

66



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ANÁLISIS INMUNOPATOLÓGICO DE LA INFECCIÓN
CRÓNICA EN CERDOS INFECTADOS
NATURALMENTE POR RUBULAVIRUS
PORCINO (LPMV).

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO

DIRECTORES DE TESIS:
MVZ. M.S. PhD. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN
MVZ. MS. PABLO HERNÁNDEZ JÁUREGUI



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.

PORQUE CUANDO INICIE MI CAMINO EN EL MARAVILLOSO MUNDO DE
LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, NUNCA PENSE QUE EL
DESCUBRIMIENTO MAS IMPORTANTE EN MI VIDA,
FUERA LA EXISTENCIA DE DIOS.
PORQUE AHORA ENTIENDO QUE LA "BUENA SUERTE" NO EXISTE, Y QUE
SIEMPRE DIOS HA ESTADO A MI LADO, PERMITIENDO ALCANZAR MIS
METAS Y ENSEÑÁNDOME APRENDER DE MIS ERRORES.

GRACIAS

PORQUE HE SABIDO QUE CUANDO SE LUCHA POR LO QUE SE QUIERE,
AUNQUE LA TAREA NO ES FACIL, ES POSIBLE
ALCANZAR CUALQUIER META.
HOY DISFRUTO OTRO DE MIS PEQUEÑOS TRIUNFOS Y ME DELEITO EN
LOS SUEÑOS DE MIS IDEALES.

A SANDRA

A MI QUERIDA HIJA CASSANDRA, PORQUE ALGUN DIA ENTIENDA LA IMPORTANCIA QUE IMPLICA EL TENER UN CONOCIMIENTO, Y COMPRENDA EL PORQUE DE MIS ESTUDIOS. GRACIAS POR TU PEQUEÑO APOYO EN LA REALIZACIÓN DE LOS DIBUJOS INCLUIDOS EN ESTE TRABAJO, QUE SE CONVIERTE EN GRANDE CUANDO SE TRATO DE APOYARME Y ENTENDERME CON TUS ABRAZOS Y TUS BESOS.

A MI QUERIDA HIJA MARIA FERNANDA, PORQUE CONOCE SUS ALCANCES Y LIMITACIONES, Y HA SU CORTA EDAD HA PODIDO LOGRAR SUS OBJETIVOS, AUN CUANDO YO ESTABA MUY OCUPADA EN MIS ESTUDIOS, GRACIAS POR PERDONAR AQUELLOS MOMENTOS QUE TE ROBE. . PORQUE CON TU CORAZON DE POLLO, SIEMPRE LOGRASTE LLAMAR MI ATENCIÓN.

A MI QUERIDA XIMENA, PORQUE AUNQUE ERES MUY PEQUEÑA Y NO LOGRAS ENTENDER DEL PORQUE DE LAS COSAS, HAS TRATADO SIEMPRE DE AYUDARME, AUNQUE A VECES EN TU AFAN DE COOPERACIÓN HACES TODO LO CONTRARIO. GRACIAS POR TU APOYO.

A MI QUERIDA SARAHI, PORQUE SIN QUERER Y AUN QUERIENDO ME TANTO, NO ME HA PERMITIDO DORMIR UNA NOCHE COMPLETA LOS ULTIMOS CUATRO MESES DE MI VIDA, GRACIAS POR HABER LLEGADO AL MUNDO Y SABER QUE ME HAS ENTENDIDO DESDE SIEMPRE.

A MI ANGELITO QUE SIEMPRE VIVE EN MI CORAZON.

CON TODO MI AMOR Y AGRADECIMIENTO POR VIVIR Y SER ASÍ COMO SON, LAS QUIERO MUCHO

SU MAMA

A MIS ASESORES

DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN Y DR. PABLO HERNÁNDEZ
JÁUREGUI.

GRACIAS POR CREER EN MI, POR COMPARTIR CONMIGO SUS
CONOCIMIENTOS Y ENSEÑARME LO IMPORTANTE QUE ES EL ORDEN.
PARA MÍ FUE MUY SATISFACTORIO TRABAJAR CON DOS GRANDES
MAESTROS, ESPERO SER DIGNA PUPILA DE AMBOS.

A MI JURADO

POR SU APOYO EN LA REVISIÓN DE ESTE TRABAJO.

A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS DE LA MAESTRÍA,

POR SU AMISTAD Y COMPAÑERISMO EN LOS MOMENTOS
DIFÍCILES.

AL DIRECTOR EL CENID-MICROBIOLOGIA.INIFAP

DR. JORGE TORRES BARRANCA, POR SU CONFIANZA Y APOYO.

A MIS QUERIDOS COMPAÑEROS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE
EPIZOOTIOLOGÍA CENID-MICROBIOLOGIA, AUNQUE ALGUNAS YA
SE LIQUIDARON SIMPRE LAS LLEVO EN MI CORAZON. POR SU APOYO
EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL PERSONAL ADMINISTRATIVO Y TÉCNICO DE LA UNIDAD DE
POSGRADO DE LA FES-CUAUTILAN, POR SU AYUDA DESINTERESADA,
ESPECIALMENTE A MINERVA.

AL PERSONAL TÉCNICO, ADMINISTRATIVO Y DE SERVICIO SOCIAL DE
LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE ORIENTE. IMSS.
GRACIAS A SU APOYO FUE POSIBLE LA CONCLUSIÓN DE ESTE
TRABAJO ESPECIALMENTE A LA QFB LUPITA.

AL DEPARTAMENTO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA FES-
CUAUTITLAN POR SU APOYO Y ENSEÑANZA LA DRA. SOFIA, QFB.
CHAYO Y TÉCNICO RODOLFO.

MUY ESPECIALMENTE A LOS DOCTORES, JORGE TORTORA, JESÚS
HERNÁNDEZ, JUAN MONROY, DANTE GONZALES, ANDREA ROPÓN,
MIGUEL CAMARA, GERMAN COLMENARES, ANTONIO MORILLA,
PABLO CORREA ,ALVARO AGUILAR, ABEL CIPRINA, SUSANA
MENDOZA E ING. JOSE LUIS RINCCN POR SU AYUDA EN LA
REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. DIODORO BATALLA RESPONSABLE DEL INICIO DE ESTA
DIFÍCIL TAREA.

AL PERSONAL TÉCNICO DEL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO,
DIVULGACIÓN Y FOTOGRAFIA DEL CENID-MICROBIOLOGIA

AL SR. SALVADOR CASTREJON Y JUVENAL SOLORIO POR SU AYUDA
EN EL MANEJO DE LOS SEMCVIENTES.

GRACIAS

AL COMPAÑERO DE MI VIDA QUE MERECE UNA HOJA APARTE,
POR SU APOYO INCONDICIONAL, AUN CON EL RESULTADO DE HABER
PERDIDO LA PACIENCIA.
PORQUE CON SUS ACIERTOS Y ERRORES ME HA DEMOSTRADO QUE ME
AMA Y SIN SU AYUDA NO HUBIERA SIDO POSIBLE LA REALIZACIÓN DE
ESTE Y MUCHOS OTROS PROYECTOS.
GRACIAS POR REGALARME PARTE DE TU VIDA QUE NO ME
CORRESPONDIA.
TU SABES QUE TE AMO

CON TODO MI AMOR Y AGRADECIMIENTO A

MIGUEL BEJERO VALDES

A MIS PADRES

SALVADOR CUEVAS Y PAULA ROMERO
POR DARME LA VIDA Y TODO SU AMOR
QUE AUN NO PUEDO COMPRENDER
LOS QUIERO MUCHO
GRACIAS Y QUE DIOS LOS BENDIGA SIEMPRE

A MI QUERIDA HERMANA MARIA INES

NUNCA ME CANSARE DE AGRADECERTE HABER
COMPARTIDO CONMIGO LOS MEJORES AÑOS
DE MI VIDA, TU SABES QUE TE QUIERO

A MI CUÑADO FRANCISCO BEJERO V.

CON UNA GRAN ADMIRACIÓN POR TU
EMPEÑO EN EL TRABAJO Y ENSEÑARME
A NO DESFALLECER EN LA LUCHA POR
LOS IDEALES AUN CUANDO EL VIENTO
NO VAYA A FAVOR

A MI QUERIDO SOBRINO DANTE

PORQUE MANTENGAS VIVO TU INTERES
EN EL ARDUO CAMINO DEL CONOCIMIENTO
QUE HOY INICIAS, APRENDE DE TUS ERRORES
Y DISFRUTA DE TUS ACIERTOS, YO SE QUE PUEDES
TE QUIERO

A MI QUERIDA SOBRINA GISELA

AUNQUE TODAVÍA ERES MUY JOVEN
PIENSA QUE LAS COSAS QUE MÁS
SATISFACCIONES NOS CAUSAN EN LA VIDA, SON
LAS QUE MAS CUESTAN, SE SIEMPRE FELIZ
TE QUIERO

A MIS ASESORES

DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN Y DR. PABLO HERNÁNDEZ
JÁUREGUI.

GRACIAS POR CREER EN MI, POR COMPARTIR CONMIGO SUS
CONOCIMIENTOS Y ENSEÑARME LO IMPORTANTE QUE ES EL ORDEN.
PARA MÍ FUE MUY SATISFACTORIO TRABAJAR CON DOS GRANDES
MAESTROS, ESPERO SER DIGNA PUPILA DE AMBOS.

A MI JURADO

POR SU APOYO EN LA REVISIÓN DE ESTE TRABAJO.

A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS DE LA MAESTRÍA,

POR SU AMISTAD Y COMPAÑERISMO EN LOS MOMENTOS
DIFÍCILES.

AL DIRECTOR EL CENID-MICROBIOLOGIA.INIFAP

DR. JORGE TORRES BARRANCA, POR SU CONFIANZA Y APOYO.

A MIS QUERIDOS COMPAÑEROS DE TRABAJO DEL LABORATORIO DE EPIZOOTIOLOGÍA CENID-MICROBIOLOGIA, AUNQUE ALGUNAS YA SE LIQUIDARON SIEMPRE LAS LLEVO EN MI CORAZON. POR SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL PERSONAL ADMINISTRATIVO Y TÉCNICO DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FES-CUAUTILAN, POR SU AYUDA DESINTERESADA, ESPECIALMENTE A MINERVA.

AL PERSONAL TÉCNICO, ADMINISTRATIVO Y DE SERVICIO SOCIAL DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE ORIENTE. IMSS. GRACIAS A SU APOYO FUE POSIBLE LA CONCLUSIÓN DE ESTE TRABAJO ESPECIALMENTE A LA QFB LUPITA.

AL DEPARTAMENTO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA FES-CUAUTITLAN POR SU APOYO Y ENSEÑANZA LA DRA. SOFIA, QFB. CHAYO Y TÉCNICO RODOLFO.

MUY ESPECIALMENTE A LOS DOCTORES, JORGE TORTORA, JESÚS HERNÁNDEZ, JUAN MONROY, DANTE GONZALES, ANDREA ROPÓN, MIGUEL CAMARA, GERMAN COLMENARES, ANTONIO MORILLA, PABLO CORREA, ALVARO AGUILAR, ABEL CIPRINA, SUSANA MENDOZA E ING. JOSE LUIS RINCON POR SU AYUDA EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. DIODORO BATALLA RESPONSABLE DEL INICIO DE ESTA DIFÍCIL TAREA.

AL PERSONAL TÉCNICO DEL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO, DIVULGACIÓN Y FOTOGRAFIA DEL CENID-MICROBIOLOGIA

AL SR. SALVADOR CASTREJON Y JUVENAL SOLORIO POR SU AYUDA EN EL MANEJO DE LOS SEMOVIENTES.

GRACIAS

INDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Antecedentes	8
1.2 Situación de la Enfermedad de Ojo Azul en México	8
1.3 Descripción de la Enfermedad del Ojo Azul.	9
1.3.1 Características de la EOA en Cerdos menores de 30 días.....	10
1.3.2 Características de la EOA en Cerdos Jóvenes	11
1.3.3 Características de la EOA en Cerdos Adultos	12
2. Clasificación y características del virus de la Enfermedad de Ojo Azul	13
2.1. Agente etiológico	13
2.2. Clasificación del virus LPMV	13
2.3. Características físicas del virus LPMV	13
2.4. Características bioquímicas del virus LPMV	14
2.5. Persistencia viral	17
2.6. Relación con otros Paramixovirus	19
2.7. Receptores celulares del LPMV	20
3. DIAGNOSTICO	22
4. MATERIAL Y METODOS	25
4.1 Animales	25
4.1.1 Cerdos Positivos	25
4.1.2 Cerdos Negativos	25
4.2 Línea Celular	26
4.3. Virus	26
4.4 Sueros	28

4.5	Anticuerpo Monoclonal	27
4.6	Leucocitos	27
5.	DISEÑO EXPERIMENTAL	27
5.1	Grupos experimentales	27
5.2	Muestras de tejidos animales negativos	28
5.3	Pruebas Especificas	28
5.3.1	Aislamiento Viral	28
5.3.2	Pruebas de Hemoaglutinación (HA) y Hemoadsorción (HAD)....		29
5.3.3	Prueba de inmunohistoquímica	29
5.3.4	Prueba de Fluorescencia Indirecta (IF)	29
5.3.5	Prueba de Seroneutralización en Cultivo de Tejidos (SN).....		30
5.3.6	Prueba de ELISA	30
5.3.7	Citometría de flujo (CF)	30
5.3.8	Microscopía Electrónica	31
5.3.9	RT- PCR del LPM (RNA)	31
6.	RESULTADOS	32
	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	36
	LITERATURA CITADA	42
	CUADROS Y FIGURAS	49
	APÉNDICE 1	59

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpos
BALT	Tejido Linfoide Asociado a Bronquios
Bp	Pares de bases
CPE	Efecto citopático
DNA	Acido desoxiribonucleico
DL	Dosis letales 50%
F	Proteína de Fusión
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico.
HA	Prueba de Hemoaglutinación
HAD	Prueba de Hemoadsorción
HN	Proteína Hemoaglutinina-Neuraminidasa
HRP	Horseradish Peroxidase conjugated anti LPM/ HN,antibodie.
DI	Defective Interfering
IH	Inhibición de la hemoaglutinación
L	Proteína Larga
LPMV	Virus de La Piedad Michoacán.
μ	microlitros
M	Proteína de Matriz
ml	mililitros
Mab	Anticuerpo Monoclonal
MEM	Medio mínimo esencial
mRNA	RNA mensajero
NP	Nucleoproteína viral
NP	Nucleoproteína
P	Fosfoproteína
PBS	Solución amortiguada de Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Porcentaje de inhibición (Eliisa por Bloqueo)
PK-15	Porcine kidney cells

PRRS	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcriptasa reversa- Reacción en cadena de la polimerasa
SN	Seroneutralización
SV5	Virus de los simios tipo 5
TICD	Dosis infectantes en cultivo de tejidos.
TMB	Tetramethylbenzidine

RESUMEN

ANÁLISIS INMUNOPATOLOGICO DE LA INFECCION CRONICA EN CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE POR Rubulavirus Porcino .

Se realizó un estudio Inmunopatológico en cerdos convalecientes de la infección por Rubulavirus (Enfermedad de Ojo azul (EOA)). Se seleccionaron 5 cerdos de una granja con presentación de un primer brote de EOA. Y 6 cerdos de una granja certificada libre de la EOA, Se formaron 5 grupos un cerdos convaleciente y un control negativo, cada 45 días se sacrificó un grupo Se determinaron los anticuerpos circulantes por la prueba de ELISA y Seroneutralización; las poblaciones linfocitaria CD4+ , CD8+ y CD4+CD8+, por Citometría de Flujo. Se recolectaron muestras de: Sistema nervioso central, Aparato respiratorio, ganglios, tonsilas y páncreas, además secreciones nasales. Se trabajaron para aislamiento viral, Inmunofluorescencia indirecta, Inmunohistoquímica e histopatología, microscopía electrónica, RT-PCR. Resultados de secreciones nasales por aislamiento viral fueron negativos para cerdos convalecientes y controles. En las pruebas de ELISA y Seroneutralización, los cerdos convalecientes mostraron elevados niveles de anticuerpos; los cerdos controles permanecieron seronegativos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las subclases linfocitarias ,CD4+ y CD8+ y CD4+CD8+. No hubo aislamiento viral en cultivos celulares de muestras de tejidos, la prueba de Hemoaglutinación, Hemoadsorción, e Inmunofluorescencia indirecta resultaron negativos en todos los grupos. En la necropsia no se encontraron lesiones macroscópicas; histopatológicamente no hubo alteraciones significativas . Por Inmunohistoquímica, se presentó reacción positiva en pulmón, plexo coroideo, tonsilas y páncreas, las muestras de tejidos de animales controles fueron negativas. No se observó la presencia de partículas virales del Rubulavirus porcino en las muestras de epitelio bronquial por microscopía electrónica. Pruebas de RT-PCR se detectó la presencia de RNAm de la glicoproteína NP del LPMV, en cerebro medio, bulbo olfatorio y páncreas. Se concluye que los cerdos que se recuperan de la fase aguda de la infección por Rubulavirus porcino, concentran niveles elevados de anticuerpos

circulantes durante 13 meses pos-infección. Los cerdos en contacto y libres de la infección no adquirieron el virus, sin formación de anticuerpos o evidencia de antígeno viral detectable en secreciones nasales. La detección de Nucleoproteína viral por Inmunoquímica y la presencia de RNAm de la nucleoproteína del LPMV demuestra la persistencia del virus en cerdos convalecientes de la infección por Rubulavirus porcino.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

En 1981 se hicieron públicos los primeros informes de un cuadro clínico de múltiples asociaciones denominado "Síndrome del Ojo Azul" (SOA), los primeros brotes se presentaron en cerdos de granjas del municipio de La Piedad Michoacán, así como en los estados de Jalisco y Guanajuato, en cerdos entre 4 y 10 días de edad, con una morbilidad y mortalidad del 20 al 90% respectivamente. (10,20,37,38,39)

1.2 SITUACION DE LA ENFERMEDAD DE OJO AZUL EN MEXICO

El Síndrome del Ojo Azul (SOA) fue observado por primera vez en México a principios de 1980, desde su aparición hasta la fecha, continúa presente únicamente en nuestro país. se ha informado en diferentes Estados de la República, y representa un grave problema sanitario en las áreas de producción porcina del país.

A principios de 1980 se observó el primer brote en una granja comercial de 2500 vientres localizada en La Piedad Michoacán, durante ese mismo año se difundió a granjas en la misma zona y en los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán. En 1982, se diagnostica en el Estado de México. En 1983, se analizaron sueros en el sur de Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, D.F., Querétaro, y Tabasco con resultados positivos. En 1984 en Tamaulipas y Jalisco, se diagnosticaron brotes mediante estudios serológicos. Para 1987, se diagnostica por aislamiento, nuevamente en La Piedad, Edo. de México (Lago de Guadalupe), en 1988, se presentan brotes en el estado de Puebla y Campeche. En 1991 se diagnostica nuevamente en Tamaulipas. (10,20,22,28,34,35, 37,38,39,40, 51).

Durante 1988 se realiza un estudio serológico por el método de Inhibición de la Hemaglutinación (IH), en sueros congelados (1972-1985) de los estados de Guanajuato, Morelos, Puebla, Edo. de México y Michoacán, encontrando serología positiva al virus del Síndrome del Ojo Azul. Entre los años de 88 y 89, la enfermedad fue detectada en los estados de Puebla, Campeche, Quintana Roo y Morelos, mediante serología y nuevamente se presenta en Jalisco, Michoacán, Edo. de México, Querétaro y Guanajuato (10,34,37,38,39,40,41).

En 1994 se publica un análisis retrospectivo (1972 a 1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el virus de la Enfermedad del Ojo Azul (VEOA), en 1742 sueros procedentes de diferentes estados, encontrando el 9.24% de sueros positivos, de los cuales 11 sueros correspondieron a muestras de años anteriores a la presentación del primer brote (1980), se concluye que desde 1972 existen evidencias de anticuerpos Inhibidores de la Hemoaglutinación contra el VEOA. (36).

En 1998, se realizó una encuesta nacional para detectar cerdos seropositivos al VEOA, mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), en muestras de sueros recolectados de cerdos que llegaron al rastro, encontrando de 1811 sueros de cerdos evaluados, solamente el 3.8% de animales seropositivos procedentes de Aguascalientes [3], Tlaxcala [13], Zacatecas [31], Tabasco [17], Oaxaca [1], Querétaro [2], Chiapas [1], Guanajuato [2] y Michoacán [1], con títulos de 1:5 a 1:320, estos resultados fueron comparados por la prueba de Seroneutralización, y con los resultados obtenidos sugieren que el punto de corte para la prueba de IH, podría ser 1:10 para sueros positivos. (11).

1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL.

La Enfermedad del Ojo azul, afecta a cerdos de diferentes edades, los cerdos más susceptibles son los de 2 a 15 días de edad. Los síntomas más notables son: cambios en el comportamiento, alteraciones nerviosas, alteraciones respiratorias, falla reproductiva en cerdas y en sementales, además de observarse en algunos casos opacidad de cornea de uno o ambos ojos. (8,27,37,39)

Stephano, y col. 1985. (45), han sugerido que una vez que la enfermedad clínica desaparece aparentemente, puede resurgir casos clínicos hasta 8 a 10 meses después de iniciado el brote, o en condiciones donde se introduzcan animales susceptibles. También han observado, que en granjas abiertas o de ciclo de producción continuo, la enfermedad persiste por más tiempo; mientras que en las granjas cerradas la enfermedad se autolimita entre los 6 y los 11 meses después del brote inicial. Así mismo en algunos estudios que se han basado en descripciones clínicas, lesiones

histopatológicas y observaciones de campo con relación a la presencia de brotes, se han observado períodos de incubación de 20 días hasta 10 meses. En infecciones experimentales también se han observado períodos de incubación de 97 días hasta 10 meses pos-infección. (14,37,38, 39,40,41,42,43,44,45) .

Respecto a la transmisión del virus en forma experimental, Galina, y col. observaron que cerdos libres de la infección, que estuvieron en contacto con cerdos infectados experimentalmente no desarrollaron anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Ojo Azul (LPMV), evaluados mediante la pruebas de inhibición de la hemoaglutinación, después de 84 días de observación (14).

Investigaciones realizadas por Allan, y col. 1996, sobre la distribución del LPMV, en tejido de cerdos infectados experimentalmente de 3 y 17 días de edad, encontraron que el 100% de los cerdos de 3 días, presentaban síntomas nerviosos hasta su muerte (8 días PI) y solamente el 30 % de los animales de 17 días fueron afectados, presentando también sintomatología nerviosa. En ambos grupos se detectó la presencia viral en tracto respiratorio y tonsilas al siguiente día post-inoculación, lo que sugiere que este puede ser el primer sitio de replicación del LPMV; sin embargo si existieron diferencias en la distribución del virus en SNC. En los cerdos de 17 días, el aislamiento fue restringido a Bulbo olfatorio y Cerebro medio, en contraste con cerdos de 3 días donde se presentó mayor propagación en SNC, esta diferencia en la distribución se asocia a la edad del cerdo. Los estudios de excreción del virus, indican que la eliminación por vía nasal del LPMV, fue más importante que la fecal. Comparativamente gran cantidad de virus infeccioso fue recuperada de muestras de orina de los cerdos de ambos grupos, (1).

1.3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD EN CERDOS MENORES DE 30 DÍAS.

Los lechones de 2 a 15 días de edad son los más susceptibles y los signos clínicos se presentan súbitamente, como fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado, acompañado principalmente de constipación, ocasionalmente diarrea. Posteriormente se observan signos nerviosos progresivos, como incoordinación,

temblores musculares, posturas anormales, marcha rígida o mediante brinco. El lechón continúa mamando, algunos muestran hipersensibilidad, movimientos de pateo, postración, letargo, movimientos involuntarios, pupila dilatada, ceguera y en ocasión nistagmo, opacidad de córnea uni o bilateral. Ocasionalmente se puede presentar retraso en el crecimiento, marcha en círculo y exudado nasal. La muerte se presenta entre 2 y 7 días después de los primeros signos. (10,20,27,39,41).

Investigaciones realizadas por Galina, P. L., y col., en la infección experimental de lechones lactantes de 7 días de edad por vía nasal, presentaron un período de incubación de 11 días. (14).

1.3.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD EN CERDOS JÓVENES (MAYORES DE 30 DÍAS DE EDAD)

En los primeros brotes de 1980, no era común que se enfermaran cerdos mayores de 30 Kg. Sin embargo a partir de 1983, se presentaron varios brotes de encefalitis con elevada mortalidad, probablemente asociado a la virulencia del virus, la absoluta carencia de inmunidad y la asociación con otros patógenos, en granjas egordadoras de cerdos de 15 a 45 Kg. de peso, los cuales fueron diagnosticados positivos por el aislamiento viral de un paramixovirus similar al virus del Síndrome del Ojo Azul (37,39,40,41).

En brotes subsiguientes, los signos clínicos entre ellos los nerviosos, se encontraron en menor intensidad y con baja mortalidad, ocasionalmente cuando se presentaron los signos clínicos consistieron en depresión, ataxia, marcha en círculos, movimientos pendulares de la cabeza, opacidad cornea y conjuntivitis, en algunos casos el único cambio observado fue la opacidad de la cornea en el 1 al 4% de los cerdos. (37,38,39,40,41,42,44)

Investigaciones realizadas con desafíos experimentales con el LPMV a cerdos de 35 días de edad, observaron que 2 de 4 cerdos infectados padecieron la enfermedad, uno murió y el otro se recuperó y se detectó la presencia de anticuerpos 7 días post-infección, sugiriendo que estos cerdos son menos susceptibles a la enfermedad que los lechones menores de 30 días, (14).

Se ha reportado que en cerdos de engorda, la enfermedad se inicia 2 o 3 semanas después de que los cerdos son agrupados y sometidos a manejos como vacunación, baño, reagrupación, etc., afectándose principalmente cerdos de 15 a 45 Kg de peso. Los signos observados son; anorexia, pelo erizado, estreñimiento, fiebre, incoordinación posterior, presencia de contracciones musculares espontáneas (tics), opistótonos, conjuntivitis, opacidad de cornea y muerte. Con un curso de la enfermedad de 1 a 4 días con mortalidad que varía del 1 a 20% en los cerdos de engorda (20,27,28,35,36,40,44)

1.3.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD EN CERDOS ADULTOS

En cerdos adultos los signos clínicos se limitan al aparato reproductor, manifestándose por abortos y mortinatos, en machos se observa epididimitis, orquitis, atrofia testicular con y sin la formación de granulomas en el epidídimo, como consecuencia la pérdida de fertilidad en los machos (7, 29,37,40,44,)

La gran mayoría de los cerdos adultos infectados permanecen clínicamente normales, sin embargo se puede presentar moderada anorexia uno o dos días antes de la aparición de los signos clínicos en los cerdos y opacidad de cornea también ha sido observada en cerdos adultos durante el brote, (7,20,29,37,38,39,42,43)

En infecciones experimentales de hembras con 103 días de gestación con el LPMV ($10^{6.3}$ TCID), no se observó signos clínicos de la Enfermedad del Ojo Azul, las cerdas permanecieron clínicamente sanas. Sin embargo de 14 lechones nacidos, 1 lechón nació débil, 3 con opacidad de cornea y 2 lechones muertos. Esto sugiere que el virus puede cruzar la barrera placentaria e infectar a los fetos, presentando así una infección congénita. (21).

La infección experimental realizada por Ramírez, y col., 1997., en machos adultos, con 8 ml. (4ml. vía nasal y 4 ml. vía intramuscular) del virus PAC-3 ($10^{4.3}$ TCID/ML), observaron epididimitis en todos los animales inoculados, con la presencia de nódulos en la cabeza del epidídimo. Reducción de la motilidad y concentración espermática 21 días post-infección. Histológicamente se observó la formación de granulomas espermáticos y degeneración vacuolar del epitelio ductular, estas lesiones

fueron asociadas con infiltración celular mononuclear y fibroplasia intersticial. En el testículo 25% de los animales resultaron con degeneración de los túbulos seminíferos e infiltración celular mononuclear intersticial, con atrofia testicular unilateral, (29).

2. CLASIFICACION Y CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE LA EOA.

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

El agente causal, aislado de muestras de cerebro de animales enfermos, fue un virus hemoaglutinante que induce en cultivo primario de células de riñón y en línea celular PK15, efecto citopatógeno con formación de sincitios, el virus caracterizado se clasificó inicialmente, dentro de la Familia *Paramixoviridae* (19,23,40,46).

2.2 CLASIFICACION DEL VIRUS

En 1991, proteínas estructurales del virus fueron secuenciadas, se encontró una homología del 40% entre el virus de paperas y el LPMV, lo que sugirió que el LPMV era un genuino paramixovirus. Posteriormente estudios realizados de clonación y secuenciación de las diferentes proteínas estructurales del virus, como son: gen de la proteína de matriz M, (6), de la Hemaglutinina-Neuraminidasa HN, (47), y el gen de la fosfoproteína P, (5) ha mostrado que el LPMV está estrechamente relacionado a la reciente clasificación del grupo de Rubulavirus (31) y en la última clasificación de la Taxonómica de los virus, fue clasificado dentro del orden *Monomegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género de los *Rubulavirus*, especie *Rubulavirus* porcino (La Piedad Michoacan-México virus) LPMV. (3,4,19,31,47,53).

2.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL *Rubulavirus* porcino .

El virus se replica en una amplia variedad de cultivos celulares de origen porcino, bovino, simio, células pulmonares de visón, y células de origen humano, ocasiona efecto citopático (ECP). Su tamaño es de aproximadamente 180 a 300 nanómetros (nm), formado por una nucleocápside helicoidal, con una envoltura lipoproteica que presenta proyecciones cortas en la periferia de distribución.

homogénea de 8 a 12 nm. Su forma es de viriones pleomórficos, o esféricos en su mayoría, (19,23,31).

El virus posee actividad hemoaglutinante con eritrocitos de pollo, cobayo, bovino, cerdo, caballo, conejo, oveja, cabra, rata, pavo y humanos tipo AB y O. También posee actividad hemoadsorbente, hemolítica, de neuraminidasa y formadora de sincicios en cultivos celulares (23,46,53)

2.4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL *Rubulavirus porcino*.

El LPMV, tiene un genoma de ácido ribonucleico (ARN), con sentido negativo, de una hebra no segmentada, formada por 15,062 nucleótidos, que actúa como molde para la síntesis de ARN mensajero, está dividida en 6 genes que codifican diferentes proteínas estructurales y no estructurales, con el siguiente orden 3' NP-P-M-F-HN-L-5', esta secuencia es similar a todos los miembros de la subfamilia *Paramyxovirinae*, cada gen codifica para una proteína excepto el gen P, cuya edición puede originar tres productos P, V, y C; y el gen F que codifica para un polipéptido F₀ que es dividido por una proteasa celular en dos proteínas F₁ y F₂ (5,9,17,18,19,46,49,53).

La nucleocápside del LPMV, está formada por tres proteínas: la nucleoproteína, (NP), la Fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular polimerasa o proteína grande (L), una proteína de Matriz (M) y por dos glicoproteínas la Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) y la de Fusión (F), con diferentes pesos moleculares 68, 52, 200, 42, 59, y 66Kd, respectivamente (Fig. 1) (3,4,5,6,9,17,23,46,47,53).

La proteína nucleoproteína NP, es la más abundante encontrada durante la infección de células y se asocia con el ARN genómico viral dando origen a la nucleocápside, provee protección y estabilidad, se expresa en gran concentración en el citoplasma y son importantes en la estimulación de respuesta inmune.(3,4,5,6,17,26,46,53)

La proteína P, forma el complejo polimerasa junto con la proteína grande L, e interactúa junto con la NP durante la replicación y la transcripción. La proteína M se encuentra en la parte interna de la envoltura viral, interactúa con la NP, lo que permite ensamblar las nucleocápsides a las zonas de la membrana celular donde se expresan

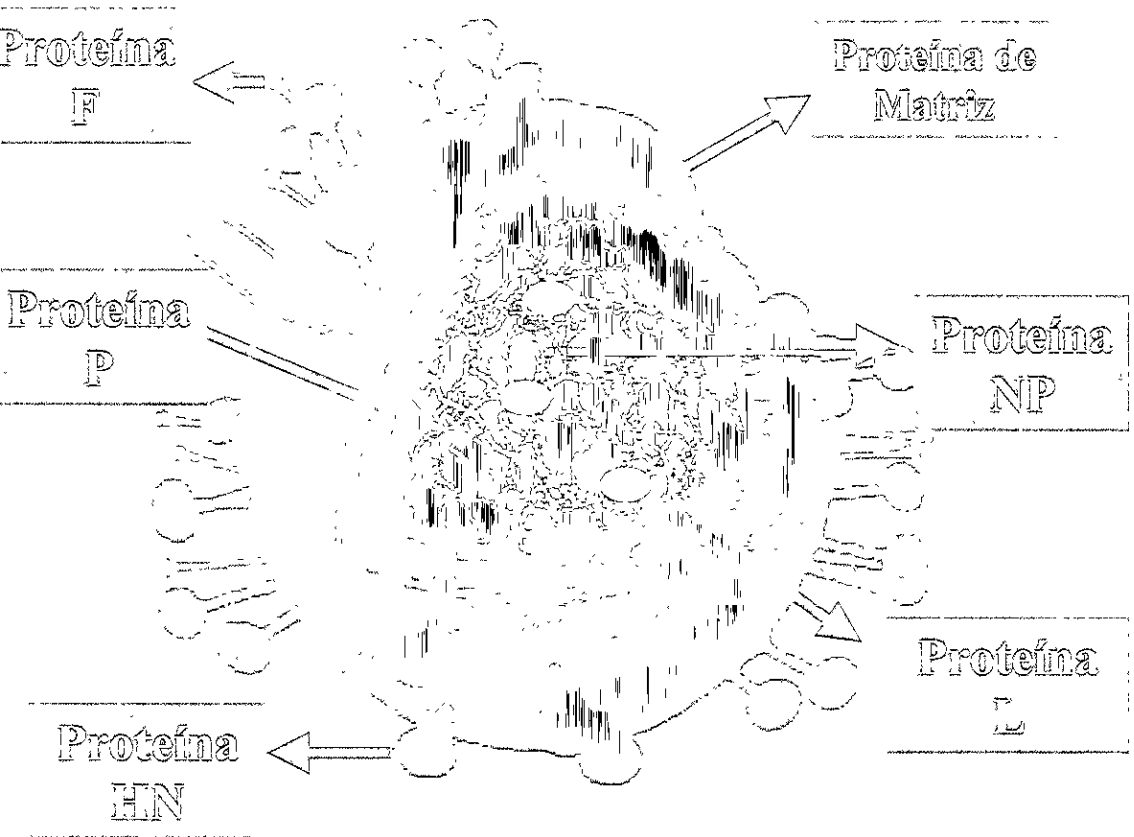


FIG. 1 Presentación esquemática de la estructura del Rubulavirus porcino (LPMV)

3' _____ 5'						
NP	P/V/C	M	F	HN	L	No. de aminoácidos
545	P:404 V:298 C:126	369	541	576	2251	
1783	1373	1376	1845	1906	1906	No. De Nucleótidos

las glicoproteínas virales . La HN y la F son proteínas de membrana glicosiladas involucradas en la infección de las células y la fusión de membranas (3,4,5,6,9,17,26,46,47,53).

El gen P presenta tres marcos de lectura abiertos, que pueden ser transcritos alternativamente mediante la adición de guanidinas no codificadas, lo que origina 3 polipéptidos, las proteínas P,V,C, que actúan como reguladoras de la transcripción del genoma viral (5,46,53).

La proteína de matriz M se localiza en la parte interna de la envoltura viral, debido a su carga neta positiva tiene gran afinidad por la NP, lo que permite ensamblar las nucleocápsides a las zonas de la membrana celular donde expresan las glicoproteínas virales.(6,46,53).

La proteína de fusión F, participa en la fusión de los receptores de la membrana celular . Permite que el virus se incorpore al citoplasma durante la fase de penetración y que difunda de una célula a otra, sin exponerse al medio externo. La fusión de varias células da lugar a la formación de células multinucleadas denominadas sincicios. La proteína F por acción de una proteasa celular da origen a dos cadenas F1 y F2 unidas por un enlace de disulfuro con lo cual constituyen la proteína activa, actualmente se determinó que la fracción F1 y F2 poseen uno y cuatro sitios potenciales de N-glicosilación respectivamente. (3,4,9,46,53).

La proteína hemoaglutinina-neuraminidasa HN es la responsable del reconocimiento del receptor viral y de la adhesión a las células blanco de la infección, tiene actividad hemaglutinante (HA) y de neuraminidasa (NA). Esta proteína estimula los mas eficientes anticuerpos neutralizantes, en consecuencia la mejor respuesta inmune. Investigaciones realizadas por Zentenc, y col. al. 1998 (55), observaron que esta proteína interactúa específicamente con los residuos Neu Ac alfa 2,3 lactosa residuos en las células blanco. La HN esta organizada en dos regiones: una intracelular , en la región de membrana, hidrofóbica, rígida e inaccesible a los disolventes polares y otra región extracelular quien posee la actividad hemoaglutinante y neuraminidasa, el análisis de las secuencias de la HN, permitió identificar el posible dominio hemaglutinante entre los residuos 314 y 414 de la proteína HN del rubulavirus

porcino, los cuales mostraron un alto grado de conservación con relación a los paramixovirus evaluados, esto sugiere que el sitio de dominio de unión, ha sido conservado a través de la evolución, (32,33,46,47,53,55)

2.3 PERSISTENCIA VIRAL

Dentro de la familia de los paramixovirus, algunos virus como el virus respiratorio sincitial (RSV), Parainfluenza tipo 3 (PIV3), virus del sarampión, virus de las paperas, etc. tienen la habilidad de establecer infecciones persistentes *in vitro* así como *in vivo* (Randall and Russel, 1991), este aspecto resulta importante por el riesgo que implica en la perpetuación del virus y por la posibilidad de existir animales persistentemente infectados que liberen virus infeccioso en forma esporádica. (2,17,18,30)

Los estudios *in vitro* de infecciones persistentes, se relacionan en su mayoría a la presencia de partículas subgenómicas del gen viral; mutantes sensible a la temperatura y por la inhibición de la expresión viral por interferón. Las partículas subgenómicas son segmentos del genoma completo que necesitan la presencia de virus infecciosos para su propagación. Éstas partículas, tienen un efecto inhibitorio en la replicación viral porque compiten por la maquinaria de síntesis de RNA viral, de ahí su nombre de partículas defectivas de interferencia (DI), las cuales pueden existir de dos formas básicas: por retrocopias (copy back RNA) y por segmentos de RNA borrado internamente. Las primeras se cree que son generadas durante la síntesis de la cadena negativa del genoma, donde la polimerasa termina prematuramente con el gen L y reinicia la síntesis de RNA, este tipo de copias son generalmente las más comunes y más pequeñas que los segmentos de RNA borrado, que corresponde a lesiones internas del RNA. (2,3,4,15,17,18,30).

Las infecciones persistentes *in vivo* pueden deberse a varios mecanismos. En ocasiones es suficiente una baja infección mediada por la presencia de partículas defectivas que interfieren con la producción de virus infeccioso. Sin duda para establecer una infección persistente se requiere que el virus cambie a una fenotipo no lítico, o que las células infectadas no presenten un ciclo de infección lítica. En estados

de persistencia puede ser necesaria la continua replicación del genoma viral en contraste con una infección latente como las causadas por ciertos virus DNA, donde la expresión viral esta estrechamente controlada por genes virales y la réplica del genoma se realiza al mismo tiempo que la división celular, (2,3,4,17,18,30).

En todas las infecciones persistentes por paramixovirus , el virus retiene la capacidad de codificar algunas proteínas funcionales involucradas en la transcripción o replicación del virus, pero la falta de otras proteínas necesarias para completar el ciclo viral, ocasiona que se establezca en la célula un equilibrio entre partículas completas y partículas DI. Esto puede ocurrir en sitios antigénicamente privilegiados como el sistema nervioso central (SNC) en donde existen células de larga vida como las neuronas. O bien se logran transmitir de una célula a otra evitando el contacto con el sistema inmune del huésped, esto sería un evento importante en la manutención del estado de persistencia. (2,3,4,15,17,18,30)

En el huésped, la respuesta inmune puede ser evadida, debido a la infección de células que no son expuestas a éste, o por la selección de variantes de virus, que hacen que no se expresen eficientemente proteínas virales en la superficie de la célula infectada, contra las que el huésped ya es inmune, evitando la activación de las células T citotóxicas, que son consideradas como las más importantes efectoras en la respuesta inmune contra infecciones virales.(30)

Muchos mecanismos han sido asociados con el establecimiento de infecciones persistente por virus de la familia paramixoviridae, los más frecuentemente descritos involucran la presencia de partículas defectivas de interferencia. Investigaciones recientemente realizadas por Hjertner y col. 1997.(17), con el Rubulavirus porcino (LPiMV) han demostrado la capacidad del virus para producir infección persistente en la línea celular PK15. Esta infección fue realizada, a partir de la infección de células normales, con una alta proporción de partículas virales por célula; las células que sobrevivieron, que en la mayoría de los casos fue abajo del 5% del número original, fueron subcultivadas y analizadas hasta 25 pases, cuando empezaban ha crecer con un monoestrato estable En el pase 65, las células persistentemente infectadas (Pi), exhibían un bajo crecimiento con la formación de sincitios y vacuolización.

Posteriormente fueron reinfectadas con LPMV y no se observó lisis celular a diferencia de cuando fueron expuestas con el virus de estomatitis vesicular donde fueron lisadas rápidamente. En el análisis de las proteínas virales se observó que las proteínas NP, P, M, F y HN del LPMV, se detectaron, en bajas cantidades en las células persistentemente infectadas y en las células con infección lítica. También observaron la presencia de partículas defectivas en sus dos variantes, copy back y las borradas internamente. Especialmente fue el efecto en la expresión de la proteína L, la cual decreció notablemente, aunque no estuvo totalmente ausente. Los autores consideran que esta proteína L, como parte esencial en su actividad de polimerasa (L) del LPMV puede tener un papel importante en la manutención del estado de persistencia, (2,3,4,15,17,18,30)

Durante 1998, Ann-Christin, y col., comprobaron mediante procedimientos de biología molecular (RT-PCR) la persistencia del LPMV, en cerdos experimentalmente infectados que sobrevivieron a la infección aguda (cerdos convalecientes) y demostraron la reactivación de la proteína estructural viral NP, mediante la inmunosupresión con esteroides. En estos estudios no se encontró virus infeccioso en ningún tejido evaluado, sin embargo se detectó, la presencia de RNA genómico viral y RNAm en cerebro medio de los cerdos convalecientes específico para el gene P, y en cerdos con adición de tratamiento de inmunosupresión; también se detectó RNA específico para el gen P y NP en mesencéfalo, región encefálica anterior, cerebro anterior y pulmones hasta 56 días post-infección. Este RNA genómico y el RNAm se encontró en pequeñas cantidades, además de que se demostró *in vitro* mediante el análisis de extensión del cebador, que este RNA es transcripcionalmente activo. . Estos hallazgos indican la persistencia de RNAm y genómico específico de algunas proteínas estructurales (NP y P) del LPMV, en animales que se recuperan de una infección experimental aguda. (2).

2.6 RECEPTORES CELULARES DEL LPMV.

Para el establecimiento de una infección viral se encuentran involucrados componentes virales y factores propios del hospedero, la expresión de moléculas de

superficie denominadas receptores, permiten al virus adherirse, fusionarse y /o penetrar a la célula. Reyes y col.1998 (32) en investigaciones de los mecanismos de respuesta al LPMV, demuestra que el virus reconoce receptores glicoconjugados celulares que contienen ácido siálico, unidos en enlace alfa 2,3. Se identificó la expresión abundante de estos receptores en tejido respiratorio y nervioso de cerdos neonatos, principalmente bulbo olfatorio, hipocampo, corteza cerebral, mesencéfalo, cerebelo y médula oblonga con ligera expresión en aparato urogenital. En cerdos adultos de 9 meses, se identificó una amplia expresión en sistema respiratorio y linfático. Sin embargo la expresión de este tipo de ácido siálico disminuyó notablemente en tejido nervioso, siendo nula en las regiones nasal y cerebral del nervio olfatorio, en su lugar se encontró en todo el sistema nervioso central, un isómero alfa 2,6. Esta diferencia en el cambio de receptores expresados en la célula, varía dependiendo de la edad y el tipo de tejido y parece ser determinante en las diferencias en la susceptibilidad tisular a la infección por LPMV. Es decir, que el tipo de ácido siálico expresado en diversos tejidos cambia conforme madura el organismo y condiciona la susceptibilidad del cerdo .(29,32,33,55).

2.7 RELACION CON OTROS PARAMIXOVIRUS.

Investigaciones realizadas por Moreno, y col., 1986 (23), determinaron que las proteínas del Rubulavirus porcino LPM, comparten homología con proteínas del virus de Parainfluenza bovina tipo 3 (PIV-3) cepa U-23 y con las del virus de la enfermedad de Newcastle cepa Montana. No se observó reacciones cruzadas en pruebas serológicas contra el virus de Parainfluenza humana tipo 1,2, y 3, paperas, sarampión, respiratorio sincitial, Newcastle y PIV-3. La homología que presenta con los virus del género de los Rubulavirus, es de 41% en la HN con el virus de paperas (MuV), y 43%

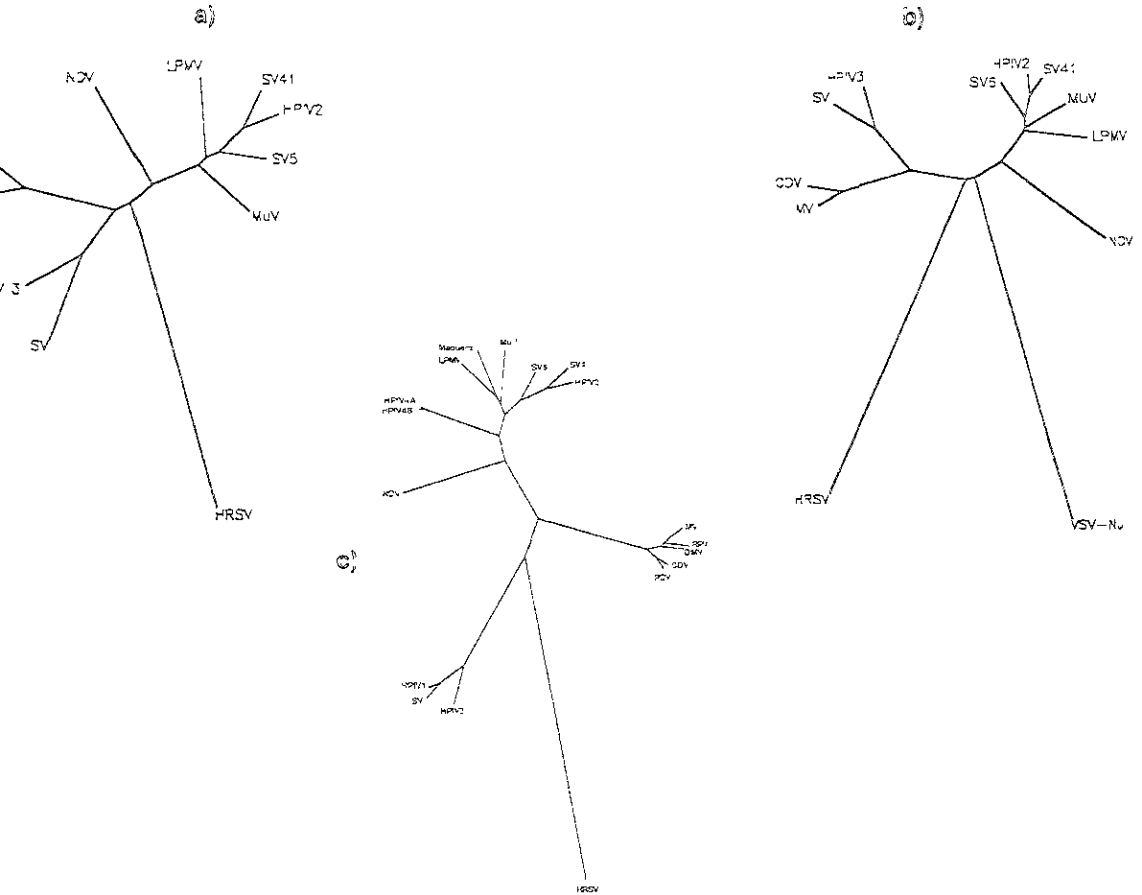


Fig. 2. Propuestas de los árboles filogenéticos, basados en el análisis de la secuencia completa de aminoácido de las proteínas F (a), L (b) y NP (c) del LPMV, comparadas con otros virus RNA de cadena negativa, utilizando el paquete de software PHYLIP (49).

con el virus de los Simios 5 (SV5). La comparación de los aminoácidos de la proteína M₁ revelan una homología del 46% con el virus de Paperas, 36% con el virus SV5 y 25% con el virus de Newcastle. Hasta la fecha no se han encontrado relaciones antigénicas, sin embargo Svenda, y col. 1998. (49), ha realizado estudios filogenéticos y ha comparado los alineamientos de las proteínas del LPMV y las proteínas análogas de otros virus dentro del orden de los monomegavirales, proponiendo la construcción de árboles filogenéticos de acuerdo a la clasificación del LPMV y en comparación con los otros virus de la familia Paramixoviridae, en relación al estudio de tres proteínas, la proteína F y L y NP, como se muestra en la Fig. 2. (3,4,5,6,9,23,26,46, 49, 54).

3. DIAGNOSTICO

Los signos clínicos clásicos de la enfermedad, permiten establecer un diagnóstico clínico presuntivo. Sin embargo es necesario demostrar la presencia del virus o de anticuerpos específicos contra el mismo. La necropsia y el estudio histológico ayudan en el diagnóstico.

En el diagnóstico serológico contra el Rubulavirus porcino, se han utilizado diferentes pruebas como son; la prueba de inmunoperoxidasa (DGSA) e inhibición de la hemoaglutinación . Sin embargo se ha demostrado que estas prueba son menos sensibles que las pruebas de ELISA y seroneutralización . Actualmente la utilización de métodos inmunoenzimáticos favorece la mejor combinación de rapidez, sensibilidad y facilidad en el diagnóstico serológico. Recientemente Nordengrahn y col., 1999 (25) desarrollaron un Kit de diagnóstico basado, en un ELISA por bloqueo, en el cual se utiliza un conjugado a base de un anticuerpo monoclonal específico dirigido a la glicoproteína Hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del LPMV, (*Svanova Biotech Uppsala Sweden*), (12,13,22,24,25,41).

Para el diagnóstico preciso se requeriría idealmente; del aislamiento del virus a partir del encéfalo, tonsilas y pulmones, así como la identificación del virus por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra la Nucleoproteína, (12,41,54).

En la necropsia, no existen lesiones específicas de la enfermedad , generalmente se encuentran asociaciones. (41,44,45,54)

Histológicamente en el cerebro se observa meningoencefalitis no supurativa. gliosis focal , infiltración peri vascular de linfocitos y células plasmáticas. Necrosis, neuronofagia y coroiditis, (1,24,27,41,44,45)

JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha los estudios de persistencia en animales convalecientes, están limitados a infecciones experimentales con el *Rubulavirus porcino* y observaciones a corto plazo. Los animales expuestos a brotes naturales, que permanecen en las granjas, pueden ser fuente de propagación del virus en el hato.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio inmunopatológico en cerdos que se recuperan de la infección aguda (convalecientes) con Rubulavirus porcino, causante de la Enfermedad del Ojo Azul en cerdos..

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la presencia del virus en diferentes tejidos, mediante pruebas de Aislamiento viral, Hemaglutinación Hemadsorción, Inmunofluorescencia, Inmunohistoquímica y Microscopia electrónica.
- -Determinación de su estado inmunológico mediante la detección de anticuerpos circulantes específicos hacia el virus y la determinación de poblaciones de linfocitos CD4 y CD8.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 ANIMALES.

Se localizó una granja porcina con casos clínicos y antecedentes de un primer brote de *Rubulavirus porcino*, para la adquisición de animales positivos, también se localizó una granja sin antecedentes de presentación de brotes de la Enfermedad del Ojo Azul, certificada libre de la enfermedad.

Todos los cerdos se trasladaron a las Unidades de Aislamiento del CENID-Microbiología, donde se mantuvieron durante 9 meses.

4.1.1 CERDOS POSITIVOS (convalecientes)

La granja fue localizada en el Edo. de México, municipio de Zumpango, con una población promedio de 300 vientres de raza Yorkshire, con un sistema de producción de ciclo completo y reemplazos de la misma granja. El brote tenía dos meses de haberse presentado, los síntomas clínicos observados en la granja fueron los característicos de la Enfermedad de Ojo Azul, observando afectadas las diferentes áreas de producción. En la granja se vacuna contra Fiebre porcina clásica y Enfermedad de Aujeszky.

Se realizó un muestreo de 10 animales de 5 semanas de edad; la selección fue orientada a aquellos cerdos que presentaban elevado título de anticuerpos (Ac) específicos contra el *Rubulavirus porcino* LPMV, detectados por la prueba de ELISA y sintomatología clínica de esta enfermedad (presencia de opacidad de cornea uni o bilateral y secuelas nerviosas como tortícolis), que sugirió la infección previa por este virus. Una vez identificados, se adquirieron 5 cerdos, de 30 Kg. de peso y de 15 semanas de edad (tres hembras y dos machos), los que se encontraron dentro de la misma etapa de producción (destete).

4.1.2. CERDOS NEGATIVOS (controles)

Para la obtención de los cerdos controles negativos y/o centineas, se localizó una granja perteneciente a la UNAM, unidad Jilotepec Edo. Mex, con cerdos

serológicamente negativos y aislamiento negativos al LPMV. Se obtuvieron 6 cerdos negativos de 8 semanas de edad (recién destetados), provenientes de esta granja certificada libre de la Enfermedad de Ojo Azul, serológicamente negativos al LPMV, para formar el grupo control.

4.2 LINEA CELULAR

Se cultivó la línea celular Pk 15 en su pase 18, en botellas de plástico especiales para cultivo celular (NUNC) con medio de cultivo mínimo esencial (MEM, Gibco), adicionado con un 10% de suero fetal bovino (In Vitro).

4.3 VIRUS

La cepa de referencia del LPMV fue donada por el Dr. Moreno López, en su quinto pase en cultivos celulares y se propagó en línea celular PK15. Se inoculó un monoestrato confluyente en un equipo de "Cell Factory" (NUNC) de dos pisos. Se retiró el medio de cultivo y se inoculó con la cepa de referencia en volumen de 5 ml por piso, se inclinó para cubrir el monoestrato con el virus, cada 15 minutos. Una vez transcurrido 60 minutos de adsorción viral, se procedió a lavar las células con Solución amortiguada de fosfatos (PBS) y se cubrieron con Medio Mínimo Esencial (MEM) adicionado con 2% de suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37°C, en una estufa con suministro de CO₂ (2%). Las células se observaron diariamente en un microscopio invertido. Cuando en el monoestrato se identificó el 80% de lisis celular, se mantuvo a 4°C. durante 2 horas, se colectó el sobrenadante y se distribuyó en criotubos, en alícuotas de 1 ml, finalmente se congeló a -196°C en Nitrógeno líquido. Para titular la cosecha viral, se descongeló una ampolleta se centrifugo a 400g en una centrifuga MSE y se tituló por la técnica de IH. Para cada prueba de seroneutralización se descongeló una alícuota fresca de virus. El título se calculó por el método de Reed and Muench.(12).

4.4 SUEROS

Para obtención del suero, las muestras sanguíneas de cada cerdo, se centrifugaron a 400g en una centrifuga MSE, el cual fue separado en condiciones de esterilidad, se envasó en crioviales, se identificaron las muestras y se conservaron en

congelación -20°C . hasta su utilización. La determinación de anticuerpos circulantes, específicos contra el Rubulavirus porcino (LPMV) se realizó mediante la prueba de Seroneutralización en cultivo de tejidos (SN) y prueba de ELISA por bloqueo (Svanova), y (1,12,13,25).

4.5 LEUCOCITOS

De los cerdos infectados y controles, se recolectaron muestras sanguíneas en tubos vacutainer con Heparina. La obtención de leucocitos fue mediante la separación de leucocitos del resto del paquete celular con un gradiente de Ficoll-Hypaque 1077 (Sigma, St. Louis .MO). Las moléculas de membrana (CD4+,CD8+, CD4+CD8+) en la población de linfocitos se determinó por el método descrito por Summerfield y col., 1996. (48) La cuantificación se realizó, mediante Citometría de flujo. (16, 50).

4.6 ANTICUERPO MONOCLONAL

Se empleó el anticuerpo monoclonal contra la nucleoproteína NP, previamente titulado a una dilución de 1:200; para la identificación del virus mediante la técnica de Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica; para estas pruebas se realizó el marcaje respectivo con Anti Ig-G de ratón acoplada a fluoresceína y avidina-biotina, respectivamente,(1,24).

Para la prueba de Citometría de flujo se utilizó Anticuerpos monoclonales de ratón (MAb), específico para diferenciación de moléculas de cerdo, (VMRD, Washington D.C.) fueron ; Mab 74.124, IgG2b anti-CD4; MAb 76.2.11, IgG2a anti-CD8; Conjugado de cabra policlonal anti-ratón IgG, marcado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC); Conjugado de rata Mab anti-ratón IgG2a, conjugado con phycoeritrina (PE); Conjugado de rata FITC, MAb anti-ratón IgG2b (Becton& Dickinson), (16, 50).

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se formaron 5 grupos integrados por dos animales cada uno (un cerdo seropositivo y uno seronegativo como centinela), además se mantuvo un cerdo fuera de estas

instalaciones como control negativo. Cada grupo se colocó en 5 unidades aisladas, con alimentación controlada dos veces al día (2 kg/día) y agua *ad libitum*. De todos los animales, se obtuvieron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja, cada 15 días, se separó el suero y se mantuvo en congelación hasta su empleo en las pruebas serológicas correspondientes. En cada grupo de cerdos, se sacrificaron 2 animales, con intervalos de 45 días. El cerdo testigo negativo, se sacrificó al término del experimento.

Simultáneamente, al inicio del experimento se tomaron, muestras de hisopos nasales, para aislamiento viral a todos los cerdos en experimentación. También se realizó diagnóstico serológico diferencial para Fiebre Porcina Clásica y el Síndrome Reproductivo y Respiratorio del Cerdo (PRRS), mediante la prueba de ELISA.

5.2 MUESTRAS DE TEJIDOS.

Inmediatamente después del sacrificio de los cerdos infectados y controles, se obtuvieron muestras de los siguientes tejidos: Corteza Cerebral, Médula oblonga, cordón espinal, Cerebelo, Bulbo olfatorio, Nervio óptico, Ojo, Traquea, Mucosa nasal, Mucosa bronquial, Pulmones, Tonsilas, Timo, Bazo, Médula ósea, Nódulos linfoides, Glándulas salivares, Hígado, Riñón, Corazón y Páncreas. Para las pruebas de Inmunohistoquímica e Histopatología, se fijaron en solución amortiguada de Formol al 10%. Para pruebas de aislamiento viral, se preservaron en medio de cultivo (MEM) con antibiótico (penicilina-estreptomicina). Simultáneamente se tomaron muestras de tejidos en crió viales para su almacenamiento en nitrógeno líquido. Para pruebas de microscopía electrónica, se colocaron muestras de tejido en solución amortiguada de Glutaraldehído al 1%, adicionado con Paraformaldehído al 4%.

5.3 PRUEBAS ESPECIFICAS

5.3.1. AISLAMIENTO VIRAL

Con la suspensión de tejidos de los cerdos infectados naturalmente por LPMV y de cerdos negativos, se realizó la prueba de aislamiento viral en células Pk15, cultivadas en microplaca de 24 pozos, para evidenciar la presencia de LPMV, mediante

la observación de CPE, ocasionado por la presencia del virus, y para su análisis mediante la prueba de Hemoaglutinación y Hemoadsorción . (Apéndice 1).

5.3.2. HEMOAGLUTINACIÓN (HA) Y HEMOADSORCIÓN (Had).

Estas pruebas se basan en la detección de la expresión de la proteína estructural HA del LPMV utilizando glóbulos rojos de pollo; la prueba de Hemoadsorción se realizó, con los monoestratos de células PK15, inoculados con las muestras problema, éstos fueron lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) e incubados con glóbulos rojos al 2.5% en temperatura ambiente durante 30 min. Inmediatamente después, fueron lavados con PBS por tres tiempos para retirar los glóbulos rojo no adsorbidos y examinados por el microscopio invertido. La prueba de Hemoaglutinación fue realizada con los sobrenadantes de los cultivos inoculados, el efecto de aglutinación de glóbulos rojos de pollo, se observó a través de un microscopio de luz. (Apéndice 1)(12,24)

5.3.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Para evidenciar la presencia de antígeno viral, se utilizó la prueba de inmunohistoquímica descrita por Haines DM, y Chelack BJ. 1991. (55), los diferentes tejidos de cerdos convalecientes y controles, fueron incluidos en parafina, para posteriormente realizar cortes de 4 micras en Micrótomo. La identificación de la presencia de antígeno viral se realizó mediante la adición del anticuerpo monoclonal específico dirigido hacia la NP del LPMV, en combinación con un segundo monoclonal anti IgG de ratón marcado con el sistema Avidina-Biotina, revelada con el sustrato de Fosfatasa alcalina. Las muestras fueron observadas al microscopio de luz. (12,56)

5.3.4. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IF).

Se realizaron cultivos de células pK15 en portaobjetos (Lab tek), posteriormente fueron inoculadas , con una suspensión (20%) de los diferentes tejidos para aislamiento viral de los cerdos convalecientes y controles . Se incubaron durante 72 hrs., se fijaron con acetona al 100% durante 20 min.. La identificación de la presencia de antígeno

viral se realizó mediante la adición del anticuerpo monoclonal específico dirigido hacia la NP del LPMV, en combinación con un segundo monoclonal anti IgG de ratón marcado con fluoresceína, la evaluación se realizó en un microscopio de fluorescencia, (Apéndice 1). (12,24)

5.3.5 SERONEUTRALIZACIÓN EN CULTIVO DE TEJIDOS (SN).

Para la realización de SN, se trabajaron placas de 96 pozos estériles marca "NUNC" de fondo plano, los sueros se inactivaron a 56 °C durante 30 min. y la infección se realizó con 200 TCID₅₀/0.05ml. de LPMV, utilizando la línea celular PK15, de acuerdo con la técnica descrita por Mc Neilly, (Apéndice 1) (12,24).

5.3.6 PRUEBA DE ELISA (bloqueo)

Se trabajó con el Kit Svanovir, (Svanova Biotech Uppsala Sweden), desarrollado por Nordengrahn y col. 1999., para detectar anticuerpos específicos hacia el LPMV. La prueba se basa en la utilización de un anticuerpo monoclonal dirigido hacia la glicoproteína HN, tiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 97%, los resultados de la estandarización de ésta prueba fueron concordados con la prueba de ELISA indirecta, Inhibición de la Hemaglutinación, Inmunofluorescencia indirecta, prueba de virus neutralización, (Apéndice 1) (25).

5.3.7 CITOMETRIA DE FLUJO

Con la suspensión fresca de leucocitos de los diferentes grupos de animales, se determinó la presencia de las diferentes moléculas de expresión (CD8+, CD4+, CD4+CD8+) en la población linfocitarias, por el método descrito por Summerfield y col., (1996), Para la cuantificación por Citometría de flujo, de las células CD4+ Ó CD8+, fueron incubados los linfocitos con el monoclonal de ratón específico hacia los diferentes fenotipos, seguido de la incubación con el conjugado marcado específicamente. En el caso del análisis de la población doblemente marcada (cd4+-cd8+), se utilizaron los Mabs anti-cd8 (76.2.11) y anti-cd4 (74.12.4) seguido por la incubación con ambos conjugados FITC y PE de Mabs respectivamente, dirigidos hacia el isotipo específico. Todas las incubaciones fueron realizadas a 4°C por 15 min., las células fueron lavadas con PBS 0.1M pH 7.2, 0.2% BSA y 0.1% NaN₃. Las células

marcadas fueron analizadas por el citofluorómetro (FAS Calibur Becton&Dickinson, Mountain. View.C.A.). (16,48).

5.3.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para el estudio de los tejidos por microscopia electrónica, se cortaron porciones de tejido muy pequeño (1mm^3), para que la superficie expuesta en contacto con el fijador fuera mayor en relación al volumen de éste. La fijación, deshidratación, e inclusión de tejidos, así como, los corte fino y ultrafinos, se realizaron de acuerdo al método descrito por Brenda y col., 1972, finalmente el contraste, se realizó mediante la utilización de Acetato de uranilo, Hidróxido de plomo y/o Citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en un Microscopio electrónico JEM-100S. (apéndice 1),(58).

5.3.9. RT-nested PCR del LPMV (RNA)

El total del Rna fue purificado utilizando un Kit comercial Rnaid (BIO 101) y un RNA polIA(+) fue purificado utilizando el Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech) de acuerdo al protocolo de manufactura. Para desnaturalizar el RNA , de 1 –10 μg de RNA en un volumen de 9 μl fueron calentados (70°C , 5 min.), posteriormente se realizo una mezcla con las transcriptasa reversa en 20 μl conteniendo 4 μl de buffer 5x RT (250 mM Tris-HCL pH 8.3. 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2 50mM DTT), 4 μl 2.5mM dNTP mix, 1 μl 33 u/ μl RNA (Pharmacia Biotech), 1 μl 200 u/ μl de transcriptasa reversa (Promega) y 1 μl 20 pmol/ μl primer (random hexamer, oligo (dt) o la secuencia específica del genoma del LPM V (gen-NP); Los cebadores del gen NP del LPMV, fueron designados de la secuencia del gen NP descrita por Svenda, y col., con la siguiente secuencia:

cebador externo, 5'- ATTCTCCTTGCCTGCTGCTGCTAT-3' (sentido)

y 5'-AGTGCCAAGTATCGTGCCTGTTCA-3' (antisentido);

cebador interno, 5'- TCCCCGATGCGATTATTGAG-3' (sentido),

y 5'-CCCCCTTCGAGCTGGATTCTG-3' (antisentido). El producto final anidado fue 375 pares de bases (bp). El método y la Cuantificación se realizó como se describe en Ann.Christin y col. 1998.(2).

6. RESULTADOS

6.1 Signos clínicos. Durante el periodo de observación, los cerdos permanecieron clínicamente sanos, sin cambios en su comportamiento. Uno de los cerdos que presentaba opacidad de la cornea bilateral, no presentaba visión de un ojo.

6.2 Aislamiento viral

El análisis de las muestras de hisopos nasales para aislamiento viral, resultaron negativos para ambos grupos de cerdos (convalecientes y controles), al no observar efecto citopático en las células inoculadas, indicativo de la falta de virus infeccioso.

En las muestras de tejidos trabajadas, para aislamiento viral tampoco se observó efecto citopático después de 72 hrs. de incubación, los monoestratos inoculados se analizaron posteriormente, mediante la prueba de HA, Had e Inmunofluorescencia indirecta.

6.3 Análisis por Hemoadsorción y Hemoaglutinación.

El resultado del análisis por la prueba de Hemoadsorción de los monoestratos de células PK15, inoculados con la suspensión de los hisopos nasales y de tejidos de los cerdos convalecientes, resultaron negativos al no presentar el fenómeno de adsorción de glóbulos rojos con las células inoculadas con las muestras problema. A diferencia del control de células positiva infectadas, que adsorbieron los glóbulos rojos por la presencia de la actividad hemoadsorbente del virus en la superficie de la células.

El análisis de los sobrenadantes de estas muestras por la prueba de Hemoaglutinación, tampoco presentaron actividad hemoaglutinante, lo cual se manifestó por la sedimentación de glóbulos rojos. A diferencia de la muestra control positivo, donde se presentó la reacción característica de hemoaglutinación de glóbulos rojos característico de la presencia de HN viral. De igual forma fueron analizados los sobrenadantes y monoestratos inoculados con las diferentes muestras de cerdos controles seronegativos, por la prueba de Hemoaglutinación y Hemoadsorción respectivamente, con resultados negativos en todas las muestras evaluadas.

6.4 Análisis de la presencia de Antígeno viral por Inmunofluorescencia:

Esta prueba se realizó en los cultivos de células PK15, infectados con las muestras de hisopos nasales y los diferentes tejidos colectados. En la Figura 3. se puede ver la reacción del control positivo (células infectadas con LPMV), por la presencia de cuerpos ovoides fluorescentes en el citoplasma de las células, indicativo de la presencia de nucleoproteína viral, a diferencia de las muestras problemas, donde no se observó este tipo de reacción resultando negativas.

6.4 Análisis de la presencia de Antígeno viral por Inmunohistoquímica.

Se analizaron los diferentes tejidos de los cerdos convalecientes y de los cerdos controles citados en material y métodos, por la prueba de Inmunohistoquímica. Las muestras que resultaron con evidencias de reacciones positivas, que sugieren la presencia de Nucleoproteína viral del LPMV, fueron tejidos como: bronquios, plexo coroides, tonsilas y Páncreas (Figura 4 y 6), donde se observó la presencia de estructuras ovoides en el citoplasma de la célula teñidos de un color rojizo por efecto de la reacción del sustrato utilizado en esta prueba (Fosfatasa alcalina); Los tejidos de los animales controles no presentaron evidencia de reacción positiva. (Fig. 5, y 7 ; Cuadro 1y 2).

6.5 Inmunidad Humoral

6.5.1 Seroneutralización

El título de lote producido para este estudio fue de 10^7 TCID₅₀ / 0.05 ml., con una actividad hemoaglutinante de 1:64 en glóbulos rojos de pollo. Los resultados de la determinación de anticuerpos circulantes por la prueba de ELISA y Seroneutralización en cultivo de tejidos fueron: en la prueba de Seroneutralización se obtuvieron títulos de entre 1: 2 y 1: 16 para los cerdos convalecientes; los cerdos centinelas y el cerdo control no infectado, no mostraron anticuerpos, permanecieron seronegativos hasta la fecha de su sacrificio. (Cuadro 3).

6.5.2 ELISA.

Los resultados de serología por la prueba de ELISA (KIT Svanova), para los cerdos infectados, muestran niveles elevados de anticuerpos, los cuales están expresado en porcentajes de inhibición (PI) de acuerdo al ELISA por bloqueo (PI) 80 y

97%). Los títulos elevados se mantuvieron durante el período de observación; los cerdos centinelas negativos permanecieron seronegativos hasta el término del experimento (PI 5 a 20%). (Cuadro 4 y 5).

6.5.3 Análisis Seriológico diferencial

Con respecto a la serología diferencial realizada para Fiebre porcina clásica y PRRS, se observó: para Fiebre porcina clásica la presencia de anticuerpos en todos los animales convalecientes de *Rubulavirus porcino* LPMV, al inicio y término del experimento. A diferencia de los cerdos controles negativos que permanecieron seronegativos desde el inicio hasta finalizar el experimento. Con relación a la serología realizada para PRRS, se detectó la presencia de anticuerpos en los cerdos convalecientes, mismos que se mantuvieron hasta el sacrificio de los animales; a diferencia de los cerdos controles, que no presentaron evidencias de anticuerpos durante el período de observación.

6.6 Inmunidad Celular

El análisis citofluorométrico para la identificación del fenotipo de los linfocitos presentes en los cerdos infectados comparado con los cerdos controles, no existió diferencias estadísticamente significativa entre las diferentes poblaciones de linfocitos de los dos grupos de cerdos. Para las células CD4+ se cuantificaron porcentajes promedio de 9.5% para los cerdos convalecientes y 12.4% para los cerdos controles. Con respecto al valor de las células CD8+ se observó de igual forma valores similares en los diferentes grupos de cerdos, 40.04% para los cerdos convalecientes y 32.8% para los cerdos controles. Las células T doblemente marcadas (CD4+CD8+), se obtuvieron porcentajes de 15.37% para los cerdos convalecientes y 8.1% para los cerdos controles. (Fig. 8).

6.7 Hallazgos a la necropsia

En la necropsia no se encontraron lesiones en los diferentes órganos muestreados, en ninguno de los animales en estudio.

6.8 Análisis histopatológico

En el análisis histopatológico se observaron cambios patológicos en diferentes tejidos evaluados, en SNC se observó satellitosis en corteza, cerebro medio,

epéndimo y médula; hiperemia en plexo corooides. En pulmones, se observó neumonía intersticial con engrosamiento del septo alveolar con la presencia de células mononucleares, en los cerdos convalecientes, además se observó aumentada la cantidad del Tejido linfóide asociado a bronquios (BALT) en algunos de los cerdos. Sin embargo estos cambios no se consideran característicos de la EOA, ya que algunos de estos cambios también fueron encontrados en los cerdos controles. En Tonsilas, Páncreas, Epitelio de la Glándula salival, Nervio óptico y Trigémino, no se observaron cambios histopatológicos aparentes en ninguno de los dos grupos de cerdos.

6.9 Microscopía electrónica

En las observaciones realizadas al microscopio electrónico, de tejido pulmonar, específicamente la zona del epitelio bronquial, no se observó la presencia de partículas virales completas en el epitelio bronquial.

6.10 Resultados preliminares por RT-PCR

Las muestras de tejido de cerebro medio, bulbo olfatorio y páncreas, han sido trabajadas mediante pruebas de RT-PCR, utilizando cebadores dirigidos hacia la Nucleoproteína del LPMV, obteniendo evidencias de la presencia de RNA de la Nucleoproteína viral del LPMV, en cerebro medio de dos de los cinco cerdos infectados (Cerdo 2 y 5), en bulbo olfatorio de tres de los cinco cerdos infectados (Cerdo 1,3 y 4), y en Páncreas dos de los cerdos infectados (Cerdo 3 y 5), a diferencia de el cerdos control negativo, donde no se presenta ningún tipo de evidencia positiva. Estas pruebas han sido trabajadas con tres repeticiones, obteniendo los mismos resultados. (Datos no mostrados) (57).

DISCUSION

El hecho de que los cerdos convalecientes permanecieran clínicamente sanos, es indicativo de que los cerdos infectados que se recuperan de la fase aguda de la infección por Rubulavirus porcino, permanecen asintomáticos y clínicamente sanos, esta observación coincide con las investigaciones realizadas por Stephano y col, 1985, donde sugieren que una vez que la enfermedad clínica desaparece, los animales permanecen asintomáticos.

En las pruebas de aislamiento viral, no se observó evidencia de antígeno viral en tejidos, suero, ni en secreciones nasales (hisopos) de los cerdos convalecientes. Esto se explica si se considera que nuestros cerdos en experimentación, convalecientes de la Enfermedad del Ojo Azul, tenían entre 5 y 13 meses post-infección. Comparado con las investigaciones realizadas en cerdos infectados experimentalmente por Allan, y col., 1996, donde cuantificaron la cantidad de LPMV en suero, secreciones nasales, heces fecales y orina; recuperan el virus de hisopos nasales entre el día 3 y 7 post-infección en cerdos de 17 días de edad, además sugieren que la excreción viral nasal es más importante que la fecal. En orina encontraron los títulos mas elevados con respecto a las otras secreciones. Comparativamente, bajo las condiciones en que se desarrollo nuestro experimento, los cerdos convalecientes, presentaban períodos pos-infección muy largos, lo que explica la falta de excreción de virus, ya que la eliminación del virus se efectúa durante la fase aguda de la infección, aún cuando el virus persista en el organismo de los cerdos.

Resultados similares de la no recuperación de virus infecciosos, de los cerdos convalecientes de la infección por LPMV, en las pruebas de aislamiento viral de hisopos y de muestras de tejidos, confirmadas por inmunofluorescencia, fueron observados en estudios realizados por Ann-Christin, y col. 1998, donde estudian cerdos convalecientes de la infección experimental con el LPMV (53 días post-infección) y no detectan la presencia de virus infecciosos en tejido de cerebro medio, cerebro anterior, ni pulmones. Con estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que en cerdos convalecientes que se recuperan de la fase

aguda de la infección por Rubulavirus porcino, no es posible la recuperación de virus infeccioso.

Los resultados negativos obtenidos en las pruebas de hemoadsorción y hemoaglutinación de los monoestratos inoculados con las muestras de tejidos de cerdos convalecientes, son indicativos de la falta de expresión de la proteína Hemoaglutinina en la superficie de las células, debido a la no infección viral por LPMV, dado que estudios de la caracterización del virus realizados por Moreno-López, y col. 1986 (23) demuestran que el LPMV posee actividad hemoaglutinante y hemoadsorbente con eritrocitos de pollo, cobayo, cerdo, conejo, etc. Actividad que en nuestras células PK15, inoculadas no se presentó.

Una posible explicación de la no excreción o la falta de cantidades detectables de virus, sería; la neutralización de las partículas virales por los abundantes anticuerpos circulantes y/o la adecuada inmunidad celular estimulada durante el curso de la infección por la destrucción de las células infectadas que exhibían en su superficie los antígenos virales para mantener una adecuada estimulación inmune.

La evaluación de los cerdos controles en las pruebas de aislamiento viral, tampoco se observó evidencia de antígeno viral en tejidos, suero, ni en secreciones nasales (hisopos). Una explicación de que los cerdos mantenidos en contacto y libres de la infección, demostraron no adquirir el virus, sin formación de anticuerpos circulantes, estaría en relación a la edad de los cerdos centinelas, ya que en investigaciones realizadas por Reyes-Leyva, y col. 1998. (32) demuestran que la susceptibilidad de cerdos a la infección por Rubulavirus esta asociada a la expresión celular de moléculas Neu Ac alfa 2,3Gal, reconocidas como receptores virales del LPMV, las cuales sufren cambios en su expresión dependiendo de la edad del cerdo (entre más jóvenes más susceptibles). En este trabajo, los animales utilizados como centinelas, tenían 8 semanas de edad y de acuerdo a lo citado anteriormente, sugiere que probablemente por su edad, se modificó la presencia de receptores celulares para el LPMV, por lo que disminuyó la susceptibilidad de los cerdos al virus. Resulta interesante para futuros experimentos, colocar en contacto con cerdos convalecientes de la Enfermedad del Ojo Azul, lechones recién nacidos o hembras gestantes

(aprovechando la inmunosupresión de la gestación), para discernir la posibilidad de infección y eliminación del virus por parte de los cerdos convalecientes,

En relación a estos resultados, se infiere que la exposición por contacto directo de cerdos convalecientes de la Enfermedad de Ojo Azul con cerdos susceptibles, no son capaces de adquirir la infección. Esto coincide con las observaciones de campo realizadas por Stephano, y col., 1989, donde menciona que cerdos susceptible (centinelas) introducidos a una granja 6 a 12 meses después de un brote, permanecen asintomáticos y seronegativos al LPMV.

La respuesta inmune celular de los cerdos convalecientes de la infección con el Rubulavirus porcino, evaluada mediante la determinación de las poblaciones linfocitarias CD4+, CD8+ y CD4+-CD8+, comparadas con los cerdos controles, indica una respuesta inmune normal, sin diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo el porcentaje de linfocitos doblemente marcados CD4+CD8+, observado en 3 de los cerdos infectados, con respecto a los cerdos controles, sugiere, que aún cuando no haya diferencias estadísticas en las poblaciones de los cerdos evaluados, no se descarta la posibilidad de que estén involucrados en la respuesta inmune celular a la infección por LPMV. Ya que determinaciones realizadas en cerdos adultos, 4 semanas posteriores a la infección experimental con el LPMV, por Hernández, y col. 1998, (16) identifican elevada concentración del fenotipo CD4+CD8+, y sugieren que posiblemente participa en la regulación de la respuesta inmune celular del cerdo en el control de la infección por el Rubulavirus porcino, además observaron que la participación de éste fenotipo de células, es específico de infecciones virales. Por lo tanto, el hecho de observar 5 meses pos-infección, en 3 de los cerdos convalecientes, un porcentaje elevado de esta población de linfocitos comparados con los cerdos controles seronegativos, sugiere la posible presencia de partículas virales defectivas que estimulen éste tipo de células, dada la evidente participación de los linfocitos CD4+CD8+, específico de infecciones virales. Si éstas diferencias en el porcentaje de las poblaciones no fueron estadísticamente significativas con respecto a los cerdos controles, se debe probablemente al número de animales evaluados, por lo que se sugeriría realizar un estudio con mayor número de observaciones.

Los resultados serológicos obtenidos, confirman que el virus infectante, indujo una fuerte respuesta humoral. Los elevados porcentajes de inhibición que se observaron en las muestras de suero evaluadas por ELISA durante la duración del experimento, (9 meses), confirma un elevado nivel de anticuerpos circulantes, estimulados posiblemente por la presencia de partículas virales defectivas. Esta hipótesis se apoya dada la facilidad con que los rubulavirus generan partículas defectivas y los hallazgos encontrados por Allan y col., 1998, al observar en cerdos infectados experimentalmente por LPMV, anticuerpos circulantes, indicativo de que los cerdos habían sido infectados, sin la evidencia de virus infeccioso en pruebas de aislamiento viral en tejido de cerdos hasta 14 días pos-infección.

Con este trabajo se demuestra que los animales infectados naturalmente por *Rubulavirus porcino*, concentran niveles elevados de anticuerpos circulantes durante por lo menos 13 meses post-infección. Lo cual coincide con las observaciones realizadas por Stephano y col., 1985 (44), donde se menciona que los animales infectados naturalmente desarrollan anticuerpos que usualmente persisten durante la vida del cerdo.

Con respecto a la reacción positiva observada en las pruebas de inmunohistoquímica, que sugiere la posible presencia de antígeno viral en plexo coroides, tonsila, pulmón y páncreas del LPMV, difiere con las observaciones realizadas por Ann-Christin y col. 1998, en cerdos experimentalmente infectados con el LPMV, donde analizan cortes de tejido de cerebro medio, cerebro anterior y pulmón, por la prueba de inmunofluorescencia, obteniendo resultados negativos a la presencia de antígeno viral. Una posible explicación a este efecto sería, el tiempo pos-infección de los cerdos convalecientes, relacionado al establecimiento de la infección persistente por el Rubulavirus porcino. Dado que en infecciones persistentes *in vitro*, en cultivos celulares (Pk15) realizadas por Hjerfner y col. 1997.(17), con el Rubulavirus porcino (LPMV), observaron que la infección de células normales con una alta proporción de partículas virales por célula; las células que sobrevivieron, fue abajo del 5% del número original, las cuales fueron subcultivadas y analizadas hasta 25 pases, cuando empezaron a crecer con un monoestrato estable. En el pase 65, las células

persistentemente infectadas (PI), exhibían un bajo crecimiento con la formación de sincitios y vacuolización. En el análisis de las proteínas virales se observó que las proteínas NP, P, M, F y HN del LPMV, se detectaron, en bajas cantidades en las células persistentemente infectadas. También observaron la presencia de partículas defectivas en sus dos variantes (copy back y borradas internamente). De acuerdo con lo anterior, el tiempo es un factor determinante para el establecimiento de la infección persistente por LPMV, nuestros cerdos tenían entre 6 y 13 meses post-infección al momento del sacrificio, lo cual representa un factor importante en el establecimiento de la infección persistente y por tanto la detección de antígeno viral.

En microscopía electrónica, no fue posible detectar la presencia de partículas virales en el epitelio bronquial de pulmones de todos los cerdos convalecientes, sin embargo existe la posibilidad de encontrar virus completos en algún otro órgano susceptible de infección por el Rubulavirus porcino.

La importancia de los hallazgos obtenidos del RNA de la NP viral del LPMV en el SNC de nuestros cerdos convalecientes infectados naturalmente, en concordancia con las investigaciones realizadas por Ann-Christin, y col., 1998., en cerdos experimentalmente infectado, que sobrevivieron a la infección aguda 53 días post infección, donde demuestran la presencia de RNA genómico viral y RNAm en cerebro medio de cerdos convalecientes específico para el gene P, y en cerdos con adición de tratamiento de inmunosupresión donde detectan la presencia de RNA m y genómico específico para el gen P y NP del LPMV en cerebro medio, cerebro anterior y pulmones, aportan evidencias para confirmar, que el virus es capaz de mantener una infección persistente en cerdos convalecientes que se recuperan de la fase aguda de la infección por LPMV. Sin embargo el hecho de aplicar tratamientos inmunosupresores modifica las condiciones normales de una infección natural. En nuestro estudio los animales no fueron objeto de tratamientos inmunosupresores (físicos o químicos) y estuvieron ajenos a estrés inmunológico; por lo anterior no es posible determinar, si algún tipo de estrés sería capaz de provocar una reactivación del virus con la consecuente eliminación de éste. Lo que sí podríamos afirmar es que la presencia de material genético viral en los cerdos que se recuperan de una infección

aguda infectados en forma natural, es independiente de la posible excreción o síntesis de partículas víricas infecciosas. Lo cual se confirma al no encontrar evidencias de virus infeccioso en hisopos nasales, ni respuesta inmunológica en los cerdos centinelas como resultado de una infección con LPMV.

Con los hallazgos obtenidos del RNA de la NP viral del LPMV en cerebro medio, bulto olfatorio y páncreas, y apoyados en la observación que hace Randall y col, 1991., al mencionar que el estado de persistencia viral en los Paramixovirus, puede ser activado por la presencia de material genético viral, aún cuando no exista replicación de virus infecciosos, podemos concluir que el Rubulavirus porcino es capaz de mantener una infección persistente en cerdos convalecientes, que se recuperan de la fase aguda de la Enfermedad del Ojo Azul.

Durante el mes de Marzo de 1999, se publicó en el Diario Oficial de la Federación, el acuerdo donde la Enfermedad del Ojo Azul es de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos y en el mes de Octubre de 1997, se publicó en el Reglamento para la Importación de Animales y Productos Animales (APHIS) de la Agencia de Servicios de Inspección en Salud Animal y Vegetal USDA, 1997, una norma donde se especifica que para el comercio internacional basado en la reglamentación del Code of Federal Regulations (CFR), título 9, capítulo 1, subcapítulo D, (49), se considera la presencia de la presencia de la Enfermedad de ojo azul en cerdos (blue eye disease of swine, paramyxovirus), como limitante para la importación de animales y productos de origen de cerdo. Además de las pérdidas económicas que la enfermedad per se produce a la industria porcina, el hecho que el Rubulavirus porcino, solo ha sido comunicado y aislado en México, convierte la enfermedad del Síndrome del Ojo Azul en una enfermedad exótica para los demás países del mundo, pudiendo ser ésta una limitante para la exportación de cerdos o sus derivados, ya que solamente de los Estados de la República que se declaran libres de la enfermedad podrán movilizar los cerdos hacia otros mercados.

La importancia de nuestros resultados con respecto al papel que juegan los cerdos que se recuperan de una infección aguda de Rubulavirus porcino, infectados en forma natural, dadas las condiciones naturales de la explotación de los cerdos en

México, donde la exposición a factores inmunosupresores es frecuente (hacinamiento, desnutrición, virus infecciosos inmunosupresores, etc.), no se descarta la posibilidad, que se presenten condiciones favorables para que se eliminen virus infeccioso, capaz de infectar animales susceptibles.

LITERATURA CITADA

1. Allan G.M., Mc neilly , F., Walker, L., Linné, T., Moreno - López J.- Hernandez- Jauregui, P., Kennedy, S., Carol, B.P., Herron, B., Forest, J.C. and Adair, B. 1996. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection in pigs, immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vy col. Diagn. Invest.* 8: 405-413.
2. Ann-Christin, Wiman., Hjertner, 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. *Journal of Neuro Virology* 4, pp.545-552.
3. Berg, M., Englund, L., Abusugra I.A., Klingeborn, B., and Linné, T. 1990. Close relationship between mink influenza (H10N4) and concomitantly circulating avian influenza viruses. *Arch. Virol.* 113. pp.61-71.
4. Berg, M., Desselberger, U., Abusugra. I.A., Klingeborn, B., and Linné, T. 1990. Genetic drift of equine 2 influenza A virus (H3N8), 1963-1988: Analysis by oligonucleotide mapping. *Vy col. Microbiol.* 22, pp.225-236.
5. Berg, M., Hjertner, B., Moreno-López, J. and 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, pp.1195-1200
6. Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J. and Linné, T., 1991. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: Comparative sequence analysis with other paramyxovirus. *J. Gen. Virol.* 72. pp.1045-1050.
7. Campos, H.R., Carvajal, S.M. 1989. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. *Memorias. AMVEC89.* Morelia pp.62-6
8. Campos M.E., Calderón S.E. y Solerio S., 1982. "The blue eye Syndrome". *Proc of The 7 th Congress of the International Pig Veterinary Society.* México D.F.p. 171.
9. Curt, M.H., Lamb, R.A. 1992. Studies on the Fusion Peptide of a Paramyxovirus Fusion Glycoprotein: Role of Conserved Residues in Cell Fusion. *Journal of Virology.* Vol. 66, No 4, pp. 2443-2455.

10. Correa, G. P., Martínez, L. A. 1997., Enfermedad del Ojo Azul, producida por el Rubulavirus porcino. Memorias. Ier. Simposium nacional de enfermedades virales y sus correlaciones . AMVEC.1997.
11. Correa, P., Pérez, J., Martínez, A., Coba, A., Córdova, D. 1998. Encuesta Nacional para detectar cerdos seropositivos a Rubulavirus porcino mediante la prueba de inhibición de la Hemaglutinación. Memorias XXXIII Congreso AMVEC. 1998, pp. 198-199.
12. Dinter Zvonimir. in Diagnostic Virology J. Moreno-López ED. Swedish University of Agricultural Sciences, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden and Swedish International Developing Authority. 1989. pp. 30
13. Engvall E, Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem* .8 pp 871
14. Galina, P.L.; Martínez, L.A.; Correa, G.P.; Colinas, T.A.; Anaya, E.A.M.; Aguilar, R.E.; Ramírez, N.R. 1989. Estudio experimental en cerdos de diferentes edades instilados por vías naturales con el paramixovirus porcino de la Piedad Michoacán. (PpLPM). Memorias. AMVEC89. Morelia pp.59-61.
15. Garcin, D., Melo, D.M., Roux, L., Kolakofsky, D. And Curran, J. 1994. Presence of a Truncated Form of the Sendai Virus P Protein in a Long-Term Persistent Infection: Implications for the Maintenance of the Persistent State. *Virology*. 201. pp. 19-25
16. Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Zenteno, R., Ramírez, H., Hernández-Jaúregui, P., Zenteno, E. 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 6051 pp.1-15
17. Hjerterner B. 1997. Molecular and biological aspects of porcine rubulavirus (LPMV) lytic and persistent infections. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Science.
18. Hjerterner, B., Linné, T., Moreno-López. 1997. Establishment and characterization of a porcine rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. *Acta Veterinaria Scandinavica* . Vol. 38. No. 3. pp 213-224.
19. Kingsbury, W.D., 1991. The Paramyxoviridae and Their Replication. Chapter 20. In: *Fundamental Virology*. Ed. By Fields, B.N. Raven Press New York . pp 507-523.

20. Martínez, L.A., Correa, G.P., Colinas, T.A. 1996. Síndrome del ojo azul producido por el paramixovirus porcino. Memorias. Symposium sobre Enfermedades del Cerdo, con implicaciones en el comercio internacional Ed. Morilla y López. J. pp. 50-66
21. Martínez, L.A., Correa, G.P., Colinas, T.A., Galina, P.L. 1989. Opacidad corneal bilateral en lechones de cerdas expuestas por vías naturales al Paramixovirus porcino de la Piedad Michoacán. Boletín de la Soc. Venezolana de Especialistas en Cerdos. Vol. 4 Nos. 1 y 2. pp.30-31
22. Martínez, L.A., Correa, G.P., Colinas, T.A. 1992. Síndrome del Ojo Azul producido por el Paramixovirus porcino. Memorias. Symposium sobre enfermedades del Cerdo. Ed. Antonio Morilla y Jorge López. pp 51-66
23. Moreno -López J., Correa, G. P., Martínez, A. and Ericsson , A. 1986. Characterization of a paramixovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. Archives of Virology . 91 pp. 221-231.
24. Mc Neilly, F., Walker, I., Allan, M., Foreste, C., Linné, T., Merza, M., Henandez, J.P., Kennedy, S. and Adai, 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.Vy col. Diagn. Invest. 9: 3-9.
25. Nordengrahs, A., Svenda, M., MorenolLópez, J., Bergvall, A., Hernandez-Jáuregui, P., Mc. Neilly, F., Allen G., Merza. M. 1999. Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus. La Piedad Michoacán virus. J. Vy col. Diagn. Invest. 11 pp 319-323.
26. Parks, G.D., Ward, D.C., Lamb, A. R. 1992. Molecular cloning of the NP and L genes of simian virus 5: identification of highly conserved domains in paramixovirus NP and L proteins. Virus Research. 22, pp 259-279.
27. Pérez, P.F., Stephano, H.A. y Gay, G.M. 1988. Estudio Histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. Memorias. AMVZC 88. León, Guanajuato. pp 81-83.
28. Ramírez, N.R., Martínez L.A., Correa, G.P., y Colinas, T.A. 1987. Un brote de paramixovirceis encefalítica en cerdos de una granja del estado de México. Memorias.

- II Congreso AMVEC. XII Convención AMVEC y III encuentro UNPC. Acapulco Gro. pp 64-66
29. Ramírez-Mendoza, H., Hernández, J.P., Reyes, L.J., Zenteno, E., Moreno, L.J. and Kennedy, S. 1997. Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J. Comp. Path.* 1997.Vol. 117 pp. 237-252.
30. Randall, R.E. and Russel W.C. 1991. Paramyxovirus Persistence: Consequences for host and virus. In: *The Paramyxoviruses*. Ed. by David W. Kingsbury. Plenum Press, New York and London. pp.299-321.
31. Rima B., Alexander, D.J., Billeter, M.A., Collins, P.L.,Kingsbury, D.W., Lipkind, M.A., Nagai, Y., Orvell, C., Peingle, C.R., and Ter Meulen, V. 1995. Virus taxonomy, 6th report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Viro. Suppl.* 10, pp. 268-274.
32. Reyes, L.J. 1998. Mecanismos de Respuesta al Paramixovirus porcino LPM. Tesis Doctoral. UNAM.
33. Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Hernández, J. Zenteno,R., Vallejo, V., Hernández, J.P., Zenteno,E. 1997. Neu Ac α 2,3 Gal-Glycoconjugate Expresión Determines Cell Susceptibility to the Porcine Rubulavirus LPMV. comp.. *Biochem. Physiol.* Vol. 118B, No.2, pp 327-332.
34. Rosales, E.F., Correa, G.P. 1990. El Síndrome del Ojo Azul, Primera Parte. *Avances en Medicina Veterinaria. Año V. Vol. X. No. 3.* pp.99-103.
35. Rosales, E.F., Correa, G.P. 1990. El Síndrome del Ojo Azul, Segunda Parte. *Avances en Medicina Veterinaria. Año V. Vol. X. No. 4.* pp. 133-138.
36. Rosales, E.J, Ramos, R.M., Martínez, L.A., Correa, G. P. 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. Mex.*Vol.26:3. 1988. Pp.304-311.
37. Stephano H.A., Gay, G.M., Ramírez T.C. y Maqueda A. 1981. Estudio de un brote de Encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. *Memorias. XVII Convención AMVEC. Ixtapa 81.* (17-43) pp.

38. Stephano H.A., Gay, G.M., Ramírez T.C. y Maqueda A. 1982. An outbreak of encephalitis in piglets produced by an nemaglutinating virus. Proceeding of the 7th I. IPVS. Congress. México.154.
39. Stephano H.A., Ramírez T.C. y Flores A.D. 1983. Situación actual del síndrome de encefalitis y opacidad de la cornea, conocido como "Ojo Azul". Memorias. Congreso Nal. AMVEC. Puerto Vallarta, Jal.
40. Stephano H.A. y Gay, G.M. 1985. Síndrome del ojo azul en cerdos en México. Memorias. Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. Ed. Por Correa y Morilla A. AMVEC. Centro Médico Nacional del IMSS. México D.F. pp. 1-13
41. Stephano H.A. y Gay, G.M. 1985. El Síndrome en cerdos de Granja engordadoras del Bajío. Memorias. Reunión de Investigación Pecuaria en México.1985. México. D .F. p.94
- 42.. Stephano, H , Gay,G., 1986. El síndrome del ojo azul. Una nueva enfermedad en cerdos asociada a un paramixovirus. Vet..Mex.17:120-121.1
43. Stephano H.A., Gay, G.M., Ramírez T.C. 1988. Encephalitis, reproductive, failure and corneal opacity (blue eyes) in pigs, associated with a paramyxovirus infection in pigs in Mexico The Veterinary Record. 122. 6-10
44. Stephano. A.,1989. Encephalitis. reproductive, failure and corneal opacity (blue eyes) in pigs, associated with a paramyxovirus infection in pigs in Mexico. The proceedings of the 93th Annual Meeting United States Animal Health Association and 32 Annual Conference of American Association of Veterinary Laboratory diagnosticians.
45. Stephano, H.A., Doporio, D.J.M., Gay, G.M. 1985. Estudio Epidemiológico de dos granjas afectadas por el Síndrome del Ojo Azul. Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985. P.93.
46. Sundqvist, A., Berg, M.,Hernández-Jauregui, P., Moreno-López., and Linné, T. 1990. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). J. Gen. Virol. 71: 609-613.
47. Sundqvist, A., Berg, M., Moreno-López., and Linné, T. 1992. The hemaglutinina neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other

- paramyxoviruses reveals the closest relationship to simian 5 and mumps virus. *Arch Virol.* 122:331-340.
48. Summerfield, A., Rhiza, H.J., Salmueller, A., 1996. Functional characterization of porcine CD4+CD8+ extratymic T lymphocytes. *Cellular Immunol.* 168. pp.291-296.
49. Svenda M., Berg M., Moreno-López, J., and Linné T. 1997. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Research* 48. 57-70
50. Thorner, R.M., Romoin, Q.R. *Principles and Procedures in the Evaluation of Screening for Disease*. Public Health Monograph. 67. 1981. U.S.A.
51. The Code of federal regulations (CFR). Título 9, Cap. 1 Subcap. D. 1997. APHIS. USDA.
52. Tesis de Maestría. Martínez.L.A. *Elaboración y Evaluación de una vacuna inactivada para prevenir la enfermedad del Ojo Azul de los cerdos*. 1996.FES-C.
53. Tommy-Linné, Berg, M., Bergvall, A.C., Hjetner, B., Moreno-L. 1992. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*, 33 pp 263-273.
54. Uribe, A., Martínez, L.A., Correa, G. P., 1989. Distribución y Título del Paramixovirus porcino de la Piedad Michoacán, en tejidos de cerdos infectados en condiciones de campo. *Boletín de la Soc. Venezolana de Especialistas en Cerdos*. Vol. 4 Nos. 1 y 2. p. 27.
55. Zenteno-Cuevas, R., Hernández, J., Espinoza, B., Reyes, J., Zenteno, E. 1998. Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Archives Virology* 143: pp.333-352.
56. Haines DM, Chelack BJ. 1991. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diag. Invest.* 3:101-112
57. Comunicación personal. Dr. Jorge Moreno López. Resultados Preliminares. Laboratorio de Microbiología. Universidad Agrícola de Suecia.
58. Brenda S. W., *A Beginner's Handbook in Biological Electron Microscopy*. Ed. Churchill Livingstone. Edinburgh and London, 1972. The University, Dundee. *Microscopia Electrónica*. España.

CUADROS Y FIGURAS

FIG.1 Presentación esquemática de la estructura del Rubulavirus porcino (LPMV).

FIG. 2 Propuestas de los árboles filogenéticos, basados en el análisis de la secuencia completa de aminoácido de las proteínas F (a), L (b) y NP (c) del LPMV, comparadas con otros virus RNA de cadena negativa, utilizando el paquete de software PHYLIP (49).

FIG. 3 Micrografía de células PK 15, 72 hrs. pos-infección. Se observa los núcleos oscuros, rodeados de inclusiones ovales fluorescentes, de diferentes tamaños. X 360.

FIG. 4 Micrografías del corte histológico del epitelio bronquial de pulmón de cerdos convalecientes de la infección por Rubulavirus porcino. En color violeta oscuro en forma redondeada se definen los núcleos y el citoplasma con la presencia de inclusiones ovoide de color rojo, por efecto del sustrato (Fosfatasa alcalina) en la Prueba de Inmunohistoquímica. X 360

FIG. 5 Micrografía del corte histológico del epitelio bronquial de pulmón de cerdos controles, en color violeta oscuro en forma redondeada se definen los núcleos y el citoplasma en color rosa, con ausencia de reacción positiva a la fosfatasa alcalina en la Prueba de Inmunohistoquímica. X 360

FIG. 6 Micrografía del corte histológico del endotelio de Plexo Coroides en SNC, de cerdos convalecientes de la infección por Rubulavirus porcino, en color violeta oscuro en forma redondeada se definen los núcleos, el citoplasma con la presencia de inclusiones ovoideas de color rojo, por efecto del sustrato (Fosfatasa alcalina) en la Prueba de Inmunohistoquímica. X 360

FIG. 7 Micrografía del corte histológico del endotelio de Plexo Coroides en SNC, de cerdos controles; en color violeta oscuro en forma redondeada se definen los núcleos y el citoplasma en color rosa, con la ausencia de reacción a la Fosfatasa alcalina en la Prueba de Inmunohistoquímica . X 360

Fig. 8 Valores relativos de las subpoblaciones de linfocitos T de células mononucleares sanguíneas, porcentajes determinados mediante Citometría de Flujo de Cerdos convalecientes de la infección por Rubulavirus porcino y cerdos controles seronegativos

a) CD4+CD8- ; b) CD4+CD8- ; c) CD4-CD8+ . Determinado con Anticuerpos monoclonales de ratón, anti-CD4 y anti-CD8, reconocidos por anticuerpos anti-ratón específico para el isotipo.

CUADRO 1. Prueba de Inmunohistoquímica, cerdos convalecientes de la infección por LPMV y control negativo.

CUADRO 2. Resultados prueba de Inmunohistoquímica (Sistema Nervioso Central).

CUADRO 3. Resultados prueba de Seroneutralización de cerdos convalecientes de la infección por LPMV y cerdo control.

CUADRO 4. Evaluación serológica mediante la prueba de ELISA (Cerdos convalecientes De la infección por LPMV)

CUADRO 5. Evaluación serológico mediante la prueba de ELISA (cerdos controles Negativos)

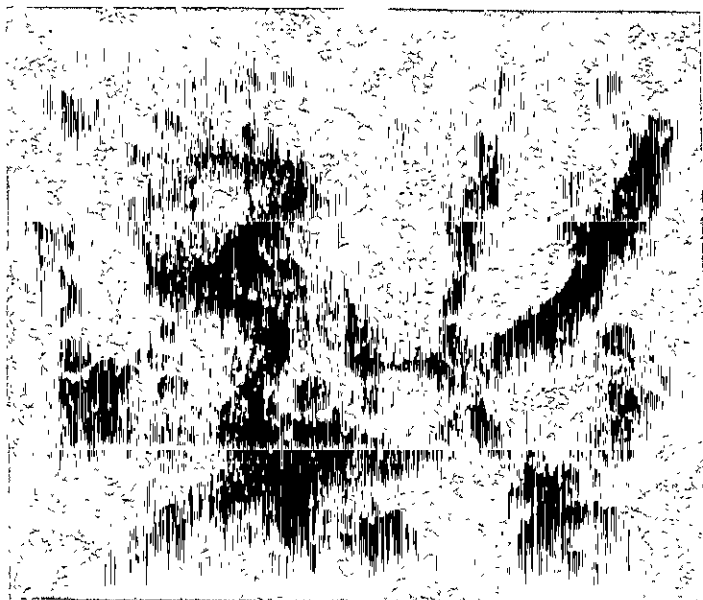


FIG. 3 Micrografía de células PK 15, 72 hrs. pos-infección. Se observa los núcleos oscuros, rodeados de inclusiones ovales fluorescentes, de diferentes tamaños. X 360.



FIG. 4 Micrografías del corte histológico del epitelio bronquial de pulmón de cerdos convalecientes de la infección por Rubulavirus porcino. En color violeta oscuro en forma redondeada se definen los núcleos y el citoplasma con la presencia de inclusiones ovoide de color rojo, por efecto del sustrato (Fosfatasa alcalina) en la Prueba de Immunohistoquímica. X 360

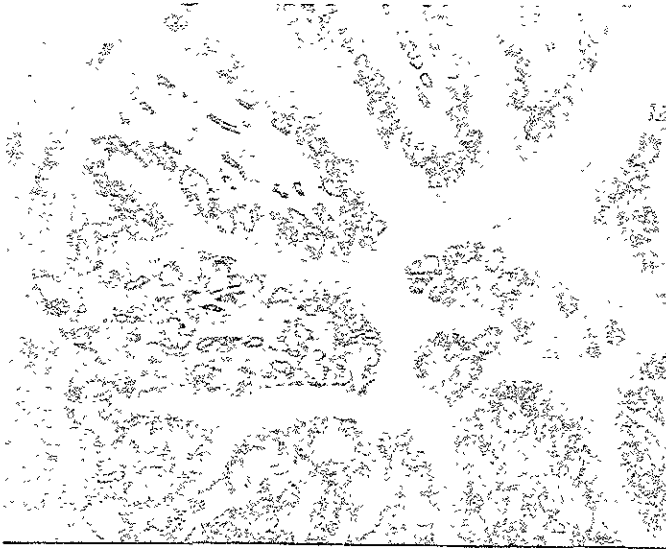


FIG. 5 Micrografía del corte histológico del epitelio bronquial de pulmón de cerdos control, en color violeta oscuro en forma redondeada se definen los núcleos y el citoplasma en color rosa , con ausencia de reacción positiva a la fosfatasa alcalina en la Prueba de Inmunohistoquímica. X 350

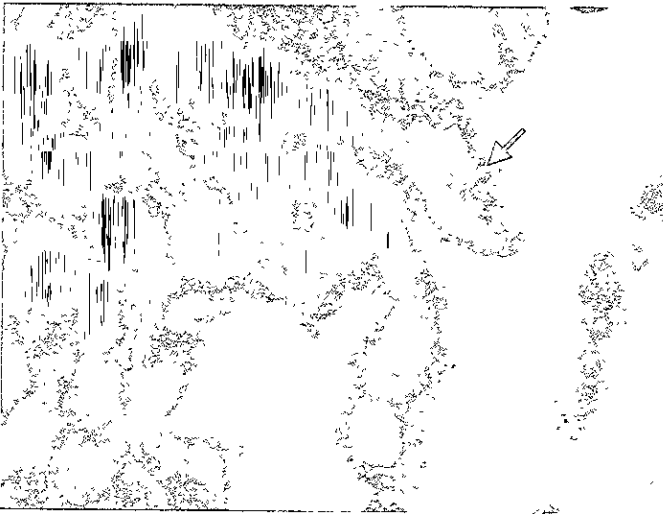


Fig. 6 Micrografía del corte histológico del endotelio de Plexo Coroides en SNC, de cerdos convalecientes de la infección por Rubulavirus porcino, en color violeta oscuro en forma redondeada se definen los núcleos, el citoplasma con la presencia de inclusiones ovoides de color rojo, por efecto del sustrato (Fosfatasa alcalina) en la Prueba de Inmunoistoquímica . X 360

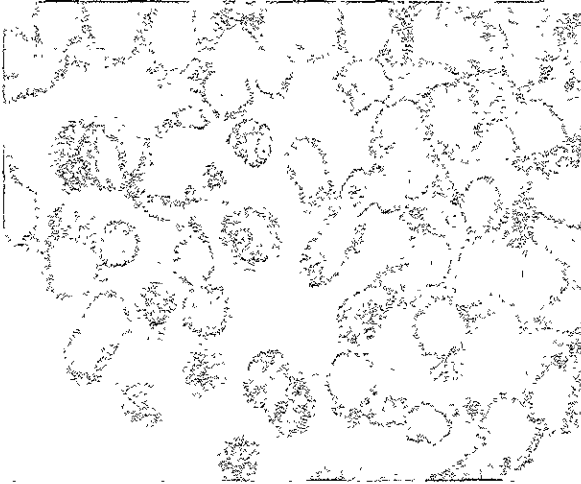


Fig. 7 Micrografía del corte histológico del endotelio de Plexo Coroides en SNC, de cerdos controles; en color violeta oscuro en forma redondeada se definen los núcleos y el citoplasma en color rosa, con la ausencia de reacción a la Fosfatasa alcalina en la Prueba de Inmunohistoquímica . X 360

a)

b)

c)

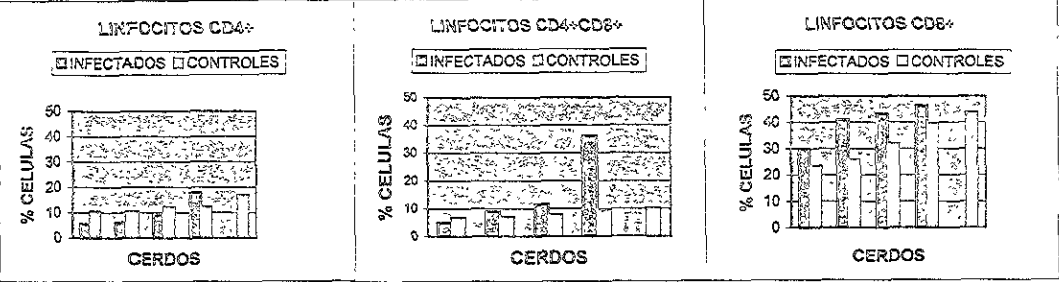


Fig. 8 Valores relativos de las subpoblaciones de linfocitos T de células mononucleares sanguíneas, porcentajes determinados mediante Citometría de Flujo de cerdos convalescentes de la infección por Rubulavirus porcino y cerdos controles seronegativos a) CD4+CD8-; b) CD4+CD8+; c) CD4-CD8+. Determinado con Anticuerpos monoclonales de ratón, anti-CD4 y anti-CD8, reconocidos por anticuerpos anti-ratón específico para el isotipo.

CUADRO 1

PRUEBA DE INMUNOHISTOQUÍMICA CERDOS
CONVALESCIENTES DE LA INFECCION POR LPMV Y
CONTROL NEGATIVO

Días post-inf.	6 meses	8 meses	11 meses	12 meses	13 meses	Control
No. Cerdo	2	1	5	3	4	Control
Pulmón	Pos.	ND	Pos.	ND	Pos.	Neg.
Tonsilas	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
Bazo	Neg.	Neg.	Neg.	ND	Neg.	ND
Tímo	ND	ND	ND	ND	Neg.	ND
Pancreas	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
N.Linf.Paro.	ND	ND	Neg.	ND	Neg.	ND
G. Salivar	ND	Neg.	ND	ND	Neg.	ND

ND: no determinado Pos: Positivo Neg: Negativo

CUADRO 2

RESULTADOS PRUEBA DE INMUNOHISTOQUIMICA
(Sistema Nervioso Central)

Días Pos-Inf.	6 meses	8 meses	11 meses	12 meses	13 meses	Control
Muestra / Cerdo 4	2	1	5	3	4	ND
Corteza C.	ND	Neg.	Neg.	ND	Neg.	Neg.
B. Olfatorio	Neg.	ND	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Epéndimo	Neg.	Neg.	ND	Neg.	Neg.	ND
Plexo Coroides	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
Cerebro Medio	ND	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

ND: no determinado Pos: Positivo Neg: Negativo

CUADRO 3

RESULTADOS PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIONEN
CULTIVO DE TEJIDOS (200DL_{50%} TICD)

No. cerda	DIAS										
	0	14	30	75	90	150	165	190	210	225	240
1	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4+						
2	1:2	1:16	1:6+								
3	1:16	1:16	ND	1:8	1:4	1:4	ND	1:8	ND	1:4+	
4	1:4	1:8	1:3	ND	1:2	1:2	1:2	1:2	ND	1:2	1:2+
5	1:8	1:8	1:14	1:2	1:4	1:8	1:8	1:8	1:8+		

-Los valores representan el recíproco de la dilución donde se observó la última dilución de CPE en células PK15.

-+ Día del sacrificio

-ND: no determinado

CUADRO 4
EVALUACION SEROLOGICA MEDIANTE LA
PRUEBA DE ELISA* (Cerdos convalesciente de la
infección por LPMV)

No. Cerdo ↓	D I A S													
	7	14	30	45	60	65	75	90	120	150	190	210	225	240
1	95	97	97		95			91						
2	95	97	97					+						
3	95	96	96	95	95	96	96	96	95	95	95	96	95+	
4	92	86	85		78	86		88	94	95	94	93	92	92, +
5	97	97	94		95		96	95	96	95	96	96	+	

+ Día del Sacrificio

* Los Valores representan porcentajes de Inhibición.

< 35% Positivos > 25% Negativos

CUADRO 5

EVALUACION SEROLOGICA MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA* (Cerdos Controles Negativos)

No. Cerdo	D I A S														
	0	7	14	21	30	45	60	65	75	90	120	150	190	210	225
6	3	20	23	8	9	6	4	1	1	6	+				
7	7	6	4	15	9	6	+								
8	3	4	13	9		4	1	1	2	6		10		0+	
9	4	20		2	16	7	1	1	0	3		21	14	3	0+
10	1	13	5	6	16	3	1	1	1	1	1	19+			
Control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1+

*Los valores representan porcentaje de Inhibición

<35% Positivo >25% Negativo

+ Día del sacrificio

APÉNDICE 1

PRUEBAS ESPECÍFICAS

PRUEBA DE AISLAMIENTO VIRAL.

Una vez obtenidas las muestras de tejido, fueron maceradas en morteros de tembrock y centrifugadas a 800g durante 15 min. para eliminar restos celulares; inmediatamente, se tomó el sobrenadante y fueron inoculados monoestratos confluyente de células Pk15 cultivadas en Microplacas NUNC de 24 pozos, de acuerdo al método descrito por Mc Neilly. Se incubó a 37°C durante 72 hrs. , después de este periodo se observó la presencia o ausencia de efecto citopático , el diagnóstico se confirmó, mediante la prueba de Inmunofluorescencia . Las muestras de sobrenadante de los monoestratos infectados, fueron evaluadas por la prueba de Hemoaglutinación y por Hemoadsorción con glóbulos de pollo, respectivamente. (1,9,12.).

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACIÓN Y HEMOADSORCIÓN

Con una preparación de glóbulos rojos de pollo al 5%, 25 ml de las muestras obtenidas por aislamiento viral, fueron suspendidas previamente en PBS, y expuestas a 25 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 2.5% en PBS, se dejó incubar durante 10 min. a temperatura ambiente y se observó en luz indirecta, la presencia de aglutinación nos indicó reacción positiva a la presencia de Hemaglutinina, en caso contrario solamente se observó sedimentación de glóbulos rojos. La prueba de Hemoadsorción , se realizó con los monoestratos de los cultivos infectados con las muestras de tejidos sospechosas, se utilizó una solución de glóbulos rojos al 5% en PBS, de la cual se agregó 100ml en los diferentes pozos de las microplacas utilizadas con las diferentes muestras y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se observó al microscopio invertido, la reacción positiva se evidenció por la adsorción de los glóbulos rojos a la superficie de las células, dando la apariencia de un tapete color rosa. En ambas pruebas se incluyeron controles positivos y negativos. (12,24).

PRUEBAS DE FLUORESCENCIA INDIRECTA (IF)

Se infectaron células de 48 Hrs. cultivadas en Lab-tek, con la suspensión de las muestras problema diluidas en MEM (20%) con un volumen de 100 μ l. En el mismo portaobjetos se incluyeron células infectadas con el LPMV (control positivo) y se dejó otro control positivo de células sin infectar (control negativo). Después de fijar los portaobjetos con acetona al 100%, fueron lavados con una solución de PBS pH 7.2, durante 10 min. Se agregó un baño de tritón x-100 .2% sobre cada portaobjeto durante 40 min. , nuevamente se lavo con PBS (3 veces) durante 5 min. cada uno y al finalizar se agregó albúmina bovina al 3%, durante 30-60 minutos, posteriormente se agregó el Anticuerpo Monoclonal (NP) dirigido a la Nucleoproteína viral del LPMV a una dilución 1:200, en agitación constante durante 40 min. Al finalizar el tiempo se lavo una vez con PBS y se agregó el segundo monoclonal Anti-IgG de ratón marcado con Fluoresceína a una dilución de 1:200 en agitación constante, durante 30 min. , se colocó un cubreobjetos en cada laminilla, y se observó en el Microscopio de Fluorescencia.

PRUEBA DE SERONEUTRALIZACIÓN (SN).

Inicialmente se obtuvo la semilla de trabajo en Cell Factory, para la realización de esta prueba, en línea celular PK-15 criada con medio de cultivo MEM, suplementado con el 10% de suero fetal bovino, cuando el monoestrato se encontró 100% confluyente (aproximadamente a las 72 horas de inoculación), se retiró el sobrenadante y las células se infectaron con el virus, se empleó aproximadamente 50 μ l de fluido viral por cada Cell Factory con una concentración de 10^3 TCID₅₀/ ml, los cuales se dejaron en incubación durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de infección, se retiró el fluido viral y se adicionó medio de cultivo fresco (2% SFB), se incubó a 37°C. El cultivo infectado se observó diariamente, cuando se presentó efecto citopático en el 90 % del monoestrato, se terminó con el proceso de incubación colectando rápidamente el sobrenadante de el Cell Factory a -20°C.

Las partículas virales se cosecharon del sobrenadante de las células infectadas centrifugando a 3 000 rpm durante 15 min. . Posteriormente se centrifugó a 100 000 g en una centrifuga Beckman L265B rotor SW27, el fluido viral se colocó en crioviales y se criopreservó a -70°C , hasta su utilización, se tomaron muestras alícuotas para

determinar el título viral mediante hemoaglutinación (HA) con eritrocitos de pollo al 0.25% y la observación del efecto citopatogénico en cultivo celular, el cálculo del título viral, se realizó por el método de Reed and Muench, así como la determinación de la Dosis infectante 50% para cultivo de tejidos, necesarias para la prueba de SN (12,24).

Para la realización de la prueba de SN, se trabajaron placas de 96 pozos estériles marca "NUNC" de fondo plano, con la línea celular pK15, y la infección se realizó con 200 TCID₅₀/0.05ml. de LPMV de acuerdo con la técnica descrita por Mc Neilly, (12,24). Simultáneamente se procesaron los mismos sueros para la prueba de ELISA competitiva Kit (Svanova).

PRUEBA DE ELISA

Todos los reactivos se equilibraron a temperatura ambiente antes de su utilización. Las placas previamente sensibilizadas fueron adicionadas con 90 ml de PBS-Tween en cada pozo. Inmediatamente se adicionaron 10 ml de las muestras de los sueros problemas además de incluir los controles positivo y negativo. Se mezcló en un agitador de microplacas y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó cada placa por 3 veces con Buffer PBS-tween, se elimina el buffer de lavado y se agrega 100 ml de Conjugado HRP a cada pozo, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, nuevamente se lava la placa por tres veces y se agrega 100 ml de la Solución de sustrato (TMB, H₂O₂) en cada pozo y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con 50 ml por pozo con una solución Stop de H₂SO₄. Los resultados fueron obtenidos mediante la medición de la Densidad Óptica (OD), en un lector de ELISA Multiskan plus II, con un filtro de 450 nm. La presencia o ausencia de anticuerpos contra LPMV fue determinada por comparación del efecto de bloqueo del suero problema, comparado con el Porcentaje de Inhibición (PI) del Suero control positivo. Para que el ensayo resulte válido es necesario que el suero control negativo presente un valor de densidad óptica superior a 0.5. y el suero control positivo debe tener un PI superior al 35%. El PI se calcula restando el valor de la OD del suero problema, del valor de la OD del suero control negativo multiplicado por 100 y dividido entre la OD del Control negativo. Las muestras con PI superior al 35% son consideradas positivas a la presencia de

anticuerpos contra LPMV. Las muestras con PI entre 25% y 35% son consideradas como muestras sospechosas. Muestras con PI abajo o igual a 25% son consideradas negativas a la presencia de anticuerpos contra LPMV.

INCLUSION DE MUESTRAS EN PARAFINA

Una vez colectadas las muestras de los diferentes tejidos de los cerdos, se colocaron en una solución de formol amortiguado con buffer de fosfatos (PBS) al 10%, por un período no mayor de 49 Hrs., inmediatamente se dieron dos lavados en buffer de fosfatos al 0.1 M durante 10 minutos y se colocaron el histoquinete, para la deshidratación de las muestras con diferentes baños de alcohol a diferentes porcentajes (70,80,96 Y 100%), seguido de dos baños de Xilol , posteriormente se realizó la inclusión en parafina, permaneciendo así hasta su utilización.

INCLUSION DE MUESTRAS EN RESINA

Muestras de diferentes tejidos de los cerdos, fueron recolectadas en una solución de Karnovski, constituida por Glutaraldehido 4%, paraformaldehido 4%, amortiguada en una solución de PBS ph 7.2. Posteriormente para su inclusión se seccionaron muestras pequeñas de aproximadamente 1mm², se realizaron dos lavados con PBS con periodos de 30 min. cada uno, inmediatamente se procedió a infiltrar la muestra con Tetraoxido de Osmio 1% diluido en PBS durante 2Hrs. en agitación constante, seguido por un proceso de deshidratación con alcohol a diferentes porcentajes (70,90,100), infiltración y Polimerización, con Oxido de polipropileno y resina (Spurr's Kit, Cat. 14300) respectivamente.