experimental con el RVP, ha sido evaluada a través del análisis de las células sanguíneas. Hernández *et al.* (1998), indican que la viremia detectada por inmunofluorescencia en frotis sanguíneos de verracos, se presentó desde el día seis al 15 pi. En otro estudio, Reyes-Leyva *et al.* (2004), evidenciaron el RVP asociado a células sanguíneas por IFD, detectando muestras antígeno positivas, en eritrocitos de los cuatro a los 12 días pi y en leucocitos desde los 12 a 20 días pi, los autores indican que el virus deja de circular libremente en la sangre a partir de que los animales reaccionan produciendo un nivel de anticuerpos elevado.

En el caso del semen, se logró la detección del ARN del RVP en todos los verracos infectados. Las muestras fueron positivas a partir del segundo día hasta el 142 pi. El verraco ID-5 presentó un mayor número de muestras positivas, llegando a encontrarse semen positivo hasta la finalización del experimento. El 82.7% de las muestras positivas se presentó en los primeros 48 días pi. Cuatro verracos (ID-2, 3, 9 y 13), presentaron sólo una muestra positiva, la distribución fue del día 13 al 26 pi. Del total de muestras positivas por RT-PCR (29), únicamente el 27.5% de las muestras fue positiva al AV, esto puede indicar que, la cantidad de virus presente en la muestra no fue suficiente para ser detectado en el cultivo celular o bien, el virus no tenía capacidad infectante (partículas virales defectuosas) y solamente pudo ser detectado el ARN viral.

Los animales (ID-1 e ID-5) que presentaron mayor número de muestras positivas en semen, corresponden a los que tuvieron más muestras positivas en suero. Por otra parte, cuatro de los seis verracos que resultaron negativos en suero, sólo presentan una muestra positiva en semen y en dos casos (ID-2 e ID-13), esa muestra fue positiva al AV.

No existen trabajos en donde se haya intentado detectar el ARN del RVP en muestras de semen. Espinosa (2002), realizó un estudio en donde buscó la presencia del

RVP en muestras de semen, por medio de citometría de flujo y empleando anticuerpos anti-RVP, logró detectar espermatozoides antígeno positivos a partir del noveno día hasta el 39^{pi}, además demostró que el espermatozoide porcino contiene receptores específicos para el RVP (NeuAc α -2,3Gal).

Bajo las condiciones en las que se desarrolló el presente estudio, no fue posible diferenciar que tipo de células (espermatozoides o linfocitos), son las responsables de transportar o de diseminar el RVP en el semen.

En la infección del MuV en jóvenes pospúberes, ha sido posible detectar el ARN viral en las muestras de semen en periodos prolongados de la infección. Jalal *et al.* (2004), en un reporte de caso, encuentran semen positivo por RT-PCR en muestras de 14 y 40 días posterior a la presentación del cuadro clínico (orquitis), además asocian la presencia del MuV a una baja considerable en la calidad seminal y a los 84 días de presentado el cuadro, detectan anticuerpos anti-espermatozoides.

8. CONCLUSIONES

Se logró reproducir la EOA en verracos adultos. Las primeras manifestaciones clínicas se presentaron a los cinco días de infección, observando inicialmente aumento del tamaño testicular en el 66% de los verracos infectados, esta condición se generó de forma unilateral. A los 14 días, en promedio, se observaron alteraciones a nivel epididimario en la totalidad de los animales, lo cual confirma que la epididimitis es una alteración constante en la EOA en cerdos machos adultos.

El análisis de la calidad seminal, demostró que existe una disminución en la concentración y motilidad espermática. Valores como volumen, porcentaje de células espermáticas anormales y porcentaje de células vivas, no se vieron afectados.

La evaluación de los órganos del tracto genital a la necropsia, permitió detectar las lesiones características provocadas por el RVP en verracos. Logrando identificar daños hasta la finalización del experimento.

La respuesta humoral se presentó en la segunda semana posinfección, detectando anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y neutralizantes en todos los verracos infectados. La curva de producción de anticuerpos llegó a un pico máximo y se observó un comportamiento de meseta a lo largo de la infección experimental.

Se logró aislar el RVP en cultivo celular a partir de muestras seminales, observando cultivos positivos por inmunofluorescencia indirecta desde el día cinco hasta los 48 posinfección.

En las muestras de tejidos, se aisló el RVP en todos los grupos, encontrando muestras positivas hasta los 142 días posinfección.

La detección del genoma del RVP a partir de muestras de suero, se consiguió desde el segundo día, manteniéndose hasta los 64 días posinfección, sin embargo, únicamente el 33% de los verracos presentaron muestras positivas.

En las muestras de semen, se logró la detección del ARN del RVP en todos los verracos infectados, observando muestras positivas desde el segundo día hasta los 142 pi.

Con lo anterior, se confirma que el ARN del RVP persiste en semen de verracos infectados experimentalmente, por periodos prolongados de la infección, el aislamiento viral a partir de semen sólo fue posible en la fase aguda de la enfermedad. Se logró el aislamiento del virus en muestras de órganos del tracto genital hasta la finalización del experimento, los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que el RVP es capaz de persistir en la infección crónica y que el virus no es eliminado aún en presencia de anticuerpos neutralizantes, por lo tanto, los animales infectados persistentemente, son un factor de alto riesgo para diseminar la EOA en la población porcina, ya sea por contacto directo o a través del uso de semen contaminado en la practica de inseminación artificial.

9. ABREVIATURAS

PK-15: [*Porcine kidney*] Línea celular de riñón de cerdo

SOA: Síndrome del ojo azul

vSOA: Virus del síndrome del ojo azul

vLPM: Virus de La Piedad Michoacán

M: Proteína de matriz

P: Fosfoproteína

HN: Hemaglutinina-neuraminidasa

F: Proteína de fusión

NP: Nucleoproteína

L: Proteína de alto peso molecular

NDV: [*Newcastle disease virus*] Virus de la enfermedad de Newcastle

hPIV: [*Human parainfluenza virus*] Virus de la parainfluenza humana

MuV: [*Mumps virus*] Virus de la parotiditis

SV: [*Simian virus*] Virus símico

RVP: *Rubulavirus* porcino

IHA: Inhibición de la hemaglutinación

EOA: Enfermedad del ojo azul

LNM: Lechones nacidos muertos

LNT: Lechones nacidos totales

FPC: Fiebre porcina clásica

EA: Enfermedad de Aujeszky

PRRS: [*Porcine reproductive and respiratory syndrome*] Síndrome respiratorio y reproductivo porcino

PCVAD: [*Porcine circovirus associated diseases*] Enfermedades asociadas a la circovirus porcina

MPRV: Virus de Mapuera

MenPV: Virus de Menangle

TioPV: Virus de Tioman

nt: nucleótido

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

aa: Aminoácidos

SDS-PAGE: [*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*] electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

kDa: kiloDaltones

pI: Punto isoeléctrico

ST: [*Swine testicle*] Línea celular de testículo de cerdo

Pt: [*Porcine turbinate*] Línea celular de cornete porcino

MDBK: [*Madin-Darbin bovine kidney*] Línea celular de riñón de bovino

BT: [*Bovine testicle*] Línea celular de testículo de bovino

Bt: [*Bovine turbinate*] Línea celular de cornete bovino

BHK-21: [*Baby hamster kidney*]] Línea celular de riñón de hamster neonato

GMK: [*African green monkey kidney*]] Línea celular de riñón de mono verde africano

Vero: [*African green monkey kidney*]] Línea celular de riñón de mono verde africano

CK: [*Canine kidney*] Riñón de perro

BEK: [*Bovine embryonic kidney*] Línea celular de riñón de embrión bovino

IBRs: [*Pig kidney cells*] Línea celular de riñón de cerdo

MDCK: [*Madin-Darbin canine kidney*] Línea celular de riñón de perro

SNC: Sistema nervioso central

IFID: Inmunofluorescencia indirecta

DPI: Días posinfección

vPRRS: Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

vEA: Virus de la enfermedad de Aujeszky

vFPC: Virus de la fiebre porcina clásica

PCV-2: [*Porcine Circovirus type 2*] Circovirus porcino tipo 2

vPPA: Virus de la peste porcina africana

vFA: Virus de la fiebre aftosa

vEBJ: Virus de la encefalitis B japonesa

vEV: Virus de estomatitis vesicular

vEOA: Virus de la enfermedad del ojo azul

vDVB: Virus de la diarrea viral bovina

vPP: Virus de la parvovirus porcina

PCR: [*Polymerase chain reaction*] Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: [*Reverse transcriptase- polymerase chain reaction*] Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa

ID: Identificación

SPI: Semanas posinfección

10. REFERENCIAS

- Allan, G. M., McNeilly, F., Walker, I., Linné, T., Moreno-López, J., Hernández, P., Kennedy, S., Carrol, B. P., Henrron, B., Foster, J. C. & Aldair, B. 1996. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infections in pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 405-413.
- Anónimo. 2003. Artificial insemination. Technical update. No. 2. USA: PIC.
- Arellanes, A. E., Fuentes, R. M., Carreón, N. R. & Ramírez, M. H. 1994. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en el gato doméstico (*Felis catus*). *Rev. Vet. Mex.* 25: 239-241.
- Berg, M., Bergvall, A. C., Svenda, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J. & Linné, T. 1997. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of the paramyxovirus f proteins. *Virus Genes* 14: 55-61.
- Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J. & Linné, T. 1991. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* 72: 1045-1050.
- Berg, M., Hjertner, B., Moreno-López, J. & Linné, T. 1992. the P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.* 73: 1195-1200.
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V. & Schountz, T. 2000. Bats: Important reservoir host of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 531-545.
- Campos, H. & Carvajal, F. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. 1989. *En: memorias de la XXIV Reunión de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos.* Morelia, México.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E. N., Nelson, J. K., Hines, R. J., Swenson, S. L., Hill, T. H., Zimmerman, J. J., Katz, J. B., Yaeger, M. J., Chase, C. C. & Benfield, D. A. 1995a. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1730-1734.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E. N., Hines, R. J., Nelson, J. K., Swenson, S. L., Zimmerman, J. J. Chase, C. C., Yaeger, M. J. & Benfield, D. A. 1995b. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 456-464.
- Christopher-Hennings, J., Holler, L. D., Benfield, D. A. & Nelson, E. A. 2001. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:133-142.
- Coba, M. A., Correa, P., Díaz, M., Martínez, A., Solís, M., Mendoza, E., Ríos, M. C. & Torres, J. 2006. El rubulavirus porcino en testículo y semen de verracos vacunados y expuestos. *En: Memorias del XLI Congreso Nacional la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos.* Ixtapa, Guerrero.

- Cuetero, R. S., Ramírez, M. H., Carreón, N. R. & Campuzano, G. J. 1995. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. *Vet. Mex.* 26: 231-236.
- Cuevas, J. S., Rodríguez-Ropón, A., Kennedy, S., Moreno-López, J., Berg, M., Hernández-Jáuregui, P. 2009. Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127:148-152.
- Cuevas-Romero, S. 2002. Persistence of porcine rubulavirus (PoRV-LPMV) in naturally infected pigs. Master Science Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.
- de Smit, A. J., Bouma, A., Terpstra, C. & van Oirshot, J. T. 1999. Transmission of classical swine fever by artificial insemination. *Vet. Microbiol.* 67: 239-249.
- Espinosa, H. S. 2001. Evaluación del semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul. Tesis de Maestría. FMVZ-UNAM. México.
- Fuentes, M., Carreón, R., Stephano, A. & Trujillo, M. 1990. Frequency of blue eye Paramyxovirus antibodies in Mexico pigs. *In: Proceedings of 11th International Pig Veterinary Society Congress.* México, D. F.
- Fuentes, R. M., Carreón, N. R. & Ramírez, M. H. 1992. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el Paramyxovirus del ojo azul en cerdos de la Republica Mexicana. *Vet. Méx.* 23:37-39.
- Guérin, B. & Pozzi, N. 2005. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenol.* 63: 556-72.
- Gupta, R. K., Best, J. & MacMahon, E. 2005. Mumps and the UK epidemic 2005. *BMJ.* 330: 1132-1135.
- Hagmaier, K., Stock, N., Precious, B., Childs, K., Wang, L-F., Goodbourn, S. & Randall, E. 2007. Mapuera virus, a rubulavirus that inhibits interferon signalling in a wide variety of mammalian cells without degrading STATs. *J. Gen. Virol.* 88: 956-966.
- Hall, L. B., Kluge, J. P., Evans, L. F. & Hill, H. T. 1984a. The effect of pseudorabies (Aujeszky's) virus infection on young mature and boar fertility. *Can. J. Comp. Med.* 48: 192-197.
- Hall, L. B., Kluge, J. P., Evans, L. F., Clark, T. L. & Hill, H. T. 1984b. testicular changes in boars following experimental inoculation with pseudorabies (Aujeszky's) virus. *Can. J. Comp. Med.* 48: 303-307.
- Hernández, J. 1997. Estudio de la respuesta inmune celular y humoral en cerdos infectados experimentalmente con el Rubulavirus porcino. Tesis de Maestría. Instituto de investigaciones biomédicas-UNAM. México.
- Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Zenteno R., Ramírez, M. H., Hernández-Jauregui, P. & Zenteno, E. 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immunol. Immunopath.* 64: 367-381.
- Hernández, J., Garfías, Y., Nieto, A., Mercado, C., Montañón, L. F., Zenteno, E. 2001. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in

the immune response to porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79:249-259.

- Hernández-Jáuregui, P. 2003. The pathogenesis of porcine rubulavirus (LPMV): Infection in PK-15 cultured cells and in experimentally infected pigs. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.
- Hernández-Jáuregui, P., Ramírez, M. H., Mercado, G. C., Moreno-López, J. & Kennedy, S. 2004. Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) infection in pregnant gilts. *J. Comp.Path.* 130: 1-6.
- Hjertner, B., Linné, T. & Moreno-López, J. 1997. Establishment and characterisation of a porcine rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. *Acta Vet. Scand.* 38: 213-224.
- Hjertner, B., Wiman, A. C., Svenda, M., Berg, M., Moreno-López, J., Linné, T. 1998. Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). *Arch. Virol.* 143:425-439.
- Hviid, A., Rubin, S. & Muhlemann, K. 2008. Mumps. *Lancet.* 371: 932-944.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. 2007. Virus Taxonomy. (20/12/2007, 4p) *Disponible en:* <http://www.ictvonline.org/>
- Jalal, H., Bahadur, G., Knowles, W., Jin, L. & Brink, N. 2004. Mumps epididymo-orchitis with prolonged detection of virus in semen and the development of anti-sperm antibodies. *J. Med. Virol.* 73: 147-150.
- Kirkland P. D. & Stephano A. 2006. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipha virus infections. *In:* Straw B., Zimmerman J., D’Allaire S. & Taylor D. Diseases of swine. 9^a Edición. Blackwell Publishing. USA.
- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J. & Roux, L. 1998. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 72: 891-899.
- Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S., Fujii, N., Tashiro, M. & Kato, A. 2005. Mumps virus V protein antagonizes interferon without the complete degradation of STAT1. *J. Virol.* 79: 4451-4459.
- Lamb, R. A., Collins, P. L., Kolakofsky, D., Melero, J. A., Nagai, Y., Oldstone, M. B. A., Pringle, C. R. & Rima, B. K. 2000. *Family Paramyxoviridae.* *In:* van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. Virus Taxonomy on line. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. doi: 10.1006/bkvt.2000.0054
- Larochelle, R., Bielanski, A., Muller, P. & Magar, R. 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4629-4632.
- Leiding, C. 2000. Prevention of disease transmission by the use of semen in the porcine AI industry. *Livestock Prod. Sci.* 62: 221-236.
- Linné, T., Berg, M., Bergvall, A. C., Hjertner, B. & Moreno-López, J. 1992. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet. Microbiol.* 33: 263-273.

- Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A. & Van Soom, A. 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenol.* 70: 1337-1345.
- Martínez, L. A., Correa, G. P. & Zamora, G. J. La enfermedad del ojo azul producida por el rubulavirus porcino. Libro Técnico No. 1. INIFAP. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. México.
- Martín-Rillo, S., Martínez, E., García Artiga, C., De Alba, C. 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 519-526.
- McNeilly, F., Walker, I., Allan, G. M., Foster, J. C., Linné, T., Merza, M., Hernández, P., Kennedy, S. & Adair, B. 1997. A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 3-9.
- Mercado, G. C. 2003. Alteraciones funcionales en la respuesta inmune de linfocitos y monocitos durante la fase inicial de la infección con el Rubulavirus porcino en cerdos adultos. Tesis de Maestría. FMVZ-UNAM. México.
- Moreno-López, J., Correa-Girón, P., Martínez, A. & Ericsson, A. 1986. Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch. Virol.* 91: 221-31.
- Morilla, A., González-Vega, D., Estrada, E. & Diosdado, F. 2002. Seroepidemiology of blue eye disease. *In: Trends in emerging viral infections of swine.* Morilla, A., Yoon, K. & Zimmerman, J. Iowa State University Press. USA.
- Nidaira, M., Taira, K., Itokasu, K., Okano, S., Kudaka, J., Nakamura, M., Ohno, A. & Takasaki, T. 2008. Detection of japanese encephalitis virus genome in Ryukyu wild boars (*Sus scrofa riukiuanus*) in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61: 164-165.
- Nöjd, J., Teclé, T. Samuelsson, A. & Orvell, C. 2001. Mumps virus neutralizing antibodies do not protect against reinfection with a heterologous mumps virus genotype. *Vaccine.* 19: 1727-1731.
- Nordengrahn, A., Svenda, M., Moreno-López, J., Bergvall, A., Hernández, P., Mcneilly, F., Allan, G. & Merza, M. 1999. Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus, La Piedad Michoacan virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 319-323.
- Pérez, M. C. 1995. Impacto económico de la enfermedad del ojo azul. *En: Memorias de la 4ª Reunión del Consejo Consultivo en Salud Animal.* México, D. F.
- Prieto, C., Suárez, P., Bautista, J. M., Sánchez, R., Rillo, S. M., Simarro, I., Solana, A. & Castro, M. 1996. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenol.* 45: 383-395.
- Prieto, C., García, C., Simarro, I. & Castro, J. C. 2003. Temporal localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars. *Theriogenol.* 60: 1505-1514.
- Prieto, C. & Castro, J. M. 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenol.* 63:1-16.

- Puglielli, M. & Ahmed, R. 1999. Persistent viral infections. *In: Granoff, A. & Webster, R. (Eds). Encyclopedia of virology. Oxford academic press. USA.*
- Quezada, M. J., Castillo, J. H., Segalés, C. J., Correa-Girón, P. & Ramírez, M. H. 2005. Estudio retrospectivo sobre circovirus porcino tipo 2, Rubulavirus porcino e Influenza porcina en cerdos del año 1972 al 2000 en México. *En: Memorias del IV Congreso Internacional de Epidemiología, Morelia, Michoacán.*
- Quintero, M. A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones en semen de caballo cerdo y conejo. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Ramírez, M. H. 1998. Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul del cerdo a nivel testicular. Tesis de Doctorado. FMVZ-UNAM. México.
- Ramírez, M. H., Carreón, N. R., Mercado, G. C. & Rodríguez, T. J. 1996. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet. Méx. 27:257-259.*
- Ramírez, M. H., Martínez, G. R., Vizuet, A. O. & Monroy, B. J. 1999. Inoculación del virus de la enfermedad del ojo azul en verracos de la raza pelón Mexicano. *Vet. Méx. 30: 1-6.*
- Ramírez-Herrera, M. A., Mendoza-Magaña, M. L., Dueñas-Jiménez, J. M., Mora-Galindo, J., Dueñas-Jiménez, S. H. 2001. Electrophysiological and morphological alterations in peripheral nerves by the pig paramyxovirus of blue eye disease in neonatal pigs. *J. Vet. Med. B. 48:477-487.*
- Ramírez-Mendoza, H., Hernández-Jauregui, P., Reyes-Leyva, J., Zenteno, E., Moreno-López, J. & Kennedy, S. 1997. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J. Comp. Path. 117:237-252.*
- Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Hernández, J., Zenteno, R., Vallejo V., Hernández-Jáuregui, P. & Zenteno, E. 1997. NeuA α 2,3Gal-Glyconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol. 118B: 327-332.*
- Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Santos, G., Zenteno, R., Hernández, J., Vallejo, V., Zenteno, E. 1999. Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj. J. 16:517-522.*
- Reyes-Leyva, J., Santos, G., Hernández, J., Espinosa, B., Borraz, M. T., Ramírez, M. H., Vallejo V. & Zenteno, E. 2002. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus porcino*. *En: Cea Bonilla, A., del Arenal Mena, I. P., Riveros Rosas, H. & Vázquez Contreras, E. (eds). Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México.*
- Reyes-Leyva, J., García, M. O., Santos, G., Vallejo V., Ramírez, M. H. & Hernández, J. 2004. Detección de la viremia en la infección experimental por rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet. 36: 39-47.*
- Rima, B., Alexander, D. J., Billeter, M. A., Collins, P. L., Kingsbury, D. W., Lipkind, M. A., Nagai, Y., Örbel, C., Pringle, C. R. & ter Mullen, V. 1995. Family *Paramyxoviridae*. *In: Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.*

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Ghabrial S. A., Jarvis, A. W., Matelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. Springer-Verlag. USA.

- Rivera, B. J., Martínez, B. N., Macías, G. M., & García, C. A. 2006. Prevalencia de anticuerpos contra el síndrome respiratorio y reproductivo porcino, Rubulavirus porcino y Parvovirus porcino en cerdos de la Ciudad de México. *En: Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. Veracruz, México.
- Rosales, E. F., Ramos, R. I., Martínez, L. A. & Correa, G. P. 1988. Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus porcino LPM, al parecer asociado con el “síndrome de ojo azul”. *Tec. Pec. Méx.* 26: 304-311
- Rozeboom, K. J. 2003. Quality assurance of semen. Allen D. Leman Swine Conference. 171-179.
- Salas-Rojas, M., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, M. D., Schnell, G. D., Schmid, R. K. & Aguilar-Setién, A. 2004. Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagus bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 98: 577-584.
- Sánchez-Betancourt, J. I., Santos-López, G., Alonso, R., Doperto, J. M., Ramírez-Mendoza, H., Mendoza, S., Hernández, J., Reyes-Leyva, J. & Trujillo, M. E. 2008. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Res. Vet. Sci.* 85: 359-67
- Santos-López, G., Hernández, J., Borraz-Argüello, M. T., Ramírez-Mendoza, H., Vallejo, V. & Reyes-Leyva, J. 2004. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus porcino*. *Arch. Med. Vet.*, 36: 119-136.
- Skov, M. K. 2005. Management of disease control and epidemics in AI in Denmark. *Theriogenol.* 63: 585-594.
- Solís, H. M. 2002. Viabilidad del semen diluido proveniente de cerdos infectados experimentalmente con el Rubulavirus porcino. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. México.
- Solís, M., Ramírez-Mendoza, H., Mercado, C., Espinosa, S., Vallejo, V., Reyes Leyva, J. & Hernández, J. 2007. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Res. Vet. Sci.* 83: 403-409
- Stephano, H. A., Gay, G. M., Ramírez, T. C. & Maqueda, A. J. 1981. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. *En: Memorias de la XVII Convención Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Ixtapa, Guerrero.
- Stephano, H. A., Gay, G. M., Ramírez, T. C. & Maqueda, A. J. 1982. An outbreak of encephalitis in piglets produced by an hemagglutinating virus. *In: Proceedings of 7th International Pig Veterinary Society Congress*. México, D. F.
- Stephano, H. A. & Gay, G. M. 1983. El síndrome del “ojo azul” estudio experimental. *En: Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria*. México, D. F.

- Stephano, H. A. & Gay, G. M. 1985. El síndrome del ojo azul en cerdos de granjas engordadoras del bajío. *En: Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria. México.*
- Stephano, H. A., Doporto, D. J. & Gay, G. M. 1985. Estudio epidemiológico en dos granjas porcinas afectadas por el síndrome del ojo azul. *En: Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria. México.*
- Stephano, H. A., Gay, G. M. & Ramírez T. C. 1988. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 122:6-10.
- Stephano, H. A., Hernández, D., Pérez, C., González, C. T., Ramírez, M. H. & Cervantes, A. 1990. Boar infertility and testicle atrophy associated with blue eye paramyxovirus infection. *In: Proceedings of 11th International Pig Veterinary Society Congress. México, D. F.*
- Sundqvist, A., Berg, M., Hernández-Jauregui, P., Linné, T. & Moreno-López, J. 1990. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.* 71: 609-613.
- Sundqvist, A., Berg, M., Moreno-Lopez, J. & 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. *Arch. Virol.* 122: 331-340.
- Sur, G. H., Doster, A. R., Christian, J. S., Galeota, J. A., Wills, R. W., Zimmerman, J. J. & Osorio, F. A. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71: 9170-9179.
- Svenda, M., Berg, M., Moreno-López, J. & Linné, T. 1997. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* 48: 57-70.
- Vallejo, V., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Ramírez, P., Delanoy, P. & Zenteno, E. 2000. Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol.* 126B: 415-424.
- van Rijn, P. A., Wellemberg, G. J., Hakse-van der Horning, H., Jacobs, L., Moonen, P. L. & Feitsma, H. 2004. Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative RealTime PCRTM technology. *J. Virol. Meth.* 120: 151-60.
- Wang, L. -F., Hansson, E., Yu, M., Chua, K. B., Mathe, N., Cramer, G., Rima, B. K., Moreno-López, J. & Eaton, B. T. 2007. Full-length genome séquense and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bats and pigs in the Americas. *Arch. Virol.* 152: 1259-1271.
- Wasilk, A., Callahan, J. D., Christopher-Hennings, J., Gay, T. A., Fang, Y., Dammann, M., Reos, M. E., Torremorell, M., Polson, D., Mellencamp, M., Nelson, E. & Nelson, W. M. 2004. Detection of U.S., Lelystad, and european-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4453-4461.

- Wharton, I. P., Chaudhry, A. H. & French, M. E. 2006. A case of mumps epididymitis. *Lancet*. 367:702.
- Wiman, A. C., Hjetner, B., Linné, T., Herron, B., Allan, G., McNeilly, F., Adair, B., Moreno-López, J & Berg, M. 1998. Porcine Rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J. Neurovirol.* 4: 545-52.
- Zenteno-Cuevas, R., Hernández, J., Espinosa, B., Reyes-Leyva, J. & Zenteno, E. 1998. Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch. Virol.* 143: 333-352
- Zenteno-Cuevas, R., Huerta-Yépez, S., Reyes-Leyva, J., Hernández-Jáuregui, P., González-Bonilla, C., Ramírez-Mendoza, H., Agundis, C., Zenteno, E. 2007. Identification of potential B cell epitope determinants by computer techniques, in hemagglutinin-neuraminidase from the porcine rubulavirus La Piedad Michoacan. *Viral Immunol.* 20:250-260.