

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE VARIACIÓN ANTIGÉNICA DEL RUBULAVIRUS PORCINO
MEDIANTE LA TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

VERÓNICA PRUDENCIANA RIAÑO CRUZ

Asesores:

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

Dra. Rosalba Carreón Nápoles

México, D. F.

Noviembre 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A ti que siempre has estado conmigo, y has llenado mi vida de bellos recuerdos, y que solo en ti puedo encontrar tranquilidad, amor, confianza y esa fe que ha hecho realidad mis más grandes sueños. Gracias por cada día que pasamos juntas te adoro mamá.

A mi papá por darme siempre su amor, apoyo y consejos que han hecho de mí una persona responsable y que me han formado tanto en mi vida personal como profesional, no tengo palabras para decirte cuanto te agradezco todo lo que has hecho por mí, te quiero muchísimo papá.

A mis hermanos Leticia y Luis, su ejemplo ha sido muy importante para mí y hoy les agradezco cada momento que pasamos juntos y por cuidarme siempre. Gracias por sus consejos los quiero demasiado a los dos.

A mi querido esposo Ricardo, desde que te conocí has hecho mi vida muy feliz y la sigues haciendo, te agradezco todo el apoyo que me das. Te amo con todo el alma y siempre serás lo mejor que me ha pasado en la vida.

AGRADECIMIENTOS.

A mí querida Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que me han formado como profesionista.

Al Dr. Iván Sánchez Betancourt por permitirme realizar este trabajo y sobre todo por apoyarme en todas las dificultades que se presentaron.

A la Dra. Rosalba Carreón Nápoles por brindarme todo su apoyo, y conocimientos incondicionalmente durante este trabajo, por la confianza que me brindo, y sobre todo por cada consejo.

Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza por todo su apoyo ofrecido durante este trabajo y sus buenos consejos que me brindo. Y a José Francisco Rivera Benitez por aportarme sus conocimientos y apoyo incondicional.

Al Dr. Orbelin Soberanis Ramos por su confianza, apoyo y consejos que me brindo durante este trabajo.

A los miembros del jurado: MVZ. Marco Antonio Herradora Lozano, MVZ. María Elena Trujillo Ortega, MVZ. María del Carmen Mercado García por sus comentarios y aportaciones en la revisión de este estudio.

Al Sr. Inocente por ayudarme a resolver todas mis dudas en el laboratorio, y por todos sus buenos consejos que me brindo.

A mis amigos: Emilio y Adrian, por estar conmigo en los buenos y malos momentos y su apoyo brindado en este trabajo. Gracias.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	40

RESUMEN.

VERÓNICA PRUDENCIANA RIAÑO CRUZ. Identificación de variación antigénica del *Rubulavirus porcino* por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (Bajo la supervisión de: Dr. José Iván Sánchez Betancourt y la Dra. Rosalba Carreón Nápoles).

La enfermedad del ojo azul es una enfermedad de los cerdos que afecta todas las etapas productivas. La enfermedad se ha reportado en la zona Centro y Bajío de la República Mexicana, en donde se considera un padecimiento endémico. El objetivo de este trabajo fue determinar la variación antigénica de ocho aislamientos del *Rubulavirus porcino* obtenidos en los años 2007 y 2008 en los estados de Michoacán, Guanajuato y Estado de México, mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. Los aislamientos se replicaron en células VERO (riñón de mono verde africano), hasta obtener un título óptimo de 1:32 a 1:128. Se obtuvieron los sueros específicos hacia cada uno de los virus para utilizar la técnica de inhibición de la hemoaglutinación con la finalidad de identificar la reacción antígeno-anticuerpo homóloga y heteróloga de cada aislamiento con su respectivo antisuero. Los resultados indican que sí existen variaciones antigénicas entre el virus 34 y los virus 2, 4, 5, 6, 7, 11 y 13. El virus 2 no presenta variación antigénica con respecto a los virus 4, 5, 6, 7, 11 y 13. Y el virus 4 tampoco varía antigénicamente con respecto a los virus 5 y 6. El virus 5 no presenta variación antigénica con los virus 6, 7, 11 y 13. El uso de diferentes aislamientos del RVP en

el diagnóstico permitirá evitar dar resultados falsos negativos, ya que la variación antigénica demostrada en este estudio aumenta la posibilidad de encontrar anticuerpos específicos cuando usemos diferentes aislados de campo en el laboratorio de diagnóstico.

Introducción.

Antecedentes históricos.

La enfermedad del ojo azul (EOA) es un padecimiento de origen viral que afecta a cerdos de todas las edades y es provocada por un virus del género *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*.¹

Fue descrito por primera vez en granjas de La Piedad, Michoacán a principios de 1980; en lechones ocasiona trastornos respiratorios y nerviosos, en los cerdos mayores de un mes, principalmente produce signos respiratorios, y en los verracos y cerdas causa trastornos reproductivos. Se le ha dado este nombre a la enfermedad, porque en algunos de los cerdos afectados se puede presentar opacidad corneal (OC) de color azul turquesa en uno o en ambos ojos.^{2,3}

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.⁴

Se realizaron numerosos estudios con el virus, determinándose como un virus envuelto con genoma ARN, que crece con facilidad en líneas celulares tales como PK-15 y VERO, que poseía actividad hemaglutinante, hemolítica y formadora de sincitios, histológicamente se detectó una meningoencefalitis no supurativa y una neumonía intersticial. ^{5, 6, 7}

En 1980 se reportaron brotes en los estados de Jalisco y Guanajuato, en 1983 en el D.F., Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Tamaulipas, Puebla, Campeche y Querétaro. Ha sido un problema de difícil control y su difusión abarcó, hasta 1992, 16 estados de la República Mexicana, manteniéndose como un padecimiento endémico, principalmente en la zona del Bajío y Centro de México. ⁸

Agente etiológico.

Con base en sus características biológicas y estructurales el virus del ojo azul se clasificó en el orden: *Mononegavirales*, familia: *Paramyxoviridae*, subfamilia: *Paramyxovirinae*, género: *Rubulavirus*, especie: *Rubulavirus porcino*. ^{4,2, 9}

La familia *Paramyxoviridae* agrupa virus envueltos, cuyo genoma está constituido por una cadena de ácido ribonucleico (ARN) en sentido negativo, dividida en seis genes que codifican para un número igual o mayor de proteínas estructurales y no estructurales, incluyendo su propia polimerasa de ARN. Los paramixovirus son muy variables y llegan a registrar en promedio una mutación por cada diez mil bases durante cada replicación. ^{9,10}

Los miembros de esta familia se clasifican en diferentes géneros de acuerdo a sus propiedades estructurales y biológicas, siendo determinante la presencia de actividades hemaglutinante y neuraminidasa.^{10,11} La familia *Paramyxoviridae* se agrupa de la siguiente manera Cuadro 1.

Cuadro 1. Organización taxonómica de la familia *Paramyxoviridae*^{9,10, 12, 13,14}

Subfamilia	Género	Especie
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Avulavirus</i>	<i>Paramyxovirus aviar</i> 2 a 9 <i>Virus de la enfermedad de Newcastle</i>
	<i>Henipavirus</i>	<i>Hendra virus</i> <i>Nipah virus</i>
	<i>Morbilivirus</i>	<i>Virus del moquillo canino</i> <i>Morbilivirus de los cetáceos</i> <i>Morbilivirus 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</i> 3 <i>Virus de la parainfluenza humana</i> 1-3 <i>Virus Sendai</i> <i>Virus símico</i> 10
	<i>Rubulavirus</i>	<i>Virus de la parainfluenza humana</i> 2-4 <i>Virus Mapuera</i> <i>Virus de la parotiditis humana</i> <i>Rubulavirus porcino</i> <i>Virus de la parainfluenza de los simios</i> 41
<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</i>	<i>Metapneumovirus humano</i> <i>Metapneumovirus aviar</i>

El virus de la enfermedad del ojo azul no presenta reacción antigénica cruzada con los virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, con los virus de la enfermedad de Newcastle, del sarampión, el sincitial respiratorio ni con el virus de la parotiditis.¹⁶

El *Rubulavirus porcino* posee gran similitud estructural y genética con el virus de la parotiditis humana y comparte con él su tropismo tisular y sus características patológicas.¹⁶

Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos, la mayoría esféricos que miden de 180 a 300 nm de diámetro y poseen una membrana lipoprotéica que presenta prolongaciones de 8-12 nm, que corresponden a las glicoproteínas HN y F, responsables de las actividades hemaglutinante, hemolítica, de neuraminidasa y formadora de sincitios observadas en *el Rubulavirus porcino*.^{4,16}

El genoma del *Rubulavirus porcino* está constituido por seis genes en el siguiente orden, 3' –N-P/V-M-F-HN-L-5', los seis genes involucrados codifican 10 proteínas, las cuales tienen funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas. Los genes N, M, HN y L codifican una sola proteína, el gen F codifica un polipéptido llamado F₀ que es dividido por una proteasa celular en las proteínas F₁ y F₂, el gen P codifica varias proteínas dependiendo del sitio de edición del ARNm.^{17, 18, 19, 20, 21, 22}

El virión está constituido por seis proteínas estructurales y tres no estructurales, dentro de las estructurales se encuentran:

La HN es una proteína multifuncional que está constituida por 576 aminoácidos con un peso molecular de 66 kDa. La glicoproteína HN es responsable de

reconocer el receptor y de la adhesión a las células blanco de la infección debido al reconocimiento específico de los residuos de ácido N- acetilneuramínico unidos por enlaces glicosídicos alfa 2-3 a galactosa (NeuAc α -2,3 Gal). El NeuAc α -2,3 Gal, el cuál 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 sistema nervioso central en cerdos neonatos y en el tracto reproductor en cerdos adultos.^{16, 23, 24, 25}

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. 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 acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3 Gal) expresado en las superficies de todos los eritrocitos.^{2, 4, 25, 26,27}

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.²⁸

Esta proteína es considerada la inmunodominante en la infección por RVP. 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.^{29, 30}

La nucleoproteína (NP) forma parte integral de la nucleocápside, está constituida por 576 aminoácidos, su peso molecular es de 68 kDa. Durante el proceso 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.^{28,31, 32, 33}

La proteína P, formada por 404 aminoácidos, tiene un peso molecular de 52 kDa; se encuentra asociada a la proteína L y con la NP. Forma un complejo con la proteína L, con actividad polimerasa responsable de la transcripción y replicación del genoma viral.³⁴

La proteína L es la más grande del virión está constituido por 2251 aminoácidos y un peso molecular de 200 kDa, y es el componente catalítico de la ARN polimerasa. Participa en los procesos de iniciación, elongación, metilación, edición y poliadenilación; dentro de sus funciones se encuentran actividades catalíticas 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.^{22, 28, 31, 35}

La proteína de matriz (M) está constituida por 369 aminoácidos gran parte de los cuales son de carácter básico, con un peso molecular de 41.7 kDa, se localiza en la parte interna de la envoltura viral. Debido a su carga neta positiva tiene gran afinidad por la NP, característica importante que le permite intervenir en el

ensamble de la partícula viral con un reducido gasto energético. Participa en el mantenimiento de la estructura del virión y en el ensamblaje de nuevos viriones.^{17,}

21, 28, 31, 34, 36

La glicoproteína F tiene una longitud de 541 aminoácidos y un peso molecular de 59 kDa; esta proteína tiene un dominio altamente hidrofóbico que participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo que permite que el virus se introduzca al citoplasma y que se difunda de célula a célula sin exponerse al medio extracelular.^{18,28,31,36}

Esta característica origina la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios) apreciables en tejidos y en cultivos celulares infectados por paramixovirus.³⁷

Las proteínas no estructurales V de 249 aminoácidos con un peso molecular de 26.1 kDa; la proteína I de 174 aminoácidos con un peso molecular de 18.1 kDa; la P de 404 aminoácidos con un peso molecular de 42.kDa; y la proteína C de 126 aminoácidos con un peso molecular de 14.7 kDa. Son codificadas por el genoma viral y se sintetizan al editarse el gen P. Al parecer estas proteínas participan en la regulación de la transcripción y en la evasión de la respuesta antiviral.^{4, 18, 28, 31}

Características fisicoquímicas y biológicas.

El RVP muestra sensibilidad a los solventes de lípidos como éter y cloroformo, formalina y β propiolactona. El virus se inactiva a 56°C después de 4 horas, mientras que la hemoaglutinación viral se pierde hasta las 48 a 60 horas a 56°C.²

El virus se ha 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.^{4, 38, 39}

Entre sus propiedades fisicoquímicas está la de hemoaglutinar eritrocitos de pollo, gallina, cobayo, bovino, cerdo, caballo, perro, gato, hámster, conejo, oveja, cabra, ratón, rata, pavo y humano tipo A, B, AB y O.^{4, 38, 40, 41}

Patogenia.

La transmisión del virus es por contacto directo, por la aspiración de aerosoles contaminados con el virus de animales portadores cuando este es eliminado a través de descargas nasales.^{8, 34,42} 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.^{43,44, 45}

La vía de entrada natural del RVP es la cavidad oronasal, cuando las partículas conteniendo el virus son grandes, el sitio de replicación inicial es la cavidad oronasal, básicamente en la mucosa nasofaríngea y tejido linfático asociado (tonsilas). Cuando las partículas son muy pequeñas, el virus ingresa con la aspiración hasta el interior del pulmón y se deposita en los conductos aéreos superiores en donde la replicación es abundante y se disemina por vía sanguínea

transportado por eritrocitos y leucocitos, iniciándose así la infección sistémica, propagación y replicación en diversos sitios inmunoprivilegiados de órganos linfáticos y reproductivos.^{1, 46, 47}

El virus puede ingresar al SNC a través de las terminaciones del nervio olfatorio en la mucosa nasal, posteriormente se puede diseminar al hipocampo, tallo cerebral y cerebelo.^{46, 47, 48}

Experimentalmente se ha producido la infección al inocular el RVP por vía intranasal, intratraqueal, intraocular, intracraneal, intraperitoneal e intramuscular.^{1, 2, 4, 49}

Se ha identificado que 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.^{2, 4, 50}

En cerdos machos adultos el virus se replica principalmente en tejidos del sistema respiratorio y del tracto reproductor (testículo y epidídimo).^{25, 40, 51} En cerdas gestantes infectadas experimentalmente, se aisló el RVP principalmente en tracto respiratorio, tonsila y ovarios.⁴⁴

La distribución tisular del RVP está determinada por la expresión de receptores celulares, en este caso específicamente del ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3 Gal), 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.^{1, 16, 25, 46,}

Los estudios que reportaron cambios en la virulencia de cuatro aislamientos (PAC-6, PAC-7, PAC-8, PAC-9) permitieron dividir nuevamente al RVP en tres grupos: el grupo uno formado por el LPMV y PAC-4; el segundo grupo formado por 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 la línea de engorda.³²

La respuesta humoral contra el RVP se inicia con la presencia de anticuerpos específicos desde el noveno y décimo día posinfección (pi), con títulos de $4.6 \log_2$ y la máxima producción se ha observado entre la sexta y novena semana pi con $7.6 \log_2$.

En estudios que han evaluado la presencia de anticuerpos durante infecciones experimentales prolongadas, se han detectado anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación desde la primera semana post-infección 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. Los anticuerpos generados están dirigidos contra las proteínas HN, NP y M.^{52, 53, 54}

Epidemiología.

El cerdo es el único animal conocido que es afectado por RVP clínicamente en condiciones naturales. A nivel experimental el RVP ha sido inoculado en ratones, ratas, embriones de pollo, conejos, perros y gatos, ninguno de estos animales presentó signos asociados a la infección. Sin embargo, se han encontrado anticuerpos en ratas, conejos, perros, gatos y pecaríes, infectados experimentalmente.^{4, 55, 56, 57}

La enfermedad del ojo azul sólo ha sido descrita en México. 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.^{8, 58, 59}

Signos clínicos.

En condiciones de campo los signos clínicos son variables dependiendo principalmente, de la edad de los cerdos, el tropismo, la dosis y la virulencia del RVP; en condiciones experimentales, también son variables, dependiendo además de los factores antes mencionados, la vía de inoculación.^{2, 38, 39, 40, 43, 57, 60}

Los signos clínicos más comunes que se presentan son alteraciones del SNC y elevada mortalidad en lechones en lactancia, falla reproductiva en animales adultos y opacidad de la córnea en cerdos de cualquier edad.⁵⁹

Los lechones de 2-15 días de edad son más susceptibles a la infección por el RVP, generalmente se encuentran postrados, deprimidos o muestran alteraciones

del SNC. El cuadro se puede presentar inicialmente con fiebre, pelo erizado y lomo arqueado, acompañado por constipación o diarrea.

Posteriormente, los animales muestran un cuadro nervioso progresivo que incluye incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, principalmente de los miembros posteriores, temblores musculares, posturas anormales. Algunos animales se encuentran hiperexcitables y muestran movimientos involuntarios (pedaleo), permanecen letárgicos puede existir una ceguera aparente y en ocasiones nistagmo, algunos animales presentan conjuntivitis, ojos hinchados, lagrimeo y exudado en parpados. El 1-10% de los lechones infectados presentan opacidad de la córnea.⁵⁹

En cerdas adultas se presenta con falla reproductiva, aumentándose el número de cerdas que retornan al estro, reducción en la tasa de partos, aumenta el intervalo de días destete a primer servicio y por consiguiente los días no productivos. Ocasionalmente durante brotes agudos se llega a presentar aborto, algunas cerdas llegan a presentar opacidad de la córnea, se han descrito nuevas presentaciones en las cerdas manifestándose signos nerviosos hasta un 10% de las cerdas afectadas.^{2, 30, 59}

El cuadro clínico en el área de maternidad se manifiesta como un incremento en el número de lechones nacidos muertos y momificados, la mortalidad en cerdas alcanza el 0.1% al 0.8%, sin embargo en brotes recientes de la EOA se ha encontrado un aumento de la mortalidad mayor al 15%.³⁰

Los signos clínicos en machos adultos son pocos, puede presentarse anorexia y opacidad de la cornea. Los parámetros seminales se ven seriamente afectados, en granjas infectadas se ha reportado el 29 al 73% de infertilidad, la cual puede ser temporal o permanente, la concentración espermática se ve disminuida y el porcentaje de anormalidades espermáticas aumenta, en algunos casos el eyaculado puede obtenerse sin espermatozoides. Algunos sementales presentan inflamación testicular, se observan turgentes con marcado edema; posteriormente pueden adquirir una textura granulosa y pueden atrofiarse generalmente unilateral, la orquitis y epididimitis por lo general esta presente.^{1, 2, 61}

Lesiones.

En lechones, se observa con frecuencia una neumonía leve en los extremos ventrales de los lóbulos pulmonares craneales, puede haber congestión cerebral y aumento del líquido cefalorraquídeo. Se observa conjuntivitis y diferentes grados de opacidad de la cornea.^{2, 61}

Las principales lesiones microscópicas se localizan en cerebro y medula espinal donde se puede observar encefalitis no supurativa que afecta en particular la sustancia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral, incluyendo una gliosis multifocal y difusa, infiltración perivascular de linfocitos, células plasmáticas y reticulares, necrosis neural, neurofagia, meningitis y coroiditis.^{1, 2, 44, 59, 62}

En las neuronas se encuentran cuerpos de inclusión citoplasmáticos, en los pulmones se observan áreas multifocales de neumonía intersticial, cuya característica es la infiltración de células mononucleares en la pared alveolar.^{2, 60}

Diagnóstico.

La historia clínica, así como los signos clínicos clásicos de la enfermedad, dan las bases para el establecimiento de un diagnóstico clínico presuntivo; sin embargo es necesario demostrar la presencia del virus (mediante su aislamiento e identificación), o de anticuerpos específicos del RVP en animales infectados; o en su caso, la presencia del genoma viral. La necropsia y el estudio histopatológico también ayudan en el diagnóstico.^{6, 40, 41 63}

El diagnóstico de la enfermedad del ojo azul se realiza por medio de pruebas que detectan la presencia del virus, tales como el aislamiento viral en cultivo celular (AV) evidenciado por la hemoaglutinación (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.^{27, 46, 50, 64}

De las pruebas que detectan anticuerpos la más utilizada es la inhibición de la hemoaglutinación (IHA), sin embargo también se utiliza la seroneutralización (SN), ELISA e inmunoperoxidasa.^{27, 54, 64}

En estudios realizados para determinar cuál es la prueba serológica más confiable para el diagnóstico EOA se compararon las pruebas de ELISA, SN e IH, y se encontró que la SN y ELISA tenían una sensibilidad de 89.1% e IH 84%. En ese estudio se concluyó que las mejores pruebas son SN y ELISA y que la IH puede emplearse como prueba de piara debido a su alta especificidad, misma que en estudios comparativos con otras técnicas (SN, ELISA) ha demostrado ser del 100%. 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 periodo de tiempo.^{65, 66, 67,68}

Prevención y control.

Para el control o eliminación de la enfermedad del ojo azul son necesarias varias acciones que dependerán del tipo de granja.⁶¹

En el pié de cría es necesario no mezclar animales de diferentes corrales, eliminar cerdos que presenten el cuadro clínico característico, evaluar a todos los sementales de la granja y eliminar aquellos que sean positivos a la enfermedad serológica o clínicamente, utilizar inseminación artificial por lo menos por seis semanas, intensificar el diagnóstico de gestación, con machos y ultrasonido en todas las hembras, incrementar el número de servicios en la medida que se incrementen las repeticiones, cerrar la granja por lo menos durante 16 semanas.⁶¹

Manejar las salas “todo dentro – todo fuera”, lavar y desinfectar, salas y corrales, cuando salgan todos los animales.^{2, 61}

El virus se inactiva con agentes químicos como éter, formalina y β propiolactona a temperatura de 56° C en un periodo mayor a 4 horas.⁶⁹

Variabilidad antigénica.

Es posible que se estén registrando eventos de variabilidad genética y antigénica, sobre todo porque la proteína HN es el elemento más antigénico y la presión de selección puede originar cambios tanto en la superficie expuesta como en las diferentes propiedades biológicas de esta proteína multifuncional.²⁹

Las diferencias genéticas entre los diferentes aislamientos del RVP podrían generar diferentes respuestas antigénicas; en un estudio realizado en el 2004, se 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.⁶⁸

Justificación.

Los antecedentes de la EOA indican que desde el año de 1980 el virus ha permanecido en el Centro de la República Mexicana, generando millonarias pérdidas económicas en la zona Bajío y Occidente de nuestro país. Por tal motivo la presente investigación pretende identificar la variación antigénica que está presentando el *Rubulavirus porcino*, utilizando virus provenientes de diferentes estados de la República Mexicana obtenidos en diferentes brotes de la enfermedad.

Hipótesis.

Los aislamientos recientes del *Rubulavirus porcino* a partir de muestras de campo no caracterizados en la zona centro occidente de la República Mexicana pueden presentar variación antigénica, como se ha reportado en otros estudios utilizando aislamientos virales obtenidos en años anteriores.

Objetivo.

Determinar la variación antigénica de ocho aislamientos del *Rubulavirus porcino* mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación calculando el valor de relación antigénica.

Material y Métodos.

Virus.

Los 8 virus fueron proporcionados en Noviembre del 2009, procedentes de Michoacán, Guanajuato y Estado de México, y obtenidos en los años 2007 y 2008 a partir de muestras de encéfalo de lechones con signos nerviosos, semen de sementales sin signos clínicos y encéfalo de lechones de tres meses con opacidad de la cornea Cuadro 2.

Cuadro 2. Aislamientos del virus de ojo azul de los estados de Michoacán, Guanajuato y Estado de México.

Identificación de aislamientos	Muestra	Estado	Año de aislamiento
2	Encéfalo de lechón con tremor y opacidad de cornea.	Michoacán	2008
4	Encéfalo de animales vacunados con virus inactivado. Con opacidad de la cornea.	Michoacán	2008
5	Semen de sementales.	Michoacán	2008
6	Semen de sementales.	Michoacán	2008
7	Encéfalo de lechón con signos nerviosos.	Guanajuato	2008
11	Encéfalo.	Michoacán	2008
13	Encéfalo de cerdos de 3 meses con opacidad de la cornea.	Guanajuato	2008
34	Se desconoce.	Estado de México	2007

Cultivo celular.

Los virus se replicaron en células VERO (riñón de mono verde africano) con 24 horas de formación en botellas de 25 cm², suplementado con medio esencial

Eagle's (MEM) y 5% de suero fetal bovino e incubado a 37° C, pasado ese tiempo de crecimiento celular se inocularon las células con cada uno de los virus utilizando 1 ml; los cultivos se mantuvieron con MEM, sin suero fetal bovino, se revisaron diariamente, y a los 3 y 6 días pos-inoculación se observó la presencia o ausencia de efecto citopático (ECP).^{63, 70}

Se obtuvieron 150 µl del sobrenadante del cultivo celular para confrontar 50 µl de este con 50 µl de eritrocitos de ave, bovino y cuye al 0.5% por separado para observar la presencia o ausencia de aglutinación producida por el *Rubulavirus porcino*, reportándose la aglutinación como muestra positiva, y se clasificó de acuerdo a la intensidad de aglutinación como leve, media y moderada.

A los 6 días los cultivos celulares fueron congelados a -70°C. Posteriormente fueron descongelados y fueron clarificados por centrifugación (1177.8 g/10 minutos).

Titulación de los virus aislados.

1. En una microplaca de fondo en "U" de 96 pozos, se colocaron 50µl de PBS (solución amortiguadora de fosfatos con pH de 7.2) en todos los pozos.
2. Se adicionaron 50µl del sobrenadante clarificado en la fila "1" utilizando 2 hileras por cada virus en donde se utilizaron 3 placas para los 8 virus y las

ultimas hileras fueron para testigos negativo y positivo, se realizaron diluciones dobles seriadas empezando con una dilución 1:2 hasta 1:4096.

3. Realizada la dilución, en todos los pozos de las hileras “1” a la “12” se agregó 50µl de una suspensión de eritrocitos de bovino al 0.5%.
4. Se consideró como titulo final de la hemoaglutinación el pozo anterior a donde se presentó sedimentación de glóbulos rojos.

La titulación se realizó hasta el tercer pase celular en donde se obtuvieron títulos mayores a 32 unidades hemoaglutinantes (UHA).⁷⁰

Titulación viral por infección en cultivo celular.

1. Se realizaron diluciones decuples de 10^{-1} a 10^{-9} de cada uno de los 8 virus del tercer pase con medio de cultivo MEM sin suero.
2. Se agregaron 50µl de cada dilución a monocapas de cultivo celular VERO de 24 horas de formación previamente preparadas en microplacas de fondo plano. Utilizando de la hilera “1” a la “9” para cada dilución, la hilera “10” fue para testigo del virus y las hileras “11” y “12” como testigo de células.
3. Se colocaron en incubación dentro de una estufa a 37°C.
4. A los 3 días de incubación se tomaron 50µl del sobrenadante del virus de cada placa y se confrontó con 50µl eritrocitos de bovino al 0.5%, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, pasado el tiempo se realizó la lectura.

5. A los 6 días pos infección se realizó el mismo procedimiento de aglutinación y además se hizo la tinción de la placa con cristal violeta para evidenciar el efecto citopático por cada virus.
6. El título de cada virus se obtuvo utilizando el método de Karber.

Obtención de anticuerpos específicos.

Cada uno de los virus obtenidos del tercer pase teniendo como mínimo 32 unidades hemoaglutinantes (UHA) o 1×10^{-4} se inoculó a 2 conejas de la raza Nueva Zelanda para cada uno de los virus, utilizando 1ml de virus y 0.5ml de hidróxido de aluminio como adyuvante por vía intramuscular. Se realizaron 3 inoculaciones con intervalos de una semana.

A la cuarta semana pos- inoculación se obtuvieron las muestras de sangre en tubos vacutainer sin anticoagulante, los tubos se mantuvieron de forma transversal y fueron refrigerados por 24 horas para posteriormente recuperar el suero; que fue colectado y centrifugado a 216.3 g/10 minutos.

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación para identificar la presencia o ausencia de anticuerpos.

1. Una vez obtenidos los sueros de cada aislamiento viral se inactivaron a 56° C en baño maría por 30 minutos, para inactivar las proteínas del complemento.

2. Se adsorbieron para eliminar inhibidores específicos de la hemoaglutinación, los sueros fueron tratados de la siguiente manera:
 - a. En una microplaca de 96 pozos de fondo en "V" se colocaron 100µl de cada suero por separado.
 - b. Se adicionaron 50µl de caolín y 50µl de eritrocitos de bovino al 5%.
 - c. Se dejó incubar a 4° C durante 24 horas.
3. Adsorbidos los sueros se depositan en microplacas de 96 pozos con fondo en "U" 50µl de PBS (solución de fosfatos con pH de 7.2) en todos los pozos.
 - a. 50µl de suero problema (sobrenadante) en la línea "A".
 - b. Se realizaron diluciones dobles seriadas de la línea "A" a la "H" empezando con una dilución 1:4 hasta 1:512. Se consideraron las dos últimas hileras como testigos positivo y negativo.
 - c. Posteriormente se agregaron 50µl de antígeno viral con 8 UHA conocido en cada pozo a partir de la línea "B" a la "H". Se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - d. Posteriormente se adicionaron 50µl de eritrocitos de bovino al 0.5% en cada pozo, se incubaron de 30-60 minutos a temperatura ambiente.

Testigos.

Positivo: se utilizó suero con título conocido de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, PBS, antígeno viral y eritrocitos. Hay unión antígeno-anticuerpo, por lo que se observa la formación de un botón al sedimentarse los eritrocitos.

Negativo: se utilizó suero conocido que no contenía anticuerpos contra el RVP, PBS, antígeno viral y eritrocitos. En este caso no hay anticuerpos, por lo que el antígeno se une a los eritrocitos observándose hemoaglutinación.

En la prueba de IH se considera que un suero es positivo cuando presenta título igual o mayor a 1:16 de acuerdo como lo reporta Ramírez et al. 1996.²⁷

Una vez identificado el título de los sueros específicos se utilizaron para identificar las respuestas homólogas y heterólogas, es decir la reacción de un virus con su antisuero y el reconocimiento de este, con los otros antisueros; mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

Respuestas homólogas y heterólogas.

Para identificar las respuestas homólogas y heterólogas de cada uno de los virus se realizó conforme a la metodología de la técnica de inhibición de la hemoaglutinación ya antes descrita, donde se empezó con una dilución 1:4 hasta 1:8192.

Como testigo para validar la prueba se utilizó suero de cerdos con anticuerpos contra RVP titulados por la técnica de inhibición de la hemoaglutinación del año 2005.

Cálculo de la relación antigénica.

El porcentaje de protección obtenido de la confrontación de cada uno de los sueros con los diferentes virus se cálculo de la siguiente manera. Los valores de protección (VP) obtenidos con los títulos de inhibición de la hemoaglutinación aportaron un valor de relación antigénica utilizando la ecuación descrita por Archetti y Horsfall (1950).⁷¹

r = valor de relación antigénica

$$r = \sqrt{r1 \times r2}$$

r1 = título heterólogo #2/ título homólogo #1

r2 = título heterólogo #1/ título homólogo #2

El porcentaje de protección se obtuvo de la siguiente ecuación para convertirlo en porcentaje.

$$r = 100 \sqrt{r1 \times r2}$$

Cabe mencionar que los valores de este porcentaje de protección que resultaron ser iguales a (cero) se reemplazaron por 0.01 para poder aplicar la ecuación.

Los aislados virales están relacionados antigénicamente cuando presentan un valor de relación antigénica (VRA) de 0.5 a 1, y los valores de 0.1 a 0.49 indican que no existe relación antigénica entre virus. Los valores de 1 o mayores indican que no hay variación antigénica entre aislados.⁷¹

Resultados.

Inhibición de la hemoaglutinación cruzada.

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación cruzada se realizó utilizando 8UHA de cada uno de los virus y fueron confrontados con cada uno de los antisueros. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Títulos de las respuestas homólogas y heterólogas de cada aislamiento del *Rubulavirus porcino* con su antisuero específico mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

Antisueros	Virus							
	2	4	5	6	7	11	13	34
2	1:8	1:32	1:16	1:8	1:32	1:8	1:32	0
4	1:16	1:64	1:32	1:16	1:64	1:8	1:32	1:16
5	1:32	1:64	1:32	1:16	1:64	1:32	1:64	1:16
6	1:128	1:256	1:128	1:32	1:256	1:64	1:128	1:32
7	1:32	1:64	1:64	1:64	1:128	1:32	1:64	1:32
11	1:64	1:128	1:128	1:128	1:256	1:64	1:128	1:32
13	1:32	1:128	1:64	1:64	1:128	1:32	1:128	1:32
34	1:8	1:32	1:16	0	1:32	1:16	1:16	1:16

Variación antigénica.

Los títulos de la inhibición de la hemoaglutinación presentados en el Cuadro 3 fueron transformados en valores r1 y r2, los cuales se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Valores de r1 y r2 obtenidos de los diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino* confrontados con los antisueros generados.

Los Valores r1 son todos los que están por arriba de los valores 1 y los r2 son todos los que están por debajo.

Antisuero	Virus							
	2	4	5	6	7	11	13	34
2	1	4	2	1	4	1	4	0.00125
4	0.25	1	0.5	0.25	1	0.125	0.5	0.25
5	1	2	1	0.5	2	1	2	0.5
6	4	8	4	1	8	2	4	1
7	0.25	0.5	0.5	0.5	1	0.25	0.5	0.25
11	1	2	2	2	4	1	2	0.5
13	0.25	1	0.5	0.5	1	0.25	1	0.25
34	0.5	2	1	0	2	1	1	1

Los valores de r1 y r2 fueron usados con la fórmula de Archetti & Horsfall (1950).⁷¹

Para calcular el Valor de Relación Antigénica (VRA) que se muestra en el Cuadro

5.

Cuadro 5. Valores de relación antigénica entre diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino*.

VRA	Virus							
Antisueros	2	4	5	6	7	11	13	34
2	1	1	1.41	2	1	1	1	0.025
4		1	1	1.41	0.70	0.5	0.70	0.70
5			1	1.41	1	1.41	1	0.70
6				1	2	2	1	0.025
7					1	1	0.70	0.70
11						1	0.70	0.70
13							1	0.5
34								1

Los aislados virales están relacionados antigénicamente cuando presentan un VRA de 0.5 a 1 (Wadey & Faragher, 1981).

Los resultados en el Cuadro 4 demuestran que los valores de relación antigénica de cada uno de los virus son igual a 1, lo cual indica la especificidad de los anticuerpos generados por el virus homólogo.

Los títulos en las respuestas heterólogas, es decir la confrontación de un virus con los otros antisueros, la reacción es diferente entre todos los aislamientos virales, identificando variación antigénica entre aislados virales como se describe a continuación.

El virus 2, con respecto a los virus 4, 7, 11 y 13 son antigénicamente idénticos, ya que presentan un VRA de 1. El virus 4 no presenta variación antigénica con el virus 5 (VRA 1), pero sí presenta diferencias antigénicas con los virus 7 (VRA 0.7), 11 (0.5), 13 (0.7) y 34 (0.7).

El virus 5, 7 y 13 con respecto al virus 34 que presentan un valor de relación antigénica de 0.7. El virus 6 y el virus 13 son antigénicamente idénticos.

El virus 7 y 11 presenta variación antigénica con los virus 13 (0.7) y 34 (0.7). El virus 13 presenta una relación antigénica de 0.5 con el virus 34.

El virus 34 muestra diferencias antigénicas con los virus 2 (0.025), 4 (0.7), 5 (0.7), 6 (0.025), 7 (0.7), 11 (0.7) y 13 (0.5). Lo cual sugiere que son antigénicamente distintos.

Al confrontar el virus con su antisuero homólogo (reacción homóloga) hubo un reconocimiento de 1 que multiplicándolo por 100 para pasarlo a porcentaje indica que hay un reconocimiento del 100%, y una protección por cada antisuero del 100%.

El virus 7 y el virus 13 que son aislamientos de Guanajuato tienen un valor de relación antigénica de 0.70.

El virus 34 que fue aislado del Estado de México tiene variación antigénica con respecto a los virus 13(0.5), 11(0.70), 7(0.70), 6(0.025), 5(0.70), 4(0.70) y 2(0.025) que fueron aislados de Michoacán y Guanajuato. Lo cual indica que es el virus que tiene mayor variabilidad antigénica con respecto a los demás aislamientos.

Discusión.

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 de los siete diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino*, mostraron un reconocimiento variable para cada uno de ellos, concluyendo que hay diferencias antigénicas entre dichos aislamientos al no ser reconocidos de la misma forma en todos los sueros analizados.⁶⁸

También se ha reportado que la variabilidad antigénica, está asociada a las mutaciones del gen HN en la secuencia de nucleótidos (secuencia primaria) que le permite al sistema inmune del cerdo generar anticuerpos específicos contra los epítopes modificados.^{30, 72}

De acuerdo con el estudio antes mencionado, los resultados de este trabajo indican que las respuestas homólogas no tienen variación antigénica, teniendo como VRA= 1. Lo cual indica un reconocimiento de los epítopes del virus con su mismo antisuero.

Por otro lado, en experimentos que evaluaron el reconocimiento de sueros de campo ante diferentes virus aislados utilizando la técnica de seroneutralización indicaron que no es similar, es decir no todos los virus son reconocidos con los mismos títulos por un determinado suero.⁷³

En este trabajo se encontró que al evaluar las respuestas heterólogas, no todos los virus responden con el mismo título ya sea con su antisuero homólogo y heterólogo.

Respecto a la utilización de la técnica de inhibición de la hemaglutinación, cabe mencionar que en un estudio similar en el 2004 se utilizó la misma técnica para identificar diferencias entre aislamientos virales del ojo azul, la cual permitió conocer que los virus presentan tales diferencias entre ellos y que mediante esta técnica se puede identificar el virus que está circulando actualmente en la granja, asu vez se sugirió la posible presencia de variantes virales.⁶⁸

En un estudio reportado en el 2010 se evidenció la variación del título de anticuerpos utilizando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación y 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 se sugiere en el presente estudio.⁷⁴

En un estudio donde se evaluó la respuesta humoral frente a virus homólogos y heterólogos del *Rubulavirus porcino* por medio de SN, se reportó 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 sí existen diferencias en el reconocimiento de los aislamientos virales analizados.⁷³

En un estudio reciente de aislados naturales del *Rubulavirus porcino* (virus de La Piedad Michoacán), un paramixovirus emergente detectado en México en 1980, se determino la variabilidad de uno de los genes que codifican para su principal

proteína de membrana (hemaglutinina-neuraminidasa), se deduce que la mayoría de los cambios se encuentran en la superficie de la proteína, expuestos al medio. Los cambios encontrados sugieren que este virus, como sucede con otros, está sometido a una presión de selección debido a la respuesta inmunitaria del hospedero.⁷⁵

Un caso similar sucede con el virus de la parotiditis o paperas, otro paramixovirus, el cual, además de la inflamación de las glándulas salivares parótidas, está asociado con distintas patologías, principalmente meningitis y orquitis. En los últimos años se han incrementado los reportes que muestran un resurgimiento de la infección, aun en poblaciones con alto porcentaje de cobertura de vacunación.

Se ha reportado que el virus de la parotiditis está teniendo variaciones genéticas relacionadas con el reconocimiento de anticuerpos, así como en la afinidad por diferentes tipos celulares. Se han reconocido variaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes HN y P (fosfoproteína) que se han relacionado con una mayor afinidad por receptores en las células de origen nervioso.^{76, 77}

En un estudio realizado sobre la caracterización antigénica del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) en pollos de engorda, se utilizó la prueba de IH para confrontar respuestas homólogas y heterólogas utilizando el método de Archetti y Horsfall en donde se evidenció la variabilidad antigénica que existe entre aislamientos, siendo un aspecto importante del virus de la bronquitis infecciosa, la diversidad antigénica, por lo que el control de la enfermedad por medio de la vacunación no siempre es exitosa.⁷⁸

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la variabilidad antigénica que existe entre los diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino*, y que al igual que el virus de la bronquitis infecciosa, por ser un ARN presenta constantemente mutaciones. Por lo que el control de la enfermedad por medio de la vacunación no siempre resulta exitoso contra las nuevas variantes del *Rubulavirus porcino*.

A su vez en nuestro estudio podemos identificar que las variantes antigénicas se encuentran localizadas en diferentes estados, por ejemplo. Al analizar las respuestas homólogas y heterólogas de cada aislamiento con su respectivo antisuero se identificó que no existe una relación directa entre la variación antigénica y el estado, ya que el virus 2 con respecto al 4 y 11 que son aislados de Michoacán no presentan diferencias antigénicas (VRA = 1), lo cual indica que son antigénicamente iguales. Sin embargo el virus 4 y el virus 11 tienen un valor de relación antigénica de 0.5, lo cual indica que en un mismo estado están circulando cepas antigénicamente diferentes. Lo mismo ocurre en el estado de Guanajuato, en donde los virus aislados de éste estado presentan un valor de relación antigénica de 0.7, lo cual sugiere que el uso de vacunas con un solo antígeno puede ser deficiente para el control de la enfermedad.

En el estado de México se encontró el virus que mayor variación antigénica presenta con respecto al resto de los virus (aislado 34), haciendo aún más evidente, la existencia del *Rubulavirus porcino* con cambios antigénicos que pueden estar generando cepas de alta, median o baja virulencia que a corto plazo deberán ser caracterizadas mediante secuenciación, identificando la signología clínica característica de cada variante, así como su patogenicidad y virulencia.

A su vez la caracterización antigénica de los virus de campo realizado en este estudio resulta esencial para considerar el uso de vacunas polivalentes que permitan un mejor control de la enfermedad.

Conclusiones.

- Al evaluar sueros hiperinmunes elaborados en una especie heteróloga al cerdo se obtuvieron resultados diferentes al confrontar cada uno de los sueros con los diferentes aislamientos.
- Se evidenció la variabilidad antigénica existente entre los diferentes aislamientos utilizando la técnica de inhibición de la hemaglutinación, confirmando que es una técnica confiable para el diagnóstico de la enfermedad del ojo azul.
- En este trabajo se logró determinar la relación antigénica que existe entre los aislamientos procedentes de Michoacán, Guanajuato y Estado de México, en años recientes.
- El uso de diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino* en el diagnóstico permitirá evitar dar resultados falsos negativos, ya que la variación antigénica demostrada en este estudio aumenta la posibilidad de encontrar anticuerpos específicos.
- El conocer que existe variación antigénica en estos aislamientos que están circulando en el país es importante para generar inmunógenos que desencadenen una respuesta inmune protectora eficiente.

- Es fundamental la identificación y monitoreo de las variantes genéticas virales que están surgiendo en México para conocer su antigenicidad; lo cual permitirá una vigilancia epidemiológica adecuada y generará la información necesaria para el control y erradicación de la enfermedad.

Literatura citada.

1. Ramírez MH, Hernandez JP, Reyes LJ, Zenteno E, Moreno LJ, Kennedy S. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine Rubulavirus. J. Comp. Path.1997; 117: 237-252.
2. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet. Rec.1988; 122(2): 6-10.
3. 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: Ixtapa, (Guerrero) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1981.
4. 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.
5. Stephano HA. El síndrome del ojo azul y la Investigación. Síntesis Porcina 1986; 5 (12): 16-17.
6. Stephano HA, Gay GM. El síndrome del ojo azul. Síntesis Porcina 1985; 4(5): 44.

7. Campos HR. Dudosa etiología del Síndrome del ojo azul. *Síntesis Porcina* 1982; 1(11): 39.
8. Fuentes RMJ, Gay GM, Herradora LMA, 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; Vol. 25:3.
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. Pringle CR. Virus taxonomy. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during. *Arch. Virol.* 1998; 144: 421-429.
11. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 4171-4175.
12. 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, Cartens 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.
13. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: Important reservoir host of emerging viruses. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 19: 531-545.
14. International Committee on Taxonomy of Viruses. Homepage on the internet 2010. Virus Taxonomy. Disponible en: [http:// www.ictvonline.org/](http://www.ictvonline.org/)
15. Stephano HA. Blue eye disease. In: B.E. Straw S, D'Allaire WL, Mengelin DJ. Taylor (eds). Diseases of swine. 8th ed. Ames, Iowa. Iowa State University Press. 1999; 103-112.
16. 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.
17. Berg M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Identification of the porcine paramyxovirus LPM matrix gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. J. Gen. Virol. 1991; 72; 1045-1050.

18. 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. *Gen Virol.* 1997; 14: 55-61.
19. Linné T, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B, Moreno- López J. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet. Microbiol.* 1992; 33: 263-273.
20. Sundqvist A, Berg M, Moreno-López J, Linné T. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch. Virol.* 1992; 122: 331-340.
21. Wang, LF, Hansson E, Yu M, Chua KB, Math N, Crameri, G, Rima, BK, Moreno- López J, Eaton BT. Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bats and pigs in the Americas. *Arch. Virol.* . 2007; 152: 1259-1271.
22. 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.
23. Reyes- Leyva J, Espinosa B, Hernandez J, Zenteno R, Vallejo V, Hernandez- Jáuregui P, Zenteno E. NeuAc α 2,3 Gal-Glyconjugate

- expression determines cell susceptibility to the porcine Rubulavirus LPMV. *Com. Biochem. Physiol.* 1997; 118: 327-332.
24. Zenteno-Cuevas R, Hernandez 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.
25. Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernandez J, Ramirez P, Delanoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol.*; 2000, 126: 415-424.
26. Reyes-Leyva J, Hernandez-Jáuregui P, Montaña LF, Zenteno E. The porcine paramixovirus LPM specifically recognizes sialyl (alpha 2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* 1993; 133: 195-200.
27. Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet. Méx.* 1996; 27:257-259.
28. Santos- López G, Hernández J, Borraz-Argüello MT, Ramírez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas de Rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet* 2004; 36: 119-136.

29. 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.
30. Sánchez-Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Dopporto JM, Ramírez-MH, Hernández J, Reyes-Leyva J, Trujillo ME. 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.
31. Sundqvist A, Berg M, Hernandez-Jauregui P, Linné T, Moreno-López J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen. Virol.* 1990; 71: 609-613.
32. 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.
33. Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J. Virol.* 1993; 67: 4822-4830.
34. 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.

35. Hercyk N, Horikami SM, Moyer SA. The vesicular stomatitis virus L-protein possesses the mRNA methyltransferase activities. *Virology*. 1988 163: 222-225.
36. Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN., Knipe, D.M., Howlet P. M. (Eds). *Fields Virology*, Third Ed. EUA: Lippincot- Raven Publishers. 1996.
37. Morrison TG, Pother A. Structure, function and intracellular processing of glycoproteins of *Paramyxoviridae*. In: Kingsbury DW (ed). *The Paramyxoviruses*. EUA: Plenum Press. 1991.
38. Martínez LA, Correa GP, Fajardo MR, Garibay SM. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramixovirus. En: Correa P y Morilla A (eds). *Encuentro sobre enfermedades infecciosas del Cerdo*. México, D.F. 1985: 15-21.
39. Ramírez NR, Martínez LA, Correa GP, Colinas TA. Un brote de paramixovirosis encefalítica en cerdos de una granja del Estado de México. Mem. II Congreso ALVEC, XII Convención AMVEC, III Encuentro UNPC. Acapulco, Guerrero, México, 1987: 64-67.
40. 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, D.F. 1985: 1-13.

41. Stephano HA, Gay GM. Síndrome del ojo azul en cerdos II. Síntesis porcina, México, D.F. 1985; 4(6): 9-14.
42. 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.
43. 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. (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1989.
44. Hernández-Jáuregui P, Ramírez MH, Mercado GC, Moreno-López J, Kennedy S. Experimental porcine Rubulavirus (La Piedad- Michoacán virus) infection in pregnant gilts. J. Comp. Path. 2004; 130: 1-6.
45. Stephano HA, Gay GM. El síndrome del "ojo azul" estudio experimental. Memorias de Reunión de Investigación Pecuaria. México (DF), 1983.
46. Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linné T, Moreno-López J, Hernandez P, Kennedy S, Carrol BP, Henrron B, Foster JC, Aldair B. A sequential study of experimental porcine paramixovirus (LPMV) infections in pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. J. Vet. Diagn. Invest. 1996; 8: 405-413.

47. 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.
48. 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.
49. 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 paramixovirus of blue eye disease in neonatal pigs. J. Vet. Med. B. 2001; 48:477-487.
50. McNeilly F, Walker I, Allan GM, Foster JC, Linné T, Merza M, Hernandez P, Kennedy S, Adair B. A. Comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacán paramixovirus (LPMV) infection in pigs. Vet. Diagn. Invest. 1997; 9:3-9.
51. Rivera – Benitez JF. Persistencia del *Rubulavirus porcino* en semen de verracos infectados experimentalmente (tesis de Maestría). México (DF): FMVZ-UNAM, 2009.

52. Fujinami RS, Oldstone MBA. Alterations in expression of measles virus polypeptides by antibody: molecular events in antibody induced antigenic modulation. *J. Immunol.* 1980; 125: 78-85.
53. Hernández J, Reyes-Leyva J, Ramírez H, Valenzuela O, Zenteno E. Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el *Rubulavirus porcino*. *Vet. Méx.* 2004; 35(1): 65-74.
54. Rivera-Benitez JF, Martínez BR, García-Contreras 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 21 st IPVS Congress, Vancouver, Canada, 2010b.
55. Arellanes AE, Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en el gato domestico (*Felis catus*). *Rev. Vet. Méx.* 1994; 25: 239-241.
56. Cuetero RS, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. *Vet. Méx.* 1995; 26: 231-236.
57. Campos M. E. Síndrome del ojo azul o cerdos zarcos. Mem. XVII convención AMVEC- Ixtapa. Zihuatanejo, Guerrero, México. 1981.

58. Morilla A, Gonzalez-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. USA: Iowa State University Press. 2002.
59. 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.
60. Pérez PF, Lesiones histológicas en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus del ojo azul. (tesis licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1989.
61. 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.
62. 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.
63. Stephano HA, Gay GM. Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea, ojo azul. Síntesis porcina. 1986; 5 (12):26-39.
64. 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 diagnosticas. Memorias de la XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz (Veracruz) México. 2006.

65. 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 hemoaglutinación 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.

66. Hernández-Jáuregui P, Sundqvist 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. Méx. 1992; 23: 217-222.

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 hemaglutinación (IH). Memorias del XXII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Ixtapa (Zihuatanejo) Guerrero, México. 1997.

68. Sánchez BJI. Evaluación de las afecciones reproductivas y caracterización del Rubulavirus porcino (tesis de Maestría). México: FMVZ-UNAM. 2004.
69. Stephano HA. Gay GM. El síndrome del ojo azul: una nueva enfermedad en cerdos asociada a un paramixovirus. Vet. Méx. 1986b; 17:120-122.
70. Colinas TA, Martínez LA, Correa GP, Fajardo MR. Curva de crecimiento del paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán en la línea celular Pk-15. Mem. del II Congreso ALVEC; XII convención AMVEC. Acapulco, Guerrero, México 1987:68-71.
71. Archetti I, Horsfall FL. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. J. of Exp. Med. 1950; 92:441-462.
72. Riaño CV, Massa A, Carreón NR, Sánchez BJI. Comportamiento in vitro de diez aislados del *Rubulavirus porcino*. Memorias del XLVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Puerto Vallarta (Jalisco) México. 2011.
73. Becerra LJC. Estudio de las diferentes cepas del *Rubulavirus porcino* mediante la técnica de seroneutralización (tesis de Maestría). México: FMVZ-UNAM.2006.

74. Escobar LAC. Determinación de la seroprevalencia del Rubulavirus porcino en el Estado de México, Jalisco, Guanajuato y Michoacán (tesis de licenciatura). México: FMVZ-UNAM.2010.
75. Borraz-Arguello M, Santos-López G, Vallejo-Ruiz V, Herrera-Camacho I, Reyes-Leyva J. Caracterización biológica de tres aislamientos naturales del Rubulavirus porcino. *Rev. Biol.* 2008; 56: 487-499.
76. Galazka AM, Robertson SE, Kraigher A. Mumps and mumps vaccine: a global review. *Bull. World health org.* 1999; 77: 3-14.
77. Santos-Lopez G, Cruz C, Pazos N, Vallejo V, Reyes-Leyva S, Tapia-Ramírez J. Two clones obtained from urabe AM9 mumps virus vaccine differ in their replicative efficiency in neuroblastoma cells. *Microb. Inf.* 2006; 8:332-339.
78. Gutiérrez REJ, Gough R, Zapata VDM. Caracterización antigénica de un virus de la bronquitis infecciosa, aislado en pollos de traspatio en Yucatán, México. *Vet. Mex.* 1998; 29(4)