



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

**PARTICIPACIÓN DE LOS ROEDORES EN LA TRANSMISIÓN DE
LOS VIRUS DE ENCEFALOMIOCARDITIS, DE LA ENFERMEDAD
DEL OJO AZUL Y DE INFLUENZA EN UNA GRANJA PORCINA
DEL BAJÍO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

KARINA ROSAS ESTRADA.

Asesores:

Dr. Humberto Ramírez Mendoza.

M.C. José Francisco Rivera Benítez.



México, D. F.

2012.



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.

DEDICATORIA

A mi Madre y amiga, Lilia que siempre ha estado a mi lado, con su apoyo, paciencia, consejos, sabiduría, palabras de aliento y llamadas de atención necesarias para poder continuar y seguir adelante. Gracias por todas esas noches de desvelo, por soportar mi carácter, por todo el amor y cariño que me brindas y por ayudarme a enfrentar mis miedos, haciendo posible un sueño más de tantos que nos faltan. ¡Te amo mami!

A mis Mamás:

Hayde, que siempre me ha apoyado, me ha dado mucho cariño, amor y protección.

Esperanza, que me apoya y protege en todo momento, estando siempre presente en mis pensamientos y corazón, gracias por ser tan importante en mi vida y nunca dejarme sola.

A mis dos lindos bebés, por desvelarse conmigo, esperarme para ir a dormir y recibirme con tanta alegría al regresar a casa.

A toda mi familia, ¡Gracias por su apoyo!

Solo el miedo convierte en imposible un sueño.

Paulo Coelho.

AGRADECIMIENTO

Al Doctor Humberto Ramírez Mendoza por su apoyo, tiempo y conocimientos que me brindo desde el inicio de la carrera (5333 años que nos conocemos), por la oportunidad que me dio de ser parte de su equipo de trabajo y por permitirme trabajar con este tema.

Al Doctor Francisco Rivera Benítez por su apoyo, tiempo, conocimientos, enseñanzas, consejos, por escuchar mis inquietudes y darme palabras de aliento, por la paciencia y sobre todo por permitirme trabajar con este tema; además de los ratitos, ratos y ratones en los que me ayudaste con la revisión de la tesis.

Al Dr. Gerardo Suzán y sus alumnos Omar y Paola por su capacitación para el muestreo y manejo de roedores.

Al Dr. Francisco Rosales, al M.V.Z. Artemio Kantun y a la Dra. Marta Macías por su apoyo y contribución para la realización de este trabajo.

A mis compañeros (as) y amigas (os) del laboratorio Francisco Rivera, Miguel Jasso, Manuel Saavedra, Luis Ramírez, Rebeca Martínez, Rosalba Gutiérrez, Evelyn Pulido, Karina Gaviña, Jazmín De la Luz y Mary Contreras por sus comentarios, por su ayuda, por compartirme sus experiencias y conocimientos y aquellos momentos de alegría.

A los miembros del jurado Dr. Francisco Monroy, Dra. Carmen Mercado, Dr. Iván Sánchez y Dra. Rosa Elena Sarmiento, por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis, por sus comentarios y opiniones que hicieron un mejor trabajo de esta tesis.

A mis amigas (os) Eva, Aron, Vero, Jackelyn, Maricela, Eve, Karina, Enrique y Raúl que me han brindado su apoyo y valiosos comentarios.

A Rene Rodríguez por apoyarme, aconsejarme, estar pendiente de mí, por esas pláticas que me han hecho reflexionar en tantas cosas de la vida y por sus comentarios.

A mis tíos (as) Pilar, Roberto, Angélica, que a pesar de que no les convence mi carrera, me han brindado siempre su apoyo incondicional.

A mis primos César, Carmen, Oscar, Nayely, Lizbeth, Baruch y Luis, que han compartido cada uno de los momentos importantes de mi vida y este es uno más.

A mi familia que siempre esta apoyándome incondicionalmente y brindándome consejos para salir adelante y haciéndome pasar ratos inolvidables. ¡Los quiero a todos y les agradezco a cada uno, todo lo que me han enseñado!

A Alex Mujica por apoyarme en todo momento, estar pendiente de mí, esperarme, acompañarme e ir por mí al laboratorio a pesar de la hora y del día, por soportar mi mal

humor y a pesar de todo seguir ahí dándome muchos momentos de alegría durante esta etapa de mi vida.

¡Gracias a todos por formar parte de mi vida y de este maravilloso sueño hecho realidad!

La tesis fue financiada por el proyecto de CONACYT SSA 126709 “Epidemiología del virus de la influenza y otros virus respiratorios en granjas de producción porcina en México.”, 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”, PAPIIT IN 224611 “Estudio de la interacción del *Rubulavirus porcino* y agentes virales implicados en el complejo respiratorio del cerdo”, CONACYT AC-90024 “Estandarización de técnicas de diagnóstico para la enfermedad del ojo azul en cerdos” y PAPIIT-IN 211308 “Evaluación del *Rubulavirus porcino* en semen de verracos”.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Encefalomiocarditis.	
Generalidades de la familia <i>Picornaviridae</i>	5
Agente etiológico.....	7
Signos y lesiones.....	9
Epidemiología.....	10
Patogénesis.....	11
Diagnóstico.....	11
Enfermedad del ojo azul.	
Generalidades de la familia <i>Paramyxoviridae</i>	11
Agente etiológico.....	15
Signos y lesiones.....	16
Epidemiología.....	17
Patogénesis.....	18
Diagnóstico.....	19
Influenza porcina.	
Generalidades de la familia <i>Orthomyxoviridae</i>	19
Agente etiológico.....	21
Signos y lesiones.....	22
Epidemiología.....	23
Patogénesis.....	24
Diagnóstico.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	26
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30

Cepas virales y células.....	30
Animales.....	31
Serología.	
Tratamiento de los sueros.....	32
Inhibición de la hemaglutinación.....	32
Titulación viral.....	33
Seroneutralización.....	34
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS.....	36
Lotes virales.....	36
Muestras.....	38
Serología.	
Inhibición de la hemaglutinación.....	39
Seropositividad en hembras reproductoras.....	39
Seropositividad en cerdos en crecimiento.....	40
Títulos de anticuerpos por virus.....	41
Virus <i>Encefalomiocarditis</i>	42
<i>Rubulavirus porcino</i>	42
<i>Influenzavirus A porcino</i> subtipo H1N1.....	42
<i>Influenzavirus A porcino</i> subtipo H3N2.....	43
Seroneutralización.....	46
Análisis estadístico.....	46
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	55
REFERENCIAS.....	57
CUADROS.	
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la familia <i>Picornaviridae</i>	6
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la familia <i>Paramyxoviridae</i>	13
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de la familia <i>Orthomyxoviridae</i>	20
Cuadro 4. Inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización para virus <i>Encefalomiocarditis</i> , <i>Rubulavirus porcino</i> e <i>Influenzavirus A</i> en cerdos en crecimiento.....	44
Cuadro 5. Inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización para virus <i>Encefalomiocarditis</i> , <i>Rubulavirus porcino</i> e <i>Influenzavirus A</i>	

en hembras reproductoras.....	45
Cuadro 6. Comparación de los resultados de inhibición de la hemaglutinación y de seroneutralización mediante la Ji cuadrada para la detección de anticuerpos contra el virus Encefalomiocarditis.....	47
Cuadro 7. Análisis de independencia de la presencia de anticuerpos contra el virus Encefalomiocarditis obtenidos mediante inhibición de la hemaglutinación en cerdos y roedores.....	48

FIGURAS.

Figura 1. Efecto citopático del virus <i>Encefalomiocarditis</i> en cultivos de células MDBK a las 96 horas post- infección, observación en microscopio de campo claro a 10x.....	36
Figura 2. Cultivo de células MDBK sin infectar (testigo negativo) a las 96 horas de crecimiento, observación en microscopio de campo claro a 10x.....	36
Figura 3. Efecto citopático del virus <i>Rubulavirus porcino</i> , cepa PAC3 en cultivos de células MDCK a las 96 horas post- infección, observación en microscopio de campo claro a 20x.....	37
Figura 4. Cultivo de células MDCK sin infectar (testigo negativo) a las 96 horas de crecimiento, observación en microscopio de campo claro a 20x.....	37
Figura 5. Infección en cavidad alantoidea de embriones de pollo de 9 días de edad con los <i>Influenzavirus A porcinos</i>	38
Figura 6. Seroprevalencia general en cerdos y roedores para <i>Encefalomiocarditis</i> (V-EMC), <i>Rubulavirus porcino</i> (RVP) e <i>Influenzavirus A</i> virus subtipo H1N1 y H3N2.....	39
Figura 7. Seroprevalencia en hembras reproductoras (por parición) para <i>Encefalomiocarditis</i> (V-EMC), <i>Rubulavirus porcino</i> (RVP) e	

Influenzavirus A virus subtipo H1N1 y H3N2.....40

Figura 8. Seroprevalencia en cerdos en crecimiento por edades para

Encefalomiocarditis (V-EMC), Rubulavirus porcino (RVP) e

Influenzavirus A virus subtipo H1N1 y H3N2.....41

Figura 9. Promedio del título de anticuerpos en logaritmo base dos en

las hembras, cerdos en crecimiento y roedores, contra los virus

Encefalomiocarditis (V-EMC), Rubulavirus porcino (RVP) e

Influenzavirus A subtipos H1N1 y H3N2.....42

Figura 10. Comparación de la seroprevalencia de los sueros de hembras

reproductoras, cerdos en crecimiento y roedores mediante las pruebas de

inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización para el virus

Encefalomiocarditis.....46

RESUMEN.

ROSAS ESTRADA KARINA. Participación de los roedores en la transmisión de los virus de encefalomiocarditis, de la enfermedad del ojo azul y de influenza en una granja porcina del Bajío. (Bajo la dirección del: Dr. Humberto Ramírez Mendoza y M.C José Francisco Rivera Benítez).

Numerosas enfermedades que afectan a los cerdos pueden transmitirse por contacto entre la misma especie o con otras especies. La fauna nociva presente en las granjas porcinas además de ser un reservorio, puede ser una vía de transmisión de diferentes agentes infecciosos. El virus *Encefalomiocarditis* es el agente causal de la encefalomiocarditis en porcinos, los roedores son el hospedero natural. El *Rubulavirus porcino* causa la enfermedad del ojo azul en cerdos, siendo éste su único hospedador natural conocido. El *Influenzavirus A*, es el agente causal de la enfermedad de influenza porcina, la infección ha sido reconocida en diversas especies de mamíferos y aves. El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos para los virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A* en cerdos y roedores en una granja, para establecer la participación de los roedores como transmisores de estos agentes virales. Se analizaron mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación 136 sueros de cerdos, resultando 125 con anticuerpos contra *Influenzavirus A* subtipo H3N2 (91.91%) y 116 para el subtipo H1N1 (85.29%). Para *Rubulavirus porcino*, 21 cerdos fueron positivos (15.44%) y 17 (12.5) para *Encefalomiocarditis*. De 23 sueros de roedores resultaron positivos solo cuatro para *Encefalomiocarditis* (17.39%). Se observó una asociación dependiente ($P=0.410$) de seropositividad para *Encefalomiocarditis* entre cerdos y roedores, indicando que los roedores son un

reservorio importante para la diseminación del virus *Encefalomiocarditis* en cerdos. El control de la fauna nociva permitirá reducir el impacto económico en animales de producción tales como los cerdos.

Palabras clave: Transmisión, roedores, cerdos, encefalomiocarditis, enfermedad del ojo azul e influenza porcina.

INTRODUCCIÓN.

La industria porcina constituye una actividad económica relevante en muchos países. Su progreso depende de diversas medidas como el mejoramiento genético, la implementación de sistemas sanitarios, además de la promoción del comercio de los productos y subproductos y el consumo por parte del público.¹ Actualmente, existen un gran número de enfermedades que afectan a los cerdos y muchas de las infecciones se transmiten por contacto directo con animales enfermos o reservorios (mosquitos, ratas, ratones, perros, gatos y fauna silvestre) y sus secreciones¹⁻³ presentándose de esta manera la transmisión entre la misma especie (intra-especie) o con otras especies (inter-especies).^{1, 4} Otros factores que influyen en la diseminación de enfermedades, son los ambientales (viento y agua) y otros como vehículos (vestimenta, automóviles, alimento y agua contaminados).^{1, 5} El comercio legal o ilegal de los animales, sus productos y subproductos contaminados, son otra fuente de diseminación, la cual puede ser mundial.¹

El surgimiento de las enfermedades emergentes¹ y la transmisión inter-especies de algunos patógenos⁴ se han convertido en una de las principales preocupaciones de los productores y autoridades sanitarias. Estas enfermedades pueden tener un impacto negativo en la industria porcina, provocando cuantiosas pérdidas económicas debido a la reducción en la producción, aumento en la mortalidad y la pérdida de mercados nacionales e internacionales; un ejemplo de estas enfermedades son, la encefalomiocarditis, la enfermedad del ojo azul y la influenza porcina.¹ Se debe considerar que la encefalomiocarditis y la influenza porcina tienen gran importancia debido a su potencial zoonótico.⁶

Se han descrito factores que predisponen a la aparición de enfermedades virales emergentes, uno de los más importantes es una alta densidad de población animal, la

mezcla de animales de diferente origen, con agentes patógenos propios y estado inmunitario variable, un ejemplo de esta situación, fueron los brotes de la influenza porcina en 1918 en los Estados Unidos y que también afectó a los seres humanos.^{1, 4, 7} En el año de 2009 se presentó un brote de un nuevo *Influenza virus A H1N1* en México, el cual mostró un potencial pandémico de este virus⁴ infectando a humanos y otras especies (aves de corral y porcinos).^{4, 8} Otro ejemplo de la emergencia de agentes virales, es la enfermedad del ojo azul producida por el *Rubulavirus porcino*, la cual fue reconocida como una nueva enfermedad en 1980 en la región de La Piedad, Michoacán.¹

Otro factor que interviene en la emergencia de nuevas enfermedades, es la adaptación de un virus que infecta a los cerdos y a otras especies animales y/o viceversa; el *Influenzavirus A* tiene como reservorio natural a las aves acuáticas silvestres y en los cerdos ocurre la recombinación de los virus y la aparición de nuevos subtipos y variantes genéticas. Las modificaciones en la ecología, ya sea que ocurran de forma natural (cambios climáticos) o sean inducidos por el hombre (cambio de uso de suelo, urbanización, deforestación, construcción de presas, entre otros), han contribuido en la aparición de nuevas enfermedades virales y su transmisión inter-especies.^{1, 4} Estas modificaciones favorecen el incremento de poblaciones de artrópodos vectores o de animales que funcionan como hospedadores de virus y que pueden entrar en contacto con los porcinos.¹ Un ejemplo de esto, fue evidenciado al asociar la presencia de grandes poblaciones de ratones y ratas infectadas con el virus *Encefalomiocarditis* a la epizootia de la enfermedad en cerdos de Nueva Gales del Sur, Australia, 1986.⁹

Es de gran interés y preocupación la aparición de nuevos virus en los animales, así como su transmisión intra e inter-especies y su adaptación. Las medidas para contrarrestar su propagación son vitales para la prevención de epidemias y pandemias.¹⁰

Nuevas enfermedades virales que afectan a los cerdos, han aparecido, a causa de los cambios en los sistemas de producción porcina¹ y la capacidad de los virus para generar mutaciones; entre ellos, los virus ARN, presentan una tasa de mutación elevada y son especialmente difíciles de controlar por este motivo, los virus zoonóticos con genoma de ARN, pueden cambiar la secuencia de aminoácidos, de tal manera que sus proteínas de superficie pueden facilitar la unión a receptores en diferentes especies.⁵

Encefalomiocarditis.

Generalidades de la familia *Picornaviridae*.

Los picornavirus son virus no envueltos que poseen un genoma de ARN de cadena simple y en sentido positivo, está unido covalentemente al extremo 5' a una proteína llamada VPg (proteína del virión vinculado al genoma).¹¹ El genoma tienen una longitud de 7-9 kb, tiene un diámetro de aproximadamente de 25-30 nm y su simetría es icosaédrica. Su cápside está compuesta por 60 protómeros, cada uno formado por tres proteínas de superficie denominadas proteínas virales (VP); VP1, VP2 y VP3 (24-41 kDa), además contiene una proteína interna llamada VP4 (5.5- 13.5 kDa), está última se encuentra presente en la mayoría de los picornavirus. El protómero tiene un peso total de 80-97 kDa.¹² La familia *Picornaviridae* contempla 12 géneros,^{12, 13} que se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1
Clasificación taxonómica de la familia *Picornaviridae*.¹³

Familia: Picornaviridae

<i>Género:</i>	<i>Especie:</i>
<i>Aphthovirus</i>	<i>Virus de rinitis A bovina.</i> <i>Virus de rinitis B bovina.</i> <i>Virus de rinitis A equina.</i> <i>Virus de la fiebre aftosa.</i>
<i>Avihepatovirus.</i>	<i>Virus de hepatitis A del pato.</i>
<i>Cardiovirus.</i>	<i>Virus de Encefalomiocarditis.</i> <i>Theilovirus.</i>
<i>Enterovirus.</i>	<i>Enterovirus bovino.</i> <i>Enterovirus A humano.</i> <i>Enterovirus B humano.</i> <i>Enterovirus C humano.</i> <i>Enterovirus D humano.</i> <i>Rinovirus A humano.</i> <i>Rinovirus B humano.</i> <i>Rinovirus C humano.</i> <i>Enterovirus B porcino.</i> <i>Enterovirus A del simio.</i>
<i>Erbovirus.</i>	<i>Virus de rinitis B equina.</i>
<i>Hepatovirus.</i>	<i>Virus de hepatitis A.</i>
<i>Kobuvirus.</i>	<i>Virus Aichi.</i> <i>Kobuvirus bovino.</i>
<i>Parechovirus.</i>	<i>Parechovirus humano.</i> <i>Virus Ljugan.</i>
<i>Sapelovirus.</i>	<i>Sapelovirus aviar.</i> <i>Sapelovirus porcino.</i>

	<i>Sapelovirus del simio.</i>
<i>Senecavirus.</i>	<i>Virus del Valle Seneca</i>
<i>Teschovirus.</i>	<i>Teschovirus porcino.</i>
<i>Tremovirus.</i>	<i>Virus de encefalomiелitis aviar.</i>

La estabilidad de los géneros y especies pertenecientes a esta familia varía, algunos géneros son inestables a un pH menor de 7 y otros moderadamente estables en medios ácidos. Al estar protegido el virión de la luz del sol por moco o heces, son relativamente estables al calor y son resistentes por algunos días a temperatura ambiente.^{12, 14} Debido a su naturaleza proteica son resistentes al éter, cloroformo y detergentes no iónicos.¹⁵ La replicación de los picornavirus se lleva a cabo en el citoplasma de la célula y se inicia mediante la adhesión del virus a los receptores celulares; los cuales son diversos dependiendo del virus, para el virus *Encefalomiocarditis* (V-EMC) se emplea el receptor VCAM-1 (molécula de adhesión a células vasculares) y una glicoforina A sialilada (sólo en eritrocitos). Otras moléculas de superficie celular sirven como receptores para los virus de esta familia, por ejemplo sulfato de heparina, lipoproteínas, proteínas extracelulares de matriz de unión y las integrinas.^{14, 16}

Agente etiológico.

De acuerdo con el ICTV (por sus siglas en inglés International Committee on Taxonomy of Viruses) la clasificación taxonómica del virus *Encefalomiocarditis* es: orden *Picornavirales*, familia *Picornaviridae*, género *Cardiovirus*, especie *Encefalomiocarditis*.¹³

Una característica particular del virus *Encefalomiocarditis* es la resistencia a pH ácidos (pH 3)¹⁵ y al éter. Tiene actividad hemaglutinante¹⁶ y produce efecto citopático en cultivo celular el cual se caracteriza por redondeamiento, picnosis y formación de sincitios.¹⁷⁻²²

El virus se puede multiplicar en cultivo de células de origen murino, porcino o primate.¹⁷ Las líneas celulares que se emplean para el aislamiento son: BHK (de sus siglas en inglés: baby hamster kidney), VERO (células de riñón de mono verde), HeLA (células de adenocarcinoma cérvico-uterino), PK15 (de sus siglas en inglés: porcine kidney), PFT (de sus siglas en inglés: pig fallopian tube) y ST (de sus siglas en inglés: swine testicle).²³ Un alto número de pases en cultivo celular reduce la virulencia y afecta el título hemaglutinante.¹⁷

El virus *Encefalomiocarditis* fue identificado por primera vez en 1940 en roedores inoculados con el virus de la poliomielitis (Cepa SK) proveniente de monos, posteriormente se identificó en una gran cantidad de mamíferos.^{17, 23-27} En el año de 1958 en Panamá¹⁷ fue la primera vez que se asoció este virus a problemas en la producción de cerdos, presentándose de dos formas, la primera con un aumento en el índice de lechones momificados y mortinatos, la segunda con muerte súbita en recién nacidos.^{17, 24, 26, 28, 29}

El hospedero natural del virus *Encefalomiocarditis* es el roedor; sin embargo, un amplio rango de especies son susceptibles a la infección. Se ha reportado en insectos, marsupiales, aves y mamíferos tanto silvestres como domésticos, incluso el hombre.^{23, 30} El cuadro clínico rara vez se presenta en seres humanos y animales domésticos, a excepción de la especie porcina. El virus ha sido aislado de cerdos, bovinos, primates, elefantes, leones, caprinos, ovinos, caninos, ratas, puercoespines, humanos, mosquitos y garrapatas.^{6, 17, 25}

El virus *Encefalomiocarditis* tiene distribución mundial y es ubicuo en las explotaciones porcinas, por ser endémico es poco frecuente observar brotes explosivos; sin embargo se tienen reportes de algunos brotes severos en Florida, Australia, Sudáfrica, Cuba, Brasil, Canadá, Grecia, Italia, Nueva Zelanda, Suiza, América del Norte y Venezuela, en este último país, ha tenido un comportamiento agresivo y un cuadro anatomopatológico que compromete la vida del cerdo afectado, registrándose altos índices de mortalidad, que han resultado en cuantiosas pérdidas económicas para el sector productivo porcino.^{23, 25}

Signos y lesiones.

La mortalidad es alta (90-100%) en cerdos de menos de una semana de edad.^{17, 23} En cerdos lactantes la enfermedad clínica se caracteriza a menudo por un curso agudo, observándose muerte súbita sin manifestaciones clínicas o pueden presentarse algunas como anorexia, debilidad, temblores, incoordinación, parálisis, disnea, fiebre, vómito, depresión y muerte en un lapso de dos a 11 días. En cerdos mayores a 30 días la infección es subclínica, pero en ocasiones puede producirse miocarditis, encefalitis y baja mortalidad. En cerdas primerizas dependiendo del momento de la infección, se observan reabsorciones, momificaciones, mortinatos o abortos.^{17, 23, 25, 31}

Las lesiones macroscópicas características en el cuadro agudo son discretas, se observa focos blancos en el miocardio, a veces acompañada de una meningoencefalitis no supurativa. Las lesiones que se presentan en los cerdos lactantes son insuficiencia cardíaca derecha, hepatomegalia, hidropericardio, hidrotórax, edema pulmonar, edema mesentérico y ascitis.^{17, 23, 26} El corazón puede estar agrandado, flácido y pálido, con hemorragias subepicárdicas petequiales^{17, 26} discretos focos amarillos o blancos y áreas de necrosis.^{17, 23, 26} Lesiones similares se pueden observar en el corazón de los fetos abortados.¹⁷ Puede observarse también un proceso congestivo en el bazo y en el riñón.

Los ganglios linfáticos se encuentran en su mayoría aumentados de volumen y congestionados.²³

Las lesiones microscópicas incluyen miocarditis no supurativa focal intersticial y necrosis del miocardio, infiltración de pequeñas cantidades de neutrófilos, macrófagos e infiltración linfocitaria perivascular no supurativa en tonsilas, corazón y encéfalo.^{17, 23, 26}

Epidemiología.

Los roedores han sido considerados el reservorio natural del virus y pueden no manifestar signos. El virus *Encefalomiocarditis* es ubicuo en esta especie, se mantiene en células del intestino (placas de Peyer) hasta por 59 días post-infección y es excretado en altas concentraciones en heces (29 días post-infección) y orina.^{6, 24, 27, 28, 32}

El mecanismo por el que se transfiere el virus de este reservorio al cerdo no ha sido completamente descrito, se cree que los cerdos se infectan al ingerir alimentos o agua contaminada con el virus excretado a través de la orina y heces por los roedores o por el consumo de los cadáveres de roedores que murieron a causa del virus *Encefalomiocarditis*. Por otra parte, la transmisión de este virus por contacto directo entre los cerdos ha sido demostrada recientemente de forma experimental²³ y la presencia del virus en las secreciones de los cerdos infectados es por un periodo no superior a una semana.^{17, 23, 25, 26} El cuadro clínico en cerdos depende de las cepas virales presentes en el hospedero que actúa como reservorio.²⁴ Se han aislado desde 1940 varias cepas antigénicamente similares como el *Colombia-SK*, *Encefalomiocarditis* cepa *R*, cepa *B*, cepa *D Mengo*, *MM* y *Maus-Elberfeld*, siendo considerados el mismo grupo del virus *Encefalomiocarditis (EMCV-1)*.^{25, 33, 34} Recientemente en el año 2012, se ha clasificado un nuevo serotipo del virus Encefalomiocarditis, el cual ha sido designado como EMCV-2, este virus a sido aislado de un ratón de campo europeo (*Apodemus sylvaticus*) de Alemania asociado a un brote zoonótico.³⁵

Patogénesis.

La vía de ingreso del virus es oronasal, entre los dos y cinco días post-infección se presenta la viremia, la cual se mantiene de dos a cuatro días,^{23, 24} la replicación viral se realiza en un diversos órganos y tejidos, principalmente en los tejidos linfáticos,²⁴ en el íleon (células M)²³, en el sistema nervioso central, corazón y páncreas.¹⁷ El virus se detecta en macrófagos y en miocardio a las 30 horas post-infección, a los tres días post-infección se puede aislar en hígado, pulmón, riñón²³ observándose una mayor concentración viral en bazo, ganglios linfáticos, cerebro y en especial el corazón.²⁴

Diagnóstico.

El diagnóstico presuntivo de la infección por el virus *Encefalomiocarditis* en granjas porcinas es poco frecuente; sin embargo, debe ser considerada en los casos en los que se observa una marcada disnea, muerte súbita en cerdos lactantes, y falla reproductiva en hembras, que incluya abortos.^{17, 23}

La detección de anticuerpos puede realizarse por medio de las técnicas de inhibición de la hemoaglutinación (IHA), inmunodifusión en gel de agar (IGDA), ensayo inmunoenzimático (ELISA) y seroneutralización (SN).^{23, 26} La presencia del agente viral puede ser confirmada por aislamiento en cultivo celular y RT-PCR.²⁵

Enfermedad del ojo azul.

Generalidades de la familia *Paramyxoviridae*.

Los virus pertenecientes a la familia *Paramyxoviridae* contienen un genoma de ARN (15-16 kb) de cadena sencilla no segmentada en sentido negativo, son virus envueltos, pleomórficos y miden de 150 a 300 nm de diámetro. Están conformados por una nucleocápside helicoidal de 600-800 nm de longitud, misma que se encuentra protegida por la envoltura lipoproteica.^{36, 37} Los virus de esta familia poseen 6 genes que

codifican hasta 10 proteínas (NP, P, V, C, I, M, F, HN y L) con funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas. Las proteínas estructurales son: Nucleoproteína (NP) que protege al genoma; Fosfoproteína (P) asociada a la nucleocápside y forma el complejo polimerasa con la Proteína de alto peso molecular (L), además tiene otras actividades relacionadas con la transcripción y replicación viral. Las proteínas localizadas en la membrana viral son: la proteína de Matriz (M) que participa en el ensamble de los viriones; la glicoproteína de fusión (F1-F2) es responsable de la fusión de las membranas celular y viral, la lisis de eritrocitos y formación de sincitios en cultivos celulares; la glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) es la responsable de reconocer y adherirse al receptor celular, además la fracción de neuraminidasa tiene la propiedad de hidrolizar ácidos siálicos celulares.³⁶⁻³⁹ La replicación de los virus pertenecientes a la familia se lleva a cabo en el citoplasma, el proceso inicia con el reconocimiento al receptor celular, adsorción en la superficie, fusión de membranas, penetración a la célula, desnudamiento, transcripción, replicación del genoma, ensamble y liberación de los viriones.⁴⁰

La familia *Paramyxoviridae* se divide en dos subfamilias: *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*, la primera subfamilia contempla siete géneros y la segunda dos,^{13, 36, 37} los datos generales de la familia se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2
Clasificación taxonómica de la familia *Paramyxoviridae*.¹³

<i>Familia: Paramyxoviridae</i>		
<i>Subfamilia:</i>	<i>Género:</i>	<i>Especie:</i>
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Aquaparamyxovirus</i>	<i>Paramyxovirus del salmón atlántico.</i>
	<i>Avulavirus.</i>	<i>Paramyxovirus aviar 2.</i> <i>Paramyxovirus aviar 3.</i> <i>Paramyxovirus aviar 4.</i> <i>Paramyxovirus aviar 5.</i> <i>Paramyxovirus aviar 6.</i> <i>Paramyxovirus aviar 7.</i> <i>Paramyxovirus aviar 8.</i> <i>Paramyxovirus aviar 9.</i> <i>Virus de la enfermedad de Newcastle.</i>
	<i>Ferlavirus.</i>	<i>Paramyxovirus Fer-de-Lance.</i>
	<i>Henipavirus.</i>	<i>Virus Hendra.</i> <i>Virus Nipha.</i>
	<i>Morbillivirus.</i>	<i>Virus del distemper canino.</i> <i>Morbillivirus de los cetáceos.</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</i>

		<i>bovina tipo 3</i> <i>Virus de la parainfluenza humana tipo 1.</i> <i>Virus de la parainfluenza humana tipo 3.</i> <i>Virus Sendai.</i> <i>Virus simico-10</i>
	<i>Rubulavirus.</i>	<i>Virus de la parainfluenza humana tipo 2.</i> <i>Virus de la parainfluenza humana tipo 4.</i> <i>Virus de la mapuera.</i> <i>Virus de la parotiditis.</i> <i>Virus parainfluenza tipo 5</i> <i>Rubulavirus porcino.</i> <i>Virus simico 41.</i>
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Metapneumovirus</i>	<i>Metapneumovirus aviar.</i> <i>Metapneumovirus humano.</i>
	<i>Pneumovirus</i>	<i>Virus respiratorio sincitial bovino.</i> <i>Virus respiratorio sincitial humano.</i> <i>Virus de la neumonía murina.</i>

La familia *Paramyxoviridae* tiene como característica la sensibilidad al calor, por lo que pierden rápidamente su infectividad al ser inactivados por tratamiento térmico a 56° C, por irradiación con rayos UV o X y son sensible a disolventes lipídicos, detergentes iónicos y no iónicos, formaldehído y agentes oxidantes.³⁷ Algunos géneros

poseen actividad hemaglutinante y la capacidad de producir efecto citopático sobre algunas líneas celulares.^{37, 41}

Agente etiológico.

De acuerdo al ICTV la clasificación taxonómica del virus causante de la enfermedad de ojo azul pertenece al orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus*, especie *Rubulavirus porcino* (RVP).¹³

Dentro de las características del *Rubulavirus porcino* se encuentran la formación de sincitios, capacidad hemolítica y hemaglutinante en eritrocitos de diferentes especies como cerdo, carnero, caprino, bovino, equino, perro, conejo, rata, ratón, hámster, cobayo, pollo, pavo y humano tipos A, B, AB y O; la hemaglutinación es posible por el reconocimiento del ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3Gal) expresado en la superficie de los eritrocitos de las especies anteriormente mencionados. La elución se presenta entre los 30 y 50 minutos de incubación a 37° C,⁴²⁻⁴⁴ la infectividad se elimina con tratamiento con β -propiolactona, éter, cloroformo, formalina, además estos tres últimos pueden eliminar la capacidad hemaglutinante. Se puede inactivar a 56° C a 4 horas.^{41, 42, 44}

El *Rubulavirus porcino* puede ser replicado en varias líneas celulares como PK-15, BHK-21, MDBK (por sus siglas en inglés: Mardin-Darby bovine kidney), ST, GMK (por sus siglas en inglés: green monkey kidney), CK (por sus siglas en inglés: canine kidney), BEK (por sus siglas en inglés: bovine embryonic kidney), IBRS-2 (por sus siglas en inglés: swine kidney), en cultivos celulares de riñón de gato, embrión de bovino, fibroblastos de embrión de pollo, dermis equina, células de feto humano, plexo coroideo porcino, plexo coroideo bovino y de pulmón de visón, causando efecto citopático en todas estas células.^{42, 44-46}

El virus causante de la enfermedad del ojo azul, fue detectado por primera vez en el municipio de La Piedad, Michoacán, México, en 1980, en cerdos con una patología caracterizada por encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la cornea. La enfermedad fue conocida entonces como “síndrome del ojo azul”.⁴¹ En esa misma época, comenzaron a reportarse brotes del síndrome del ojo azul en diferentes Estados, principalmente Jalisco y Guanajuato.⁴² Un par de años después de haber hecho la primera descripción del síndrome, se identificó al agente etiológico como un paramixovirus hemaglutinante.⁴⁷ En 1986, se realizó la primera caracterización del virus asociado al síndrome del ojo azul, el cual presentó propiedades biológicas y morfológicas parecidas a los virus que se agrupan en la familia *Paramyxoviridae* y se le nombró virus de La Piedad Michoacán. En 1995, el virus de La Piedad Michoacán es reconocido como una nueva especie, debido a su similitud con el virus de la parotiditis humana, virus de la parainfluenza humana-2 y -4 y el virus símico-5 y -41, quedando clasificado en el nuevo género de los *Rubulavirus*.^{36, 37}

Signos y lesiones.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de ojo azul son dependientes de la edad y distribución de receptores específicos en los órganos blanco.^{48, 49} Los cerdos lactantes son más susceptibles a la infección por el *Rubulavirus porcino*, puede producir daños a nivel de sistema nervioso, llegando a ocasionar muerte hasta en el 100% de los animales infectados. Otros signos que se presentan inicialmente son fiebre, lomo arqueado, acompañado por constipación o diarrea, postración y depresión. Posteriormente es factible observar incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, principalmente de los miembros posteriores, temblores musculares, posturas anormales, letargia, ceguera aparente y en ocasiones nistagmo. La opacidad de la córnea se observa

en menos del 10% de los lechones infectados. Frecuentemente la opacidad desaparece y los cerdos afectados no presentan más signos.^{42, 44}

En cerdos destetados, raramente se describen signos clínicos y la mortalidad se presenta del 1 al 4%. Es posible observar depresión, anorexia, incoordinación, opacidad corneal^{42, 44} y cuadros respiratorios.⁵⁰

En las hembras se presentan fallas reproductivas, reducción en la tasa de partos y fertilidad, incrementando el número de cerdas que retornan al estro, ocasionalmente se presentan abortos, aumento en el número de mortinatos y signos nerviosos. En brotes de la enfermedad del ojo azul recientes se ha encontrado un aumento en la mortalidad (> 15%).^{42, 44, 50}

En verracos se presenta anorexia y opacidad corneal, en algunos casos se puede observar inflamación testicular, turgencia con marcado edema, textura granulosa y atrofia (generalmente unilateral). Los parámetros reproductivos disminuyen, ocasionando un 29 a un 73% de infertilidad, la concentración espermática disminuye y aumenta el número de anormalidades espermáticas, en ocasiones puede presentarse azoospermia. Las lesiones se presentan en sistema nervioso central, sistema respiratorio, ojo y en órganos del tacto reproductor, se observa epididimitis, orquitis, atrofia testicular, destrucción del epitelio tubular y formación de granulomas. Debido a la presencia de lesiones severas, los verracos pueden presentar infertilidad.^{42, 44, 49, 51-53}

Epidemiología.

El cerdo es el único animal que se ha reportado como hospedador natural del *Rubulavirus porcino*. Experimentalmente el virus ha sido inoculado en ratones, ratas (cepa Wistar), embriones de pollo, conejos, perros y gatos, ninguno de estos animales presentó signos; sin embargo, las ratas, conejos, perros, gatos y pecaríes han presentado anticuerpos, posterior a la infección. En condiciones naturales se reportaron anticuerpos

en un murciélago frugívoro de la especie *Rhogeessa parvula*.^{44, 45, 54-56} La enfermedad ha sido reportada únicamente en México, las regiones productivas en donde se reporta frecuentemente son las que corresponden al centro y occidente.^{44, 57-59} El *Rubulavirus porcino* es excretado en secreciones nasales, orina y heces; se ha demostrado que los machos infectados experimentalmente excretan el virus en semen, sin embargo, la transmisión a cerdas a partir del semen no ha sido demostrada.^{45, 52, 53}

Patogénesis.

La vía de entrada natural del *Rubulavirus porcino* es la cavidad oronasal, la transmisión se produce principalmente por inhalación de aerosoles contaminados. Cuando el tamaño de la gota del aerosol es grande, ésta queda atrapada en la mucosa oronasal y el virus infecta células susceptibles para poder iniciar su replicación; cuando las gotas son muy pequeñas, los virus ingresan hasta el pulmón y se depositan en conductos aéreos inferiores. La replicación inicial del *Rubulavirus porcino* se lleva a cabo en la mucosa nasofaríngea y tejido linfático asociado. El virus es diseminado y transportado por eritrocitos y leucocitos, iniciando la infección sistémica, propagación y replicación en diversos órganos como bronquios, pulmones, sitios inmunoprivilegiados de órganos linfáticos y reproductivos. El virus puede ingresar al sistema nervioso central a través de las terminaciones del nervio olfatorio en la mucosa nasal, posteriormente se puede diseminar al hipocampo, tallo cerebral y cerebelo.^{38-40, 60}

El tropismo celular del *Rubulavirus porcino* se ve influenciado por la expresión de receptores en la célula, principalmente el ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3Gal), componente terminal de diversas glicoproteínas celulares.⁴³ Dicho receptor se ha identificado en tejidos del sistema nervioso central, como son en el bulbo olfatorio, corteza del lóbulo piriforme, hipocampo, tálamo, tallo cerebral y cerebelo, en el sistema respiratorio en mucosa nasal, tráquea, bronquios y pulmón y en el sistema

linfático en tonsilas y nódulos linfáticos de cerdos neonatos; en cerdos machos adultos se identificó principalmente en tejidos del sistema respiratorio y del tracto reproductor en testículo y epidídimo.⁴⁸

Diagnóstico.

Para el diagnóstico de este virus, las pruebas más utilizadas para detectar anticuerpos son inhibición de la hemaglutinación (IHA), seroneutralización (SN), ELISA e inmunoperoxidasa (IP). Para la detección del agente viral se emplea el aislamiento en cultivo celular, RT-PCR, RT-PCR en tiempo real e inmunohistoquímica.⁶⁰⁻⁶⁴

Influenza porcina.

Generalidades de la familia *Orthomyxoviridae*.

Los virus de la familia *Orthomyxoviridae* poseen un genoma ARN de cadena sencilla en sentido negativo segmentado (se presentan ocho segmentos en los géneros de *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* y *Isavirus*, siete en los géneros de *Influenzavirus C* y seis para el género *Thogotovirus*).^{65, 66} El genoma en su totalidad tiene un tamaño de 10-14.6 kb. Los viriones pueden ser pleomórficos, esféricos o filamentosos, con un diámetro de 80-120nm. Al genoma de los virus se asocia una nucleoproteína helicoidal y en este complejo se encuentran tres proteínas (PB1, PB2 y PA) que componen la ARN polimerasa viral. La familia *Orthomyxoviridae* contempla 5 géneros,⁵⁵⁻⁵⁷ que se presentan en el cuadro 3.^{13, 66-68}

Cuadro 3
Clasificación taxonómica de la familia *Orthomyxoviridae*.¹³

Familia: Orthomyxoviridae

<i>Género:</i>	<i>Especie:</i>
<i>Influenzavirus A.</i>	<i>Virus de influenza A.</i>
<i>Influenzavirus B.</i>	<i>Virus de influenza B.</i>
<i>Influenzavirus C.</i>	<i>Virus de influenza C.</i>
<i>Isavirus.</i>	<i>Virus de la anemia infecciosa del salmón.</i>
<i>Thogotovirus.</i>	<i>Virus Dhori.</i> <i>Virus Thogoto.</i>

El virion tiene una envoltura lipídica, con proyecciones filamentosas en forma de picos (peplómeros).^{65, 66}

Por poseer envoltura lipídica, los virus de esta familia son sensibles al calor, inactivándose a 56° C por un periodo de 30 minutos, al pH ácido (pH 3), a disolventes lipídicos, y son muy inestables en condiciones ambientales.⁶⁷

En la envoltura del virion, hay tres proteínas; la proteína de membrana de matriz 2 (M2), que es transmembranal y mediante la cual se forman canales de iones en tetrámeros, y dos glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), el género *Influenzavirus C* carecen de esta última. Los componentes internos son la proteína de membrana de matriz 1 (M1) y la ribonucleoproteína viral (RNP) que se encuentra agregada a los segmentos de ARN. Las proteínas de superficie cumplen con

tres funciones principales: unión al receptor y fusión de membranas (HA), escisión de los residuos de ácido siálico en la célula (NA) y la acidificación del virión que promueve el desnudamiento y liberación de la RNP en el citoplasma celular (M2).^{8, 67, 68}

Los virus de la familia *Orthomyxoviridae* se adhieren a las células a través de la activación de la hemaglutinina mediante los receptores N-acetil ácido neuramínico (ácido siálico) que contenga la célula receptora. El epitelio intestinal de las aves expresa un receptor SA α 2,3 Ga, en los humanos el receptor que se expresa en el tracto respiratorio superior tiene una conformación de SA α 2,6 Ga, mientras que la especie porcina posee ambos receptores.^{8, 10}

El virus ingresa a las células a través de endocitosis mediada por receptores, en el endosoma se libera la envoltura viral y los complejos de RNP en el citoplasma. La replicación de los orthomixovirus tiene lugar en el núcleo y la síntesis de proteínas en el citoplasma, el ensamblaje y liberación se producen a través de gemación de las membranas plasmáticas.⁶⁷ Una característica única del virus de la influenza es que toda la síntesis de ARN tiene lugar en el núcleo de la célula.^{8, 67}

La replicación del virus en aves puede ser en tracto respiratorio y en intestino, por lo que la transmisión puede ser por ingestión o inhalación. En mamíferos la transmisión puede ser a través de aerosoles. Estos virus cuentan con actividad para adsorber y aglutinar eritrocitos de ave (pollo y pavo), bovino y cuye.^{7, 67, 69}

Agente etiológico.

La clasificación taxonómica del virus causante de la enfermedad de influenza porcina, es: familia *Orthomyxoviridae*, género *Influenzavirus A*, especie *virus de influenza A*.¹³

El *Influenzavirus A porcino (VIP)* se describió por primera vez en 1918 en Estados Unidos, Hungría y China, asociada a brotes en granjas porcinas; que

coincidieron con la pandemia de influenza humana de 1918-1919; sin embargo, el primer aislamiento del *Influenzavirus A porcino* fue realizado por Richard Shope en 1930 (A/swine/Iowa/15/30 (H1N1)).^{67, 70-75} en la actualidad los porcinos también se infectan con otros subtipos del *Influenzavirus A*, como el subtipo H3N2 y H1N2.⁷⁶⁻⁷⁸

El *Influenzavirus A porcino* se aisló en Europa hasta los años 1940 y 1950 en Checoslovaquia, el Reino Unido y Alemania Occidental. En 1979 se detectó el virus en Bélgica y Francia. Los brotes más recientes en cerdos han sido ocasionados por cepas de origen aviar. La mayoría de las infecciones por virus de influenza en el cerdo se han asociado con el tipo A, no obstante, hay descripciones esporádicas de infecciones por los tipos B y C.⁷⁰

Los cerdos se han considerado como el "mezclador" de los *Influenzavirus A* por su capacidad de co-infectarse con cepas aviares, humanas y propias de los cerdos. Esto es posible porque los cerdos expresan en su epitelio traqueal receptores para los virus de tipo aviar (SA α 2,3Gal) y de tipo humano (SA α 2,6Gal).⁷

Signos y lesiones.

Después del periodo de incubación de 24-72 horas, se presentan los primeros signos de la enfermedad como fiebre, apatía, inapetencia, distrés respiratorio manifestándose como tos seca, estornudos, rinitis con secreción nasal u ocular y disnea. Los cerdos se recuperan del tercer al sexto día bajo condiciones de poco estrés (ambiental y microbiológico), presentándose pocas complicaciones y una tasa de mortalidad menor al 1%. Algunos cerdos pueden desarrollar bronconeumonía resultando en muerte. En hembras gestantes dependiendo del periodo en el que se infectan puede haber repeticiones, disminución en el tamaño de la camada, disminución de la viabilidad de los lechones y abortos, si la infección es causada por el subtipo H3N2.⁷

Los cerdos desarrollan neumonía broncointersticial que se caracteriza por lesiones pulmonares delimitadas en los lóbulos apicales y cardíacos, con hiperemia, consolidación, y la presencia de exudado inflamatorio en las vías respiratorias. Histológicamente, las superficies epiteliales se encuentran sin recubrimiento, hay neumonía y enfisema.⁷⁴ Aunque la mayoría de los cerdos se recuperan sin problemas, las consecuencias económicas de la influenza porcina son considerables, ya que los cerdos enfermos bajan de peso y/o sus ganancias de peso se reducen. Los brotes de influenza porcina se observan sobre todo a finales de otoño y en invierno, o después de la introducción de nuevos animales.^{7, 70}

Epidemiología.

Una característica fundamental en la ecología y epidemiología del *Influenzavirus A* es la transmisión entre especies, provocando que su distribución sea mundial.^{10, 79} Esta característica se favorece con la convivencia cercana entre diferentes especies como puede ser los humanos, aves, cerdos y otras especies.^{7, 70}

Las aves acuáticas son el reservorio natural de todos los subtipos conocidos del *Influenzavirus A*, mismos que pueden transmitirse a otras especies y establecer nuevos linajes en un nuevo hospedero. El virus es muy variable y es sometido a constante evolución genética. Estos mecanismos consisten en la acumulación de mutaciones puntuales en cada ciclo de replicación y eventos de reordenamiento que implica el intercambio de genes cuando una célula es co-infectada por virus de diferente origen. Estos mecanismos contribuyen a la aparición de nuevas variantes con la capacidad de transmitirse a nuevos hospederos y/o con potencial epidémico o pandémico.⁷⁹ El *Influenzavirus A* se ha adaptado a una variedad de especies y el entorno ambiental. Se sugiere que la capacidad de adaptación del *Influenzavirus A* podría generar otros

reservorios secundarios que estarían involucrados en el mantenimiento de la infección, evolución y transmisión.⁷⁶

Los *Influenzavirus A* infectan a un amplio rango de hospederos como humanos, cerdos, caballos, osos, gatos, bovinos, cabras, gibones, visones, búfalos de agua, yaks, mamíferos marinos y varias aves.^{70, 80} Estudios experimentales han indicado que las ratas pueden ser infectadas con el virus, la respuesta a la infección es transitoria y no hay manifestación de signos de la enfermedad.⁸¹ En un estudio de ingeniería genética del *Influenzavirus A*, se ha sugerido que algunos de estos virus pueden tener genes, ya sea del virus H1N1 de 1918 o el de *Influenzavirus A aviar* altamente patógeno (H5N1), induciendo una enfermedad grave en ratones y macacos a través de activación aberrante y persistente de las respuestas pro-inflamatorias con citocinas y quimiocinas.⁴

Patogenia.

El ingreso del virus es por vía nasofaríngea a través de aerosoles, generándose una rápida distribución de la infección en el epitelio de la cavidad nasal y vías respiratorias. La viremia ocurre rara vez. La infección puede progresar en pocas horas y comprometer las vías respiratorias. El virus se replica en la mucosa nasal, tonsilas, tráquea y linfonodos bronquiales y pulmonares. Después del periodo de incubación (de uno a tres días) el virus es llevado en las secreciones nasales durante la etapa febril aguda, manifestándose signos. La morbilidad es del 100%, mientras que la mortalidad es muy baja (1%).^{7, 70}

Diagnóstico.

Para el diagnóstico de la infección por el de *Influenzavirus A* porcina se puede usar la prueba de RT-PCR, aislamiento viral en embrión de pollo o en cultivo celular MDCK.^{7, 70} La identificación serológica de los subtipos virales se realiza empleando sueros hiperinmunes específicos y la identificación genética mediante la secuenciación

de la hemaglutinina y neuraminidasa. El virus puede detectarse en muestras de tejido por inmunofluorescencia o por inmunohistoquímica.⁶¹ Para la detección de anticuerpos se realizan pruebas serológicas como inhibición de la hemaglutinación y ELISA. Las pruebas serológicas se emplean para detectar animales que han sido expuestos a los virus, ya que algunas enfermedades son de curso agudo y resulta difícil la detección del agente causal; también se usan para determinar el estado inmune de cerdos en diferentes edades, el nivel inmunológico de la pira o los niveles de anticuerpos vacunales.⁷⁵

JUSTIFICACIÓN.

La importancia de las enfermedades de encefalomiocarditis, ojo azul y de influenza porcina radica en el retraso en el crecimiento de los cerdos infectados y en la falla reproductiva en las hembras,⁷⁴ lo que ocasiona grandes pérdidas económicas,^{17, 23} la infección simple o coinfección pueden no generar mortalidad.⁷⁴

En años recientes, las zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales domésticos han sido objeto de mayor atención en el mundo.⁶ Sin embargo, aun sigue habiendo un conocimiento limitado de los riesgos de enfermedades zoonóticas e inter-especies de los animales domésticos.² Además, la identificación de nuevas adaptaciones que permitan a los virus propagarse de forma eficiente, interactuar con receptores de diferentes especies y causar la enfermedad en diversos hospederos a través de una mayor replicación viral o la neutralización de la respuesta inmune innata y adaptativa, debe ser ampliada.⁴

En este contexto, los roedores pueden ser potenciales nuevos hospederos para diversos virus de origen porcino, manteniendo la presencia de estos agentes en su organismo y excretando altas cantidades de virus al ambiente, potencializando su diseminación.⁸²⁻⁸⁴

Actualmente los roedores son una de las especies animales de mayor población a nivel mundial, debido a su capacidad de adaptación y potencial reproductivo. Las especies más conocidas son *Rattus norvegicus* (rata noruega), *Rattus rattus* (rata negra) y *Mus musculus* (ratón doméstico), denominados roedores comensales por compartir la vivienda y alimentos con el hombre. Existen especies silvestres, que tienen poco contacto con el hombre y sirven de reservorio de agentes infecciosos por un largo tiempo. Los roedores comensales por sus hábitos de vida tienen contacto con especies silvestres produciéndose la infección o contagio de forma directa ó indirecta. Al

compartir el hábitat con el hombre y animales domésticos, se produce el brote de enfermedad o infección.⁸⁵

En México se ha evaluado la presencia de anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A* únicamente en cerdos,^{59, 68} evidenciando su endemismo en la región porcícola del bajío. A nivel nacional no se han realizado estudios que describan la presencia de anticuerpos contra el virus *Encefalomiocarditis* en cerdos y en roedores.

En roedores se han realizado estudios de infección experimental con el virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A*.^{4, 23, 55, 71, 72} La transmisión de la infección por *Encefalomiocarditis* ha sido demostrada en condiciones naturales,⁹ sin embargo no se tiene conocimiento de la posible transmisión natural de *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A*.

Al conocer como se lleva a cabo la diseminación de los virus es posible controlar su difusión,¹ por lo que se requiere establecer el papel que tiene los roedores en la transmisión de los virus causantes de las enfermedades de encefalomiocarditis, ojo azul y de influenza porcina.

HIPÓTESIS.

Los roedores (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*), son transmisores para los virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* y de *Influenzavirus A* dentro de una unidad de producción porcina.

OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar la presencia de anticuerpos para los virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A* en cerdos y roedores que habitan en una granja para determinar la transmisión inter-especies.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Detectar mediante la prueba inhibición de la hemaglutinación la presencia de anticuerpos contra *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A* en sueros de cerdos y roedores.
- Confirmar la presencia de anticuerpos contra *Encefalomiocarditis* mediante la prueba de seroneutralización.
- Asociar la seroprevalencia de *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* y el *Influenzavirus A* y la participación de los roedores como transmisor de estos agentes.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Cepas virales y células.

Se emplearon el virus *Encefalomiocarditis* (ATCC: VR-129B, aislamiento de chimpancé), la cepa PAC-3 (Jalisco/1992) del *Rubulavirus porcino* (No. acceso GenBank: EF413173), y los virus A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1) (No. acceso GenBank: K00992) y A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) (No. acceso GenBank: AF153234) de *Influenzavirus A*. Se utilizó la línea celular MDBK (NBL-1; ATCC: CCL-22), con medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (ATCC: 30-2021), para la replicación del virus *Encefalomiocarditis*, se inocularon las células y se dejó incubar a 37° C por 72 a 96 horas, se observaron los cultivos cada 24 horas para identificar el efecto citopático, el cual consistió en redondeamiento celular, formación de sincitios y desprendimiento celular. Los cultivos fueron congelados a -70° C, posteriormente el sobrenadante obtenido, se centrifugó a 2500 × g durante 10 minutos. El lote viral fue titulado mediante la prueba de hemaglutinación, empleando eritrocitos de pollo al 0.5%, por último se realizaron alícuotas del lote viral y se almacenaron a -70° C.

Se empleó la línea celular MDCK (NBL-2; ATCC: CCL-34) para la replicación del *Rubulavirus porcino* cepa PAC-3(Jalisco/1992), los cultivos fueron mantenidos con medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino. Posterior a la infección las células se dejaron incubar por 96 horas, en este tiempo se observó el efecto citopático, el cual consistía en formación de sincitios y desprendimiento del monoestrato. Se tituló y realizaron alícuotas de acuerdo con lo descrito para *Encefalomiocarditis*. Las líneas celulares empleadas en este estudio fueron donadas por la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales, como norma de calidad las células fueron

evaluadas por la Comisión y resultaron libres de contaminación por *Mycoplasma* sp. y diarrea viral bovina.

Las cepas virales del *Influenzavirus A* A/swine/New Jersey/11/76 (H1N1) y A/swine/Minnesota/9088-2/98 (H3N2) fueron replicados mediante la utilización de embriones de pollo de nueve días de edad, se inocularon por cavidad alantoidea con 0.2ml de antígeno viral y se incubó por 72 horas, los embriones fueron refrigerados y posteriormente se realizó la cosecha del líquido alantoideo. El líquido colectado se centrifugó a $2500 \times g$ por 10 minutos, Se tituló y realizaron alícuotas de acuerdo con lo descrito para *Encefalomiocarditis*.

Animales.

Se obtuvieron muestras sanguíneas empleando tubos vacutainer sin anticoagulante por vía yugular de cerdos en una granja de ciclo completo ubicada en el municipio de La Piedad Michoacán, misma que no ha presentado antecedentes clínicos recientes de enfermedad causada por *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A*, la historia clínica indica que existió un aumento en la presentación de abortos dos años antes del muestreo. El tipo de muestreo fue transversal, estratificado por edades y etapas reproductivas, completamente al azar. Las muestras fueron colectadas de hembras de diferentes partos (nueve, cinco, tres y dos partos), hembras de reemplazo y de cerdos en crecimiento calostrados de un mes a seis meses de edad. El tamaño de muestra fue ajustado de acuerdo con estudios de perfiles serológicos en cerdos.⁶¹ Considerando una prevalencia estimada del 20% general para los tres virus a analizar y con un intervalo de confianza del 95%.⁸⁶⁻⁸⁸

La captura, obtención de las muestras de sangre y eutanasia de los roedores se efectuó conforme a procedimientos previamente descritos en otros estudios. Se colocaron trampas tipo “Sherman” y trampas metálicas para ratones en diferentes áreas

de la granja. Los roedores capturados fueron anestesiados en una cámara con éter, posteriormente se obtuvieron las muestras sanguíneas mediante punción cardiaca y se realizó la eutanasia mediante dislocación cervical.⁸⁹

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a $300 \times g$ durante 10 minutos para la separación y obtención de suero, las muestras fueron congeladas a -20°C hasta la realización de las pruebas serológicas.

Serología.

Tratamiento de los sueros.

Los sueros fueron sometidos a un tratamiento previo a la realización de la prueba de inhibición de la hemaglutinación con la finalidad de eliminar factores inespecíficos. El tratamiento consistió en mantener los sueros a 56°C por 30 minutos, para la inactivación del complemento. Posteriormente, a $50\mu\text{l}$ de suero se le agregaron $100\mu\text{l}$ de caolín y $100\mu\text{l}$ de eritrocitos de pollo al 5%, se homogenizó y mantuvo en refrigeración durante una noche, para eliminar aglutininas y otras proteínas inespecíficas inhibidoras de la hemaglutinación. Por último, se centrifugaron a $1800 \times g$ por 5 minutos para la sedimentación del caolín y los eritrocitos y se obtuvo el suero, mismo que fue empleado en la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

Inhibición de la hemaglutinación.

Se emplearon placas de 96 pozos de fondo en "U", se colocaron $50\mu\text{l}$ de PBS 1X (de las siglas en inglés: phosphate buffered solution) en todos los pozos a partir de la columna "B" para realizar diluciones dobles de los sueros. Las diluciones empleadas para la prueba con *Encefalomiocarditis* y *Rubulavirus porcino* fueron de 1:8 a 1:1024, para la prueba con *Influenzavirus A porcino* fueron de 1:40 a 1:5120.

En cada prueba, los antígenos de referencia fueron ajustados a 8 unidades hemaglutinantes, posteriormente se agregaron $50\mu\text{l}$ a todos los pozos de la placa y se

dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Una vez concluido el periodo de incubación, se agregaron 50µl de eritrocitos de pollo al 0.5% en cada pozo de la placa y se realizó la lectura de la prueba cada 15 minutos durante una hora. El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se definió como la máxima dilución en la que el suero fue capaz de inhibir la capacidad hemaglutinante de los antígenos. Se consideraron positivos los sueros que presentaron título $\geq 1:16$ con los virus *Encefalomiocarditis* y *Rubulavirus porcino*, para el *Influenzavirus A porcino* sueros con títulos $\geq 1:80$. Los títulos obtenidos fueron transformados a logaritmo base dos.

Para la validación de las pruebas serológicas de *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A porcino* se contaron con suero de cerdos positivos y negativos, los sueros fueron obtenidos en estudios previos de infección experimental.⁹⁰ Para la prueba de inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización de *Encefalomiocarditis* se empleó un suero positivo del banco de sueros de Ames, Iowa, donado por el Dr. J. Kreese. El suero testigo negativo correspondía a un suero de lechón sin calostroar, procedente de una granja seronegativa y sin cuadros clínicos asociados a *Encefalomiocarditis*. Este suero fue negativo a la inhibición de la hemaglutinación de *Encefalomiocarditis* y posteriormente se comprobó la ausencia de anticuerpos por seroneutralización.

Titulación viral.

Se realizó la titulación del virus *Encefalomiocarditis* en cultivo celular. Se emplearon placas de fondo plano para el cultivo de células MDBK, cuando el monoestato presentó un 80% de confluencia (24 horas), se retiró el medio de cultivo y se agregaron 50µl de virus preparado en diluciones decuples (10^{-1} a 10^{-9}), se contó con un testigo positivo del virus (virus sin diluir) y testigo negativo (células sin infectar), se dejó incubar por una hora a 37° C. Posteriormente se ajustó a 200µl con medio de

cultivo con el 5% de suero fetal bovino, se incubó a 37° C por 96 horas. Se observó diariamente para la identificación del efecto citopático. Se calculó el título en dosis infectantes en cultivo celular 50% (DICC_{50%}), con el método de Reed y Muench.⁹¹

Seroneutralización.

Se realizaron diluciones dobles de los sueros en un volumen de 50µl con medio de cultivo sin suero (1:2 a 1:256). Se agregaron 50µl del virus *Encefalomiocarditis* ajustado a 300 DICC_{50%} y la mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se agregaron 100µl de células MDBK en suspensión (1×10^5 /ml)⁹¹ con medio de cultivo con el 5% de suero fetal bovino. Las placas fueron incubadas por 96 horas a 37° C y posteriormente colectaron 50µl de los sobrenadantes para confrontarlos con un volumen similar de eritrocitos de pollo al 0.5%.

El título de anticuerpos neutralizantes se expresó como la máxima dilución en la que el suero fue capaz de neutralizar la multiplicación del virus *Encefalomiocarditis* en el cultivo celular, evidenciado por su capacidad de producir hemaglutinación. Se consideraron positivos los sueros que presentaron título $\geq 1:16$. Los resultados obtenidos fueron convertidos a logaritmo base dos.

Análisis estadístico.

Con los datos de la prueba de inhibición de la hemaglutinación y los de la seroneutralización para el virus *Encefalomiocarditis* se realizó una prueba de contingencia mediante la Ji cuadrada (X^2), con la finalidad de obtener los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas, se calculó el coeficiente de Kappa de Cohen, que indica la concordancia o conformidad entre ambas pruebas. Para obtener la precisión de las pruebas se obtuvo el valor predictivo positivo (VPP) de la prueba de inhibición de la hemaglutinación, el cual indica la proporción de los sueros positivos que realmente son positivos evaluados por seroneutralización, el valor predictivo

negativo (VPN) de la prueba de inhibición de la hemaglutinación indica la proporción de los sueros negativos que realmente son negativos mediante la seroneutralización.⁹²⁻⁹⁴

Se analizaron los datos de la prueba de inhibición de la hemaglutinación positivos en cerdos y roedores mediante una prueba de independencia, con la finalidad de asociar la presencia de anticuerpos contra los virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A porcino* detectados en los cerdos y si existe alguna relación con la presencia de anticuerpos detectados en los roedores.

RESULTADOS.

Lotes virales.

Se inocularon células MDBK con virus *Encefalomiocarditis*, se observaron diariamente los cultivos celulares, detectando efecto citopático a las 96 horas post-infección (Figura 1 y 2).

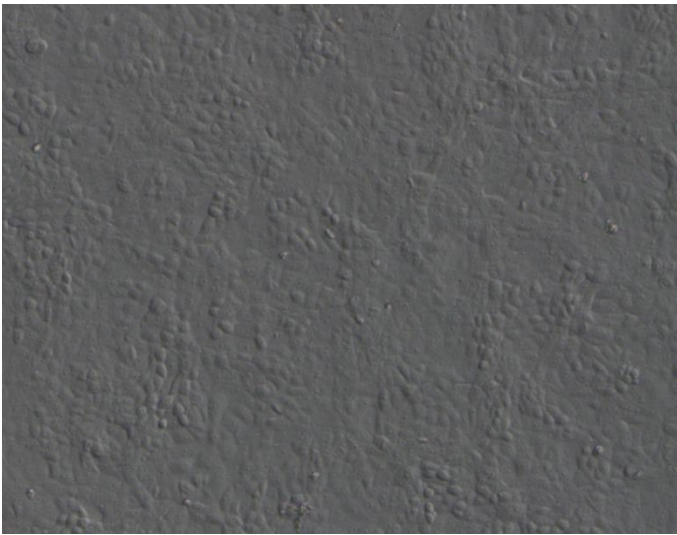


Figura 1. Cultivo de células MDBK sin infectar (testigo negativo) a las 96 horas de crecimiento, observación en microscopio de campo claro a 10x.

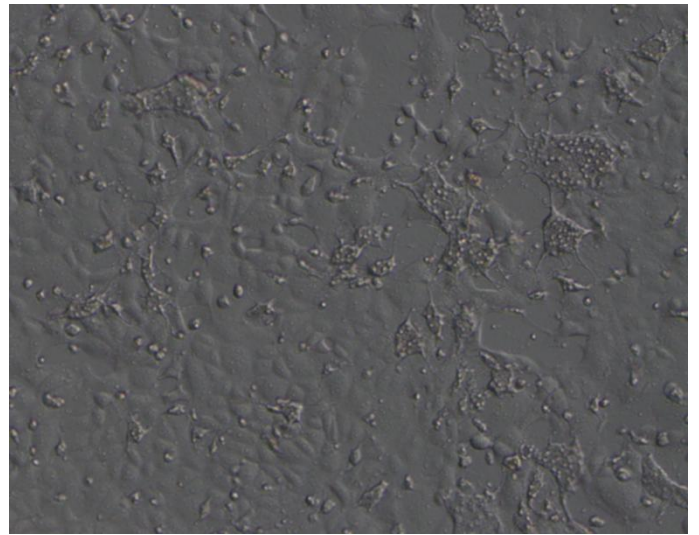


Figura 2. Efecto citopático del virus *Encefalomiocarditis* en cultivos de células MDBK a las 96 horas post- infección, observación en microscopio de campo claro a 10x.

La replicación del *Rubulavirus porcino* cepa PAC-3(Jalisco/1992) se realizó en células MDCK, se monitoreó diariamente observando la presencia del efecto citopático en el monoestrato a las 96 horas post-infección (Figura 3 y 4).

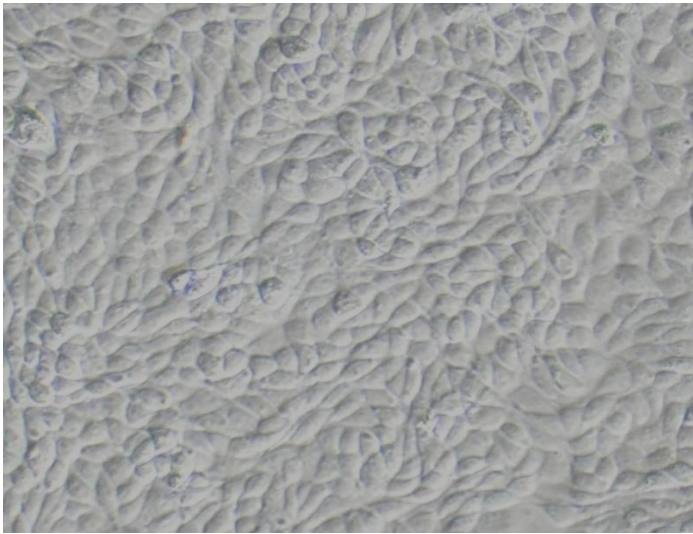


Figura 3. Cultivo de células MDCK sin infectar (testigo negativo) a las 96 horas de crecimiento, observación en microscopio de campo claro a 20x.

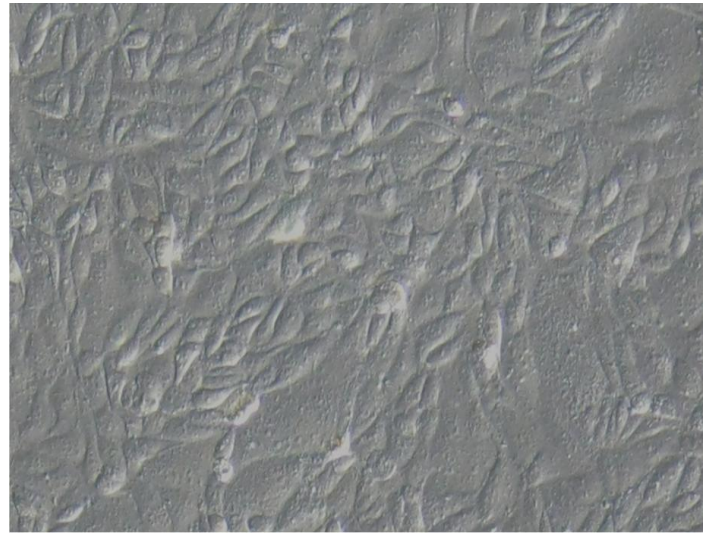


Figura 4. Efecto citopático del virus *Rubulavirus porcino*, cepa PAC3 en cultivos de células MDCK a las 96 horas post- infección, observación en microscopio de campo claro a 20x.

Para el *Influenzavirus A* se emplearon embriones de pollo, inoculados en la cavidad alantoidea y se revisaron a las 24 horas post-infección. Los embriones muertos se desecharon, el resto de los embriones se mantuvieron hasta las 72 horas post-infección (Figura 5).



Figura 5. Infección en cavidad alantoidea de embriones de pollo de 9 días de edad con los *Influenzavirus A porcinos*.

Muestras.

Se obtuvieron 136 muestras sanguíneas de los cerdos de la granja, siendo 81 muestras de hembras reproductoras, de las cuales 24 fueron hembras de reemplazo, 16 de segundo parto, 17 de tercer parto, 19 hembras de quinto parto y cinco de noveno parto. Las 55 muestras restantes fueron de cerdos en crecimiento, siete de un mes de edad, siete de dos meses de edad, 15 de tres meses, 11 de cuatro meses, 10 de cinco meses y cinco de seis meses de edad.

Se obtuvieron 23 muestras de roedores de diferentes áreas de la granja (almacén de alimento, área de gestación, destete y engorda), cinco pertenecían al género *Mus musculus* y 18 al género *Rattus* sp., de estas últimas 14 fueron identificadas como *Rattus norvegicus* y cuatro como *Rattus rattus*; teniendo una proporción en total de tres machos por cada hembra (3:1).

Serología.

Inhibición de la hemaglutinación.

De las 136 muestras sanguíneas que se obtuvieron de los cerdos, un total de 17 muestras fueron positivas a la presencia de anticuerpos para el virus *Encefalomiocarditis*, 21 muestras fueron positivas para *Rubulavirus porcino*, 116 muestras fueron positivas a la presencia de anticuerpos para el *Influenza virus A*, subtipo H1N1 y para el subtipo H3N2, 125 muestras resultaron positivas.

De las 23 muestras sanguíneas de roedores, solamente cuatro muestras fueron positivas para el virus *Encefalomiocarditis*, para los virus restantes fueron negativas (Figura 6).

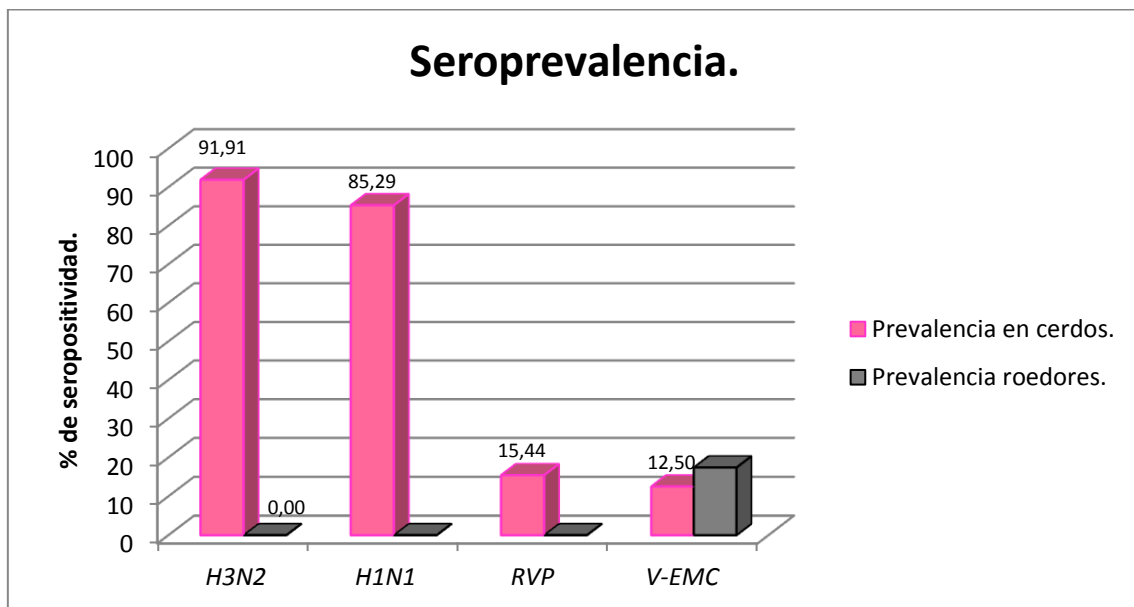


Figura 6. Seroprevalencia general en cerdos y roedores para *Encefalomiocarditis* (V-EMC), *Rubulavirus porcino* (RVP) e *Influenzavirus A* virus subtipo H1N1 y H3N2.

Seropositividad en hembras reproductoras.

Las hembras reproductoras mostraron una seropositividad mayor para el *Influenzavirus A* subtipo H3N2, siendo de 81 muestras positivas, seguida del subtipo H1N1 con 68 muestras positivas; sin embargo, para *Rubulavirus porcino* se registraron

18 hembras positivas, en las de tercer parto (una muestra positiva), de quinto (12 muestras positivas) y de noveno parto (cinco muestras positivas). Para *Encefalomiocarditis* se registraron 17 hembras positivas, en las de tercer parto (una muestra positiva), de quinto parto (11 muestras positivas) y de noveno parto (cinco muestras positivas de cinco) (Figura 7).

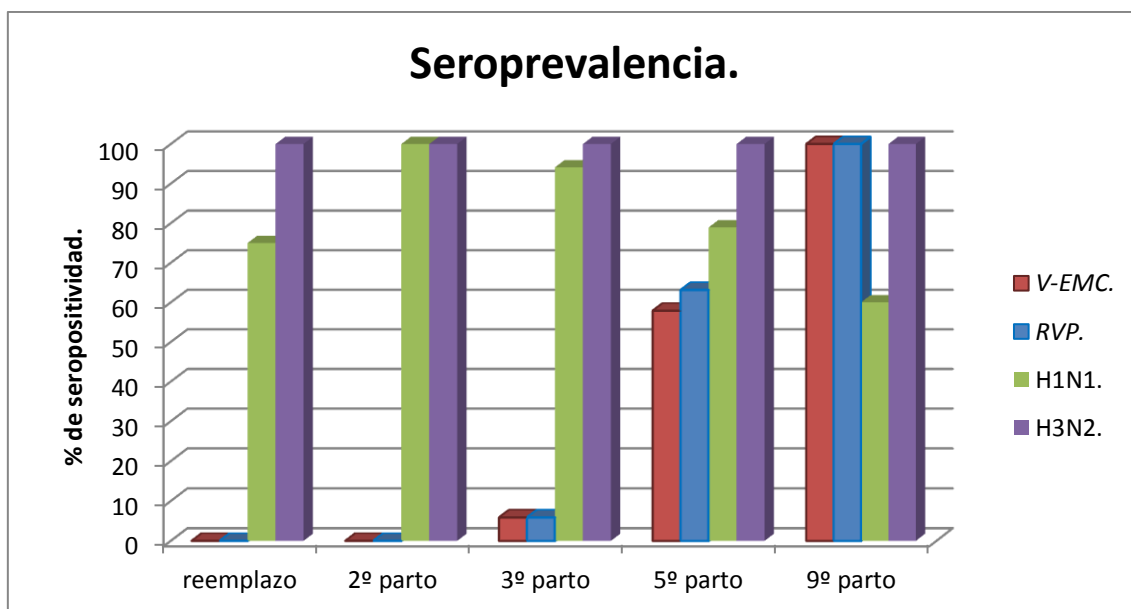


Figura 7. Seroprevalencia en hembras reproductoras (por parición) para *Encefalomiocarditis* (V-EMC), *Rubulavirus porcino* (RVP) e *Influenzavirus A* virus subtipo H1N1 y H3N2.

Seropositividad en cerdos en crecimiento.

Se registró seropositividad en los cerdos de un mes de edad, para *Rubulavirus porcino* (tres muestras positivas) y para los dos subtipos del virus de *Influenzavirus A porcino* (cinco muestras positivas). A partir de los dos meses de edad se observó seroprevalencia para los subtipos H1N1 (41 muestras positivas) y H3N2 (37 muestras positivas), siendo mayor en los cerdos de dos meses (siete muestras positivas), tres meses (15 muestras positivas) y seis meses de edad (cinco muestras positivas) para el subtipo H1N1 y para el subtipo H3N2 fue mayor para los cerdos de dos (siete muestras

positivas), cinco (10 muestras positivas) y seis meses de edad (cinco muestras positivas). Para el virus *Encefalomiocarditis* no se presentó seropositividad (Figura 8).

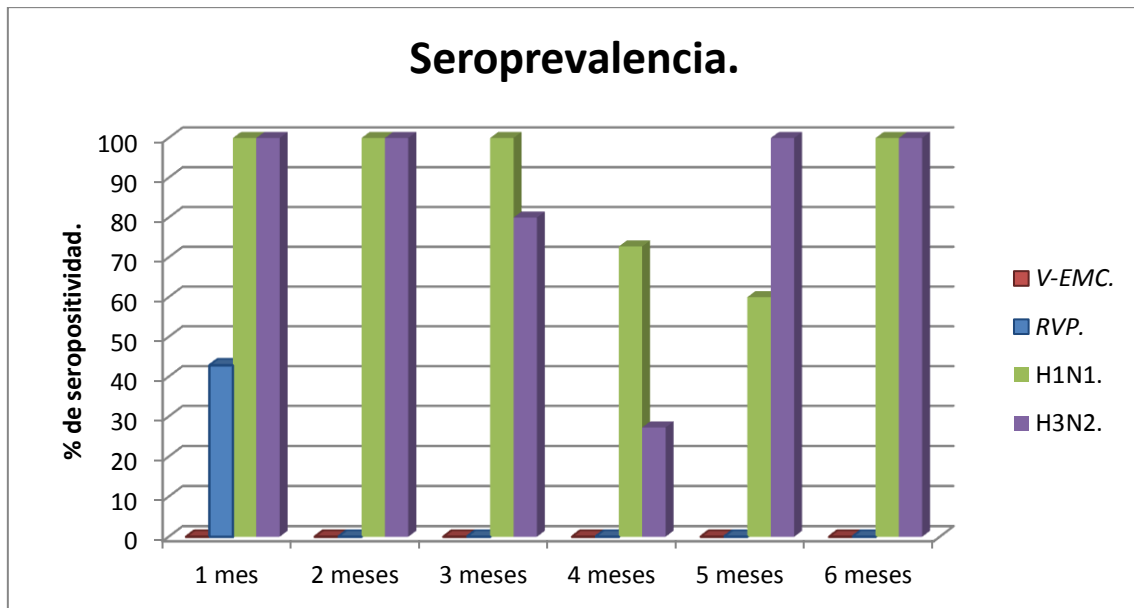


Figura 8. Seroprevalencia en cerdos en crecimiento por edades para *Encefalomiocarditis* (V-EMC), *Rubulavirus porcino* (RVP) e *Influenzavirus A* virus subtipo H1N1 y H3N2.

Títulos de anticuerpos por virus.

En general, las hembras reproductoras mostraron títulos para los virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A porcino*. Los cerdos en crecimiento mostraron títulos al *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A porcino*. Los roedores solo para el virus *Encefalomiocarditis*, el promedio de los títulos de anticuerpos en logaritmo base dos en ambas especies se muestran en la figura 9.

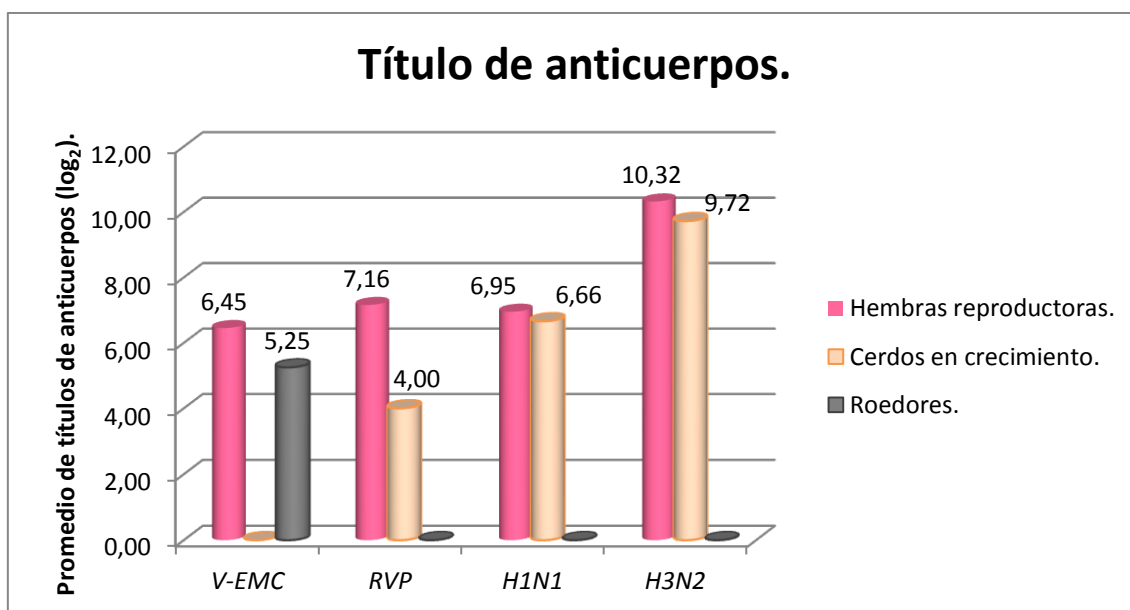


Figura 9. Promedio del título de anticuerpos en logaritmo base dos en las hembras, cerdos en crecimiento y roedores, contra los virus *Encefalomiocarditis* (V-EMC), *Rubulavirus porcino* (RVP) e *Influenzavirus A* subtipos H1N1 y H3N2.

Virus Encefalomiocarditis (V-EMC).

Las hembras de noveno, quinto y tercer parto mostraron presencia de anticuerpos, el promedio de los títulos se muestra en el cuadro 4.

Rubulavirus porcino (RVP).

Para *Rubulavirus porcino*, las hembras de tercer, quinto y noveno parto, resultaron positivas a la inhibición de la hemaglutinación. Únicamente los cerdos en crecimiento de un mes de edad mostraron títulos, el promedio de los títulos obtenidos se presenta en el cuadro 4.

Influenzavirus A porcino subtipo H1N1 (VIP H1N1).

Se observaron anticuerpos contra el *Influenzavirus A* subtipo H1N1 en hembras de todas las pariciones (cuadro 4). Los cerdos en crecimiento presentaron anticuerpos

contra el subtipo H1N1, los promedios del título de anticuerpos se muestran en el cuadro 5.

Influenzavirus A porcino subtipo H3N2 (VIP H3N2).

Las hembras reproductoras presentaron anticuerpos para este virus con títulos altos, en todas las pariciones (cuadro 4). Para el caso de cerdos en crecimiento los títulos de anticuerpos presentes en los sueros, fueron similares para los cerdos de un mes, cuatro, cinco y seis meses de edad (cuadro 5).

Cuadro 4

Inhibición de la hemaglutinación (IHA) y seroneutralización (SN) para virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A* en hembras reproductoras.

No. de paridad	No. de muestras	No. de positivos V-EMC, IHA	Promedio del título (log ₂)	No. de positivos RVP, IHA	Promedio del título (log ₂)	No. de positivos H1N1, IHA	Promedio del título (log ₂)	No. de positivos H3N2, IHA	Promedio del título (log ₂)	No. de positivos V-EMC, SN	Promedio del título (log ₂)
1	24	0	0	0	0	18	6.82	24	10.32	1	4
2	16	0	0	0	0	16	7.01	16	10.32	0	0
3	17	1	6	1	8	16	6.95	17	10.32	1	8
5	19	11	6.36	12	6.92	15	6.99	19	10.32	13	7.61
9	5	5	7	5	7.4	3	6.99	5	10.32	5	8
Total	81	17	6.45	18	7.44	68	6.95	81	10.32	20	6.9

V-EMC: Virus *Encefalomiocarditis*; RVP: *Rubulavirus porcino*; H1N1: *Influenzavirus A porcino* subtipo H1N1; H3N2: *Influenzavirus A porcino* subtipo H3N2.

Cuadro 5

Inhibición de la hemaglutinación (IHA) y seroneutralización (SN) para virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A* en cerdos en crecimiento.

Edad meses	No. de muestras	No. de positivos V-EMC, IHA	Promedio del título (log ₂)	No. de positivos RVP, IHA	Promedio del título (log ₂)	No. de positivos H1N1, IHA	Promedio del título (log ₂)	No. de positivos H3N2, IHA	Promedio del título (log ₂)	No. de positivos V-EMC, SN	Promedio del título (log ₂)
1	7	0	0	3	4	7	6.46	7	10.32	3	7
2	7	0	0	0	0	7	6.75	7	9.89	1	5
3	15	0	0	0	0	15	6.92	12	7.15	0	0
4	11	0	0	0	0	8	6.45	3	10.32	0	0
5	10	0	0	0	0	6	6.66	10	10.32	0	0
6	5	0	0	0	0	5	6.72	5	10.32	0	0
Total	55	0	0	3	4	48	6.66	44	9.72	4	6

V-EMC: Virus *Encefalomiocarditis*; RVP: *Rubulavirus porcino*; H1N1: *Influenzavirus A porcino* subtipo H1N1; H3N2: *Influenzavirus A porcino* subtipo H3N2.

Seroneutralización.

La seroprevalencia obtenida mediante la prueba de seroneutralización fue mayor en las hembras reproductoras y en los cerdos en crecimiento, mientras que en los roedores fue igual en comparación con la prueba de inhibición de la hemaglutinación (Figura 10).

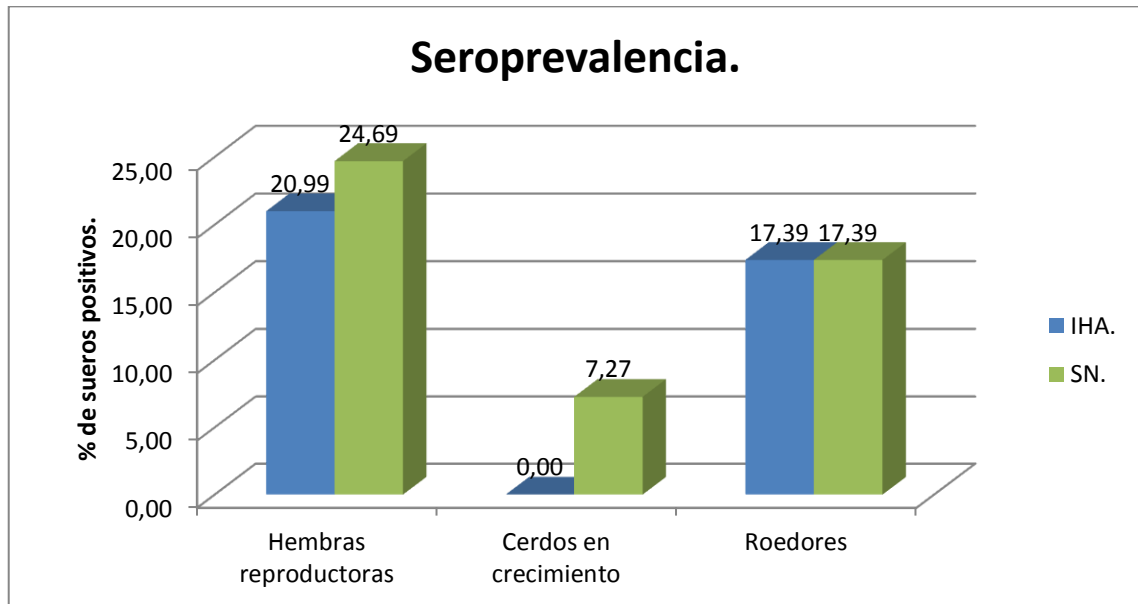


Figura 10. Comparación de la seroprevalencia de los sueros de hembras reproductoras, cerdos en crecimiento y roedores mediante las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización para el virus *Encefalomiocarditis*.

El promedio de los títulos obtenidos en la prueba de seroneutralización para los sueros de las hembras reproductoras se muestran en el cuadro 4 y el de los cerdos en crecimiento se muestra en el cuadro 5.

Análisis estadístico.

Mediante el cuadro de contingencia de Ji cuadrada, se pudo obtener la sensibilidad y la especificidad de la prueba de inhibición de la hemaglutinación ante la prueba de seroneutralización, resultando una sensibilidad de 68.75% y especificidad del

96.30%. El valor que se obtuvo para el coeficiente de Kappa de Cohen fue de 0.69. El valor predictivo positivo fue de 0.815 y de 0.929 para el valor predictivo negativo (Cuadro 6).

Cuadro 6

Comparación de los resultados de inhibición de la hemaglutinación y de seroneutralización mediante la Ji cuadrada para la detección de anticuerpos contra el virus *Encefalomiocarditis*.

IHA.	SN.		
	+	-	Total.
+	22	5	27
-	10	130	140
Total.	32	135	167

Sensibilidad: 68.75%

Intervalo de Confianza: 54.7% a 77.8%

Especificidad: 96.30%

Intervalo de Confianza: 93.0% a 98.4%

Kappa: 0.692

Valor predictivo positivo: 81.5%

Intervalo de Confianza: 64.8% a 92.2%

Valor predictivo negativo: 92.9%

Intervalo de Confianza: 89.6% a 94.9%

Sensibilidad=	$\frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}}$
Especificidad=	$\frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}}$
Kappa=	$\frac{\text{concordancia observada} - \text{concordancia aleatoria}}{1 - \text{concordancia aleatoria}}$
VPP =	$\frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}}$
VPN =	$\frac{\text{verdaderos negativo}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}}$

En el análisis de independencia que se empleó para asociar la presencia de seropositividad en roedores y cerdos, se obtuvo un valor de $P=0.410$, indicado una asociación dependiente en la seropositividad de ambas especies para *Encefalomiocarditis* (Cuadro 7).

Cuadro 7

Análisis de independencia de la presencia de anticuerpos contra el virus *Encefalomiocarditis* obtenidos mediante inhibición de la hemaglutinación en cerdos y roedores.

Presencia de anticuerpos con inhibición de la hemaglutinación.	Animales.		
	Cerdos.	Roedores.	
+	17	4	21
-	119	19	138
	136	2	159

$p = 0.410$

$$p = \frac{n(a*d - b*c)^2}{(a+b)*(a+c)*(c+d)*(b+d)}$$

DISCUSIÓN.

En los estudios que se han realizado con el virus *Encefalomiocarditis* se han utilizado comúnmente las líneas celulares BHK-21 (principalmente), HeLa, PK y VERO.^{34, 95} En este estudio se empleó la línea celular MDBK, previamente se comparó la infección en las líneas celulares MDBK y PK, obteniendo resultados favorables para la línea MDBK, registrados como mayor título mediante la prueba de hemaglutinación y el efecto citopático fue evidente a las 96 horas post-infección. Este es el primer reporte del empleo de células de la línea MDBK para la multiplicación del virus *Encefalomiocarditis*.

Los resultados obtenidos en la serología con la prueba de inhibición de la hemaglutinación indican la presencia de anticuerpos contra los tres virus evaluados en diferentes etapas.

En un estudio realizado en granjas porcinas de China, se observó mediante la prueba de seroneutralización una seroprevalencia para *Encefalomiocarditis* del 64.3% en las cerdas viejas y 54.6% en hembras jóvenes.⁹⁶

En las islas Británicas, se realizó un estudio serológico mediante seroneutralización para *Encefalomiocarditis*, se reportó la presencia de anticuerpos en el 28% de los cerdos analizados y que no mostraban ningún signo de la enfermedad, por lo que se concluyó que la infección subclínica puede también desempeñar un papel importante en la epidemiología del virus *Encefalomiocarditis*.^{95, 97} Así mismo, se ha mencionado que los cerdos mayores son menos susceptibles a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, pero desempeñan un papel importante en la persistencia y propagación del virus.⁹⁸

La detección de anticuerpos en cerdos aparentemente sanos, demuestra que el virus *Encefalomiocarditis* circula extensamente en granjas porcinas.⁹⁹ Los resultados

que se obtuvieron en este estudio, muestran la presencia de anticuerpos contra el virus *Encefalomiocarditis*, sobre todo en las hembras más viejas, tanto en la prueba de inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización, como ya se mencionó actualmente no se han presentado cerdos enfermos o con algún cuadro clínico asociado a la infección por *Encefalomiocarditis*, por lo que coincide con los resultados de otros autores.^{34, 96, 100} Por consiguiente, esto puede estar indicando que las hembras viejas, están implicadas de manera importante en el mantenimiento de la infección. Además, una posible explicación de que las hembras viejas sean positivas a la presencia de anticuerpos, es debido a que tienen un mayor riesgo de exposición al virus (por antigüedad en la granja) y a que pudieron estar presentes en un posible brote de *Encefalomiocarditis*, mismo que pudo haber causado el aumento de abortos dos años antes, tal como lo indica la historia clínica.

En el presente trabajo se evaluaron 159 muestras, siendo estas representativas⁸⁶ para poder establecer la asociación entre la presencia de anticuerpos en las distintas especies evaluadas.

La seropositividad en los roedores sugiere que éstos animales desempeñan un papel en la epidemiología de las infecciones, que a su vez, se ve facilitado por la distribución de estas especies, aumentando así, la posibilidad de que entren en contacto los roedores con los cerdos en la granja.¹⁰¹

Los resultados mostraron una prevalencia para el virus *Encefalomiocarditis* del 17.39% en los roedores, esto no descarta a los mismos roedores como fuente de infección, ya que como menciona Maurice et al.(2008), la aparición de un brote del virus *Encefalomiocarditis* en las granjas de cerdos domésticos, es probable por causas multifactoriales, como la cepa del virus involucrada, el estado de infección de las poblaciones de los roedores locales, el contacto entre las poblaciones de roedores con

cerdos, así como ciertos factores propios entre los cerdos, tales, como la sensibilidad dada por la edad.¹⁰²

De la misma manera, en nuestro estudio, los roedores seropositivos a *Encefalomiocarditis*, mostraron una seroprevalencia relativamente baja y con títulos de anticuerpos menores de 6 logaritmo base dos, sin embargo, en la prueba de independencia se observó una asociación ($P=0.410$) en la seropositividad en ambas especies analizadas, indicando la transmisión del virus de una especie a la otra. En las hembras viejas la seroprevalencia es del 100%, pero conforme disminuyen los partos (hembras jóvenes) la prevalencia disminuye hasta hacerse nula. Estos datos sugieren que la infección por el virus *Encefalomiocarditis* se está presentando de forma endémica.

La transmisión de enfermedades entre especies, puede dar lugar a la adaptación y selección de cepas virales con una gama de huéspedes más amplia y una virulencia mayor.²

Debido a que en el lugar de dónde se tomaron las muestras el *Rubulavirus porcino* es considerado un virus endémico de esta zona,^{42, 45, 57-59} la seropositividad obtenida en las cerdas de noveno, quinto y tercer parto nos indica que estos individuos estuvieron expuestos al virus y por otro lado, la presencia de anticuerpos en los cerdos de un mes de edad podrían deberse a la protección que da la madre a través del calostro.

Para *Influenzavirus A* la seropositividad resultante en las hembras y la seroconversión que se observa a partir del tercer y cuarto mes en los cerdos en crecimientos nos indica una exposición al virus, indicando que el virus está presente de forma endémica en la granja. La seroprevalencia que se observa en los cerdos de un mes y dos meses de edad se asocia a la inmunidad proveniente de la madre al momento de tomar calostro.

Uno de los mecanismos básicos de la transmisión entre especies del *Influenzavirus A* es la transferencia directa de un virus desde una especie a otra, sin embargo, algunos factores restringen esta transferencia. En particular, la presencia o ausencia en las especies hospederas de los receptores específicos para el virus de influenza en los tractos respiratorios superior e inferior, que sirve para prevenir la transmisión de tales especies cruzadas o zoonóticas.¹⁰

La ausencia de anticuerpos en los roedores para el *Influenzavirus A* en este estudio podría estar relacionada con esta situación.

Los virus *Encefalomiocarditis*, *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A* son capaces de atravesar la barrera de las especies, como se ha demostrado por medio de infecciones experimentales en cerdos y algunos roedores.⁴ En el presente estudio no se encontró evidencia serológica en los roedores para los virus de *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A*, por lo que la infección natural inter-especies no fue demostrada.

Es muy importante, tener en cuenta que aún en la actualidad, falta información epidemiológica de las enfermedades que se transmiten entre especies, incluyendo aquellas que son zoonosis.¹⁰³

Existen diversas pruebas para el diagnóstico de enfermedades, sin embargo es necesario considerar las características de las pruebas existentes y para que se van a utilizar. La prueba de seroneutralización es considerada como una prueba confirmatoria ya que puede determinar absolutamente y con el mínimo error la presencia de un individuo con anticuerpos.¹⁰⁴ En un estudio realizado en 1990, cuyo objetivo fue medir a través de seroneutralización los títulos de anticuerpos en cerdos infectados experimentalmente para establecer un diagnóstico apropiado evaluando por medio de diferentes puntos de corte la sensibilidad y especificidad de la prueba, se obtuvo una sensibilidad de 93.9% a 97.8% y una especificidad de 95.7% a 100% en la prueba;¹⁰⁵

En este estudio la respuesta serológica para el virus *Encefalomiocarditis* fue evaluada con la prueba de inhibición de hemaglutinación y seroneutralización, mediante la prueba de contingencia se obtuvieron los valores de sensibilidad, mismos que indicaron que la prueba de inhibición de la hemaglutinación identificó al 68.75% de los casos positivos y la especificidad que nos indicó la presencia de 96.30% de los sueros negativos,^{106, 107} con lo que se puede observar que la prueba de inhibición de la hemaglutinación funciona correctamente como prueba inicial dada su especificidad y su sensibilidad.

Algunos animales negativos en la prueba de inhibición de la hemaglutinación fueron positivos en la seroneutralización, esto se debe a que esta última técnica es más específica y sensible que la primera.⁵⁵

El valor predictivo positivo para la prueba de inhibición de la hemaglutinación, comparado con la prueba de seroneutralización fue de 81%, lo que indica que solo en el 19% de los casos se obtuvieron valores positivos en cerdos que fueron negativos mediante la seroneutralización. El valor predictivo negativo de la inhibición de la hemaglutinación fue de 92%, el margen de error de la prueba es del 8%, lo que indica que solo en esta proporción se obtuvieron resultados negativos en sueros de cerdos seropositivos por seroneutralización.^{106, 107} Los valores obtenidos se establecen como considerables, de acuerdo con otros estudios en donde se calculan los valores predictivos para la validación de pruebas serológicas.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

El valor de Kappa, varía según diversos autores, como Fleiss, Landis y Koch.¹¹⁰ Si el valor de Kappa es de 1, nos indica que hay concordancia total entre las pruebas, un valor de Kappa de 0 indica una concordancia nula. Por lo tanto, al analizar los resultados se obtuvo un valor de Kappa de 0.691, lo que indica que las pruebas

diagnósticas de inhibición de la hemaglutinación y la prueba de seroneutralización presentan un grado de concordancia fuerte, de acuerdo con Landis y Kock.¹¹¹

CONCLUSIONES.

Se evidenció la presencia de anticuerpos en las cerdas de noveno y quinto parto, principalmente contra el virus *Encefalomiocarditis*, lo que nos brinda información sobre la exposición al virus, su posible diseminación y mantenimiento.

De la misma manera se observó la presencia de anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* en cerdas de noveno, tercer y quinto parto y en cerdos de crecimiento de un mes, estos últimos provenientes de la inmunidad pasiva.

Las hembras mostraron una mayor seroprevalencia para el virus de *Influenzavirus A*. Los cerdos en crecimiento fueron positivos en los primeros meses, probablemente esto se deba a la inmunidad materna, puesto que a los dos meses comienza un descenso de los anticuerpos, sin embargo, en el cuarto y quinto mes, vuelven a subir, indicándonos una nueva exposición al virus.

La seroprevalencia para el *Rubulavirus porcino* e *Influenzavirus A porcino*, en la población de roedores capturados, no fue detectada, lo que sugiere que no hay circulación del virus en esta población.

Por otro lado, la presencia de anticuerpos en los roedores sólo resultó evidenciada para el virus *Encefalomiocarditis*, y con esto una asociación en la transmisión de esta enfermedad hacia los cerdos, sin embargo, no son la única fuente de transmisión, ya que debemos de tener en cuenta que el virus de *Encefalomiocarditis* es capaz de generar persistencia y las hembras reproductoras forman parte importante para la transmisión del virus.

Este es el primer estudio realizado en México, que reporta una prevalencia de anticuerpos contra *Encefalomiocarditis* en cerdos y roedores que conviven en un mismo nicho ecológico. Cabe destacar que los reportes de esta enfermedad son relativamente nulos en el país.

Los roedores son capaces de transmitir una gran cantidad de enfermedades conocidas, con los datos obtenidos, se confirma que la infección por *Encefalomiocarditis* puede ser transmitida por los roedores a los cerdos y viceversa.

A pesar de que la seroneutralización es una prueba confiable, es importante realizar pruebas llamadas tamiz como la prueba de inhibición de la hemaglutinación, debido a practicidad, bajo costo y rapidez en su desarrollo, siendo de gran utilidad en la evaluación de grandes poblaciones, aparentemente sanas.

REFERENCIAS.

1. Morilla GA. Las enfermedades virales emergentes de los cerdos. *Ciencia Veterinaria*. 2003; 9(4):197-227.
2. Bartz JC, Bessen RA, McKenzie D, Marsh RF ,Aiken JM. Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *J Virol*. 2000 Jun; 74(12):5542-7.
3. Epp T ,Waldner C. Occupational health hazards in veterinary medicine: Zoonoses and other biological hazards. *Can Vet J*. 2012 Feb; 53(2):144-50.
4. Haagmans BL, Andeweg AC ,Osterhaus AD. The application of genomics to emerging zoonotic viral diseases. *PLoS Pathog*. 2009 Oct; 5(10):e1000557.
5. Bae SE ,Son HS. Classification of viral zoonosis through receptor pattern analysis. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12:96.
6. Organización Panamericana de la Salud. *Virosis*. In: Acha NP,Szyfres B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3th ed. Washington: OPS, 2003; p. XVII, XVII, 140-3, 329-42.
7. Olsen WC, Brown HI, Easterday CB ,Reeth VK. Swine Influenza. In: Straw EB, Zimmerman JJ, D'Allaire S,Taylor JD. *Diseases of swine*. 9th ed. USA: Blackwell publishing, 2006; p. 469-81.
8. Arias CF, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Rio Mde L, Cobian-Guemes AG, Isa P ,Lopez S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res*. 2009 Nov; 40(8):643-54.
9. Seaman JT, Boulton JG ,Carrigan MJ. Encephalomyocarditis virus disease of pigs associated with a plague of rodents. *Aust Vet J*. 1986 Sep; 63(9):292-4.

10. Song D, Kang B, Lee C, Jung K, Ha G, Kang D, Park S, Park B, Oh J. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. *Emerg Infect Dis.* 2008 May; 14(5):741-6.
11. Racaniello RV. *Picornaviridae: The viruses and their replication.* In: Knipe MD, Howley MP. *Fields Virology.* 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins 2007; p. 796-838.
12. MacLachlan NJ, Dubovi JE. *Picornaviridae.* In: MacLachlan NJ, Dubovi JE. *Fenner's veterinary Virology.* 4th ed. San Diego, USA: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2011; p. 414 - 41.
13. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2011 [updated; cited 2012 abril]; Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011&bhcp=1>.
14. Murphy AF, Gibbs JEP, Horzinek CM, Studdert JM. *Picornaviridae.* In: *Veterinary Virology.* 3th ed. San Diego, California: Academic Press, 1999; p. 517- 21, 31.
15. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus RNA cadena sencilla sentido positivo. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy. Eighth, Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* ed. San Diego, California: Academic Press, Elsevier, 2005; p. 757-60, 67-68.
16. Castillo OMR. Detección del virus de encefalomiocarditis en roedores de diferentes zonas del Perú. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2010.
17. Neumann EJ, Ramírez A, Schwartz KJ. Swine Disease Manual. In. 4th ed. Iowa: Published by AASV, 2009; p. 49-50.

18. De Rolo M, De López N ,Palencia L. Encefalomiocarditis: Una nueva patología porcina en Venezuela. Fonaiap Divulga. 1998; 59: Available from: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd59/encefa.html.
19. King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T ,Knowles NJ. Picornaviridae. In. Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. ed. New York: AcademicPress 2000; p. 657–73.
20. Minor PD, Brown F, Domingo E, Holy E, King A ,Knowles N. Picornaviridae. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Chabrial SA, Jarvis AV. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. ed. Vienna: Springer Arch. Virol, 1995; p. 329-36.
21. Kim HS, Joo HS, Christianson WT ,RB. M. Evaluation of serologic methods for the detection of antibodies to encephalomyocarditis virus in swine fetal thoracic fluids. J Vet Diagn Invest 1991; 3:283-6.
22. Almajhdi FN. Microwaves assisted anhibition of Encephalomyocarditis virus. World Applied Sciences Journal. 2009; 6(6):829-38.
23. Doi K. Experimental encephalomyocarditis virus infection in small laboratory rodents. J Comp Pathol. 2011 Jan; 144(1):25-40.
24. Billinis C, Paschaleri-Papadopoulou E, Anastasiadis G, Psychas V, Vlemmas J, Leontides S, Koumbati M, Kyriakis SC ,Papadopoulos O. A comparative study of the pathogenic properties and transmissibility of a Greek and a Belgian encephalomyocarditis virus (EMCV) for piglets. Vet Microbiol. 1999 Dec; 70(3-4):179-92.
25. Koenen F. Encephalomyocarditis Virus. In: Straw EB, Zimmerman JJ, D´Allaire S, Taylor JD. Diseases of swine. 9th ed. EUA: Blackwell Publishing, 2006; p. 331-6.

26. Denis P, Liebig HD, Nowotny N, Billinis C, Papadopoulos O ,O'Hara RS. Genetic variability of encephalomyocarditis virus (EMCV) isolates. *Vet Microbiol.* 2006; 113 (1-2):1-12.
27. Zimmermann A, Nelsen-Salz B, Kruppenbacher JP ,Eggers HJ. Nucleotide sequence and construction of an infectious cDNA clone of an EMCV strain isolated from aborted swine fetus. *Virology.* 1994; 203(2):366-72.
28. Matthews RE. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague, September 1978. *Intervirology.* 1979; 11(3):133-5.
29. Oberste MS, Gotuzzo E, Blair P, Nix WA, Ksiazek TG, Comer JA, Rollin P, Goldsmith CS, Olson J ,Kochel TJ. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2009 Apr; 15(4):640-6.
30. Gelmetti D, Meroni A, Brocchi E, Koenen F ,Cammarata G. Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis. *Vet Res.* 2006 Jan-Feb; 37(1):15-23.
31. Billinis C, Paschaleri-Papadopoulou E, Psychas V, Vlemmas J, Leontides S, Koumbati M, Kyriakis SC ,Papadopoulos O. Persistence of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets. *Vet Microbiol.* 1999 Dec; 70(3-4):171-7.
32. Psalla D, Psychas V, Spyrou V, Billinis C, Papaioannou N ,Vlemmas I. Pathogenesis of experimental encephalomyocarditis: a histopathological, immunohistochemical and virological study in rats. *J Comp Pathol.* 2006 Jan; 134(1):30-9.
33. Howard LL, Manoj KAS ,Shannon H. Cardioviruses: Encephalomyocarditis virus and Theiler's murine encephalomyelitis virus. In: Piprek J. *Semiconductor*

optoelectronic devices, Introduction to physics and simulation. ed. San Diego California, USA: Academic press, 2007; p. 311-24.

34. An DJ, Jeong W, Jeoung HY, Yoon SH, Kim HJ, Choi CU ,Park BK. Encephalomyocarditis in Korea: serological survey in pigs and phylogenetic analysis of two historical isolates. *Vet Microbiol.* 2009 May 28; 137(1-2):37-44.

35. Philipps A, Dauber M, Groth M, Schirrmeier H, Platzer M, Krumbholz A, Wutzler P ,Zell R. Isolation and molecular characterization of a second serotype of the encephalomyocarditis virus. *Vet Microbiol.* 2012 Jul 10.

36. Murphy AF, Gibbs JEP, Horzinek CM ,Studdert JM. *Paramyxoviridae*. In. *Veterinary Virology*. ed. San Diego, California: Academic Press, 1999; p. 411-28.

37. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U ,Ball LA. Virus RNA cadena sencilla sentido negativo. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U,Ball LA. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2005; p. 609-14, 55-60.

38. Santos-López G, Hernandez J, Borraz-Argüello MT, Ramírez-Mendoza H, Vallejo V ,Reyes-Leyva J. Proteins of *Porcine rubulavirus*: structure, function and pathological implications. *Arch. Med. Vet.* XXXVI. 2004; (2):119-36.

39. Reyes-Leyva J, García-Morales O, Santos-López G, Vallejo V, Ramírez-Mendoza H ,Hernández J. Detection of viremia in the *Porcine rubulavirus* experimental infection. *Arch. Med. Vet.* XXXV. 2004; (1):41-9.

40. Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz MdT, Ramírez MH, Vallejo V ,Zenteno E. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus porcino*. *Mensaje Bioquímico*. 2002; XXVI:99-127.

41. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC ,Maqueda AJ. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. In: XVII Reunión de la Asociación

de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC.; Ixtapa, (Guerrero) México (DF). Memorias de la XVII Convención Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1981.

42. 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.

43. 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; 118:327-32.

44. Kirkland PD, Stephano A. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle, and Nipah Virus Infections. In: Straw EB, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor JD. *Diseases Of Swine*. ed. EUA.: Blackwell Publishing, 2006; p. 455-68.

45. Moreno-Lopez J, Correa-Giron P, Martinez A, Ericsson A. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch Virol.* 1986; 91(3-4):221-31.

46. Hernandez-Jauregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Tellez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-Lopez J. Uptake of porcine rubulavirus (LPMV) by PK-15 cells. *Arch Med Res.* 2001 Sep-Oct; 32(5):400-9.

47. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, Maqueda AJ. An outbreak of encephalitis in piglets produced by an hemagglutinating virus. In: *Proceedings of 7th International Pig Veterinary Society Congress; México, D. F.: 1982.*

48. Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernandez J, Ramirez H, Delannoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2000 Jul; 126(3):415-24.

49. Ramirez-Mendoza H, Hernandez-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-Lopez J, Kennedy S. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J Comp Pathol.* 1997 Oct; 117(3):237-52.
50. Sanchez-Betancourt JI, Santos-Lopez G, Alonso R, Doperto JM, Ramirez-Mendoza H, Mendoza S, Hernandez 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 Oct; 85(2):359-67.
51. Campos H, Carvajal F. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. In: XXIV Reunión de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; Morelia (Michoacán) México. Memorias de la XXIV Reunión de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1989.
52. Espinosa HS. Evaluación del semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul. [Tesis de Maestría]. México (D.F.): Universidad Nacional de México, 2001.
53. Solis M, Ramirez-Mendoza H, Mercado C, Espinosa S, Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernandez J. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Res Vet Sci.* 2007 Dec; 83(3):403-9.
54. 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.

55. Cuetero RS, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. *Vet. Mex* 1995; 26:231-6.
56. Salas-Rojas M, Sanchez-Hernandez C, Romero-Almaraz Md Mde L, Schnell GD, Schmid RK, Aguilar-Setien A. Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004 Oct; 98(10):577-84.
57. Morilla GA, González-Vega D, Estrada E, Diosdado F. Seroepidemiology of blue eye disease. In: Morilla A, Yoon K, Zimmerman J. Trends in emerging viral infections of swine. 8th ed. Iowa, EUA: Blackwell publishing company, 2002; p. 59-64.
58. Rivera BJ, Martínez BN, Macías GM, García CA. Prevalencia de anticuerpos contra el síndrome respiratorio y reproductivo porcino, Rubulavirus porcino y Parvovirus porcino en cerdos de la Ciudad de México. In: Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; Veracruz, México. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, 2006.
59. Escobar-Lopez AC, Rivera-Benitez JF, Castillo-Juarez H, Ramirez-Mendoza H, Trujillo-Ortega ME, Sanchez-Betancourt JI. Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in Sera of Field Swine and their Seroprevalence. *Transbound Emerg Dis.* 2012 Oct; 59(5):416-20.
60. Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linne T, Moreno-Lopez J, Hernandez P, Kennedy S, Carroll BP, Herron B, Foster JC, Adair B. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest.* 1996 Oct; 8(4):405-13.
61. Morilla GA. Los perfiles serologicos y microbiologicos para evaluar el estado sanitario de las granjas porcinas. *Ciencia Veterinaria.* 1996; 7:273-313.

62. Wiman AC, Hjertner B, Linne T, Herron B, Allan G, McNeilly F, Adair B, Moreno-Lopez J ,Berg M. Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J Neurovirol.* 1998 Oct; 4(5):545-52.
63. Jasso EMA, Pérez TA, Rivera BJB ,Ramírez MH. Distribución del *Rubulavirus porcino* en tejidos de cerdos infectados experimentalmente. In: Jasso EMA.editor XLVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; León, Guanajuato. Prometeo Editores, 2011.
64. Rivera BJB, García CA, Cuevas S, Reyes LJ, Hernández LJ ,Ramírez MH. Desarrollo de una RT-PCR cuantitativa en tiempo real para *Rubulavirus porcino* y comparación con el aislamiento viral en cultivo celular. In: XLVII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 18-21 julio; Guadalajara, Jalisco, México. 2012.
65. Murphy AF, Gibbs JEP, Horzinek CM ,Studdert JM. *Orthomyxoviridae*. In. *Veterinary Virology*. ed. San Diego, California: Academic Press, 1999; p. 459-68.
66. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U ,Ball LA. Virus RNA cadena sencilla sentido negativo. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U,Ball LA. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2005; p. 681-93.
67. MacLachlan NJ ,Dubovi JE. *Orthomyxoviridae*. In: MacLachlan NJ,Dubovi JE. *Fenner's veterinary Virology*. 4th ed. San diego, USA: Academic Press in an imprint of Elsevier, 2011; p. 353-70.
68. Avalos GP, Sanchez BJI ,Trujillo OME. Influenza porcina en México, subtipos H1H1 y H3N2 en Jalisco, Guanajuato y Michoacán. ed. U.S.A: Academia española, 2011.

69. Sánchez MDM, Carreón NR ,Palacios AJM. Comparison of two diagnostic methods for the detection of the porcine influenza virus. *Vet. Méx.* 2010; 41(1):45-58.
70. World Health Organization. Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance: World Health Organization 2002 [cited. Available from: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/WHO_manual_on_animal-diagnosis_and_surveillance_2002_5.pdf.
71. Daniels MJ, Selgrade MK, Doerfler D ,Gilmour MI. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains. *Comp Med.* 2003 Jun; 53(3):293-8.
72. Oropesa S, Calvi F, Hernández B, Cantillo J, Pérez O ,Atencio I. Producción de un antisuero específico contra la cepa A/Johannesburg/33/94 (H3N2), y su utilidad en la caracterización de aislamientos de virus de influenza en ratas Wistar. *VacciMonitor.* 2006; 15(3):9-13.
73. Koen JS. A practical method for field diagnosis of swine diseases. *Am J Vet Med.* 1919; 14:468-70.
74. Karasin AI, Landgraf J, Swenson S, Erickson G, Goyal S, Woodruff M, Scherba G, Anderson G ,Olsen CW. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar; 40(3):1073-9.
75. Taylor HP ,Dimmock NJ. Mechanism of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J Exp Med.* 1985 Jan 1; 161(1):198-209.
76. Morens DM ,Taubenberger JK. Historical thoughts on influenza viral ecosystems, or behold a pale horse, dead dogs, failing fowl, and sick swine. *Influenza Other Respi Viruses.* 2010 Nov; 4(6):327-37.

77. Lekcharoensuk P, Nanakorn J, Wajjwalku W, Webby R, Chumsing W. First whole genome characterization of swine influenza virus subtype H3N2 in Thailand. *Vet Microbiol.* 2010 Oct 26; 145(3-4):230-44.
78. Ma W, Lager KM, Li X, Janke BH, Mosier DA, Painter LE, Ulery ES, Ma J, Lekcharoensuk P, Webby RJ, Richt JA. Pathogenicity of swine influenza viruses possessing an avian or swine-origin PB2 polymerase gene evaluated in mouse and pig models. *Virology.* 2011 Feb 5; 410(1):1-6.
79. Vittecoq M, Grandhomme V, Simon G, Herve S, Blanchon T, Renaud F, Thomas F, Gauthier-Clerc M, van der Werf S. Study of influenza A virus in wild boars living in a major duck wintering site. *Infect Genet Evol.* 2012 Mar; 12(2):483-6.
80. Yoo K-J, Janke BH, Brown H, Olsen WC. Swine influenza virus. In: Morilla A, Yoon K, Zimmerman J. *Trends in emerging viral infections of swine.* 8th ed. Iowa, EUA: Iowa States Press, 2002; p. 23-46.
81. Martín DBMA, Chinchilla RB, Del Real SG. La gripe porcina: Una enfermedad clásica con carácter zoonótico y emergente. *Anales de la real academia de ciencias veterinarias de Andalucía Oriental.* 2009; 22(1).
82. Rodríguez PV, Rubio GA, Sánchez-Vizcaíno RJM. The role of wild fauna in the emergent diseases. *RCCV.* 2009; 3(2):244-52.
83. Giraldo dIG, Orrego AU, Betancurth AM. Los roedores como reservorios de *Leptospiras* en planteles porcinos de la zona central cafetera de Colombia. *Archivos de medicina veterinaria.* 2002; 34:69-78.
84. Morales CRJ, Bravo TD, Moreno VD, Góngora A, Ocampo A. Serological association of the infection by leptospira in human, pigs and rodents in a farm of Villavicencio-Colombia. *Orinoquia.* 2007:73-80.

85. Ricci M ,Padín S. Roedores transmisores de enfermedades: Medidas de prevención y control.: Universida Nacional de La Plata, Forestales. FdCAy.Report No.
86. McPike SM. Toma de muestras. In: Dohoo I, Martin W,Stryhn H. Veterinary epidemiologic research. ed. Canada: AVC Inc, 2003; p. 27-47.
87. Thrusfield M. Determinación del tamaño de muestra, Calculo de intervalos de confianza. In. Veterinary epidemiology. 3th ed. Iowa, USA: Blackweell publishing, 2007; p. 250-1, 8-62.
88. Álvarez FM, Rodríguez BCJ, Ciprián CA, Rodríguez GL, Ayora TG ,Segura CCJ. Perfil serológico del virus de Influenza porcina, Mycoplasma hyopneumoniae y Actinobacillus pleuropneumoniae, en granjas de Yucatán, México. Veterinaria México. 2004 octubre-diciembre; 35(4):295-305.
89. Mills NJ, Childs EJ, Ksiazek GT, C JP ,Velleca MW. Trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. ed. Chile: Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud, 1998.
90. Rivera BJB, García CA, Cuevas S, Reyes LJ, Hernández LJ ,Ramírez MH. Infección experimental de Rubulavirus porcino y virus de influenza porcina clásico h1n1 en cerdos en crecimiento. In: XLVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 10-13 septiembre; Queretaro, México. 2012.
91. Burleson GF, Chambers MT ,Wiedbrauk LD. Introduction to quantal virus assays. In. Virology a laboratory manual. ed. San Diego, California: Academic Press, 1992; p. 53-61.
92. McPike SM. Estimación de la sensibilidad y la especificidad. In: Dohoo I, Martin W,Stryhn H. Veterinary epidemiologic research. ed. Canada: AVC Inc, 2003; p. 96-9.

93. McPike SM. Valores predictivos. In: Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Veterinary epidemiologic research. ed. Canada: AVC Inc, 2003; p. 99-101.
94. Thrusfield M. Sensibilidad y especificidad. In. Veterinary epidemiology. 3th ed. Iowa, USA: Blackweell publishing, 2007; p. 158.
95. Maurice H, Nielen M, Stegeman JA, Vanderhallen H, Koenen F. Transmission of encephalomyocarditis virus (EMCV) among pigs experimentally quantified. Vet Microbiol. 2002 Sep 24; 88(4):301-14.
96. Ge X, Zhao D, Liu C, Wang F, Guo X, Yang H. Seroprevalence of encephalomyocarditis virus in intensive pig farms in China. Vet Rec. 2010 Jan 30; 166(5):145-6.
97. Sangar DV, Rowlands DJ, Brown F. Encephalomyocarditis virus antibodies in sera from apparently normal pigs. Vet Rec. 1977 Mar 19; 100(12):240-1.
98. Billinis C, Leontides L, Psychas V, Spyrou V, Kostoulas P, Koenen F, Papadopoulos O. Effect of challenge dose and age in experimental infection of pigs with encephalomyocarditis virus. Vet Microbiol. 2004 Apr 19; 99(3-4):187-95.
99. Paschaleri-Papadopoulou E, Axiotis I, Laspidis C. Encephalomyocarditis of swine in Greece. Vet Rec. 1990 Apr 14; 126(15):364-5.
100. Kassimi LB, Madec F, Guy M, Boutrouille A, Rose C, C. C. Serological survey of encephalomyocarditis virus infection in pigs in France. Vet Rec. 2006 14 Oct; 159:511-4.
101. Ebani VV, Cerri D, Poli A, Andreani E. Prevalence of Leptospira and Brucella antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. J Wildl Dis. 2003 Jul; 39(3):718-22.
102. Maurice H. Introduction and transmission of Encephalomyocarditis virus (EMCV) in pig farms : studies to support prevention and control. [S.l.: s.n.], 2008.

103. Chen J, Xu MJ, Zhou DH, Song HQ, Wang CR, Zhu XQ. Canine and feline parasitic zoonoses in China. *Parasit Vectors*. 2012; 5:152.
104. Jaramillo AC, Martínez MJJ. Evaluación de pruebas diagnósticas. In: Rodríguez BJC. *Epidemiología Veterinaria*. ed. México, D.F.: Manual Moderno, 2010; p.
105. Zimmerman JJ, Hill HT, Beran GW, Meetz MC. Serologic diagnosis of encephalomyocarditis virus infection in swine by the microtiter serum neutralization test. *J Vet Diagn Invest*. 1990 Oct; 2(4):347-50.
106. Pezzullo's. JC. Way contingency table analysis 2011 [updated; cited 2012]; Available from: <http://statpages.org/ctab2x2.html>.
107. Gardner IA, Blanchard PC. Interpretation of Laboratory Results. In: Straw EB, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor JD. *Disease of swine*. 9th ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006; p. 219-40.
108. Londono B, Carmona J, Blair S. [Comparison between OptiMAL and the thick smear tests for malaria diagnosis in an endemic area during a non-epidemic period]. *Biomedica*. 2002 Dec; 22(4):466-75.
109. Tyler JW, Cullor JS. Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J Am Vet Med Assoc*. 1989 Jun 1; 194(11):1550-8.
110. Tuesca-Molina R, Fierro HN, Molinares SA, Oviedo MF, Polo AY, Polo CJ, Sierra MI. Social Groups with Factor Protective to Depression in Elderly. Barranquilla, Colombia. *Rev Esp Salud Pública*. 2003 Septiembre-Octubre; 77(5):595-604.
111. Clopés AE, Castro IC, Sala MLE, Farré RR, Gámez ML, Ramos J. Pharmaceutical Interventions (part II): Validation of the methodology used to measure impact. *Farm Hosp*. 2000; 24(4):215-20.