

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE LAS AFECCIONES PRODUCTIVAS Y  
CARACTERIZACIÓN DEL RUBULAVIRUS PORCINO**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT**

Tutor:

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega

Comité tutorial:

MVZ. MsC. José Miguel Doporto Díaz

Dr. Julio Reyes Leyva



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## DEDICATORIA

A mis padres Ma. Guadalupe Betancourt y Arturo Sánchez por guiarme siempre con excelente rectitud y honestidad; y por enseñarme a caminar por la vida con humildad y siempre con la frente en alto.

A mi prometida Alicia Cordero, que me ha apoyado en todo lo que hago y que ha sabido mantener nuestro cariño durante más de 10 años de noviazgo. Te amo...

A mis hermanos Luis Arturo, Alma Guadalupe e Israel, de los cuales he aprendido todas aquellas cosas, que representan la sencillez y tenacidad, necesarias para lograr todo lo que uno se propone.

A todos mis amigos que me han motivado a seguir adelante, como Eduardo Veyan, Víctor Meraz, Javier Torres, Ernesto Fentanes y todos aquellos compañeros de licenciatura que nunca olvidaré.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Sánchez Betancourt  
José Ivan  
FECHA: 22-02-2004  
FIRMA: [Firma]

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tres excelentes tutores que me supieron guiar para lograr este importante paso en mi vida:

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega

Dr. José Miguel Doporto Días

Dr. Julio Reyes Leyva

A los integrantes del jurado:

Dra. Rosalba Carreón Nápoles

Dr. Daniel Mota Rojas

A la empresa Proteína Animal S.A. de C.V. y al Sr. Manuel Romo que financiaron el proyecto, y que sin el no se hubiera logrado esta investigación. **GRACIAS**

Al Dr. Alfredo Becerra, que hizo posible el trabajo en conjunto con ésta importante empresa porcicultora, que ocupa uno de los tres primeros lugares en tecnología y producción de cerdos.

A todas aquellas personas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, que pertenecen a la Secretaría Escolar de Posgrado y que cumplen a la perfección con su trabajo como son: Dr. Javier Flores y Araceli, Dr. Francisco Monroy y Meche, Dr. Francisco S. Güemes y a Graciela, y al Dr. Librado. Gracias...

Sobre todo le doy gracias a Dios por permitirme estar aquí, al lado de todos los que amo y estimo. Le doy gracias a él y a todos ustedes por el apoyo incondicional que me han brindado y por la confianza, que estoy seguro, nunca defraudaré.

## RESÚMEN

El objetivo de este estudio fue identificar todos los parámetros productivos afectados por el *rubulavirus* porcino y realizar la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) con siete diferentes aislamientos virales obtenidos en México. El estudio fue realizado en una granja de producción porcina multisitios con 15,000 hembras en producción, localizada en el estado de Jalisco, México. Los parámetros productivos fueron evaluados durante el brote de la enfermedad y comparado con parámetros productivos normales. Se realizó un análisis serológico transversal, del cual se obtuvieron sueros positivos que se utilizaron junto con los siete virus en la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación, para identificar las diferencias virales. Los parámetros productivos mas afectados fueron el porcentaje de fertilidad a servicio, porcentaje de fertilidad a parto, número de lechones, lechones nacidos vivos, porcentaje de fetos momificados, número de lechones destetados por cerda, porcentaje de mortalidad predestete, número de partos por cerda por año y mortalidad de las hembras. En la IH fueron identificadas diferencias entre los aislamientos virales y el virus aislado de encéfalo de lechón fue el más reconocido por los sueros, esto indica que es el virus causante del brote en la granja.

**Palabras clave:** *Rubulavirus* porcino, Enfermedad del Ojo Azul, parámetros afectados, diferencias virales.

## **ABSTRACT**

The purposes of the present study were to identify the productive parameters affected by the porcine *rubulavirus* infection and to evaluate seven viruses isolated in México using Inhibition Haemagglutination (IH) test. The study was done in a multisite farm with 15,000 sows, located at Jalisco, México. All productive parameters were evaluated during an outbreak of blue eye disease. Transversal serology analysis was done to the whole line of production using IH test to identify the presence of viral antibodies, and positive samples were used to identify differences between seven viruses. The parameters more affected were fertility to service percentage, fertility to farrowing percentage, total number of piglets, piglets born alive, mummified fetuses percentage, number of piglets weaned per sow, mortality in piglets percentage, number of farrowings per sow per year and sow mortality percentage. In IH test differences between the viruses were identified and the virus isolated from piglet brain was the more recognized and seems to be the virus that caused the outbreak.

**Key words: Porcine *Rubulavirus*, Blue eye disease, parameters affected, viral differences.**

## **CONTENIDO**

	Pag.
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
<b>Resumen</b> .....	iv
<b>Abstract</b> .....	v
Cuadro de contenido.....	vi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Antecedentes.....	3
Etiología.....	3
Estructura viral.....	4
Ciclo biológico del rubulavirus.....	6
Epizootiología.....	7
Signos clínicos.....	8
Patogenia.....	10
Respuesta inmune.....	11
Lesiones.....	14
Inmunopatología.....	15
Diagnóstico.....	16
Prevención y Control.....	18
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	20
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
<b>HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
Características de la granja.....	23
Monitoreo serológico.....	26
Aislamientos virales.....	29
Caracterización Inmunológica.....	30
<b>RESULTADOS</b>	
Afecciones productivas.....	33
Monitoreo seroepidemiológico.....	35
Aislamientos virales.....	39
Caracterización Inmunológica.....	40
<b>DISCUSION</b> .....	42
<b>CONCLUSIONES</b> .....	52



<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>53</b>
-------------------------------	-----------

## **CUADROS**

Cuadro 1. Parámetros productivos afectados por la enfermedad del OA.....	62
Cuadro 2. Análisis serológico a la EOA de la granja A.....	63
Cuadro 3. Análisis serológico a la EOA de la granja B.....	64
Cuadro 4. Análisis serológico a la EOA de la línea de producción de la granja A.....	65
Cuadro 5. Análisis serológico a la EOA de la línea de producción de la granja B.....	66
Cuadro 6. Aislamientos virales por tejido analizado.....	67
Cuadro 7. Número y porcentaje de muestras positivas a ojo azul.....	68
Cuadro 8. Caracterización Inmunológica mediante la técnica de IH.....	69

## **FIGURAS**

Figura 1. Análisis serológico a la EOA de la granja A durante los años 2000, 2001 y 2002 por número de parto.....	70
Figura 2. Análisis serológico a la EOA de la granja B durante los años 2000, 2001 y 2002 por número de parto.....	71
Figura 3. Análisis serológico a la EOA de la línea de producción de la granja A.....	72
Figura 4. Análisis serológico a la EOA de la línea de producción de la granja B.....	73
Figura 5. Análisis serológico a la EOA de las dos granjas durante los años 2000, 2001 y 2002.....	74
Figura 6. Análisis serológico a la EOA de la línea de producción proveniente de las dos granjas.....	75
Figura 7. Seguimiento serológico lineal de lechones provenientes de hembras (+) a EOA.....	76

## **IMÁGENES**

Imagen 1. Cerdo mayor a 90 días de edad con opacidad corneal.....	77
Imagen 2. Encéfalo proveniente de cerdo adulto con signología nerviosa.....	77
Imagen 3. Pulmón proveniente de cerdo adulto con signología respiratoria..	77
Imagen 4. Línea celular Vero.....	78
Imagen 5. Línea celular Vero con efecto citopático (EC).....	78
Imagen 6. Eritrocitos de ave.....	78
Imagen 7. Eritrocitos de ave con aglutinación ligera (+).....	79
Imagen 8. Eritrocitos de ave con aglutinación media (++).....	79
Imagen 9. Eritrocitos de ave con aglutinación total (+++).....	79
Imagen 10. Microscopia Electrónica (ME) panorámica de partículas virales.	80
Imagen 11. Microscopia Electrónica (ME) del <i>Rubulavirus</i> porcino.....	80

# EVALUACIÓN DE LAS AFECCIONES PRODUCTIVAS Y CARACTERIZACIÓN DEL RUBULAVIRUS PORCINO

## INTRODUCCIÓN

*El Rubulavirus* porcino, perteneciente a la familia de los paramixovirus, es un virus esférico que mide de 100 a 300 nm y tiene gran similitud con el virus de la parotiditis humana, por tal motivo la signología clínica presente en la enfermedad del Ojo Azul, presenta también signos neurológicos en individuos de corta edad, así como inflamación testicular en individuos adultos. Sin embargo la signología clínica provocada por el *Rubulavirus* porcino, en los dos primeros años de su aparición, era predominantemente nerviosa y se caracterizaba por provocar ataxia, debilidad, pedaleo e incoordinación en lechones menores de treinta días de edad, con una mortalidad que alcanzaba hasta el 90%; en este mismo año (1980) los lechones mayores a 30 días de edad no presentaban signología tan marcada y la mortalidad era prácticamente nula.

En 1983 se observaron brotes severos de encefalitis en cerdos de 15 a 45 Kg de peso, acompañados con signos respiratorios como tos, disnea y estornudos, presentando mortalidad hasta del 30% (Stephano HA, 1984). También se hizo evidente la falla reproductiva en hembras, y los parámetros afectados fueron: el porcentaje de repeticiones, mortinatos y fetos momificados, así como un ligero aumento de abortos (Stephano y Gay, 1984; Stephano y Gay, 1985a).

Hasta antes de 1998 se pensaba que los sementales eran refractarios a la enfermedad, sin embargo, en este año se presentaron los primeros casos de orquitis, epididimitis y atrofia testicular con severas alteraciones en la calidad del

semen, asociados a la infección por el *Rubulavirus* porcino, anteriormente llamado paramixovirus porcino. (Campos y Carbajal, 1989).

En la actualidad algunas granjas de Jalisco, presentan signología clínica respiratoria y nerviosa en animales mayores a 90 días de edad, es decir, un patrón nuevo en comparación con el presentado en años anteriores; por tal motivo este estudio pretende realizar aislamientos virales de animales mayores de 90 días de edad así como de lechones que presenten la signología clínica antes mencionada, con la finalidad de realizar la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación, con sueros positivos de las granjas actuales y aquellos virus provenientes de animales con signología clínica sugerente a la enfermedad del Ojo Azul, obtenidos de 1980 a 1995, que indique si el reconocimiento antigénico es diferente para cada uno de los virus aislados.

También se pretenden identificar todos aquellos parámetros productivos afectados por el virus que se encuentra circulando actualmente en estas granjas, durante un rebrote, en donde aparentemente la etapa productiva más afectada es la de engorda.

## **Antecedentes**

La enfermedad del ojo azul afecta a cerdos de todas las edades y es provocada por un virus del género *Rubulavirus* de la Familia *Paramyxoviridae* (Ramírez *et al.*, 1997). Los primeros casos de esta enfermedad se identificaron en 1979 en granjas porcícolas de La Piedad, Michoacán; en las que se presentaron signos clínicos nerviosos principalmente en lechones menores a 30 días de edad. En 1980 se reportaron brotes en los estados de Jalisco y Guanajuato, en 1983 en el D.F., Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Tamaulipas, Puebla, Campeche y Querétaro. Desde su aparición ha sido un problema de difícil control y su difusión abarcó hasta 1992, 16 estados de la República Mexicana (Fuentes *et al.*, 1992).

## **Etiología.**

Los Paramixovirus conforman una familia de virus patógenos que producen importantes problemas a la salud humana y veterinaria. Entre los cuales se encuentran el virus sincitial respiratorio y los virus de parainfluenza causantes de infecciones de vías respiratorias bajas en niños y animales jóvenes. Dentro de esta familia también se incluyen virus que producen infecciones neurológicas y sistémicas, como el virus del sarampión, el del moquillo canino, el de la enfermedad de Newcastle aviar y el de la parotiditis humana (Ramírez MH, 1997).

El virus de la parotiditis es reconocido por producir inflamación de las glándulas salivales parótidas, sin embargo en casi la mitad de los casos hay complicaciones neurológicas, como meningitis, que pasan desapercibidas o son mal diagnosticadas, pero que causan un importante detrimento a la salud y al desarrollo infantil. En ocasiones la infección viral puede abarcar el parénquima nervioso produciendo encefalitis, la cual deja graves secuelas nerviosas en los niños afectados. Aunado a esto, el virus de la parotiditis se replica en diversos

tejidos linfáticos y glandulares incluyendo las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, por lo que se le ha asociado con la generación de diabetes y también puede replicarse en células epiteliales y germinativas de órganos reproductivos masculinos causando inflamación testicular y esterilidad en jóvenes postpúberes (Stephano y Gay, 1985a).

El *Rubulavirus* porcino posee un alto grado de homología estructural y genética con el virus de la parotiditis humana y comparte con él su tropismo tisular y sus características patológicas, ya que también provoca alteraciones en sistema nervioso central de cerdos neonatos y en tejido reproductivo en cerdos adultos; además es capaz de replicarse en diversos tejidos glandulares y linfáticos. Por lo que es un modelo adecuado para estudiar los factores de patogenicidad de los paramixovirus.

### ***Estructura Viral***

Los *Rubulavirus* están constituidos por seis proteínas estructurales: la polimerasa o proteína de alto peso molecular (L), la nucleoproteína (NP), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M) y dos glicoproteínas, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la glicoproteína de fusión (F). Las glicoproteínas HN y F son transmembranales y su mayor parte se encuentra expuesta al exterior del virión, dejando un pequeño segmento intraviral que hace contacto con la proteína M, que se ubica en la parte interna de la membrana. Las unidades de la NP se unen mediante interacciones hidrofóbicas al ARN genómico para dar origen a la nucleocápside; cada NP se enlaza a seis nucleótidos inmediatamente después de la síntesis del ARN genómico y no se separan durante la replicación ni la transcripción, así que a diferencia de los virus de ARN positivo, el genoma de los virus de ARN negativo nunca se encuentra desnudo (Lamb y Kolakofsky, 1996). A la nucleocápside se asocian cerca de 50 complejos con actividad polimerasa, cada

uno de ellos está formado por 3 unidades de proteína P (P3) y una de proteína L, que actúan como componentes catalíticos aunque también se encuentran viriones que poseen el mismo número de complejos P sin proteína L (Lamb y Kolakofsky, 1996; Kolakofsky *et al.*, 1998). Otras dos proteínas, V y C, se han identificado en las células infectadas pero no forman parte de la estructura del virión, son codificadas por el genoma viral y se sintetizan al editarse el gen P (Berg *et al.*, 1992). Al parecer estas proteínas participan en la regulación de la transcripción y la replicación viral.

El *Rubulavirus* porcino tiene forma esférica y mide de 100 a 360 nm, tiene una nucleocápside semejante a una hélice o espiral, contenida dentro de una membrana lipoprotéica proveniente de la célula huésped. Esta contiene dos proteínas de suma importancia en la biología del paramixovirus; la proteína de fusión (F) que participa en la unión del virus a la membrana para su posterior penetración a la célula, también es la principal responsable de la fusión con células vecinas ocasionando la propagación de la infección en el área local. La otra proteína es la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) que posee dos dominios funcionales: uno con capacidad para aglutinar eritrocitos y otro que se encarga de la eliminación de grupos de ácido siálico. Este virus se caracteriza por aglutinar una gran variedad de glóbulos rojos de mamíferos y aves como cerdo, vaca, caballo, cabra, gato, cuyo, hamster, rata, ratón, conejo y humanos tipo A, B, AB y O, pollos, patos, etc (Stephano *et al.* 1988; Ramírez *et al.*, 1996). Esto se debe a que su proteína HN reconoce un tipo de ácido siálico que está presente en todos esos eritrocitos (Reyes-Leyva *et al.* 1993 y 1997a).

### **Ciclo biológico**

El ciclo biológico de los rubulavirus incluye las fases de reconocimiento, adsorción a la superficie celular, fusión de membranas, penetración a la célula, desnudamiento, transcripción, replicación del genoma, ensamble y liberación de viriones. La partícula viral se adsorbe a la membrana de la célula por medio de la proteína HN, que reconoce un receptor específico, generalmente glicosilado, posteriormente un cambio conformacional de la proteína HN activa a la proteína F, que expone un dominio altamente hidrofóbico mediante el cual fusiona las membranas celular y viral. Este evento ocurre en la superficie celular y a un pH neutro, por lo que es independiente de enzimas lisosomales como ocurre en otros virus. La integración de la envoltura viral al sistema de membranas celulares provoca la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. Ya que el virión trae integrada su propia polimerasa, al liberarse el ARN viral se sintetiza una copia completa del genoma en sentido positivo que servirá de molde para los nuevos genomas, y por otro lado, se inicia la síntesis de los ARN mensajeros que codifican cada una de las proteínas virales. Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, las proteínas NP, P y L son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se acumula en la parte interna de la membrana celular. Las proteínas, HN y F, que fueron sintetizadas en el retículo endoplásmico son glicosiladas en el aparato de Golgi y posteriormente expresadas en la cara externa de la membrana, en sitios de contacto estrecho con la proteína M. La afinidad de las proteínas de la nucleocapside, NP, con la proteína M y de ésta con las glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis (Lamb y Kolakofsky, 1996).

La replicación de los *Rubulavirus* se realiza totalmente en el citoplasma, por lo cual se forman aglomerados de nucleocápsides que se observan como grandes inclusiones citoplasmáticas en las células infectadas (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2001).

El material genético viral también puede pasar directamente de una célula infectada a una célula vecina sin que haya necesidad de que se libere la partícula viral, esto es debido al proceso de fusión de membranas celulares realizado por las proteínas HN y F, de esta manera se originan las células gigantes multinucleadas o sincitios características de las infecciones por paramixovirus (Lamb y Kolakofsky, 1996).

### ***Epizootiología***

La enfermedad de Ojo Azul se ha mantenido desde 1980 en el centro de México, en los primeros años se aisló el paramixovirus de Ojo Azul (POA) de diferentes brotes en los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato. La enfermedad se diseminó rápidamente a los estados de Querétaro, Estado de México y Distrito Federal debido a la intensa movilización de cerdos; sin embargo, la evidencia serológica indicó la presencia de anticuerpos contra el paramixovirus del Ojo Azul (POA) en cerdos reproductores y en animales menores a 45 días de edad, en al menos 16 estados de la República Mexicana (Fuentes *et al.*, 1992).

Hasta el momento se sabe que el cerdo es el único animal afectado clínicamente por el *Rubulavirus*, cuando la infección se da de manera natural, sin embargo experimentalmente afecta a embriones de pollo y ratones; por otro lado los conejos, perros y gatos también se han inoculado de forma experimental pero no presentan signología clínica (Stephano y Gay, 1985b; Stephano *et al.*, 1988).

Se han hecho estudios donde se observa que el virus puede diseminarse a través de gente y fomites, y posiblemente a través de las aves y el viento (Stephano, 1992).



### ***Signos clínicos***

Los primeros brotes de la enfermedad (Stephano HA, 1982) se caracterizaron por la presentación de signos nerviosos con elevada mortalidad (80-90%) en lechones de 2 a 15 días de edad. La afección nerviosa se presentaba en dos formas: en algunos casos los lechones parecían clínicamente sanos y súbitamente quedaban postrados lateralmente, en otros casos, los animales afectados mostraban signos nerviosos progresivos. En cerdos mayores de 30 días de edad los signos clínicos eran menos comunes y más discretos, con baja o nula mortalidad (Stephano, 2002; Taylor, 1999).

Cuando la enfermedad comienza generalmente se observa fiebre, pelo erizado y lomo arqueado, algunas veces acompañado por constipación o diarrea. Posteriormente hay signos nerviosos tales como ataxia, debilidad, rigidez principalmente en las patas traseras, temblores musculares y posturas anormales, como posición de perro sentado (Stephano, 2000; Stephano, 2002; Taylor, 1999).

A partir de 1983 se observaron brotes severos de encefalitis y signos respiratorios con mortalidad hasta del 30% en cerdos de 15 a 45 Kg de peso (Stephano *et al*, 1985a). En este año también se hizo evidente la falla reproductiva cuando se realizó una evaluación sobre los parámetros afectados y se identificó un aumento de repeticiones, mortinatos y fetos momificados, y un ligero aumento de abortos (Stephano y Gay, 1984; Stephano y Gay, 1985).

En 1988 se observó orquitis, epididimitis y atrofia testicular con severas alteraciones en la calidad del semen, asociados a la infección por el paramixovirus de ojo azul. Para este año en lechones nacidos bajo un brote, la morbilidad era del 20 a 50% y la mortalidad oscilaba entre el 89 y 90% (Campos y Carbajal, 1989).

En 1998 se observaron casos severos de esta enfermedad asociados con el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS), donde los parámetros reproductivos mostraron alteraciones más severas que con el *Rubulavirus* o VPRRS solos. En cerdas gestantes se observó anorexia, en algunas opacidad corneal y la falla reproductiva afectó diferentes parámetros por 2 a 11 meses, generalmente por cuatro meses. Disminuyó el número de lechones nacidos vivos (LNV), aumentó el número de fetos momificados y la mortalidad en lechones, y por lo tanto el número de lechones destetados se redujo dramáticamente. También se incrementó el número de repeticiones, con caída de la tasa de parto e incremento en el intervalo de días de destete a primer servicio, aumentando los días no productivos de las hembras. El aborto no ha sido una característica común, pero se ha observado en algunas hembras en porcentaje variable en brotes agudos. También hay marcado incremento en mortinatos y fetos momificados, lo que consecuentemente causa reducción en el número de nacidos vivos y posteriormente en el número de nacidos totales (Stephano, 2000a).

También existen reportes de animales que presentan signología respiratoria como disnea, tos y estornudos, asociados a la enfermedad del Ojo Azul, pero están asociados a problemas infecciosos bacterianos. Sin embargo se han realizado aislamientos virales a partir de pulmón y otros órganos

### **Patogenia**

El virus se transmite a otros animales por la aspiración de microgotas contaminadas cuando éste es eliminado a través de descargas nasales (Collier y Oxford, 2000; Iorio *et al.*, 1986; Bowden *et al.*, 2001; Chua *et al.*, 2000), siendo la ruta natural de infección la nasofaríngea. Cuando la gota es muy grande queda atrapada en la mucosa oronasal y el virus busca una célula susceptible para replicarse, cuando las gotas son muy pequeñas el virus ingresa con la aspiración y se localiza en los conductos aéreos inferiores (Collier y Oxford, 2000).

La multiplicación inicial del virus se lleva al cabo en la mucosa nasofaríngea y el tejido linfático asociado, después se disemina por vía aérea a bronquios y pulmones en donde se vuelve a replicar y de ahí se disemina a todo el organismo por vía sanguínea (Reyes –Leyva, 2004; Stephano *et al.*, 1988b; Allan *et al.*, 1996; Ramírez-Herrera *et al.*, 1997).

El ingreso del virus al sistema nervioso central ocurre a través de las terminaciones nerviosas que se encuentran en la porción olfatoria de la mucosa nasal, el virus asciende por los nervios olfatorios a los lóbulos olfatorios y al hipocampo, de aquí se disemina al tallo cerebral y cerebelo donde se replica abundantemente (Allan *et al.*, 1996; Reyes-Leyva *et al.* 1997b). Aunque, hay propuestas de que el virus ingresa al sistema nervioso por vía sanguínea atravesando la barrera hematoencefálica (Ramírez-Herrera *et al.*, 1997b).

Durante la fase de viremia el virus se transporta asociado a eritrocitos y monocitos (Reyes-Leyva, 2004; García, 1999; Hernández *et al.*, 1998) lo que le permite producir una infección sistémica y replicarse en sitios inmunoprivilegiados de órganos linfáticos y reproductores (Reyes-Leyva, 2004).

### ***Respuesta Inmune***

Los anticuerpos y los linfocitos T son los principales sistemas efectores para resolver la infección viral. Los anticuerpos pueden reconocer virus en forma libre o células infectadas por virus. Ellos controlan las infecciones neutralizando las partículas virales o produciendo la muerte de las células infectadas a través de citotoxicidad mediada por complemento o por células citotóxicas. Las proteínas importantes en estos procesos son las glicoproteínas de superficie o proteínas de la cápsida externa y aunque se producen anticuerpos contra componentes internos del virión éstos no son importantes en la neutralización de la infección. Cambios en la estructura o en la expresión de las proteínas de superficie pueden ser importantes mecanismos mediante los cuales los virus evitan el reconocimiento y la eliminación por anticuerpos (Ahmed y Biron, 1999).

En contraste con los anticuerpos, las células T sólo pueden reconocer al antígeno en la superficie de células presentadoras y en asociación con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del hospedero. El receptor de linfocitos T reconoce péptidos virales unidos a moléculas celulares. Una importante consecuencia de este modo de reconocimiento es que los linfocitos T no pueden reconocer virus libres y su actividad antiviral está confinada a las células infectadas. El mecanismo primario utilizado por los linfocitos T CD8+ para controlar la infección viral es eliminar a las células infectadas por virus. Las células CD8+ también controlan el crecimiento viral produciendo citocinas antivirales como el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral, que interfieren con la replicación viral. Los linfocitos CD4+ juegan un papel central en la inmunidad antiviral y participan en el control de la infección por medio de diversos mecanismos. Ellos producen citocinas antivirales, están involucrados en la activación y reclutamiento de macrófagos y ayudan mediante la síntesis de citocinas, en la producción de anticuerpos y en la respuesta citotóxica mediada por linfocitos CD8+ (Ahmed y Biron, 1999).

La respuesta humoral contra el rubulavirus porcino se inicia con la producción de anticuerpos desde la primera semana posinfección. Durante las primeras 4 semanas los títulos se incrementan entre 4 y 6 log<sup>2</sup> y a partir de la quinta semana llegan a incrementarse hasta 8.5 log<sub>2</sub> (Hernández *et al*, 1998). En la infección natural se han encontrado anticuerpos hasta 18 meses después de presentada la infección (Stephano, 2000a). La inmunidad humoral es de gran importancia en el control de la diseminación sistémica de la infección ya que títulos elevados de anticuerpos coinciden con la desaparición de la viremia (Reyes-Leyva *et al.*, 2004). Los anticuerpos generados están dirigidos contra la proteína HN y son capaces de inhibir la hemaglutinación y neutralizar la infección viral (Hernández *et al*, 1998).

Los anticuerpos contra el rubulavirus porcino pueden ser inducidos utilizando como antígeno virus inactivado con formalina y esta inmunidad puede transmitirse a la camada al vacunar a cerdas en gestación. Los anticuerpos adquiridos pasivamente logran controlar la infección y reducir los índices de morbilidad y mortalidad en la población vacunada (Hernández-Jáuregui *et al*, 1992).

Ensayos *in vitro* muestran que los anticuerpos específicos contra el rubulavirus porcino o contra determinantes antigénicos de la proteína HN poseen actividad neutralizante (Zenteno y Cuevas, 1997). No obstante estos resultados alentadores, hasta el momento no se ha logrado producir una vacuna que sea lo suficientemente efectiva para controlar la infección en el campo, al respecto han encontrado que las diferentes cepas del *Rubulavirus* que circulan en la población porcina poseen diferencias antigénicas que les permiten evadir la respuesta inducida por algún otro serotipo viral (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1994; Reyes-Leyva *et al*, 2002).

En relación a la respuesta inmune celular, los primeros cambios que se observan después de la infección es un aumento en el número de linfocitos T totales (CD3+) y citotóxicos (CD8+) esto ocurre durante la primera semana, demostrando la importancia de estas células en el control de la infección. Un evento importante es

un notable índice de estimulación muy bajos con los mitógenos concanavalina A y fitohemaglutinina (Hernández *et al.*, 1998).

Stephano (1998) reportó que existe una alta susceptibilidad a padecer infecciones secundarias en los animales infectados con *Rubulavirus* porcino. Esto puede estar relacionado con la reducción en el número de leucocitos, principalmente de linfocitos CD4+, que ocurre en la tercera semana posinfección (Hernández *et al.*, 1998); lo que podría resultar del reclutamiento de células inmunes en los tejidos para participar en el control de la infección (Reyes-Leyva, *et al.* 2002) esto es sugerido por la abundancia de células mononucleares observadas en los tejidos infectados (Ramírez-Mendoza, 1997).

Se ha demostrado que los linfocitos CD4+CD8- estimulados por el virus se transforman en linfocitos CD4+CD8+, una población celular abundante en la sangre porcina. Los estudios realizados demuestran que esta población de linfocitos T responde de manera específica al virus para convertirse en células de memoria productoras de citocinas de tipo 2 (principalmente IL-10) inductoras de inmunidad humoral. Este tal vez sea un mecanismo inducido por los rubulavirus para modular la respuesta antiviral y sobrevivir en el hospedero (Hernández *et al.*, 2001,2002). Estas células pueden diferenciarse de las células en reposo por la alta expresión del marcador de superficie CD29 y del disacárido Gal $\beta$ 1,3GalNAc reconocido por las lectinas PNA y de *Amaranthus leucocarpus* (Hernández *et al.*, 2002).

La importancia de la respuesta inmune celular en el control de la infección viral fue evaluada midiendo la capacidad proliferativa de las células mononucleares de sangre periférica a un antígeno viral inactivado por calor y a lectinas mitogénicas y determinando subsecuentemente el fenotipo de los linfoblastos proliferantes. Una fase de inmunosupresión fue identificada en los animales infectados, se mostró que durante la tercera semana de la infección se presenta una disminución del 19% de linfocitos T, de 28% de linfocitos B y de 53% de monocitos en

comparación con los valores promedios observados en los animales sanos utilizados como testigos (Hernández *et al.*, 1998). Este fenómeno puede ser resultado de la infección de células mononucleares que se han identificado durante la segunda fase de viremia que se presenta durante la infección por Rubulavirus la cual ocurre entre los 14 y 21 días postinfección (Reyes-Leyva, *et al.* 2004). La identificación de antígeno viral en el interior de células mononucleares circulantes y en células inmunes de nódulos linfáticos indican que el mismo sistema inmune es blanco de la infección viral, aunque no se presente una notable alteración en los mecanismos de respuesta como ocurre en virus verdaderamente inmunosupresores (Reyes-Leyva, 2002).

### **Lesiones**

Las lesiones macroscópicas que se pueden encontrar en las infecciones ocasionadas por el Rubulavirus porcino son conjuntivitis, equimosis y diferentes grados de opacidad de la cornea, principalmente en lechones menores de treinta días de edad. En sementales provoca inflamación de los testículos y del epidídimo, con un marcado aumento en el diámetro debido al edema en casos agudos; cuando el curso progresa se observa una marcada epididimitis y orquitis. Cuando el epidídimo es afectado puede tornarse granular y se observa orquitis con fibrosis y adherencias a la túnica albuginia; ocasionalmente pueden encontrarse hemorragias en la túnica, epidídimo o testículo (Campos y Carvajal, 1989; Stephano *et al.*, 1990).

Las lesiones microscópicas se localizan principalmente en cerebro y médula espinal donde se puede observar encefalitis no supurativa, afectando principalmente la materia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral; incluyendo una gliosis difusa y multifocal, infiltración perivascular con linfocitos, células plasmáticas y reticulares, necrosis neuronal, neurofagia, meningitis y

coroiditis. También es característico de este virus provocar en neuronas cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos debido a que es un virus RNA y su replicación se lleva a cabo en el citoplasma (Stephano y Gay, 1985a; Ramírez y Stephano, 1982; Pérez *et al*, 1988).

En adultos las lesiones histológicas que se observan son en el epidídimo, que incluye la formación de granulomas espermáticos y degeneración vacuolar del epitelio del ducto (Ramírez-Mendoza *et al*, 1997).

### ***Inmunopatología***

Hasta el momento no se han realizado experimentos para conocer la participación del sistema inmune en el daño a los tejidos durante la infección por *Rubulavirus* porcino. No obstante, observaciones indirectas indican que la respuesta inmune está involucrada al menos en dos eventos patológicos. Stephano *et al*, (1988a) ha propuesto que la opacidad de la córnea es una reacción de hipersensibilidad mediada por complejos inmunes. La gran respuesta de anticuerpos circulantes contra el *Rubulavirus* porcino observada en las infecciones experimentales y la identificación de una abundante expresión de receptores virales en el tejido ocular hacen suponer que efectivamente hay una deposición de complejos inmunes en la cámara anterior del ojo, lo que produce la opacidad corneal. El otro evento es la formación del granuloma epididimario que se presenta en los cerdos adultos: Al parecer el virus llega al epidídimo transportado por células inmunes que infiltran el tejido, la abundante replicación viral en ese sitio y en los conductos seminíferos producen la atracción de gran cantidad de células inmunes, monocitos, linfocitos T y células plasmáticas que en su afán de destruir las células infectadas terminan por dañar las paredes de los conductos, dejando escapar a los espermatozoides al tejido intersticial, lo que genera un círculo vicioso de activación celular e incrementó del daño a los tejidos circundantes (Reyes-Leyva *et al*. 2002). El granuloma que se forma puede llegar a ser tan grande que es aparente a simple



vista como un engrandecimiento testicular anormal. El daño al tejido puede ser tan importante que induzca la involución y la atrofia del testículo afectado (Ramírez *et al.*, 1997).

### **Diagnóstico**

Se realiza por medio de pruebas serológicas, siendo la inhibición de la hemaglutinación (HA) la prueba más utilizada para determinar la difusión del virus de la enfermedad del ojo azul EOA en México; aunque también se han utilizado la seroneutralización (SN), ELISA e inmunoperoxidasa (Morilla *et al.*, 2000).

Se han hecho diversos estudios para determinar cual es la prueba serológica más confiable para el diagnóstico, en uno de los cuales se compararon las pruebas de ELISA, SN e IH en 46 animales después de un brote de campo y se encontró que la SN tenía una sensibilidad del 89.1 %, ELISA de 89.1 % e inhibición de la hemoaglutinación del 84 %; en 35 animales inmunizados con una vacuna experimental se encontró una sensibilidad de la SN del 94 %, ELISA 91.4 % e IH de 80 %.; en 94 animales vacunados que se encontraban en una granja durante un brote y se encontró una sensibilidad de ELISA del 91.5 % e IH de 98.9 %. Morilla *et al.* (2000) concluyeron que las mejores pruebas son SN y ELISA y que la IH puede emplearse como prueba de piara ya que detecta a un pequeño porcentaje de falsos positivos.

Recientemente, se desarrolló la prueba de inmunoperoxidasa (IP), la cual tiene ventaja de que se vende como un kit listo para usarse y puede ser utilizado fácilmente para el diagnóstico en los laboratorios que cuenten con poco equipo; en un estudio serológico se demostró tiene el 100 % de correlación con la prueba de seroneutralización (SN) (Morilla *et al.*, 2000).

El diagnóstico también se basa en la detección del virus por medio de aislamientos virales, inmunofluorescencia indirecta u observación en tejidos infectados por microscopia electrónica. Las líneas celulares más utilizadas para realizar el aislamiento viral, son: Vero (riñón de mono verde africano), PK-15 (riñón de cerdo) (Hernández *et al.*, 1997), ST (testículos de cerdo), BHK-21 (riñón de hamster lactante). En estas células el virus produce el efecto citopático característico consistente en la formación de sincitios; y en las células PK-15 también se han observado cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Stephano y Gay, 1986).

### ***Prevención y control***

Se sabe que este virus se inactiva con agentes químicos como éter, formalina y beta propiolactona o a temperaturas de 56°C en un periodo mayor a 4 horas (Taylor, 1999).

Para el control o eliminación de la Enfermedad del Ojo Azul son necesarias varias acciones que dependerán del tipo de granja. En el pié de cría es necesario no mezclar animales de diferentes corrales, eliminar cerdos que presenten la signología clínica característica, evaluar a todos los sementales de la granja y eliminar aquellos que sean positivos a la enfermedad, utilizar inseminación artificial por lo menos por seis semanas, intensificar el diagnóstico de gestación, con machos y ultrasonido en todas las hembras, incrementar el número de servicios en la medida que se incrementen las repeticiones, cerrar la granja por lo menos durante 16 semanas (Campos y Carbajal, 1992).

En el área de lactancia es necesario evitar el estrés, reducir el manejo de animales, no mezclar lechones, mantenerlos secos y a la temperatura adecuada, de acuerdo a su edad, sacrificar a lechones enfermos, manejar las salas “todo dentro – todo fuera”, lavar y desinfectar, salas y corrales, cuando salgan todos los animales (Campos y Carbajal, 1992).

En el sitio dos y tres es necesario evitar el hacinamiento, cuidar la temperatura de acuerdo a la edad, cuidar la ventilación, no mezclar animales de diferentes edades u origen, actuar de forma inmediata en caso de que exista otra enfermedad (Campos y Carbajal, 1992).

Para prevenir la enfermedad se han desarrollado diversas vacunas, en una de ellas se utilizó rubulavirus porcino inactivado y se determinaron los niveles de inmunoglobulinas en los animales vacunados mediante la prueba de seroneutralización; así se comprobó que hubo el 71 % de protección, conferida a

través del calostro, en cerdos destetados a los 4, 28 y 38 días de edad provenientes de las hembras vacunadas; mientras que el 100% de los hijos de las hembras no vacunadas murieron al ser desafiados (Fuentes *et al.* 1994).

Otro tipo de vacunas se han generado con la implementación de técnicas moleculares, en donde Zenteno-Cuevas (1997) identificó los epítopes específicos de la proteína HN del *Rubulavirus* porcino que fueron incorporados a la proteína OmpC de *Salmonella typhi* y expresados en bacterias *Escherichia coli* para posteriormente ser evaluados en ratones y conejos; estos antígenos recombinantes generaron una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer y bloquear la actividad de la proteína HN y en consecuencia la actividad citopática del *Rubulavirus*.

Al identificar todos los aspectos relacionados con la enfermedad del Ojo Azul, en el marco teórico anteriormente descrito, es importante resaltar que la enfermedad se ha presentado en animales de todas las edades, y con signología diferente en cada uno de ellos; por tal motivo la presente investigación pretende identificar, las posibles diferencias entre aislamientos virales obtenidos a través de los años, mediante la técnica de Inhibición de la hemaglutinación.

## **JUSTIFICACIÓN**

Para saber mas acerca de esta nueva enfermedad viral enzoótica en México, se propone realizar estudios que ayuden a conocer los factores que influyen en la transmisión y presentación de esta enfermedad, así como las causas que predisponen a la enfermedad y a la diferente signología clínica, presente en cerdos de diferentes edades en un sistema de producción porcina multisitios; para encontrar dichas propuestas es necesario realizar el aislamiento viral de tejidos provenientes de animales con signología clínica sugerente a esta enfermedad, así como sueros positivos, obtenidos de granjas positivas que mediante la técnica de Inhibición de la hemaglutinación permita identificar si existen diferencias entre los aislamientos virales obtenidos en diferentes años.

**OBJETIVO GENERAL**

Identificar el comportamiento del *rubulavirus* porcino durante un brote, para determinar si la presentación clínica de la enfermedad, así como las afecciones que provoca, han cambiado a través del tiempo; lo cual puede estar asociado a las posibles diferencias virales, entre aislamientos obtenidos en diferentes brotes a través del tiempo.

**OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- Evaluar los efectos productivos y reproductivos provocados por esta enfermedad.
- Realizar un muestreo seroepidemiológico para determinar el comportamiento del virus.
- Realizar el aislamiento viral de tejidos de cerdos con cuadros clínicos sugestivos a EOA.
- Realizar la caracterización inmunológica de los virus aislados mediante la técnica de Inhibición de la hemaglutinación.

**HIPÓTESIS**

Ya que las características clínicas observadas durante el brote de la enfermedad del ojo azul, estudiado difieren de las reportadas previamente, es probable que los ensayos inmunológicos demuestren que este brote fue causado por una variedad de virus diferente, y en conjunto con el monitoreo seroepidemiológico permitirá identificar el comportamiento del virus a nivel de campo, lo cual determinará las causas de la diferente signología clínica observada a través de los años.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### A) Características de la granja.

La presente investigación se realizó en un sistema de producción porcina en tres sitios múltiples, localizado en San Juan de los Lagos, Jalisco. El clima predominante es templado con lluvias en verano y con una temperatura media anual de 22 °C.

Cuenta con dos “sitios uno” con capacidad para 7,500 hembras cada uno y cuya finalidad zootécnica es la producción de animales para abasto, cuya carne es comercializada en otros países.

En esta granja se realizan evaluaciones serológicas periódicas para diferentes enfermedades como: síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), enfermedad del ojo azul (OA), enfermedad de Aujeszky, fiebre porcina clásica y parvovirus porcino, por tal motivo es importante hacer notar que cuenta con un programa de control y erradicación de enfermedades que sirve para mantener el mejor estado sanitario dentro de la granja.

Para identificar las alteraciones causadas por el *rubulavirus* porcino se estudiaron todos los parámetros reproductivos y productivos, después de identificar un incremento en el porcentaje de animales seropositivos a este virus. Los parámetros analizados fueron: fertilidad, promedio de animales nacidos vivos por camada, cerdos destetados por cerda, porcentaje de momias, peso promedio de nacidos vivos, mortalidad predestete, peso promedio de lechones destetados, edad promedio al destete, cerdos destetados por hembra al año y porcentaje de mortalidad; así como también los parámetros productivos tales como: ganancia diaria de peso, porcentaje de mortalidad, días a mercado, kilogramos ganados y edad a venta.



La identificación de los parámetros productivos afectados se realizó mediante el programa Pig–Champ y se comparó con los parámetros normales (Taylor, 1999 y parámetros de las granjas antes del brote), para identificar las principales alteraciones provocadas por el *Rubulavirus* porcino y compararlas con el perfil serológico. Así se hizo evidente la presencia de animales positivos, en la mayoría de las etapas productivas, a excepción del sitio 2.

### **A.1) Sitios 1.**

El sistema de producción cuenta con dos sitios 1 con capacidad para alojar a 7,500 hembras cada uno, ahí se alojan únicamente las hembras reproductoras en la etapa de gestación y maternidad, en salas suficientes para permanecer durante los 114 días de gestación y 21 días lactancia.

Las dos granjas se encuentran separadas y delimitadas por una cerca perimetral, cuentan con arco y vado sanitario donde se fumigan sin excepción todos los vehículos que ingresan al perímetro de la granja, así como un baño en donde el personal y visitas deben utilizar obligatoriamente. Además cuenta con ropa estéril exclusiva para trabajo en granja que se otorga a toda la persona que ingresa a las granjas.

Los silos de alimento, el tanque de gas y el embarcadero se encuentran en la frontera de la barda perimetral por lo que ningún proveedor tiene acceso a las instalaciones. Por otro lado cada edificio cuenta con comederos y bebederos automáticos; por todo esto se consideran como granjas tecnificadas.

El destete de lechones se da a los 21 días de edad promedio y se llevan a cabo todos los manejos zootécnicos y sanitarios necesarios para procurar el bienestar

de hembras y lechones. Los lechones producidos en este sitio se separan de su madre a dicha edad y pasan al sitio dos.

### **A.2) Sitios 2:**

En estos sitios cerca de 4,000 lechones permanecen de los 21 a los 60 días de edad, tienen capacidad para alojar a toda la producción proveniente de las granjas sitios 1 y están divididos por edificios, también se encuentra dividido cada corral por una cerca perimetral y cuenta con las mismas características que se citan para el sitio 1.

### **A.3) Sitios 3:**

Estos sitios tienen la capacidad para alojar 16,000 cerdos cada uno, los que salen a rastro a los 180 días de edad, con un peso aproximado de 100Kg, para su comercialización en canal y también los silos, tanque de gas y embarcadero se encuentran en la frontera de la barda perimetral y cuentan con las medidas de bioseguridad descritas anteriormente.

### **A.4) Cuarentena**

Esta tiene capacidad para alojar a las hembras, que ingresan a la granja, provenientes de fuentes externas (casas productoras de pie de cría), así como provenientes de sus sitios tres (autorreemplazos).

Está ubicada en una zona estratégica para evitar contacto con otros animales así como gente externa a la granja. No es permitida la entrada de ninguna persona

ajena y cuenta con todas las medidas de bioseguridad necesarias antes mencionadas.

En esta cuarentena se les practica un monitoreo serológico a todas las cerdas para identificar el estado inmunitario en que se encuentran y determinar cuales se encuentran en un estado óptimo para su ingreso a sitios uno.

#### **A.5.) Posta de sementales**

Esta granja también se encuentra separada de los otros sitios de producción y mantiene sementales de alto valor genético altamente seleccionadas para la producción. Cuenta con un laboratorio para procesamiento del semen y elaboración de pajillas que se utilizan para la inseminación artificial a las hembras del sitio uno.

#### **B) Monitoreo serológico**

Se realizó un monitoreo serológico transversal cada cuatro meses a un total de 300 cerdos, incluyendo las cerdas productoras y a la línea de producción.

A las cerdas que se encuentran en los sitios uno se les realizó un monitoreo serológico para realizar la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) hacia la enfermedad del Ojo Azul; los sueros fueron identificados con la fecha del muestreo así como la identificación de la cerda incluyendo el número de parto al que corresponde. Identificando cerdas de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 o más partos.

Con el monitoreo serológico de la línea de producción se obtuvieron muestras de suero de animales de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 y mayores de 180 días de edad para analizar la misma prueba serológica.

Por otro lado para obtener un patrón serológico lineal se realizó un muestreo sanguíneo transversal a 10 lechones provenientes de hembras positivas hasta su salida a rastro.

Una vez identificadas las muestras de suero fueron transportadas en refrigeración al laboratorio diagnóstico del Departamento de Producción Animal; Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

### **B.1) Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.**

De las muestras sanguíneas se obtuvo la mayor cantidad de suero posible, para esto es necesario, que desde el momento que se obtiene la sangre se mantenga el Vacutainer sin anticoagulante de forma transversal, una vez obtenido el suero se inactivan las proteínas del complemento incubando en baño María a 56°C/30 minutos.

Para adsorber y eliminar inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación, los sueros fueron tratados de la siguiente manera: En una placa de 96 pozos de fondo en "V" se ponen 200 µl del suero, se adicionan 100 µl de caolín y 100 µl de eritrocitos de bovino al 5% y se deja incubar a 4°C durante 24 horas.

Adsorbidos los sueros se depositan en microplacas de 96 pozos con fondo en "U" 50 µl de PBS (solución de fosfatos con pH de 7.2) en todos los pozos, 50 µl del suero problema (sobrenadante) en la línea "A", se realizan diluciones dobles seriadas de la línea A a la H y se eliminan al final 50 µl. En este momento se debe considerar que las dos últimas hileras sirvan como controles (+ y -).

Posteriormente se agregan 50 µl de antígeno viral con 8 UHA, en cada pozo a partir de la línea A a la H, se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y se adicionan 50 µl de eritrocitos de bovino al 0.5%, en cada pozo. Por último se deja incubar a temperatura ambiente de 30 a 60 minutos.

Como control positivo se utilizará un suero con un título conocido de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, PBS, antígeno viral y eritrocitos. En este caso se considera la muestra como positiva al observar un botón formado al sedimentarse los eritrocitos.

El control negativo es la adición de un suero conocido que no contiene anticuerpos antivirales, PBS, antígeno viral y eritrocitos. En este caso no hay anticuerpos, por tal motivo el antígeno se une a los eritrocitos y hay hemaglutinación.

En la prueba de IH se considera que un suero es positivo cuando presenta un título igual o mayor a 1:16. Una vez identificados los animales positivos y negativos se realizaron las gráficas y cuadros correspondientes a cada perfil serológico realizado durante los años 2000, 2001 y 2002, para realizar el análisis de la información.

## **C) Aislamientos virales.**

Para realizar el aislamiento viral se utilizaron dos grupos de cerdos: menores de 30 días y los otros mayores de 90 días de edad, que presentaron signos clínicos respiratorios y/o nerviosos asociados con la enfermedad del Ojo Azul.

### **C.1) Necropsias.**

La técnica de necropsia para los cerdos muertos y sacrificados se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Aluja y Constantino (2002).

Se obtuvieron 27 muestras de encéfalo y 27 de pulmón; a partir del encéfalo se obtuvieron porciones del cerebro, lóbulos olfatorios y corteza cerebral; del pulmón se obtuvieron muestras de todos los lóbulos (figura 2 y 3).

Cada tejido se maceró por separado, se disolvió en medio de cultivo y posteriormente fue filtrado a través de prefiltros y filtros de 1.2, 0.6, 0.45 y por último se utilizaron filtros estériles de 0.22 micras.

Con 1 ml de cada sobrenadante filtrado se infectaron monoestratos de la línea celular Vero de 24 horas de formación (Imagen 4) y a los 3 días se observa para identificar si existe efecto citopático (ECP) (Imagen 5).

A los 3 y 6 días post infección se obtuvieron 200  $\mu$ l del sobrenadante para confrontarlo con 50  $\mu$ l de glóbulos rojos de ave (Imagen 6), bovino y cuye (por separado) para detectar hemaglutinación provocada por la presencia del *Rubulavirus* porcino, reportando a esta muestra como positiva (Imagen 7 a 9).

Las muestras de órganos y tejidos producto de las necropsias también fueron analizadas por histopatología utilizando formalina buferada al 10% como conservador y después teñidas con hematoxilina-eosina y leídas al microscopio

con la finalidad de encontrar lesiones sugerentes a Ojo Azul, como cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y gliosis difusa.

También se analizaron algunos monoestratos de células infectadas, con microscopía electrónica, para identificar la presencia del virus (Imágenes 10 y 11).

## **D) Caracterización inmunológica**

Se realizó la caracterización inmunológica de siete virus mediante la prueba de IH confrontando los virus aislados recientemente, así como tres aislamientos virales realizados años atrás, con los sueros de campo positivos a la enfermedad de Ojo Azul.

### **D.1) Metodología**

Una vez analizadas las 54 muestras de tejidos se utilizaron 3 de los virus aislados en el año 2002; el primer virus fue aislado a partir de encéfalo de un lechón menor a 30 días de edad (E-L), el segundo proviene de encéfalo de un animal de más de 90 días de edad (E-E) y el tercero fue aislado a partir de pulmón de un animal de más de 90 días de edad (P-E). Por otro lado se aisló un virus proveniente de encéfalo de un animal adulto del estado de Guanajuato en el año 2003, denominado PAC A.

Las tres cepas restantes fueron remitidas para diagnóstico al Departamento de Producción Animal Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia entre los años 1980 a 1995, procedentes de la zona porcícola del bajío de la República Mexicana, a los cuales se les denominó PAC1 (Michoacán/1990), PAC2 (Jalisco 1990) y PAC 3 (Jalisco 1992).

Para realizar la IH, se utilizaron los 7 virus antes mencionados a un título de 8 UH (unidades hemaglutinantes) y aquellos sueros positivos provenientes de los perfiles serológicos de la granja en estudio, referentes al objetivo 2.

Los sueros fueron divididos en: sueros positivos provenientes de lechones menores de 30 días de edad, mayores a 90 días, sueros de hembras reproductoras de 0 partos, 1er parto, 2° parto, 3er parto 4° parto, 6° parto, 7° parto y 8° parto. Cabe mencionar que en el monitoreo serológico de donde se obtuvieron estos sueros positivos, no presentaron seropositividad las hembras de 5° parto, por tal motivo se excluyeron de este ensayo experimental.

Para este análisis inmunológico se utilizó la misma metodología descrita en la técnica de IH, sin embargo al realizar la confrontación de los diferentes antígenos con los sueros positivos obtenidos de las granjas en estudio se interpretaron los resultados de acuerdo a la reacción antígeno anticuerpo.

## **D.2) Interpretación de resultados**

Cuando el reconocimiento entre estos fue:

- Nulo = se observa hemaglutinación porque no hay anticuerpos que reconozcan a ese antígeno.
- Moderado = Se observan títulos bajos, ya que los anticuerpos presentes en el suero no reconocen totalmente a ese virus.
- Total = Se observan títulos altos, porque hay unión y reconocimiento antígeno anticuerpo.



### **D.3) Preparación de los virus para la técnica de IH.**

Los siete virus antes mencionados fueron replicados individualmente en monoestratos celulares de 24 horas de formación de la línea celular Vero 15, provenientes de riñón de mono verde africano.

Mediante la técnica de IH se realizó la caracterización inmunológica de los diferentes virus aislados a través del tiempo, sin embargo es indispensable recordar que los virus deben estar a un mismo título para que los resultados sean confiables.

La titulación se realizó de la siguiente manera:

- En placas de 96 pozos se adicionan 50ml de PBS (todos los pozos).
- Se colocan 50ml de la muestra a titular (1a hilera vertical).
- Se diluyen hasta el penúltimo pozo. (Dejando el último pozo como control sin virus); se pone el control positivo.
- Se adicionan 50 µl de eritrocitos de bovino al 0.5%.

## RESULTADOS

### Afecciones productivas y reproductivas.

#### Parámetros del sitio 1

Se determinaron cuales eran los principales parámetros afectados por el *rubulavirus* porcino reportados para el sitio 1; para lo cual fue necesario realizar una comparación con la información de años anteriores. Los resultados fueron los siguientes para cada una de las granjas:

El porcentaje de repetición se incrementó de un 7-15 % a 28 y 24 % para la granja A y granja B, respectivamente (cuadro 1).

La tasa de parición de la granja A disminuyó hasta en un 20 % ya que este parámetro fue del 63.2 % y para la granja B el 60% (cuadro 1).

El número de lechones nacidos totales (LN) disminuyó a 9.6 y 10.3 para la granja A y granja B, respectivamente. Esto repercutió en otros parámetros productivos directamente relacionados con el número de lechones, como son: número de lechones nacidos vivos (LNV) y lechones destetados; La granja A tuvo una disminución en el parámetro LNV a 8.1 y de 8.8 para la granja B (cuadro 1).

En el caso del número de lechones nacidos muertos (LNM), se observó que se incrementó hasta 11.9 y 8.8% respectivamente para ambas granjas (cuadro 1).

Por otro lado el porcentaje de fetos momificados se aumentó de 2.5% hasta 4.2 y 5.5% respectivamente para la granja A y B (cuadro 1).

El número de cerdos destetados por hembra disminuyó de 9.8 a 6.8 y 7.6 para ambas granjas, afectando considerablemente el número de cerdos que ingresaron al sitio 2 y que posteriormente llegan a finalización. Se encontró una mortalidad predestete (MPD) de 15.9% y 11.9% para la granja A y B, respectivamente (cuadro 1).

La tasa de mortalidad de las hembras se incrementó a 13 y 12.2% para la granja A y B, respectivamente (cuadro 1).

### **Parámetros del Sitio 2**

Es importante mencionar que los sitios 2 no presentaron signología clínica sugerente a la Enfermedad del Ojo Azul y tampoco se afectaron los parámetros productivos.

### **Parámetros del sitio 3**

Por otro lado los sitios tres presentaron signología clínica provocada por el *Rubulavirus* porcino observándose problemas nerviosos, opacidad de la córnea y problemas respiratorios (Imagen 1).

En tres granjas sitios tres se observó un incremento de la mortalidad, alcanzando el 19% (Cuadro 1). Por tal motivo la pérdida económica observada por el incremento de la mortalidad fue de \$9'120,000.00 M. N. ya que el número de cerdos muertos fue de 9,120.

## Monitoreo seroepidemiológico

- Perfil serológico a la enfermedad del Ojo Azul de la Granja A (sitio 1).

Respecto a los resultados de los perfiles serológicos se observa que en la granja A, en el mes de marzo del año 2000, las cerdas reproductoras de todos los partos eran serológicamente positivas a la enfermedad de Ojo Azul, encontrando hasta el 100% de seropositividad entre las cerdas de 6 o más partos. Cuatro meses después (monitoreo julio 2000) el porcentaje de hembras positivas por número de parto disminuyó a excepción de las hembras de 4° parto, que estando en 20% pasó al 30% de hembras con seropositividad (cuadro 2, figura 1).

Para finales del año 2000 las hembras de 0 y 1 parto eran 100% negativas, es decir ingresaron a la granja hembras nuevas negativas y las de primer parto se mantuvieron así. Las hembras de 2°, 4° y 6° parto se encontraban con menos seropositividad, sin embargo las hembras de 3° y 5° parto incrementaron casi el doble con respecto a la serología anterior (cuadro 2, figura 1).

Para los perfiles serológicos correspondientes a los meses de febrero y junio del 2001 se observó un comportamiento similar, pero el incremento del porcentaje promedio de animales positivos en este periodo se atribuye al 70% de hembras positivas de 4° parto (cuadro 2, figura 1).

Por último para el mes de noviembre del 2001 un dato importante en este perfil serológico (cuadro 2) fue el marcado incremento de hembras positivas de 0 y 1 parto, asociado a la introducción de hembras negativas que seroconvirtieron dentro del sitio 1. Por tal motivo cuatro meses después (perfil de marzo 2002) hasta el 90% de las hembras de primer parto eran positivas.

■ Perfil serológico a la enfermedad del Ojo Azul de la Granja B (Sitio 1).

En esta granja se puede observar a través del perfil serológico que la introducción de la enfermedad se presentó a través del tiempo, ya que en el primer perfil serológico, con fecha en el mes de marzo del 2000, el 100% de las hembras era serológicamente negativas (cuadro 3, figura 2).

El primer brote que se presenta en esta granja fue en el mes de julio del 2000, en donde el 11 % de las cerdas de 3er parto eran positivas, para finales del mismo año (noviembre), las hembras de segundo parto seroconvirtieron a la enfermedad en un 21%, y en ese mismo monitoreo se observa que el 11% de las cerdas fueron positivas. Siete meses después (perfil de junio del 2001), solamente las cerdas de 2° y 4° parto fueron 100% negativas, sin embargo para noviembre del mismo año sólo las cerdas ingresadas recientemente (cero partos) fueron 100% negativas (cuadro 3, figura 2).

Las hembras de 0 partos en la serología del mes de noviembre del 2001 eran negativas a la enfermedad del Ojo Azul, cuatro meses después, esas hembras (ahora de un parto) continuaron negativas. Sin embargo la enfermedad se empezó a hacer más evidente en las hembras de cero partos para el mes de junio del 2002, en donde el 90% eran positivas. Y respecto a las hembras que para este monitoreo eran de 1er parto el 50% eran serológicamente positivas (cuadro 3, figura 2).

También se realizó un muestreo serológico longitudinal a hembras que entraron negativas a la granja y posteriormente seroconvirtieron, así como a 10 lechones provenientes de estas hembras realizando a estos un muestreo serológico a los 15, 56, 84, 115 y 145 días de edad.

A finales del año 2002 ésta granja presentaba seropositividad en las hembras de 1°, 2°, 4°, 5° y 6° parto, por tal motivo se puede pensar que la enfermedad se

diseminó en la granja desde el momento que ingreso el virus, sin obtener buenos resultados en su control (figura 2).

■ Perfil serológico de la línea de producción proveniente de granja A.

En el cuadro 4 se observa que en marzo del 2000 los animales de la línea de producción serológicamente negativos eran los de 60 a 90 días. Se observa que hasta el 80 % de los lechones de 15 días eran positivos en este mes.

Cuatro meses mas tarde (julio 2000) se observa, que los animales que se encuentran en el sitio 2, de 30 días en adelante y animales de hasta 135 días (ya estando en sitio 3) se mantienen negativos a la enfermedad.

En el mes de noviembre de 2000 los animales de 45 hasta 165 días eran serologicamente negativos (cuadro 4), este es un dato muy interesante, ya que en el mismo cuadro se observa que un año más tarde se presentó un patrón serológico similar, inclusive con animales negativos desde los 45 días hasta su salida a rastro, por lo que podría estar involucrado el ciclo de la enfermedad, ya que es una enfermedad autolimitante.

En el año 2001 esta enfermedad presentó del 10 al 40% de animales positivos de 15 a 30 días de edad. Los animales con más de 105 días en los perfiles serológicos de febrero y junio se encontraban positivos, sin embargo en el mes de noviembre estos animales mostraron valores negativos (cuadro 4, figura 3).

Durante el año 2002 se presentaron los mismos patrones al año anterior, ya que en el primer monitoreo serológico, correspondiente al mes de marzo el 30% de los animales de 15 días eran positivos a la enfermedad del Ojo Azul, de los 30 a los

105 días fueron negativos, y de los 120 día en adelante se observó seropositividad con un rango de 20 al 70%.

En el mes de junio del 2002 todos los animales resultaron serológicamente negativos; para noviembre del mismo año sólo existía un 10% de animales positivos de 45 días de edad y 20% y 40% de positivos para las edades de 150 y 165 respectivamente (cuadro 4, figura 3).

En la figura 3 se observa claramente un patrón de seropositividad a la enfermedad del Ojo azul en animales menores a 30 días y mayores a 105, ya que los animales de 45 a 90 días fueron serológicamente negativos en un 100% a excepción de animales de 45 días del mes de marzo del 2000 y noviembre del 2002.

■ Perfil serológico de la línea de producción proveniente de granja B.

En el cuadro 5 y la figura 4, que reúnen los 9 perfiles serológicos obtenidos durante los años 2000, 2001 y 2002, se puede observar que los animales seropositivos a ojo azul se localizan principalmente entre la población de 105 días de edad en adelante, los cuales se encuentran en el sitio 3 y hasta el 90% de ellos son positivos a la enfermedad.

También se observa la presencia de un brote en junio del 2002 que provocó hasta el 80% de animales serológicamente positivos (figura 4).

Por otro lado se puede observar que en marzo del 2000 un bajo porcentaje de animales de 15 y 30 días de edad fueron positivos (figura 4).

## **Aislamientos virales**

De los 27 animales de donde se obtuvieron las muestras de encéfalo y pulmón 16 de ellos eran animales de 90 a 120 días de edad y 11 de ellos eran de 15-20 días de edad. En el cuadro 6 y 7 se observa que 20 de los 27 animales fueron positivos.

En el cuadro 7 se puede observar el tejido de procedencia (encéfalo o pulmón) de cada virus aislado; de las 54 muestras estudiadas, 34 de ellas fueron positivas; 18 provenientes de encéfalo y 16 provenientes de pulmón (cuadro 7).

Al agrupar los aislados virales de acuerdo a la edad de los animales, de un total de 34 aislamientos realizados, 22 provenían de animales del grupo de 20-90 días de edad y 12 del grupo de animales de 15-20 días de edad (cuadro 7).

Al analizar la procedencia de los virus por grupo de edad, se observa que de las 12 muestras positivas de lechones de 15 a 20 días de edad 8 (66%) se obtuvieron de encéfalo y 4 de las muestras positivas (34%) provienen de pulmón (cuadro 7). Sin embargo el patrón de los animales adultos es diferente, ya que, de las 22 muestras positivas, provenientes de animales de 90 a 120 días de edad, el 55% se obtuvo de pulmón y el 45% de encéfalo (cuadro 7) (Imagen 2 y 3).

En el cuadro 6 se observan aquellos animales, en donde sólo en uno de sus tejidos se obtuvo el virus. De los cerdos identificados con los números 3 y 7 (100 y 120 días de edad respectivamente) se obtuvieron virus a partir de pulmón. Sin embargo de los cerdos 17, 18, 21 y 24 (lechones de 15-20 días de edad) los aislamientos virales fueron únicamente de encéfalo.

En los cuadros 6 y 7, se observa el número de pase en el que se encontró el virus y el tejido de procedencia, así como el rango de edad de cada cerdo. De los 22



aislamientos virales de cerdos adultos, 8 de ellos (4 de pulmón y 4 de encéfalo) se aislaron en el primer pase, 6 aislamientos en el segundo pase (2 de encéfalo y 4 de pulmón) y en el tercer pase, se aislaron los 8 virus restantes (4 a partir de encéfalo y 4 de pulmón).

Por otro lado los 10 aislamientos de tejidos provenientes de lechones menores a 30 días de edad se obtuvieron; 2 en el primer pase (de encéfalo) y 10 en el segundo pase (6 de encéfalo y 4 de pulmón) (cuadro 6 y 7).

Es importante mencionar que se hace referencia a los dos cuadros, ya que, el cuadro 7 representa un análisis en forma de resumen de todos los datos obtenidos en el aislamiento viral correspondientes al cuadro 6.

### **Caracterización Inmunológica**

Cuando realizamos la confrontación de los siete diferentes virus aislados encontramos datos muy interesantes que se pueden interpretar de la siguiente manera de acuerdo a las respuestas homólogas, es decir la reacción antígeno anticuerpo de cada uno de los virus con su suero, cabe mencionar que sólo se aplica a los virus aislados de la granja en estudio, debido a que los demás virus pertenecen a granjas donde posiblemente existan variaciones en los diferentes aislamientos:

Las reacciones antígeno-anticuerpo de los virus aislados del pulmón (P-E) y del encéfalo (E-E) de cerdos en engorda, presentan un patrón similar de reconocimiento con los sueros de campo de la línea de producción (cuadro 7).

Por otro lado se observa que el virus proveniente de encéfalo de lechón (E-L) tiene un título de 64 para sueros positivos de lechones menores a 30 días y se comporta de forma similar a los virus PAC 1 y PAC A (cuadro 7).

También se realizó el análisis de los datos de forma heteróloga, es decir, los virus que son reconocidos por los anticuerpos presentes en sueros de granjas que no corresponden a la de los aislamientos:

Se observa que los virus P-E y E-E son reconocidos por los anticuerpos de las hembras de más de dos partos. El virus E-L presenta la misma tendencia que los anteriores, pero con diferente título.

Analizando a los virus externos de esta granja se puede mencionar que los virus PAC 1 y PAC A tienen el mismo patrón de reconocimiento por los sueros positivos de cerdos de la línea de producción, pero no corresponden a los títulos de las hembras reproductoras. Los virus PAC 2 y PAC 3 presentan estas características en la línea de producción (cuadro 7).

Cabe mencionar que estas reacciones antígeno-anticuerpo aportan información tan importante, como saber, si existen diferencias entre los aislamientos virales e identificar qué virus es más reconocido por los sueros de las diferentes etapas.

Esto nos dice el tipo de virus que se encuentra actualmente circulando en la granja, así como, los virus a los que han estado expuestas las hembras reproductoras y que han generado anticuerpos hacia ellos, ejemplificado con las hembras de 5° parto que son las que reconocen a la mayoría de los virus de forma muy clara, de acuerdo al título alcanzado (cuadro 7).

## DISCUSIÓN

Respecto a las principales afecciones productivas provocadas por el *Rubulavirus* porcino, se observa la importancia que tiene esta enfermedad en los sitios uno, ya que ocasiona problemas productivos, afectando parámetros productivos como el porcentaje de repetición, el cual presentó un incremento de un 7-15 % a 28 y 24 % para los sitios 1 A y B respectivamente comparado con lo que reportan los parámetros productivos normales (Taylor, 1999) y con algunos otros autores que reportan la presencia de esta enfermedad en granjas de ciclo completo afectando el mismo parámetro con valores hasta del 22.1% permaneciendo estos parámetros en un periodo de 2 - 6 meses (Stephano, 2000) y provocando una infertilidad hasta del 20% (Campos, 1992; Stephano y Gay, 1984; Stephano, 1992b; y 2000).

Otro de los datos reportados por Stephano, (2000) es la tasa de parición de las granjas afectadas por el *Rubulavirus* con una disminución del 6 al 30.2 %, respecto a los parámetros normales. En este estudio se observa que la tasa de parición disminuyó 21.8 % y 25% para las dos granjas sitios uno, ya que del 85% que se considera como parámetro normal, disminuyó para la granja A al 63.2 % y para la granja S B hasta el 60%. (Stephano, 2000).

Por otro lado en el número de lechones nacidos totales se encontró disminución a 9.6 y 10.3 para A y B respectivamente, obteniendo una disminución similar a la reportada en este parámetro por Stephano (2000).

Los parámetros afectados, mencionados anteriormente provocan grandes pérdidas económicas en las granjas porcinas de nuestro país y los parámetros productivos directamente relacionados con la fertilidad de las hembras así como con el número de lechones nacidos totales, afectan directamente al número de lechones nacidos vivos (LNV) que también se vio afectado y que fué de 8.1 y 8.8

para las granjas A y B respectivamente. En donde los reportes generados por Stephano *et al.* (1986b) indican una disminución que presenta un rango de 0.8 a 4.1 respecto a los parámetros normales, reportados por Taylor (1999) el cual es de 11.5 LNV. Sin embargo hubo una similitud con lo reportado por CONASA (1995) en donde este parámetro disminuía hasta 7.3 LNV, de hembras que solían mantener un promedio de 9.3 LNV.

En cuanto al número de lechones nacidos muertos (LNM), se espera un porcentaje del 4-6% en esta etapa (Taylor, 1999), sin embargo en la granja A y B fue de 11.9 y 8.8%, respectivamente, lo cual está dentro de los rangos provocados por el *Rubulavirus* porcino, según Stephano (2000), que reporta un incremento en el porcentaje de este parámetro de 4.5 a 19.6%, cuando la granja presenta un brote. Por otro lado CONASA (1995) reporta el 12 %, en granjas con condiciones similares.

El porcentaje de fetos momificados aumentó de 2.5% que se considera como parámetro normal, hasta 4.2 y 5.5% para ambas granjas, respectivamente, siendo estos casi lo doble del parámetro normal esperado en las granjas porcinas con esta infraestructura, superando así al 36.2% de incremento de este parámetro, publicado por Stephano (2000); también Mercado *et al.* (1997) reportan que experimentalmente las cerdas inoculadas en el segundo tercio de gestación presentan un ligero incremento en el número de fetos momificados después de la segunda semana de inoculación (Mercado *et al.*, 1997; Stephano, 2000; Taylor, 1999).

Es importante destacar que en esta investigación, no se observaron diferencias en el número de partos por hembra por año en comparación con los parámetros normales (Taylor, 1999), debido a que el incremento de los animales positivos a la enfermedad de Ojo Azul fue ocasionado por la introducción de hembras negativas a los sitios uno, que más tarde seroconvirtieron y que fue controlado

eficientemente antes de alcanzar afecciones mayores. Para esto fue necesario un monitoreo serológico con la finalidad de identificar a las cerdas serológicamente positivas y tomar las medidas necesarias para evitar la exacerbación del brote y el incremento de la alteración en más parámetros productivos.

Desde la aparición de esta enfermedad se han identificado altos índices de mortalidad predestete provocados por el *Rubulavirus* porcino, incrementando hasta el 51%, respecto a los parámetros normales en esta etapa productiva (Stephano, 2000). En este estudio la mortalidad predestete (MPD) de la granja A fue de 15.9% y de 11.9% para la granja B. Por tal motivo se observa una disminución en el número de cerdos destetados por camada, en donde el valor de este parámetro fue de 6.8 y 7.6 para la granja A y B, respectivamente, siendo un parámetro normal de esta granja 9.8 lechones destetados por cerda, antes de la entrada de la enfermedad del Ojo Azul.

Otro parámetro afectado fué la tasa de mortalidad de las hembras, que siendo el promedio normal de 6-7%, aumentó a 13 y 12.2% para la granja A y B respectivamente (Taylor, 1999). Stephano (2000) ha reportado que el porcentaje de mortalidad en hembras reproductoras va de 0.3 hasta 13 %, sin embargo estos valores son obtenidos de granjas de ciclo completo, no en granjas establecidas en sitios diferentes, por tal motivo, es importante resaltar que la mortalidad alcanzada en las hembras reproductoras, es alta debido al brote de esta enfermedad en animales que no habían sido expuestos al virus, ya que como se menciona en material y métodos, las hembras ingresan al sitio uno sólo si son negativas a la enfermedad del Ojo Azul.

Respecto al número de partos por hembra por año el valor obtenido para la granja A fue de 2.2, Santa Elena 2.6, mientras que el valor reportado por Taylor (1999) es de 2.4 partos por hembra al año, es decir, que este parámetro no fue afectado debido a que el brote inició en el sitio uno, originado por la introducción de

hembras serológicamente positivas, pero las medidas de control implementadas en el momento del brote, evitaron que este parámetro se viera afectado; por tal motivo, el anestro prolongado en el 25% de las reproductoras durante cinco meses, como lo reporta Guillén (1984), no fue observado.

Es importante mencionar que durante el brote de la enfermedad existían hembras de más de un parto que sí habían tenido exposición previa a la enfermedad, por tal motivo, en el sitio uno, existían lechones con anticuerpos maternos que no presentaban la enfermedad aunque fueran serológicamente positivos, esto evitó que los parámetros de los cerdos en crecimiento se vieran afectados, a diferencia de lo reportado por Stephano y Gay (1985b), en donde los cerdos de 15 a 45 kg de peso presentaban del 5 a 20% de mortalidad y severas manifestaciones del sistema nervioso central y respiratorias. Sin embargo, los animales en la etapa de finalización que se encontraban en el sitio tres presentaban signología clínica sugerente a la enfermedad del Ojo Azul; es decir, problemas nerviosos, opacidad de la córnea y problemas respiratorios evidentes como lo reportan varios autores en diversas edades (Hernández-Jauregui *et al.*, 1992; Stephano HA, 1983; Stephano HA, 1989). Sin embargo, Martínez *et al.*, (1998), menciona que la enfermedad afecta principalmente a verracos, cerdas y crías lactantes y en menor grado a cerdos en crecimiento muchos de los cuales no mueren, discrepando con este reporte, ya que en este estudio se observó claramente que los cerdos de engorda presentaron importantes alteraciones nerviosas y respiratorias alcanzando altos porcentajes de mortalidad. (Martínez *et al.*, 1998).

El sitio tres fue afectado, ya que la signología nerviosa era evidente y se observó signología respiratoria como disnea, tos y estornudos similar a lo observado por Hernández *et al.* (1992). Se observaron lesiones en los lóbulos pulmonares (Stephano HA, 1992), sugerentes a un proceso neumónico bacteriano y el porcentaje de mortalidad en cerdos de 75 a 180 días de edad en el periodo más crítico de la enfermedad fué de 19% en tres sitios finalizadores, por tal motivo las

pérdidas económicas señaladas en los resultados alcanzaron esas dimensiones. Cabe mencionar que no existen reportes donde se alcance dicha mortalidad y pérdidas económicas asociadas a la presencia del *Rubulavirus* porcino en cerdos de finalización, sin embargo sí existen reportes que mencionan que la presencia de las complicaciones respiratorias en cerdos en finalización, provocadas por el *Rubulavirus* porcino, afecta del 25 al 30% del hato (Hernández J, 1992; Hjertner B, 1997).

En cuanto a los resultados de los perfiles serológicos existen pocos reportes sobre monitoreos transversales, sin embargo, se ha visto que existen altos porcentajes de seropositividad en la zona del bajío de nuestro país debido a las condiciones en las en que se encuentra la porcicultura de dicha zona (Stephano, 1992). La técnica de la Inhibición de la hemaglutinación fue realizada como la reporta Ramírez *et al.* (1996) en un artículo sobre la modificación de algunas variables para identificar con mayor especificidad al *Rubulavirus* porcino, en donde los resultados más confiables obtenidos mediante esta técnica se lograron con eritrocitos de bovino al 0.5% y con un antígeno obtenido de cultivo celular con 8 unidades hemoaglutinantes y a temperaturas cercanas a 25°C.

Esta prueba serológica ha sido la más utilizada en México para determinar la difusión del *Rubulavirus* porcino y establecer el patrón de circulación viral dentro de las granjas porcinas como se obtuvo en el presente estudio (Martínez *et al.*, 1986). Es utilizada desde el inicio de la aparición de la enfermedad, debido a la facilidad y especificidad que se presenta por la reacción antígeno anticuerpo. También se han realizado evaluaciones de esta técnica, en donde, la sensibilidad alcanzada durante una evaluación en una granja con brotes de la enfermedad del Ojo Azul, fue de 98.9% de sensibilidad (Morilla *et al.*, 2000), sin embargo este último reporte se realizó con un antígeno que alcanzaba un título de 1:32, en donde se consideró que un suero positivo era con una dilución de 1:80 en

adelante a diferencia del título de nuestro antígeno como se mencionó en los resultados.

En esta investigación se observa que la seropositividad en las hembras reproductoras es diferente a través de los años, así como su presencia de acuerdo al número de parto en el que se encuentran. Sin embargo, es importante resaltar que los resultados concuerdan con lo reportado por Morilla *et al.*, (2000), en donde los porcentajes de positividad a la enfermedad de Ojo Azul variaron de 40 a 100%, para las hembras de 1er hasta 5° parto, respectivamente. Los resultados serológicos en hembras reproductoras son variables, ya que el porcentaje de seropositividad varía de acuerdo al momento del muestro serológico y el manejo de la granja, así como el tipo de sistema de producción en el cual se está realizando el monitoreo, por tal motivo los porcentajes de hembras positivas al *Rubulavirus* porcino puede variar.

También se puede ver en la figura 2, en la granja Santa Elena, como seroconvirtieron las hembras del año 2000 al 2002, incrementando gradualmente el número de hembras positivas, a partir del segundo muestreo del año 2000, en donde las hembras empezaron a seroconvertir hasta llegar al 90% de seropositividad en algunos muestreos (Morilla *et al.*, 2000).

En el monitoreo serológico de julio del año 2000 el porcentaje de hembras positivas por número de parto disminuyó a excepción de las hembras de 4° parto, que pasó de 20% a 30% de seropositividad, corroborando que estos porcentajes difieren con los reportados por Morilla *et al.*, (2000) y Stephano *et al.* (1988b).

El muestreo serológico longitudinal de 10 lechones provenientes de hembras positivas, a los 15, 56, 84, 115 y 145 días de edad, fue importante para identificar los niveles de anticuerpos obtenidos a través del calostro y la permanencia de éstos en la primera serología, realizada a los 15 días, para posteriormente presentarse sólo un 9% de seropositividad a los 115 días de edad. Rosales *et al*



(1987) reportaron que en las granjas afectadas clínicamente las cerdas pueden tener anticuerpos IH detectables y sus lechones pueden ser negativos o los lechones ser seropositivos y las hembras seronegativas, así como también es posible encontrar granjas donde los animales clínicamente enfermos sean serológicamente negativos a la enfermedad del Ojo Azul (Rosales *et al.*, 1987). Por otro lado, Morilla *et al.*,(2000) reporta la presencia de anticuerpos maternos durante los 2 primeros meses de edad, lo cual no se observó en este monitoreo longitudinal, ya que no se detectó seropositividad en animales de 60 días de edad.

En los animales de la línea de producción de hembras provenientes de ambas granjas se observa que existen animales serológicamente negativos de edades de 45 a 70 días, durante los 2 años de monitoreo serológico; este perfil es semejante al descrito por Martínez *et al.* (1987) y por Morilla *et al.*, (2000) los cuales atribuyen la presencia de seropositividad a partir del día 75 por la disminución de los anticuerpos maternos, alrededor de los 2 meses de edad, y es posible que entre el segundo y tercer mes de edad ocurra una infección que se refleja por el incremento del número de cerdos seropositivos a partir del tercer mes de edad.

Es importante mencionar que en la serología de la línea de producción de la granja A (cuadro 5) en el mes de noviembre del 2001 y noviembre del 2002 son similares, ya que existía 0% de positividad en los animales de 45 hasta 165 días, este es un dato interesante, ya que se observa un patrón serológico similar para estos años en la línea de producción de la granja B, por lo que podría estar involucrada la autolimitación de la enfermedad sin llegar a cerrar su ciclo, debido a que los sitios tres no tienen un manejo “todo-dentro, todo-fuera” que permita que la enfermedad se autolimite (Stephano *et a.*, 1986a).

Los diferentes patrones observados en años distintos corresponden al estado inmunitario de los animales, así como de las características zoonositarias de la

granja. Por tal motivo la seropositividad, de las granjas ubicadas en la zona del bajo y occidente de la República Mexicana, presenta un rango de 20 al 70% (Fuentes *et al*, 1992; Stephano *et al.*, 1988b; Stephano, 1998, Stephano, 2002).

Como conclusión del monitoreo serológico realizado en esta investigación es importante hacer notar la presencia de anticuerpos contra el *Rubulavirus* porcino en el suero de todos los animales, con excepción de aquellos que se encuentran en el sitio 2, es decir animales de 30 a 60 días de edad. Lo cual indica que la diseminación de la enfermedad se da en las hembras reproductoras y que posiblemente la presencia de anticuerpos maternos evite la presencia de la enfermedad en animales de estas edades, por tal motivo, al disminuir los anticuerpos maternos y encontrarse inmunodeprimidos provoca la recirculación del virus en animales que llegan al sitio tres, en donde se encuentran desde los 60 días hasta su salida a rastro, que fluctúa alrededor de los 180 días de edad.

Los aislamientos virales se realizaron en la línea celular Vero, las cuales tienen un origen de riñón de mono verde africano, sin embargo existen otras líneas celulares que pueden ser utilizadas para la identificación del *Rubulavirus* porcino como las células de riñón de cedo (PK-15) (Hjertner *et al*, 1997; Hernández *et al*, 1997), testículos de cerdo (ST), riñón de hamster lactante (BHK) en donde el virus también causa efecto citopático y en células PK-15 se han observado cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, debido a que es un virus RNA. (Stephano y Gay, 1986; Moreno *et al*, 1986, Moreno *et al*, 1995).

Al analizar el número de aislamientos virales obtenidos de acuerdo a la edad de los cerdos y al tejido de donde estos provienen; de las 12 muestras positivas de lechones de 15 a 20 días de edad 8 (72%) se obtuvieron de encéfalo y 4 (36%) provienen de pulmón, por tal motivo es importante relacionar la edad del animal con el posible aislamiento viral, ya que Reyes-Leyva *et al.* (1993 y 1997b) han

reportado la relación directa que existe entre la edad del animal y el tropismo viral, debido al reconocimiento celular que tiene el virus sobre la molécula NeuAc2,3-Gal y la cantidad de esta molécula, en diferentes tejidos de acuerdo al grado de desarrollo y maduración del animal. En donde se encuentran mayores concentraciones de esta molécula en sistema nervioso de lechones a diferencia de los verracos, en los cuales la concentración más alta se encontró en tejido testicular.

Por otro lado cabe mencionar que el virus se puede identificar desde el tercer día post infección en la mucosa nasal y en el bulbo olfatorio, para el séptimo día en las estructuras mesencefálicas como hipocampo, tálamo e hipotálamo de donde puede ser aislado, y si el virus ingresó por microgotas podrá ser identificado en lóbulos pulmonares craneales (Allan et al. 1996; Reyes-Leyva et al. 1997b).

También destaca el número de aislamientos provenientes de pulmón, de los cuales 16 de ellos fueron en animales de 90 a 120 días de edad y 11 en animales de 15-20 días de edad, esto quiere decir que el aislamiento a partir de este tejido representa una alternativa más para la detección del *Rubulavirus* porcino, de tejido provenientes de animales de engorda con signología respiratoria, ya que el virus ingresa por microgotas y se localiza en pulmones provocando neumonía intersticial (Collier y Oxford, 2000; Iorio et al., 1986; Bowden et al., 2001; Chua et al., 2000). Sin embargo, también se ha encontrado en otros tejidos como hígado y bazo (Correa et al., 1986; Moreno et al., 1986).

Respecto a la utilización de la técnica de inhibición de la hemaglutinación para realizar la caracterización inmunológica donde se determinaron las posibles diferencias entre aislamientos virales obtenidos a través de los años, es importante mencionar que esta investigación es la primera donde se utiliza dicha técnica para identificar diferencias virales, de acuerdo a las respuestas obtenidas por el reconocimiento antígeno anticuerpo de la confrontación de un mismo suero

con antígenos del mismo género que fueron aislados de diferentes brotes en diversas granjas de la zona Bajío y Occidente de nuestro País.

Cuando se realizó la confrontación de los siete diferentes virus con cada suero se observó que existe una relación entre los diferentes aislamientos virales, ya que todos fueron reconocidos por los sueros de la granja.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados podemos decir que se observan diferencias entre los siete diferentes aislamientos virales, ya que no fueron reconocidos por los anticuerpos, presentes en el suero, de la misma forma. Los virus P-E (pulmón de engorda) y E-E (encéfalo de engorda), presentaron el mismo patrón de reconocimiento con los sueros de campo de la línea de producción y puede indicar que es el mismo virus, sin embargo, no fueron reconocidos de la misma forma por los sueros de las hembras reproductoras. Reyes-Leyva *et al.* (2002) han reportado las diferencias en reconocimiento antigénico entre diferentes cepas virales, utilizando un diagrama que reúne los resultados de diferentes ensayos inmunológicos.

Por otro lado se observa que el virus proveniente de encéfalo de lechón (E-L) tiene un título de 64 para sueros positivos de lechones menores a 30 días y se comporta de forma similar a los virus PAC 1 y PAC A, por tal motivo se puede pensar que estos tres virus tienen un mismo origen, aunque se hayan aislado en diferentes años y en diferentes granjas; y que presentan diferencias estructurales con respecto a los demás aislamientos virales como las reportadas por Reyes-Leyva *et al.*, (2002), quienes al evaluar las reacciones antigénicas cruzadas entre diferentes aislados virales propusieron que algunos de ellos podrían ser variantes silvestres de los virus aislados en los primeros brotes de la enfermedad del ojo azul.

## CONCLUSIONES

- El brote afectó la productividad del sistema, ya que se redujo el número de LNV y se incrementó la mortalidad predestete, así como aquellos parámetros productivos que son afectados por la disminución de la fertilidad en las hembras reproductoras. Cabe mencionar que en este brote la etapa de engorda también fue afectada severamente con altos porcentajes de mortalidad.
- Los aislamientos virales fueron obtenidos principalmente de animales de engorda, sin embargo, la mayoría de los aislamientos provenientes de los lechones, fueron a partir de encéfalo, y por el contrario, se logró aislar un mayor número de virus a partir de pulmón de aquellos animales de más de 90 días de edad.
- La inhibición de la hemaglutinación utilizadas para el monitoreo serológico así como para la identificación de diferentes cepas virales, permitió conocer que los virus si presentan diferencias entre ellos y que mediante esta técnica se pudo identificar al virus que se encuentra circulando en la granja.
- La recapitulación a través de los años que se ha escrito en esta tesis, marca claramente las variaciones en la signología clínica presente en animales de diferentes edades a través del tiempo; lo cual da pie a la continua búsqueda de información, acerca de las posibles diferencias genómicas existentes entre los diversos aislamientos virales, que permita determinar todas las posibles cepas virales distribuidas en nuestro país para controlar la enfermedad del Ojo Azul de una forma adecuada.

**LITERATURA CITADA**

- Ahmed R, Biron CA (1999). Immunity to Viruses. En: Fundamental Immunology, Fourth Ed. Paul WE. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 1295-1334.
- Aluja SA, Constantino CF (2002). Técnicas de necrópsias en animales domésticos. 2ª ed. Manual Moderno: p10
- Allan GM, McNeilly F, Walker Y, Linné T, Moreno-Lopez, Hernbndez-Jáuregui P, Kennedy S, Carrol BP, Herron B, Foster JC, Adair B (1996). A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: Immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:pp. 405-413.
- Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linné T (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polipeptides, P, V and C; the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.* 73: 1195-1200.
- Bowden TR, Westenberg M, Wang LF, Eaton BT, Boyle DS (2001). Molecular characterization of Menangle virus, a novel paramyxovirus which infects pigs, fruit Bats, and humans. *Virology* 283: 358-373.
- Campos HR, Carbajal SM. (1989). Transtornos reproductivos de los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. Mem 24<sup>th</sup> Congr Asoc Mex Vet Esp Cerdos, Morelia, México: 62-64.
- Collier L, Oxford J (2000). Childhood infections caused by paramyxovirus. En: Human Virology Second Ed. Oxford University Press. pp. 75-81.

- CONASA.(1995). Situación del Síndrome del Ojo Azul en México:Impacto económico de la enfermedad:152-156.
- Degos F (1995). Vaccins sous-unités protéiques: exemple de la vaccination contre le virus de l'hépatite B. *Rev Prat* ; 45: 1.488-1.491.
- Fuentes RMJ, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo OME, Fraire I. (1992). Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el Paramyxovirus del Ojo Azul en cerdos en la República Mexicana. *Veterinaria México*, 23:37-39.
- Fuentes RMJ, Gay GM, Herradora LMA, Retana RA. (1994). Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. *Veterinaria México*; Vol.25:3.
- Garcia O (1999). Estudio de la viremia en una infección experimental por Rubulavirus porcino. Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla.
- Guillén AH. (1984). Estudio de un brote de una nueva enfermedad denominada Síndrome del Ojo Azul de los porcinos. Tesis Profesional, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Guadalajara.
- Hernández J, Garfias Y, Nieto A, Mercado C, Montañó LF, Zenteno E (2001). Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to Porcine Rubulavirus: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79: 249-259.
- Hernández J, Garfias Y, Reyes-Leyva J, Chávez R, Lascurain R, Vargas J, Zenteno E (2002). Peanut and Amaranthus leucocarpus lectins discriminate

- between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84: 71-82. 43.
- Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramirez H, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E (1998). Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 367-381.
- Hernández-Jáuregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Diaz-Orea A, Reyes-Leyva J, Hernández-Baumgarten E, Moreno-López J (1992). Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del síndrome del ojo azul en cerdos. *Vet. Mex.* 23: 217-222.
- Hernández-Jauregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Téllez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-López J (2001). Uptake of porcine rubulavirus (LPMV) by PK15 cells. *Arch. Med. Res.* 32: 400-409.
- Hernández LJ, Ramírez MH, Zenteno CR, Monroy BJ, Reyes LJR, Zenteno E. (1997). Neumonitis inducida por el rubulavirus porcino. *Rev Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*; 10: 250-255.
- Hjertner B, Linné T, Moreno L. (1997). Establishment and characterization of a Porcine Rubulavirus (LPMV) Persistent infection in porcine kidney Cells. *Acta Veterinaria Scandinavica*; 38: 213-224.
- Iorio RM, Borgman JB, Glickman RL, Bratt MA (1986). Genetic variation within a neutralizing domain on the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1393-1403.



- Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L (1998). Paramyxovirus RNA synthesis and requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 72: 891-899.
- Lamb RA, Kolakofsky D (1996). Paramyxoviridae: The viruses and their replication,. En: *Fields Virology Third Ed.* Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (Eds.). Lippincott-Raven Publishers. pp. 1177-1204.
- Martínez A, Santiago J, Coba MA, Manjares ME, Correa P, Alvarado N. (1998). Clonación y evaluación de diferentes procedimientos para la titulación del Rubulavirus Porcino (RVP) de La Piedad, Michoacán (LPM). *Memorias XXXIII Congreso Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos*: 196-197.
- Martínez LA, Correa P, Rosales JF, Vazquez C y Garibay M.(1986). Títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) contra el *Paramixovirus* porcino de La Piedad, Michoacán (LPM) en cerdos de diferentes edades. *IPVS*, 9: 313.
- Mercado GC, Ramírez MH, Martínez RO, Carreón NR, Rodríguez TJ, Leguizamo A(1997). Inoculación experimental del Rubulavirus porcino del ojo azul en cerdas gestantes. *XXXII Congreso Nacional AMVEC*. Ixtapa Zihuatanejo. México: 90.
- Morilla GA, Diosdado VF, González VD, Ojeda ZP, Mercado PM, Campomanes CA, Hernández JP, Moreno LJ. (2000). Estudio comparativo entre las prueba de inmunoperoxidasa, ELISA e Inhibición de la hemoaglutinación para el diagnóstico serológico de la enfermedad de ojo azul en cerdos. *Symp Int Enf Em del Cerdo*, Irapuato, Guanajuato, México. Academia Veterinaria Mexicana, A.C.

- Moreno J, Correa P, and Linne T. (1995). Characterisation of the LPM strain of the pig paramyxovirus. First International Symposium upon Pig Paramyxovirus Puebla, Pue. México.
- Moreno L, Correa G, Martínez A and Ericsson A.(1986). Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch. Virol.* 91:221-231.
- Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. (1996). Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del Paramixovirus Porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet. Méx.*, 27(3): 257-259.
- Ramírez MH, Hernández JP, Reyes LJ, Zenteno E, Moreno LJ, Kennedy S. (1997). Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J. Comp. Path.*, 117: 237-252.
- Ramírez TCA, Stephano HA. (1982). Histological central nervous system lesions produced by haemagglutinating virus in naturally infected piglets. *Proc 7<sup>th</sup> Int Congr Pig Vet Soc. México City*: 154.
- Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas SH (1997). Experimental infection of swine and cat central nervous systems by the pig paramyxovirus of the blue eye disease. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 44: 461-476.
- Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S (1997). Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J. Comp. Path.* 117: 237-252.

- Ramírez-Mendoza H, Hernández J, Santos-López G, Garfías Y, Zenteno E, Reyes-Leyva J. Clinicopathological characterisation of Porcine rubulavirus isolates. Manuscrito en preparación.
- Reyes-Leyva J, Hernández JP, Montaña LF, Zenteno E. (1993). The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl(a2,3)lactose-containing structures. *Arch virol.* 133: 195-200.
- Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. (1997a). NeuAc2,3-Gal glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 118: 327-332.
- Reyes-Leyva J, Ramírez H, Hernández J, Rodríguez J, Mercado C, Carreón R, Adair B, Herron B, Alan G, Kennedy S, Zenteno E, Hernández-Jauregui P, (1997b). El sistema olfatorio vía de ingreso del rubulavirus porcino al sistema nervioso central: I. Infección experimental y detección del antígeno. II. Distribución y papel de los ácidos siálicos. *Revista Biomédica* 8 (2): 128-130.
- Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz MT, Vallejo V, Zenteno E. Mecanismos moleculares de patogenicidad viral: Estudios con el rubulavirus porcino. En: *Mensaje Bioquímico Volumen XXVI*, 2002. Del Arenal P, Cea A, Rivero-Rosas H, Vázquez E (Eds.) Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. México DF. Pp 99-127.
- Reyes-Leyva J, García O, Santos-López G, Vallejo V, Ramírez H, Hernández J. 2004. Detección de la viremia en la infección por Rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet.* En prensa.

- Rosales FF, Ramos R, Sánchez-Mejorada P y Correa P. (1987). Presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán, en cerdos encefalíticos con y sin opacidad corneal. Reunión de Investigación Pecuaria en México.: 79-80.
- Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC and Maqueda AJJ. (1981). Estudio de un brote de encefalitis en leones por un virus hemoaglutinante. Mem 17th Congr Assoc Med Vet Esp Cerdos. Puerto Vallarta, Mex. P.43
- Stephano HA and Gay GM.(1983). El síndrome del ojo azul. Estudio experimental. Mem. Reun Inv Pec Mexico. Mex,D.F., pp.523-528.
- Stephano HA and Gay GM. (1984). Experimental studies of a new viral Syndrome in pigs called "Blue Eye" Characterized by Encephalitis and corneal opacity. Proc 8<sup>th</sup> Int Congr Pig Vet Soc, Ghent. P.71.
- Stephano HA (1992a). Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la cornea "Ojo Azul". Avances Prod. Porcina; Vol 1: 245-252.
- Stephano HA (1992b). Blue eye disease. En: Disease of Swine, Edited by A.D. Leman *et al.* Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA: 237-241.
- Stephano HA (2000a). La enfermedad del ojo azul. Signos clínicos y lesiones. En: Memorias del Simposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del Cerdo.
- Stephano HA. (2000b). Las enfermedades del Ojo Azul, signos clínicos y lesiones. Symp Intern Enf Em del Cerdo, Irapuato Gto, México. Academia Mexicana A.C.

- Stephano HA, Fuentes RM, Hernández JP, Herradora LM and Carreón R. (1988). Encefalitis y opacidad de la cornea en cerdos destetados, inoculados experimentalmente con paramyxovirus de ojo azul. *Memorias XXIII Cong Asoc Mexicana Vet Esp Cerdos*. Leon, México: 90-92.
- Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, Maqueda AJJ. (1982). Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemoaglutinante. *Mem 17<sup>th</sup> Congr Asoc Mex Vet Esp Cerdos*. Puerto Vallarta México: 43.
- Stephano HA, Gay GM. (1984). Experimental studies of a new viral Syndrome in Pigs called "Ble Eye" Characterized by Encephalitis and corneal opacity. *Proc 8<sup>th</sup> Int Congr Pig Vet Soc*. Ghent: 71.
- Stephano HA, Gay GM. (1985a). El síndrome del Ojo Azul en granjas engordadoras. *Mem 19<sup>th</sup> Congr Assoc Mex Vet Esp Cerdos*. Mérida, México: 71-74.
- Stephano HA, Gay GM. (1985b). Síndrome del Ojo Azul en Cerdos. I. *Sint Porc.*; 4(5):42-49.
- Stephano HA and Gay GM. (1986). Encefalitis, Falla Reproductiva y Opacidad de la Cornea, Ojo Azul. *Síntesis Porcina* 5;12:26-39.
- Stephano HA, Gay GM, Ramirez TC (1988). Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 122: 6-10.
- Stephano HA, Hernández D, Pérez C, González CT, Ramírez MH, Cervantes A. (1990). Boar infertility and testicle atrophy associated with blue eye

paramyxovirus infection. Proc 11<sup>th</sup> Int Congr Pig Vet Soc. Lousanne Switzerland: 211.

Stephano HA. (1992). Blue eye disease. Disease of swine. Chapter 13.pp.237-241.

Stephano HA, Doporto DJM, Gay M. (1986b). Estudio epidemiológico en dos granjas afectadas por el ojo azul. Proc 9th International Congress Pig Veterinary Soc. Barcelona, Spain.p.456.

Sundqvist A, Berg M, Moreno-Lopez,J. and Linne T. (1992). The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch. Virol.* 122 (3-4), 331-340.

Taylor DJ (1999). Rubulavirus infection and "Blue Eye". Pig diseases 7<sup>th</sup> ed.:54-55.

Zenteno-Cuevas R (1997). Purificación y predicción de determinantes antigénicos y de estructura secundaria en la hemaglutinina-neuraminidasa del paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F.

## CUADROS

**Cuadro 1. Parámetros productivos afectados por la Enfermedad del Ojo Azul de enero a abril del 2002**

	Granja A	Granja B	Normales
- Porcentaje de repetición (%)	28.0	24.6	7-15
- Tasa de parición (%)	63.2	60.6	85
- LN (#)	9.6	10.3	12
- LNV (#)	8.1	8.8	11.5
- LNM (%)	11.9	8.8	4-6
- Fetos momificados (%)	4.2	5.5	2.5
- Cerdos destetados / cerda (#)	6.8	7.6	9.8
- MPD (%)	15.9	11.9	8-12
- N° partos/ hembra/ año	2.2	2.6	2.4
- Tasa de mortalidad hembras(%)	13	12.2	2.2-3

LN= Lechones nacidos totales  
 LNV= Lechones nacidos vivos  
 LNM= Lechones nacidos muertos  
 MPD= Mortalidad pre-destete

**Cuadro 2. Análisis serológico a la Enfermedad de Ojo Azul en la granja A.**

Serología	Número de parto							Prom.
	0	1	2	3	4	5	6+	
mar-00	60,0	73,0	50,0	80,0	20,0	60,0	100,0	63,3
jul-00	10,0	10,0	30,0	10,0	30,0	20,0	91,0	28,7
nov-00	0,0	0,0	12,0	29,0	8,0	71,0	72,0	27,4
feb-01	0,0	0,0	17,0	15,0	27,0	29,0	69,3	22,5
jun-01	0,0	11,0	11,0	30,0	70,0	40,0	59,5	31,6
nov-01	72,0	60,0	9,0	67,0	9,0	80,0	55,5	50,4
mar-02	90,0	30,0	50,0	0,0	0,0	30,0	42,0	34,6
jun-02	27,0	9,0	0,0	0,0	10,0	14,0	35,0	13,6
nov-02	30,0	20,0	10,0	50,0	40,0	0,0	10,0	22,9

Prom= promedio

Este cuadro representa el análisis serológico, de las cerdas de 0 a 6 partos, hacia la enfermedad del Ojo Azul durante los años 2000,2001 y 2002.



**Cuadro 3. Análisis serológico a la Enfermedad de Ojo Azul en la granja B.**

Serología	Número de parto							Prom.
	0	1	2	3	4	5	6+	
<b>mar-00</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>jul-00</b>	0,0	0,0	0,0	11,0	0,0	0,0	0,0	1,6
<b>nov-00</b>	0,0	0,0	21,0	0,0	0,0	11,0	3,0	5,0
<b>feb-01</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	1,7	1,7
<b>jun-01</b>	33,0	50,0	0,0	10,0	0,0	11,0	10,6	16,4
<b>nov-01</b>	0,0	20,0	56,0	40,0	25,0	20,0	24,5	26,5
<b>mar-02</b>	0,0	0,0	44,0	67,0	25,0	0,0	26,0	23,1
<b>jun-02</b>	90,0	50,0	0,0	50,0	0,0	14,0	0,0	29,1
<b>nov-02</b>	0,0	30,0	30,0	0,0	60,0	20,0	60,0	28,6

Prom= promedio

Este cuadro representa el análisis serológico, de las cerdas de 0 a 6 partos, hacia la enfermedad del Ojo Azul durante los años 2000,2001 y 2002.

**Cuadro 4. Análisis serológico a la Enfermedad del Ojo Azul  
de la línea de producción proveniente de la granja A.**

Días de edad													
Serología	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180-195	Prom.
<b>mar-00</b>	80,0	30,0	30,0	0,0	0,0	0,0	10,0	10,0	30,0	20,0	60,0	50,0	26,7
<b>jul-00</b>	11,0	55,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	30,0	20,0	13,8
<b>nov-00</b>	10,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	45,0	10,4
<b>feb-01</b>	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	20,0	50,0	70,0	50,0	0,0	20,8
<b>jun-01</b>	30,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	20,0	20,0	20,0	0,0	10,0	14,2
<b>nov-01</b>	40,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,8
<b>mar-02</b>	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	70,0	60,0	40,0	50,0	22,5
<b>jun-02</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,8
<b>nov-02</b>	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	40,0	20,0	7,5

Prom= promedio

Porcentaje de animales positivos de la línea de producción, de acuerdo a la edad, durante los años 2000, 2001 y 2002.

**Cuadro 5. Análisis serológico a la Enfermedad del Ojo Azul  
de la línea de producción proveniente de la granja B.**

Serología	Días de edad												Prom.
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180-194	
<b>mar-00</b>	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	100	70,0	100	40,0	32,5
<b>jul-00</b>	43,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	60,0	70,0	80,0	24,4
<b>nov-01</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	45,0	4,6
<b>feb-01</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	20,0	60,0	60,0	50,0	0,0	16,7
<b>jun-01</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	20,0	10,0	20,0	0,0	0,0	5,0
<b>nov-01</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	0,0	90,0	50,0	14,2
<b>mar-02</b>	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	90,0	20,0	30,0	0,0	14,2
<b>jun-02</b>	0,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	10,0	10,0
<b>nov-02</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,8

Prom= promedio

Porcentaje de animales positivos de la línea de producción, de acuerdo a la edad, durante los años 2000, 2001 y 2002.

**Cuadro 6. Aislamientos virales (por tejido)obtenidos de cerdos con signología sugerente a la Enfermedad del Ojo Azul.**

Animal	MTRA	TEJIDO	EDAD	RESULTADO	1º	2º	3er
1	1	encéfalo	100	Negativo	(-)	(-)	(-)
	2	pulmón		Negativo	(-)	(-)	(-)
2	3	encéfalo	100	Negativo	(-)	(-)	(-)
	4	pulmón		Negativo	(-)	(-)	(-)
3	5	encéfalo	100	Negativo	(-)	(-)	(-)
	6	pulmón		Positivo	(-)6d	(+++)	
4	7	encéfalo	115	Positivo	(-)6d	(+)	(+++)
	8	pulmón		Positivo	(-)6d	(+)	(+++)
5	9	encéfalo	60	Positivo	(-)6d	(-)	(+)
	10	pulmón		Positivo	(-)6d	(-)	(+)
6	11	encéfalo	80	Positivo	(-)6d	(-)	(+++)
	12	pulmón		Positivo	(-)6d	(-)	(+)
7	13	encéfalo	120	Negativo	(-)	(-)	(-)
	14	pulmón		Positivo	(-)6d	(+)	(+++)
8	15	encéfalo	95	Positivo	(-)6d	(++)	
	16	pulmón		Positivo	(-)6d	(++)	
9	17	encéfalo	90	Positivo	(+)3d	(+++)	
	18	pulmón		Positivo	(+)3d	(+++)	
10	19	encéfalo	105	Positivo	(+)3d	(+++)	
	20	pulmón		Positivo	(+)3d	(+++)	
11	21	encéfalo	95	Positivo	(+)3d	(+++)	
	22	pulmón		Positivo	(+)6d	(++)	
12	23	encéfalo	95	Negativo	(-)	(-)	(-)
	24	pulmón		Negativo	(-)	(-)	(-)
13	25	encéfalo	100	Negativo	(-)	(-)	(-)
	26	pulmón		Negativo	(-)	(-)	(-)
14	27	encéfalo	100	Positivo	(+)3d	(+++)	
	28	pulmón		Positivo	(+)6d	(+++)	
15	29	encéfalo	120	Positivo	(-)6d	(-)	(+++)
	30	pulmón		Positivo	(-)6d	(-)	(+)
16	31	encéfalo	110	Positivo	(-)6d	(-)	(+)
	32	pulmón		Positivo	(-)6d	(-)	(+)
17	33	encéfalo	15-20	Positivo	(-)6d	(++)	
	34	pulmón		Negativo	(-)	(-)	
18	35	encéfalo	15-20	Positivo	(-)6d	(++)	
	36	pulmón		Negativo	(-)	(-)	
19	37	encéfalo	15-20	Negativo	(-)	(-)	
	38	pulmón		Negativo	(-)	(-)	
20	39	encéfalo	15-20	Negativo	(-)	(-)	
	40	pulmón		Negativo	(-)	(-)	
21	41	encéfalo	15-20	Positivo	(+)6d	(++)	
	42	pulmón		Negativo	(-)	(-)	
22	43	encéfalo	15-20	Negativo	(-)	(-)	
	44	pulmón		Negativo	(-)	(-)	
23	45	encéfalo	15-20	Positivo	(-)6d	(++)	
	46	pulmón		Positivo	(-)6d	(++)	
24	47	encéfalo	15-20	Positivo	(-)6d	(++)	
	48	pulmón		Negativo	(-)	(-)	
25	49	encéfalo	15-20	Positivo	(+)6d	(++)	
	50	pulmón		Positivo	(-)6d	(++)	
26	51	encéfalo	15-20	Positivo	(-)6d	(++)	
	52	pulmón		Positivo	(-)6d	(++)	
27	53	encéfalo	15-20	Positivo	(-)6d	(+)	
	54	pulmón		Positivo	(-)6d	(++)	

MTRA= muestra 1º, 2º, 3er= número de pases d=días de infección  
 +=aglutinación ligera, ++=moderada, +++=abundante (ver imágenes 7 a 9).

Aislamientos virales identificados por el tipo de tejido, edad del animal y pase en el cual se presentó la hemoaglutinación.

**Cuadro 7. Número y porcentaje de muestras positivas a OA**

		ANIMALES		MTRAS		PASES			
TOTAL		27	54				1	2	3
POSITIVAS		20	34				10	16	8
Animales	EDAD	Anim (+)	Mtras (+)	ENC (+)	PULM (+)	1	2	3	
27		20	34	18	16	10	16	8	
11	15 - 20	8	12	8 (72%)	4(36%)	2(enc)	10(6e y 4p)	0	
16	90 -120	12	22	10(62%)	12(75%)	8(4e y 4p)	6(2e y 4p)	8(4 y 4)	

Anim= Número de animales  
Mtras= Número de muestras  
ENC= encéfalo  
PULM= Pulmón  
e= encéfalo  
p= pulmón

Resumen del cuadro 6, identificando la cantidad y procedencia de aislamientos virales.

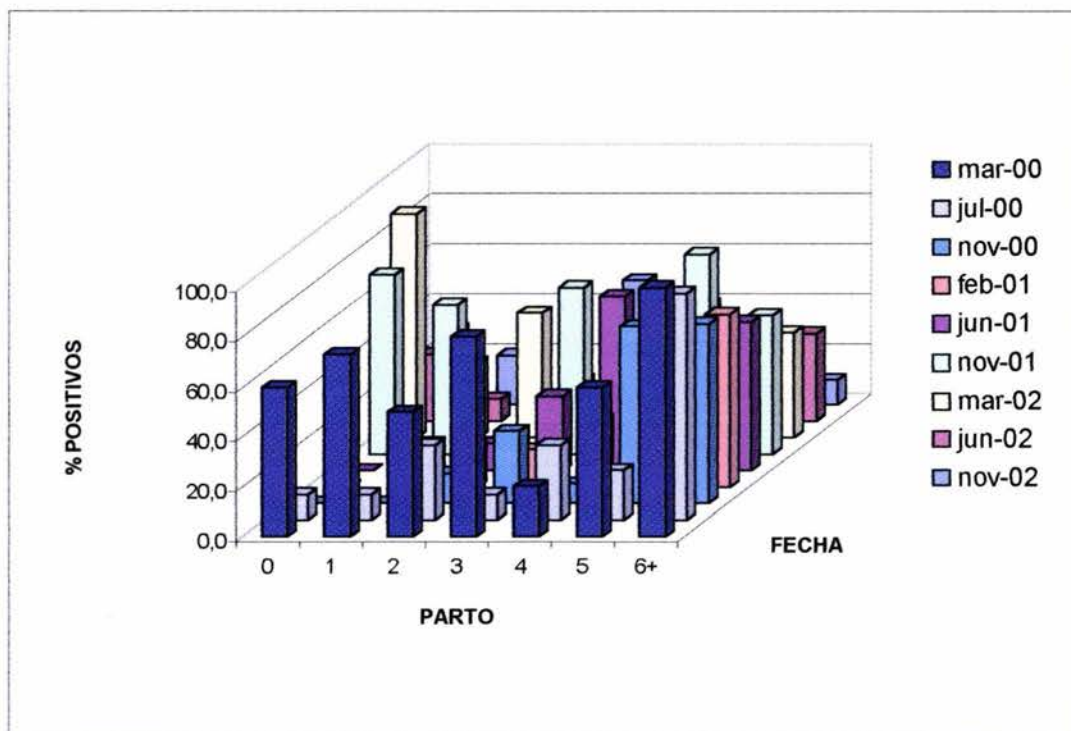
**Cuadro 8. Caracterización Inmunológica mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH).**

VIRUS	EDAD			PARTO							
	< 30 DÍAS	45 DÍAS	>90 DÍAS	0	1er	2 °	3 °	5 °	6 °	7 °	8 °
12 P - E	32	16	16	32	32	128	64	128	64	16	64
13 E - E	32	16	16	32	32	64	64	64	32	16	32
15 E - L	64	32	32	64	64	128	128	128	64	32	64
18 PAC 1	64	16	16	64	64	64	128	128	64	16	64
20 PAC 2	32	8	8	32	32	64	64	128	32	32	32
21 PAC 3	32	8	16	32	32	128	64	128	32	8	32
22 PAC A	64	16	16	32	32	128	64	128	64	16	64

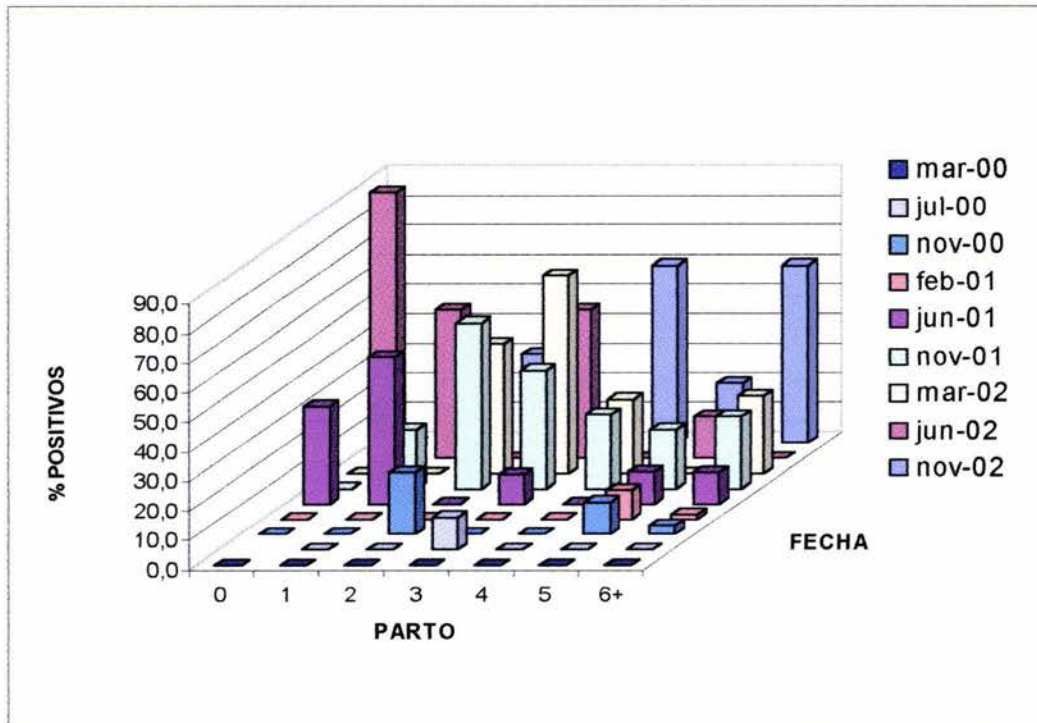
P-E pulmón de engorda  
 E-E encéfalo de engorda  
 E-L encéfalo de lechón

Títulos obtenidos de la IH, mediante la confrontación de siete aislamientos virales, con los sueros obtenidos de diferentes etapas productivas, de cerdos positivos al *Rubulavirus*.

## FIGURAS



**Figura 1. Análisis serológico a la enfermedad del Ojo Azul de la granja A, durante los años 2000, 2001 y 2002 por número de parto.**



**Figura 2. Análisis serológico a la enfermedad del Ojo Azul de la granja B, durante los años 2000, 2001 y 2002 por número de parto.**



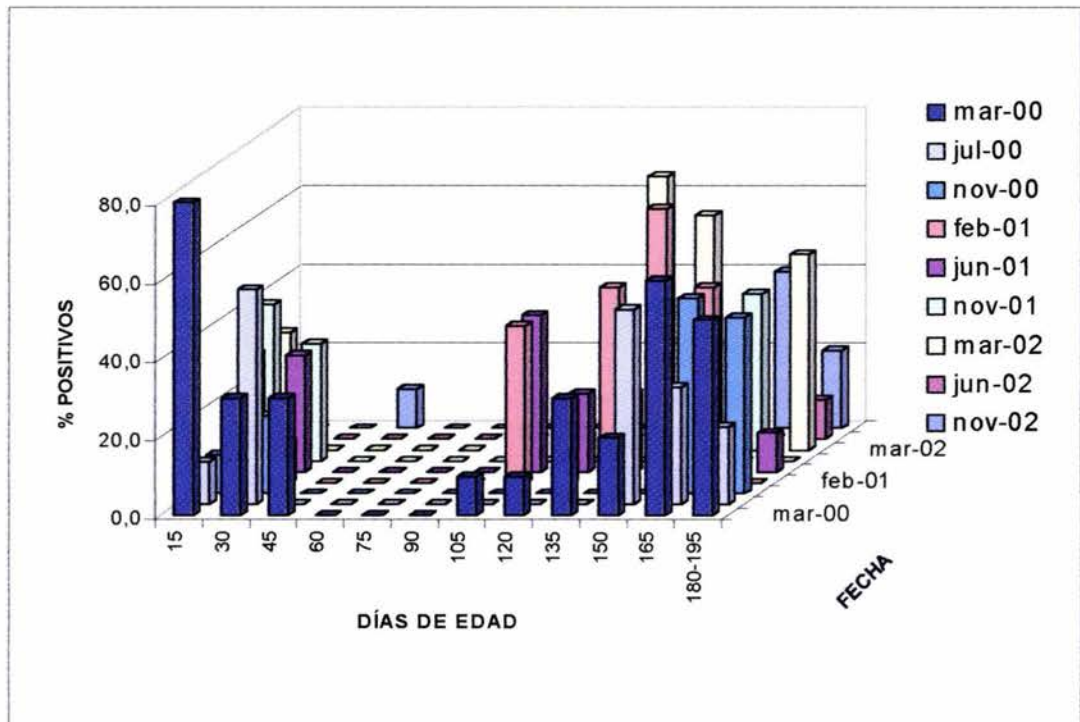


Figura 3. Análisis serológico a la enfermedad del Ojo Azul, de la línea de producción proveniente de la granja A, por edad y fecha de serología.

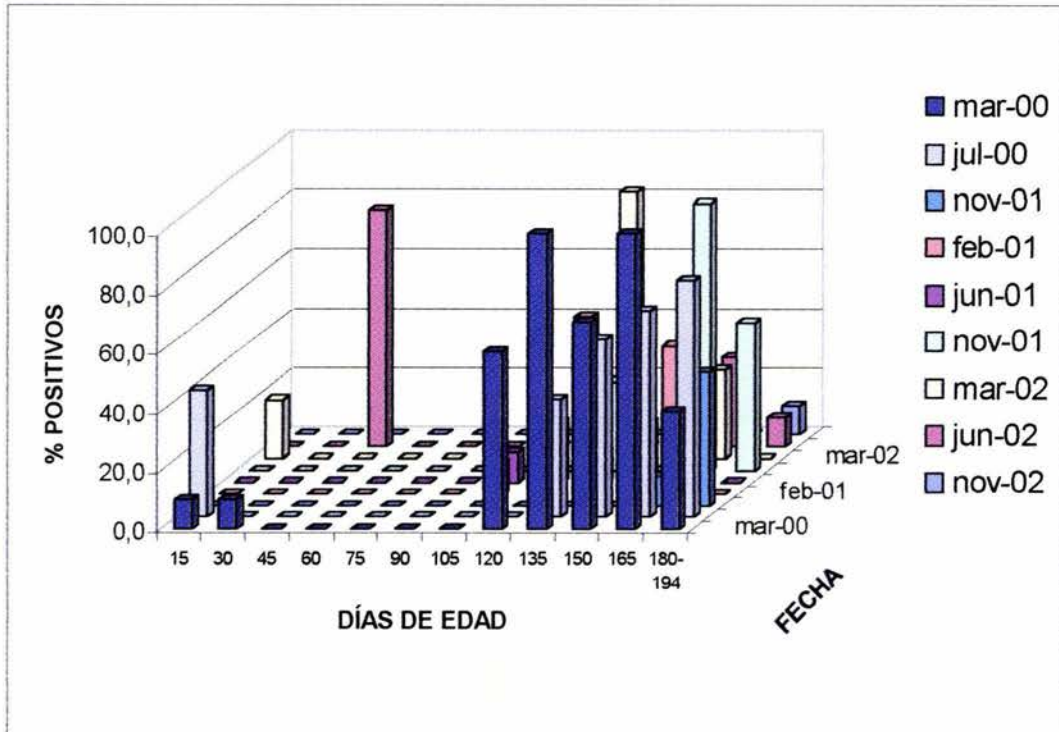
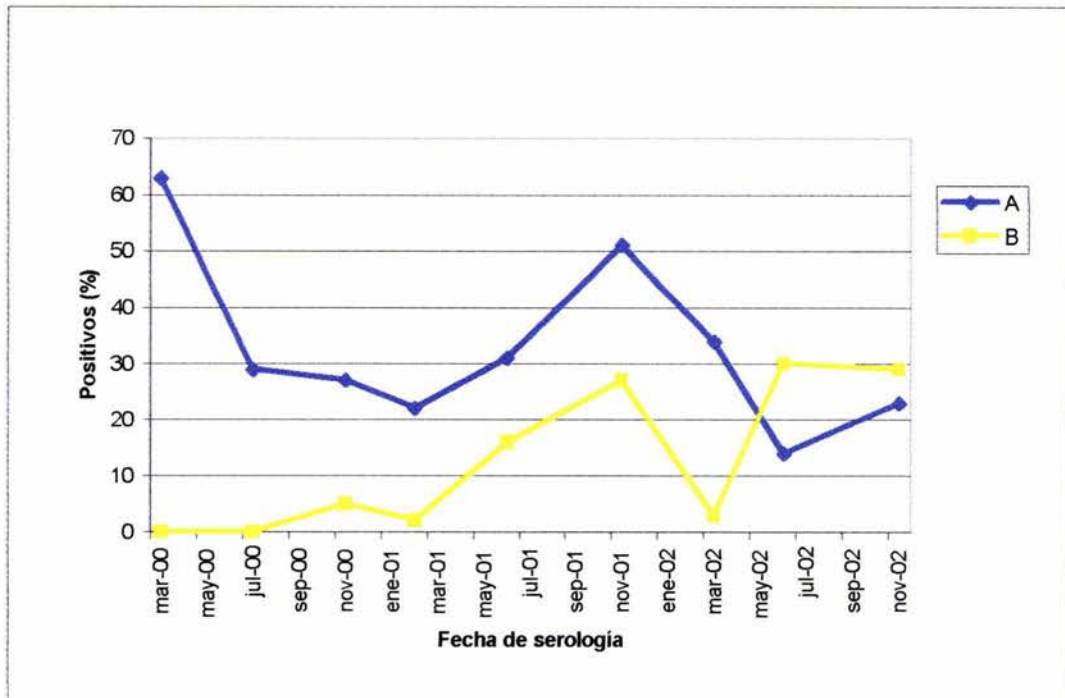
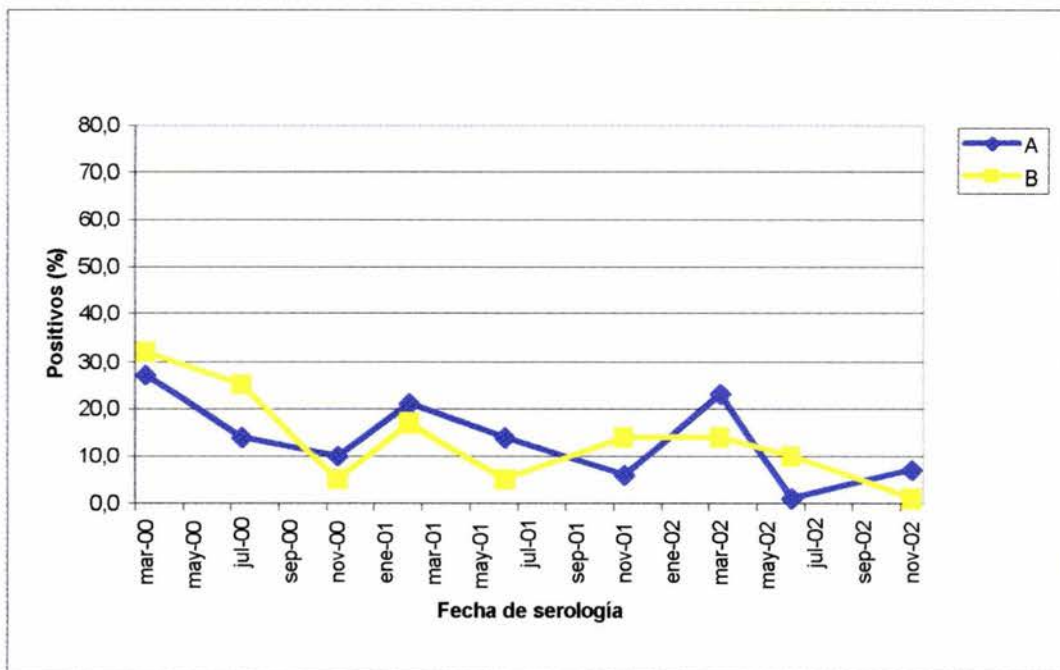


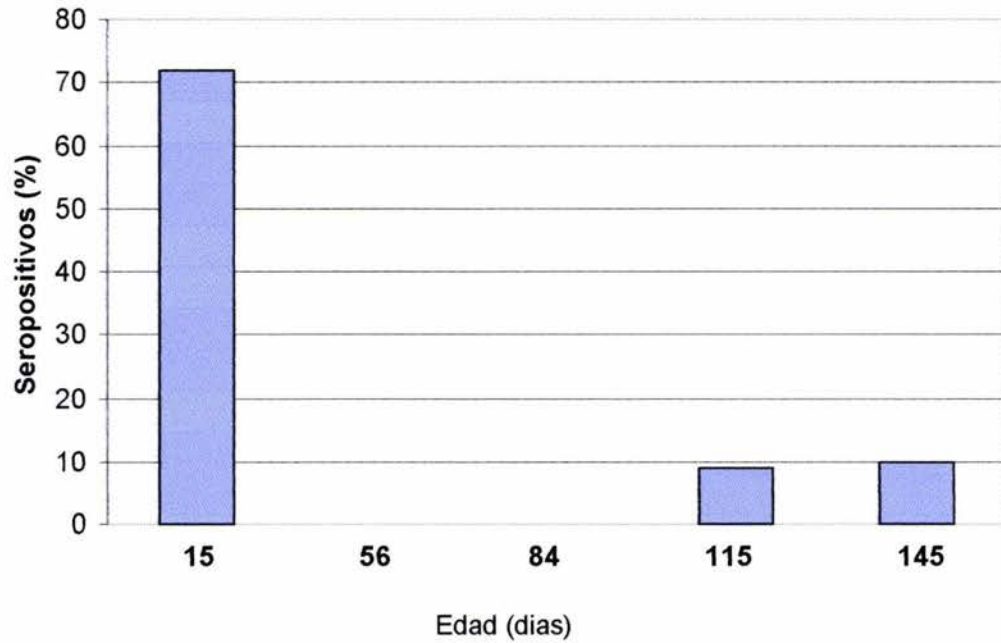
Figura 4. Análisis serológico a la enfermedad del Ojo Azul, de la línea de producción proveniente de la granja B, por edad y fecha de serología.



**Figura 5. Análisis serológico a la enfermedad del Ojo Azul, de las dos granjas, durante los años 2000, 2001 y 2002.**



**Figura 6. Análisis serológico, a la enfermedad del Ojo Azul, de la línea de producción de las dos granjas (2000, 2001 y 2002).**



**Figura 7. Seguimiento serológico lineal de lechones provenientes de hembras positivas a la EOA.**

IMÁGENES



Imagen 1. Cerdo mayor a 90 días de edad con opacidad corneal.

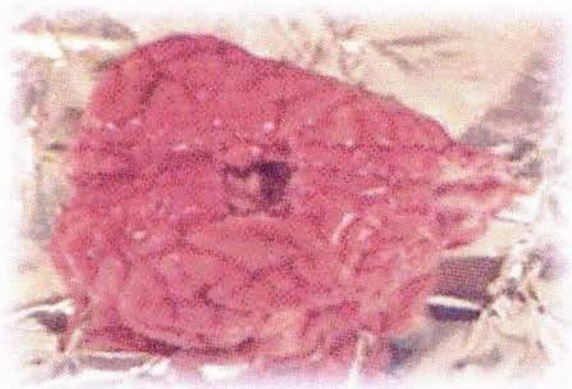


Imagen 2. Encéfalo proveniente de un cerdo adulto con signología nerviosa.

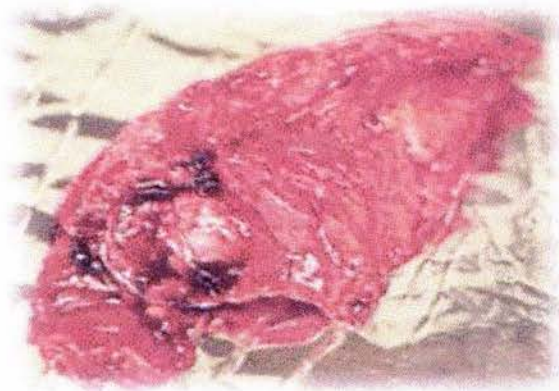


Imagen 3. Pulmón proveniente de un cerdo adulto con signología respiratoria.



Imagen 4. Línea celular Vero (origen: riñón de mono verde africano).

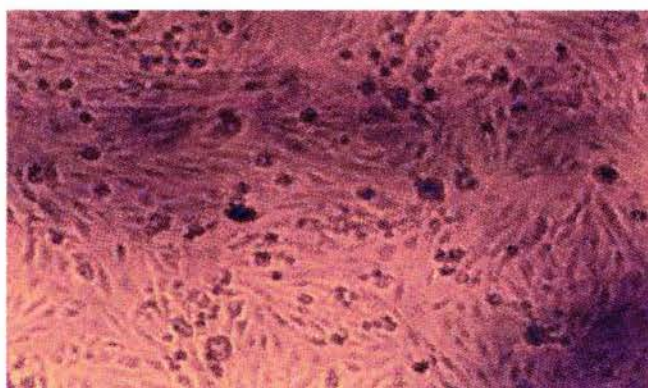


Imagen 5. Línea celular Vero con presencia de Efecto Citopático (EC).

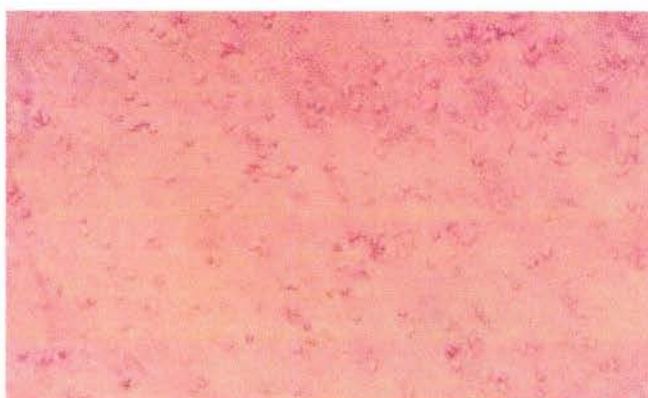


Imagen 6. Eritrocitos de ave.

NOTA: Imágenes observadas con el objetivo 10X de un microscopio invertido convencional.

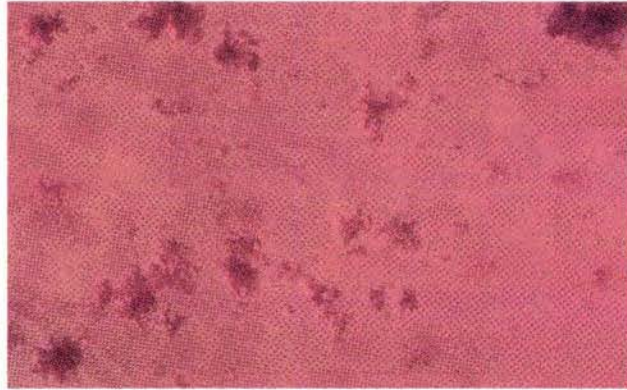


Imagen 7. Eritrocitos de ave con aglutinación ligera (+).

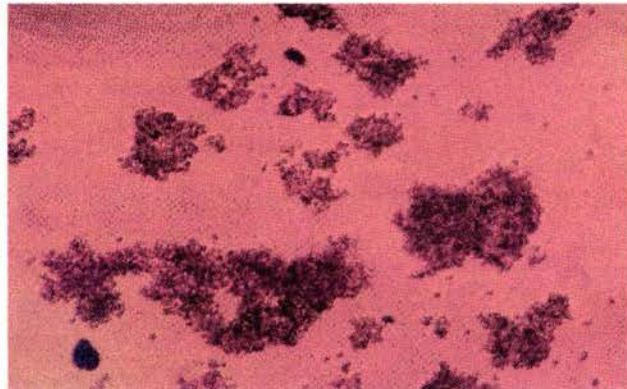


Imagen 8. Eritrocitos de ave con aglutinación media (++)

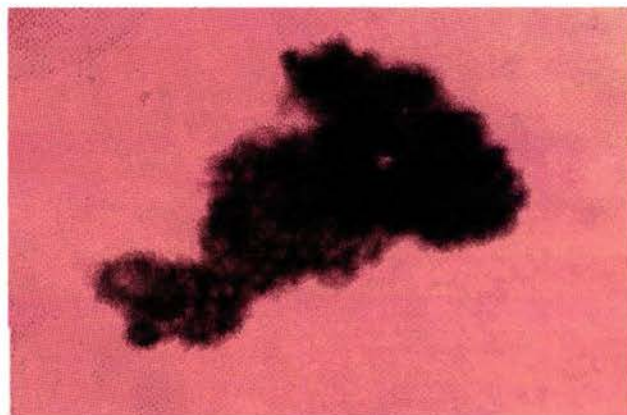


Imagen 9. Eritrocitos de ave con aglutinación total (+++).



NOTA: Imágenes observadas con el objetivo 10X de un microscopio invertido.

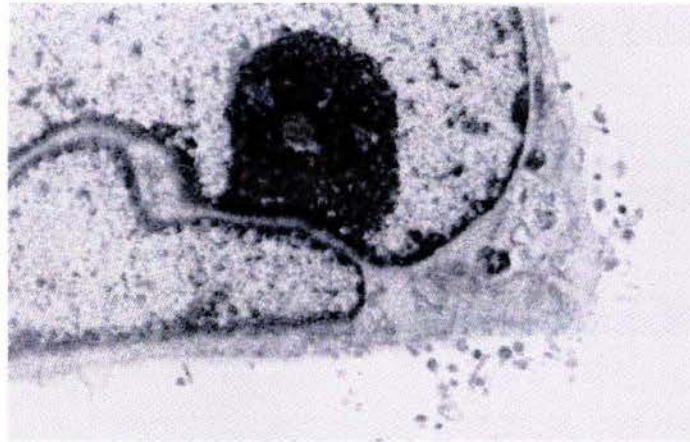


Imagen 10. Microscopia Electrónica panorámica de partículas virales.

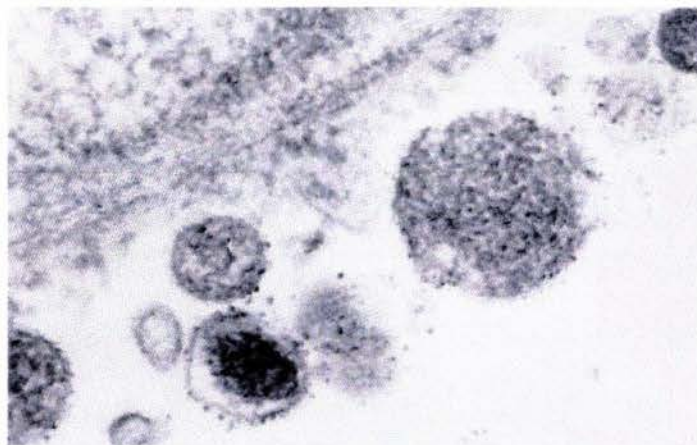


Imagen 11. Microscopia Electrónica del *Rubulavirus* porcino.