



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA
DEL Rubulavirus porcino EN EL ESTADO DE MÉXICO,
JALISCO, GUANAJUATO Y MICHOACÁN.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ANA CECILIA ESCOBAR LÓPEZ

Asesores:

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

Dra. María Elena Trujillo Ortega



México, D.F.

2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Porque en tu corazón encuentro toda la fe, la esperanza y el ánimo que necesito día con día. Gracias por enseñarme que con amor y devoción todo es posible. Gracias por tus bendiciones, confianza y por mostrarme la belleza de la vida a cada instante. Esto es todo tuyo, te amo Mamá.

A mis fantásticos y entrañables amigos: Edgar, Dalila, Raúl y Helí. Gracias por sus sonrisas, su afecto, compañía y por compartir conmigo momentos tan mágicos. Su sola presencia a mi lado me ha motivado para iniciar y ahora concluir este trabajo que con mucho cariño, también es de ustedes. Los amo!!

“Emancipate yourselves from mental slavery;

None but ourselves can free our minds”. Bob Marley.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Veterinaria y Zootecnia por que han definido en mí lo que es un ser humano, formándome académica y personalmente.

A mis asesores, Dr. Iván Sánchez Betancourt y Dra. María Elena Trujillo Ortega por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A la Dra. Carmen García Mercado por su apoyo ofrecido durante la elaboración de este trabajo.

Muy especialmente al Dr. Humberto Ramírez Mendoza por ser guía incondicional aportando su corazón y sus conocimientos y a José Francisco Rivera Benitez por tu confianza y apoyo constante.

A los miembros del jurado: MVZ. Jorge Raúl López Morales, MVZ. Evaristo Barragán Hernández, MVZ. Alfredo Sahagún Ruiz por sus valiosas aportaciones y comentarios en la revisión de este trabajo.

Al personal del Departamento de Producción Animal: Cerdos y del Departamento de Microbiología e Inmunología.

A mis amigos: Gabi, Elizabeth, Shanty, Adrián, Fernando, Daniel, Manolo, Lalo, Merary, Christian, Flor, Ernesto, José Manuel, Miguel, Alberto, Evelyn, Kary, Olimpia, y a todos los que han estado conmigo. Gracias.

El presente trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: CONACYT AC-90024 “Estandarización de técnicas de diagnóstico para la enfermedad del ojo azul en cerdos”. PAPIIT-IN211308 “Evaluación del Rubulavirus porcino en semen de verracos”. PAPIME-PE/202709. “Apoyo a la docencia en las prácticas de laboratorio de la materia virología y enfermedades virales de los animales domésticos de la FMVZ-UNAM”.CONACYT SSA 126709. “Epidemiología del virus de la influenza y otros virus respiratorios en granjas de producción porcina en México”.

La alumna fue becaria del proyecto PAPIME-PE/202709.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA	52

RESUMEN

ANA CECILIA ESCOBAR LÓPEZ. Determinación de la seroprevalencia del Rubulavirus porcino en el Estado de México, Guanajuato, Jalisco y Michoacán. (Bajo la supervisión de: Dr. José Iván Sánchez Betancourt y la Dra. María Elena Trujillo Ortega.

El *Rubulavirus porcino* (RVP) es el agente causal de la Enfermedad del Ojo Azul (EOA); los primeros casos fueron diagnosticados en el estado de Michoacán en 1980. La enfermedad ha sido reportada en otros estados principalmente en el Centro y Bajío de la República, donde es considerada como un padecimiento endémico de dicha zona. La presencia de anticuerpos contra la EOA ha quedado demostrada mediante estudios serológicos en al menos 16 estados de la República sin embargo, los reportes sobre la prevalencia están restringidos a una zona y a un virus de referencia, lo cual impide conocer la circulación de los diferentes aislamientos caracterizados. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos por medio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación contra tres aislamientos del RVP (PAC-4/1993, PAC-6/2001, PAC-9/2003), en 1013 sueros provenientes del Estado de México, Guanajuato, Jalisco y Michoacán obtenidos en rastros por personal de SAGARPA durante el primer semestre del año 2007. Los sueros fueron tratados para su posterior procesamiento y los aislamientos virales fueron obtenidos a través de cultivo celular. Se analizaron 222 muestras provenientes de 20 municipios del Estado de México, el porcentaje de seroprevalencia para PAC-4, PAC-6 y PAC-9 fue de 10.3, 8.5 y 9.0% respectivamente. Mientras que 232 muestras provenientes de 8 municipios de Guanajuato alcanzaron porcentajes de seropositividad de 23.7, 13.3 y 11.6% para PAC-4, PAC-6 y PAC-9, respectivamente; en

el estado de Jalisco de 320 muestras, provenientes de 9 municipios, el porcentaje de sueros positivos fue de 16.5, 35.9 y 23.3% respectivamente y para el estado de Michoacán en 228 sueros provenientes de 3 municipios, se obtuvieron porcentajes de seroprevalencia de 13.1, 13.9 y 21%. Las correlaciones entre los aislamientos revelaron una fuerte asociación entre PAC-6 y PAC-9. El análisis estadístico de los datos indica que, existen diferencias en el comportamiento promedio de los títulos por aislamiento viral en los cuatro estados, y la seropositividad no depende del origen geográfico de las muestras. Por lo tanto, se concluye que el Centro y Bajío de la República mantienen la infección por RVP, posiblemente asociado a factores como la alta densidad de unidades de producción y población porcina, siendo el estado de Jalisco el de mayor prevalencia seguido de Guanajuato, Michoacán y Estado de México.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes históricos

La enfermedad del ojo azul (EOA) es un padecimiento de origen viral que fue detectado por primera vez en el municipio de La Piedad, Michoacán en 1980. El agente causal fue reconocido por poseer características similares a los miembros de la familia *Paramyxoviridae* y fue llamado virus La Piedad Michoacán (LPMV). Inicialmente fue asociado con un brote de encefalitis y opacidad corneal en lechones y fallas reproductivas en animales adultos. Los signos clínicos iniciales observados incluían, incoordinación motora, hiperexcitabilidad, postración, movimientos de carrera o pedaleo y opacidad corneal, presentando un 90% de mortalidad de los animales infectados, una semana después de haberse presentado el cuadro clínico. La caracterización del virus aislado de un lechón con meningoencefalitis, permitió definir la etiología de la enfermedad, se confirmó que se trataba de un virus envuelto con genoma de ARN que poseía actividad hemaglutinante, hemolítica y formadora de sincitios.¹

La EOA fue reproducida en lechones inoculados con un virus aislado en 1981, denominado paramixovirus del ojo azul (POA), el cual producía efecto citopático con formación de sincitios en células de la línea PK-15 y con actividad hemaglutinante. Los hallazgos histopatológicos consistieron en meningoencefalitis no supurativa y neumonía intersticial.

2,3

En 1990, Sundqvist *et al.*, identificaron las proteínas estructurales del virión: hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), de matriz (M), nucleoproteína

(NP), la fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular (L).⁴ Posteriormente, en 1992 se obtuvieron las secuencias de los genes que codifican las proteínas M y F⁵, L⁶, P⁷, F⁸, dichos estudios permitieron concluir que el LPMV está estrechamente relacionado con el virus de la parotiditis humana y el virus símico-5, por lo cual fue clasificado en el género *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*.^{9, 10}

En 1992, se detectaron anticuerpos contra la enfermedad en 16 estados de la República Mexicana,¹¹ posteriormente se presentaron brotes en los estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Distrito Federal y Querétaro,¹² manteniéndose como un padecimiento endémico, principalmente en la zona del Bajío y Centro de México.

Agente etiológico

La clasificación taxonómica del agente causal de la EOA es la siguiente, orden: *Mononegavirales*, familia: *Paramyxoviridae*, subfamilia: *Paramyxovirinae*, género: *Rubulavirus*, especie: *Rubulavirus porcino* (RVP).^{9, 10} Los miembros de la familia *Paramyxoviridae* se presentan en el cuadro 1.

Los Paramixovirus, son virus envueltos con una cadena sencilla de ARN en sentido negativo y conforman una familia de virus que producen infecciones neurológicas y sistémicas como el virus del sarampión, del moquillo canino, de la enfermedad de Newcastle y de la parotiditis humana.^{13, 14}

Cuadro 1. Especies de la familia *Paramyxoviridae*.^{9, 10, 15, 16}

Subfamilia	Género	Especie
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Avulavirus</i>	<i>Paramyxovirus aviar 2 a 9</i>
		<i>Virus de la enfermedad de Newcastle</i>
	<i>Henipavirus</i>	<i>Hendra Virus</i> <i>Nipah Virus</i>
	<i>Morbillivirus</i>	<i>Virus del moquillo canino</i>
		<i>Morbillivirus de los cetáceos</i>
		<i>Morbillivirus de los delfines</i>
		<i>Virus del sarampión</i>
		<i>Virus de la peste de los pequeños rumiantes</i>
		<i>Virus del moquillo de las focas</i> <i>Virus de la peste bovina</i>
	<i>Respirovirus</i>	<i>Virus de la parainfluenza bovina 3</i>
<i>Virus de la parainfluenza humana 1 -3</i>		
<i>Virus Sendai</i>		
<i>Virus símico 10</i>		
<i>Rubulavirus</i>	<i>Virus de la parainfluenza humana 2- 4</i>	
	<i>Virus Mapuera</i>	
	<i>Virus de la parotiditis humana</i>	
	<i>Rubulavirus porcino</i>	
	<i>Virus de la parainfluenza de los simios 41</i>	
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	<i>Virus respiratorio sincitial bovino</i>
		<i>Virus respiratorio sincitial humano</i>
		<i>Virus de la neumonía del ratón</i>
	<i>Metapneumovirus humano</i>	
<i>Metapneumovirus</i>	<i>Metapneumovirus aviar</i>	

El virión de forma tridimensional, generalmente esférico mide de 100 a 360 nm de diámetro y posee una membrana lipoprotéica proveniente de la célula huésped, presenta prolongaciones de 8-12 nm que corresponden a las glicoproteínas transmembranales HN y

F, responsables de la actividad hemaglutinante, hemolítica, neuraminidasa y formadora de sincitios.^{1,17}

La nucleocápside de forma helicoidal mide 1000-1630 nm de longitud y 20 nm de diámetro. El genoma del RVP contenido en una molécula de ARN de cadena sencilla de 15,180 nt de longitud con polaridad negativa no segmentada. El virus posee seis genes que codifican 10 proteínas, con funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas.^{1, 18, 19, 20}

La glicoproteína transmembranal HN está constituida por 576 aminoácidos con un peso molecular de 66 kDa,^{1, 4, 20, 21} tiene la función de unirse a los receptores que participan en el proceso de adhesión en las células blanco, debido al reconocimiento específico de los residuos de ácido N-acetilneuramínico unidos por enlaces glicosídicos alfa 2-3 a galactosa (NeuAc α -2,3Gal). El NeuAc α -2,3Gal es un oligosacárido determinante de la susceptibilidad y el tropismo tisular a la infección por el RVP su expresión se presenta en mayor proporción en tejidos del SNC en cerdos neonatos y en el tracto reproductor en cerdos adultos.^{17, 22, 23, 24}

La HN presenta actividad hemaglutinante y neuraminidasa, posee dos dominios funcionales, uno con capacidad para aglutinar eritrocitos y otro que se encarga de la eliminación de grupos de ácido siálico.¹⁸ Aglutina eritrocitos de una gran variedad de especies animales incluyendo cerdo, carnero, vaca, perro, conejo, ratón, rata, hámster, cobayo, pollo y humano tipos A, B y O debido al reconocimiento específico del ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3Gal) expresado en las superficies de todos estos eritrocitos.^{1, 3, 25, 26}

La actividad neuraminidasa o sialidasa de la HN permite hidrolizar los residuos de ácido siálico de los receptores celulares, se ha considerado la posibilidad que esta actividad sea un factor de virulencia.¹⁸

Esta proteína es considerada la inmunodominante en la infección por RVP.²⁷ Estudios recientes han reportado cambios en la secuencia de nucleótidos del gen codificante para la HN, lo cual aporta virulencia y manifestaciones clínicas diferentes para cada aislamiento.²⁸

La nucleoproteína (NP) forma parte integral de la nucleocápside, está constituida por 576 aminoácidos su peso molecular es de 68 kDa. Durante los procesos de replicación y transcripción, cada molécula de la NP se encuentra unida a seis nucleótidos con alta afinidad que impide que el genoma del RVP se encuentre desnudo dentro de la célula huésped, esto constituye un mecanismo de protección al ARN viral para no ser degradado en la célula.^{4, 18, 29}

La proteína P, formada por 404 aminoácidos, tiene un peso molecular de 52 kDa; forma un complejo con la proteína L, con actividad polimerasa responsable de la transcripción y replicación del genoma viral.^{4, 7, 18, 20, 30}

La proteína L es la más grande del virión está constituida por 2251 aminoácidos y un peso molecular de 200 kDa, funciona como el componente catalítico de la ARN polimerasa, participa en los procesos de iniciación, elongación, metilación, edición y poliadenilación; es fundamental en la síntesis de ARN genómico y mensajero para poder transcribir y replicar

partículas virales sin necesidad de ingresar al núcleo celular, ya que dichos eventos ocurren en el citoplasma.^{4, 6, 18, 20}

La proteína de matriz (M) está constituida por 369 aminoácidos, con un peso molecular de 41.7 kDa, se localiza en la parte interna de la envoltura viral, participa en el mantenimiento de la estructura del virión y en el ensamblaje de nuevos viriones.^{4, 5, 7, 13, 18, 20}

La proteína de fusión (F) tiene una longitud de 541 aminoácidos y un peso molecular de 59 kDa; es una glicoproteína transmembranal que participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo que permite que el virus que se propague sin exponerse al medio extracelular; origina la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios) apreciables en tejidos y en cultivos celulares.^{4, 8, 13, 18, 31}

Las proteínas no estructurales se sintetizan a partir del gen P; el cual puede dar origen a cuatro productos, V de 249 aa, y 26.1 kDa, I de 174 aa y 18.1 kDa; P de 404 aa, y 42. kDa; y C de 126 aa y 14.7 kDa. Las proteínas V, I y C participan en los procesos de regulación de la transcripción y en la evasión de la respuesta antiviral.^{1, 4, 8, 18, 20}

Características biológicas

El virus pierde infectividad con solventes de lípidos como éter y cloroformo, formalina y β -propiolactona, se inactiva a 56° C después de 4 horas y la actividad hemaglutinante se pierde entre las 48 y 60 horas a 56° C.^{3, 19}

El RVP ha sido multiplicado en una gran variedad de líneas celulares como PK-15, Vero, MDBK, ST, Pt, BT, Bt, BHK-21, GMK, CK, BEK y en cultivos primario de riñón de gato, embrión bovino, dermis equina, células fetales humanas, plexo coroideo porcino, plexo coroideo bovino y de pulmón de visón, causando efecto citopático en todas ellas, puede ser replicado también en embrión de pollo.^{1, 3, 19}

Patogenia

El RVP se transmite por contacto directo, por la aspiración de microgotas contaminadas con el virus de animales portadores, eliminado mediante descargas nasales.^{7, 11, 32} La forma de transmisión del RVP ocurre de manera horizontal, de animales infectados a animales susceptibles y también existe evidencia de infección vertical, ya que el virus tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria.^{33, 34, 35}

La vía de entrada natural del RVP es la cavidad oronasal, cuando la gota que contiene al virus es muy grande, se mantiene en la mucosa nasofaríngea de los cornetes nasales y tonsilas donde el virus comienza a replicarse; cuando la gota es muy pequeña, ingresa con la aspiración y se aloja en los conductos aéreos anteriores donde se replica abundantemente y se disemina por vía sanguínea a todo el organismo.^{17, 18, 36, 37, 38}

El virus ingresa al SNC a través de las terminaciones nerviosas de la porción olfatoria de la mucosa nasal, ascendiendo por los lóbulos olfatorios y el hipocampo, posteriormente se disemina al tallo cerebral y cerebelo.^{17, 18, 36, 38}

La infección sistémica comienza cuando el virus se disemina por vía sanguínea, asociado a eritrocitos y monocitos, alcanzando sitios inmunoprivilegiados, como órganos linfáticos y reproductores, donde se replica. El RVP ha sido detectado inmunológicamente en eritrocitos en animales infectados experimentalmente desde el cuarto día y hasta el doceavo día posinfección (pi) y en el citoplasma de los leucocitos desde el desde los ocho hasta los 20 días pi.³⁸

Experimentalmente se ha producido la infección al inocular el RVP por vía intranasal, intratraqueal, intraocular, intracraneal, intraperitoneal e intramuscular.^{1, 3, 27, 36, 38, 39, 40}

La distribución del RVP varía con la edad de los cerdos infectados. En neonatos el sitio de mayor replicación viral es el SNC (bulbo olfatorio, corteza del lóbulo piriforme, hipocampo, tálamo, tallo cerebral y cerebelo) y tejidos del tracto respiratorio; en cerdos destetados, la infección se presenta principalmente en el tracto respiratorio y en SNC.^{1, 3, 41} En cerdos machos adultos el virus se replica principalmente en tejidos del sistema respiratorio y del tracto reproductor (testículo y epidídimo).^{24, 39, 42} En cerdas gestantes infectadas experimentalmente, se aisló el RVP principalmente en tracto respiratorio, tonsila y ovarios.³⁴

Las diferencias entre la distribución tisular del RVP, están determinadas por la expresión de receptores celulares, en este caso específicamente del ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3Gal), el cual está presente de manera abundante en tejidos de cerdos neonatos en el sistema nervioso, respiratorio y linfático y en machos adultos en el sistema respiratorio y reproductor.^{17, 24, 36, 39}

De acuerdo al análisis de los cuadros clínicos producidos por los diferentes aislamientos del RVP se han definido tres grupos de virus, el primero constituido por LPMV, POA y POA-2 produciendo manifestaciones nerviosas principalmente en lechones; el segundo grupo formado por los aislamientos PAC-1, PAC-4 y PAC-5, con cuadros neurológicos, alta mortalidad en lechones y falla reproductiva en adultos; y el tercer grupo, formado por PAC-2 y PAC-3 presentando falla reproductiva en adultos y cuadros nerviosos ocasionales en lechones.¹⁷

Los estudios que reportaron cambios en la virulencia de cuatro aislamientos (PAC-6, PAC-7, PAC-8, PAC-9)²⁹ permitieron dividir nuevamente al RVP en tres subgrupos: el grupo uno formado por el LPMV y PAC-4; el grupo dos que incluye a PAC-2, PAC-3 y CI-IV, y un tercer grupo formado por los aislamientos PAC-6, PAC-7, PAC-8 y PAC-9. Dichos cambios fueron resultado de alteraciones en la secuencia de aminoácidos del gen codificante para la proteína HN, lo cual confiere virulencia y cuadros clínicos con manifestaciones nerviosas en animales adultos y de la línea de engorda.

Respuesta inmune humoral

La presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se ha reportado desde el noveno y décimo día pi, con títulos de $4.6 \log_2$ y la máxima producción se ha observado entre la sexta y novena semana pi con $7.6 \log_2$.^{43, 44} En estudios que han evaluado la presencia de anticuerpos durante infecciones experimentales prolongadas, se han detectado

anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación desde la primera semana pi con un título de $2.85 \log_2$, los cuales alcanzan su pico a la novena semana con $5.0 \log_2$ y se mantienen constantes hasta por diecinueve semanas.⁴⁵ Los anticuerpos generados están dirigidos contra las proteínas HN, NP y M.²⁷

Respuesta inmune celular

Al inicio de la infección se ha detectado la proliferación principalmente linfocitos T; para la tercera semana pi disminuyen los linfocitos con fenotipo CD4+CD8- debido al reclutamiento de éstos en los órganos blanco infectados para participar en el control de la infección. La respuesta de memoria se caracteriza por la proliferación de linfocitos T CD4+CD8+ con un perfil de citocinas donde predomina IL-10.^{27, 43, 46, 47}

Epidemiología

La EOA se ha presentado en México desde 1980, principalmente en el Centro y Bajío del país, los primeros brotes de la enfermedad fueron reportados en áreas con alta densidad de población porcina del estado de Michoacán en 1980, posteriormente se diseminó a los estados de Querétaro, Estado de México y Distrito Federal, debido a la intensa movilización de cerdos, estudios serológicos, han evidenciado la presencia de anticuerpos contra el RVP en cerdos reproductores y en animales menores de 45 días de edad en 16 estados de la República.^{11, 48} Algunos autores han concluido que la enfermedad es endémica y que afecta principalmente a los cerdos de la zona central del país.^{12, 49}

En un estudio serológico a nivel nacional llevado a cabo de 1999 a 2000 se encontró un 16% ($n = 27,733$ sueros) de sueros con anticuerpos contra la EOA en 10 de 19 estados de la República muestreados; los casos positivos se situaron principalmente en estados con alta densidad y movilización de porcinos; como Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo y Querétaro.¹² Sin embargo, en estudios retrospectivos se reportó un 16% de seropositividad contra la EOA en muestras colectadas de cerdos en el Estado de México durante los años 1972 y 1980.⁵⁰

Actualmente, la enfermedad se ha establecido y se reporta ocasionalmente en los estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Distrito Federal y Querétaro.^{12, 19}

En condiciones naturales el cerdo es el único animal afectado clínicamente por el RVP. Experimentalmente el virus afecta a embriones de pollo, ratas de la cepa Wistar y ratones; se han inoculado de forma experimental conejos, perros y gatos, sin presentar signos clínicos.^{1, 3, 51, 52, 53}

El RVP se transmite comúnmente por contacto directo entre cerdos infectados y cerdos susceptibles. Es posible que la enfermedad se transmita a través de aerosoles, personas, vehículos, equipo contaminado, aves y viento.¹⁹

El virus se excreta a través de secreciones nasales, orina y heces; los machos infectados experimentalmente excretan el RVP en semen, sin embargo, aun no ha sido demostrada la transmisión venérea.^{19, 36, 44, 54, 55}

Signos clínicos

La manifestación de signos clínicos durante la infección por RVP depende de la edad de los cerdos afectados. En lechones, los signos clínicos comprenden alteraciones del SNC y alta mortalidad; en los animales adultos generalmente se observan alteraciones reproductivas, la opacidad corneal es una manifestación esporádica.¹⁹

Los lechones de 2 a 15 días de edad son más susceptibles a la infección por el RVP, los signos se presentan súbitamente, se observa postración, animales deprimidos o con problemas nerviosos. Los primeros signos son fiebre, pelo erizado y lomo arqueado, acompañado por constipación o diarreas ocasionales. Posteriormente, los animales muestran alteraciones nerviosas progresivas como incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, temblores musculares, posturas y marchas anormales. Se pueden observar movimientos involuntarios, letargia y algunos animales presentan conjuntivitis, ceguera aparente, nistagmo, lagrimeo y exudado en párpados, en promedio 10% de los cerdos afectados presentan opacidad corneal.^{3, 19}

En cerdos de más de 30 días, los signos se presentan ocasionalmente, la mortalidad es del 4%, la opacidad de la cornea puede estar presente o no. En cerdos de 15 a 45 kg se han observado cuadros nerviosos donde la mortalidad fue de 20%. La muerte se presenta 48 horas posterior a la aparición de los signos, aunque en algunos casos puede presentarse hasta 4 a 6 días después.^{3, 19}

El cuadro clínico en cerdas se manifiesta por falla reproductiva donde los parámetros productivos afectados muestran un aumento en la tasa de repeticiones, incremento en el intervalo de días destete-primer servicio y como consecuencia aumento en los días no productivos; se ha identificado también aumento en la tasa de mortinatos (2 a 24%) y fetos momificados (1 a 5%), así como abortos ocasionales durante brotes agudos; los signos nerviosos se manifiestan en un 10% de las cerdas afectadas, recientemente se ha reportado que la mortalidad puede alcanzar más de 15% .^{3, 28, 56}

El porcentaje de camadas afectadas durante el brote oscila entre el 20 y 65%, en los lechones afectados la morbilidad varía de 20 a 50% y la mortalidad puede alcanzar un 87 a 99%; en brotes de la EOA del año 2000 al 2003, se ha reportado una la mortalidad del 30%.
3, 19, 28, 57

Los machos adultos pueden presentar anorexia y opacidad corneal, la falla reproductiva es evidente, ya que se afecta severamente la calidad del semen, la concentración espermática disminuye, las anormalidades espermáticas aumentan y el eyaculado pierde viabilidad. Se han reportado porcentajes de infertilidad de 29 a 73%. Puede presentarse inflamación y edema testicular, que progresa a atrofia, orquitis y epididimitis.^{3, 39, 42, 54, 57}

Lesiones

Las alteraciones macroscópicas ocasionadas por el RVP son escasas y ocasionalmente ausentes. Se aprecia conjuntivitis y diferentes grados de opacidad corneal, principalmente en lechones menores de 30 días de edad. En los sementales provoca inflamación de los

testículos y del epidídimo, observándose en estadios avanzados una marcada epididimitis y orquitis.^{57, 58}

Con frecuencia se observa congestión meníngea con aumento variable del volumen del líquido cerebroespinal y neumonía apreciable en los bordes ventrales de los lóbulos craneales con extensión del 1 a 5% del parénquima.³

Las principales lesiones microscópicas se localizan en el SNC; ya sea en cerebro o médula espinal, donde se puede observar encefalitis no supurativa que afecta la materia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral, incluyendo una gliosis difusa y multifocal, infiltración perivascular de linfocitos, células plasmáticas y reticulares, necrosis neuronal, neurofagia, meningitis y coroiditis. En los pulmones se observan áreas multifocales de neumonía intersticial, cuya característica es la infiltración de células mononucleares en la pared alveolar.^{3, 51, 59}

En adultos se observan lesiones histológicas en el epidídimo como granulomas espermáticos y degeneración vacuolar del epitelio. En las hembras se ha observado hemorragia y congestión en endometrio y placenta.^{34, 39}

Diagnóstico

El diagnóstico de la EOA se realiza por medio de pruebas que detectan la presencia del virus, tales como el aislamiento viral en cultivo celular (AV) evidenciado por la hemaglutinación (HA) e inmunofluorescencia (IF) directa e indirecta, la reacción en cadena

de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT- PCR) y RT-PCR anidada, han sido empleadas para detectar el material genético del virus en tejidos, suero y semen.^{26, 36, 41, 47, 55, 60, 61}

Dentro de las pruebas que detectan anticuerpos la más utilizada es la inhibición de la hemaglutinación (IHA), sin embargo también se utilizan la seroneutralización (SN), ELISA e inmunoperoxidasa (IP).^{26, 45, 63}

La prueba de IHA se basa en la propiedad hemaglutinante del virus, característica de la glicoproteína expresada en la membrana del virus hemaglutinina-neuraminidasa (HN) que posee dos dominios funcionales, uno con capacidad para aglutinar eritrocitos debido a la presencia de receptores en las membranas de éstos, específicamente el ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3Gal) y el otro dominio con actividad neuraminidasa cuya función consiste en la eliminación de grupos de ácido siálico.¹⁸

La prueba de IHA es el método más utilizado para la detección de anticuerpos contra el RVP, debido a que es sencilla, de bajo costo y no requiere equipo especializado.^{26, 63} La presencia de inhibidores inespecíficos de origen proteico en algunos sueros puede constituir una desventaja para la prueba, para ello se han implementado métodos para reducir su efecto, como el tratamiento con heparina y MgCl₂,^{41, 61} el tratamiento con caolín, inactivación a 56° C durante 30 minutos, y la adsorción con eritrocitos de bovino al 5% .^{26,}

43, 64

Estudios que han evaluado las variables de la prueba de IHA sugieren el uso del antígeno ajustado a ocho unidades hemaglutinantes (UHA) proveniente de cultivos celulares con

temperaturas de incubación de 25° C. Los autores que han estudiado las variables que afectan la prueba han concluido que las reacciones de hemaglutinación con eritrocitos de bovino, aunque presentan títulos inferiores comparados con los obtenidos con eritrocitos de ave, suelen ser más estables pues el fenómeno se conserva durante 24 horas entre 4 y 25° C, aunque presentan títulos inferiores comparados con los obtenidos con eritrocitos de ave, los autores también concluyen que este tipo de eritrocitos son los indicados cuando se utiliza un antígeno producido a partir de cultivo celular, siendo 0.5% la concentración adecuada.^{26,}

43

Algunos estudios han reportado que la IHA tiene una sensibilidad de 84.7% comparado con las pruebas de ELISA indirecto y seroneutralización (SN), mismas que alcanzaron un 89.1% para ambas. En animales inmunizados con una vacuna experimental, se han encontrado valores de sensibilidad para la IHA de hasta 98.9% comparado con 91.5% de sensibilidad de ELISA.⁶⁵

En un estudio realizado por González-Vega *et al.* (2002), se evaluó el desempeño de las pruebas serológicas, a partir de 495 sueros provenientes de 5 granjas de áreas afectadas, se pudieron determinar los valores de de sensibilidad y especificidad para tres pruebas serológicas,⁶⁶ los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Comparación de los valores de sensibilidad y especificidad entre las pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico del RVP.

ELISA		
	Sensibilidad	Especificidad
IHA	76.0*	83.4
IP	68.4	96.5
IP		
IHA	66.2	92.7

*Expresado en porcentaje.

La prueba de IHA también es útil como prueba de piara debido a su alta especificidad, misma que en estudios comparativos con otras técnicas (SN, ELISA) ha demostrado ser del 100%.⁶⁵ La prueba es utilizada para detectar anticuerpos específicos de la clase IgG e IgM en suero, de la misma forma se considera útil para identificar aislamientos y patrones de circulación viral en una población durante un período de tiempo.^{65, 66, 67}

En 1997 se desarrolló un ELISA indirecto la cual mostró baja especificidad debido a las reacciones inespecíficas asociadas al conjugado, así como dificultades para reproducir los resultados,⁶⁸ razón por la cual la técnica se ha realizado de manera aislada.⁴³ Posteriormente fue desarrollado un ELISA de bloqueo a partir de un anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína HN, obteniendo mayor sensibilidad y especificidad.⁶²

Prevención y control

La prevención y control de la EOA en cerdos infectados se basa en acciones que mantengan la bioseguridad de las explotaciones, además de monitoreos serológicos, los cuales son una herramienta indispensable para el control adecuado de la enfermedad.¹⁹

La inmunización en los primeros brotes de la EOA se desarrollaron empleando autovacunas, las cuales eran preparadas a partir de encéfalos de cerdos infectados e inactivadas con formalina, la efectividad de estas primeras vacunas no fue evaluada. Posteriormente se desarrollaron dos vacunas comerciales con virus inactivado elaborado en cultivo celular. En estudios recientes se ha evaluado su eficacia y se ha descrito una respuesta variable entre cada vacuna evaluada.⁶⁹

De manera experimental se ha desarrollado una vacuna oleosa inactivada con rayos gamma, que ha demostrado ser segura y más antigénica que las vacunas comerciales; aunque ofrece protección variable que depende de la edad de los animales. Se ha probado en lechones desafiándolos con el RVP y el 100% de los vacunados sobrevivieron, también fue probada durante un brote, controlando los cuadros clínicos y la mortalidad seis a ocho días después de la vacunación, respectivamente.^{63,70}

JUSTIFICACIÓN

La EOA ha permanecido en el Centro y Bajío como un padecimiento endémico que ocasiona pérdidas económicas importantes al sector porcícola. El monitoreo serológico constituye una herramienta indispensable para el control y erradicación de la enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico serológico por inhibición de la hemaglutinación se ha realizado de manera convencional con dos aislamientos del RVP, por lo cual se desconoce la prevalencia hacia otros aislamientos.

HIPÓTESIS

La prevalencia de anticuerpos hacia el *Rubulavirus porcino* será similar a los reportes realizados previamente, sin embargo se podrá determinar mayor distribución de muestras positivas dependiendo del origen de los aislamientos de cada estado. Por lo tanto, en el estado de Michoacán se obtendrán mayor cantidad de muestras para el aislamiento PAC-4 y para Jalisco PAC-6 y PAC-9, siendo en Guanajuato y el Estado de México la distribución variable.

OBJETIVO

Determinar la seroprevalencia de los aislamientos del *Rubulavirus porcino* PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en el Estado de México, Guanajuato, Jalisco y Michoacán.

MATERIAL Y METODOS

Muestras

Se emplearon 1013 sueros provenientes de cerdos sin vacunar contra la EOA mayores a 150 días de edad, los cuales fueron obtenidos en diferentes rastros tipo inspección federal (TIF) por personal de SAGARPA, durante el primer semestre del año 2007. Las muestras de suero se colectaron antes del sacrificio de los animales. Los cerdos provenían de 10 municipios del estado de Jalisco, tres municipios del estado de Michoacán, ocho municipios del estado de Guanajuato y 20 municipios del Estado de México.

Los sueros fueron identificados y organizados para su posterior procesamiento mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA).

Células y virus

Se utilizaron los aislamientos virales PAC-4, PAC-6 y PAC-9 del RVP los cuales fueron obtenidos del Departamento de Producción Animal: Cerdos (PAC), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

El aislamiento PAC-4 (Michoacán/1993), fue obtenido de una granja de ciclo completo donde se observaron cuadros clínicos con signos nerviosos en cerdos lactantes; y ocasionalmente en cerdos destetados.¹⁷ El aislamiento PAC-6 (Jalisco/2001) fue aislado de una granja de ciclo completo en donde se presentó un cuadro clínico nervioso en lechones y en animales de engorda.²⁸ El aislamiento PAC-9 (Jalisco/2003) ocasionó signos nerviosos en lechones y adultos.²⁸

Cultivo celular

Cada uno de los aislamientos virales fue replicado en cultivos de las línea celulares PK-15 (riñón de cerdo) y VERO (riñón de mono verde africano) en botellas de cultivo de 25cm², al obtener un 80-90% de confluencia del cultivo celular se agregó por separado 1ml de PAC-4, PAC-6 y PAC-9 (8 UHA); las células se mantuvieron con D-MEM, sin suero fetal bovino, los cultivos se monitorearon diariamente hasta por 96 horas, cuando el efecto citopático se presentó en un 50% fueron congelados a -70° C. Posteriormente, fueron descongelados, se clarificaron por centrifugación (3000 rpm/10 minutos) y se titularon con eritrocitos de bovino al 0.5% y almacenados en alícuotas de 15 ml a -70° C hasta su utilización.

Procesamiento de los sueros

Con el propósito de eliminar proteínas inespecíficas inhibidoras de la hemaglutinación, se homogenizaron 100µl de suero con 50µl de caolín y 50µl de eritrocitos de bovino al 5%, se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas, posterior a la sedimentación del caolín y los eritrocitos, se extrajeron 50µl de suero para ser confrontado con cada aislamiento viral.

Inhibición de la hemaglutinación

Los sueros fueron colocados en placas de 96 pozos con fondo en U (Nunc), con 50µl de PBS, a partir del primer pozo se realizaron diluciones dobles seriadas, las cuales fueron de 1:8 hasta 1:1024. Posteriormente se agregaron 50µl de cada aislamiento (PAC-4, PAC-6, PAC-9) de manera individual, conteniendo 8 unidades hemaglutinantes (UHA) en cada

pozo; se incubó 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron 50µl de eritrocitos de bovino al 0.5% a toda la placa; la lectura fue realizada a los 60 minutos.^{26, 64}

El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se expresó como la máxima dilución en la que el suero fue capaz de inhibir la capacidad hemaglutinante del RVP. Los sueros se consideraron positivos a partir de la dilución 1:16 ($4 \log_2$). Los títulos obtenidos fueron convertidos a logaritmo base dos para su posterior análisis estadístico.^{26, 27, 43}

En cada ensayo se emplearon testigos de prueba, los cuales consistieron en:

- Suero testigo, se utilizó suero de cerdo positivo a PAC-4, PAC-6 y PAC-9 y suero de cerdo negativo.
- Virus testigo, se adicionan 50µl de virus y se diluyó de la misma forma que el suero, mediante este procedimiento se comprueba la hemaglutinación y se confirma el título de cada lote viral empleado.

Análisis estadístico

Se realizó la estadística descriptiva de los datos obtenidos en la prueba de IHA; para determinar la seroprevalencia y la seropositividad por estado, municipio y por aislamiento viral. La respuesta promedio de los títulos de anticuerpos (\log_2) por aislamiento viral fue analizada mediante análisis de la varianza para determinar si existían diferencias entre los títulos de cada aislamiento en los diferentes estados de la República. La prueba Chi cuadrada (X^2) se utilizó para realizar una prueba de independencia entre el estado de la

República y la seropositividad. Para observar el grado de relación entre los aislamientos analizados se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

De las 1013 muestras de suero analizadas el estado que presentó mayor seroprevalencia hacia el aislamiento PAC-4 fue Guanajuato con 23.7% de muestras positivas para PAC-6 y PAC-9; el estado con mayor seropositividad fue Jalisco con 36.5 y 24.3%, respectivamente y el Estado de México fue el que presentó menor porcentaje de muestras positivas para los tres aislamientos (Cuadro 3 y Figura 2).

Cuadro 3. Prevalencia y título de anticuerpos para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9.

Aislamiento	Número de muestras	Moda	Máximo	Media*	D.E.	E.E.	Positivos (No.)	Prevalencia (%)
PAC-4								
Estado de México	222	1:8	1:128	0.7	1.6	0.13	23	10.3
Guanajuato	232	1:64	1:128	1.4	2.4	0.13	55	23.7
Jalisco	320	1:32	1:128	1.2	1.9	0.11	23	16.5
Michoacán	239	1:64	1:256	1	1.9	0.13	32	13.9
PAC-6								
Estado de México	222	1:16	1:64	0.63	1.5	0.11	19	8.5
Guanajuato	232	1:16	1:64	0.54	1.4	0.11	21	9
Jalisco	320	1:32	1:512	2.46	2	0.09	117	36.5
Michoacán	239	1:16	1:128	1.21	1.8	0.11	32	13.9
PAC-9								
Estado de México	222	1:8	1:32	0.56	1.4	0.11	20	9
Guanajuato	232	1:8	1:64	0.46	1.3	0.11	15	6.4
Jalisco	320	1:8	1:128	1.76	1.9	0.09	78	24.3
Michoacán	239	1:8	1:128	1.46	1.9	0.11	48	20.9

*: Valores expresados en \log_2 . D.E.: Desviación estándar. E. E.: Error estándar.

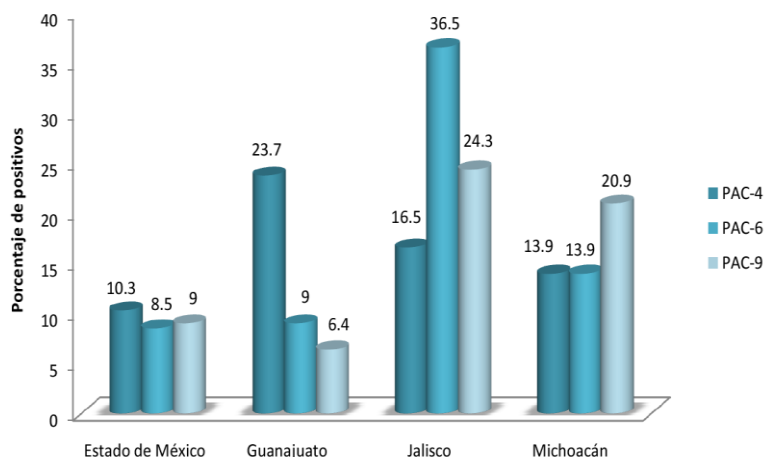


Figura 2. Prevalencia de anticuerpos para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9.

1. ESTADO DE MÉXICO

En los sueros pertenecientes al Estado de México, se observó mayor seropositividad hacia el aislamiento PAC-4 con 10.3, 8.5 y 9% para PAC-6 y PAC-9, respectivamente (Figura 3).

Las 222 muestras analizadas del Estado de México provenían de 20 municipios, Aculco, Amecameca, Capulhuac, Chalco, Chalma, Cuautitlán, Donato Guerra, Jilotepec, La Paz, Lerma, Mexicalzingo, Nezahualcóyotl, Ozumba, San Mateo Atenco, Santiago Tianguistenco, Soyaniquilpan, Texcoco, Tultitlán, Villa Victoria y Zumpango. De estos municipios 13 presentaron valores de seropositividad por lo menos hacia un aislamiento y 7 de ellos fueron negativos; Zumpango y La Paz fueron los municipios con mayor porcentaje de sueros positivos. Los resultados se muestran en el Cuadro 4 y la Figura 4.

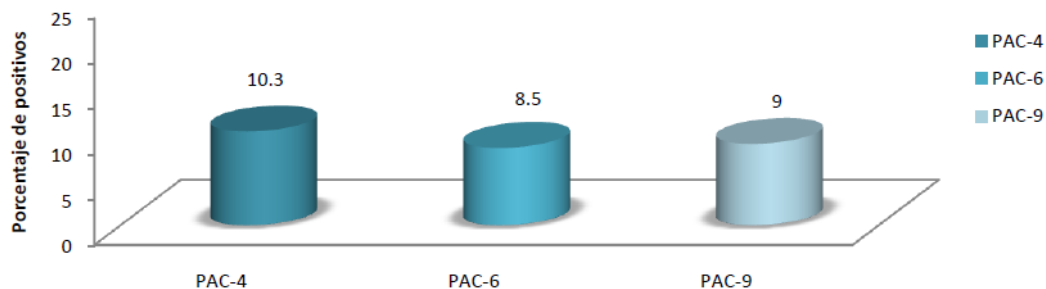


Figura 3. Porcentaje de sueros positivos para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en el Estado de México.

Cuadro 4. Porcentaje y número de sueros positivos para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en 20 municipios del Estado de México.

No. de sueros	Municipio	PAC-4	PAC-6	PAC-9
7	Aculco	0	14.2	0
20	Amecameca	0	0	0
6	Capulhuac	0	0	0
8	Chalco	0	0	0
20	Chalma	0	5	0
10	Cuautitlán	0	10	0
10	Donato Guerra	0	0	0
10	Jilotepec	0	0	0
11	La Paz	36.3	36.3	27.2
20	Lerma	20	0	10
7	Mexicalzingo	14.2	0	0
8	Nezahualcóyotl	12.5	0	0
12	Ozumba	0	0	0
9	San Mateo Atenco	33.3	22.2	0
13	Santiago Tianguistenco	7.6	7.6	0
10	Soyaniquilpan	10	0	0
10	Texcoco	0	0	0
10	Tultitlán	0	20	40
9	Villa Victoria	0	22.2	33.3
12	Zumpango	66.6	41.6	50

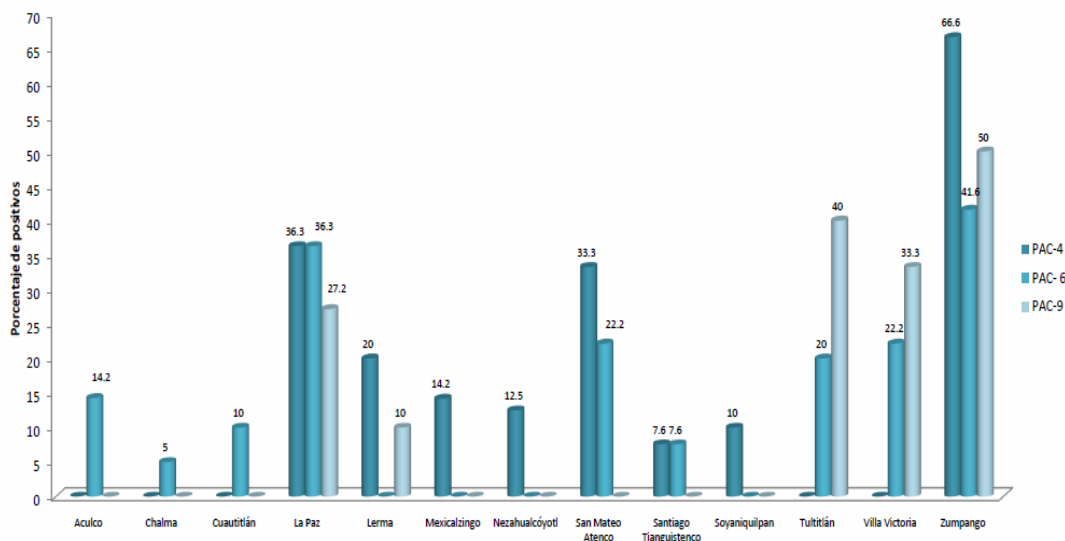


Figura 4. Seroprevalencia para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en 20 municipios del Estado de México.

La distribución de los títulos de anticuerpos en el Estado de México muestra que el más frecuente fue 1:32 para PAC-4 y PAC-9 y en menor porcentaje título de 1:64 para PAC-6. Un bajo porcentaje obtuvo título de 1:128. Los resultados se presentan en el Cuadro 5 y la Figura 5.

Cuadro 5. Títulos de anticuerpos obtenidos de cada aislamiento en el Estado de México expresados en porcentaje.

Título	PAC-4	PAC-6	PAC-9
1:16	2.7	3	4.5
1:32	5.4	2.2	4.5
1:64	1.8	3	0
1:128	0.4	0	0
1:256	0	0	0
1:512	0	0	0

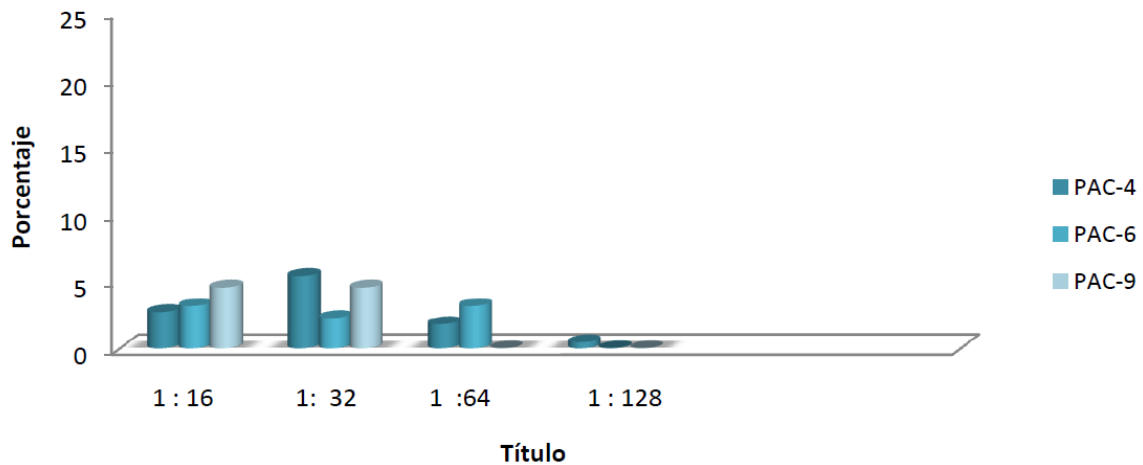


Figura 5. Frecuencia de títulos de sueros positivos del Estado de México.

2. GUANAJUATO

De las muestras provenientes del estado de Guanajuato, se obtuvieron 23.7% de positivos para PAC-4, 9% para PAC-6 y 6.4% para PAC-9 (Figura 6). Los 232 sueros analizados provenían de ocho municipios: Abasolo, Jaral, Irapuato, Pénjamo, Salamanca, Uriangato, Villagrán y Yuriria. El municipio de Abasolo fue el que presentó mayor porcentaje de sueros positivos para los tres aislamientos, seguido de Pénjamo y Yuriria, el resto de los municipios presentaron porcentajes bajos de sueros positivos para el aislamiento PAC-4 y sólo Irapuato y Uriangato fueron negativos. Los porcentajes y número de muestras positivas se muestran en el Cuadro 7 y la Figura 7.

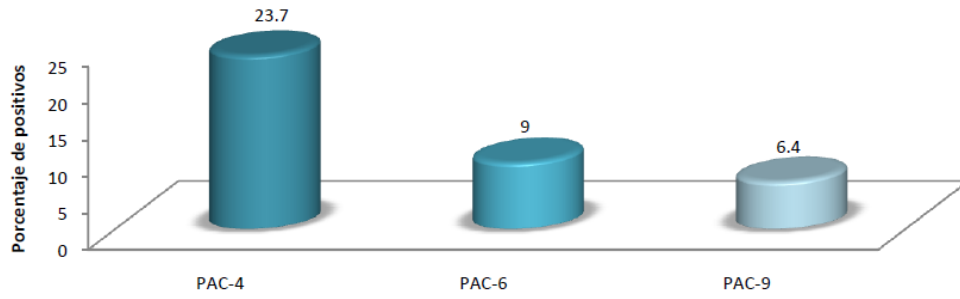


Figura 6. Seroprevalencia para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en el estado de Guanajuato

Cuadro 7. Porcentaje y número de sueros positivos para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en nueve municipios del estado de Guanajuato.

No. de sueros	Municipio	PAC-4	PAC-6	PAC-9
60	Abasolo	63.3	28.3	16.6
10	Irapuato	0	0	0
16	Jaral	6.2	0	0
41	Pénjamo	29.2	7.3	7.3
29	Salamanca	3.4	0	0
10	Uriangato	0	0	0
15	Villagrán	6.6	0	6.6
51	Yuriria	3.9	1.9	1.9

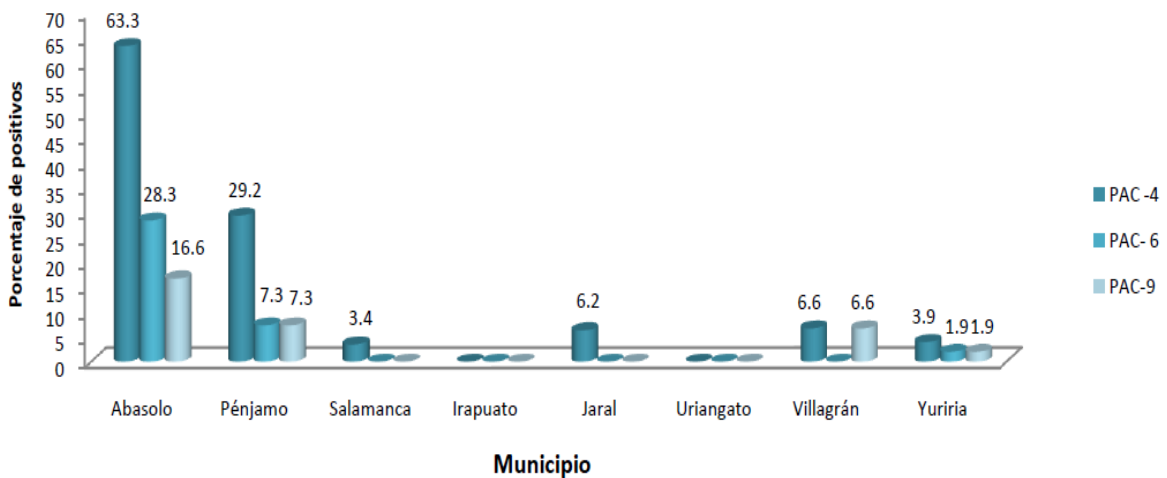


Figura 7. Seroprevalencia para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en nueve municipios del estado de Guanajuato.

En la distribución de los de títulos de sueros positivos en el estado de Guanajuato se observa que los título 1:16 y 1:32 fueron los más frecuentes para los tres aislamientos, aunque también se obtuvieron títulos de 1:64 principalmente para PAC-4 y en porcentaje más bajo para PAC-6. El título 1:128 tuvo baja frecuencia para PAC-4 y no se presentó para los aislamientos restantes. Los resultados se muestran en el Cuadro 8 y la Figura 8.

Cuadro 8. Títulos de anticuerpos obtenidos de cada aislamiento en el estado de Guanajuato expresados en porcentaje.

Título	PAC-4	PAC-6	PAC-9
1:16	4.3	4.7	3
1:32	4.3	3.4	2.5
1:64	12	0.8	0.8
1:128	3	0	0
1:256	0	0	0
1:512	0	0.3	0

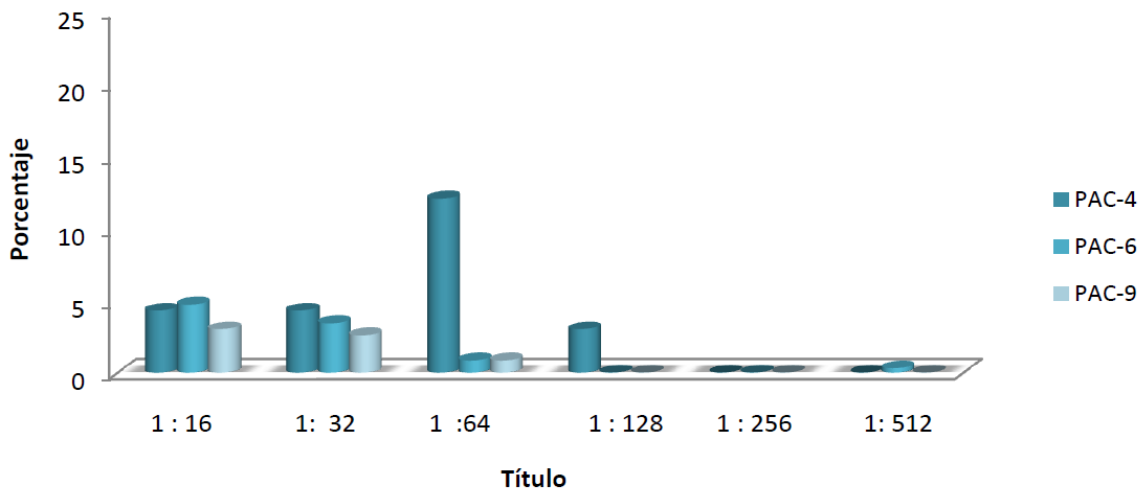


Figura 8. Frecuencia de títulos de sueros positivos del estado de Guanajuato.

3. JALISCO

Del estado de Jalisco se analizaron 320 muestras, los valores de seropositividad fueron, 16.5 para PAC-4, 36.5 y 24.3% para PAC-6 y PAC-9, respectivamente (Figura 9).

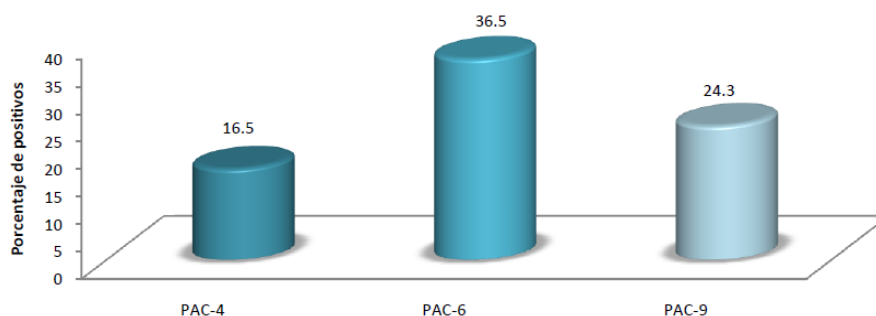


Figura 9. Seroprevalencia para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en el estado de Jalisco.

Las 320 muestras analizadas pertenecían a nueve municipios: Acatic, Atotonilco, Degollado, Jesús María, La Barca, Lagos de Moreno, San Miguel el Alto, Tepatitlán y Zapopan, los municipios que presentaron mayor porcentaje de sueros positivos fueron Tepatitlan, Lagos de moreno, Zapopan, Degollado y San Miguel el Alto; en Atotonilco y Jesús María no se encontraron sueros positivos para el aislamiento PAC-4, aunque si los hubo para los aislamientos PAC-6 y PAC-9, en Acatic y La Barca se observó menor porcentaje de sueros positivos para los tres aislamientos. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 9 y la Figura 10.

Cuadro 9. Porcentaje y número de sueros positivos para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en nueve municipios del estado de Jalisco.

No. de sueros	Municipio	PAC-4	PAC-6	PAC-9
45	Acatic	6.6	15.5	16.6
45	Atotonilco	0	33.3	11.1
41	Degollado	21.9	36.5	24.3
8	Jesús María	0	46.6	26.6
30	La Barca	13.1	5.2	5.2
33	Lagos de Moreno	23.6	52.6	52.2
45	San Miguel el Alto	17.7	40	28.8
58	Tepatitlán	35.5	57.7	42.2
15	Zapopan	20	46.6	26.6

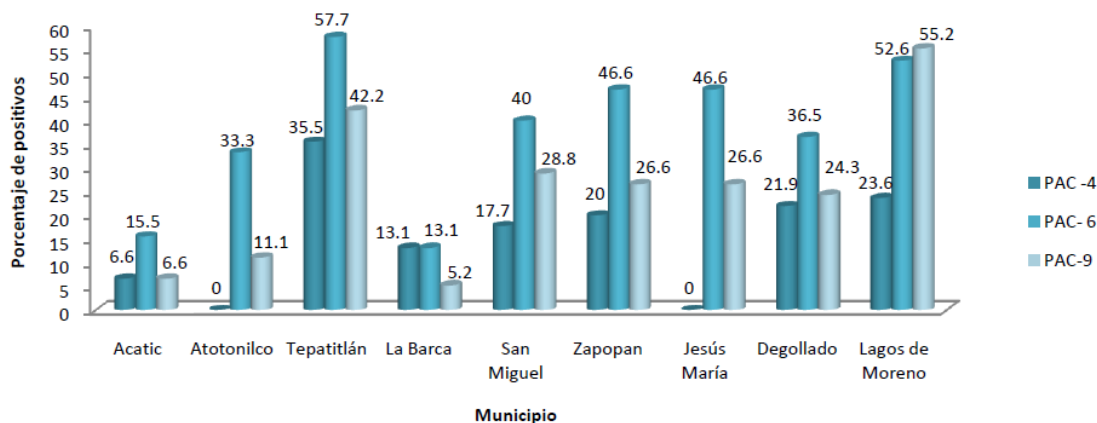


Figura 10. Seroprevalencia para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en nueve municipios del estado de Jalisco.

Los títulos más frecuentes en los sueros del estado de Jalisco fueron 1:16 y 1:32 en ambos casos principalmente para PAC-6, seguido de PAC-9 y PAC-4, respectivamente, también se alcanzaron títulos de 1:64, 1:128, para los tres aislamientos, aunque en menor porcentaje.

Los resultados se muestran en el Cuadro 10 y la Figura 11.

Cuadro 10. Títulos de anticuerpos obtenidos de cada aislamiento en el estado de Jalisco expresado en porcentaje.

Título	PAC-4	PAC-6	PAC-9
1:16	9.3	21.5	17.1
1:32	4	11.8	5
1:64	2.1	1.5	1.2
1:128	0.9	0.9	0.9
1:256	0	0.3	0
1:512	0	0.3	0

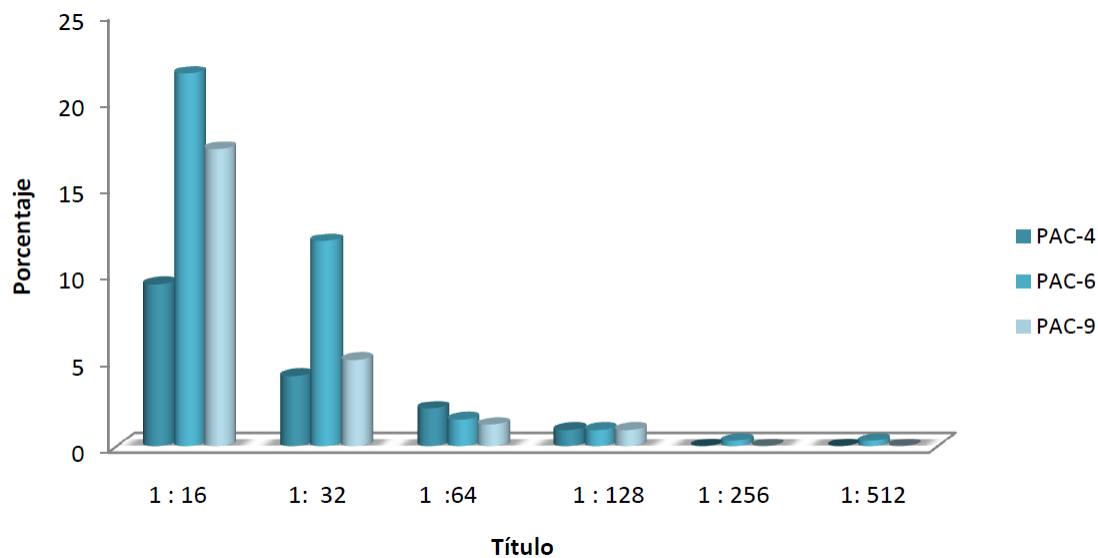


Figura 11. Distribución de los títulos de sueros positivos del estado de Jalisco.

4. MICHOACÁN

De los 229 sueros correspondientes al estado de Michoacán, 13.9% fueron positivos para los aislamientos PAC-4 y PAC-6, y 20.9% para PAC-9 (Figura 12).

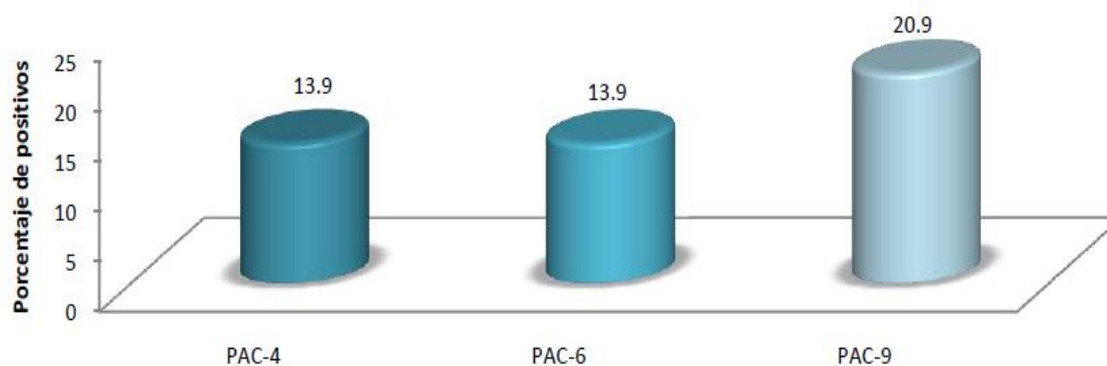


Figura 12. Seroprevalencia para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en el estado de Michoacán.

El municipio de Huandacareo fue el que obtuvo porcentajes de seropositividad más altos, seguido de La Piedad y Purúandiro. Los resultados se presentan en el Cuadro 11 y Figura 13.

Cuadro 11. Porcentaje y número de sueros positivos para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en tres municipios del estado de Michoacán.

Número de sueros	Municipio	PAC-4	PAC-6	PAC-9
70	Huandacareo	10	24.2	24.2
129	La Piedad	17.8	7.75	20.1
30	Purúandiro	6.6	16.6	16.6

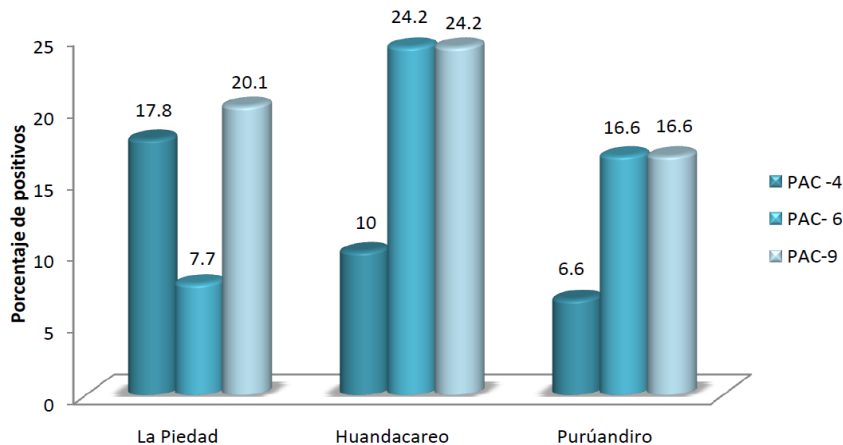


Figura 13. Seroprevalencia para los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9 en tres municipios del estado de Michoacán.

En el estado de Michoacán los títulos de anticuerpos alcanzados fueron 1:16 principalmente para PAC-9, seguido de PAC-6 y PAC-4. Con menor frecuencia se observaron títulos de 1:32 para PAC-9 y PAC-4, y en menor proporción para PAC-6. 1:64 se obtuvo con mayor frecuencia para PAC-4. Se obtuvieron bajos porcentajes de título 1:128 para los 3 aislamientos. Una pequeña proporción alcanzó títulos máximos de 1:256 y 1:512 para

PAC-4 y PAC-6, respectivamente. Los resultados se muestran en el Cuadro 12 y la Figura 14.

Cuadro 12. Títulos de anticuerpos obtenidos de cada aislamiento en el estado de Michoacán expresados en porcentaje.

Título	PAC-4	PAC-6	PAC-9
1:16	5.6	9	14.8
1:32	3	1.8	3.1
1:64	3.4	2.2	1.3
1:128	0.8	1.3	2.2
1:256	0.8	0	0
1:512	0	0.3	0

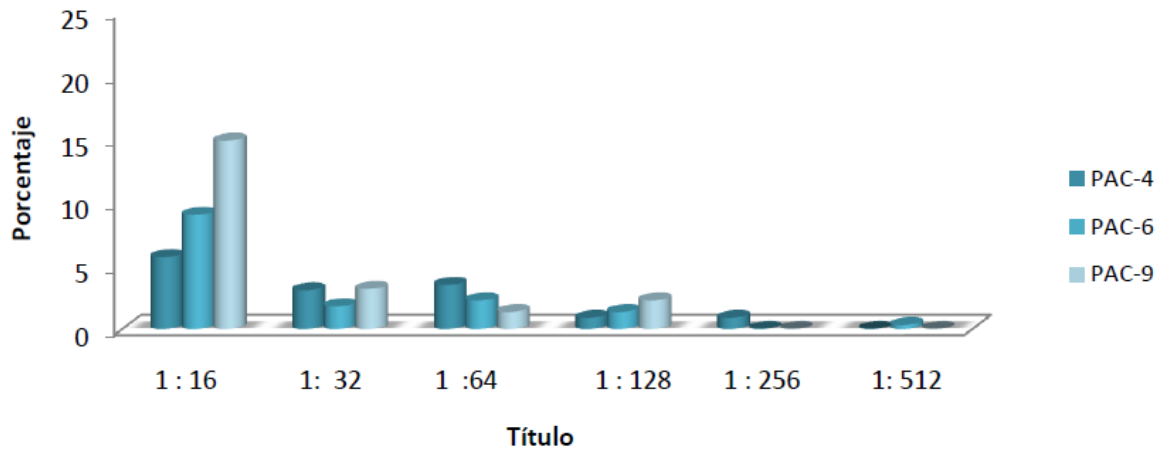


Figura 14. Frecuencia de títulos de sueros positivos del estado de Michoacán.

PRUEBA DE INDEPENDENCIA

El resultado de la prueba de independencia entre seropositividad y el origen geográfico de las muestras indicó que no hay relación entre la seropositividad y el estado de la República para cada aislamiento ($P > 0.05$).

La respuesta promedio del título de anticuerpos por aislamiento por estado de la República, mostró que en los sueros analizados con el aislamiento PAC-4 se presenta un comportamiento similar entre Guanajuato y Jalisco, en el Estado de Michoacán no se

presentó una respuesta diferente comparada con los demás estados. En el estado de México se observó una respuesta diferente comparada con Guanajuato y Jalisco pero similar a los de Michoacán. Los resultados del aislamiento PAC-6 fueron diferentes entre todos los estados exceptuando los del Estado de México y Guanajuato, los cuales se comportaron de manera similar. Para el aislamiento PAC-9, Jalisco y Michoacán presentaron valores similares, pero diferentes a Guanajuato y Estado de México. En Guanajuato y Estado de México se observaron valores similares entre ellos pero diferentes a Michoacán y Jalisco. Los resultados se presentan en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Respuesta promedio del título de anticuerpos por aislamiento y por estado de la República (expresados en logaritmo base 2).

Aislamiento	PAC-4			PAC-6			PAC-9		
	Media	D.E.	E.E.	Media	D.E.	E.E.	Media	D.E.	E.E.
Estado de México	0.72 ^a	1.6	0.13	0.63 ^a	1.5	0.11	0.56 ^a	1.4	0.11
Guanajuato	1.41 ^b	2.4	0.13	0.54 ^{a,b}	1.4	0.11	0.46 ^{a,b}	1.3	0.11
Jalisco	1.20 ^b	1.9	0.11	2.46 ^c	2	0.09	1.71 ^c	1.9	0.09
Michoacán	1.0 ^{a,b}	1.9	0.13	1.21 ^d	1.8	0.11	1.46 ^c	1.9	0.11

^{a, b, c, d}: Valores promedio por columna con distinta literal son diferentes ($P > 0.05$). D.E.: Desviación estándar. E. E.: Error estándar.

Para evaluar el grado de relación entre los aislamientos analizados, se obtuvo el coeficiente de correlación el cual midió la intensidad de la relación lineal entre dos variables.

Las correlaciones observadas entre los aislamientos PAC-4 y PAC-6 y entre los aislamientos PAC-4 y PAC-9 fueron positivas pero moderadas, 0.50 y 0.56, respectivamente, mientras que la correlación entre PAC-6 y PAC-9 fue positiva y alta (0.73).

DISCUSIÓN

La prevalencia de la EOA ha sido reportada frecuentemente en la zona Centro y Bajío de la República Mexicana, siendo los estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo y Querétaro los más afectados. En esta región se ha considerado un padecimiento endémico asociado a la alta densidad de población porcina. Se han realizado diversos estudios serológicos para evaluar la prevalencia de la EOA, por medio de la prueba de IHA durante los años 1980 y 1990 se demostró la existencia de animales seropositivos en 16 de los 32 estados, sin embargo, los brotes de la EOA se reportaron sólo en la zona central del país, principalmente en los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco.^{11, 48, 71}

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran que la circulación del RVP, evidenciado mediante la detección de anticuerpos, en la zona Centro y Bajío de México sigue presentándose de manera constante. Siendo el estado de Jalisco el de mayor prevalencia seguido de Guanajuato, Michoacán y Estado de México.

En estudios previos realizados en el Estado de México, durante los años 1990 al 2000 se ha reportado prevalencia de 6.4 a 20.3%.^{11, 12, 72, 73} En el presente estudio la seroprevalencia para los tres aislamientos del RVP analizados es cercana a 10%, lo cual coincide con los estudios previos, demostrando una circulación moderada del RVP en esta entidad.

En 1991, en muestras del estado de Guanajuato, se presentó seroprevalencia de 47.9%;⁴⁸ en 1992, Fuentes *et al.*, reportaron 34.6%;¹¹ en 1998 se detectó 26.8%;⁷³ de 1999 a 2000, Morilla *et al.*, reportaron 29.7% de positividad.¹² Leguízamo (2000), reportó ausencia de

sueros positivos a RVP colectados en el año de 1997, incrementándose a 54.8% en 1998.⁶⁴ En el presente estudio el valor más alto de seropositividad fue para el aislamiento PAC-4 con 23.7% y menor al 10% para los dos aislamientos restantes. Los datos obtenidos y los reportes previos demuestran que existe una presentación variable en este estado, este evento puede estar asociado a la procedencia de las muestras, sin embargo se confirma que la circulación viral se ha mantenido en la región y que la respuesta hacia diferentes aislamientos se presenta en diferentes proporciones.

Del año 1991 al 2000 en el estado de Jalisco, se reportaron porcentajes variables de prevalencia. En 1990 se detectó 82.5%;⁷² en 1992, Fuentes *et al.*, reportan 29.7%;¹¹ Leguízamo (2000), en 1997, reportó 12.9%, aumentando a 37.5% en 1998;⁶⁴ en 2002 Morilla *et al.* (2002), reportaron 19.7%.¹² En el presente estudio la seroprevalencia promedio para los tres aislamientos fue de 25%, lo anterior indica que el estado de Jalisco se mantiene con una alta prevalencia de anticuerpos frente a RVP, este evento puede estar asociado a la alta densidad porcina presente en la zona.

En el estado de Michoacán, los valores de seropositividad durante los años 1990 al 2000 fueron de 71.4%;⁷² 42.4%,¹¹ 2.8%,⁷¹ 36.8%,⁷³ 16.9% ,¹² 3.6% en 1997 y 48.0% en 1998,⁶⁴ en este estudio se demostró una prevalencia de 16%.

En un estudio realizado en el municipio de La Piedad, la seroprevalencia encontrada fue de 28%,⁷⁴ valor superior al obtenido en este estudio, ya que para el aislamiento PAC-9 sólo se obtuvo 20%. Los sueros analizados por Martínez *et al.* (2010), procedentes de La Piedad, han evidenciado que el LPMV ha mantenido una alta circulación desde la primera

presentación,⁷⁴ comparado con los aislamientos PAC-4 y PAC-6, resultados observados en el presente estudio.

La distribución de títulos de anticuerpos no ha sido un parámetro analizado en todos los estudios anteriormente realizados, sin embargo, Leguízamo (2000), reporta un rango de 17.7% de muestras positivas con título 1:16, el cual es el título más bajo, 18% para el título 1:64 y 1.1 % para el título máximo (1:512).⁶⁴

En el Estado de México, los títulos que se presentaron con mayor frecuencia fueron 1:16 y 1:32 en ambos casos para los aislamientos PAC-6 y PAC-9, el aislamiento PAC-6 tuvo la menor frecuencia de presentación con títulos de 1:64.

En el estado de Guanajuato, se observó una mayor cantidad de sueros positivos para el aislamiento PAC-4, el título que se presentó con mayor frecuencia fue 1:64 y una pequeña proporción alcanzó el título máximo de 1:128, los aislamientos PAC-6 y PAC-9 presentaron una baja proporción de sueros positivos con títulos bajos.

El estado de Jalisco presenta la mayor cantidad de muestras positivas de las cuatro entidades analizadas, un elevado número de sueros obtuvieron título de 1:16 para el aislamiento PAC-4, el título máximo fue 1:512 para el aislamiento PAC-6, este aislamiento es originario del estado de Jalisco,²⁸ hecho que podría estar relacionado a una alta respuesta de anticuerpos en sueros de esta región.

En el estado de Michoacán el título que se presentó con mayor frecuencia fue 1:16, para los tres aislamientos y los títulos máximos fueron 1:256 y 1:512 aunque en bajo porcentaje.

La distribución del título de anticuerpos observada indica que la infección podría estar presentándose pocas semanas antes de que los animales sean enviados a rastro, en estudios donde se analiza la cinética de la respuesta inmune humoral, empleando la técnica de IHA, se ha observado que durante las primeras semanas de infección se presentan títulos de anticuerpos bajos (1:16-1:32), aumentando de forma exponencial, para posteriormente mantenerse estables con títulos altos (1:128-1:512).^{27,45}

Se ha propuesto que las diferencias genéticas entre los diferentes aislamientos del RVP podrían generar diferentes respuestas antigénicas, en un estudio realizado por Sánchez (2004), donde analizó la relación entre diferentes aislamientos y sueros de cerdos infectados bajo condiciones naturales, por medio de IHA. Los resultados mostraron que de siete diferentes aislamientos del RVP, se presentó un reconocimiento variable para cada uno de ellos, concluyendo que hay diferencias entre dichos aislamientos al no ser reconocidos de la misma forma en todos los sueros analizados.⁷⁵

En un estudio de antigenicidad cruzada se evaluó la respuesta protectora de sueros hiperinmunes específicos contra PAC-4 y PAC-9 empleando virus homólogos y heterólogos; (PAC-2, PAC-3, PAC-6, PAC-7 y PAC-8) mediante la técnica de SN; el suero homólogo PAC-4 contra el aislamiento PAC-4 presentó un nivel de reconocimiento de 100% al emplear 8 unidades de anticuerpos. Las reacciones heterólogas contra los aislamientos PAC-2 y PAC-3 tuvieron menor reconocimiento, 75 y 83% de protección *in*

in vitro respectivamente, y para PAC-6, PAC-7, PAC-8 y PAC-9 presentaron 75% de protección cuando se utilizó una mayor cantidad de unidades de anticuerpos (32 U). La reacción homóloga de PAC-9 contra el aislamiento PAC-9 mostró un nivel de protección del 100% al utilizar 16 unidades de anticuerpos. En las reacciones heterólogas, solamente contra PAC-6 y PAC-9 se alcanzó un 100% de protección, para PAC-2 y PAC-3, 83% y para PAC-4, 91% cuando se utilizaron 32 unidades de anticuerpos. Estos resultados concluyen que la capacidad protectora de los anticuerpos no alcanza un 100% para todos los aislamientos analizados y no se presenta de manera uniforme, sin embargo cuando la reacción es contra el virus homólogo se obtiene el mayor título seroneutralizante, lo cual indica la especificidad de los anticuerpos hacia el aislamiento que les dio origen.⁷⁶

En experimentos que evaluaron la respuesta humoral frente a virus homólogos y heterólogos del RVP por medio de SN, se observó que las muestras de cerdos infectados bajo condiciones naturales, presentaron un mayor reconocimiento hacia aislamientos heterólogos (PAC-2 y PAC-4) en comparación con los aislamientos homólogos obtenidos durante el brote de la enfermedad, concluyendo que existen diferencias en el reconocimiento de los aislamientos virales analizados.⁷⁷

Quezada *et al.* (2009) y Lara-Puente *et al.* (2010), evaluaron la respuesta serológica durante la infección experimental con tres diferentes aislamientos del RVP, el objetivo fue identificar las posibles reacciones cruzadas existentes a través de los niveles de anticuerpos empleando la prueba de SN con virus homólogos y heterólogos. Los resultados obtenidos indican que en la fase inicial de la infección (0 a 16 dpi) no se presenta un reconocimiento de 100% entre los diferentes aislamientos utilizados, la reacción cruzada se observa al

100% después de los 24 dpi empleando los virus homólogos y heterólogos. Los autores concluyen que existen aislamientos que producen diferente respuesta de anticuerpos y que tienen potencial inmunogénico variable,^{78, 79} dichos resultados son similares a los obtenidos en la prueba de independencia realizada en el presente estudio.

Quezada-Monroy *et al.* (2010), analizaron la respuesta serológica de 144 muestras de sueros de cerdos procedentes de granjas comerciales, empleando dos aislamientos diferentes del RVP evaluaron el título de anticuerpos por medio de la prueba de IHA. La información obtenida indica que no existe diferencia entre ambos aislamientos, por lo tanto los autores concluyen que no hay variaciones antigénicas entre éstos.⁶⁹ Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican una situación similar, donde al analizar el título de anticuerpos de las muestras de los estados analizados, no se observaron diferencias en cada aislamiento empleado.

Sánchez-Betancourt *et al.* (2008), compararon 12 secuencias del gen que codifica la glicoproteína HN del RVP de aislamientos obtenidos durante un período de 19 años (PAC-2, PAC-3, PAC-4, PAC-6, PAC-7, PAC-8 y PAC-9, CI, CII, CIII y CIV) con las secuencias del LPMV; observando que el aislamiento PAC-4 presentó 99.8% de homología, mientras que los aislamientos PAC-6, PAC-7, PAC-8 y PAC-9 obtuvieron porcentajes de identidad de 98.6 a 98.9% lo que indica una estrecha relación, esto permitió incluir estos aislamientos en tres grupos de acuerdo a su secuencia de aminoácidos.²⁸

La relación entre los sueros positivos para los aislamientos PAC-6 y PAC-9 es fuertemente positiva, esta relación se presenta probablemente por que se trata de aislamientos que están

incluidos en el mismo grupo genético,²⁸ estos resultados podrían sustentar una posible relación antigénica más representativa entre estos mismos miembros del grupo.

En 2010, Castro-Peralta *et al.*, compararon 10 aislamientos obtenidos del año 2000 al 2007, con el virus prototipo LPM,⁸⁰ no encontraron diferencias marcadas entre ellos ya que hubo un rango de 97.9 a 100% de homología a nivel de nucleótidos y de 98 a 100% cuando se comparó con las otras siete secuencias obtenidas del *GenBank* (PAC-2 a PAC-4 y PAC-6 a PAC-9), todas las secuencias reportadas y los aislamientos secuenciados en este estudio presentaron un 98.9 a 100% de homología comparada contra el virus prototipo LPMV, los autores concluyen con base en información previamente publicada⁸¹ que estas variaciones genéticas no representan cambios inmunogénicos *in vivo*.

En el presente estudio la variación del título de anticuerpos quedó evidenciada mediante el análisis estadístico, el cual reveló que los diferentes aislamientos no presentaron títulos de anticuerpos de manera similar, este comportamiento puede asociarse a la variación del potencial inmunogénico de cada aislamiento viral como lo reporta Quezada *et al.*, (2009), Lara-Puente *et al.*, (2010) y Sánchez-Betancourt *et al.* (2008).^{28, 78, 79}

CONCLUSIONES

- Se evidenció la presencia de anticuerpos contra la EOA mediante la técnica de la inhibición de la hemoaglutinación en los sueros pertenecientes a los cuatro estados analizados.
- Los resultados obtenidos, demuestran que el RVP se presenta de manera constante en la zona Centro y Bajío de México. Siendo el estado de Jalisco el de mayor prevalencia para el aislamiento PAC-6, seguido de Guanajuato para el aislamiento PAC-4, Michoacán para el aislamiento PAC- 9 y el Estado de México para PAC-4.
- Jalisco es el estado con mayor cantidad de sueros positivos.
- El análisis de la distribución de los títulos indica que la exposición al RVP se podría estar presentando pocas semanas antes de que los animales sean enviados a rastro, pues se observaron altas proporciones de sueros con títulos bajos, en las muestras con títulos altos podría haberse presentarse la exposición al virus desde el destete o crecimiento.
- El análisis estadístico de los datos indica que, aunque hay diferencias en el comportamiento promedio de los títulos por aislamiento viral en los cuatro estados, la seropositividad no depende del origen geográfico de las muestras.

- La variación del título de anticuerpos reveló que los diferentes aislamientos no presentaron títulos de anticuerpos de manera similar y que este comportamiento puede asociarse a la variación del potencial inmunogénico de cada aislamiento viral.
- Por lo tanto, se concluye que el Centro y Bajío de la República Mexicana mantienen la infección por RVP, asociado a factores como la alta densidad de población y explotaciones porcinas.

LITERATURA CITADA

1. 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.
2. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, Maqueda AJ. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. *Memorias de la XVII Convención Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos*; 1981; Ixtapa, (Guerrero) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1981.
3. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 1988; 122:6-10.
4. Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jauregui P, Linné T, Moreno-López J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen. Virol.* 1990; 71: 609-613.
5. Berg M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* 1991; 72: 1045-1050.
6. Svenda M, Berg M, Moreno-López J, Linné T.. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* 1997; 48: 57-70.

7. Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linné T. The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 1195-1200.
8. Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T.. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of the paramyxovirus f proteins. *Virus Gen.* 1997; 14: 55-61.
9. Rima B, Alexander DJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, Nagai Y, Örbel C, Pringle CR, Ter Mullen, V. Family *Paramyxoviridae*. In: Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Ghabrial S. A., Jarvis, A. W., Matelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.* EUA: Springer-Verlag, 1995.
10. Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D, Melero JA, Nagai Y, Oldstone MBA, Pringle CR, Rima BK. *Family Paramyxoviridae*. In: van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. *Virus Taxonomy on line. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press. 2000. doi: 10.1006/bkvt.2000.0054.
11. Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el Paramyxovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. *Vet. Méx.* 1992; 23:37-39.
12. Morilla A, González-Vega D, Estrada E, Diosdado F. Seroepidemiology of blue eye disease. In: Morilla A, Yoon K, Zimmerman J. (Eds). *Trends in emerging viral infections of swine.* EUA: Iowa State University Press. 2002.

13. Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe, D. M., Howlet P. M. (Eds). Fields Virology, Third Ed. EUA: Lippincot-Raven Publishers. 1996.
14. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jauregui 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.
15. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: Important reservoir host of emerging viruses. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 19: 531-545.
16. International Committee on Taxonomy of Viruses. [homepage on the Internet]. 2010. Virus Taxonomy. (22/07/2010, 4p) *Disponible en:* <http://www.ictvonline.org/>
17. Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz MT, Ramírez MH, Vallejo V, Zenteno E. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus porcino*. En: Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E. (eds). Mensaje Bioquímico Vol. XXVI. México: Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM D. F. 2002.
18. Santos-López G, Hernández J, Borraz-Argüello MT, Ramírez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus porcino*. Arch. Med. Vet 2004; 36: 119-136.
19. Kirkland PD, Stephano A. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipha virus infections. In: Straw B, Zimmerman J, D'Allaire S, Taylor D. Diseases of swine. 9th Ed. EUA: Blackwell Publishing, 2006.

20. Wang LF, Hansson E, Yu M, Chua KB, Math N, Crameri G, Rima BK, Moreno-López J, Eaton BT. Full-length genome séquence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bats and pigs in the Americas. *Arch. Virol.* 2007; 152: 1259-1271.
21. Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jauregui P, Linné T, Moreno-López J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *Gen. Virol.* 1990; 71: 609-613.
22. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E. NeuAc α 2,3 Gal-Glyconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 118: 327-332.
23. Zenteno-Cuevas R, Hernández J, Espinosa B, Reyes-Leyva J, Zenteno, E. Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch. Virol.* 1998; 143: 333-352
24. Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez P, Delanoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol.*; 2000; 126 : 415-424.
25. Reyes-Leyva J, Hernández-Jáuregui P, Montaña LF, Zenteno E. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (α 2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* 1993; 133:195-200.
26. Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez T J. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet. Méx.* 1996; 27:257–259.

27. Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez MH, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immunol. Immunopath.* 1998; 64: 367-381.
28. Sánchez-Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Doperto JM, Ramírez-MH, Hernández J, Reyes-Leyva J, Trujillo ME 2008. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Res. Vet. Sci.* 2008; 85: 359-67.
29. Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 1998; 72: 891-899.
30. Svenda M, Hjertner B, Linné 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; 83: 31-41.
31. Morrison TG, Portner A. Structure, function and intracellular processing of glycoproteins of *Paramyxoviridae*. In: Kingsbury DW (ed.). *The Paramyxoviruses*. EUA: Plenum Press.1991.
32. Stephano HA. Las enfermedades del ojo azul, signos clínicos y lesiones. *Symposium Internacional de las Enfermedades del Cerdo*. Irapuato (Guanajuato) México. Academia Mexicana, A. C. 2000.
33. Martínez LA, Correa GP, Colinas TA, Galina PL. Opacidad corneal bilateral congénita en lechones de cerdas expuestas al paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán. *Memorias del XIV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1989.

34. Hernández-Jáuregui P, Ramírez MH, Mercado GC, Moreno-López J, Kennedy S. Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) infection in pregnant gilts. *J. Comp.Path.* 2004; 130: 1-6.
35. Stephano HA, Gay GM. El síndrome del “ojo azul” estudio experimental. *Memorias de Reunión de Investigación Pecuaria. México (DF), 1983.*
36. Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linné T, Moreno-López J, Hernández P, Kennedy S, Carrol BP, Henrron B, Foster JC, Aldair B. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infections in pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996; 8: 405-413.
37. Collier L, Oxford J. Childhood infections caused by paramyxovirus. *In: Human Virology. Second Edition. EUA: Oxford University Press. 2000.*
38. Reyes-Leyva J, García MO, Santos G, Vallejo V, Ramírez MH, Hernández J. Detección de la viremia en la infección experimental por rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet.* 2004; 36: 39-47.
39. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jauregui 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.
40. Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas-Jiménez JM, Mora-Galindo J, Dueñas-Jiménez SH. Electrophysiological and morphological alterations in peripheral nerves by the pig paramyxovirus of blue eye disease in neonatal pigs. *J. Vet. Med. B.* 2001; 48:477-487.
41. McNeilly F, Walker I, Allan GM, Foster JC, Linné T, Merza M, Hernández P, Kennedy S, Adair B. 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.
42. Rivera-Benitez JF. Persistencia del *Rubulavirus* porcino en semen de verracos infectados experimentalmente (tesis de Maestría). México (DF): FMVZ-UNAM, 2009.
43. Ramírez MH. Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul del cerdo a nivel testicular (tesis de Doctorado) México (DF): FMVZ-UNAM, 1998.
44. Espinosa HS. Evaluación del semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul. (tesis de Maestría). México (DF): FMVZ-UNAM, 2001.
45. Rivera-Benitez JF, Martínez BR, García-Conteras A, Escobar LC, Hernández LJ, Ramírez MH. Assay of humoral immunity to porcine rubulavirus (PoRV) experimental infection. *In: D'Allaire, S. & Friendship, R. (Ed.) Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada, 2010b.*
46. Hernández J, Garfías Y, Nieto A, Mercado C, Montañón LF, Zenteno E. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol* 2001; 79:249-259.
47. Cuevas JS, Rodríguez-Ropón A, Kennedy S, Moreno-López J, Berg M, Hernández-Jáuregui P. Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol* 2009; 127:148-152.
48. Carreón NR, Fuentes MR, Frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en el altiplano y norte de México. *Vet. Mex.* 1991; 2: 117-119.

49. Mercado GMC. Alteraciones funcionales en la respuesta inmune de linfocitos y monocitos durante la fase inicial de la infección con el rubulavirus porcino en cerdos adultos. (tesis de maestría). México: FMVZ-UNAM, 2003.
50. Rosales EF, Ramos RI, Martínez LA, Correa GP. Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus porcino LPM, al parecer asociado con el “síndrome de ojo azul”. Tec. Pec. Méx. 1988; 26: 304-311.
51. Stephano HA, Gay GM El síndrome del ojo azul en cerdos de granjas engordadoras del bajío. *En: Memorias de Reunión de Investigación Pecuaria.* México. 1985.
52. Arellanes AE, Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en el gato doméstico (*Felis catus*). Rev. Vet. Mex 1994; 25: 239-24.
53. Cuetero RS, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. Rev. Vet. Mex 1995; 26: 231-236.
54. Solís M, Ramírez MH, Mercado GC, Espinosa S, Vallejo V, Reyes Leyva J, Hernández J. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. Res.Vet Sci. 2007; 83: 403-409.
55. Rivera-Benitez JF, Martínez BR, García-Conteras A, Reyes-Leyva JR, Hernández LJ, Ramírez MH. Persistence of porcine rubulavirus (PoRV) in experimentally infected boars. *In: D'Allaire S. Friendship R. (Ed.) Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. 2010a.*

56. Stephano H.A, Gay GM Experimental studies of a new viral Syndrome in pigs called “Blue eye” characterized by encephalitis and corneal opacity. *In*: Proceedings of the 7th International Pig Veterinary Society Congress. Ghent, Belgium. 1984.
57. Campos H, Carvajal F. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. Memorias de la XXIV Reunión de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Morelia (Michoacán) México. 1989.
58. Stephano HA, Hernández D, Pérez C, González CT, Ramírez MH, Cervantes A. Boar infertility and testicle atrophy associated with blue eye paramyxovirus infection. Proceedings of 11th International Pig Veterinary Society Congress. Lausanne, Switzerland, 1990.
59. Pérez PF, Stephano HA, Gay GM. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. Memorias del Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, León (Guanajuato) México. 1988.
60. Wiman AC, Hjetner B, Linné T, Herron B, Allan G, McNeilly F, Adair B, Moreno-López J, Berg M. Porcine Rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J. Neurovirol.* 1998; 4: 545-552.
61. Nordengrahn A, Svenda M, Moreno-López J, Bergvall A, Hernández P, Mcneilly F, Allan G, Merza M. Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus La Piedad Michoacan virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999; 11: 319-323.

62. Morilla GA, Diosdado VF, González VD, Ojeda ZP, Mercado PM, Campomanes CA, Hernández JP, Moreno LJ. Estudio comparativo entre las pruebas de inmunoperoxidasa, ELISA e inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico serológico de la enfermedad de ojo azul en cerdos. Memorias del Simposio internacional de enfermedades emergentes del cerdo. Academia Veterinaria Mexicana, A.C. Irapuato (Guanajuato) México. 2000.
63. Martínez LA, Pérez SJ, Correa-Girón P, Córdoba LD, Coba AMA. Utilidad del rubulavirus porcino en la prueba de IH para el serodiagnóstico de la enfermedad del ojo azul y su comparación con otras pruebas diagnósticas. Memorias de la XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz (Veracruz) México. 2006.
64. Leguízamo RA. Determinación de los títulos de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de ojo azul en animales para abasto procedentes del Bajío de la República Mexicana (tesis de licenciatura). México: FMVZ-UNAM. 2000.
65. Hernández-Jáuregui P, Sunqvist A, Fuentes M, Díaz-Orea A, Reyes-Leyva J, Hernández-Baumgarten E, Moreno-López J. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos. *Vet. Mex.* 1992; 23: 217-222.
66. González-Vega D, Diosdado F, Nordengrahn A, Mercado GC, Hernández-Jáuregui P, Moreno-López J, Morilla A. Comparison of tests for serological diagnosis of blue eye disease. *In: Morilla A, Yoon K, Zimmerman J. (Eds). Trends in emerging viral infections of swine. EUA: Iowa State University Press. 2002.*

67. Martínez LA, Correa-Girón P, Coba AMA, Córdoba LD. Propuesta para la estandarización del serodiagnóstico de la enfermedad del ojo azul por las pruebas de seroneutralización (SN) y de inhibición de la hemoaglutinación (IH). Memorias del XXII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Ixtapa (Zihuatanejo) Guerrero, México. 1997.
68. Colmenares VG, Cuevas RS, Guzmán HM. Concordancia entre las pruebas Dot-ELISA, ELISA indirecta y sueroneutralización para el diagnóstico del paramixovirus porcino. *Vet. Méx.* 1995; 26:120.
69. Quezada-Monroy F, Echeveste-García R, Lozano-Dubernard B, Sarfati-Mizrahi D, Soto-Priante E, Lara-Puente H. Immunogenicity of commercial vaccines for the control of Porcine Rubulavirus causing Blue Eye Disease. *In: D'Allaire S. Friendship R. (Ed.) Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. 2010.*
70. Fuentes RJ, Gay GM, Herradora LM, Retana RA. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. *Vet. Méx.* 1994; 22: 243-246.
71. Correa P, Pérez J, Martínez LA, Coba AMA, Córdoba LD. Encuesta nacional para detectar cerdos seropositivos al Rubulavirus porcino mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Memorias del XXXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdos. Querétaro, (Querétaro) México. 1998.

72. Fuentes M, Carreón R, Stephano A, Trujillo M. Frequency of blue eye Paramyxovirus antibodies in Mexico pigs. Proceedings of 11th International Pig Veterinary Society Congress. Lausanne, Switzerland. 1990.
73. Mercado GC, Ramírez MH, Martínez RO, Carreón NR, Rodríguez TJ, Leguízamo A. Inoculación experimental del Rubulavirus porcino del ojo azul en cerdas gestantes. Memorias del XXXII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Ixtapa (Zihuatanejo) México. 1997.
74. Martínez LA, Carrillo GN, Diosdado VF, Solís HM, Liljeult FF, Flores CR, Castillo R. Búsqueda preliminar de anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* LPM en sueros de cerdos pertenecientes a estados del sureste y de centro occidente de México. Memorias del XLV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Acapulco (Guerrero) México. 2010.
75. Sánchez BJI. Evaluación de las afecciones reproductivas y caracterización del Rubulavirus porcino (tesis de Maestría). México: FMVZ-UNAM. 2004.
76. Sánchez-Betancourt JI. Caracterización del gen HN de variantes del Rubulavirus porcino y determinación de la eficiencia protectora de una vacuna polivalente (tesis de Doctorado). México: FMVZ-UNAM. 2007.
77. Becerra LJC. Estudio de las diferentes cepas del Rubulavirus Porcino mediante la técnica de seroneutralización (tesis de Maestría). México: FMVZ-UNAM. 2006.
78. Quezada MF, Echeveste GR, Lozano DB, Sarfati MD, Soto PE, Lara PH. Evaluaciones serológicas cruzadas obtenidas en cerdos SPF inoculados con diferentes aislamientos de Rubulavirus porcino. Memorias del XLV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdos. Puerto Vallarta (Jalisco) México. 2009

79. Lara-Puente H, Echeveste-García de Alba R, Lozano-Dubernard B, Sarfati-Mizrahi D, Soto-Priante E, Quezada-Monroy F. Cross serological reactions obtained in SPF pigs inoculated with different Rubulavirus isolates (blue eye disease). D'Allaire S, Friendship R. (Ed.) Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. 2010
80. Castro-Peralta F, Quezada-Monroy F, Echeveste-García de Alba R, Lozano-Dubernard B, Sarfati-Mizrahi D, Soto-Priante E, Cortes-Fernández R, Lara-Puente H. Genotype of Porcine rubulavirus causing Blue Eye Disease. D'Allaire S, Friendship R. (Ed.) Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. 2010.
81. Echeveste-García de Alba R, Quezada MF, Lozano DB, Sarfati MD, Soto PE, Lara PJH. Potencia de una vacuna comercial contra ojo azul ante 3 diferentes desafíos virales (lesiones pulmonares) Memorias del XLV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdos. Puerto Vallarta (Jalisco) México. 2009.