



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

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

**INTERACCIÓN DE *Herpesvirus suis* TIPO 1 Y *Rubulavirus*
PORCINO EN CERDOS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
FRANCISCO PÉREZ PONCE

TUTOR:

ALFREDO SAHAGÚN RUIZ

COMITE TUTORAL:

SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA



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.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 ENFERMEDAD DE AUJESZKY	1
1.1.1 SITUACION DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY EN LA REPUBLICA MEXICANA	2
1.1.2 ETIOLOGIA	3
1.1.3 TRANSMISION	3
1.1.4 PATOGENIA	3
1.1.5 SIGNOS Y LESIONES	5
1.1.6 DIAGNOSTICO	6
1.1.7 VACUNACION	7
1.2 ENFERMEDAD DE OJO AZUL	8
1.2.1 SITUACION DE LA ENFERMEDAD DE OJO AZUL EN LA REPUBLICA MEXICANA	8
1.2.2 ETIOLOGIA	8
1.2.3 TRANSMISION	9
1.2.4 PATOGENIA	9
1.2.5 SIGNOS Y LESIONES	10
1.2.6 DIAGNOSTICO	10
1.2.7 VACUNACION	10
1.3 JUSTIFICACION	11
1.4 HIPOTESIS	11
2. OBJETIVO GENERAL	11
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES	11
3. MATERIALES Y METODOS	12
3.1 ANIMALES	12
3.1.1 DESCRIPCION DE LOS GRUPOS	12
3.2 CEPAS VIRALES	13
3.2.1 VIRUS	13

	Página
3.3 ESTUDIOS POSTMORTEM	14
3.4 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	16
3.4.1 HISTOPATOLOGIA	16
3.4.2 SEROLOGIA	17
3.4.2.1 SERONEUTRALIZACION	17
3.4.2.2 INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION	17
3.4.3 IDENTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS VIRALES	18
3.4.3.1 EXTRACCION Y PURIFICACION DE ADN Y ARN	18
3.4.3.2 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA	18
3.4.3.3 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA POR TRANSCRIPTASA REVERSA	19
3.4.3.4 PRODUCTOS DE RCP	19
3.5 CALCULOS MATEMATICOS	19
4. RESULTADOS	20
4.1 SIGNOLOGIA CLINICA	20
4.2 CONVERSION ALIMENTICIA	30
4.3 NECROPSIA	33
4.4 HISTOPATOLOGIA	46
4.5 SEROLOGIA	56
4.6 PRODUCTOS DE LA RCP	60
5. DISCUSION	64
5.1 SIGNOLOGIA CLINICA	64
5.2 CONVERSION ALIMENTICIA	66
5.3 NECROPSIA	66
5.4 HISTOPATOLOGIA	68
5.5 SEROLOGIA	70
5.6 PRODUCTOS DE LA RCP	72
6. CONCLUSIONES	75
7. LITERATURA CITADA	77

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Viabilidad del virus de la Enfermedad de Aujeszky en varios sitios de una granja	4
Cuadro 2. Signos clínicos observados en animales del grupo RuVP	21
Cuadro 3. Signos clínicos observados en animales del grupo HVS-1	24
Cuadro 4. Signos clínicos observados en animales del grupo RuVP/HVS-1	27
Cuadro 5. Peso corporal en kilogramos de los animales del grupo T	30
Cuadro 6. Peso corporal en kilogramos de los animales del grupo RuVP	30
Cuadro 7. Peso corporal en kilogramos de los animales del grupo HVS-1	31
Cuadro 8. Peso corporal en kilogramos de los animales del grupo RuVP/HVS-1	31
Cuadro 9. ANDEVA para GDP en la fase de 8 a 14 días PI para todos los grupos	32
Cuadro 10. Prueba de Tuckey-Kramer para determinar la media GDP	32
Cuadro 11. ANDEVA para CA en la fase de 8 a 14 días PI para todos los grupos	32
Cuadro 12. Prueba de Tuckey-Kramer para CA	32
Cuadro 13. Cambios macroscópicos en el grupo T	36
Cuadro 14. Cambios macroscópicos en el grupo RuVP	40
Cuadro 15. Cambios macroscópicos en el grupo HVS-1	40
Cuadro 16. Cambios macroscópicos en el grupo RuVP / HVS-1	45
Cuadro 17. Cambios microscópicos en el grupo RuVP	49
Cuadro 18. Cambios microscópicos en el grupo HVS-1	52
Cuadro 19. Cambios microscópicos en el grupo RuVP/HVS-1	55
Cuadro 20. Seroneutralización (HVS-1) en el grupo T	56
Cuadro 21. Seroneutralización (HVS-1) en el grupo RuVP	56
Cuadro 22. Seroneutralización (HVS-1) en el grupo HVS-1	57
Cuadro 23. Seroneutralización (HVS-1) en el grupo RuVP/HVS-1	57
Cuadro 24. Inhibición de la hemoaglutinación (RuVP) en el grupo T	58

	Página
Cuadro 25. Inhibición de la hemoaglutinación (RuVP) en el grupo HVS-1	58
Cuadro 26. Inhibición de la hemoaglutinación (RuVP) en el grupo RuVP	59
Cuadro 27. Inhibición de la hemoaglutinación (RuVP) en el grupo RuVP/HVS-1	59

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

	Página
Figura 1. Situación zoonositaria de la Enfermedad de Aujeszky	2
Figura 2. Situación zoonositaria de la Enfermedad de Ojo Azul	8
Figura 3. Medición de la temperatura corporal vía rectal	13
Figura 4. Espécimen preparado para la inspección interna	15
Figura 5. Vísceras expuestas para realizar la inspección interna	15
Figura 6. Extracción del ganglio del nervio trigémino	16
Figura 7. Posición de “perro sentado”. Cerdo 85. Grupo HVS-1	22
Figura 8. Animales pálidos del grupo HVS-1	25
Gráfica 1. Temperatura corporal en los animales de los grupos T, RuVP, HVS-1 y RuVP / HVS-1 expresada en grados Celsius	29
Figura 9. Linfona mediastínico edematoso y hemorrágico. Cerdo no. 81 Grupo T	34
Figura 10. Encéfalo congestionado. Cerdo no. 91. Grupo T	34
Figura 11. Pulmón sin cambios. Linfonodo mediastínico hemorrágico. Cerdo no. 95. Grupo T	35
Figura 12. Encéfalo congestionado. Cerdo no. 93. Grupo T	35
Figura 13. Lesiones discretas al día 7 PI. Cerdo no. 55. Grupo RuVP	37
Figura 14. Encéfalo congestionado al día 7 PI. Cerdo no. 98. Grupo RuVP	37
Figura 15. Necropsia del animal 98 al 7 PI. Grupo HVS-1	38
Figura 16. Linfonodo mediastínico hemorrágico. Día 14 PI. Cerdo no. 87. Grupo RuVP	39
Figura 17. Encéfalo congestionado. Día 14 PI. Cerdo no. 87. Grupo HVS-1	39
Figura 18. Encéfalo congestionado. 7Días PI. Cerdo 53. Grupo HVS-1	41
Figura 19. Vísceras abdominales congestionadas. 7 días PI. Cerdo no. 53. Grupo HVS-1	41
Figura 20. Pulmón consolidado. Día 7 PI. Cerdo no. 90. Grupo HVS-1	42
Figura 21. Pulmón sin cambios vista dorsal. Linfonodo aórtico edematoso y hemorrágico. Día 14 PI. Grupo HVS-1	43

	Página
Figura 22. Pulmón sin cambios vista ventral. Cerdo no. 90. Día 14 PI. Grupo HVS-1	43
Figura 23. Encéfalo congestionado. Día 14 PI. Cerdo no. 52. Grupo HVS-1	44
Figura 24. Linfonodo mediastínico edematoso y hemorrágico. Día 14 PI. Cerdo no. 85. Grupo HVS-1	44
Figura 25. Encéfalo congestionado. Día 14 PI. Cerdo no. 85. Grupo HVS-1	45
Figura 26. Puente de Varolio con infiltración linfocitaria perivascular. Día 7 PI. Cerdo no. 98. Grupo RuVP. 400x	47
Figura 27. Córnea con acúmulo por mononucleares por debajo del epitelio. Día 7 PI. Cerdo no. 98. Grupo RuVP. 400x	48
Figura 28. Neumonía intersticial. Día 7 PI. Cerdo 98. Grupo RuVP. 100x.	48
Figura 29. Médula espinal con gliosis difusa. Cerdo no. 89 Día 14 PI. Grupo HVS-1. 100x	50
Figura 30. Ganglio del nervio trigémino con infiltración linfocitaria. Cerdo No. 57. Día 30 PI. Grupo HVS-1. 100x	51
Figura 31. Bazo con depleción linfoide. Cerdo no. 73. Día 14 PI. Grupo HVS-1. 100x	51
Figura 32. Puente de Varolio con gliosis focal. Día 14 PI. Cerdo no. 75 Grupo RuVP/HVS-1. 100x	53
Figura 33. Cerebro anterior con degeneración neuronal. Día 14 PI. Cerdo No. 59. Grupo RuVP/HVS-1. 400x	53
Figura 34. Pulmón con neumonía intersticial. Día 7 PI. Cerdo no. 50. Grupo RuVP/HVS-1. 400x	54
Figura 35. Nervio óptico infiltrado por mononucleares. Día 14 PI. Cerdo no. 75. Grupo RuVP/ HVS-1. 400x	54
Figura 36. Reacción de PCR del testigo positivo de RuVP en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	60
Figura 37. Reacción de PCR de RuVP en suero sanguíneo del grupo T el día 0. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	61

	Página
Figura 38. Reacción de PCR de RuVP en suero sanguíneo del grupo T el día 7 PI. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	61
Figura 39. Reacción de PCR de RuVP en suero sanguíneo del grupo T el día 14 PI. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	62
Figura 40. Reacción de PCR de RuVP en suero sanguíneo del grupo T de los días 21 PI y 30 PI. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	62
Figura 41. Reacción de PCR del testigo positivo de HVS-1 en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio	63

RESUMEN

Con la finalidad de demostrar que *Rubulavirus* porcino (RuP, cepa PAC 3) y *Herpesvirus suis* tipo 1 (VEA, cepa Shope) actúan sinérgicamente afectando la salud y productividad en cerdos destetados fue diseñado un experimento donde fueron utilizados 36 cerdos, con 21 días de edad aproximada, machos castrados, seronegativos a VEA y RuP. Fueron identificados con aretes plásticos y distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos, con 9 animales cada uno. Grupo 1: Testigo negativo; grupo 2: Ru; grupo 3: VEA; grupo 4: RuP más VEA. Todos los grupos fueron alojados en corrales de piso de cemento con bebedero tipo chupón, aislados, con drenaje y acceso separados. Se utilizó una fórmula comercial para la alimentación de todos los animales. Los días 7, 14, 21 y 30 postinoculación (PI) los animales fueron sangrados para obtener suero sanguíneo para determinar la presencia o ausencia de ácido nucleico del VEA y RuP y por seroneutralización e inhibición de la hemoaglutinación para anticuerpos específicos contra VEA y RuP, respectivamente. Se llevaron estudios postmortem secuenciales los días 7, 14 y 30 PI en 3 cerdos de cada grupo. Fueron sacrificados por sangrado previa insensibilización por aplicación de electricidad con tenazas. Se tomaron cerebro, ganglio semilunar, tonsila, pulmón, hígado, bazo, riñón, timo, páncreas, nódulos linfáticos mediastínicos e íleon, para histopatología. Los animales fueron observados clínicamente todos los días. Los cerdos fueron pesados y el consumo de alimento fue medido los días 1, 8 y 14 PI. El cuadro clínico en los grupos OA y EA coincide con el reportado en la literatura; en el grupo de la doble infección la signología fue generalizada pero moderada aún después de la inoculación con HVS-1. La CA tuvo diferencia significativa ($P > 0.05$) en el grupo RuVP/HVS-1. El grupo T se mantuvo seronegativo a RuVP y HVS-1. Los grupos RuVP y HVS-1 son seropositivos al virus inoculado así como el grupo de la coinfección. El grupo T fue negativo a RuVP por PCR. No se logró demostrar los virus inoculados por PCR en los grupos inoculados a partir de sueros sanguíneos. Los cambios macroscópicos se limitaron a linfonodo mediastínico, pulmón y encéfalo en tanto que las lesiones histológicas, indicativas de infección viral, fueron

observadas en: encéfalo, tonsila, pulmón y bazo, en los animales de todos los grupos inoculados, siendo el grupo RuVP en número de animales e intensidad el menos afectado; seguido en intensidad por RuVP/HVS-1 y el grupo HVS-1 el más afectado en intensidad. A pesar que todos los animales del grupo de la doble infección mostraron lesiones macro y microscópicas en mayor número de órganos y tejidos, no es indicativo de sinergismo entre los virus de la Enfermedad del Ojo Azul y el virus de la Enfermedad de Aujeszky.

Proyecto financiado parcialmente por los programas PAPIIT 213302, 219006 y 226105 y SAGARPA CONACYT 2004-C01-61

1. INTRODUCCION

La tendencia actual de la industria porcina es que los cerdos manifiesten todo su potencial biológico y para esto, las piaras deben estar libres de enfermedades infecciosas. Sin embargo, es común observar que los sistemas modernos de producción se caracterizan por reunir gran número de animales en espacios reducidos y en condiciones ambientales poco favorables. Esto ha propiciado que las infecciones mixtas por gérmenes diversos sean frecuentes afectando la productividad del ganado.¹

Las enfermedades de los cerdos son, en la mayoría de los casos, resultado de la interacción de factores ambientales y agentes patógenos, afectando los aparatos y sistemas de los animales. En este sentido se conoce al complejo respiratorio porcino, donde se combinan además de los factores ambientales, diversos tipos de virus, bacterias y micoplasmas, estableciéndose interacciones de diferente naturaleza que resultan en efectos negativos en la salud y productividad de los animales.²

Las pérdidas económicas por la presencia de enfermedades en la porcicultura mexicana han sido estimadas en 20 millones de dólares al año, tan solo por Gastroenteritis Transmisible, Parvovirus, Enfermedad de Aujeszky, Ojo Azul y Rinitis Atrófica.³ Las enfermedades de Ojo Azul y Aujeszky se han convertido en endémicas en algunas granjas del Altiplano Central de México⁴, y al no observar brotes explosivos se han dejado de llevar a cabo medidas de manejo y vacunación para su control efectivo. Recientemente se ha autorizado para el mercado mexicano la vacuna con virus activo contra la enfermedad de Aujeszky. En tanto, para la enfermedad del Ojo Azul, existen vacunas inactivadas disponibles; pero se desconoce la posible interacción que pueda tener el virus vivo vacunal de la enfermedad de Aujeszky con el virus de la enfermedad del Ojo Azul u otros agentes infecciosos.

1.1 ENFERMEDAD DE AUJESZKY

La enfermedad de Aujeszky (EA) o Pseudorabia, es una enfermedad infecciosa causada el *Herpesvirus suis* tipo 1 (HVS-1), que afecta a un gran número de especies animales siendo la especie porcina la más importante desde el punto de vista sanitario y económico. Produce principalmente signos

del sistema nervioso central en cerdos lactantes, del tracto respiratorio en animales de la engorda y reproductivos en animales del pié de cría. Los lechones son especialmente sensibles a la infección, mientras que los cerdos destetados o de mayor edad, presentan un efecto inmunosupresor mismo que predispone a la colonización del aparato respiratorio por bacterias que enmascaran la infección viral.^{5,6}

1.1.1 Situación de la EA en la República Mexicana

La EA, en México, fue diagnosticada por primera vez en 1943 en bovinos del estado de Veracruz. En 1972 se presentó una epizootia en la región del Bajío que afectó a lechones con cuadro nervioso y hembras del pié de cría con falla reproductiva.⁷

A partir de 1995 se estableció una campaña oficial para el control de la EA en México. De 1995 a diciembre de 2007 han sido declarados libres de la enfermedad los estados de Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chihuahua, Guerrero, Nuevo León, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas. Actualmente existe

Figura 1. Situación zoonosanitaria de la enfermedad de Aujeszky.



en erradicación 4 estados: Chiapas, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí. Los estados en fase de escasa prevalencia, son: Distrito Federal, México, Morelos,

Nayarit, Oaxaca, y Tabasco. En fase de control se ubican los 6 estados restantes de la República Mexicana así como la Comarca Lagunera (Figura 1).⁸

1.1.2 Etiología

El HVS-1 es un virus alfa que se caracteriza por tener ciclos líticos de menos de 24 h y establecer infecciones latentes en células del tejido nervioso especialmente en el ganglio trigémino. Su estructura consiste en un genoma lineal de alrededor de 145 kb de DNA rodeado de una nucleocápside envuelta. Las dimensiones globales del virus son de 150 a 180 nm de diámetro y la nucleocápside tiene 105-110 nm de diámetro. La nucleocápside esta compuesta al menos por ocho proteínas que varían de tamaño de 22.5 a 142 kDa. La envoltura del virus presenta nueve proteínas con peso moleculares que varían de 50 a 130 kDa. La nomenclatura moderna de las glicoproteínas utiliza el sistema de letras para designar las glicoproteínas de los herpesvirus; las moléculas identificadas como gE, gD, gI junto con la timidin cinasa (TK), están relacionadas con la virulencia, en tanto que las moléculas identificadas como gB, gC y gD, están relacionadas con la inducción de inmunidad. HSV-1 permanece viable de 1 a 7 días en una granja porcina (Cuadro 1).^{5,6,9}

1.1.3 Transmisión

En observaciones de campo se ha determinado que la introducción de cerdos infectados a granjas susceptibles, es la forma más frecuente de contraer el virus. El contacto de cerdos domésticos con cerdos silvestres infectados es otra forma de contagio, aunque en menor frecuencia y el contagio a través del aire, cuando se desarrollan fenómenos atmosféricos severos, también es posible.^{5,9}

1.1.4 Patogenia

El virus penetra vía oro-nasal y se replica inicialmente en el epitelio de la nasofaringe y tonsilas. Posteriormente pasa a los nódulos linfáticos regionales donde se replica e induce una viremia. Además pasa al bulbo raquídeo y puente

de Varolio por el nervio trigémino, o bien al bulbo raquídeo por los nervios olfatorio y glosofaríngeo. Después de estos sitios de replicación, el virus se

disemina a otras partes del cerebro. En animales adultos, las cepas de baja y mediana virulencia permanecen en el ganglio del nervio trigémino sin diseminar a otras partes del cuerpo.^{5,6}

Las cepas de alta virulencia además de seguir las vías anteriormente descritas, se diseminan a todo el cuerpo. Estas cepas producen una breve viremia y pueden ser demostradas en el suero. También pueden aislarse de macrófagos alveolares, epitelio de los bronquios terminales, hepatocitos, células linfoides del bazo y nódulos linfoides, células de la corteza adrenal, trofoblastos, embriones, células del cuerpo lúteo y semen.^{5,6,10}

Cuadro 1. Viabilidad del virus de la enfermedad de Aujeszky.

Fomites a 25°C	Supervivencia en saliva a niveles infecciosos (días)
Control sin fomites	4
Acero	4
Cemento	4
Plástico	3
Goma	2
Tela	1
Suelo	7
Pasto verde	2
Granos con cáscara	4
Alimento peletizado	3
Harina de carne y hueso	2
Alfalfa	1
Cama de paja	4
Cama de aserrín	2
Alimento	2
Agua de pozo	7
Agua clorada	2
Efluente anaerobio de laguna	2
Efluente del desagüe de granja	1

Tomado de Pejsak ZK, Truszczynski MJ.⁵

1.1.5 Signos y lesiones

Los signos clínicos dependen de la cepa viral, la dosis infectante y la edad del cerdo afectado. El HVS-1 tiene predilección por el tejido respiratorio y nervioso, por esta razón la mayoría de los signos clínicos se asocian con estos dos sistemas. En general, los signos neurológicos son observados con

frecuencia en cerdos lactantes y destetados, mientras que los signos respiratorias aparecen en los cerdos de la engorda y animales adultos.^{5, 6, 9, 10}

La enfermedad puede manifestarse con una diseminación rápida donde se afectan cerdos de todas las edades, o bien con una infección completamente inaparente que se detecta solo al hacer una evaluación cuidadosa.^{5, 6, 9, 10}

Los primeros signos clínicos que se observan en una piara pueden ser de índole reproductivo donde el aborto y la aparición de mortinatos es típico; en cerdos de la engorda se observa depresión y anorexia con tos, o bien, cerdos lactantes con pelo áspero que se vuelven apáticos, anoréxicos y en 24 h presentan un cuadro de incoordinación motriz y convulsiones. La mortalidad en cerdos lactantes es alta y con frecuencia es del 100 %.^{5, 6, 9, 10}

En cerdos recién destetados el cuadro clínico es similar al descrito en lechones. Sin embargo, es menos grave y la morbilidad por el cuadro nervioso es menor. La mortalidad puede llegar al 50 % en casos graves. Frecuentemente se observa un cuadro respiratorio en donde las infecciones bacterianas secundarias se asocian, siendo los agentes encontrados con mayor frecuencia *Pasteurella multocida* (PM) o *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP).⁵

Los cerdos del área de engorda desarrollan con más frecuencia signos respiratorios. Comúnmente la morbilidad es cercana al 100%, siendo la mortalidad baja de 1 a 2 %, siempre y cuando no halla complicaciones por infecciones secundarias. Los cerdos adelgazan y pierden peso corporal considerable. Al cabo de 10 días de manifestaciones clínicas el animal ya no tiene fiebre y retorna el apetito. Las pérdidas pueden aumentar considerablemente si hay asociaciones bacterianas especialmente con PM y/o APP.⁵

Los animales adultos desarrollan signos clínicos similares a los observados en cerdos de engorda pero en menor proporción. La falla reproductiva observada, se caracteriza por abortos, retorno irregular del estro, momificaciones, mortinatos y nacidos débiles. La morbilidad reproductiva es por lo general baja, observándose hasta en el 20 % de las hembras gestantes.

La mortalidad en animales de pie de cría infectados por el virus de la EA rara vez excede el 2%.^{5, 6, 9}

Las lesiones macroscópicas frecuentemente no son observables. En el caso de estar presentes son de ayuda para hacer un diagnóstico presuntivo en combinación con los antecedentes de la granja y los signos clínicos. La rinitis serosa a fibrinonecrótica es común y para ello se debe cortar para exponer cavidad nasal en todo su trayecto. Asimismo se observa amigdalitis necrótica, linfonódulos aumentados de volumen y hemorrágicos en la zona superior del aparato respiratorio y cavidad oral. Pueden encontrarse los típicos focos blanco amarillentos diseminados en hígado y bazo.⁵

Las hembras que han abortado presentan endometritis leve y la pared del útero esta engrosada y rosa. Frecuentemente la placenta esta inflamada y necrótica. Ocasionalmente los fetos presentan focos necróticos en hígado y bazo. La única lesión macroscópica detectada en el aparato reproductor masculino es el edema del escroto.⁶

1.1.6 Diagnóstico

Suele hacerse con la combinación de antecedentes, signos clínicos y lesiones microscópicas. Los signos clínicos clásicos dan las bases para un diagnóstico de campo que frecuentemente es confirmado si se observan lesiones características (focos necróticos en bazo e hígado y amigdalitis necrótica) en lechones. La EA es más difícil de diagnosticar si solo están afectados los cerdos en engorda o adultos, donde comúnmente se observa la presentación respiratoria de la EA.^{5, 6}

El diagnóstico de campo de la EA debe ser confirmado por un laboratorio aprobado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), para lo cual se remiten las muestras de los cerdos afectados, además de 30 muestras de suero sanguíneo que incluyen cerdos del pie de cría, así como de las diferentes etapas de crecimiento; o bien, 30 sueros de animales de más de 4 meses de edad, en aquellas granjas que no cuentan con pie de cría. Las muestras deben acompañarse con la historia clínica correspondiente.¹¹

Para el diagnóstico de la EA se pueden utilizar cualquiera de las siguientes pruebas diagnósticas: inmunofluorescencia en tonsila y encéfalo, prueba biológica a partir de encéfalo, pulmón, hígado y bazo; aislamiento viral en cultivo celular a partir de encéfalo, pulmón, hígado, bazo y semen; inmunoperoxidasa, ELISA y/o seroneutralización.¹¹

1.1.7 Vacunación

En México, la vacunación contra la EA está sujeta a las condiciones señaladas en la norma oficial mexicana NOM-007-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky. Solamente puede utilizarse como biológico contra la EA, la vacuna que contiene virus activo con delección gE y registrada por SAGARPA con las siguientes consideraciones:

- Para los estados ubicados en zonas en control, la vacunación es permanente al pie de cría y opcional a la engorda, permitiéndose sólo el uso de vacunas con delección gE. Para efectos de constatación se debe expedir la constancia de granja bajo el esquema de vacunación por la Subdelegación de Ganadería correspondiente. En el caso de brotes, bajo confirmación diagnóstica oficial, podrá vacunarse a los animales de la granja con un biológico a base de virus activo con delección gE. La distribución de la vacuna se realiza a través de laboratorios autorizados por la Dirección General de Salud Animal.
- En los estados ubicados en zonas en erradicación la vacunación está suspendida contra la EA.
- Para aquellas entidades ubicadas en zonas libres, la vacuna contra la EA no se deberá utilizar, comercializar ni movilizar.¹¹

1.2 ENFERMEDAD DEL OJO AZUL

La enfermedad del Ojo Azul (EOA) de los cerdos es causada por el *Rubulavirus* porcino (RuVP), también denominado virus del síndrome del Ojo Azul (VSOA) o virus La Piedad Michoacán (VLPM). Esta enfermedad consiste en un complejo conformado por alteraciones neurológicas, reproductivas y respiratorias acompañadas por opacidad de la córnea.^{12, 13, 14}

1.2.1 Situación de la EOA en la República Mexicana

La EOA es una enfermedad emergente que se identificó inicialmente en granjas de La Piedad Michoacán, en 1980, de ahí se diseminó a 18 estados del centro, noreste, sur-centro y este de la República Mexicana.^{15, 16, 17, 18, 19} Actualmente el mayor impacto económico se registra en los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco, zona considerada endémica (Figura 2).¹³

Figura 2. Situación zoonosanitaria de la enfermedad de Ojo Azul



Adaptado de Stephano A, Gay G, Ramírez C¹³

1.2.2 Etiología

El origen del virus es desconocido, análisis filogenéticos muestran que el RuVP tiene un ancestro común a todos los paramyxovirus, pero excluyen la posibilidad de que este virus sea una variante de algún otro rubulavirus.^{20, 21} Así mismo, se demostró la circulación de anticuerpos contra RuVP en sueros sanguíneos colectados entre los años 1972 a 1976.²²

El agente causal pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. Esta familia fue reorganizada y el virus de la enfermedad del Ojo Azul fue clasificado como miembro de la subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus*, especie *Rubulavirus* porcino. Se replica y produce efecto citopático en una variedad de cultivos celulares y aglutina eritrocitos de mamíferos y aves.^{23, 25}

El RuVP presenta tres proteínas estructurales en la nucleocápside; la nucleoproteína (NP, 68 kDa), la fosfoproteína (P; 52 kDa) y la proteína de alto peso molecular (L, 200 kDa); una proteína de matriz (M, 42 kDa), una

glicoproteína: hemaglutinina y neuraminidasa (HN, 66 kDa) y la proteína de fusión (F, 71 kDa).²⁶

La proteína HN se encarga de reconocer el receptor celular y la proteína F se encarga de la fusión con la célula blanco. La proteína HN reconoce un receptor en la célula blanco que contiene sialila-2,3 lactosa, que es determinante para que la infección ocurra, ya que cuando se modifica por un sialila-2,6 lactosa, el virus pierde la habilidad para reconocer e infectar. Se ha propuesto que las diferencias patológicas entre cerdos de diferentes edades se deben, en parte, a la expresión diferencial de estos glicoconjugados con sialila-2,3 lactosa que se encuentran en mayor proporción en el sistema nervioso de neonatos y en el sistema reproductor de cerdos adultos.²⁷

1.2.3 Transmisión

En condiciones naturales se considera que la transmisión es por contacto directo entre cerdos susceptibles y enfermos. En condiciones de laboratorio, se ha demostrado por vía nasal e intratraqueal.²⁷ El RuVP se elimina por saliva, heces orina, semen y descargas nasales.^{13, 28}

1.2.4 Patogenia

La vía de infección natural del RuVP es la nasal.¹³ En un estudio secuencial de la infección experimental de VLPM, se utilizó la vía nasal y se demostró que, el virus llega al sistema nervioso central a través del nervio olfatorio, es posible aislarlo del sistema nervioso central de neonatos²⁸ y del aparato reproductor de verracos.^{29, 30, 31}

El sitio de replicación viral no está definido, pero se aísla de la mucosa nasal y de las tonsilas.^{13, 28} A partir de dichos sitios, el virus se disemina al sistema nervioso central y a pulmón. La viremia provoca neumonía intersticial y el virus es aislado a partir de cerebro, pulmón, tonsila, hígado, cornetes, bazo, linfonódulos, corazón, y sangre.²⁵

1.2.5 Signos y lesiones

En cerdos lactantes las manifestaciones nerviosas se presentan en forma progresiva, aguda y generalmente son letales cuando tienen menos de 15 días de edad. En los cerdos de 3 a 4 meses de edad las manifestaciones neurológicas son escasas y la tasa de mortalidad es baja. En cerdos adultos

las lesiones se limitan al aparato reproductor: en las hembras se presentan abortos, aumento de mortinatos y reducción de la fertilidad; en machos se observa epididimitis, orquitis, atrofia testicular y una sensible pérdida de fertilidad. La opacidad corneal se presenta solamente en 1 a 10% de los animales infectados de cualquier edad. Se ha postulado que la infección por RuVP en cerdos de engorda cursa con proceso neumónico ya que así se ha observado. En este sentido 2 estudios experimentales fueron desarrollados para investigar la asociación entre RuVP y PM, en uno, y RuVP y APP en otro. No lograron demostrar la asociación.^{32, 33} En general, los parámetros productivos se ven gravemente afectados y las pérdidas económicas son altas.^{29, 30, 34, 35, 36, 37}

1.2.6 Diagnóstico

Los tejidos de elección para aislamiento viral e inmunofluorescencia son cerebro medio, bulbo olfatorio, pulmón y tonsila. La combinación de ambas técnicas permite obtener resultados confiables. La detección de anticuerpos puede llevarse a cabo por inhibición de la hemoaglutinación, seroneutralización, ELISA e inmunoperoxidasa a partir del día 8 postinfección. Para estudios histopatológicos se pueden emplear los tejidos mencionados anteriormente además del globo ocular.^{38, 39, 40}

1.2.7 Vacunación

En el mercado mexicano existen dos biológicos con virus inactivado.

1.3 JUSTIFICACION

En la zona del bajío de la República Mexicana se encuentra ubicada la mayor concentración de porcinos criados en condiciones intensivas de producción. La diversidad de los sistemas de producción aunada a las condiciones ambientales, el avance de la campaña nacional contra la fiebre porcina clásica, entre otros factores, han propiciado cambios en el comportamiento de las enfermedades que afectan al ganado porcino. Comúnmente se observan en el campo problemas de salud con signología clínica compatible con la presencia de los virus de las enfermedades de Ojo Azul y de Aujeszky. Se desconoce la posible interacción que pueda tener RuVP con el HVS-1.

1.4 HIPOTESIS

Los virus de las enfermedades de Ojo Azul y Aujeszky actúan de manera sinérgica en el cerdo afectando la salud y la productividad.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluación del efecto de la infección experimental de los virus de las enfermedades de Aujeszky y Ojo Azul en cerdos.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

2.1.1 Reproducir el cuadro clínico de las enfermedades de Ojo Azul y Aujeszky por separado.

2.1.2 Inducir la infección mixta con *Rubulavirus* porcino y *Herpesvirus suis* tipo 1.

2.1.3 Describir el cuadro clínico de las enfermedades por separado y en conjunto.

2.1.4 Evaluación de cambios macro y microscópicos en órganos y tejidos.

2.1.5 Cuantificación de la respuesta inmune humoral inducida por la infección.

2.1.6 Determinación de la conversión alimenticia en los animales de todos los grupos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 ANIMALES

Se utilizaron 36 lechones destetados, de 26 días de edad, de 6.0 Kg., machos castrados, serológicamente negativos al virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA), y al virus de la enfermedad de Ojo Azul (VOA).

Los lechones fueron identificados con arete plástico y mediante un cuadro de números aleatorios, fueron distribuidos en 4 lotes de 9 lechones cada uno. Todos los lotes fueron alojados en corrales de piso de cemento con bebedero tipo chupón, aislados, con drenaje y acceso separados. Se empleó una fórmula comercial para la alimentación de todos los animales. Se aplicó un programa de aclimatación por 14 días, para propiciar el consumo de alimento sólido.

Los días 1, 7, 14, 21 y 30 postinoculación (PI) los animales fueron sangrados para obtener suero sanguíneo, por punción directa en la fosa yugular.⁴¹ Todos los sueros fueron analizados por seroneutralización e inhibición de la hemoaglutinación para el HVS-1 y RuVP. Se llevaron a cabo estudios postmortem secuenciales los días 7, 14 y 30 PI en 3 cerdos de cada grupo. El sacrificio fue mediante sangrado previa insensibilización por aplicación de electricidad con tenazas. Se tomaron muestras de cerebro, ganglio trigémino, tonsila, nódulo linfático retrofaríngeo, timo, pulmón, hígado, bazo, riñón, páncreas, e íleon, para histopatología. Los animales fueron observados constantemente y aquellos que desarrollaron un estado crítico de enfermedad, fueron sujetos a eutanasia y al estudio postmortem descrito.

Los animales fueron pesados y el consumo de alimento fue medido los días 1, 7 y 14 PI, para calcular la conversión alimenticia (CA) en todos los grupos.

3.1.1 Descripción de los grupos

Grupo testigo (T): lo animales recibieron un placebo consistente en 2 ml de Dulbeco's medio mínimo esencial (DMEM), estéril, por instilación nasal.

Grupo RuVP: Los animales recibieron un inóculo consistente en 2 ml con $10^{4.7}$ dosis infectante en cultivo celular (DICC) de RuVP, cepa PAC-3, por instilación nasal.

Grupo HVS-1: Los animales recibieron un inóculo consistente en 2 ml con $10^{1.7}$ DICC de HVS-1, cepa Shope, por instilación nasal.

Grupo RuVP-HVS-1: los animales recibieron 2 ml con $10^{4.7}$ DICC de RuVP, por instilación nasal. Una semana después recibieron $10^{1.7}$ DICC de HVS-1, cepa Shope, por fosa nasal.

Los animales de todos los grupos fueron observados diariamente y se les tomó la temperatura corporal vía rectal, desde el día 2 PI hasta el día 30 PI (Figura 3).

Figura 3. Medición de la temperatura corporal vía rectal.



3.2 Cepas virales

3.2.1 Virus. Los virus de la EA y de la EOA fueron cultivados en células VERO y PK15, respectivamente.

3.3 ESTUDIOS POSTMORTEM

Una vez desangrado el animal, se procedió a realizar la inspección externa que consistió en revisar detenidamente el estado de carnes, integridad de la piel y las faneras así como el estado de los orificios naturales. El cadáver fue colocado en decúbito dorsal y se procedió a practicar 4 incisiones para desarticular los miembros anteriores y posteriores sin separarlos totalmente del cuerpo y que sirvieran de apoyo al tronco y la superficie metálica de la mesa de trabajo. La incisión de los miembros anteriores se extendió hasta el borde inferior de la barbilla. De esta forma, se estuvo en condiciones adecuadas para proceder a realizar la inspección interna (Figura 4).⁴²

La piel de la cara ventral de la cabeza fue retirada continuando con la del cuello, pecho y abdomen. Fueron inspeccionados los linfonodos superficiales tanto anteriores como posteriores y el estado del tejido subcutáneo. La unión cartilaginosa costo-esternal fue cortada y las costillas separadas para exponer los órganos de la cavidad torácica (Figura 5). La lengua junto con el esófago, la tráquea, los pulmones y el corazón fueron retirados. El esófago fue separado de estos órganos sin cortarlo del estómago. Se procedió a revisar los órganos del aparato respiratorio y el corazón. De la cavidad oral posterior se retiraron las tonsilas y se procedió a inspeccionar los órganos del tubo digestivo y órganos accesorios. Fue revisado el aparato urinario. La cavidad craneana fue expuesta para retirar el encéfalo, el cordón espinal en la zona cervical y los ganglios del nervio trigémino (Figura 6). Durante la inspección externa e interna, se anotaron los cambios observados y se tomaron las muestras requeridas para los análisis correspondientes.⁴²

Figura 4. Espécimen preparado para la inspección interna.



Figura 5. Vísceras expuestas para realizar la inspección interna.

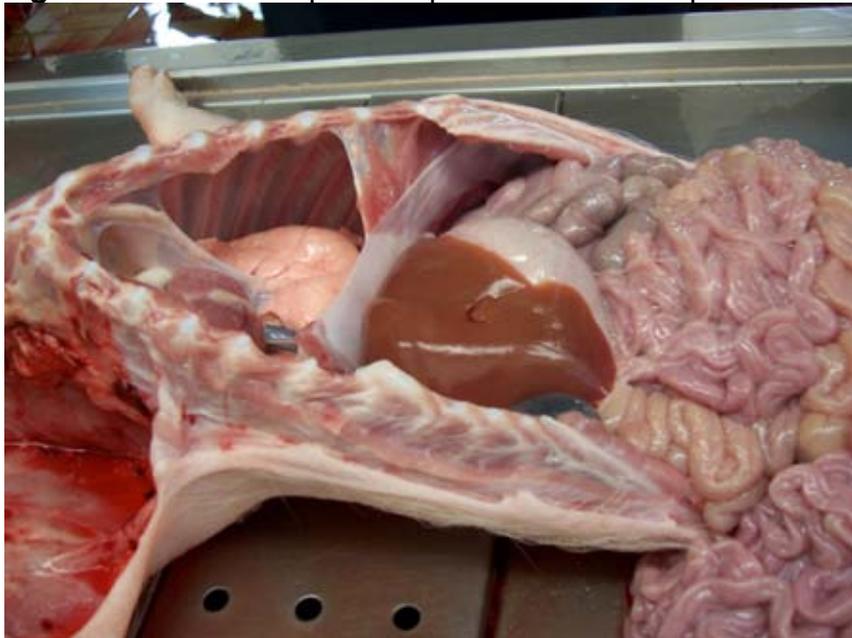


Figura 6. Extracción del ganglio del nervio trigémino.



3.4 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

3.4.1 Histopatología

Las muestras para histopatología fueron fijadas en formol amortiguado al 4% durante 24 a 48 horas. Los órganos y tejidos fueron cortados en porciones de 2 a 3 mm de grosor por 1 a 2 cm por lado aproximadamente, fueron colocadas en canastillas plásticas para su procesamiento en el histokinette. Al concluir este proceso, las muestras fueron incluidas en parafina y cortadas en el microtomo

calibrado a 3 μ de grosor. El corte fue montado en un portaobjetos y fue teñido con hematoxilina-eosina. Finalmente, el cubreobjetos fue sobrepuesto en el corte teñido y pegado con resina sintética.⁴³

Las laminillas fueron observadas en un microscopio óptico y los cambios fueron registrados y cuantificados de la forma siguiente: + discreto; ++ moderado; y +++ severo.⁴³

3.4.2 Serología

3.4.2.1 Seroneutralización (SN)

La prueba de SN para el HVP-1 fue desarrollada de la forma siguiente:

- Se colocaron 10⁵ células VERO en 100 μ l, por pozo en 7 placas de plástico con 96 pozos de fondo plano, estériles, y se incubaron por 18 a 24 h a 37°C, hasta tener el monoestrato completo.
- Para realizar la reacción antígeno-anticuerpo, se prepararon 7 placas de plástico con 96 pozos de fondo plano, estériles, utilizando 50 DICC del HVS-1 por pozo y 8 diluciones dobles seriadas de los sueros colectados los días 1, 7, 14, 21 y 30 PI, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h.
- Se trasvasó la reacción antígeno-anticuerpo a las placas con el monoestrato completo de células VERO y se incubaron a 37°C. Las placas fueron revisadas diariamente en un microscopio invertido marca Carl Zeiss y cuando se observó efecto citopático en el control positivo, se fijaron con alcohol etílico absoluto y se tiñeron con cristal violeta.^{44, 45}

Se consideró positiva a partir de la dilución 1:8⁴⁶

3.4.2.2 Inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

La IHA para el RuVP fue desarrollada de la forma siguiente:

- Se colocaron 50 μ l por pozo, de solución amortiguada de fosfatos (PBS) con pH de 5.8 en 7 placas de plástico con 96 pozos de fondo en "U" nuevas.

- En la fila A de cada placa, se colocaron 50 µl, de los sueros sanguíneos colectados los días 1, 7, 14, 21 y 30 PI y se realizaron 8 diluciones dobles seriada.
- Se colocaron 50 µl de RuVP con 8 unidades aglutinantes en cada pozo de todas las placas de fondo en “U” y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se colocaron 50 µl de eritrocitos de bovino al 0.5% por pozo, en todas las placas de fondo en “U” y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente revisándolas cada 15 minutos.^{44, 47}

Se consideró positiva a partir de la dilución 1:8⁴⁸

3.4.3 Identificación de ácidos nucleicos virales

3.4.3.1 Extracción y purificación del ADN y ARN

Se utilizó el kit comercial QIAamp UltraSens Virus, QIAGEN Inc. para extraer el ARN y ADN viral a partir de 1 ml de suero o plasma sanguíneo. La purificación se realizó con una columna de sílice. Las soluciones amortiguadoras fueron diluidas con alcohol etílico absoluto de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.4.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron los iniciadores de gG-F CCTTCCGCTGATGAGATACTC y gG-R GGGTCCAGGAGGCGCATC basados en la secuencia del gen de la glicoproteína G de HSV-1 que amplifican un fragmento de 322 pares de bases (pb). La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador Eppendorf, en un volumen de 20 µl con 2 µl de solución amortiguadora 10X (20mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM de KCl), 7.5% DMSO, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 µM de cada primer, 0.25 unidades de Taq polimerasa y concentraciones variables de ADN. Las condiciones fueron: 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 s, alineamiento a 50°C por 60 s y extensión a 72°C por 60 s. Seguidos de una extensión final a 72°C por 7 minutos. Cada reacción de la PCR incluyó un testigo positivo con ADN de HSV-1 y un testigo negativo sin ADN.

3.4.3.3 Reacción de transcriptasa reversa (RT) y PCR (RT-PCR)

El ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) fue sintetizado a partir de 2 µl de ARN de RuVP extraído de 1 ml de líquido sobrenadante de cultivo celular que contiene $10^{4.7}$ DICC de RuVP utilizando el iniciador HN-F CAGTTCTTCACACCATAACAATGCC y el kit comercial Sensiscript Reverse Transcription QIAGEN Inc.

Para la reacción de PCR se utilizaron los iniciadores de HN-F CAGTTCTTCACACCATAACAATGCC y HN-R GTATGGCCAAGAACTACTGC basados en la secuencia del gen que codifica para la glicoproteína HN de RuVP que amplifican un fragmento de 273 pb. La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador Eppendorf, en un volumen de 20 µl con 2 µl de solución amortiguadora 10X (20mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM de KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 µM de cada primer, 0.25 unidades de Taq polimerasa y concentraciones variables de ADN. Las condiciones fueron: 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s, alineamiento a 55°C por 30 s y extensión a 72°C por 60 s. Seguidos de una extensión final a 72°C por 7 minutos. Cada reacción de la PCR incluyó un testigo positivo con ADNc de RuVP y un testigo negativo sin ADN.

3.4.3.4 Productos de la PCR

Los productos de la reacción fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (peso/vol. en TAE 1X), teñido con bromuro de etidio, utilizando el marcador de peso molecular 1 Kb ladder DNA Invitrogen Inc.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la signología clínica, estudios postmortem, histopatología, serología y visualización de los productos de la PCR fueron analizados mediante estadística descriptiva.⁴⁹ Los resultados del consumo de alimento y conversión alimenticia, fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de Tuckey-Kramer fue empleada para identificar la diferencia entre medias.⁴⁹

4. RESULTADOS

4.1 SIGNOS CLÍNICOS (SC)

4.1.1 Grupo testigo (T)

Los animales, en general, expresaron un comportamiento normal durante todo el experimento, excepto dos animales. El cerdo identificado con el arete 81 mantuvo su cabeza inclinada hacia el lado izquierdo. Fue sacrificado al día 7 PI.

El día 23 PI el cerdo 97 manifestó dificultad para respirar y así se mantuvo hasta concluir el experimento.

4.1.2 Grupo RuVP

A partir del día 2 PI se observaron los animales alertas y a la espera del alimento. Excepto el cerdo identificado con el arte 77 ya que se mantuvo en decúbito esternal.

Para el día 3 PI, el cerdo 77 mantuvo la cabeza cerca del suelo. El cerdo 76 se desplazó poco dentro del corral y se postró en decúbito esternal. Todos los animales presentaron legañas. Para el día 5 PI, los animales 68, 78 y 84 se mantuvieron indiferentes. En el día 6 PI los animales tienen laceraciones en la piel. El cerdo 84 estuvo muy agresivo.

En el día 7 PI el animal 78 manifestó dificultad respiratoria. En el día 8 PI, los animales mostraron poca actividad. El cerdo 77 manifestó coprofagia y el 84 comenzó a rechinar los dientes. Para el día 9 PI todos los animales manifestaron poco apetito.

Al día 10 PI, el cerdo 87 manifestó dificultad respiratoria con estornudos. En el día 11 PI los cerdos 78 y 84 se mostraron agresivos. Para el día 12 PI los animales 76, 78, 84 y 96 presentaron dificultad respiratoria después de la toma de temperatura corporal.

En el día 13 PI el animal 96 manifestó disnea. Al día siguiente (14 PI), los animales tuvieron poco apetito.

En los días 16, 17 y 18 PI los animales 78, 84 y 96 se mostraron somnolientos, descansaron en decúbito lateral y su respiración fue superficial. Para el día 19 PI, el cerdo 78 manifestó coprofagia y los otros dos estuvieron en

decúbito esternal. En los días 20 y 21 PI los 3 animales comieron con voracidad. Para los días 22 al 30 PI el comportamiento de los 3 cerdos consistió en: consumo de alimento poco voraz, somnolencia, dificultad respiratoria posterior a la toma de la temperatura corporal, coprofagia alternante en los cerdos 78 y 84, ocasional hiperestesia y rechinado de dientes. En el Cuadro 2 se aprecian los signos observados en los animales del grupo RuVP.

Cuadro 2. Signos clínicos observados en animales del grupo RuVP.

SIGNO / ARETE	55	68	98	76	77	87	78	84	96
Decúbito esternal				+	+				
Cabeza baja					+				
Legaña	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indiferencia		+					+	+	
Laceraciones piel	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Agresividad	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dificultad respiratoria						+			
Depresión	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coprofagia					+		+	+	
Rechinado de dientes					+		+	+	+
Poco apetito	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Estornudo						+			
Somnolencia							+	+	+
Hiperestesia							+	+	

4.1.3 Grupo HVS-1

Para el día 3 PI los animales manifestaron poco interés por el alimento. El cerdo 85 estuvo rechinando sus dientes; el 53 mostró legaña incipiente.

Para el día 4 PI el cerdo 85 adoptó la posición de “perro sentado” (Figura 7) y estuvo rechinando sus dientes y se mantuvo cruzando sus miembros posteriores durante la marcha. El animal 52 estuvo agresivo con los demás; el animal 89 adoptó la posición de “perro sentado” y presentó pelo hirsuto al igual que el 52; el animal 89 estuvo cruzando los miembros posteriores al desplazarse. Los cerdos 90 y 73 mostraron somnolencia.

Figura 7. Posición de “perro sentado”. Cerdo 85. Grupo HVS-1



Para el día 5 PI los cerdos 89 y 90 se mostraron indiferentes. El cerdo 90 presentó temblores musculares en los miembros anteriores, mantuvo la cabeza cerca del suelo y adoptó la posición de “perro sentado”. El cerdo 85 presenta espasmos musculares y rechinó los dientes. El cerdo 57 presentó estornudos, se postró y tuvo dificultad para incorporarse. El cerdo 89 adoptó la posición de “perro sentado” y apoyó la trompa en el suelo para postrarse; el cerdo 79 presentó incoordinación locomotora posterior. Se observaron momentos donde todos los animales pelearon. Manifestaron interés por el alimento pero con apetito irregular.

Durante el día 6 PI los cerdos 73 y 79 rechinaron los dientes; el 85 adoptó la posición de “perro sentado”, presentando temblores musculares, estornudo y respiración difícil; el cerdo 52 se mostró agresivo con sus compañeros, manifestó convulsiones discretas; el cerdo 57 mostró problemas para incorporarse; el cerdo 90 manifestó somnolencia.

Para el día 7 PI el cerdo 53 comió poco y tuvo respiración abdominal además presentó cuadros convulsivos, salivación, legaña, incoordinación locomotora, depresión y fue golpeado constantemente por los demás animales; el cerdo 90 caminó con la cabeza cercana al suelo, comió poco, tuvo marcada dificultad respiratoria y tosió; el cerdo 73 presentó dificultad respiratoria; el cerdo 57 mostró dificultad respiratoria; el cerdo 85 se mostró postrado, indiferente y rechinó. El cerdo 79 se mostró repuesto, con apetito y mejor condición del pelo. El cerdo 73 adoptó constantemente la posición de “perro sentado”. Todos los cerdos presentaron laceraciones en cola, orejas y prepucio.

En el día 8 PI los cerdos 73 y 89 presentaron temblores musculares y el primero presentó posición de “perro sentado”; el cerdo 89 permaneció con salivación; el cerdo 85 tendió a mantenerse postrado con estornudos y depresión; el animal 52 presentó hiperestesia; el cerdo 57 mostró incoordinación locomotora anterior al postrarse. El cerdo 73 defecó heces deshidratadas.

Para el día 9 PI el cerdo 89 estornudó constantemente, mostrando debilidad en miembros posteriores al igual que el cerdo 73. El cerdo 85 presentó rechinido de dientes y defecó heces deshidratadas. El cerdo 52 mostró incoordinación locomotora posterior. El cerdo 63 presentó dificultad respiratoria y manifestó constantemente movimientos faciales.

En el día 10 PI, el cerdo 57 presentó tos, postrado en decúbito esternal y respiración abdominal. El cerdo 73 adoptó la posición de “perro sentado”; el animal 89 tuvo tos húmeda. El animal 52 tuvo respiración abdominal. El cerdo 63 se mantuvo semipostrado. El cerdo 89 estuvo indiferente. El cerdo 85 se mostró aparentemente sano. Para el día 11 PI los animales estuvieron muy tranquilos. El cerdo 53 manifestó coprofagia.

En el día 12 PI el cerdo 73 presentó espuma en la boca; el animal 63 se manifestó normal; el cerdo 85 presentó estornudos y somnolencia. El cerdo 52 caminó con la cabeza cerca del suelo. El animal 57 tuvo respiración agitada. El cerdo 89 estuvo deprimido. Para el día 13 PI los cerdos se mostraron indiferentes.

En el día 14 PI el cerdo 89 presentó movimientos masticatorios manifiestos; el animal 57 presentó estornudos y tos. El cerdo 85 caminó con la cabeza cercana al suelo.

A partir del día 15 PI y hasta concluir el experimento, los animales se observaron en buen estado de carnes a pesar de estar pálidos (ver Figura 8). El cuadro respiratorio es evidente pero no grave. EL cuadro nervioso fue estacionario sin progresar. Prevalció la salivación y el rechinado de dientes. En el Cuadro 3 son mostrados los signos clínicos de los animales del grupo HVS-1.

CUADRO 3. Signos clínicos observados en animales del grupo HVS-1.

SIGNO / ARETE	53	79	90	52	85	89	57	63	73
Cabeza baja			+	+	+	+			
Legaña	+								
Indiferencia						+			
Laceraciones piel	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Agresividad	+	+	+	+	+	+	+	+	
Dificultad respiratoria			+				+	+	+
Depresión	+		+		+	+			
Coprofagia	+								
Rechinado de dientes		+			+	+	+		+
Poco apetito	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Estornudo					+	+	+		
Somnolencia			+				+	+	+
Hiperestesia				+					
Perro sentado			+		+	+			+
Incoordinación posterior		+			+	+			
Pelo hirsuto				+		+			
Tremores	+		+	+	+	+			+
Postración					+		+	+	
Incoordinación locomotora	+			+		+	+		+
Salivación	+					+	+	+	+
Tos			+				+		
Heces deshidratadas					+				+

Figura 8. Animales pálidos del grupo HVS-1.



4.1.4 Grupo RuVP/HVS-1

Durante los días 1 a 5 PI los animales tuvieron buen apetito y se observaron sanos. El día 6 PI se apreciaron con legaña escasa. Para el día 7 PI el cerdo 75 permaneció postrado e indiferente al medio ambiente. Sus compañeros estuvieron explorando en todo el corral.

En el día 8 PI los animales se mostraron indiferentes al medio ambiente, pero no dejaron de comer. Durante el día 9 PI los animales mostraron respiración agitada y ligera depresión. El apetito no disminuyó.

Para el día 10 PI los animales 59 y 69 presentaron heces deshidratadas y este último rechinido de dientes. El cerdo 65 mostró rechinido de dientes.

En el día 11 PI se observó que todos los animales se desplazaban con la cabeza cercana al suelo pero manteniendo el apetito. El cerdo 69 mostró rechinido de dientes mientras que el animal 59 presentó respiración rápida. El animal 75 se

encontró durmiendo profundamente. Todos los animales se observaron somnolientos.

Para el día 12 PI los animales permanecieron con somnolencia. Los cerdos, durante el día 13 PI, presentaron dificultad respiratoria.

Las observaciones del día 14 PI fueron: animal 69 eliminó heces deshidratadas; cerdo 59 con poco apetito y tendencia a postrarse; cerdo 62 está irritable. Los demás se encontraron somnolientos.

En el día 15 PI los animales mostraron gran apetito. Para el día 16 PI los animales mostraron poco interés por el alimento y la actividad de exploración estuvo disminuida. Para el día 17 PI los animales manifestaron poco apetito y presentaron respiración acelerada y tendencia a postrarse. En el día 18 PI los animales presentaron poco apetito y dificultad respiratoria. El cerdo 61 estuvo postrado; el cerdo 62 eliminó heces deshidratadas mientras que el cerdo 65 tuvo comportamiento normal.

En los días 19 y 20 PI los animales presentaron tendencia a postrarse y ligera dificultad respiratoria. Durante el día 21 PI el cerdo 65 mostró dificultad respiratoria mientras que el cerdo 61 estuvo indiferente al medio ambiente. El cerdo 62 tuvo comportamiento normal.

Para el día 22 PI los animales comieron sin embargo, el cerdo 62 presentó tos productiva. En el día 23 PI los animales tuvieron apetito. El cerdo 61 mostró rechinado de dientes, hemoptisis y somnolencia. El animal 62 tuvo hiperestesia y el 65 presentó hemoptisis, dificultad respiratoria y eritema generalizado después de la toma de temperatura corporal.

Los días 23 al 30 PI los animales mostraron poca actividad. Los cerdos 61 y 62 presentaron hiperestesia; este último ocasionalmente adoptó la posición de "perro sentado". El cerdo 65 mostró tendencia a mantenerse postrado. En general, los animales manifestaron poco apetito. Los signos clínicos que desarrollaron los animales del grupo RuVP / HVS-1 durante el experimento, son mostrados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Signos clínicos observados en animales del grupo RuVP / HVS-1.

SIGNO / ARETE	49	50	70	59	69	75	61	62	65
Cabeza baja	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Legaña	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indiferencia						+	+		
Agresividad								+	
Dificultad respiratoria	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Depresión	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Poco apetito	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Somnolencia	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hiperestesia							+	+	
Postración	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Heces secas				+	+			+	
Rechina dientes					+		+		+
Respira rápido				+					
Tos								+	
Hemoptisis							+		+
Perro sentado								+	

La temperatura corporal (TC) fue medida por vía rectal, con un termómetro digital para uso en pediatría humana. Los animales del grupo T se mostraron hipotérmicos en el rango de 38.2 °C a 38.9 °C durante la primera mitad del experimento. Durante los días 15 al 18 PI tuvieron fiebre discreta de 39.4 °C a 39.7 °C y a partir del día 19 y hasta concluir el experimento la TC se mantuvo en el rango esperado 39.0 °C a 39.3 °C (Gráfica 1).

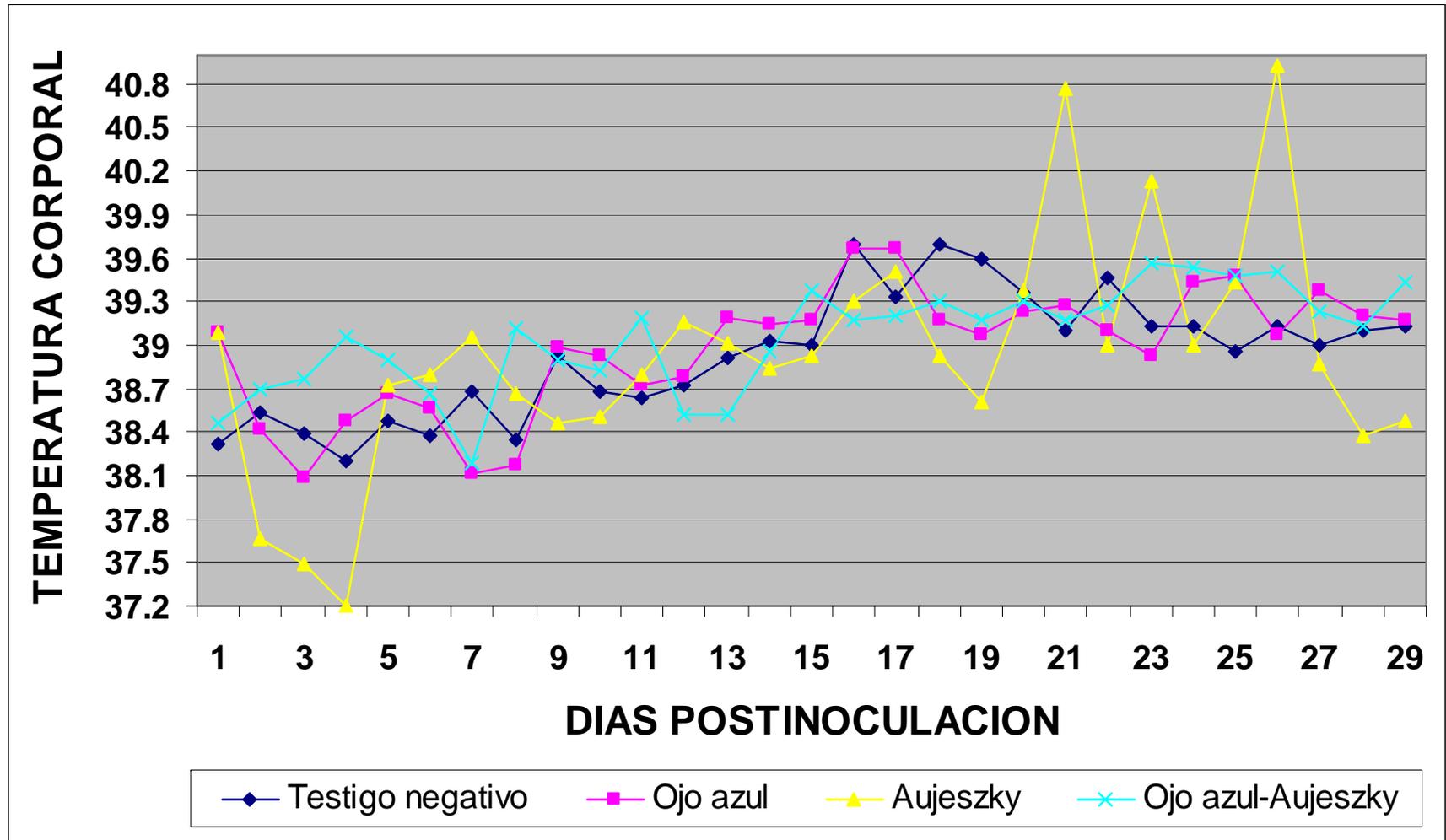
Las lecturas de TC del grupo RuVP indican que los animales estuvieron hipotérmicos 38.1 a 38.7 C durante los primeros 12 días PI. La TC durante los 3 días siguientes fue normal de 39.0 a 39.3 C. Hubo fiebre discreta de 39.7 C durante los días 16 a 22 PI. A partir del día 23 PI la TC fue normal de 39.0 °C a 39.3 °C (Gráfica 1).

Los animales del grupo HVS-1 se mostraron hipotérmicos en el rango de 37.2 °C a 38.9 °C durante la primera mitad del experimento. Durante los días 12 al 15 PI se mantuvieron normales, de 39.0 a 39.3 C; el día 16 PI con TC normal de 39.4 °C; el día 17 PI con fiebre discreta de 39.4 C, seguida por hipotermia de 38.5 a 38.8 C durante los días 18 y 19 PI. A partir del día 20 PI hubo 3 picos de fiebre

severa (de 40 °C a 40.9 °C) con eventos de hipotermia de 38.8 C intercalados hasta concluir el experimento (Grafica 1).

En el grupo RuVP-HVS-1 la TC de los animales fue baja en un rango de 38.1°C a 38.9°C durante los primeros 14 días PI. Durante los días 15 hasta 21 PI la TC se comportó normal, de 39.0 a 39.3 C. A partir del día 22 PI y hasta concluir el experimento, hubo fiebre discreta que no rebasó los 39.6°C (Gráfica 1).

Gráfica 1. Temperatura corporal en los animales de los grupos TN, RuVP, HVS-1 y RuVP / HVS-1 expresada en grados Celsius.



4.2 GANANCIA DIARIA DE PESO Y CONVERSIÓN ALIMENTICIA

Los datos obtenidos de las mediciones del peso corporal para cada animal en todos los grupos estudiados, se presentan en los Cuadros 5, 6, 7 y 8.

Cuadro 5. Peso corporal en kilogramos de los animales del grupo T

ARETE/DIA PI	1	8	14
51	5.02	6.58	
81	8.23	8.3	
91	6.13	7.83	
93	6.55	9.12	13.4
94	7.86	10.1	14.55
95	8.19	11.3	16.2
80	7.93	11.14	15.83
88	11.06	14.65	20.3
97	10.82	14.69	18.74

Cuadro 6. Peso corporal en kilogramos de los animales del grupo RuVP

ARETE/DIA PI	1	8	
55	6.53	8.16	
68	8.65	10.82	
98	6.96	9	
76	6.78	9.22	13.65
77	8.07	9.21	14.17
87	8.2	10.26	15.68
78	9.66	12.78	17.78
84	9.7	12.93	18.27
96	9.05	12.63	17.98

Cuadro 7. Peso corporal en kilogramos de los animales del grupo HVS-1

ARETE/DIA PI	1	8	14
53	8.64	11.38	
79	6.06	7.7	
90	5.52	6.97	
52	6.9	10.81	13.7
85	9	11.53	14.6
89	7.78	10.89	13.9
57	7.88	11.63	18.6
63	8.62	12.47	18.24
73	8.14	12.66	18.8

Cuadro 8. Peso corporal en kilogramos de los animales del grupo RuVP/ HVS-1

ARETE / DIA PI	1	8	14
49	8.9	10.94	
50	9.48	12.4	
70	9.62	13.4	
59	11.48	14.32	19.16
69	9.68	11.68	16.28
75	11.48	13.96	18.2
61	9.78	12.44	18.44
62	11.88	15.2	21.56
65	9.92	12.64	18.67

El ANDEVA fue calculado para los periodos 1-7 días PI y 8-14 PI tanto para GDP como CA en todos los grupos.

No hubo diferencia estadística para GDP y CA en el período de 1 a 7 días PI entre todos los grupos sujetos a estudio.

En cambio, para el período de 8 a 14 días PI, si hubo diferencia estadística ($P > 0.05$) para GDP y CA en el grupo RuVP / HVS-1, como puede observarse en los Cuadros 9, 10, 11 y 12.

Cuadro 9. ANDEVA para GDP en la fase de 8 a 14 días PI para todos los grupos

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	RANGO	P>F
Tx 8-14	3	0.52816625	0.176055	9.0150	0.0004
Error	23	0.44916950	0.019529		
Total	26	0.97733575			

Cuadro 10. Prueba de Tuckey-Kramer para GDP

NIVEL		MEDIA
Grupo RuVP	A	0.72619048
Grupo TN	A	0.66714286
Grupo HVS-1	A	0.66309524
Grupo RuVP / HVS-1	B	0.39301587

Cuadro 11. ANDEVA para CA en la fase de 8 a 14 días PI para todos los grupos

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	RANGO	P>F
Tx 8-14	3	67.83168	22.6106	5.2318	0.0067
Error	23	99.40077	4.3218		
Total	26	167.23245			

Cuadro 12. Prueba de Tuckey-Kramer para CA

NIVEL		MEDIA
Grupo TN	A	16.503333
Grupo HVS-1	A	16.306667
Grupo RuVP	A	16.255000
Grupo RuVP / HVS-1	B	12.997778

4.3 NECROPSIA

El cuadro 13 muestra los hallazgos macroscópicos observados a la necropsia de los animales del grupo T en las diferentes fechas del estudio postmortem. En el animal identificado con el arete 51 (11.1%) no se observaron cambios macroscópicos. En cambio, en el 88.9% de los animales restantes de este grupo se observaron cambios. Es relevante que los linfonodos edematosos y hemorrágicos se hayan apreciado en el 77.8% de los animales estudiados. Por otro lado, el 55.6% de los animales presentaron congestión en el encéfalo. El número porcentual indicado para el animal no. 88 expresa la superficie pulmonar afectada. (Figuras 9, 10, 11 y 12)

Cuadro 13. Cambios macroscópicos en el grupo T

ORGANO / DIA NECROPSIA / ARETE	7 PI			14 PI			30 PI		
	51	81	91	93	94	95	80	88	97
Encéfalo	SC	C	SC	C	C	C	SC	C	SC
Linfonodo	SC		SC						
Edematoso				SI	SI	SI	SI		
Hemorragia		SI		SI	SI	SI	SI	SI	SI
Cavidad torácica	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Corazón	SC	SC	SC	SC	AS	SC	SC	SC	SC
Saco pericárdico	SC	H	SC	SC	SC	SC	SC	H	H
Pulmón	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC		SC
Consolidación								5%	
Cavidad abdominal	SC	SC	A	SC	SC	SC	SC	SC	SC

A: ascitis; **AS:** atrofia serosa de la grasa coronaria; **C:** congestión;
H: hidropericardio; **SC:** sin cambios

Figura 9. Linfonodo mediastínico edematoso y hemorrágico. Cerdo no. 81. Grupo T.



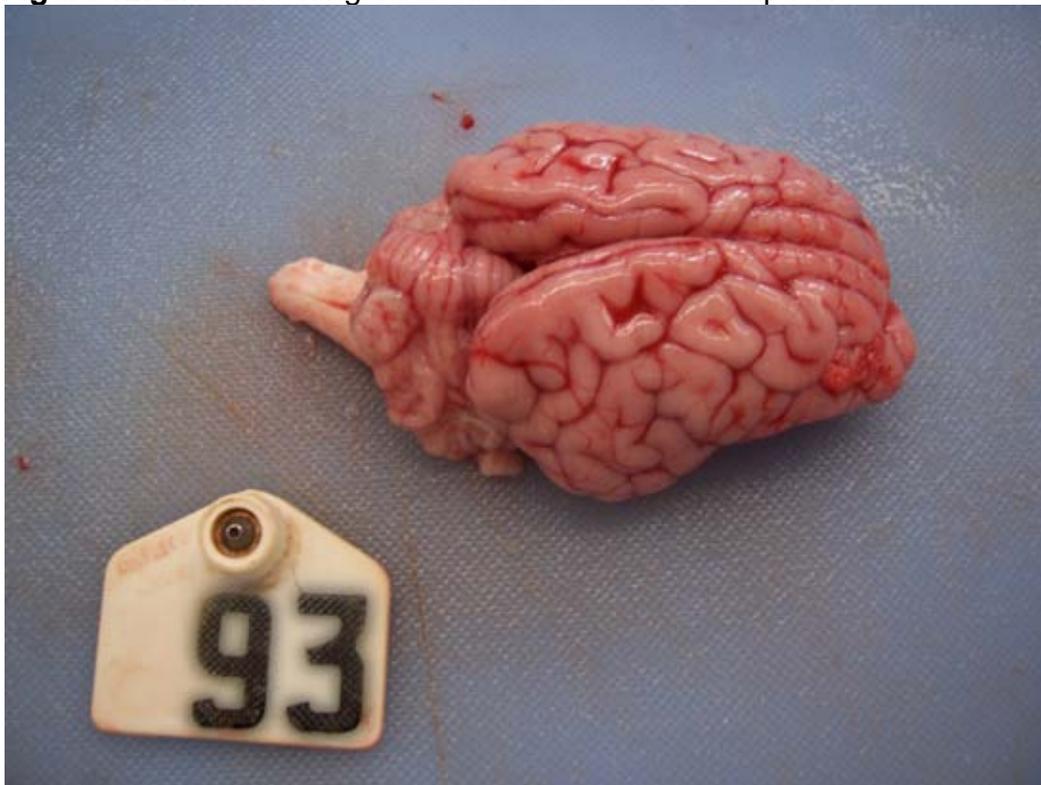
Figura 10. Encéfalo congestionado. Cerdo no. 91 Grupo T.



Figura 11. Pulmón sin cambios. Linfonodo mediastínico aumentado de tamaño y hemorrágico. Cerdo no. 95 Grupo T.



Figura 12. Encéfalo congestionado. Cerdo no. 93 Grupo T.



Los cambios macroscópicos observados en los animales del grupo RuVP son mostrados en el cuadro 14. Se aprecia que el 77.8% de los animales estudiados presentaron linfonodo mediastínico edematoso y hemorrágico. En el saco pericárdico hubo acúmulo de líquido en el 66.7% (6/9) de los animales. Se apreció congestión en el encéfalo en el 55.6% (5/9) de los animales. En la cavidad abdominal se observó ascitis en el 33.3% (3/9) del total estudiado. En el 22.2% (2/9) de los animales se apreció congestión en el riñón. El pulmón del animal no. 55 presentó consolidación en el 1% de la superficie mientras que no hubo colapso pulmonar en el 11.1% (1/9) de los animales bajo estudio. (Figuras 13, 14, 15, 16 y 17)

Cuadro 14. Cambios macroscópicos en el grupo RuVP

ORGANO / DIA NECROPSIA / ARETE	7 PI			14 PI			30 PI		
	55	68	98	76	77	87	78	84	96
Encéfalo	SC	C	C	SC	C	C	SC	C	SC
Linfonodo Edematoso Hemorrágica	SC	SI	SI	SC	SI	SI	SI	SI	SI
Saco pericárdico	SC	H	SC	H	H	H	H	H	SC
Pulmón Consolidación Sin colapso	1%	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SI	SC
Cavidad abdominal	A	SC	SC	A	SC	SC	SC	SC	A
Riñón Congestión	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SI	SI	SC

A: ascitis; **C:** congestión; **H:** hidropericardio; **SC:** sin cambios

Figura 13. Lesiones discretas al día 7 PI. Cerdo no. 55 Grupo RuVP.

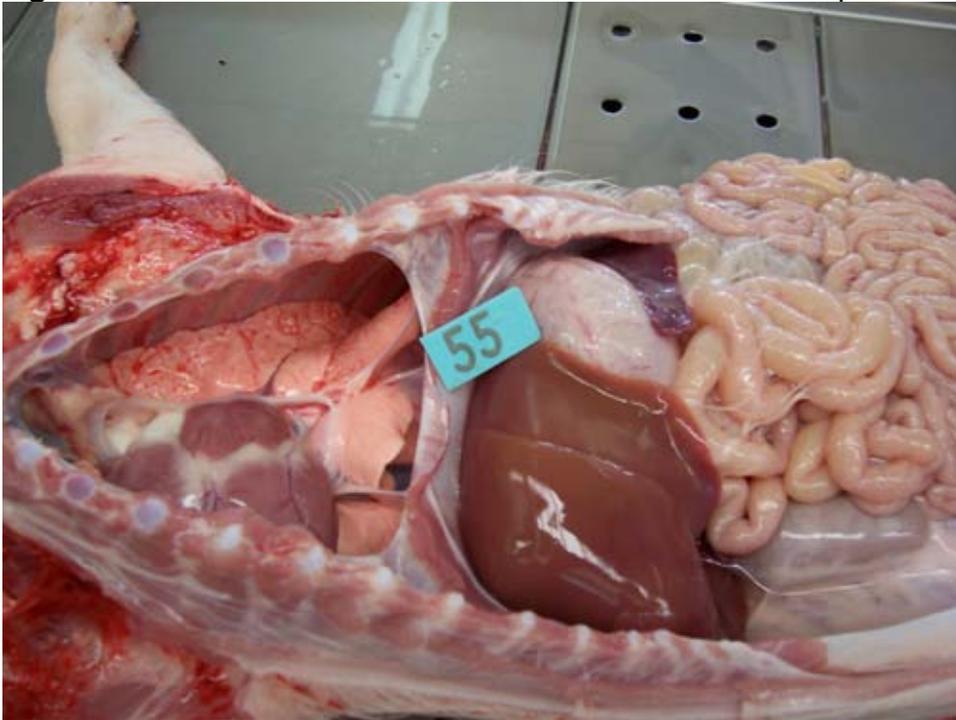


Figura 14. Encéfalo congestionado al día 7 PI. Cerdo no. 98 Grupo RuVP.



Figura 15. Necropsia del animal 98 al 7 PI. Grupo RuVP.

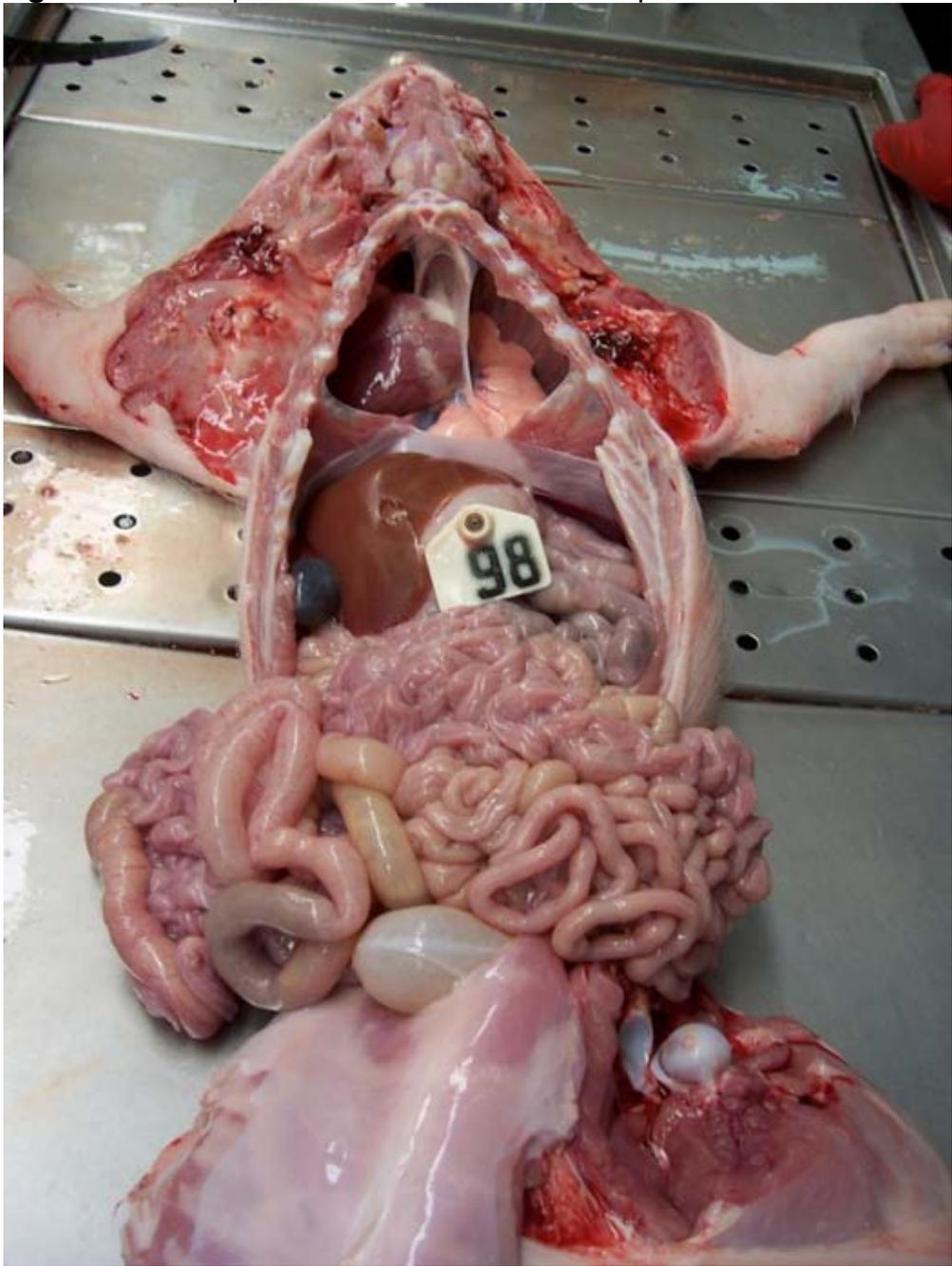


Figura 16. Linfonodos mediastínicos hemorrágicos. Día 14 PI.
Cerdo no. 87 Grupo RuVP.

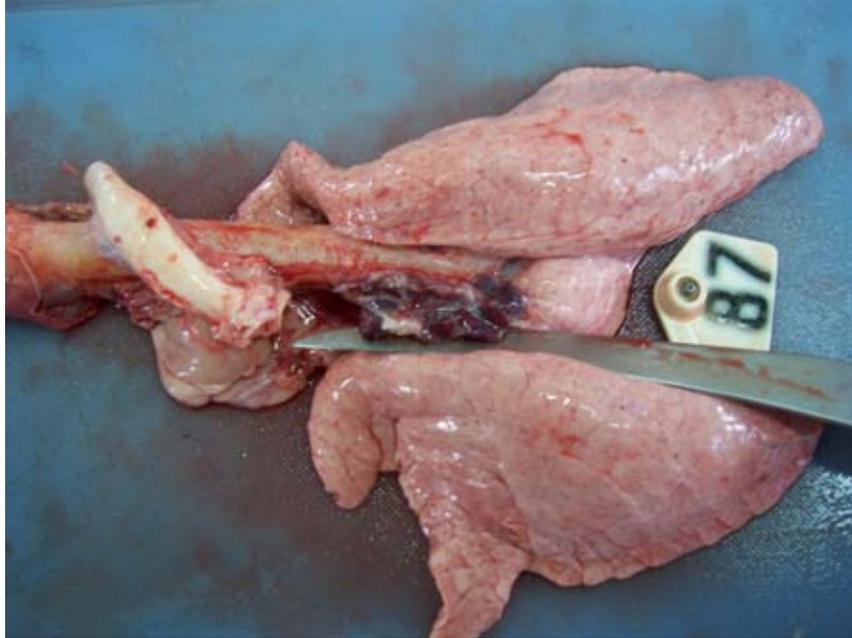
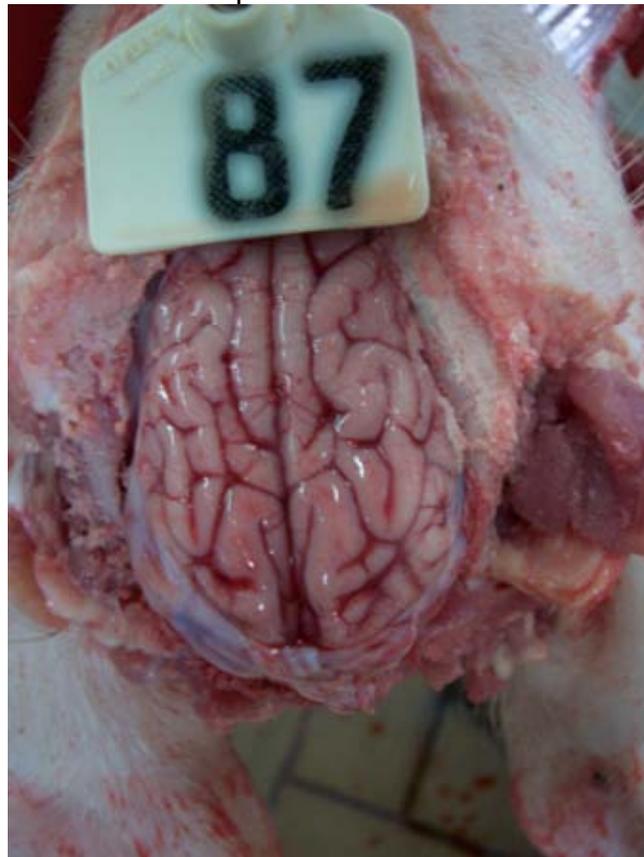


Figura 17. Encéfalo congestionado. Día 14 PI.
Cerdo no. 87 Grupo RuVP.



En el cuadro 15 pueden apreciarse los cambios macroscópicos identificados a la necropsia de los animales del grupo HVS-1. El linfonodo mediastínico hemorrágico y edematoso fue observado en el 77.8% (7/9) de los casos. La congestión en el encéfalo y la presencia de edema en la cavidad abdominal (ascitis), se observaron asociadas en el 44.4% (4/9) en los animales del grupo. Los cambios congestivos en vísceras de la cavidad abdominal se observaron por separado en el 33.3% (3/9) de los animales. En el saco pericárdico hubo acúmulo de líquido en el 11.1% (1/9) de los animales. Los pulmones de los animales nos. 79 y 90 presentaron 1% y 5% de afectación del total de la superficie del órgano, lo que representa el 22.2% (2/9) de los animales afectados. (Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25)

Cuadro 15. Cambios macroscópicos en el grupo HVS-1

ORGANO / DIA NECROPSIA / ARETE	7 PI			14 PI			30 PI		
	53	79	90	52	85	89	57	63	73
Encéfalo	SC	SC	SC	C	C	C	C	SC	SC
Linfonodo Edematosos Hemorrágica	SC	SI SI	SC	SI SI	SI SI	SI SI	SI SI	SI	SI
Saco pericárdico	SC	SC	SC	SC	H	SC	SC	SC	SC
Pulmón Consolidación	SC	1%	5%	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Cavidad abdominal	SC	SC	SC	A	SC	A	SC	A	A
Bazo Congestión	SI	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
Hígado Congestión	SI	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SI
Riñón Congestión	SI	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC

C: congestión; **A:** ascitis; **C:** congestión; **H:** hidropericardio

Figura 18. Encéfalo congestionado. 7Días PI. Cerdo no. 53. Grupo HVS-1.

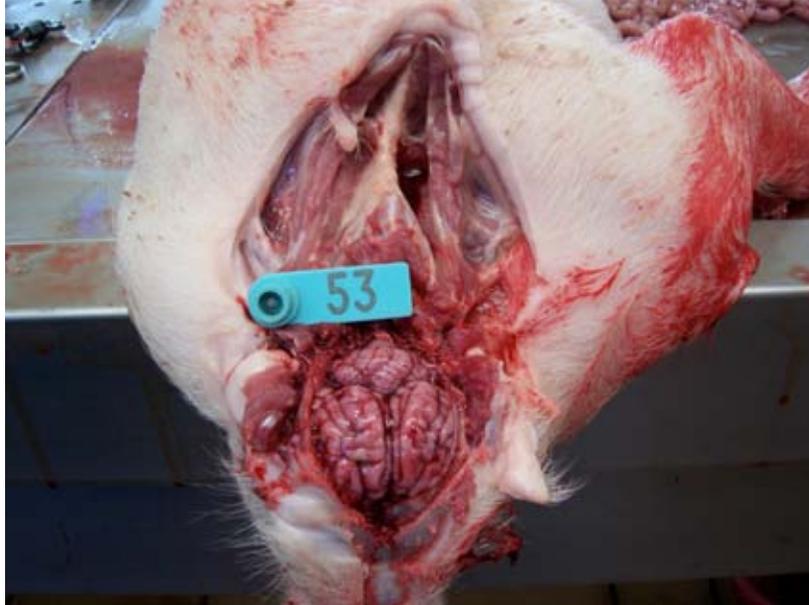


Figura 19. Vísceras abdominales congestionadas. 7 días PI. Cerdo no. 53 Grupo HVS-1.

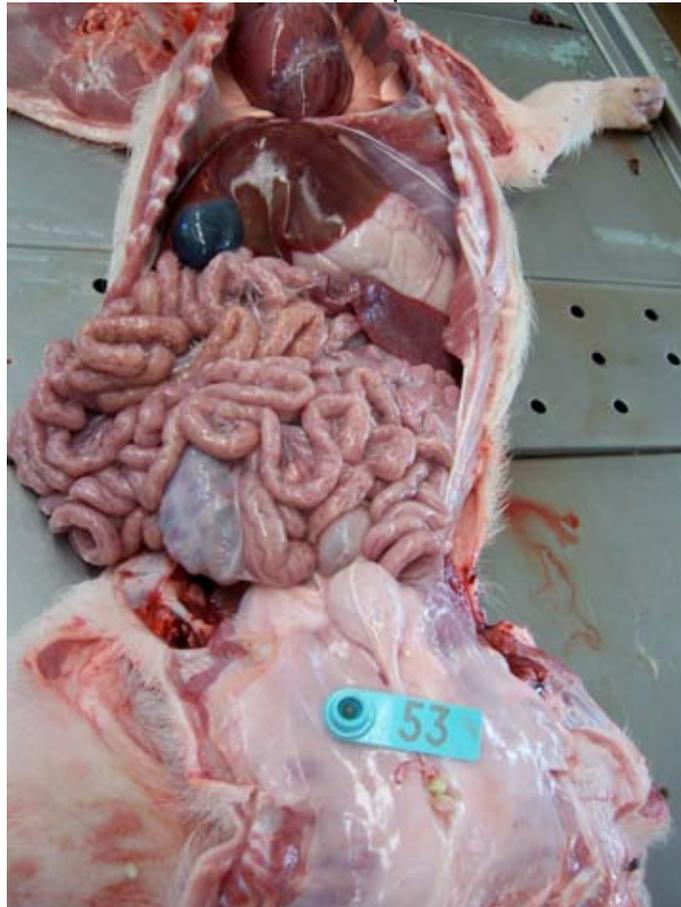


Figura 20. Pulmón consolidado. Día 7 PI. Cerdo no. 90 Grupo HVS-1.

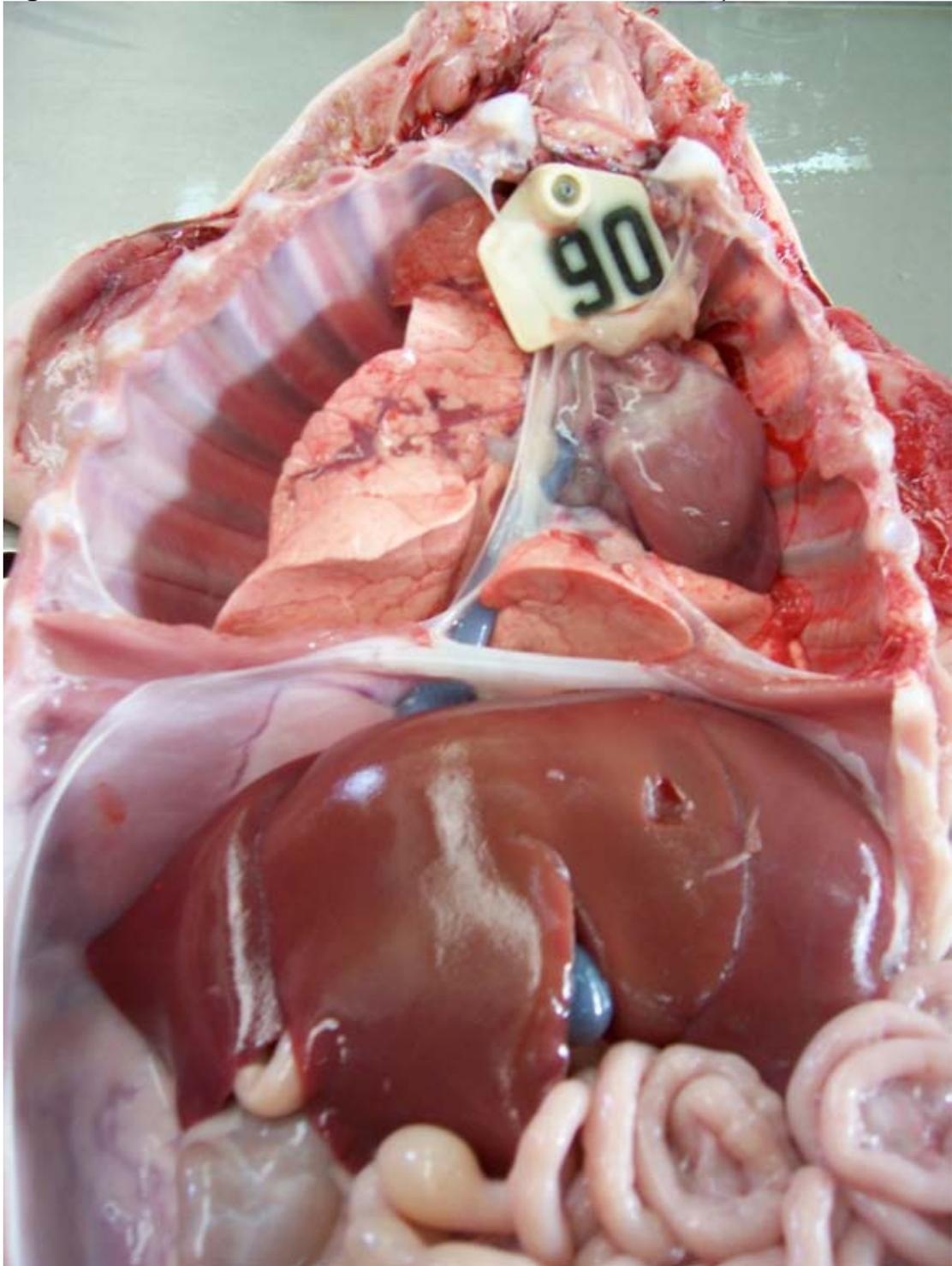


Figura 21. Pulmón sin cambios vista dorsal. Linfonodo aórtico Edematoso y hemorrágico. Día 14 PI. Cerdo no. 52. Grupo HVS-1

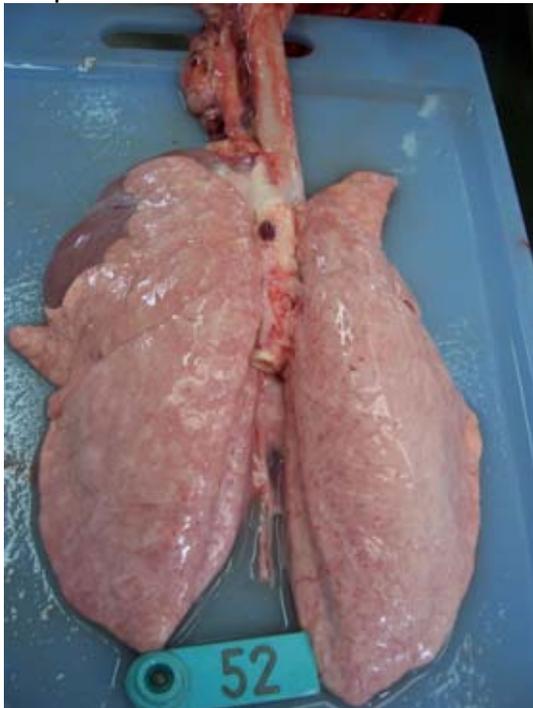


Figura 22. Pulmón sin cambios vista ventral. Día 14 PI. Cerdo no. 52 Grupo HVS-1

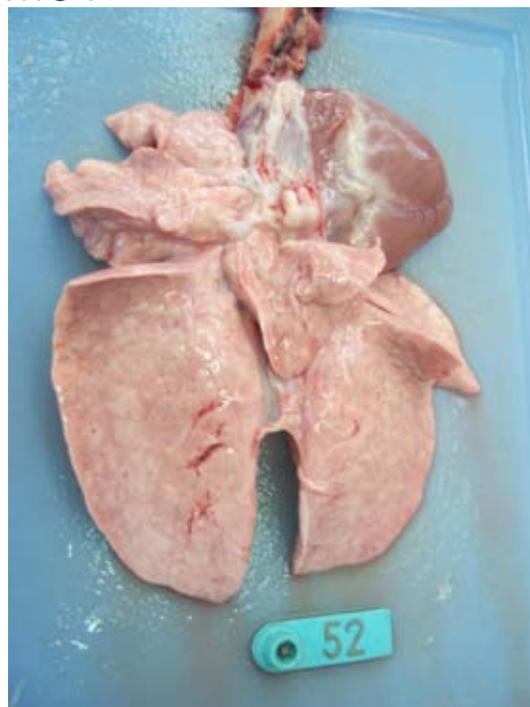


Figura 23. Encéfalo congestionado.
Día 14 PI. Cerdo no. 52. Grupo HVS-1.

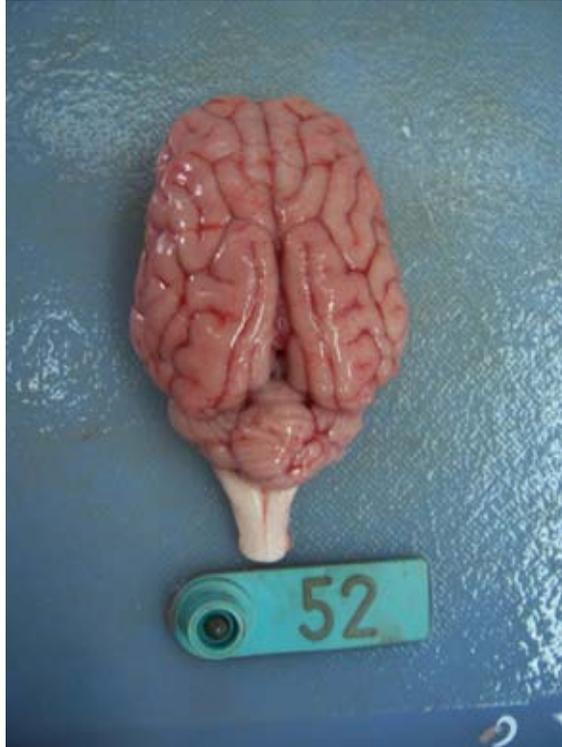


Figura 24. Linfonodo mediastínico hemorrágico. Día 14 PI.
Cerdo no. 85. Grupo HVS-1.

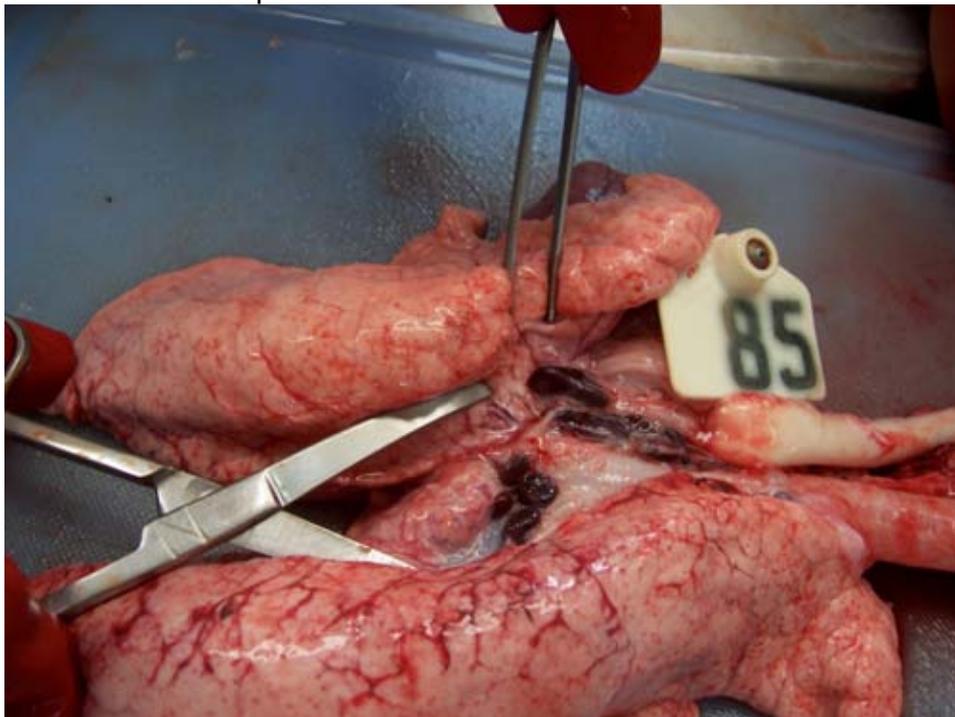
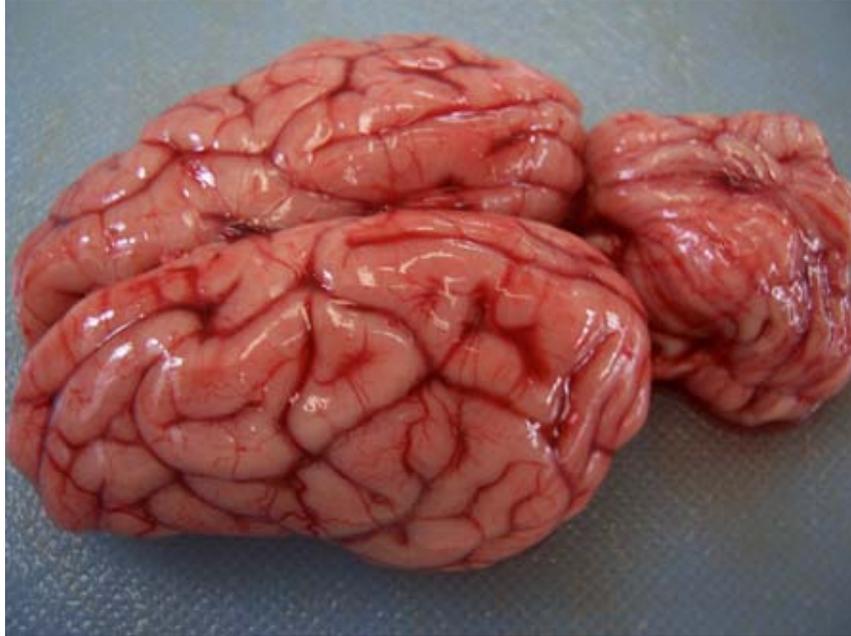


Figura 25. Encéfalo congestionado. Día 14 PI. Cerdo no. 85. Grupo HVS-1.



Los cambios macroscópicos identificados durante la necropsia de los animales del grupo RuVP / HVS-1 pueden observarse en el cuadro 16. Los linfonodos edematosos y/o hemorrágicos fueron observados en el 100% de los casos estudiados. La congestión en el encéfalo fue desarrollada por el 88.9% (8/9) de los animales de este grupo. El hidropericardio fue identificado en el 66.7% (6/9), ascitis se observó en el 55.6% (5/6) y la falta de colapso pulmonar en el 11.1% (1/9) de los animales estudiados.

Cuadro16. Cambios macroscópicos en el grupo RuVP / HVS-1.

ORGANO / DIA NECROPSIA / ARETE	7 PI			14 PI			30 PI		
	49	50	70	59	69	75	61	62	65
Encéfalo	C	C	C	C	C	C	C	SC	C
Linfonodo	Edematosos	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
	Hemorrágica	SI	SI		SI	SI	SI	SI	
Saco pericárdico	H	H	H	SC	H	H	H	SC	H
Pulmón		SC	SC	SC	SC	SC		SC	SC
	Sin colapso						SI		
Cavidad abdominal	SC	A	A	SC	A	SC	A	SC	A
Bazo		SC	SC	SC	SC	SC			SC
	Congestión						SI	SI	

A: ascitis; **C:** congestión; **H:** hidropericardio; **SC:** sin cambios

4.4 HISTOPATOLOGÍA

El examen microscópico realizado en los animales del grupo T mostró cambios discretos e inespecíficos en el sistema nervioso central. No se identificaron cambios microscópicos en el ganglio del nervio trigémino, glándula salival, timo, tonsila, placas de Peyer, globo ocular, páncreas e hígado.

El cuadro 17 contiene las alteraciones microscópicas identificadas en los órganos y tejidos de los animales que conformaron el grupo RuVP. Se puede observar que el 88.9% (8/9) de los animales desarrollaron meningoencefalomielitis no supurativa con marcado tropismo a tejido nervioso (Figura 26). En el 66.7% (6/9) de los animales se identificó neumonía intersticial y en uno pleuroneumonía. En el 55.5% (5/9) de los animales se identificó ganglioneuritis no supurativa y además, apoptosis linfocitaria en la tonsila. El 11.1% (1/9) de los animales mostraron infiltrado linfocitario en la córnea (Figura 27). Así mismo, se identificó apoptosis en linfonodo mediastínico en el 55.5% (5/9) de los animales y adenitis en el 11.1% de los animales estudiados. Lesiones indicativas de neumonía intersticial (Figura 28) y depleción linfoide esplénica fueron identificadas en el 55.6% (5/9) de los animales. No hubo cambios en timo y páncreas.

Figura 26. Puente de Varolio con infiltración linfocitaria perivascular. Día 7 PI. Cerdo no. 55. Grupo RuVP. 400x.

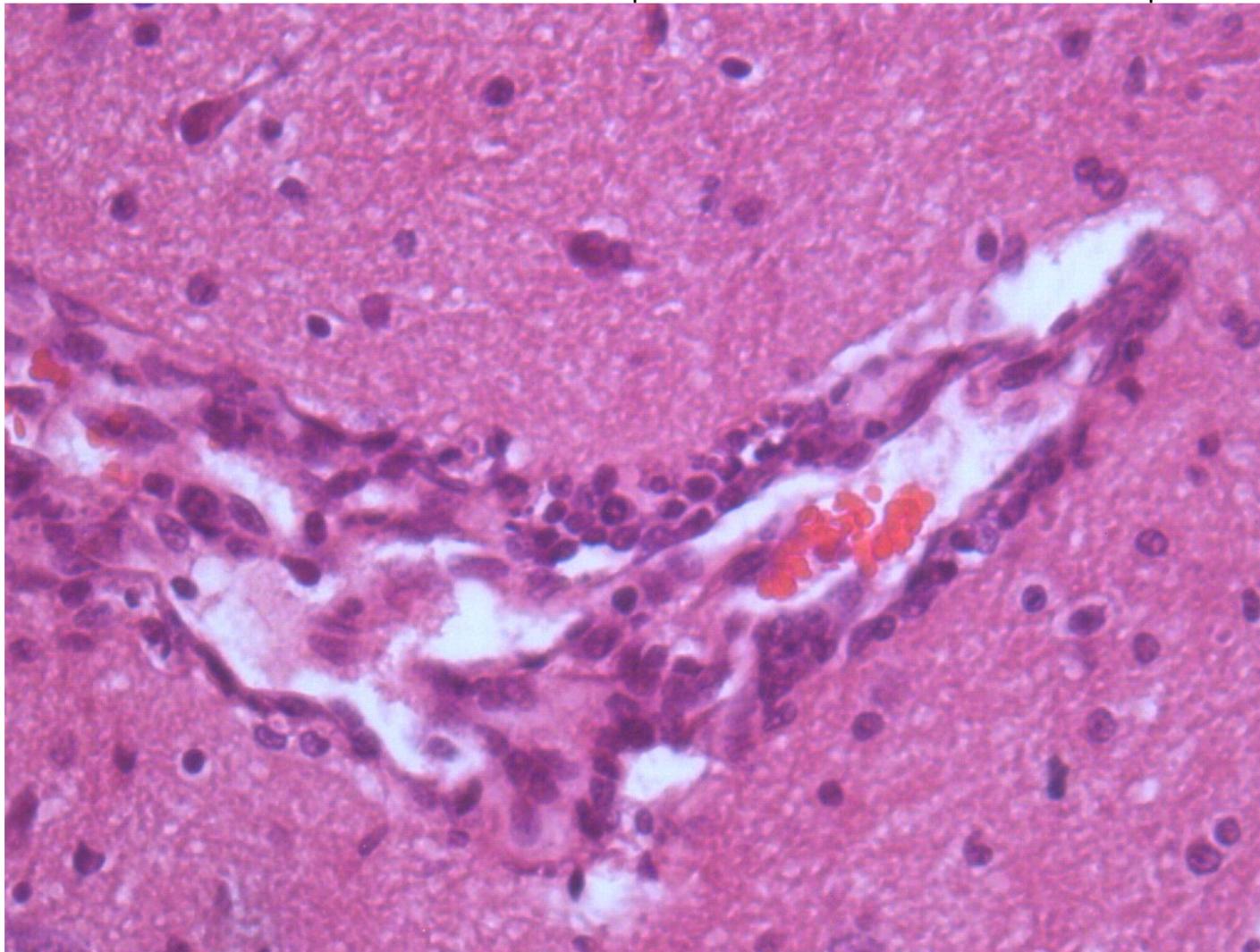


Figura 27. Córnea con acúmulo por mononucleares por debajo del epitelio. Día 7 PI. Cerdo no. 98. RuVP. 400x.

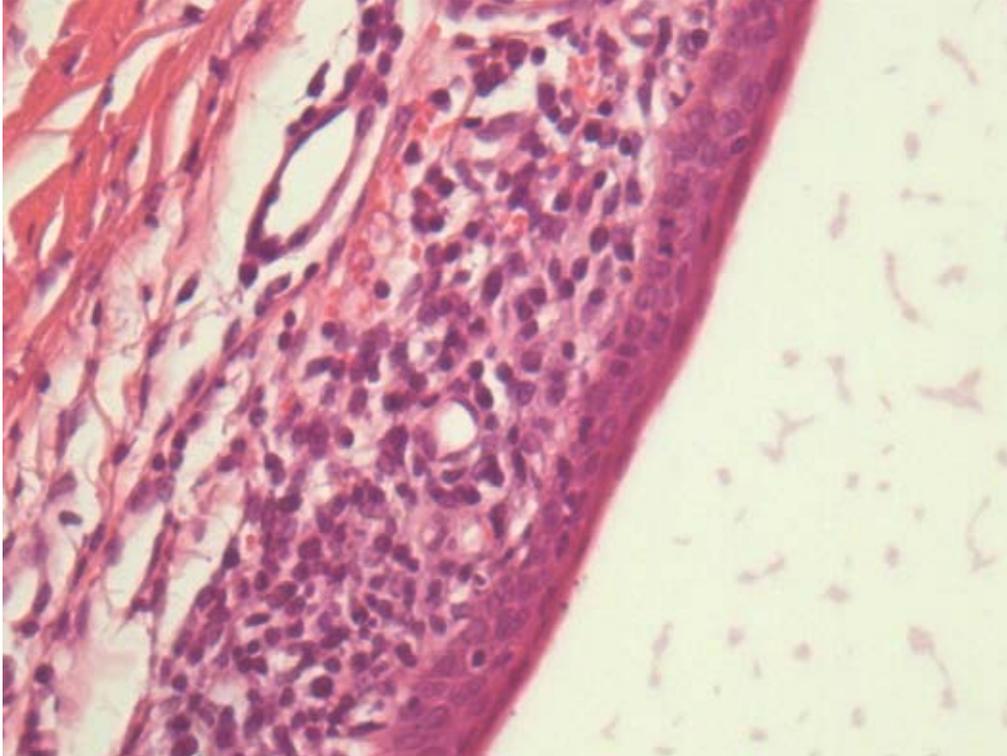
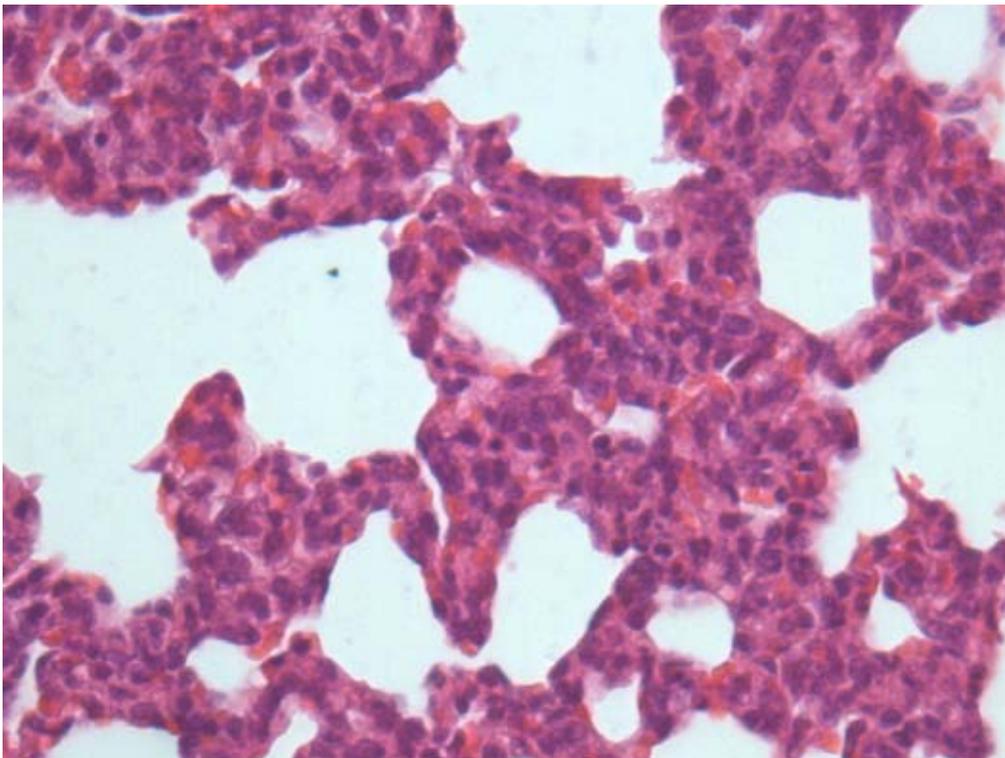


Figura 28. Neumonía intersticial. Día 7 PI. Cerdo no.98. Grupo RuVP. 100x



Cuadro 17. Cambios microscópicos en el grupo RuVP

ORGANO/DIA NECROPSIA/ ARETE	7 PI			14 PI			30 PI		
	55	68	98	76	77	87	78	84	96
Encéfalo		---							
Gliosis difusa	+		++	+++	+	+	++		
Gliosis focal				+		+			++
Neuronofagia				+					
Degeneración neuronal	+				+	+	+	+	
Infiltrado de linfocitos perivasc	+					+	+	+++	
Meningitis linfocitaria			+	+	+	+	+	+	+
Satelitismo				+			+	++	
Médula espinal	---	---	---		---	---			
Gliosis focal				+			+	+	+
Satelitismo				+					
Degeneración neuronal								+	
Infiltrado de linfocitos								+	+
Ganglio de Gässer	---	---		---	---				
Infiltrado de linfocitos			+			+	+	+	+
Degeneración neuronal								+	
Globo ocular	---	---		---	---	---	---	---	---
Infiltrado de linfocitos (córnea)			+						
Glándula salival	---	---	---	---	---	---		---	
Infiltrado de linfocitos							+		
Tonsila	---							---	
Apoptosis linfocitaria		+	+	+	+	+			
Necrosis epitelial							+		+
Linfonodo	---					---		---	---
Apoptosis linfoide		+	+	+			+		
Depleción linfoide					+				
Hemorragia							++		
Pulmón							---	---	
Neumonía intersticial		++	++	+	+	+			+
Pleuroneumonía	++								
Placas de Peyer			---	---	---	---	---	---	---
Apoptosis linfocitaria	+	+							
Bazo	---	---	---		---				
Depleción linfoide				++		++	++	+	+
Hígado	---	---					---		---
Infiltrado de linfocitos			++	+	+	++		+	
Riñón	---	---		---	---				
Nefritis intersticial						+			
Infiltrado de linfocitos			+				++	+	+

---: sin cambios +: discreto ++: moderado +++: severo

Los cambios microscópicos identificados en los órganos y tejidos de los animales del grupo HVS-1, se muestran en el cuadro 18. En el 100% de los animales estudiados se identificó meningoencefalomiellitis no supurativa con marcado tropismo a tejido nervioso así como depleción linfocítica esplénica (Figuras 29, 30 y 31. En el 77.8% (7/9) de los animales se identificó neumonía intersticial y necrosis epitelial en tonsilas. En 66.7% (6/9) de los animales desarrollaron hemorragias en linfonodo. El 44.5% (4/9) de los animales desarrollo ganglioneuritis no supurativa. No se identificaron cambios en globo ocular, timo, páncreas y placas de Peyer.

Figura 29. Médula espinal con gliosis difusa. Día 14 PI. Cerdo no.89. Grupo HVS-1. 100x

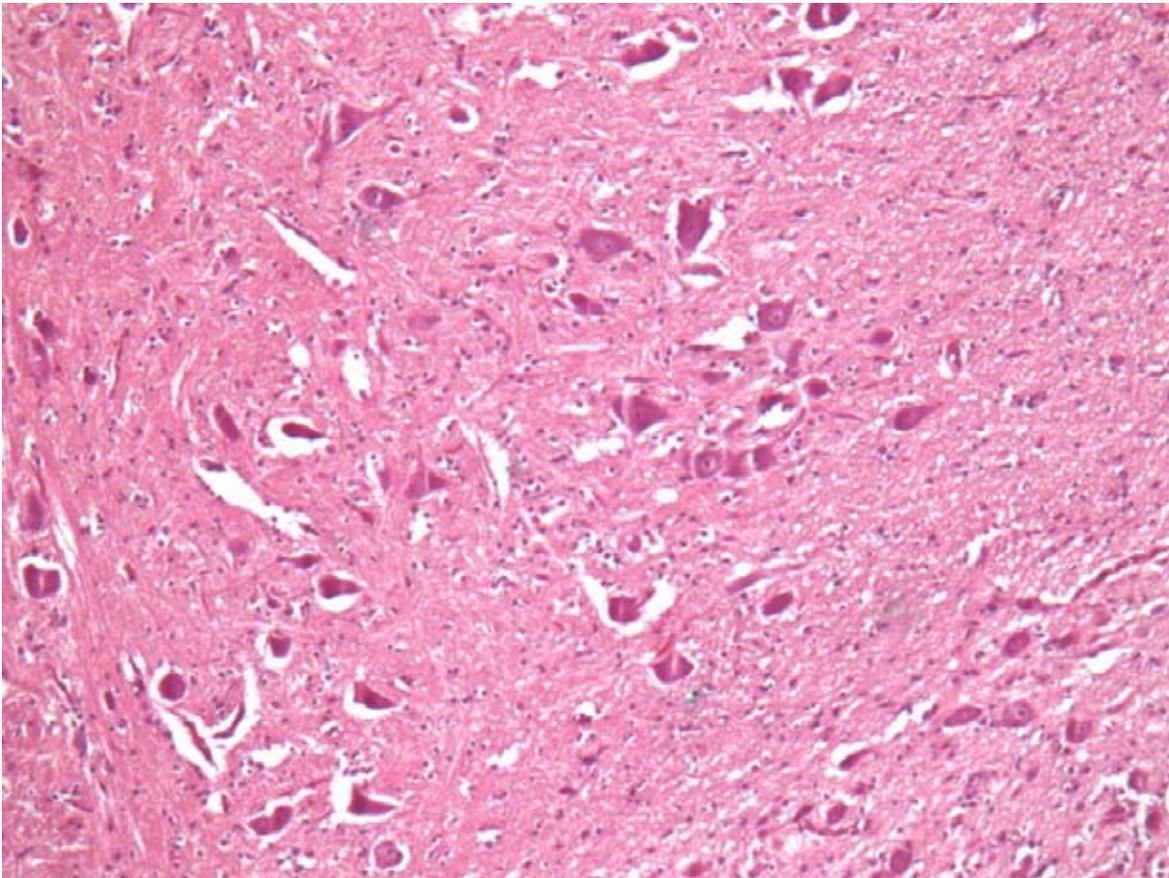


Figura 30. Ganglio del nervio trigémino con infiltración linfocitaria. Día 30 PI. Cerdo no. 57. Grupo HVS-1. 100x

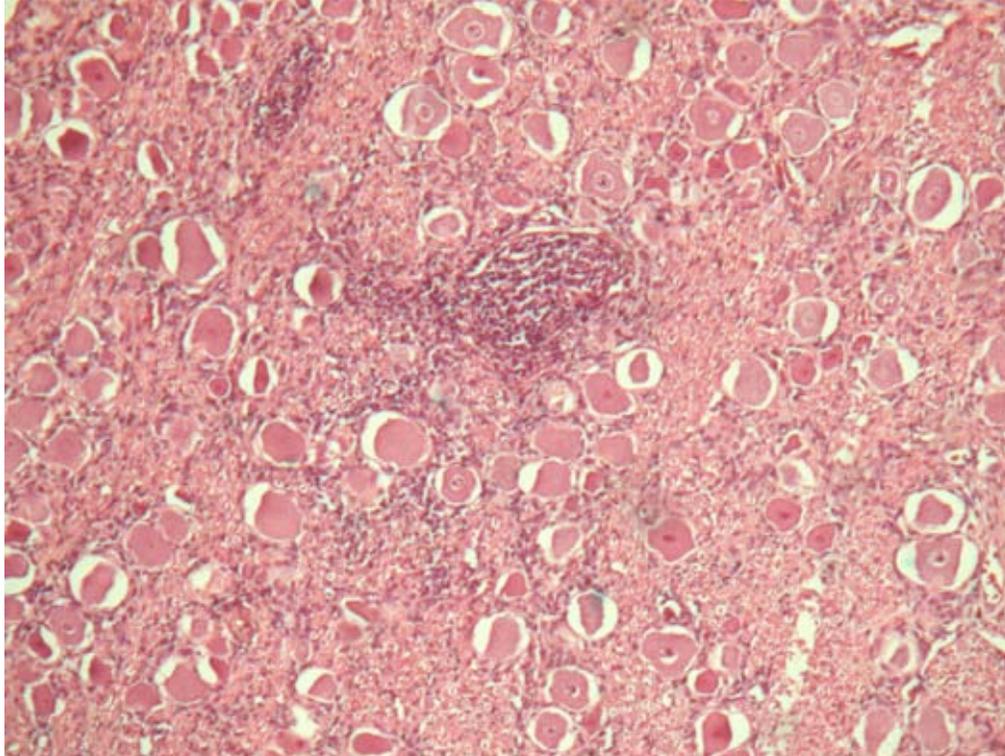
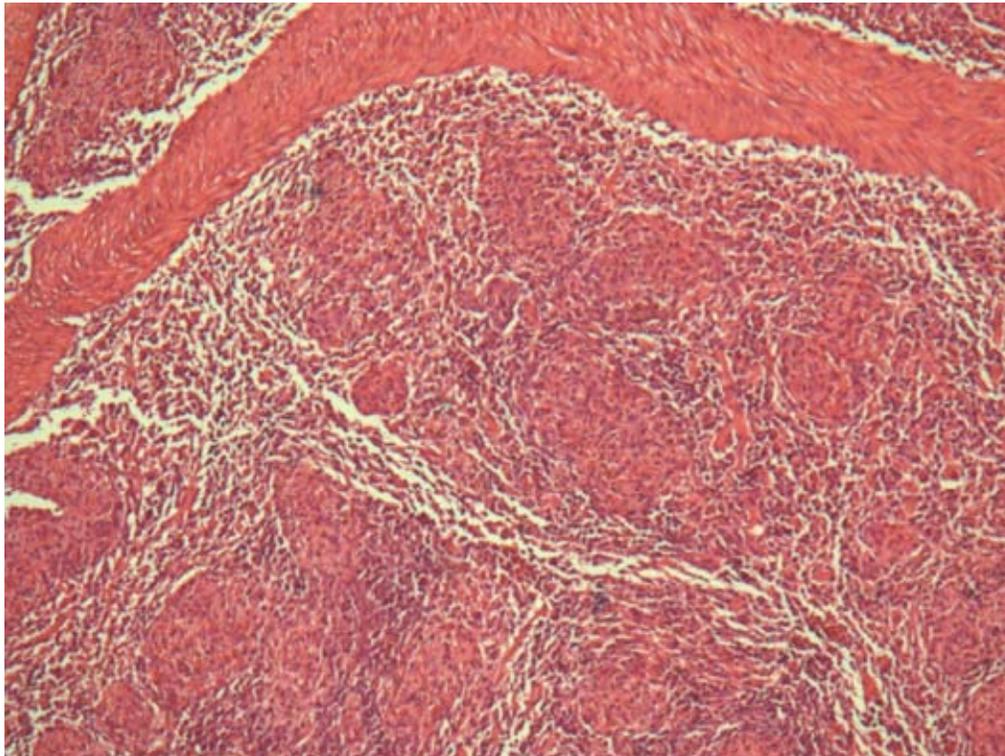


Figura 31. Bazo con depresión linfoide. Día 14 PI. Cerdo no.73. Grupo HVS-1. 100x.



CUADRO 18. Cambios microscópicos en el grupo HVS-1

ORGANO	7 PI			14 PI			30 PI		
	53	79	90	52	85	89	57	63	73
Encéfalo									
Gliosis focal	+++	+	++	+	++	+	+		+++
Gliosis difusa	+++				++		+	++	++
Satelitosis				+	++			++	+++
Congestión	+++							++	
Neuronofagia	+++				++				
Degeneración neuronal	+				++			++	++
Infiltrado de linfocitos perivasc.	+				+		+	+	
Meninges con linfocitos					+		+	+	+
Médula espinal	---	---	---	---			---	---	
Gliosis focal					++	+			++
Satelitosis					++	+			
Degeneración neuronal					++	+			
Ganglio de Gässer	---	---	---	---					
Infiltrado de linfocitos					+++	++	+++	+	+
Glándula salival		---	---	---	---	---	---	---	---
Infiltrado de linfocitos	+								
Tonsila			---	---					
Necrosis epitelial	+	+			++	+++	+	+	+
Linfonodo	---	---	---						
Apoptosis linfoide								+	+
Hemorragias				+	+++	+++	+	+	++
Pulmón	---								
Neumonía intersticial		+		+	+	+	+	+	+
Neumonía			+						
Bazo									
Depleción linfoide	++	+	+	+	+	+	++	+	+
Hígado		---		---	---	---			---
Infiltrado de linfocitos	+		+				+	++	
Riñón	---	---		---		---	---	---	---
Infiltrado de linfocitos			+		+				

---: sin cambios +: discreto ++: moderado +++: severo

En el cuadro 19 se pueden observar las alteraciones histológicas identificadas en órganos y tejidos de los animales del grupo RuVP y HVS-1. Fue identificada meningoencefalomielitis ni supurativa (Figuras 31 y32) y neumonía intersticial (Figura 33) en el 100% de los animales. Hubo depleción linfoide y hemorragias en el linfonodo, en el 77.8% (7/9) de los animales. Además se determinó que el 66.7% de los animales desarrolló hepatitis linfocitaria; el 55.6% (5/9) de los animales mostró neuritis linfocitaria en nervio óptico (Figura 34); el

44.5% (4/9) desarrolló apoptosis en linfonodos y degeneración epitelial en tonsila; el 33.4% (3/9) mostró adenitis linfocitaria; y finalmente, el 22.3% (2/9) de los animales, desarrolló depleción linfoide en linfonodo mediastínico. No hubo lesiones microscópicas en páncreas.

Figura 32. Puente de Varolio con gliosis focal. Día 14 PI. Cerdo no. 75. Grupo RuVP/HVS-1. 100x.

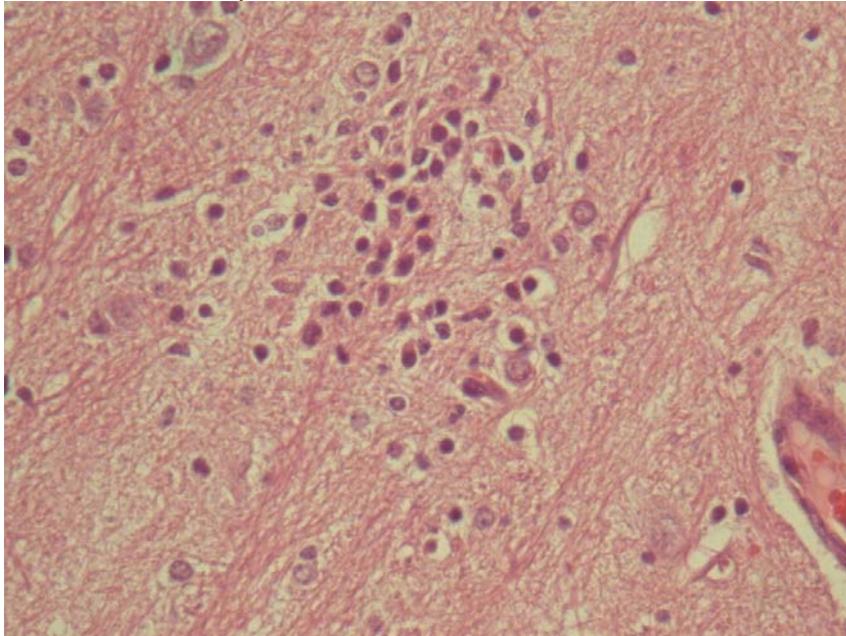


Figura 33. Cerebro anterior con degeneración neuronal. Día 14 PI. Cerdo no. 59. Grupo RuVP/HVS-1. 400x.

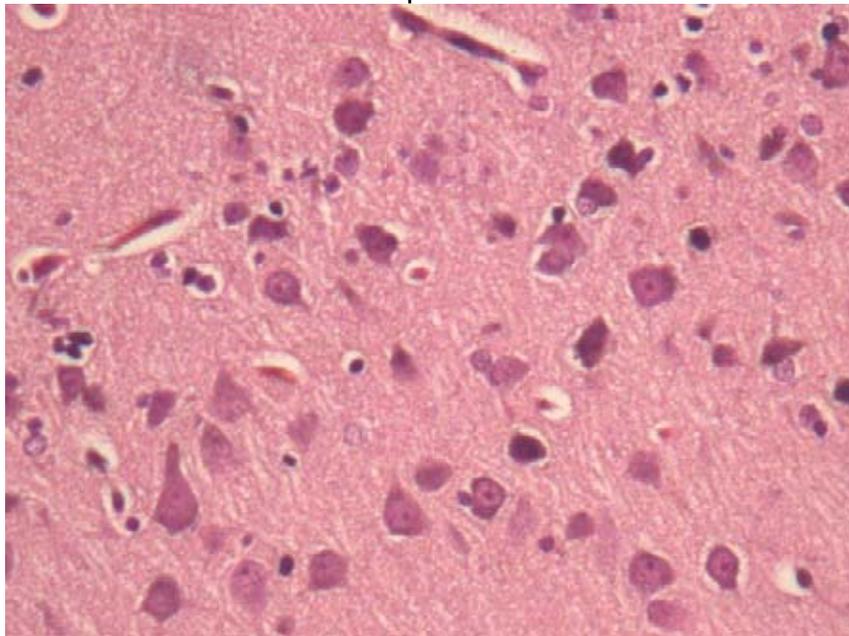


Figura 34. Pulmón con neumonía intersticial. Día 7 PI. Cerdo no. 50. Grupo RuVP/HVS-1. 400x.

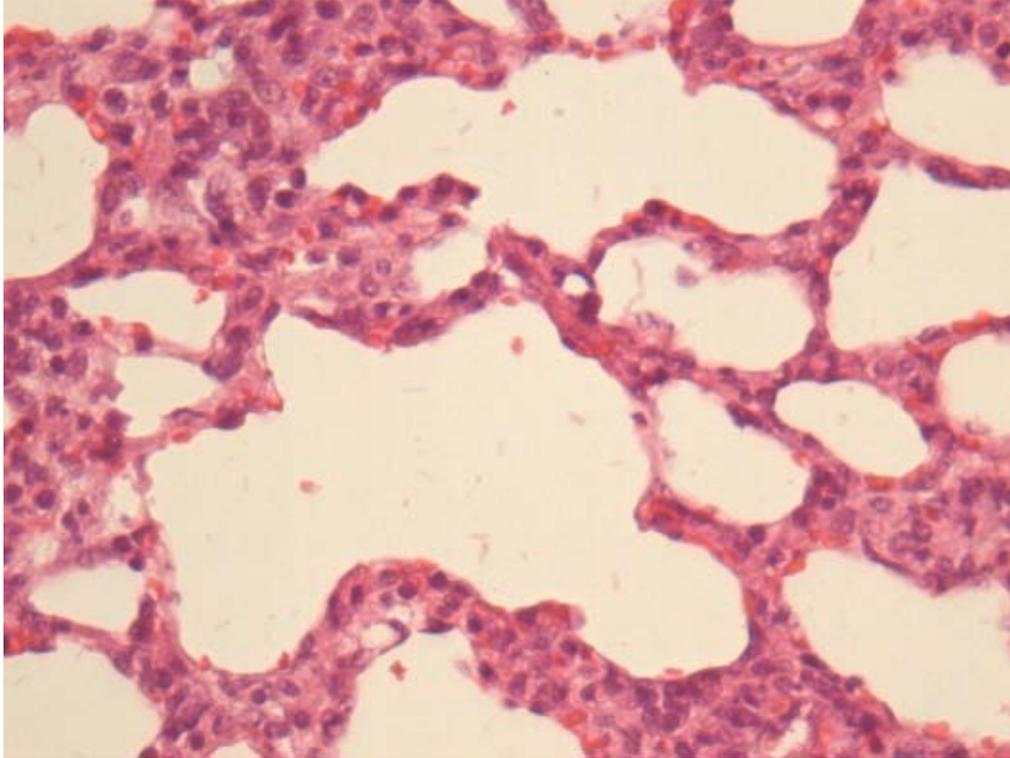
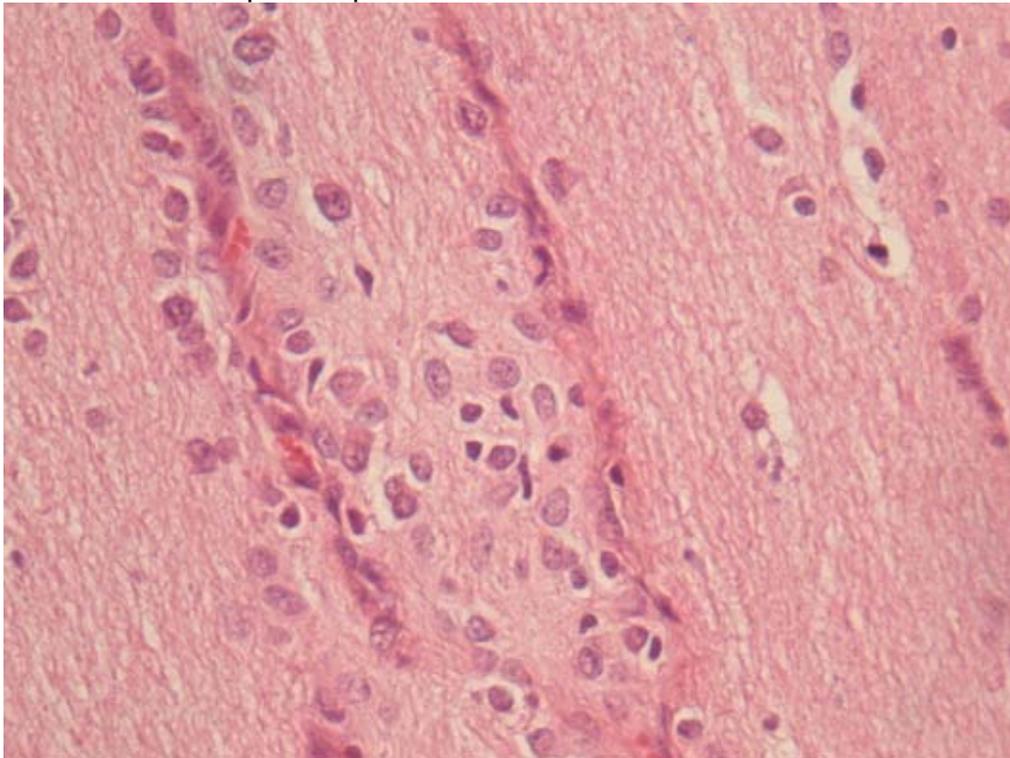


Figura 35. Nervio óptico infiltrado por mononucleares. Día 14 PI. Cerdo no. 75 Grupo RuVp/HVS-1. 400x.



Cuadro 19. Cambios microscópicos en el grupo RuVP / HVS-1.

ORGANO	7 PI			14 PI			30 PI		
	49	50	70	59	69	75	61	62	65
Encéfalo									
Gliosis difusa	+	++		+	++				
Hemorragias		+	++			++	+	+	+
Neuronofagia	+	++			++				
Satelitosis	+		+		++				
Degeneración neuronal	+	++		+	++	++	+		
Meninges con linfocitos	+		+			++	+		+
Infiltrado de linfocitos periv.		+		+	+		+	+	+
Médula espinal	---						---		
Hemorragias		+	+	+	+				+
Gliosis difusa				+	+			+	
Neuronofagia				+					
Degeneración neuronal						+		+	
Ganglio de Gässer		---		---	---	---	---	---	---
Infiltrado de linfocitos	+		+						
Globo ocular)			---	---			---	---	
Neuritis (mononucleares)	+	+			+	+			+
Apoptosis linfocitos	+								
Glándula salival			---	---	---	---		---	---
Infiltrado de linfocitos	+	+					+		
Apoptosis linfocitos		+							
Timo	---		---	---	---	---	---	---	---
Apoptosis linfocitos		+							
Tonsila				---			---		
Degeneración epitelial	+	+	+			+			
Necrosis de criptas		+			+	+			
Hiperplasia epitelial								+	+
Linfonodo					---				---
Apoptosis linfoide	+		+	+			+		
Deplesión linfoide	+	+							
Hemorragias	++	++	++	++		+	+	+	
Pulmón									
Neumonía intersticial	+	+	+	+	+	+	++	+	+
Placas de Peyer	---		---	---	---	---	---	---	---
Apoptosis linfocitos		+							
Bazo		---				---			
Deplesión linfoide	+		++	+	+		++	+	+
Hígado	---	---				---			
Infiltrado de linfocitos			++	+	+		+	+	+
Riñón	---			---	---	---			---
Infiltrado de linfocitos		+	+				+	+	

---: sin cambios +: discreto ++: moderado +++: severo

4.5 SEROLOGÍA

Los resultados de la prueba de seroneutralización realizada en los sueros sanguíneos para detección de anticuerpos específicos con el HVS-1 son mostrados en los cuadros 20, 21, 22 y 23.

En los cuadros 20 y 21, correspondientes a los sueros sanguíneos colectados los días 0, 7, 14, 21 y 30 PI de los animales que conformaron los grupos T y RuVP, se aprecian que son negativos a anticuerpos específicos contra HVS-1.

Cuadro 20. Seroneutralización (HVS-1) en el grupo T.

CERDO NO.	DIAS PI				
	0	7	14	21	30
51	n	n			
81	n	n			
91	n	n			
93	n	n	n		
94	n	n	n		
95	n	n	n		
80	n	n	n	n	n
88	n	n	n	n	n
97	n	n	n	n	n

Cuadro 21. Seroneutralización (HVS-1) en el grupo RuVP.

CERDO NO.	DIAS PI				
	0	7	14	21	30
55	n	sd			
68	n	sd			
98	n	sd			
76	n	n	n		
77	n	n	n		
87	n	n	n		
78	n	sd	sd	n	n
84	n	n	n	n	n
96	n	n	n	n	n

sd: sin datos

Por otro lado, el cuadro 22 muestra los resultados de la SN en los sueros sanguíneos de los animales del grupo HVS-1. Del total de animales de dicho grupo, el 22.3% resultó positivo a la prueba.

Cuadro 22. Seroneutralización (HVS-1) en el grupo HVS-1.

CERDO NO.	DIAS PI				
	1	7	14	21	30
53	n	n			
79	n	sd			
90	n	n			
52	n	n	n		
85	n	n	n		
89	n	n	n		
57	n	n	n	1:8	1:8
63	n	n	n	n	n
73	n	n	1:8	1:16	1:16

Por lo que respecta al grupo RuVP/ HVS-1, el cuadro 23 muestra que el 11.1% de los animales muestreados seroconvirtió en el último muestreo a anticuerpos específicos contra el HVS-1.

Cuadro 23. Seroneutralización (HVS-1) en el grupo RuVP/HVS-1.

CERDO NO.	DIAS PI				
	1	7	14	21	30
49	n	n			
50	n	n			
70	n	n			
59	n	n	n		
69	n	n	n		
75	n	n	n		
61	n	n	n	n	n
62	n	n	n	n	n
65	n	n	n	n	1:8

Los resultados de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) realizada en los sueros sanguíneos para detección de anticuerpos específicos con el RuVP son mostrados en los cuadros 24, 25, 26 y 27.

En los cuadros 24 y 25 correspondientes a los sueros sanguíneos colectados los días 0, 7, 14, 21 y 30 PI de los animales que conformaron los grupos T y HVS-1, se aprecian que son negativos a anticuerpos específicos contra RuVP.

Cuadro 24. Inhibición de la hemoaglutinación (RuVP) en el grupo T.

CERDO NO.	DIAS PI				
	0	7	14	21	30
51	n	n			
81	n	n			
91	n	n			
93	n	n	n		
94	n	n	n		
95	n	n	n		
80	n	n	n	n	n
88	n	n	n	n	n
97	n	n	n	n	n

Cuadro 25. Inhibición de la hemoaglutinación (RuVP) en el grupo HVS-1.

CERDO NO.	DIAS PI				
	0	7	14	21	30
53	n	n			
79	n	sd			
90	n	n			
52	n	n	n		
85	n	sd	n		
89	n	n	n		
57	n	n	n	n	n
63	n	n	n	n	n
73	n	n	n	n	n

sd: sin datos

Por otro lado, el cuadro 26 muestra los resultados de la IHA en los sueros sanguíneos de los animales del grupo HVS-1. Del total de animales de dicho grupo, el 66.7% resultó positivo a la prueba.

Cuadro 26. Inhibición de la hemoaglutinación (RuVP) en el grupo RuVP.

CERDO NO.	DIAS PI				
	1	7	14	21	30
55	n	sd			
68	n	sd			
98	n	sd			
76	n	n	1:16		
77	n	n	1:32		
87	n	n	1:32		
78	n	sd	sd	1:32	1:32
84	n	n	1:8	1:16	1:16
96	n	n	1:16	1:32	1:32

sd: sin datos

Por lo que respecta al grupo RuVP/ HVS-1, el cuadro 27 muestra que el 66.7% de los animales muestreados seroconvirtió a anticuerpos específicos contra el RuVP.

Cuadro 27. Inhibición de la hemoaglutinación (RuVP) en el grupo RuVP/HVS-1

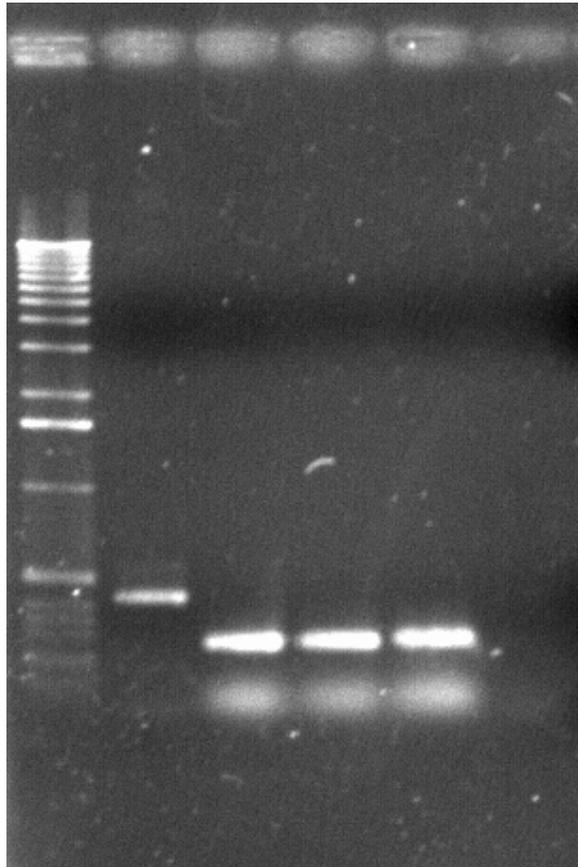
CERDO NO.	DIAS PI				
	1	7	14	21	30
49	n	n			
50	n	n			
70	n	n			
59	n	n	1:8		
69	n	n	1:16		
75	n	n	1:8		
61	n	1:8	1:32	1:8	1:32
62	n	1:8	1:32	1:16	1:16
65	n	1:8	1:16	1:16	1:8

4.6 PRODUCTOS DE LA RCP

4.6.1 Preparación del testigo positivo de RuVP

A partir de 3 alícuotas de 1 ml cada una, de líquido sobrenadante de cultivo celular con $10^{4.7}$ DICC de RuVP se obtuvieron 180 μ l del líquido que contiene RNA del virus mencionado. Se procedió a realizar la reacción de transcriptasa reversa y posteriormente la reacción de PCR. En la Figura 36 se muestran los resultados de la extracción, purificación, RT y PCR para Rubulavirus porcino. Cabe señalar que fue utilizado Circovirus porcino tipo 2 (CVP-2) como control de PCR en el carril 2. La amplificación del segmento de 427 pb corresponde a CVP-2. En los carriles 3, 4 y 5 se aprecia la amplificación de 3 segmentos de 273 pb que corresponden a RuVP.

Figura 36. Reacción de PCR del testigo positivo de RuVP en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



4.6.1.2 Resultados del grupo T para RuVP.

Un total de 29 muestras de suero sanguíneo correspondientes al grupo RuVP fueron sujetas a los procesos de extracción y purificación, RT y PCR. En las figuras 37 al 40 pueden observarse que todas las muestras serológicas son negativas a *Rubulavirus* porcino en el grupo T.

Por otro lado, los sueros sanguíneos de los animales de los grupos RuVP, HVS-1 y RuVP / HVS-1 fueron procesados pero no hubo amplificación del control positivo ni de las muestras. Se decidió repetir el proceso pero ya habían sido agotadas las reacciones del kit RT-PCR.

Figura 37. Reacción de PCR de RuVP en suero sanguíneo del grupo T el día 0. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

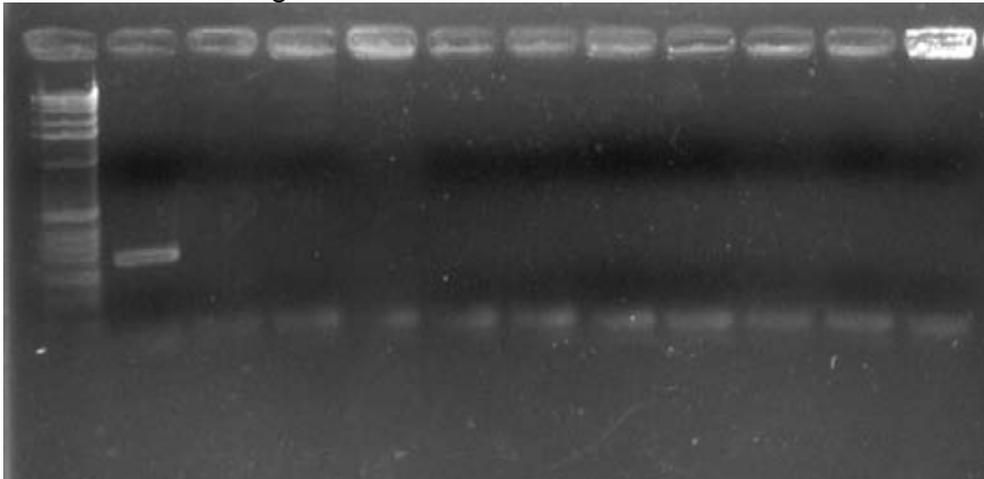


Figura 38. Reacción de PCR de RuVP en suero sanguíneo del grupo T el día 7 PI. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

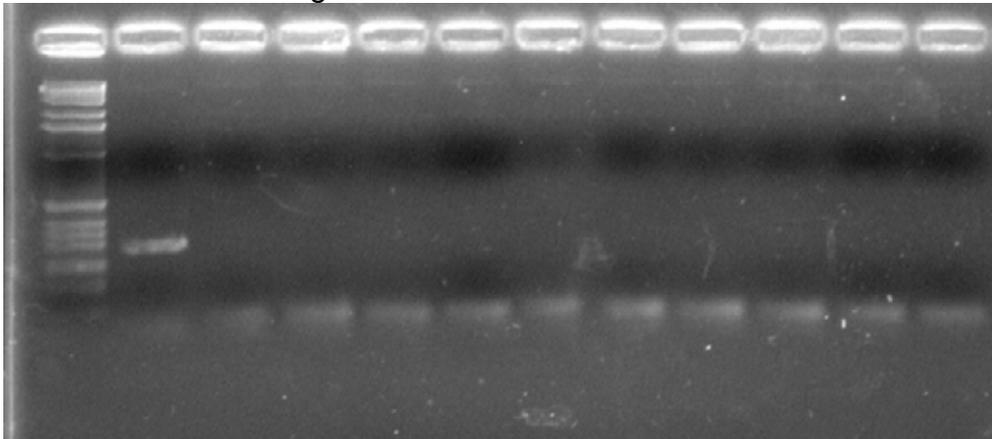


Figura 39. Reacción de PCR de RuVP en suero sanguíneo del grupo T el día 14 PI. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

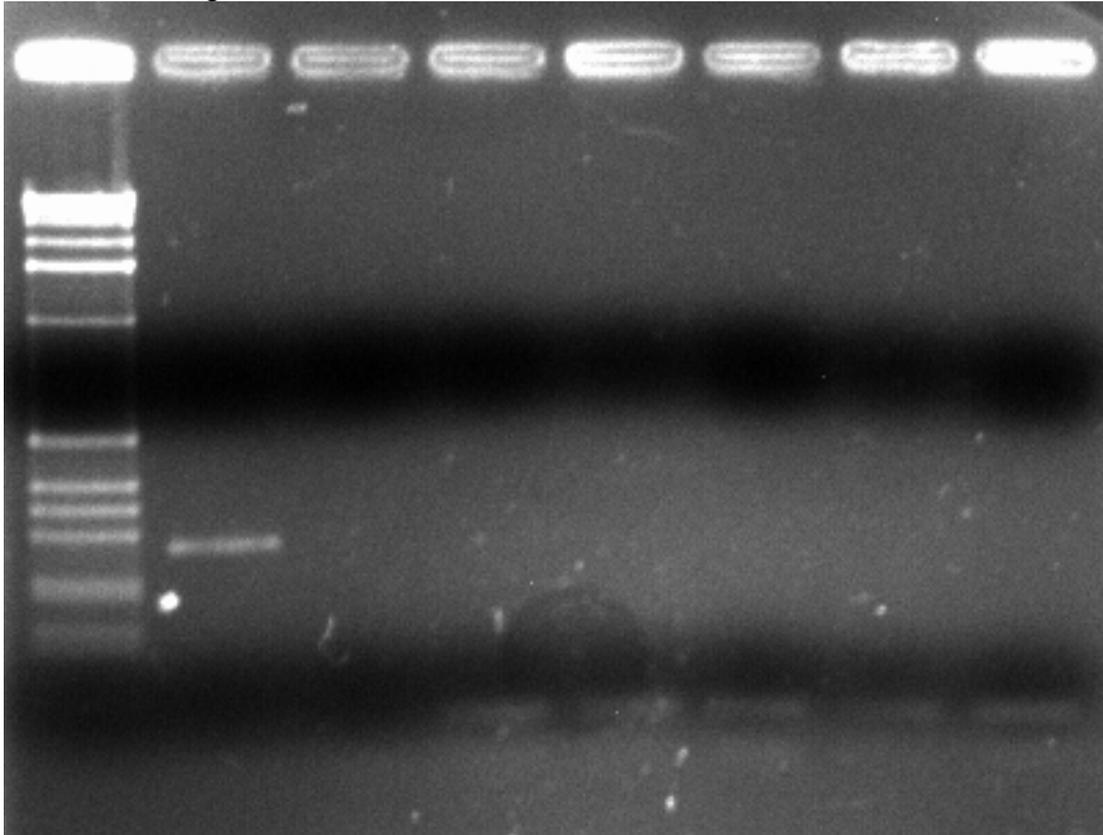
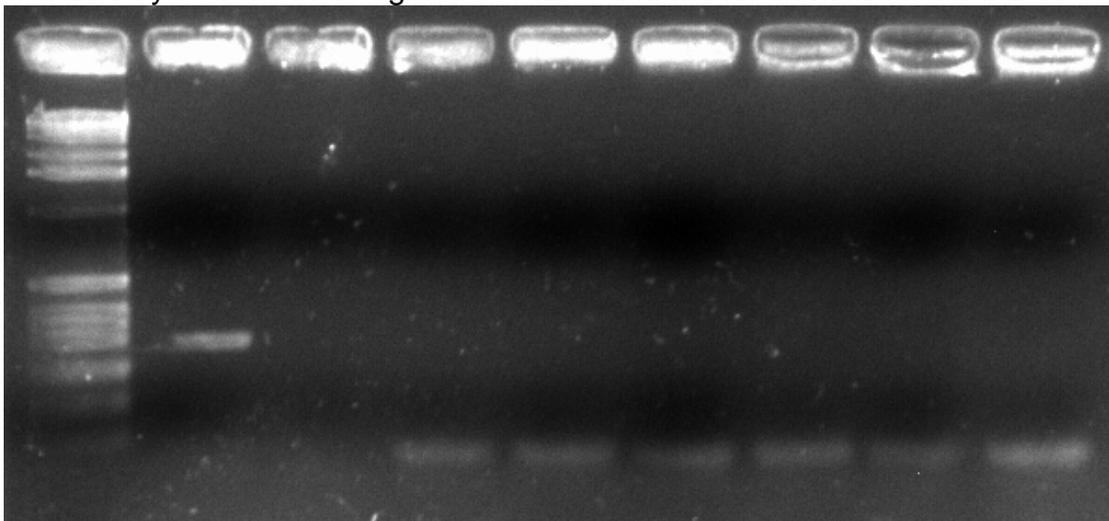


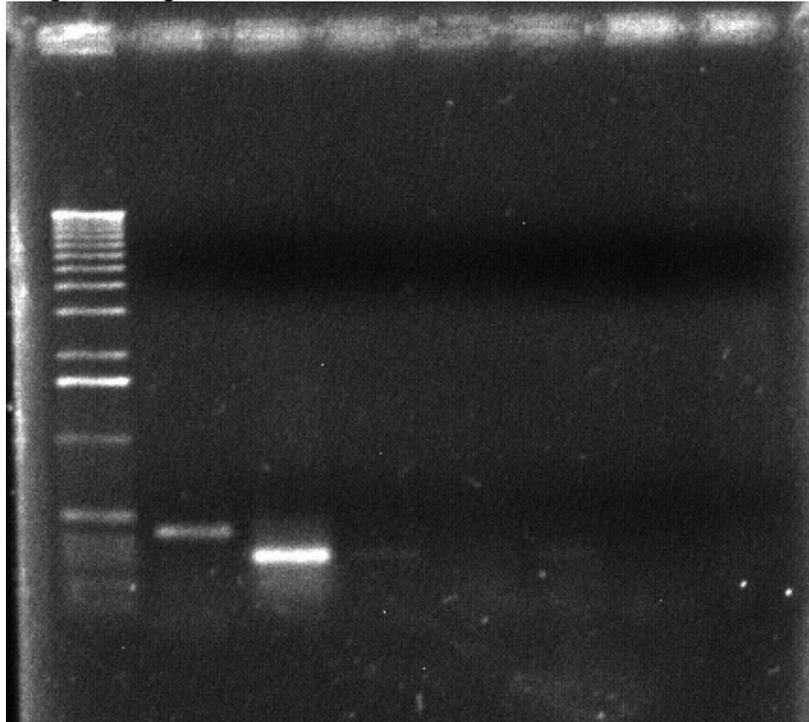
Figura 40. Reacción de PCR de RuVP en suero sanguíneo del grupo T de los días 21 PI y 30 PI. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



4.6.2 Preparación del control positivo de HVS-1

A partir de 1 alícuota de 1 ml de líquido sobrenadante de cultivo celular con $10^{4.7}$ DICC de HVS-1 se obtuvo 60 μ l del líquido que contiene DNA del virus mencionado. Se procedió a realizar la reacción de PCR. En la Figura 41 pueden apreciarse los resultados de la extracción, purificación y PCR para *Herpesvirus suis* tipo 1. Cabe señalar que fue utilizado *Circovirus* porcino tipo 2 (CVP) como control positivo de PCR, en el carril 2. La amplificación de un segmento de 427 pb corresponde a CVP. En el carril 3 se aprecia la banda de amplificación de un segmento de 322 pb que corresponde a gG de HVS-1.

Figura 41. Reacción de PCR del control positivo de HVS-1 en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



A pesar de la amplificación del control positivo de HVS-1 éste no se mantuvo estable ya que al repetir la misma reacción en ensayos inmediatos, no se lograba la repetición del resultado. Fue realizada una reacción de PCR con sueros sanguíneos de los animales del grupo HVS-1 colectados el día 7 PI y no se obtuvo la amplificación del control positivo ni de las muestras experimentales.

5. DISCUSION

Han transcurrido casi tres décadas desde que la infección por RuVP fue descrita por primera vez en México en el año de 1980. Se han realizado algunos trabajos experimentales para demostrar la posible interacción de este virus con otros agentes patógenos de importancia para la porcicultura mexicana y hasta el momento no se ha logrado el objetivo, salvo unos estudios realizados en condiciones de campo, donde se demostró la asociación serológica de algunos patógenos con RuVP.

La observación de problemas clínicos en el campo donde se aprecian signos de infección por RuVP y HVS-1 motivó la realización del presente trabajo.

5.1 SIGNOS CLÍNICOS

Este estudio se realizó con animales convencionales seronegativos a *Herpesvirus suis* tipo 1 y *Rubulavirus* porcino. Sin embargo 2 de 9 animales (22%) del grupo T manifestaron comportamiento alterado. El cerdo 81 mostró signos de infección a nivel del oído medio. El análisis bacteriológico resultó negativo similarmente, el estudio histopatológico no mostró lesiones compatibles con infección bacteriana en el encéfalo. Esto sugiere que la infección quedó circunscrita al área del oído medio. Por otro lado, en el animal 97 se identificó un cambio macroscópico que explicó parcialmente el cuadro clínico observado: el linfonodo mediastínico se encontró edematoso. Este hecho no comprometió el experimento.

Stephano y Gay en 1985 informaron que los cerdos mayores a 30 días de edad presentaron legaña, apatía, poco apetito, estornudo, somnolencia, opacidad de la córnea, entre otros signos, como resultado de la infección por RuVP. A pesar de la ausencia de opacidad de la córnea, el cuadro clínico observado en los animales del grupo RuVP de este experimento coincide con lo reportado por esos investigadores.

Iglesias en 1987 publicó los resultados de la infección experimental por HVS-1 en cerdos de 10 semanas de edad. En dicho estudio fueron comparadas

dos cepas que tuvieron diferente efecto citopático, mientras una de ellas se comportó formando sincitios, la otra lo hizo formando células redondeadas. Desde el punto de vista clínico los animales de ambos grupos mostraron la signología característica de la Enfermedad de Aujeszky, siendo los animales inoculados con la cepa formadora de sincitios quienes desarrollaron el cuadro clínico grave. En el presente estudio los animales del grupo HVS-1 manifestaron el cuadro clínico característico de la enfermedad de Aujeszky, sin mortalidad, poco grave, similar en magnitud al cuadro clínico observado en los animales inoculados con la cepa formadora de células redondas en cultivo celular en el estudio publicado por Iglesias en 1987. Para efectos del presente trabajo, los animales del grupo HVS-1 desarrollaron el cuadro clínico más evidente en comparación con los animales inoculados con ambos virus.

Los animales del grupo RuVP/HVS-1 expresaron signología clínica inespecífica pero de manera más uniforme. El patrón clínico observado en todos los animales, consistió en: cabeza baja, legaña, dificultad respiratoria, depresión, poco apetito, somnolencia y postración. El cuadro clínico descrito es similar al observado en el grupo RuVP pero generalizado en el grupo. Por otro lado, el cuadro clínico observado posterior a la infección inducida de HVS-1 no resultó de la gravedad apreciada en el grupo HVS-1. Iglesias en 1987 comentó que el estudio de la respuesta inmune en animales inoculados permite contemplar la eficiencia de las pruebas de diagnóstico. La prueba de SN es un buen indicador del estado de infección de los animales, puesto que aquellos que presentaron una respuesta clínica leve mostraron títulos bajos de anticuerpos neutralizantes. Mas adelante, en la sección de serología de este trabajo, será tocado el punto nuevamente.

Dewey y Straw, en 2006, precisan que el rango de temperatura corporal esperado en animales de 26 a 70 días de edad, es de 39.0 °C a 39.3 °C. Durante el periodo de aclimatación fue utilizada fuente de calor suplementario para proporcionar calor a los animales y fue retirada a partir del día de la inoculación porque los animales ya no requerían de ella. El análisis de la gráfica de TC indica que todos los animales estuvieron hipotérmicos durante los primeros 15 días PI.

En el grupo HVS-1 fue más evidente este hecho. Los animales de los grupos T, RuVP y RuVP/HVS-1 manifestaron fiebre, pero no tan marcada como los animales del grupo HVS-1. Esto hace evidente la virulencia de la cepa Shope de HVS-1, de acuerdo a la información publicada por Iglesias en 1987, en animales inoculados con HVS-1.

5.2 CONVERSIÓN ALIMENTICIA

Shibata y colaboradores en 2003, compararon los efectos clínicos y patológicos de la infección doble con los virus de la enfermedad disgenésica y respiratoria del cerdo. (VEDRC) y HVS-1 en cerdos SPF de 6 semanas de edad. Los resultados de dicho trabajo indican que no hubo diferencia significativa entre el grupo de animales inoculados con VEDRC y HVS-1 con el grupo control. La explicación dada está basada en el reducido número de animales por grupo y la variación individual. Los resultados del presente trabajo difieren con los publicados por Shibata y colaboradores en 2003. El ANDEVA indicó que la CA de uno de los grupos fue estadísticamente diferente. La prueba de Tuckey-Kramer identificó al grupo RuVP/HVS-1 como aquel cuya CA fue más alta y que, además, tuvo diferencia significativa con la CA de los grupos T, RuVP y HVS-1.

En el presente estudio la CA y GDP de los animales del grupo RuVP no tuvieron diferencia significativa con los otros grupos. Stephano y Córdova en 1992, publicaron los indicadores de producción afectados por la infección por RuVP en granjas porcícolas en la parte central de México. Las pérdidas en las áreas de reproducción (Servicios/Gestación) y lactancia (Maternidad) son evidentes. Los datos de CA de la línea de producción (Destete/Engorda) no fueron evaluados mediante estadística por lo que no puede ser definido el efecto detrimental de la enfermedad en esta área de producción en el estudio referido.

5.3 NECROPSIA

En los animales (7/9) del grupo T fueron identificados cambios en el linfonodo mediastínico, tales como: hemorragia y edema. Estas alteraciones están asociadas al drenaje de la hemorragia causada por la toma de muestra sanguínea en la fosa yugular.

Stephano y colaboradores en 1988 inocularon RuVP a cerdos destetados, vía intranasal, con 27 días de edad, observaron a la necropsia: opacidad corneal, edema subcutáneo en la región inguinal y abdominal, estómago lleno de alimento e intestinos vacíos, petequias en la superficie renal, congestión en meninges y aumento del líquido cefalorraquídeo. Las lesiones descritas en los animales del grupo RuVP indican que en los animales (7/9) se observaron linfonodos edematosos y en 5/7 animales se observaron hemorrágicos, hidropericardio en 6/9 animales y congestión meníngea en 5/9 animales. No hubo opacidad de la córnea. Estos cambios difieren de los descritos por los investigadores referidos y posiblemente se encuentre asociado a la cepa inoculada. La cepa utilizada por Stephano y colaboradores fue aislada de cerdos lactantes afectados por RuVP mientras que la cepa utilizada en este experimento fue aislada de sementales afectados por RuVP.

Iglesias en 1987, en un artículo de revisión sobre la EA, menciona que las lesiones macroscópicas son más claras en cerdos lactantes o recién destetados que en animales de mayor edad. Entre las lesiones más frecuentemente observadas se encuentran: congestión discreta hasta zonas necróticas en tonsilas, faringe y linfonodos. Edema pulmonar y focos necróticos en hígado y bazo de 2 mm de diámetro. También se menciona la presencia de hemorragias petequiales en corteza renal y glándulas adrenales. Cuando la infección está dada por cepas virales capaces de desarrollar problemas respiratorios, comúnmente se observan zonas de consolidación aguda que pueden abarcar lóbulos completos. Las asociaciones bacterianas a nivel pulmonar en los casos de campo son comunes. En el presente trabajo las lesiones macroscópicas observadas en los animales del grupo HVS-1 se concentran en los linfonodos y en el encéfalo. Las lesiones neumónicas, son de poca extensión y no se apreciaron otros cambios en el pulmón sugerentes de la asociación por gérmenes oportunistas. La ausencia de las lesiones macroscópicas se asocian a la edad de los cerdos (40 días) al momento de la inoculación empleados en este experimento y a la dosis de HVS-1 utilizada.

Shibata y colaboradores en 2004 estudiaron la interacción de VEDRC y HVS-1 en cerdos SPF, con 42 días de edad. Las lesiones a la necropsia se circunscribieron al pulmón en donde se observó moderada falta de colapso pulmonar al día 14 PI y severa falta de colapso pulmonar al día 21 PI a diferencia de los animales de los grupos VEDRC, HVS-1 y control en donde no fue observado este cambio. Narita e Ishii en 2004, estudiaron la interacción de los mismos virus estudiados por Shibata y colaboradores. Utilizaron cerdos SPF, con 28 días de edad serológicamente negativos a VEDGR, HVS-1 y Circovirus porcino tipo 2 (CVP-2). Encontraron que los cambios macroscópicos fueron severos en el grupo de la doble infección y consistieron en: severa atrofia del timo, congestión del cerebro y neumonía con coloración difusa en la periferia de los lóbulos. No hubo lesiones macroscópicas en los cerdos de los grupos VEDRC y control. Solo hubo discreta atrofia en el timo de los animales del grupo HVS-1. Los cambios macroscópicos descritos en estos 2 experimentos sugieren la interacción en los virus estudiados. Los cambios observados en el grupo RuVP/HVS-1 se manifestaron en la mayoría de los animales y consistieron en linfonodos edematosos y/o hemorrágicos seguidos por la congestión en el encéfalo, el hidropericardio y la ascitis.

5.4 HISTOPATOLOGÍA

Las lesiones observadas en los animales del grupo T son discretas e inespecíficas en el sistema nervioso central. No se identificaron cambios microscópicos en el ganglio del nervio trigémino, glándula salival, timo, tonsila, placas de Peyer, globo ocular, páncreas e hígado.

Pérez en 1989 describió los cambios histológicos en lechones de 1 día de edad, inoculados con RuVP, vía intratraqueal con $10^{4.5}$ DICC 50%. Reportó meningoencefalomielitis no supurativa con cuerpos de inclusión intracitoplásmicos en las neuronas piriformes de la corteza cerebelosa, infiltrado linfocitario en el ángulo iridocorneal y cuerpos de inclusión intracitoplásmicos en el epitelio corneal. Stephano y colaboradores en 1981 describieron los brotes de encefalitis por un virus hemoaglutinante. Encontraron severa meningoencefalomielitis no supurativa en lechones de 7 a 10 días de edad. En este trabajo los resultados del estudio

histológico realizado en los animales del grupo RuVP son: meningoencefalomielitis no supurativa de discreta a moderada. Neumonía intersticial en 6/9 animales. Destaca notablemente la apoptosis linfocitaria en la tonsila, depleción linfocitaria en bazo y la escasa presencia del infiltrado linfocitario en la córnea. Resalta la infiltración linfocitaria en el ganglio del nervio trigémino. No se observaron cuerpos de inclusión intracitoplásmicos en las neuronas piriformes de la corteza cerebelosa. Los cambios microscópicos, en lo general, indican la infección por RuVP.

Iglesias en 1987 en un artículo de revisión, indica que las lesiones histológicas asociadas a la infección por HVS-1 son: meningoencefalomielitis no supurativa, con cuerpos de inclusión eosinofílicos o ligeramente basófilos que no son un hallazgo constante. Es común observar necrosis neuronal, satelitosis, microgliosis e infiltración perivascular antes que los cuerpos de inclusión. Pueden observarse focos de necrosis coagulativa en hígado, bazo y glándulas adrenales. En las tonsilas se aprecian zonas de necrosis acompañadas por cuerpos de inclusión intranucleares y depleción linfoide de diferente magnitud. Cuando la cepa viral involucrada afecta al aparato respiratorio es común observarse necrosis pulmonar diseminada, cambios exudativos severos, cuerpos de inclusión en las células epiteliales de todos los pasajes aéreos y exudado fibrinoso en la luz alveolar. En el grupo HVS-1 de este trabajo, fue identificada meningoencefalomielitis no supurativa, de moderada a severa, con marcado tropismo a tejido nervioso así como depleción linfoide esplénica. Este último cambio es común a todos los animales empleados en este trabajo. La neumonía intersticial es poco común ya que la replicación de HVS-1 en pulmón, desarrolla necrosis focal y cuerpos de inclusión intranucleares. En contraste, la necrosis epitelial en tonsilas es común observarla pero acompañada por la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares, que no fueron observados en este trabajo. La ganglioneuritis no supurativa es un cambio constante en infecciones naturales o inducidas por cualquier virus neurotrófico. La edad de los animales al momento de la inoculación de HVS-1 y la dosis empleada son dos factores que posiblemente

condicionaron el desarrollo de las lesiones microscópicas características de la infección por HVS-1.

Shibata y colaboradores en 2003, demostraron la interacción entre VEDRC y HVS-1 mediante diferentes técnicas. El estudio histopatológico indicó la presencia de neumonía intersticial en todos los cerdos del grupo VEDRC / HVS-1 y en los animales del grupo HVS-1. Esta lesión fue mas severa en los animales del grupo VEDRC / HVS-1 que en los del grupo VERC. Por otro lado, solo se observó neumonía intersticial moderada en 2 cerdos del grupo HVS-1. Adicionalmente fue observada encefalitis en medula oblonga y cerebelo en todos los animales del grupo VEDRC / HVS-1 y en los animales del grupo HVS-1. Narita e Ishii en 2004, estudiaron los mismos virus. Utilizaron cerdos SPF, con 28 días de edad serológicamente negativos a VEDGR, HVS-1 y CVP-2, encontraron meningoencefalitis no supurativa y encefalomalacia en corteza cerebral en los animales del grupo de la doble infección. En un cerdo del grupo HVS-1 hubo encefalomiелitis no supurativa discreta y en el resto de los animales de dicho grupo asi como en los animales del grupo VEDRC y control no hubo lesiones en el sistema nervioso central. Estos hallazgos permitieron a los investigadores concluir que VEDRC y HVS-1 actúan sinérgicamente cuando son inoculados a cerdos susceptibles.

En el grupo RuVP/HVS-1 fue identificada meningoencefalomiелitis no supurativa de discreta a moderada y neumonía intersticial en el 100% de los animales. Un número importante de animales desarrollaron lesiones en varios órganos y tejidos. Se observó neuritis linfocitaria en el nervio óptico. A pesar de A pesar que todos los animales del grupo de la doble infección mostraron lesiones microscópicas en mayor número de órganos y tejidos, no es indicativo de sinergismo entre RuVP y HVS-1.

5.5 SEROLOGÍA

La seroconversión fue detectada mediante las pruebas de SN e IHA para HVS-1 y RuVP, respectivamente. Se demostró que no hubo seroconversión a anticuerpos específicos contra HVS-1 en los animales de los grupos T y RuVP, como tampoco la hubo para RuVP en los animales de los grupos T y HVS-1

Pirtle y Gutekundst en 1978, desarrollaron un trabajo en donde evaluaron la respuesta inmune y el asilamiento viral en cerdos susceptibles expuestos a la cepa Shope de HVS-1. Utilizaron cerdos de un peso inicial al considerado para este trabajo; la misma vía de administración del inóculo y la cepa Shope de HVS-1; obteniendo títulos de 1:8 hasta 1:256 al día 21 PI. Los resultados de las muestras de suero sanguíneo de los animales del grupo HVS-1 indican seroconversión específica por anticuerpos neutralizantes en 7/9 animales, con títulos de 1:2 hasta 1:16. Los títulos alcanzados por los anticuerpos neutralizantes al día 30 PI en este experimento no son altos en comparación a los títulos reportados por Pirtle y Gitekundst. Iglesias en 1987, expresó que el estudio de la respuesta inmune en animales inoculados permite contemplar la eficiencia de las diversas pruebas de diagnóstico. La prueba de SN es un buen indicador del estado de infección de los animales, puesto que aquellos que presentaron una respuesta clínica leve, mostraron títulos bajos de anticuerpos neutralizantes, caso contrario de lo ocurrido con los animales que sufrieron una infección severa. Con base a lo anterior, para este trabajo esperaba haber obtenido títulos de anticuerpos neutralizantes mas bajos en el grupo RuVP / HVS-1 que los obtenidos en el grupo HVS-1. Sin embargo, solo un animal de 9 en total tuvo un título de anticuerpos neutralizantes en 1:8 y solo al final del experimento. Una posible explicación del por qué se obtuvieron estos resultados en la prueba de SN para detectar anticuerpos neutralizantes del HVS-1, es que los sueros no fueron tratados ni activados previo a la realización de la prueba. Otro factor que pudo interferir, es el hecho de haber descongelado los sueros 4 veces para vaciarlos en placas y repetir las pruebas serológicas de este trabajo.

Ramírez y colaboradores en 1996, establecieron las condiciones para realizar la prueba de IH para detectar anticuerpos específicos de RuVP. A excepción del tratamiento e inactivación que debieron realizarse en los sueros, previo a la realización de la prueba, se utilizaron eritrocitos de bovino y demás elementos determinados en dicho trabajo. Los resultados positivos obtenidos en los sueros de los animales de los grupos RuVP (6/9) así como en los resultados

positivos en los animales del grupo RuVP / HVS-1 (6/9), podrían considerarse como esperados.

La interacción entre RuVP y HVS-1 que se pretendió demostrar en este trabajo pudo haber sido estudiada desde el punto de vista de la serología. Sin embargo, la seroconversión en los animales del grupo RuVP / HVS-1 fue de 6/9 y 1/9 respectivamente, que no resultó ser la esperada, posiblemente se debió al manejo excesivo de descongelación de los sueros. La metodología para demostrar la asociación entre patógenos a nivel de pruebas serológicas está claramente descrita por Diosdado y colaboradores. En 2002 estos investigadores publicaron un estudio seroepidemiológico realizado en 1000 sueros de hembras adultas y 3600 sueros de cerdos de engorda. En los sueros de las hembras se encontró asociación serológica del VEDRC con RuVP y HVS-1. En los sueros de los cerdos de la línea de producción, se determinó que RuVP no tuvo asociación serológica con HVS-1 pero sí con el virus de la influenza porcina. En 2004, estos mismos investigadores publicaron otro estudio seroepidemiológico realizado en 2600 hembras porcinas adultas. Se determinó la presencia de anticuerpos específicos contra RuVP conjuntamente con anticuerpos específicos contra VEDRC, HVS-1, virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo, virus de la influenza porcina, coronavirus respiratorio del cerdo, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Salmonella* spp., y *Brucella suis*, sin encontrarse asociación serológica entre RuVP y esos patógenos. La metodología empleada para evaluar la asociación serológica en ambos trabajos fue mediante la estadística paramétrica.

5.6 PRODUCTOS DE LA RCP

En los sueros sanguíneos de los animales del grupo T fue posible demostrar la ausencia de RuVP. No fue posible demostrar la presencia de RuVP a partir de las muestras de suero sanguíneo correspondientes a los animales de los grupos RuVP y RuVP/HVS-1, como tampoco la ausencia de RuVP en el grupo HVS-1, porque no se logró la amplificación del control positivo ni de las muestras. Se decidió repetir el procedimiento pero ya no había reactivos suficientes para ello. En cuanto a HVS-1 tampoco fue posible demostrarlo en las muestras de suero sanguíneo correspondientes a los animales de los grupos HVS-1 y

RuVP/HVS-1 como tampoco demostrar su ausencia en los grupos T y RuVP porque a pesar de obtener la amplificación del control positivo no se mantuvo estable en las reacciones subsecuentes como tampoco se logró en las muestras donde se esperaba hubiese amplificación.

El kit de extracción y purificación de ARN y ADN virales en muestras de suero y plasma contiene varios reactivos que deben ser diluidos con alcohol étílico absoluto. El manual de instrucciones del fabricante del producto indica el volumen necesario de solvente para cada tipo de reactivo, más no señala la calidad del reactivo. Posiblemente el grado de pureza del alcohol utilizado para la dilución de los reactivos no fue el adecuado. Por otro lado, las muestras de suero sanguíneo estuvieron almacenadas en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 a 9 meses, en tanto se lograba la amplificación del control positivo de RuVP y HVS-1.

Para este estudio se postuló como hipótesis de trabajo que RuVP y HVS-1 al estar presentes en el cerdo, actuarían de manera sinérgica y afectarían la salud así como la productividad en porcinos de 40 a 70 días de edad. Los resultados del estudio histopatológico realizado en los animales de los 4 grupos sujetos a estudio, contrastados entre sí, permiten concluir que no se confirmó la hipótesis de trabajo formulada. Los estudios revisados donde trabajaron con HVS-1 y el virus de la enfermedad disgenésica y respiratoria del cerdo, permiten visualizar con claridad la interacción de ambos virus desde el punto de vista clínico e histopatológico.

Los objetivos planteados para este estudio proporcionarían la información necesaria para contrastar el comportamiento de los animales distribuidos en los 4 grupos de trabajo. Sin embargo hubo algunas omisiones al plan de trabajo originalmente aprobado por el comité tutorial:

1. Comprobar la seronegatividad de los animales no solo para RuVP y HVS-1, sino también para PRRS y APP. En este punto también debió considerarse CVP-2, pero no se hizo. Aparentemente los animales no estaban infectados por PRRS ni por APP. Posiblemente

si por CVP-2 ya que un cerdo tuvo costras en la piel y la deplesión linfoide esplénica identificada en 22/36 (61%) de los animales, está asociada a infección por CVP-2 y por HVS-1

2. La falta de inactivación de los sueros sanguíneos para realizar las pruebas de SN e IHA, así como el manejo excesivo de las muestras por repetición de las pruebas influyeron en la obtención de los resultados en el grupo RuVP/HVS-1.
3. El tiempo excesivo de almacenamiento de las muestras de suero y tejidos, aunque haya sido en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pudo haber condicionado la obtención de ADN y ARN y que haya influido en la PCR. A este punto hay que considerar el uso de alcohol etílico absoluto de dudosa pureza para diluir las soluciones amortiguadoras del kit de extracción y purificación de ADN y ARN virales.
4. El retraso de 7 días para disponer del inóculo trajo como consecuencia que los cerdos tuvieran más edad y por ende más peso, que rebasó la estimación inicial de 65 días de edad y menos de 30 kg de peso al término del experimento. Por esta razón no se pudo obtener el peso corporal al día 30 PI. Esta situación impactó negativamente el objetivo relacionado a la conversión alimenticia.
5. La evaluación de la CA a pesar de estar truncada, proporcionó información de producción con significancia estadística.
6. Se logró reproducir el cuadro clínico de la infección por RuVP, HVS-1 y RuVP/HVS-1.
7. Fue descrito el cuadro clínico inducido en cada grupo de animales y se logró la evaluación de los cambios macro y microscópicos en órganos y tejidos.

6. CONCLUSIONES

- Los animales de los grupos inoculados manifestaron signos clínicos resultado del virus inoculado
- Los animales del grupo T se comportaron clínicamente sanos
- Las lesiones macroscópicas fueron similares en todos los grupos inoculados pero variaron en intensidad y número de animales que las manifestaron
- El lugar de punción para obtener sangre alteró los linfonodos mediastínicos en los animales de todos los grupos
- El grupo inoculado con ambos virus tuvo un mayor número de animales afectados; así como mayor número de tejidos y órganos con lesiones
- Solo un animal del grupo *Rubulavirus* porcino tiene infiltración linfocitaria en la córnea. En ningún otro animal de cualquier grupo hubo lesión ocular
- Las lesiones microscópicas son similares en los animales de todos los grupos aunque varían en intensidad y tienen tropismo hacia tejido nervioso. De menor a mayor, los grupos se ubican: *Rubulavirus* porcino, *Rubulavirus* porcino/*Herpesvirus suis* tipo 1 y *Herpesvirus suis* tipo 1
- Los animales del grupo T presentan lesiones microscópicas discretas e inespecíficas
- El cuadro clínico, las lesiones macroscópicas e histológicas observados en los animales inoculados con RuVP y HVS-1 están descritas con anterioridad en la literatura científica.
- Hubo seroconversión a *Herpesvirus suis* tipo 1 en el grupo HVS-1
- Hubo seroconversión a *Rubulavirus* porcino en el grupo RuVP
- Hubo seroconversión a *Herpesvirus suis* tipo 1 y *Rubulavirus* porcino en el grupo RuVP/HVS-1
- Hubo seronegatividad a *Herpesvirus suis* tipo 1 en el grupo RuVP
- Hubo seronegatividad a *Rubulavirus* porcino en el grupo HVS-1

- Hubo seronegatividad a *Herpesvirus suis* tipo 1 y *Rubulavirus* porcino en el grupo T
- El grupo T es negativo a *Rubulavirus* porcino por PCR
- Este trabajo aporta resultados preliminares relativos al impacto negativo en la conversión alimenticia en cerdos infectados naturalmente con *Rubulavirus* porcino y *Herpesvirus suis* tipo 1. Es necesario repetir este experimento con mayor número de animales y por toda la duración del proceso de engorda

7. LITERATURA CITADA

1.- Morilla GA. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. 2ª ed. México: El Manual Moderno, S.A. de C.V., 2005.

2.- Iglesias SG, Trujano CM. Diversos modelos de interacciones que ocurren en el complejo respiratorio porcino. Vet Mex 2000;31:59-65.

3.- Flores HAO. Riesgo de introducción de enfermedades exóticas de los cerdos a México. Memorias del Symposium sobre enfermedades del cerdo con implicaciones en el comercio internacional; 1993 marzo 20-21; México (DF): Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, 1993:86-89.

4.- Ramírez NR. Interacciones microbianas. Memorias del seminario internacional sobre Diagnóstico y manejo de las interacciones infecciosas que inciden en la producción porcina, 1997 octubre 23-24; Guadalajara, Jalisco (México): Anchor SA de CV/Boehringer Ingelheim, 1997:1-11.

5.- Pejsak ZK, Truszczynski JM. Pseudorabia (Aujeszky's Disease). In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. USA: Blackwell Publishing, 2006: 419-433.

6.- Iglesias SG. Infección con el virus de la Enfermedad de Aujeszky en cerdos. En: Moreno ChR, editor. Ciencia Veterinaria, Vol. 4. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1987: 225–255.

7.- Martell DM, Aguirre BF, Soto L, González MM. Comments on pseudorabies or Aujeszky's disease outbreaks in Mexico. Proc. of the 4th IPVS congress. Ames, Iowa USA. 1976:G.15.

8.- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Dirección General de Salud Animal. Situación Zoonositaria Nacional de la Enfermedad de Aujeszky (en línea) 2008 Febrero (2008 Febrero 8). Disponible en: URL:http://www.senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud_animal/campanas_zoosanitarias/Campana_Nacional_contra_la_Enfermedad_de_Aujeszky.html.

9.- Carter GR, Wise DJ, Flores EF. Herpesviridae. Disponible en: URL:<http://www.ivis.org> documento A3411.0506.ES.

10.- Iglesias SG. Estudio comparativo de la virulencia de dos cepas del virus de la enfermedad de Aujeszky. *Vet Mex* 1987; 18:101-108.

11.- CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY, NOM-007-ZOO-1994, 29 de octubre de 1996.

12.- Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Ericsson A. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch Virol* 1986; 91:221-231.

13.- Stephano A, Gay G, Ramírez C. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet Rec* 1988; 122:6-10.

14.- Taylor DJ. Pig diseases. 7th ed. Suffolk UK: St Edmundsbury Press Ltd, 1999.

15.- Carreón NR, Fuentes RM, Stephano HA, Ramírez MH. Estudios preliminares del paramyxovirus del ojo azul en la república mexicana. Memorias del curso de actualización de enfermedades virales del cerdo; 1989 abril 14 y 15; México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, Grupo Roussel, SA, 1989:78-82.

16.- Fuentes RMC, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo ME, Fraire IB. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del Ojo Azul en cerdos de la República Mexicana. *Vet Mex* 1992; 23:37-39.

17.- Correa-Girón P, Pérez SJ, Martínez LA, Córdova LD. Avances de una encuesta nacional para detectar cerdos seropositivos al rubulavirus porcino mediante las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y de seroneutralización. Memorias del XXXII Congreso nacional de la Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, 1997 agosto 10 al 13; Ixtapa-Zihuatanejo, Guerrero (México): Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación de veterinarios especialistas en cerdos AC, 1997:88.

18.- Carvajal VM, Morilla GA, Diosdado VF, Rodríguez HG, Mora PM, Situación seroepidemiológica de diversos gérmenes patógenos en granjas

porcinas de un área del estado de Puebla. Memorias de la XXXV Reunión de Investigación Pecuaria en México, 1999 octubre 19-22; México, DF (México): Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos y Universidad Nacional Autónoma de México, 1999:46.

19.- Angeles MAA, Lima PG; Villagomez CJAS, Morilla GA, González VD, Velásquez SF. Seropositividad a enfermedades en cerdos de granjas tecnificadas del centro del estado de Veracruz. Memorias de la XXXVIII Reunión de Investigación Pecuaria en México, 2002 octubre 31 a noviembre 1; México, DF (México): Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos y Universidad Nacional Autónoma de México, 2002:276.

20.- Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Moreno-Lopez J, Linne T. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus: comparative analysis of paramyxovirus F proteins. *Virus Genes* 1997; 14:55-61.

21.- Svenda M, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. Analisis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res* 1997; 48:57-70.

22.- Rosales F, Correa GP, Martínez LA, Ramos RI. Presencia de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el paramyxovirus porcino LPM en sueros porcinos colectados de 1972 a 1976. Memorias de la XXIII Reunión de Investigación Pecuaria en México, 1986 noviembre 3-5; México, DF (México): Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos y Universidad Nacional Autónoma de México, 1986:161

23.- Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JI, Monath TP, Roizman B. The Family Paramyviridae. 3th edition, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996 citado por: Martínez LA, Correa GP, Zamora GJ. 2006. La enfermedad del ojo azul producida por el *Rubulavirus* porcino. Libro técnico no. 1. INIFAP. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. 46p.

24.- Svenda M, Hjertner B, Linne T, Berg M. Both the P and V proteins of the porcine rubulavirus LPMV interact with the NP protein via their respective C-terminal unique parts. *Virus Res* 2002; 128:1-8.

25.- Kirkland PD, Stephano HA. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipah Virus Infections. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. USA: Blackwell Publishing, 2006: 455-467.

26.- Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jáuregui P, Linné T, Moreno-López J. The structural proteins of a paramyxovirus (LPM).

27.- Reyes-Leyva J, Hernández-Jáuregui P, Montaña LF, Zenteno E. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (alfa 2,3) lactose-containing structures. Arch Virol 1993; 133: 195-200.

28.- Allan GM, McNeilly I, Linne T, Moreno-Lopez J, Hernandez P, Kennedy S, *et al.* A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. J Diagn Invest 1996; 413:405-413.

29.- Campos HRF, Carvajal SM. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de Ojo Azul. Memorias de XXIV Congreso Nacional de AMVEC; 1989 Julio 20-22; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 1989:62-66.

30.- Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. J Comp Path 1997; 117:237-252.

31.- Hernández JAP. The Pathogeneses of the Porcine Rubulavirus (LPMV) (doctoral theses). Uppsala Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, 2003.

32.- García GJ, Camacho MJ, Mendoza SE, Ciprian CA, González GS, Díaz RC, Stephano HA. Infección experimental con el virus de ojo azul y *Pasteurella multocida* en cerdos convencionales. Memorias del XXIII Congreso nacional de la Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, 1988 julio 20 al 24; León, Guanajuato (México): Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación de veterinarios especialistas en cerdos AC, 1988:87-89.

33.- Torres ME, Mendoza ES, Tórtora PJ, Correa GP, Lara H, Flores L *et al.* Efecto del paramyxovirus porcino en la presentación de la pleuroneumonía

contagiosa porcina producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Memorias del XXXI Congreso nacional de la Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, 1996 agosto 21 al 24; Veracruz, Veracruz (México): Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación de veterinarios especialistas en cerdos AC, 1996:65.

34.- Stephano HA, Gay GM. Efecto del virus del ojo azul en la reproducción de la cerda. Memorias del II Congreso nacional de la Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, 1984 julio 11 al 14; Mazatlán, Sinaloa (México): Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación de veterinarios especialistas en cerdos AC, 1984:83-85.

35.- Guillén AH, Barba LRJ. Estudio de un brote de una nueva enfermedad denominada síndrome de ojo azul de los porcinos. Memorias del II Congreso nacional de la Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, 1984 julio 11 al 14; Mazatlán, Sinaloa (México): Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación de veterinarios especialistas en cerdos AC, 1984:100-101.

36.- Stephano HA, Fuentes RM, Hernández JP, Herradora LMA, Carreón NR. Encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos destetados inoculados experimentalmente con paramyxovirus del ojo azul. Memorias del XXIII Congreso nacional de la Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, 1988 julio 20 al 24; León, Guanajuato (México): Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación de veterinarios especialistas en cerdos AC, 1988:90-92.

37.- Stephano A, Cordova J. Production parameters affected by blue eye disease in swine herds in Central Mexico. Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society 1992 Aug 17-20; The Hague, Netherlands. The Hague; 1992:135.

38.- Gay GM. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de ojo azul. Memorias del curso de actualización de enfermedades virales del cerdo; 1989 abril 14 y 15; México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, Asociación mexicana de veterinarios especialistas en cerdos, AC, Grupo Roussel, SA, 1989:83-84.

39.- McNeilly G, Wlaker I, Allan GM, Foster JC, Linné T, Merza M, *et al.* A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 3-9

40.- Ojeda ZP, Diosdado VF, González VD, Campomanes CA, Hernández-Jáuregui P, Mercado PM, *et al.* Estudio comparativo de tres pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad del ojo azul. *Memorias de la XXXIV Reunión de Investigación Pecuaria en México, 1998 octubre 27-31; México, DF (México): Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos y Universidad Nacional Autónoma de México, 1998:216.*

41.- Schaller O, editor. *Nomenclatura anatómica veterinaria ilustrada.* Zaragoza: Acribia, 1992.

42.- Schunemann HA, Constantino CF: *Técnica de necropsia en animales domésticos.* 2ª. Edición. México: El Manual Moderno SA de CV., 2002.

43.- Valero EG, Morales AF. *Histopatología.* En Valero G, editor. *Diagnóstico Veterinario 2ª. Edición.* Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, AC. 1997.

44.- Burleson FG, Chambers TM, Wieldbrauk DL. *Virology. A Laboratory Manual.* San Diego CA USA: Academic Press Inc, 1992.

45.- Rowe ChA, Romero CH. *Manual de técnicas de diagnóstico virológico.* Santiago de Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1991.

46.- Carreón, NR, Rodríguez TJ, Martínez RO, Ramírez MH, Mercado GC. *Correlación entre las técnicas de inhibición de la hemoaglutinación y microsueroneutralización para el diagnóstico serológico del Rubulavirus de la enfermedad de Ojo Azul.* *Memorias del XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos, AC, 1996, Veracruz México.* 1996:59.

47.- Ramírez Mendoza H, Carreón Nápoles R, Mercado García C, Rodríguez Torres J. *Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del*

paramyxovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. Vet Mex 1996; 27: 257-259.

48.- Wirahadiredja RM, Rondhuis PR. A comparative study of the neutralisation test and the indirect fluorescent antibody technique for the detection of antibodies to the virus of Aujeszky in pig sera. Tijdschr Diergeneeskd 1976 Oct 15;101(20):1125-8. (Abstrac)

49.- Kuehl RO. Diseño de Experimentos. 2ª. Ed. México DF: International Thomson Editores, S.A. de C.V., 2001.

50.- Stephano HA, Gay GM. Síndrome del ojo azul en cerdos. En: Correa GP y Morilla GA. (eds.) Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. AMVEC. México, DF, 198:1-13, citado por: Martínez LA, Correa GP, Zamora GJ. 2006. La enfermedad del ojo azul producida por el *Rubulavirus* porcino. Libro técnico no. 1. INIFAP. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. 46p.

51.- Dewey CE, Straw B. Herd examination. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. USA: Blackwell Publishing, 2006: 3-14.

52.- Shibata I, Yazawa S, Ono M, Okuda Y. Experimental dual infection of specific pathogen-free pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. J Vet Med B 2003; 50:14-19.

53.- Narita M, Ishii M. Encephalomalacic lesions in pigs dually infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. J Comp Path 2004; 131:277-284.

54.- Narita M, Ishii M. Brain lesions in pigs dually infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. J Comp Path 2006; 134:111-114.

55.- Pérez PF. Lesiones histológicas en lechones inoculados experimentalmente con el paramyxovirus del ojo azul (tesis de licenciatura). México DF. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1989.

56.- Stephano HA, Ramírez TC, Gay GM, Maqueda AJJ. Estudios de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemoaglutinante. Memorias del XVII

Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1981, Puerto Vallarta, México. 1981:43.

57.- Pirtle EC, Gutekunst DE. Virus isolation and immune responses in susceptible swine exposed with pseudorabies virus (Shope strain). Am J Vet Res 1978; 39:1367-1368.

58.- Diosdado F, González-Vega D, Morilla A. Serological associations between PRRS virus and other swine pathogens in México. Proc. of the 17th IPVS Congress. Ames, Iowa, USA. 2002:21.

59.- Diosdado F, Socci G, González-Vega D, Torres A, Morilla A. Serological associations between blue eye disease virus and other swine pathogens in México. Proc. of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany. 2004:436.