



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“DETECCIÓN DE CERDOS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS
POR LA ENFERMEDAD DE OJO AZUL (RUBULAVIRUS PORCINO)
MEDIANTE LA PRUEBA DE PCR TIEMPO REAL EN LEUCOCITOS
DE SANGRE PERIFÉRICA”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ROCÍO LARA ROMERO

ASESORA: M. EN C. JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO

COASESORA: DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

“Detección de cerdos persistentemente infectados por la enfermedad de ojo azul (Rubulavirus porcino) mediante la prueba de PCR tiempo real en leucocitos de sangre periférica”

Que presenta la pasante: **Rocío Lara Romero**

Con número de cuenta: **30308299-6** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Enero de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Abel Ciprian Carrasco	
VOCAL	MVZ. Mario Alberto Velasco Jiménez	
SECRETARIO	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
1er SUPLENTE	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
2do SUPLENTE	MVZ. Jesús Arturo Sandoval Romero	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).

HHA/pm

Índice de Figuras.

Figura 1. Estados de la República Mexicana con anticuerpos contra el PoRV.....	11
Figura 2. Estados de la República Mexicana en donde se encontraron anticuerpos contra PoRV de 1999 al año 2000	11
Figura 3. Estudio serológico realizado en 2011 que muestra los Estados donde fueron encontrados anticuerpos contra PoRV	11
Figura 4. Replicación del PoRV	14
Figura 5. Esquema y mapa genómico del PoRV	15
Figura 6. Productos del gen P	16
Figura 7. Sonda TaqMan	22
Figura 8. Mecanismo de la sonda molecular beacons	22
Figura 9. Sondas FRET	23
Figura 10. Sonda escorpión	23
Figura 11. Curva de amplificación RT-PCR tiempo real de las diluciones de RNA viral de la cepa LPMV obtenida en cultivo celular PK-15.....	36
Figura 12. Grafica de la curva para la RT-PCR tiempo real	36

Índice de Tablas

Tabla 1. Variabilidad genómica del gen HN	18
Tabla 2. Cantidad de RNA utilizada por dilución (ng/μl) para el establecimiento de la curva	31
Tabla 3. Programa RT-PCR tiempo real para la detección de un fragmento del gen P Rubulavirus porcino	32
Tabla 4. Composición de la mezcla para RT-PCR tiempo real para gen P del PoRV	32
Tabla 5. Resultados de la curva de RT-PCR tiempo real	35
Tabla 6. Resultados RT-PCR tiempo real de la granja de Zumpango	37
Tabla 7. Resultados RT-PCR tiempo real de la granja de Guanajuato	38
Tabla 8. Resultados RT-PCR tiempo real de la granja de Toluca	39
Tabla 9. Resultados de la prueba de ELISA	40
Tabla 10. Resultados de los diferentes grupos de la granja de Toluca a la prueba de ELISA	40
Tabla 11. Resultados a la prueba de ELISA de los diferentes grupos de la granja de Guanajuato	40

Lista de abreviaturas y símbolos.

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
®	Marca registrada
™	Trademark
©	Compañía
[]	Concentración
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
cDNA	Cadena complementaria del ácido desoxirribonucleico
CENID	Centro de Investigación Disciplinaria.
CICUAE	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación
Ct	Valor umbral del ciclo
DEPC	Dietilpirocarbonato
D.O.	Densidad óptica
dNTPs	Desoxidonucleótidos
EOA	Enfermedad del Ojo Azul
et. al.	Y otros
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

F	Proteína de fusión
FRET	Transferencia de Energía Fluorescente Mediante Resonancia
HN	Hemoaglutinina-Neuraminidasa
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina G
IH	Inhibición de la Hemoaglutinación
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Kg	Kilogramo
Km	Kilometro
L	Proteína de alto peso molecular
LPMV	Virus de La Piedad Michoacán
M	Proteína matriz
ml	Mililitro
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NP	Nucleoproteína
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
P	Fosfoproteína
PAC	Producción Animal Cerdos
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PoRV	Rubulavirus Porcino

RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcriptasa Reversa
SAGARPA	Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
rpm	Revoluciones por minuto
SPF	Libre de patógenos específicos
μl	Microlitros
VN	Virus Neutralización.

Índice

Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
1.1. Antecedentes y situación actual de la enfermedad de ojo azul en México.....	9
1.2. Signos clínicos.....	12
1.3. Patogenia viral.....	13
1.4. Agente etiológico.....	14
1.5. El gen P.....	16
1.6. Persistencia viral.....	17
1.7. Biología molecular del PoRV.....	18
1.8. Métodos de diagnóstico.....	19
1.8.1. PCR.....	19
1.8.2. PCR en tiempo real.....	21
1.8.3. ELISA.....	24
2. Justificación.....	25
3. Hipótesis.....	26
4. Objetivos.....	27
5. Materiales y métodos.....	28
5.1. Diseño experimental.....	28
5.2. Toma de muestras.....	28
5.3. Animales y granjas.....	29
5.4. Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	29
5.5. Extracción de RNA.....	30
5.6. Cuantificación de RNA.....	30
5.7. Prueba de RT-PCR en tiempo real.....	31
5.8. Prueba de ELISA.....	32
5.9. Análisis estadístico.....	33
6. Resultados.....	34
7. Discusión.....	41
8. Conclusión.....	44
9. Referencias.....	45

Resumen.

El Rubulavirus porcino (PoRV) es el agente etiológico de la Enfermedad de Ojo Azul (EOA). Los signos clínicos son dependientes de la edad, presentado cuadros nerviosos, respiratorios y reproductivos. El virus se caracteriza por establecer infecciones persistentes en cerdos. Esta enfermedad solo ha sido reportada en México. El objetivo del presente estudio fue determinar en cerdos la infección persistente al PoRV mediante la técnica de RT-PCR tiempo real, a partir de los leucocitos obtenidos de muestras de sangre periférica. Se seleccionaron tres granjas, dos confirmadas positivas por aislamiento viral (Zumpango y Guanajuato), la tercera sin antecedentes de la enfermedad (Toluca). Adicionalmente, se trabajó con 8 cerdos SPF como controles negativos. De los animales se obtuvieron muestras de sangre para realizar la extracción de leucocitos y obtención de suero. De los leucocitos se realizó extracción de RNA. En la granja de Zumpango, Estado de México, se muestrearon 18 cerdas de 1 a 7 partos, de las cuales el 88.89% resultaron positivas con una concentración estimada mediante PCR tiempo real de 47.67 ng/μl de RNA viral. De la granja ubicada en Pénjamo, Estado de Guanajuato se obtuvieron un total de 30 muestras de sangre de hembras de 0 a 6 partos, donde el 96.67% fueron positivas con 2.45 ng/μl de RNA viral y 23 muestras de sangre de sementales, con un 69.57% de animales positivos a la prueba de RT-PCR tiempo real con una concentración de 1.31 ng/μl de RNA. En la granja de Toluca (n=21), Estado de México, se obtuvo el 80.95% de animales positivos con una cantidad de 0.35ng/μl de RNA viral para el gen P. La prueba de ELISA mostro que en las tres granjas evaluadas existen cantidades significativas de IgG para la proteína HN del PoRV. La aplicación de la prueba de RT-PCR tiempo real en muestras de leucocitos de sangre periférica, resulto un método rápido (90 minutos), cuantitativo y altamente sensible para la detección de animales infectados persistentemente a la Enfermedad de Ojo Azul, es decir, se permite detectar cantidades mínimas de RNA viral, lo que representa un aspecto importante para el uso de esta técnica en la epidemiología de la EOA en México.

Palabras clave: PCR tiempo real, Persistencia viral, Rubulavirus porcino, Leucocitos.

1. Introducción.

El cerdo (*Sus scrofa*) es una especie de gran importancia para la industria Mexicana, tiene un rendimiento en de canal hasta el 75%, incluso mayor en comparación con la del ganado bovino. La especie porcina se caracteriza por su prolificidad, ya que una cerda es capaz de gestar más de 20 lechones por año, así cada uno de estos lechones convenientemente alimentado, puede ser sacrificado 6 meses después proporcionando 100 Kg de peso. Con una conversión alimenticia de 3.5 Kg de alimento por kg de peso (Koeslag, 2006).

Hasta 1980 prácticamente solo existía una zona de importancia en la producción porcina en el país, tanto por su concentración porcina como por el número de personas relacionadas con dicha explotación y que representaba por otra parte cerca del 80% de la actividad económica de la región. Dicha zona abarcaba parte de los estados de Guanajuato (51%), Michoacán (21%), Querétaro (16%) y Jalisco (9%) y cuyo centro mayor de actividad estaba localizado en la ciudad de La Piedad, Michoacán y poblaciones del estado de Guanajuato que quedan en la ruta de La Piedad-Irapuato (Flores, 1983).

En el último censo realizado en 2010 por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera para conocer la población porcina en el país muestra que los estados con mayor población porcina son: Jalisco, Sonora, Puebla, Guanajuato y Veracruz, mientras que el estado de Michoacán ocupa el noveno lugar (SAGARPA, Población Ganadera Porcina, 2010).

Actualmente la porcicultura está expuesta a un gran número de enfermedades. En donde se ha dado una gran importancia a enfermedades bacterianas, debido a que se considera que las enfermedades virales están controladas por la vacunación. Sin embargo, este concepto no es del todo acertado en el caso del PoRV (Ross, 2003).

La EOA solo ha sido reportada en México, sin embargo, se han encontrado paramixovirus porcinos estrechamente relacionados en otros países tales como Australia, Canadá, Japón e Israel (CFSPH, 2006).

Con la aparición de la EOA, la prevención y el control en las granjas infectadas se ha basado en estándares de sanidad e higiene, junto con la producción de vacunas experimentales y comerciales (Correa-Girón *et al*, 2002).

Desde que se le identificó por primera vez, se ha logrado un avance importante en el conocimiento de las características moleculares del virus, las propiedades patológicas, biológicas e inmunológicas de la enfermedad (Hernández *et al*, 2004).

1.1. Antecedentes y situación actual de la enfermedad de ojo azul en México.

En 1980 se dieron a conocer los primeros brotes de una enfermedad con un cuadro clínico de encefalitis y opacidad corneal en lechones de maternidad, de los cuales, se aisló un virus hemoaglutinante en granjas alrededor de la ciudad de La Piedad, Michoacán. Sin embargo, desde 1972 hay evidencias serológicas de que el agente etiológico ya se encontraba presente en la República Mexicana. Seis años después del primer brote en México de esta enfermedad, la EOA se diseminó a otros estados de la República Mexicana: Querétaro, Guanajuato, Nuevo León, Jalisco, Hidalgo, Tlaxcala y el Distrito Federal (Rosales *et al.*, 1988; Stephano *et al.*, 1981).

Estudios serológicos en 1991, 1992 y 1998 mostraron que los cerdos de granjas ubicadas en los estados de Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sonora, Tlaxcala, Tabasco y Zacatecas fueron positivos a anticuerpos contra el Rubulavirus porcino. Los brotes de esta enfermedad solo fueron reportados en cerdos de los estados centrales de nuestro país, principalmente en Michoacán, Guanajuato y Jalisco. Incluso ocasionalmente en otras áreas se encontraron animales seropositivos que no presentaron ningún signo clínico (Figura 1) (Carreón y Fuentes 1991; Fuentes *et al*, 1992; Correa *et al*, 1998). Para el año de 1999 y el 2000 se demostró mediante pruebas serológicas que el agente etiológico causante de la enfermedad de ojo azul se encontraba

presente en áreas con una alta población porcina, como lo son el estado de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo y Querétaro (Figura 2) (Morilla *et al.*, 2002). Actualmente Escobar-López y colaboradores (2012) señalan que existe una seroprevalencia del Rubulavirus porcino (PoRV) del 9% al 23.7% en los estados de Jalisco, Michoacán, Estado de México y Guanajuato, por lo que la enfermedad continua endémica principalmente en la región central y occidental de la República Mexicana (Figura 3).

La enfermedad causada por el PoRV es considerada una de las enfermedades más importantes que afectan la industria porcina mexicana. El impacto negativo en los parámetros reproductivos y la mortalidad asociada con los brotes en la granjas afectadas, es causa de importantes pérdidas económicas (Correa-Girón *et al.*, 2002; Stephano, 2002). En donde las pérdidas económicas después de una infección por el PoRV, se encuentran relacionadas a la baja fertilidad, al aumento del porcentaje de lechones nacidos muertos (hasta 19%), aumento en el número de momias (hasta 30%) y se reduce el número de lechones nacidos vivos; además de que durante la primera semana de vida la mortalidad de los lechones se incrementa hasta en 50% (Kirkland and Stephano, 2006).

El primer aislamiento obtenido del PoRV fue caracterizado por Moreno-López y colaboradores en 1986 y se denominó LPMV. Desde su aparición el Rubulavirus porcino solo ha permanecido en el centro de la República Mexicana, provocando signos nerviosos, respiratorios y reproductivos en animales de diferentes edades y generando millonarias pérdidas económicas en esta zona del país (Sánchez *et al.*, 2003). Debido a que la enfermedad de ojo azul es endémica en México, actualmente representa una barrera comercial que afecta notablemente la producción y comercialización de la industria porcícola mexicana (APHIS, 2005). Hasta la fecha, en la República Mexicana, no existe programa o norma oficial para controlar o erradicar esta enfermedad



Figura 1. Estados de la República Mexicana con cerdos que presentan anticuerpos contra PoRV (Carreón y Fuentes 1991; Correa, 1998; Fuentes *et al*, 1992).



Figura 2. Estados de la Republica Mexicana en donde se encontraron cerdos con anticuerpos contra PoRV de 1999 al año 2000 (Morilla *et al.*, 2002).



Figura 3. Estudio serológico realizado en 2011 que muestra los Estados donde fueron encontrados cerdos con anticuerpos contra PoRV (Escobar-López *et al*, 2012).

1.2. Signos clínicos.

En 1981 Stephano y sus colaboradores reportaron que en cerdos recién nacidos y lactantes la enfermedad del ojo azul se caracterizaba por encefalitis, neumonía y opacidad corneal, la cual generalmente iniciaba con la aparición repentina de fiebre, lomo arqueado, postración y depresión, estos signos eran seguidos de enfermedad neurológica progresiva con debilidad, ataxia, temblores musculares, postura anormal y rigidez, especialmente de las patas traseras; algunos lechones se encuentran hipersensibles y realizan movimientos de pedaleo cuando son manipulados. Entre 1 y 10 % de los lechones desarrollan opacidad corneal unilateral o bilateral, incluso se puede observar conjuntivitis, ceguera aparente, nistagmo, constipación y diarrea. Con frecuencia los lechones afectados mueren dentro de las primeras 48 horas de la aparición de los primeros signos clínicos; posteriormente se observan muertes después de 4 a 6 días de la enfermedad (Stephano *et al*, 1988).

Para el año de 1985, Stephano y Gay observaron que los cerdos destetados de más de 30 días de vida mostraban signos moderados y transitorios que podían incluir anorexia, fiebre, tos, estornudos y, ocasionalmente, opacidad corneal. Los síntomas neurológicos eran poco comunes en este rango de edad, sin embargo, se observaba depresión ocasional, ataxia y marcha en círculos (Stephano *et al*, 1988).

En 1988 descubren fallas reproductivas en los cerdos adultos. Los signos incluyeron disminución en las tasas de concepción, abortos, aumento de mortinatos y fetos momificados en las cerdas (Stephano *et al*, 1988).

Ramírez-Mendoza (1997) reportó lesiones ocasionadas por el PoRV en el tracto reproductivo de verracos, al realizar una infección experimental los sementales presentaron inflamación en la cabeza del epidídimo, una reducción en la concentración y motilidad de los espermatozoides asociada a la formación de granulomas y orquitis, incluso cuando la infección se tornó crónica generó degeneración de túbulos seminíferos con infiltración linfocitaria y atrofia testicular.

Del 2000 al 2003 ocurrieron brotes atípicos del PoRV en un total de 22 granjas multi-sitio ubicadas en el estado de Jalisco, en las cuales el 60% de los cerdos de 3 a 4 meses de edad presentaron signos neumónicos; de estos animales el 20% presentaron signos de encefalitis y la mortalidad se incrementó en un 30% durante este brote. Este incremento en la neurovirulencia del PoRV puede estar asociado a las variantes PAC6-PAC9 del gen Hemoaglutinina-Neuraminidasa (HN) del PoRV en (Sánchez–Betancourt *et al.*, 2008).

1.3. Patogenia viral.

El virus es transmitido de un animal a otro a través de la aspiración de aerosoles cuando son eliminados por descargas nasales, en donde la nasofaringe actúa como ruta natural de infección (Collier & Oxford, 2000).

La replicación del PoRV inicia en la mucosa nasofaríngea y en el tejido linfático asociado, después se disemina a pulmones y bronquios en donde se vuelve a replicar, para finalmente diseminarse por todo el organismo por vía sanguínea. Sin embargo, después de que la multiplicación se dio en la mucosa nasal, el PoRV se extiende a SNC a través de los nervios trigémino y olfatorio, para después, permanecer localizado en bulbo olfatorio y mesencéfalo (Figura 4) (Allan *et al.*, 1996; Reyes-Leyva *et al.*, 2004; Stephano *et al.*, 1988).

Durante la fase de viremia se ha demostrado que el virus se transporta asociado a eritrocitos del día 4 al 12 post inoculación y leucocitos del día 12 al 20, lo que permite producir una infección sistémica y replicarse en sitios inmuno privilegiados de diversos órganos linfáticos y reproductores (Hernández *et al.*, 1998; Reyes-Leyva *et al.*, 2004).

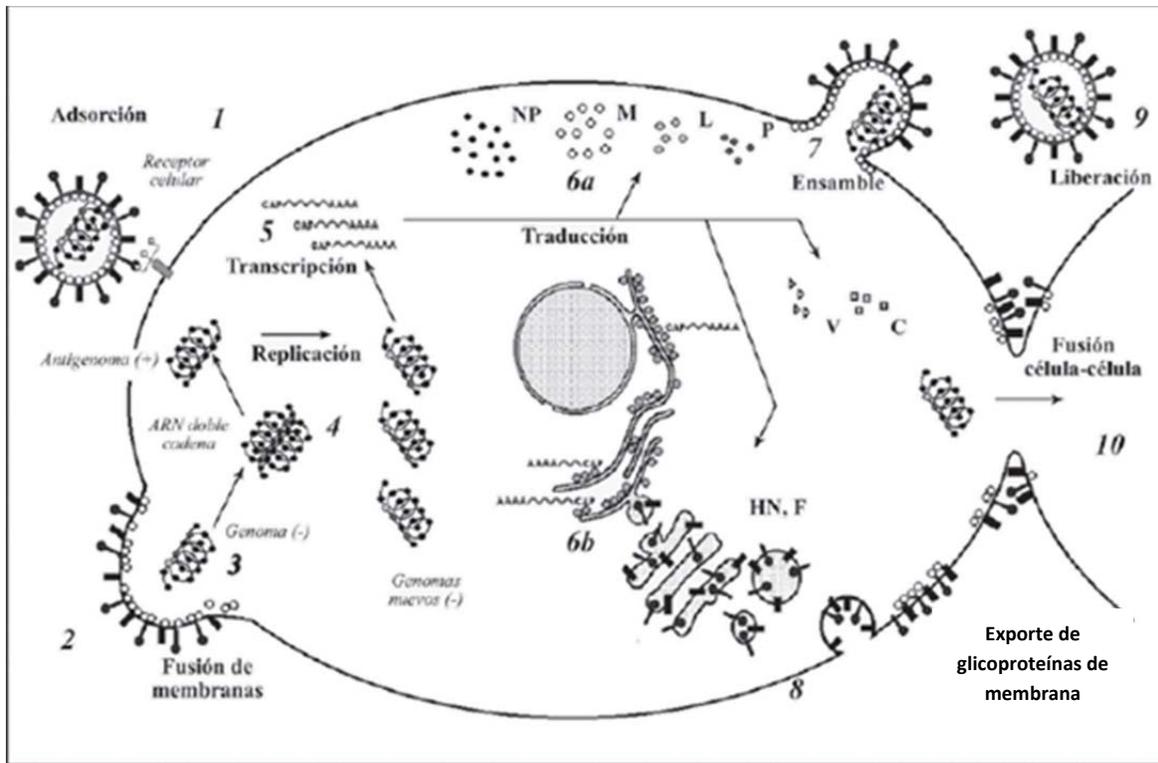


Figura 4. Replicación del PoRV en la célula.

1.4. Agente etiológico.

El Rubulavirus porcino es el agente causal de la EOA, el cual está clasificado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus*, especie *Rubulavirus porcino* (Hernández *et al*, 2004; Rima *et al*, 1995). Es un virus RNA envuelto con una cadena de sentido negativo, no segmentada, formada por 15180 bases, que actúan como molde para la síntesis del RNA mensajero (Wang *et al.*, 2007). Presenta 6 genes que codifican diferentes proteínas estructurales y no estructurales, en la siguiente disposición 3'-NP-P-M-F-HN-L-5'. La proteína HN es la responsable del reconocimiento del receptor viral y de la adhesión a las células blanco de la infección. Esta proteína estimula los anticuerpos neutralizantes más eficientes, en consecuencia la mejor respuesta inmune (Hernández *et al*, 2004; Linné *et al*, 1992; Reyes-Leyva *et al*, 2004). Hay

una especificidad de los anticuerpos hacia las proteínas Hemoaglutinina-Neuraminidasa (HN), Matriz (M) y NucleoProteína (NP) del virus, pero está demostrada la inmunodominancia de la proteína HN (Hernández *et al*, 2004).

En la superficie de la membrana viral se encuentran las glicoproteínas transmembranales HN y Fusión (F), en la parte interna de la misma se encuentra la proteína M. Estrechamente ligada a la cadena de RNA se encuentran las nucleoproteínas que conforman la nucleocápside helicoidal (Figura 5) (Linné *et al.*, 1992).

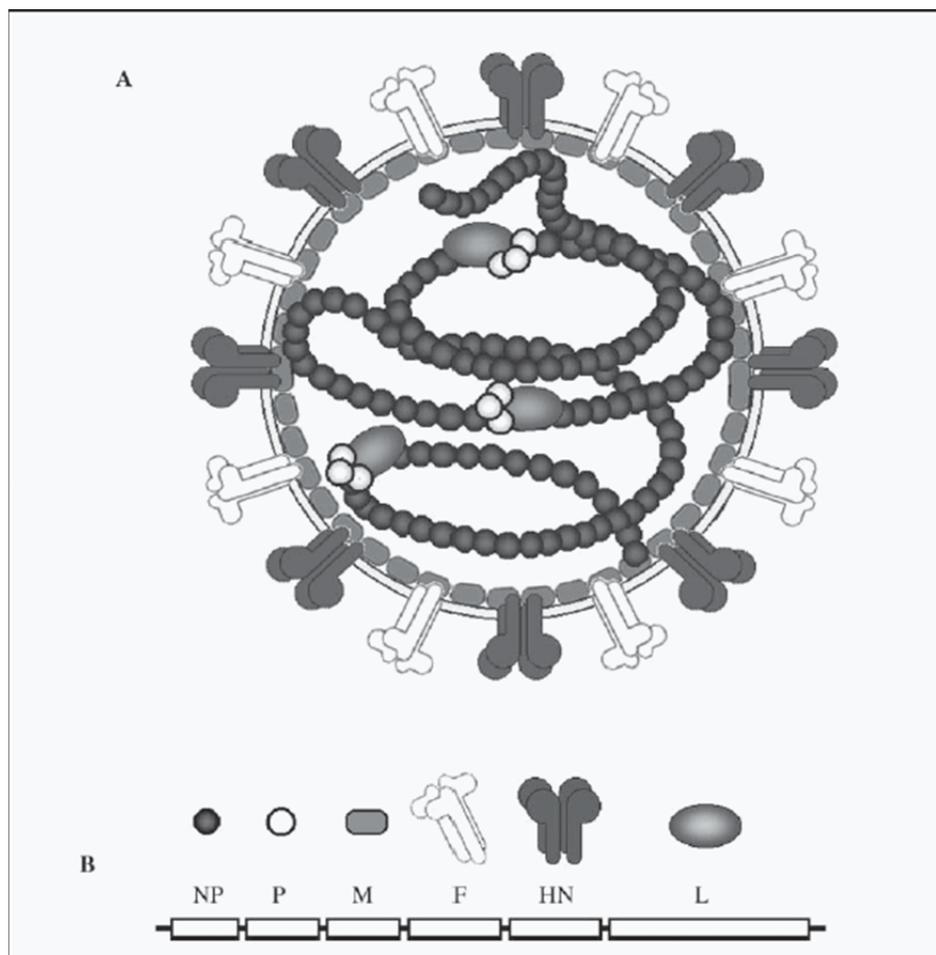


Figura 5. a) Esquema del PoRV y sus proteínas constituyentes. b) Esquema del mapa genómico del PoRV (Hernández *et al*, 2004).

1.5. El gen P.

El gen P puede dar origen a cuatro productos: P, V, I y C, los cuales están asociados a la nucleocápside, y junto con la proteína de alto peso molecular (L) forma el complejo polimerasa. Datos experimentales indican que las proteínas V y C se encuentran involucradas en la regulación de la replicación y la transcripción viral, además, se relacionan con la actividad inhibitoria sobre el complejo polimerasa viral y en la inhibición de las cascadas de activación del interferón en la célula hospedera como respuesta a la infección. La función de la proteína I aun es desconocida (Berg *et al.*, 1992).

La proteína V, de 249 aminoácidos, es codificada por una copia exacta del gen P. La adición de dos guanidinas no codificadas, entre las posiciones 586 a 591 de la secuencia genómica, permite que el marco de lectura se alargue para dar lugar a la expresión de la proteína P, de 404 aminoácidos. El marco de lectura que da origen a la proteína I se forma de manera similar al de la fosfoproteína (P), sólo que en lugar de añadir dos guanidinas se añade una, lo que ocasiona que el marco de lectura termine antes que cualquiera de los otros dos, originando una proteína de 174 aminoácidos. Por último, la proteína C (126 aminoácidos) se codifica en un marco de lectura más pequeño contenido dentro de los tres anteriores (Figura 6) (Berg *et al.*, 1992).

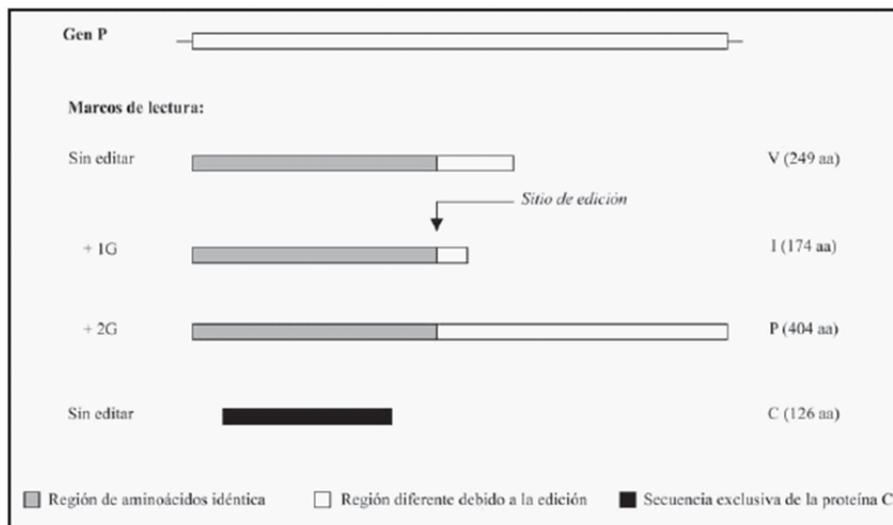


Figura 6. Productos del gen P (Hernández *et al.*, 2004).

1.6. Persistencia viral.

Los paramixovirus, tienen la habilidad de establecer infecciones persistentes *in vitro*, así como *in vivo*, este aspecto resulta importante por el riesgo que implica en la perpetuación del virus y por la posibilidad de existir animales persistentemente infectados que liberen el virus de forma esporádica (Cuevas *et al.*, 2000; 2009; Hernández, 1998; Hjetner, 1998).

En las infecciones por Paramixovirus, se espera que el virus conserve la capacidad de codificar las proteínas funcionales involucradas en la transcripción y replicación viral. Debido al tipo de replicación de los Paramixovirus, en gran medida las infecciones persistentes pueden conducir a enfermedades crónicas (Randall y Russell, 1991).

En la infección crónica producida por otro Paramixovirus, el virus del Sarampión, las proteínas involucradas en la persistencia son NP, P y L (Randall y Russell, 1991).

En las infecciones latentes, por lo general, la replicación del genoma del virus no se transcribe, sin embargo, podría llegar a replicarse, cuando se replica el ADN de la célula hospedera, además la transcripción del virus se restringe de manera específica y el mantenimiento del estado latente puede ser controlado por productos de genes codificados. Sin embargo, la persistencia exige la replicación continua del genoma viral, en contraste, con la infección latente (Ahmed *et al.*, 1996).

Estudios recientes demuestran que el PoRV puede mantener una infección persistente en el sistema nervioso, respiratorio, genitourinario y órganos linfoides (Cuevas *et al.*, 2009; Hjetner, 1997; Wiman, 1998).

1.7. Biología molecular del PoRV

Desde que el PoRV fue aislado por primera vez, se ha encontrado una variabilidad del gen Hemoaglutinina Neuraminidasa (HN) respecto a diferentes aislamientos del Rubulavirus porcino obtenidos desde 1990 y hasta el 2003. La realización de estudios de biología molecular y de secuenciación del gen HN de aislamientos del virus ha permitido identificar diferentes variantes (Tabla 1). Hasta el momento se encuentran descritas 11 secuencias diferentes del gen HN del Rubulavirus porcino, respecto al primer virus aislado en La Piedad, Michoacán en 1984 (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Actualmente se indica que no existe una reacción cruzada completa de los anticuerpos generados por los aislamientos PAC-4, PAC-6 y PAC-9, por lo que las variaciones antigénicas en la respuesta de anticuerpos implica que el uso de vacunas monovalentes no generarían una protección completa contra los diferentes subtipos antigénicos (Escobar-López *et al.*, 2012).

Virus	Año de aislamiento	Numero de acceso al GenBank	Estado
LPM	1984	S77541	Michoacán
C-I	1991	AY463798	Jalisco
C-II	1991	AY487249	Jalisco
C-III	1999	AY487251	Michoacán
C-IV	1999	AY487250	Michoacán
PAC2	1990	EF413172	Michoacán
PAC3	1992	EF413173	Michoacán
PAC4	1993	EF413174	Michoacán
PAC6	2001	EF413175	Jalisco
PAC7	2002	EF413176	Jalisco
PAC8	2002	EF413177	Jalisco
PAC9	2003	EF413178	Jalisco

Tabla 1. Variabilidad genómica del gen HN del PoRV (Moreno-López *et al.*, 1986; Paniagua-Buelnas, 2000; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

1.8. Métodos de diagnóstico

Debido a los diversos signos clínicos asociados con la infección por el PoRV, se dificulta el diagnóstico de esta enfermedad. Las pruebas serológicas de inhibición de la hemoaglutinación (IH), inmunofluorescencia indirecta (IF), virus neutralización (VN) y el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) son las más utilizadas para el diagnóstico. En particular la técnica de inhibición de la hemoaglutinación ha sido utilizada en estudios epidemiológicos (Nordengrahn *et al.*, 2002).

1.8.1. PCR.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) fue desarrollada por el Dr. Kary Mullis en 1983. Es un método para la amplificación selectiva de una región elegida dentro de una molécula de ADN (Mullis *et al.*, 1987).

Es una reacción *in vitro* que necesita la presencia de:

- Una cadena de ADN “diana” donde está incluido el fragmento que se puede amplificar.
- Un par de cebadores o también llamados primers, los cuales son cadenas simples de ADN, de entre 18-30 nucleótidos sintetizados en un laboratorio y diseñados de manera que permiten definir los límites del segmento que se va a amplificar.
- Nucleótidos que son precursores de las nuevas cadenas de ADN (adenina, timina, guanina y citosina)
- La enzima polimerasa, la cual usando como punto de inicio el sitio donde se unen los cebadores, va a formar las cadenas nuevas (Mendoza *et. al.*, 2008).

Básicamente cada ciclo de amplificación se divide en tres etapas.

La primera etapa consiste en la desnaturalización por calor del ADN, el cual se calienta hasta una temperatura de 92° a 96° separando la doble hebra de ADN, en dos hebras sencillas rompiendo los enlaces de hidrogeno que unen a las bases, mientras que los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfato permanecen intactos (Mendoza *et. al.*, 2008; Mullis *et. al.*, 1987).

La segunda etapa consiste en la hibridación o alineamiento de los cebadores, donde la temperatura se reduce, y los rangos de alineamiento van de 40° a 65° dependiendo de los primers. Para que se pueda producir la hibridación cada cebador debe ser complementario del tramo al que tiene que unirse en las cadenas separadas del ADN molde (Mendoza *et. al.*, 2008; Mullis *et. al.*, 1987).

La tercera etapa es la extensión. Una vez que los cebadores se unieron a sus secuencias complementarias la temperatura se eleva a 72°, temperatura a la cual la Taq polimerasa lleva a cabo su función de replicación de hebras de ADN, la cual comienza el proceso de extensión en dirección 5' a 3' agregando los nucleótidos correspondientes obteniéndose la hebra complementaria de ADN; para ello, la Taq polimerasa utiliza los desoxidonucleótidos (dNTPs) agregados a la mezcla de la reacción (Mendoza *et. al.*, 2008; Mullis *et. al.*, 1987).

Una limitante de esta técnica es que se debe utilizar ADN como secuencia “diana”, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar RNA de manera similar, incluso el RNA generalmente es de una sola hebra y es sensible al calor, por estas razones es necesario realizar una transcripción reversa (RT) antes de iniciar una amplificación por PCR. La RT transforma una copia de la hebra de RNA a ADN complementario (cDNA) que es estable al calor y resistente a la metodología del PCR (Mendoza *et al*, 2008).

1.8.2. PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real es reconocida como un método preciso, sensible y más rápido, es utilizada para la cuantificación de los ácidos nucleicos y reduce el riesgo de contaminación, en comparación con el PCR punto final, el cual es un método cualitativo. Esta técnica se basa en la detección de los productos del PCR en tiempo real a través de fluorocromos, los cuales pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas de hibridación específica (Mackay *et al.*, 2002).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN de doble hélice; el más empleado en PCR tiempo real es el SYBER Green I (Mendoza *et al.*, 2008).

Las sondas de hibridación específicas están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas TaqMan (Figura 7), las sondas molecular beacons (Figura 8), sondas FRET (Figura 9) y sondas scorpions (Figura 10) (Mackay *et al.*, 2002).

Las sondas de hidrólisis TaqMan son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra las moléculas donadora y receptora deben estar cercanas. Mientras la sonda se encuentra intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de la secuencia la sonda se hibrida con su cadena complementaria y la ADN polimerasa al desplazarse a lo largo de la cadena hidroliza el extremo 5' de la sonda produciendo la liberación del fluorocromo donador, alejándolo del aceptor y liberando la fluorescencia (Mackay *et al.*, 2002).

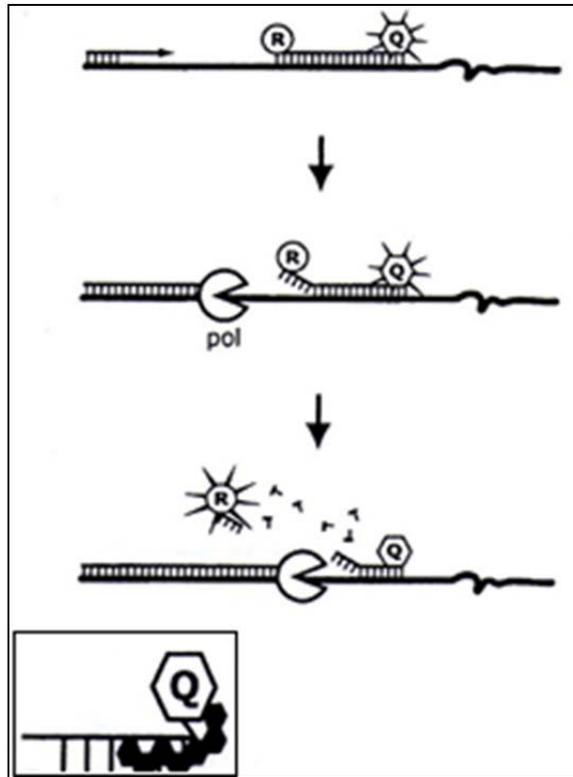


Figura 7. Sonda TaqMan. Durante la amplificación la sonda se degrada en la etapa de polimerización, liberando al quencher (Q), el cual es el inhibidor de la fluorescencia del marcador fluorescente (R) (Mackay *et al*, 2002).

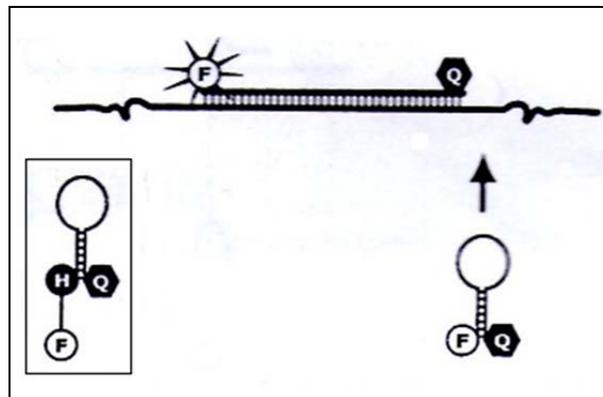


Figura 8. Mecanismo de la sonda molecular beacons. Durante la reacción, cuando la sonda se une a la secuencia específica del ADN “diana”, la horquilla se abre, separándose el fluorocromo (F) y el quencher (Q), con lo que se produce un incremento de la fluorescencia (Mackay *et al*, 2002).

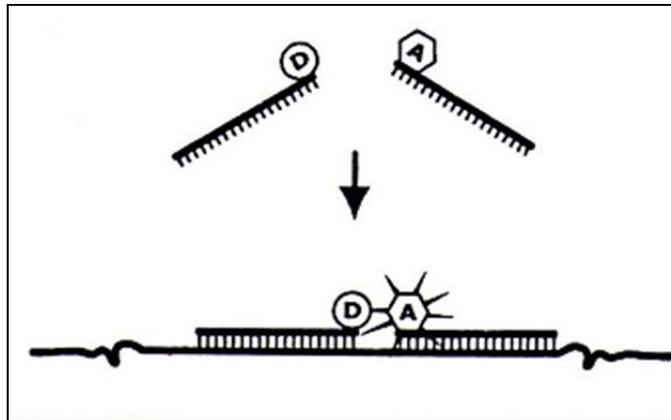


Figura 9. Sondas FRET. Una de las sondas lleva el donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado el donador transfiere su energía al aceptor, que a su vez emite la fluorescencia (Mackay *et al*, 2002).

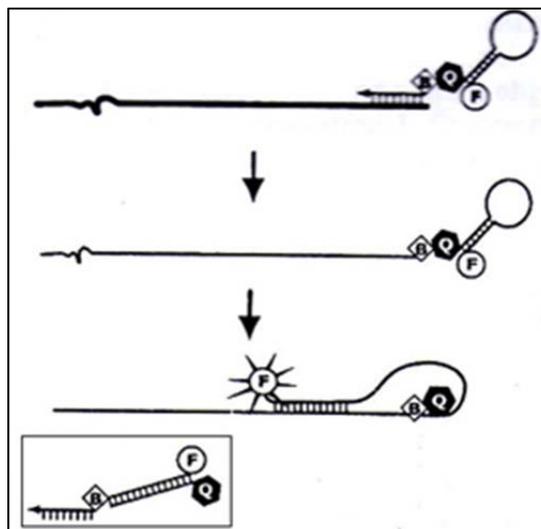


Figura 10. Sonda escorpión. La horquilla está unida al extremo 5' de un primer específico por medio de un bloqueante (B). Después de la extensión del primer durante la amplificación la secuencia específica de la sonda se une a la región complementaria dentro de la misma hebra de DNA. Esta hibridación abre la estructura de la horquilla, de tal forma que el quencher (Q) ya no queda próximo al fluorocromo (F) y se emite la fluorescencia. El bloqueante evita que continúe la amplificación a lo largo de la sonda (Mackay *et al*, 2002).

1.8.3. ELISA.

El Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas, ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay), es un método versátil, sensible y fácil de manejar. Esta técnica se adapta para la identificación de un número cada vez mayor de moléculas de interés biológico, sobre todo para el diagnóstico clínico. Consiste en la unión del Ag con el Ac, según sea el objeto de la búsqueda, a una fase sólida como pueden ser perlas, discos, tubos, microplacas de polivinil o poliestreno. La reacción continúa su desarrollo al agregar los reactivos que se adhieren a la fase sólida y el material sobrante se elimina por simples lavados entre cada paso. Para revelar la reacción se emplean conjugados de anticuerpos marcados con peroxidasa, que al reaccionar con el sustrato adecuado dan una reacción coloreada fácil de medir en un espectrofotómetro o a simple vista. La cantidad de color presente en determinado tiempo es directamente proporcional a la concentración del Ac o del Ag presente en la muestra (Mendoza *et. al.*, 2008).

2. Justificación.

La enfermedad de ojo azul solamente ha sido descrita en granjas porcina de México y representa un grave problema sanitario y económico en la industria porcina del país, ya que actualmente es una limitante para su comercio internacional (APHIS, 2005). Investigaciones previas han demostrado que el PoRV posee la capacidad de establecer infecciones persistentes, lo que implica un riesgo importante de que los animales convalecientes se mantengan como reservorios y puedan liberar el virus de manera esporádica (Cuevas *et al.*, 2009; Hjetner B *et al.*, 1998; Wiman *et al.*, 1998). Por lo tanto, es necesario establecer y desarrollar Cuevas *et al.*, 200métodos de diagnóstico sensibles y específicos, que permitan la detección de cerdos persistentes al PoRV. Con lo cual poder establecer un manejo seguro en la movilización de animales hacia zonas libres de la enfermedad y disminuir la diseminación del virus entre granjas en el país.

3. Hipótesis.

Si los cerdos se encuentran infectados persistentemente por el Rubulavirus porcino, entonces se podrá identificar la presencia de un gen conservado, como es el caso del gen P, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, utilizando RNA extraído de las células mononucleares de sangre periférica de cerdos recuperados de una infección aguda, dado que el virus, en etapas tempranas de la infección se transporta en monocitos.

4. Objetivos.

Objetivo general.

Identificación de cerdos persistentemente infectados por Rubulavirus porcino, el cual provoca la enfermedad de ojo azul, mediante un método de diagnóstico rápido y práctico de PCR en tiempo real, a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Objetivos particulares.

- Validar un método cuantitativo de PCR para el diagnóstico del Rubulavirus porcino.
- Establecer la sensibilidad del ensayo mediante una concentración conocida de RNA.
- Valorar la prueba de RT-PCR tiempo real estandarizada en forma comparativa con una prueba experimental de ELISA.

5. Materiales y métodos.

5.1. Diseño experimental.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de epizootiología del CENID-Microbiología Animal INIFAP, ubicado en la carretera México-Toluca Km. 15.5, colonia Palo Alto, delegación Cuajimalpa de Morelos, México D.F. Se emplearon muestras de sangre de cerdos de diferentes edades, de granjas confirmadas positivas por aislamiento viral y una granja sin reportes previos de la EOA. Posteriormente se realizó la detección de animales infectados persistentemente por el PoRV, mediante RT-PCR en tiempo real a partir de PMBC y se compararon los resultados obtenidos mediante sus respectivos sueros con la prueba experimental de ELISA.

5.2. Toma de muestras.

De cada cerdo se obtuvieron dos muestras de sangre, una de sangre completa para el aislamiento de leucocitos en tubos Vacutainer™ con EDTA y otra en tubos Vacutainer™ sin anticoagulante para la obtención de suero (Rangel, 1999). Las muestras fueron tomadas de la yugular de los animales, todo esto de acuerdo al reglamento del CICUAE de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Las muestras se procesaron en el laboratorio de epizootiología del CENID-Microbiología Animal INIFAP.

Para la obtención de suero las muestras de sangre de cada animal se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos, el cual posteriormente fue separado en condiciones de esterilidad en tubos Eppendorf. Las muestras de suero fueron conservadas a -20°C hasta su utilización (Martínez *et. al.*, 2006).

5.3. Animales y granjas.

Se seleccionaron 3 granjas:

Granja 1: Ubicada en el municipio de Zumpango, Estado de México. De la cual se tomaron 18 muestras de cerdas de maternidad de 1 a 7 partos. Confirmada positiva al PoRV por aislamiento viral.

Granja 2: Ubicada en Pénjamo, Estado de Guanajuato. Donde fueron tomadas 30 muestras de cerdas de maternidad de 0 a 6 partos y 23 muestras de sementales. Confirmada positiva al PoRV por aislamiento viral.

Granja 3: Ubicada en Toluca, Estado de México, se tomaron 21 muestras de cerdas de reemplazo. Sin ningún antecedente de brote de la enfermedad de ojo azul.

Como controles negativos, se utilizaron 8 muestras de RNA extraído de PBMC de cerdos SPF.

5.4. Obtención de células mononucleares de sangre periférica.

La separación de leucocitos de las muestras de sangre completa se realizó utilizando el gradiente Ficoll-Paque Plus® de GE healthcare®, el cual es un gradiente de densidad para que mediante la centrifugación se obtenga la separación de las PBMC.

La sangre se diluyó en una proporción 1:1 en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril, se colocó en el fondo de un tubo cónico de 15 ml, el gradiente Ficoll-Paque Plus® y posteriormente sin mezclar se agregó sangre diluida, todo esto en relación 1:3. Los tubos se centrifugaron sin freno a 2000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente para la separación de PMBC, las cuales permanecieron entre la interface del plasma y del gradiente. Las PMBC se separaron cuidadosamente y se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS estéril para posteriormente centrifugarse a 1800 rpm durante 5 minutos. Se decantó el

sobrenadante y las células se resuspendieron en 300µl de PBS estéril para proceder a la extracción de RNA (Gorodezky, 2008).

5.5. Extracción de RNA.

Para la extracción de RNA se utilizó el kit TRIzol® Reagent de Invitrogen™, el cual contiene una solución, compuesta por isocianato de fenol y guanidina para aislar RNA total a partir de células y tejidos.

A las PBMC resuspendidas en 300µl de PBS estéril se les adicionó 700µl de TRIzol Reagent, se homogenizó y se dejó reposar 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200µl de cloroformo a 4°C y se mezcló perfectamente para dejar reposar 3 minutos, se centrifugo a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4° C y se obtuvieron 3 fases, la fase acuosa que contiene el RNA se extrajo con cuidado y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf estéril en el cual se le adicionó 500µl de isopropanol a 4°C, para posteriormente incubar a -20°C durante 24 horas. Al día siguiente se centrifugó a 13 500 rpm durante 20 minutos a 4°C, se removió el isopropanol y se adicionó 1ml de etanol al 75%, se agitó en vortex por 15 segundos y se prosiguió a centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se retiró el etanol sin mover el botón y se dejó secar a temperatura ambiente bajo la luz de la campana, al final se re suspendió en 30µl de agua DEPC libre de RNAsas, y se almacenó a -70°C para su uso posterior (Haimov-Kochman R *et. al.*, 2006).

5.6. Cuantificación de RNA.

La cuantificación de RNA se llevó a cabo mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop 2000® de Thermo Scientific©, el cual es el único que permite medir volúmenes desde 0.5µl de muestra.

Para realizar la cuantificación fue utilizado 1µl de cada muestra de RNA. Y fue leído a una longitud de onda de 260 nm.

5.7. Prueba de RT-PCR en tiempo real.

La técnica de RT-PCR en tiempo real se desarrolló y estandarizó para la detección del gen P del Rubulavirus porcino en muestras de sangre completa y tejidos. Este ensayo se adaptó a un sistema Cepheid SmartCycler®.

Para la estandarización de la técnica se trabajó con una cantidad conocida de RNA a partir de la cepa LPMV del PoRV obtenida en cultivo celular PK-15. A partir de este RNA se realizaron 3 diluciones decimales seriadas para establecer la sensibilidad del ensayo (Tabla 2).

Dilución	RNA ng/μl
1	100
2	10
3	1
4	0.1

Tabla 2. Cantidad de RNA total utilizada en cada dilución (ng/μl) para el establecimiento de la curva estándar.

Para la realización de la RT-PCR en tiempo real se seleccionaron iniciadores específicos para el gen P, 5'-GCA CTT TCG GGG GCA GG-3' (sentido) y 5'-TGG TGC AAC CCA GCA TGT-3' (antisentido) que amplifican un fragmento de 71 pares de bases. Se utilizó una sonda Taqman marcada con el fluorocromo FAM con la secuencia 5'-/56-FAM/CAA GAT ACT ACC AAT GCA CCT G /3BHQ_1/-3' (Cuevas *et. al.*, 2013). Para la detección se utilizó el kit de Ambion® AgPath-ID™ One-step RT-PCR de acuerdo al protocolo de manufactura a un volumen final de 25 μl (Tabla 3). Posteriormente, se programó el termociclador de acuerdo al protocolo de manufactura del kit para el RT-PCR tiempo real.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
RT	45°C	10 minutos	
RT inactivación y desnaturalización inicial	95°C	15 minutos	1
PCR amplificación	95°C	15 segundos	40
	60°C	60 segundos.	

Tabla 3. Programa RT-PCR tiempo real para la detección de un fragmento del gen P Rubulavirus porcino

REACTIVO	VOLUMEN en µl.
Buffer 2x	12.5
Enhancer	0.83
Primer F	1
Primer R	1
Sonda	1
Enzima	0.5
H₂O	6.17
RNA muestra	2
VOLUMEN TOTAL	25

Tabla 4. Composición de la mezcla para RT-PCR tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen P del PoRV.

5.8. Prueba de ELISA

Con los sueros obtenidos, se realizó la técnica de ELISA indirecta para la detección de IgG contra la proteína HN del PoRV. Esta técnica se realizó como lo describen Cuevas y colaboradores (2011), validándola mediante la comparación con una curva de concentraciones estándar de IgG (ensayo de captura), estableciendo una regresión lineal entre la concentración de IgG y densidades ópticas (D.O.), lo que permitió calcular la concentración específica para anticuerpos contra Rubulavirus porcino en relación a los valores de densidad

óptica de la curva estándar. Para la lectura y registro de la prueba, el lector de ELISA se calibro a una longitud de onda de 450 nm para determinar la D.O.

5.9. Análisis estadístico.

Se realizó estadística descriptiva de los datos, calculando la media y desviación estándar de los resultados obtenidos de las pruebas de RT-PCR tiempo real y ELISA para determinar diferencias entre granjas. A los resultados se les realizó un análisis estadístico de T de Student y análisis de varianza para los grupos de la granja ubicada en Toluca y Guanajuato (Daniel, 2004).

6. Resultados.

Para calcular la concentración en ng de RNA total para el gen P del PoRV de las muestras obtenidas, se estableció una curva estándar con los resultados obtenidos del RT-PCR tiempo real de las diluciones decimales seriadas a partir de 100 ng/μl de la cepa LPMV del PoRV, con un límite de detección de 0.1ng de RNA viral (Tabla 4) utilizando el termociclador Cepheid SmartCycler® (Figura11). Se realizó una gráfica con regresión lineal entre el número de ciclos y diluciones de la curva en donde se obtuvo una pendiente de -3.813 y un coeficiente de correlación $R^2= 0.998$ (Figura 12).

Al interpolar los valores de Ct de las muestras de las granjas de Zumpango, Toluca y Guanajuato con la curva estándar se calculó la concentración de RNA viral para el PoRV. En este caso es importante considerar que debido a las observaciones realizadas en este estudio un valor Ct superior al ciclo 35 indica que no hay amplificación específica y por lo tanto no se incluyeron en los cálculos.

De las 18 cerdas ubicadas en la granja del municipio de Zumpango Estado de México, 2 resultaron negativas a la prueba de RT-PCR tiempo real (11.11%). Las muestras presentaron un valor promedio de Ct= 28.7 equivalente a 47.67 ng/μl de RNA viral del gen P (Tabla 5). En la granja ubicada en el estado de Guanajuato, una de las hembras resulto negativa a la prueba (3.33%), mientras en este grupo de hembras de 0 a 6 partos el promedio de Ct= 30.43 equivalente a 2.45 ng/μl de RNA viral. En el caso de los sementales 7 de 23 animales resultaron negativos (30.4%), y el promedio Ct fue igual a 32.44 equivalente a 1.32 ng/μl de RNA viral (Tabla 6). De las muestras obtenidas de las cerdas de reemplazo de la granja de Toluca, 4 de 21 animales resultaron negativos (19.05%), el resultado del promedio de Ct fue de 33.10 equivalente a 0.35 ng/μl de RNA (Tabla 7).

Las 8 muestras de cerdos SPF presentaron un valor Ct superior al 35 por lo que se consideraron negativos.

En la prueba de ELISA se obtuvo la concentración de IgG de las muestras de sueros provenientes de animales muestreados de las granjas problema. Para establecer el punto de corte de esta prueba, los resultados (Tabla 8) se evaluaron realizando una comparación entre las granjas de Zumpango, Toluca, Guanajuato y el grupo control negativo, en donde, entre granjas, la de Guanajuato arrojó una mayor concentración de IgG y la granja de Toluca la menor concentración de anticuerpos. Utilizando el programa STATA® 7.0 y mediante el análisis estadístico T de Student indico que existe una diferencia significativa entre las tres granjas evaluadas y el grupo control negativo, además de encontrar diferencias en la cantidad de IgG entre la granja de Zumpango y Guanajuato, Zumpango y Toluca, Guanajuato y Toluca.

De acuerdo a la edad de las cerdas, se hicieron 3 grupos para la granja de Toluca (Tabla 9) y Guanajuato (Tabla 10). Se observó que en las dos granjas la cantidad de IgG es proporcional a la edad, a mayor edad, mayor cantidad de anticuerpos contra el PoRV. Sin embargo cuando se realizó el análisis de varianza mediante el programa estadístico STATA® 7.0 el resultado obtenido indicó que hay igualdad entre los 3 grupos, tanto para la granja de Zumpango y la granja de Guanajuato. No existió diferencia significativa entre en las edades de los animales y la concentración de IgG. El grupo control negativo mostró una baja cantidad de IgG para la proteína HN del PoRV.

Dilución	RNA ng/μl	Valor Ct
1	100	23.47
2	10	26.92
3	1	31.18
4	0.1	34.76

Tabla 5. Resultados de la curva de RT-PCR tiempo real.

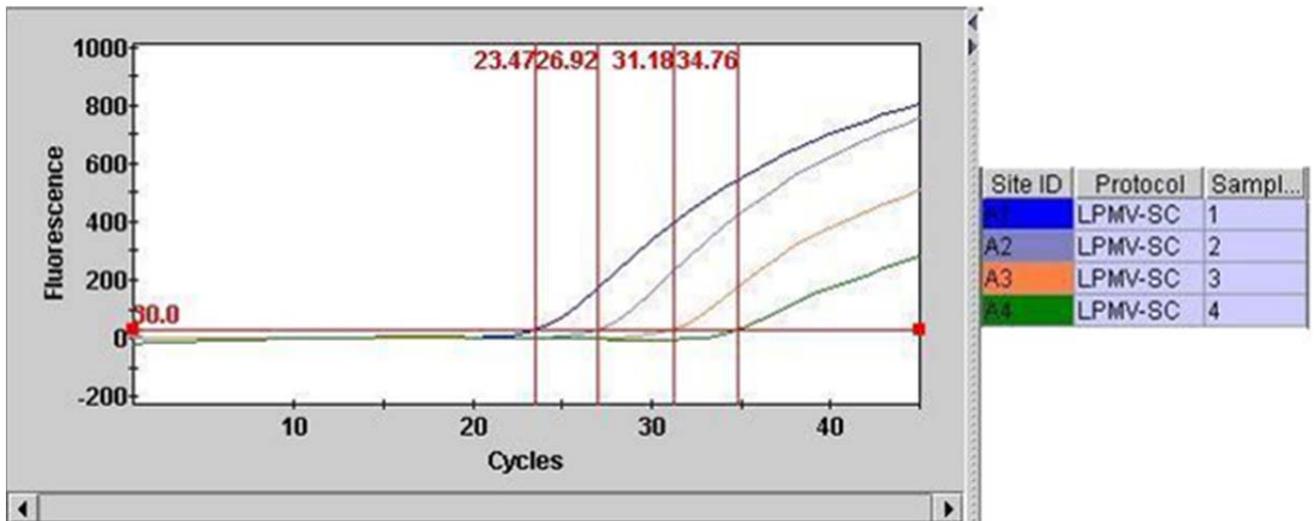


Figura 11. Curva de la amplificación RT-PCR tiempo real de diluciones de RNA total de la cepa LPMV del PoRV obtenida en cultivo celular PK-15.

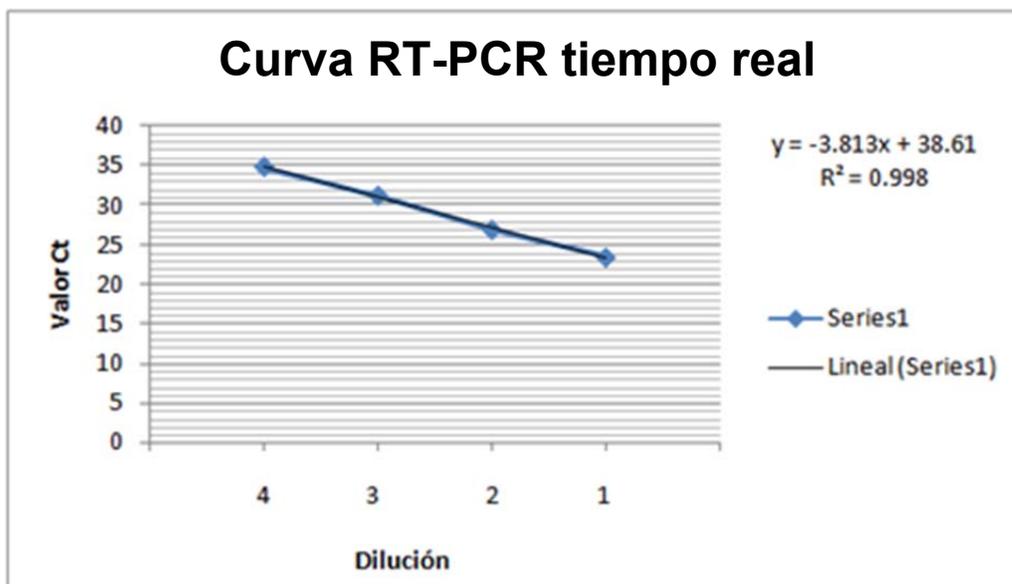


Figura 12. Grafica de la curva para la RT-PCR tiempo real.

Granja de Zumpango	
Número de muestra	Valor Ct
1	>35
2	26.7
3	31.4
4	27.43
5	29.92
6	30.07
7	28.91
8	28.92
9	31.71
10	29.34
11	28.09
12	30.19
13	24.11
14	20.38
15	23.78
16	26.36
17	>35
18	29.31

Tabla 6. Resultados obtenidos por RT-PCR tiempo real para 18 muestras obtenidas de una granja ubicada en el municipio de Zumpango, Estado de México. Con un promedio Ct= 28.70 equivalente a 47.67 ng/μl de RNA viral.

Granja de Guanajuato	
Hembras	
Número de muestra	Valor Ct
1	29.46
2	33.28
3	28.09
4	34.62
5	28.91
6	29.99
7	29.03
8	>35
9	28.64
10	28.11
11	30.2
12	33.14
13	30.2
14	30.06
15	27.22
16	30.21
17	27.38
18	30.38
19	33
20	30.43
21	31.45
22	29.99
23	29.97
24	28.69
25	29.91
26	31.74
27	29.92

28	34.70
29	29.4
30	29.63
Sementales	
Número de muestra	Valor Ct
1	>35
2	29.92
3	26.77
4	30.04
5	28.4
6	>35
7	32.99
8	30.43
9	34.35
10	33.34
11	33.32
12	32.23
13	29.39
14	29.94
15	32.52
16	33.18
17	>35
18	>35
19	31.71
20	>35
21	32.59
22	>35
23	>35

Tabla 7. Resultados obtenidos por RT-PCR tiempo real para 30 muestras de hembras de 0 a 6 partos y 23 muestras de sementales obtenidas de una granja ubicada en el estado de Guanajuato. Con un promedio Ct= 30.43 equivalente a 2.45 ng/μl de RNA viral para las hembras, y Ct= 32.44 equivalente a 1.32 ng/μl de RNA viral para los sementales.

Granja Toluca	
Número de muestra	Valor Ct
1	>35
2	32.26
3	32.72
4	29.54
5	32.37
6	32.55
7	33.99
8	>35
9	31.09
10	33.91
11	30.58
12	31.79
13	30.83
14	33.98
15	34.43
16	>35
17	>35
18	34.43
19	32.97
20	34.28
21	33.42

Tabla 8. Resultados obtenidos por RT-PCR tiempo real para 21 muestras obtenidas de una granja ubicada en el municipio de Toluca, Estado de México. Con un valor promedio Ct= 33.10 equivalente a 0.35ng/μl de RNA viral.

Granja.	N=	Promedio [] de IgG ng/μl
Zumpango	18	12248
Guanajuato	53	18993
Toluca	21	9018
Grupo control (-)	8	1267

Tabla 9. Resultados de la prueba de ELISA.

Grupos.	N=	Promedio [] de IgG ng/μl
Grupo 1 Cerdas de reemplazo de menor edad	7	8920
Grupo2 Cerdas de reemplazo de mediana edad	7	9055
Grupo 3 Cerdas de reemplazo de mayor edad	7	10724

Tabla 10. Resultados de los diferentes grupos de la granja de Toluca a la prueba de ELISA.

Grupos.	N=	Promedio [] de IgG ng/μl
Grupo 1 Cerdas de 0 a 1 parto	10	11647
Grupo 2 Cerdas de 2 a 3 partos	10	21424
Grupo 3 Cerdas de 4 a 6 partos	10	22269

Tabla 11. Resultados a la prueba de ELISA de los diferentes grupos de la granja de Guanajuato.

7. Discusión.

En el establecimiento de la prueba de RT-PCR en tiempo real para amplificar un fragmento del gen P del PoRV se realizó una curva estándar para determinar el límite de detección, el cual fue de 100 a 0.1 ng/μl de RNA viral; estudios previos han descrito un límite de detección de 10^1 a 10^2 copias de RNA viral para el gen P del PoRV a partir de su cuantificación con un plásmido estándar (Cuevas *et al.*, 2007, 2013).

La utilización de la técnica de RT-PCR tiempo real proporciono resultados satisfactorios, al poder detectar la presencia de RNA viral en PMBC, de animales clínicamente sanos, incluso, de animales sin antecedentes de enfermedad. Estudios anteriores indican que mediante la técnica de RT-PCR anidada se logró detectar RNA viral de cerebro medio de cerdos convalecientes a una infección experimental inoculados con PoRV (Wiman *et al.*, 1998). Incluso el gen P se ha detectado en linfonodos de animales adultos recuperados a una infección aguda utilizando la técnica de RT-PCR (Cuevas *et al.*, 2009).

La granja ubicada en el municipio de Zumpango fue la que mostro el mayor promedio de RNA viral, con 47.67ng/μl. Esto indica que la circulación de virus pudiera ser mayor, en comparación con las granjas ubicadas en Toluca y Guanajuato. Esto puede estar asociado a la de bioseguridad de la granja, como ha sido descrito por Padilla (2007), donde sugiere que uno de los factores determinantes para controlar la circulación de los patógenos en las granjas es la bioseguridad, el manejo y el grado de tecnificación. En este caso, la granja de Zumpango no es tecnificada, al igual que la granja ubicada en Toluca, Estado de México, en esta última se detectó una mínima cantidad de RNA viral (0.35ng/μl). Indicativos de una posible circulación viral baja en la granja. En este centro de producción porcina, no existen casos clínicos reportados de la enfermedad de ojo azul y los estudios serológicos a inhibición de la hemaglutinación para el diagnóstico de esta enfermedad se han reportado como negativos, a partir de esto, se puede resaltar la importancia del uso de técnicas con una gran

sensibilidad, como es el caso de la RT-PCR tiempo real (Mackay *et al.*, 2002) En el presente trabajo se observó que mediante el uso de la técnica RT-PCR tiempo real fue posible detectar RNA viral en cerdos infectados que serológicamente fueron negativos e incluso sin antecedentes de signología clínica a ojo azul.

Al analizar los resultados obtenidos de las granjas de Zumpango, Guanajuato y Toluca, se observó que algunas muestras resultaron negativas (11%, 3% y 19% respectivamente) a la prueba de RT-PCR tiempo real, esto puede ser debido a que posiblemente el virus se encontró en una fase temprana de infección persistente (crónica) sin la síntesis de la fosfoproteína viral o a una baja concentración de RNA viral en las células utilizadas (Randall y Russell, 1991; Ahmed *et al.*, 1996).

De las muestras obtenidas en la granja ubicada en el estado de Guanajuato, las hembras presentaron una cantidad promedio mayor de RNA viral, 2.45ng/μl, comparada con los sementales que promedian 1.32ng/μl. La diferencia en la cantidad de RNA viral detectado y el porcentaje de animales detectados pudiera estar asociado a que los sementales se encuentran en un sitio distinto al de las hembras, al número de animales muestreados y al número de población existente en la granja, lo que influiría en la circulación del virus en la unidad de producción pecuaria (Padilla, 2007).

En el análisis serológico la prueba de ELISA indico que en las tres granjas existen anticuerpos para el PoRV. No obstante, los resultados observados muestran una clara diferencia en la presencia de RNA viral y títulos de anticuerpos específicos contra el virus relacionados por la zona donde se ubica la granja, es decir; la granja de Guanajuato tuvo la mayor cantidad de anticuerpos contra el PoRV con 18993 ng/μl. Estudios recientes señalan que en este estado existe una seroprevalencia del 27.74% (Escobar-López *et al.*, 2012), la cual es superior en comparación con la seroprevalencia obtenida en el Estado de México que es de tan solo el 10%, donde se observa una menor cantidad en el título de anticuerpos de las granjas de Zumpango (12248 ng/μl) y Toluca (9018 ng/μl). La ventaja de

esta técnica, radica en la posibilidad de detectar y cuantificar la cantidad de IgG que contienen los sueros de los cerdos (Cuevas *et al.*, 2011).

Estudios serológicos previos utilizando la técnica de IH en la granja de Toluca habían resultado negativos, sin embargo, con la prueba de ELISA de captura, se pudieron detectar anticuerpos contra la proteína HN del PoRV. Esto indica que la cantidad de anticuerpos que tienen los animales de la granja de Toluca no es la óptima para inhibir el efecto aglutinante del virus de ojo azul, ya que se menciona que para que la inhibición de la hemaglutinación se produzca, debe de existir una cantidad óptima de virus, eritrocitos y anticuerpos (Martínez *et al.*, 2006), además de que las pruebas inmunoenzimáticas presenta una mayor sensibilidad en comparación con otras pruebas serológicas, por lo que fue posible detectar IgG contra la proteína HN del PoRV con la prueba experimental de ELISA de captura.

La baja cantidad de IgG detectada en los sueros de los cerdos controles negativos pudo ser ocasionada por la detección de proteínas de la bacteria *Escherichia coli*, ya que a pesar de que los cerdos son SPF Borie y colaboradores (1997) mencionan que la *Escherichia coli* es parte de la flora normal del intestino de los animales y la proteína HN utilizada para la realización de la prueba de ELISA es recombinante, y se utilizó esta bacteria para su producción.

8. Conclusión.

Mediante el empleo de la técnica de RT-PCR tiempo real se logró confirmar la presencia del gen P del PoRV en PMBC de animales infectados persistentemente, incluso en animales sin antecedentes de la enfermedad pero ubicados en una zona de alta seroprevalencia (Edo. De México).

La técnica de RT-PCR tiempo real resultó ser específica para detectar la presencia de un fragmento del gen P en animales infectados por el Rubulavirus porcino, dado que los cerdos SPF dieron resultados negativos a la prueba.

La prueba de RT-PCR tiempo real para identificar el gen P del PoRV tiene una alta sensibilidad, logrando detectar hasta 0.1ng/μl de RNA viral en muestras de PMBC.

Las pruebas de PCR tiempo real y ELISA permitieron obtener resultados cuantitativos y conocer la carga viral y las concentraciones de anticuerpos, que se relacionaron con el estado serológico de las granjas.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren una relación entre el grado de infección de las granjas y la seroprevalencia actual de la Enfermedad del Ojo Azul en la República Mexicana.

9. Referencias.

Ahmed R, Morrison LM, Knipe DM. (1996). Persistence of viruses. In Fields Virology, Third ed., (eds. B.N. Fields, Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.*), pp 219-249, Raven-Publishers, Philadelphia.

Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linné T, Moreno-López J, Hernández P, Kennedy S, Carroll BP, Herron B, Foster JC, Adair B. (1996). A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest.* Oct; 8(4):405-413.

APHIS. (2005) Reglamento de Importación de Animales y Productos de Origen Animal de la Agencia de Servicios de Inspección en Salud Animal y Vegetal USDA.

Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linné T. (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides, P, V and C, the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.* 73: 1195-1200.

Borie C, Monreal Z, Guerrero P, Sanchez M, Martinez J, Arellano C, Prado V. (1997). Prevalence and characterization of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated from healthy cattle and pigs slaughtered in Santiago, Chile. *Arch. med. vet.* 29 (2): 205-212

Bustin S. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol*, 29: 23-39.

Carreón RN, Fuentes MR, (1991). Frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos del altiplano y norte de México. *Veterinaria México*, 22:177-178.

CFSPH, (2006) Enfermedad de Ojo Azul.

Collier L, Oxford J. (2000). Childhood infections caused by paramixovirus. In: *Human Virology*, Second Edition. Ed Oxford University Press. Pp. 75-81.

Correa P, Pérez J, Martínez A. (1997). Encuesta nacional para detectar cerdos seropositivos al Rubulavirus porcino mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. En: memorias del XXXII AMVEC, pp198-199.

Correa-Girón P, Martínez A, Pérez J, Coba M A, Solis M. (2002) Vaccination against blue eye disease. In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermaan, J. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University Press, USA. pp. 65-70.

Cuevas S, Rodríguez-Ropón A, Kennedy S, Moreno-López J, Berg M, Hernández-Jauregui P. (2009) Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine Rubulavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 127: 148-152.

Cuevas S, Ramírez C, Alvarado A, Baule C, Hernández-Baumgarten E, Berg M, Vega M. (2011) Proteína HN del Rubulavirus porcino, adaptada a un sistema diagnóstico específico de ELISA cuantitativa, (enfermedad del ojo azul). *Memorias Premio Canifarma Veterinaria Dr. Alfredo Téllez Girón Rode*.

Cuevas S, Anne-Lee B, Alvarado A, Hernández-Jáuregui P, Rivera-Benítez F, Ramírez-Mendoza H, Berg M. (2013). Development of a real-time RT-PCR method for detection of porcine Rubulavirus (PoRV-LPMV). *Journal of Virological Methods*. In press.

Daniel WW. (2004). *Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud*. 4ta Ed. Mexico:Ed Limusa Wiley; 185-190, 314, 317.

Escobar-López AC, Rivera-Benítez J F, Castillo-Juárez H, Ramírez-Mendoza, H, Trujillo-Ortega ME, Sánchez-Betancourt JI. (2012) Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in sera of Field Swine and their Seroprevalence. *Transboundary and Emerging Diseases*. 59 (5): 416–420.

Flores-Méndez JA. (1983). *Ganado Porcino*, Editorial Limusa, Tercera Edición, México DF.

Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo ME, Fraire BI. (1992). Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. *Veterinaria México*, 23:37-39.

Gorodezky LC, Vázquez AA, Pérez VM, García SD, Rodríguez UD, Lliguin LI, Vega RM. (2008). Manual de procedimientos serológicos y celulares de inmunogenética. Departamento de Inmunología e inmunogenética del InDRE. Secretaría de Salud.

Haimov-Kochman R, Fisher S, Winn V. (2006) Modification of the Standard TRIzol-Based Technique Improves the Integrity of RNA Isolated from RNase-Rich Placental Tissue. *Clin. Chem.* 52: 159 - 160.

Hernández J, Reyes-Leyva J, Ramírez H, Valenzuela O, Zenteno E. (2004) Características de la respuesta inmune de los cerdos infectados con el Rubulavirus porcino. *Veterinaria México*. 35: 65-71.

Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez H, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. (1998). Immunity to porcine Rubulavirus infection in adult swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 64: 367-381.

Hjetner B, Wiman A-C, Svenda M, Moreno-López J, Linné T. (1998). Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine Rubulavirus (LPMV). *Arch Virol*. 143(3): 425-439.

Hjetner B, Linné T, Moreno-López J. (1997) Establishment and characterisation of a porcine Rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. *Acta. Vet. Scand.* 38. 213-224.

Kirkland PD, Stephano A. (2006) Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipha virus infections. In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D. *Diseases of swine*, 9th ed. Blackwell Publishing, USA. pp. 455-459

Koeslag J. (2006). Manuales para la educación agropecuaria. Porcinos, Trillas, SEP, Tercera edición, México.

Linné T, Berg M, Bergball A, Hjertner B, Moreno-López J. (1992). The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*. 33: 263-273.

Mackay I, Arden K, Nitsche A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 30 (6): 1292-1305.

Martínez Humberto, Mar Raúl, Ciprian Abel, Ramírez Hugo, Díaz Frank, Córdova Rodolfo, Jara María, Hernández Mirna, López Gerardo, Montes de Oca Alma. (2006) Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología Veterinaria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

Mendoza Susana, Alvarado José Luis, Hernández Eliseo, Ciprian Abel. (2008). Manual de diagnóstico virológico. UNAM. Primera edición. México.

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

Morilla A, González-Vega D, Estrada E, Diosdado F. (2002). Seroepidemiology of blue eye disease. In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermaan, J. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University Press, USA. pp. 59-64.

Mullis KB, Faloona F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155, 335-350.

Nordengrahn A, Moreno-López J, Merza M. (2002). New Approaches in the Diagnosis of Porcine Rubulavirus (LPMV). In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermaan, J. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University Press, USA. pp. 51-53.

Padilla Perez M. (2007). Manual de Porcicultura. MAG. San Jose, Costa Rica.

Paniagua-Buelnas NA. (2000). Estudio de la variación genética de la hemaglutinina-neudaminidasa (HN) del virus del síndrome del ojo azul (VSOA). Master Science Thesis, CINVESTAV, IPN, México.

Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S. (1997). Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J Comp Pathol.* 117(3):237-252.

Randall RE and Russell WC. (1991) Paramyxovirus persistence: Consequences for host and virus. In: *The Paramyxoviruses*. Ed. by David W. Kingsburg. Plenum Press, New York and London. pp 299-321.

Rangel Ignacio. (1999). *Manual de Prácticas de Laboratorio Clínico*. Segunda Edición. UNAM.

Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinoza B, Borrás MT, Ramírez H, Vallejo V, Zenteno E. (2002). Mecanismos moleculares de la patogenia viral, Estudios con el Rubulavirus Porcino. In: Cea-Bonilla A, Arenal-Mena IP, Reveros-Rosas H, Vázquez-Contreras E. *Mensaje Bioquímico XXVI*. Depto. Bioquímica. Fac. Medicina. UNAM. México DF. Pp. 99-129.

Reyes-Leyva J, García-Morales O, Santos-López G, Vallejo V, Ramírez-Mendoza H, Hernández J. (2004). Detección de la viremia en la infección experimental por Rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet.* 36: 39-47.

Rima B, Alexander D, Billeter M, Collins P, Kingsbury D, Limpkind M, Nagai Y, Örvell C, Pringle C, Ter-Mullen V. (1995). Family Paramyxoviridae. In: F.A. Murphy, Fauquet C, Bishop D, Ghabrial S, Jarvis A, Matelli G, Mayo M, Summers M. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Viena-Nueva York: Springer-Verlag. pp. 265-274

Rosales EF, Martínez LA, Correa GP. (1988). Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el

paramixovirus porcino LPM, al parecer asociado con el "Síndrome de Ojo Azul". Tec. Pec. 26: 304-311.

Ross, RF, (2003). Producción pecuaria en confinamiento y la salud de los animales, el consumidor y el ambiente. Resúmenes del simposio internacional "Fronteras de la Medicina Veterinaria". (2003) FMVZ, UNAM, impartido en el Centro Médico Nacional Siglo XXI. pp. 44-59.

SAGARPA. (2010). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Población Ganadera Porcino 2001-2010 http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=21&Itemid=330

Sánchez-Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Doporto JM, Ramírez-Mendoza H, Mendoza S, Hernández J, Reyes-Leyva J, Trujillo ME. (2008). Molecular characterization of the Hemagglutinin-Neuraminidase gene of porcine Rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. Research in Veterinary Science. 85: 359-367.

Sánchez JI, Doporto JM, Trujillo OM, Reyes LJ, Becerra FA. (2003) Alteraciones reproductivas en hembras reproductoras después de un brote de Ojo Azul. Memorias XXXIX Congreso AMVEC. Guadalajara Jal. Mex. pp 251.

Santos-López G, Hernández J, Borraz-Argüello M, Ramírez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. Arch. Med. Vet. 36(2): 119-136.

Stephano H, Gay M, Ramírez C, Maqueda J. (1981). An outbreak of encephalitis in piglets produced by an hemagglutinating virus. Proc of the international pig veterinary society congress, Mexico. pp 153.

Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. (1988) Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet Rec. 122:6-10

Stephano HA, Gay GM, (1985). El síndrome del ojo azul en granjas engordadoras. Memorias 19th Congreso AMVEC. Mérida, México: 71-74.

Stephano HA. (2002). Blue eye disease: clinical signs and lesions. In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermaan, J. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University Press, USA. pp. 47-50.

Tesis de Maestría. Cuevas RJ. (2000) Análisis inmunopatológico de la infección crónica en cerdos infectados naturalmente por Rubulavirus porcino (LPMV). FES-C.

Wang L, Hansson E, Yu M, Chua K, Mathe N, Crameri G, Rima B, Moreno-López J, Eaton B. (2007). Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in the Americas. Archives of Virology. 2007; 152: 1259-1271.

Watzinger F, Ebner K, Lion T. (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Molecular Aspects of Medicine. 27: 254-298.

Wiman A-C, Hjertner, B, Linné T, Herron B, Allan G, McNeilly F, Adair B, Moreno-López J, Berg M. (1998). Porcine Rubulavirus LPMV RNA persist in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. Journal of Neuro Virology. 4 (5): 545-552.