



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Caracterización Genética del Gen Hemaglutinin-Neuraminidasa (HN) de diferentes
aislados del *Rubulavirus porcino*.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

VERÓNICA PRUDENCIANA RIAÑO CRUZ

TUTOR PRINCIPAL:

José Iván Sánchez Betancourt

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECCIA-UNAM

COMITÉ TUTOR:

Rosalba Carreón Nápoles

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECCIA-UNAM

Susana Mendoza Elvira

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLAN-UNAM

México D.F.

Marzo 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Para mi hermosa familia: Ricardo Ávila Órnelas y Bebe Ricardo Ávila Riaño que sin duda son mi razón de ser y vivir. Sin ustedes simplemente esto no sería posible los amo infinitamente.

A mis queridos padres que siempre han estado conmigo en todo momento y han hecho un camino fácil a seguir. Los amo y admiro profundamente.

A mis hermanos Luis y Lety por estar siempre en los buenos y malos momentos, y por ayudarme siempre a salir adelante gracias.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas e instituciones que de una u otra manera hicieron posible la realización y culminación de este proyecto. Aportando conocimientos sin ningún interés, gracias por cada momento y aportación para esta meta que no fue fácil pero tampoco imposible.

A CONACYT por su apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

RESUMEN

La enfermedad del ojo azul (EOA) es un padecimiento de origen viral que afecta a cerdos de todas las edades y es provocada por un virus del género *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae* este virus causa una enfermedad sin atender de alto impacto en la República Mexicana. La HN (Hemaglutinina-Neuraminidasa) es una proteína multifuncional considerada la inmunodominante en la infección por el *Rubulavirus Porcino* (RVP). Estudios recientes han reportado cambios en la secuencia de nucleótidos del gen codificante para la HN, lo cual aporta virulencia y manifestaciones clínicas diferentes para cada aislamiento. Caracterizar genéticamente nuevos aislamientos del *Rubulavirus porcino*, permite conocer su secuencia a partir del gen HN y compararlas con aislamientos ya reportados para conocer el grado de similitud o diferencias que existen entre aislamientos y poder estudiar la variabilidad genética del gen HN del *Rubulavirus porcino* entre diferentes aislados virales.

La obtención del ARN viral se obtuvo a partir de sobrenadantes de monocapas de células Vero infectadas con cada uno de los siete virus que presentaron efecto citopático y hemaglutinación. Una vez que se logró estandarizar la técnica de RT-PCR se amplificó el gen HN de los diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino* y se realizó la secuenciación completa del gen HN, con lo que obtuvimos las secuencias de los siete virus y se analizaron a partir del programa MEGA® tomando como referencia al aislamiento LPM (Virus La Piedad Michoacán), en donde tuvimos como resultados que los virus (MICH/MEX/5/2008, MICH/MEX/13/2009, MICH/MEX/4/2008, GTO/MEX/6/2009, GTO/MEX/11/2008) se agruparon un grupo diferente al aislamiento EDO.MEX/MEX/34/2007, MICH/MEX/2/2008 y al virus LPM aislado por primera vez en 1980. Con este trabajo evidenciamos la evolución viral de diferentes cepas del *Rubulavirus porcino* a través del tiempo.

Palabras clave: *Rubulavirus porcino*, enfermedad del ojo azul, proteína HN.

ABSTRACT

The blue eye disease (BED) is of viral origin that affects pigs of all ages and is produced by a virus of the *Rubulavirus* genus of the *Paramyxoviridae* family. This virus causes a disease that has received scarce attention with a high impact on pig farming activities in Mexico. Hemagglutinin-neuraminidase (HN) is a multifunctional protein considered immunodominant in *PorcineRubulavirus* (PRV) infection. Recent studies have reported changes in the nucleotides sequence of the gene coding for HN, which gives rise to different virulence and clinical manifestations for each isolate. Genetic characterization of new PRV isolates allows knowing their sequence starting with the HN gene and enables their comparison with isolates already reported to know the degree of similarity or difference existing among isolates. In this way, it is possible to study the genetic variability of the HN gene of the PRV among different viral isolates.

Viral RNA was obtained from supernatants of Vero cell monolayers infected with each one of the seven viruses that presented cytopathic effect and hemoagglutination. Once the RT-PCR technique was standardized, the HN gene of the different PRV isolates was amplified, and the complete sequencing of the HN gene was performed. This enabled us to obtain the sequences of the seven viruses, which were analyzed with the MEGA® software taking as reference the La Piedad Michoacan (LPM) virus. Results revealed that the viruses (MICH/MEX/5/2008, MICH/MEX/13/2009, MICH/MEX/4/2008, GTO/MEX/6/2009, GTO/MEX/11/2008) clustered in a different group from the EDO.MEX/MEX/34/2007, MICH/MEX/2/2008 isolates and from the LPM virus isolated for the first time in 1980. This work evidences the viral evolution of different PRV strains along time.

Key words: *PorcineRubulavirus*, blue eye disease, HN protein.

ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
INDICE.....	V
LISTA DE CUADROS.....	VII
LISTA DE IMÁGENES.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
AGENTE ETIOLÓGICO.....	3
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y BIOLÓGICAS.....	8
PATOGENIA.....	8
EPIDEMIOLOGIA.....	10
SIGNOS CLÍNICOS.....	11
LESIONES.....	12
DIAGNOSTICO.....	13
PREVENCIÓN Y CONTROL.....	14
VARIABILIDAD ANTIGÉNICA Y GENÉTICA.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. HIPÓTESIS.....	19
4. OBJETIVO GENERAL.....	20
Objetivos específicos.....	20
5. METODOLOGÍA.....	21
SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS VIRALES.....	21
REPLICACIÓN VIRAL.....	22
OBTENCIÓN DEL ARN VIRAL.....	22
TÉCNICA DE RT-PCR.....	23
PREPARACIÓN DE LOS GELES DE AGAROSA Y ELECTROFORESIS.....	25

PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	25
SECUENCIACIÓN.....	26
REACCIÓN DE SECUENCIAS.....	26
ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....	26
6. RESULTADOS.....	28
AMPLIFICACIÓN DE LA RT-PCR.....	29
SECUENCIACIÓN.....	30
ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	37
7. DISCUSIÓN.....	39
8. CONCLUSIÓN.....	42
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Organización taxonómica de la familia <i>Paramyxoviridae</i>	4
Cuadro 2. Variabilidad genómica del gen HN del <i>Rubulavirus porcino</i>	17
Cuadro 3. Aislamientos del virus de ojo azul de los estados de Michoacán, Guanajuato y Estado de México.....	21
Cuadro 4. Título viral de cada asilamiento del <i>Rubulavirus porcino</i>	23
Cuadro 5. Volumen final de la reacción de RT-PCR para el virus de Ojo Azul.....	24
Cuadro 6. Porcentaje de similitud y número de nucleótidos que cambian, con relación a la secuencia de referencia LPM 1984 de los siete virus utilizados.....	32
Cuadro 7. Porcentaje de similitud y número de aminoácidos que cambian, con relación a la secuencia de referencia LPM 1984 de los siete virus utilizados.....	33
Cuadro 8. Cambio de aminoácidos del gen HN de los siete virus analizados en comparación con el virus LPM y los virus PAC.....	35
Cuadro 9. Cambio de aminoácidos de los siete virus secuenciados con respecto al virus LPM y virus PAC en la posición antigénica 500.....	36

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Condiciones optimas establecidas para la RT-PCR del virus de Ojo Azul.....	28
Imagen 2. Productos amplificados a partir de muestras de cultivo celular.....	29
Imagen 3. Productos amplificados a partir de muestras de cultivo celular.....	30
Imagen 4. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen HN de los siete aislamientos a la cepa de referencia LPM 1984.....	31
Imagen 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen HN de los siete aislamientos a la cepa de referencia LPM 1984.....	31
Imagen 6. Árbol filogenético realizado a partir de los aminoácidos del gen HN de los Rubulavirus porcino estudiados.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido Ribonucleico mensajero

AV Aislamiento viral

CONACYT Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

ELISA del inglés enzyme-linked immunosorbent assay; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EOA Enfermedad del Ojo Azul

g gramos

HA Hemaglutinación

HN Hemaglutinina- Neuraminidasa

hrs hora

IF Inmunofluorescencia

Ig inmunoglobulina

IHA Inhibición de la Hemaglutinación

KDa Kilodalton

Kg Kilogramos

LPMV Virus La Piedad Michoacán

M proteína de Matriz

Mg Miligramo

min minuto

ml mililitro

nm Nanometro

NP Nucleoproteína

nt nucleótido

OC Opacidad corneal

ORF del inglés Open Reading Frame; marco de lectura abierto

PAC Aislamiento Viral Producción Animal Cerdos

pb pares de bases

pi Posinfección

Pm picomolar

rpm revoluciones por minuto

RT-PCR reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

RVP Rubulavirus porcino

seg segundo

SN Seroneutralización

SNC Sistema Nervioso Central

Tm temperatura

µL microlitro

1. INTRODUCCIÓN.

El *Rubulavirus porcino* es un virus emergente de importancia veterinaria que es responsable de la enfermedad del ojo azul de los cerdos. Esta enfermedad consiste en alteraciones neurológicas, respiratorias y reproductivas, acompañadas en 1 a 10% de los casos por opacidad de la córnea (Stephano y Gay 1988). La identificación inicial de la enfermedad se realizó en 1980, en granjas porcinas de La Piedad, Michoacán. A partir de ahí la enfermedad se difundió rápidamente a otros Estados de la República Mexicana en Michoacán, Guanajuato y Jalisco, lugares que hoy persisten como focos de infección (Stephano 2000).

La enfermedad del ojo azul se caracteriza por la presencia de signos neurológicos en cerdos lactantes y alteraciones reproductivas en animales adultos. Sin embargo, en los dos primeros años de su aparición esta enfermedad era predominantemente nerviosa y se caracterizaba por provocar ataxia, debilidad, pedaleo e incoordinación en lechones menores de treinta días de edad, con una mortalidad que alcanzaba hasta el 90%. Los lechones mayores a 30 días de edad no presentaban signos tan marcados y la mortalidad era prácticamente nula. Para el año de 1983 se observaron brotes severos de encefalitis en cerdos de 15 a 45 Kg de peso, acompañados con signos respiratorios tales como tos, disnea estornudos, presentando mortalidad hasta del 30% (Stephano 1984). También se hizo evidente la falla reproductiva en hembras, y los parámetros afectados fueron: el porcentaje de repeticiones, mortinatos y fetos momificados, así como un ligero aumento de los abortos (Stephano y Gay, 1984, Stephano y Gay, 1985).

En la actualidad en algunas granjas porcinas de Jalisco, se presenta signología clínica respiratoria y nerviosa en animales mayores de 90 días de edad (Sánchez *et al.*, 2004), es decir un patrón nuevo en comparación con el observado en años anteriores. También existen reportes de diferencias antigénicas encontradas mediante ensayos inmunológicos a partir de aislamientos virales obtenidos en diferentes años (Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2004, Riaño *et al.*, 2011).

ANTECEDENTES

La enfermedad del ojo azul (EOA) es un padecimiento de origen viral que afecta a cerdos de todas las edades y es provocada por un virus del género *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*. (Ramírez *et al.*, 1997). Se le ha dado este nombre a la enfermedad, porque en algunos de los cerdos afectados se puede presentar opacidad corneal (OC) de color azul turquesa en uno o en ambos ojos (Stephano *et al.*, 1988).

El agente causal fue reconocido por poseer características similares a los miembros de la familia *Paramyxoviridae* y fue llamado virus La Piedad Michoacán (LPMV). Inicialmente fue asociado con un brote de encefalitis y opacidad corneal en lechones y fallas reproductivas en animales adultos. Los signos clínicos iniciales observados incluían, incoordinación motora, hiperexcitabilidad, postración, movimientos de carrera o pedaleo y opacidad corneal, presentando un 90% de mortalidad de los animales infectados, una semana después de haberse presentado el cuadro clínico (Moreno-López *et al.*, 1986).

Se realizaron numerosos estudios con el virus, determinándose como un virus envuelto con genoma ARN, que crece con facilidad en líneas celulares tales como PK-15 y que poseía actividad hemaglutinante, hemolítica y formadora de sincitios, histológicamente se detectó una meningoencefalitis no supurativa y una neumonía intersticial (Stephano y Gay, 1985;Stephano,1986;Campos 1982).

En 1980 se reportaron brotes en los estados de Jalisco y Guanajuato, en 1983 en el D.F., Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Tamaulipas, Puebla, Campeche y Querétaro. Ha sido un problema de difícil control y su difusión abarcó, hasta 1992, 16 estados de la República Mexicana, manteniéndose como un padecimiento endémico, principalmente en la zona del Bajío y Centro de México (Fuentes *et al.*, 1994).

AGENTE ETIOLOGICO

Con base en sus características biológicas y estructurales el virus del ojo azul se clasificó en el orden: *Mononegavirales*, familia: *Paramyxoviridae*, subfamilia: *Paramyxovirinae*, género: *Rubulavirus*, especie: *Rubulavirus porcino* (Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano *et al.*, 1988; Rima *et al.*, 1995).

La familia *Paramyxoviridae* agrupa virus envueltos, cuyo genoma está constituido por una cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa, dividida en seis o siete genes que codifican para un número igual o mayor de proteínas estructurales y no estructurales, incluyendo su propia polimerasa de ARN. Los paramixovirus son muy variables y llegan a registrar en promedio una mutación por cada diez mil bases durante cada replicación (Pringle 1998; Rima *et al.*, 1995). Los miembros de esta familia se clasifican en diferentes géneros de acuerdo a sus propiedades estructurales y biológicas, siendo determinante la presencia de actividades hemaglutinante y neuraminidasa (Drake 1993; Pringle 1998). La familia *Paramixoviridae* se agrupa de la siguiente manera (Cuadro 1).

Cuadro 1. Organización taxonómica de la familia *Paramyxoviridae* (Lamb et al., 2000; Calisher et al., 2000).

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

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

El *Rubulavirus porcino* posee gran similitud estructural y genética con el virus de la parotiditis humana y además comparte tropismo tisular y sus características patológicas (Reyes-Leyva *et al.*, 2002).

Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos, la mayoría esféricos que miden de 180 a 300 nm de diámetro y poseen una membrana lipoprotéica que presenta prolongaciones de 8-12 nm, que corresponden a las glicoproteínas HN y F, responsables de las actividades hemaglutinante, hemolítica, de neuraminidasa y formadora de sincitios observadas en el *Rubulavirus porcino* (Moreno-López *et al.*, 1986; Reyes-Leyva *et al.*, 2002).

El genoma del *Rubulavirus porcino* está constituido por seis genes en el siguiente orden, 3' -N-P/V-M-F-HN-L-5', que codifican por 10 proteínas, las cuales tienen funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas. Los genes N, M, HN y L codifican una sola proteína, el gen F codifica un polipéptido llamado F₀ que es cortado por una proteasa celular en las proteínas F₁ y F₂, el gen P codifica para varias proteínas dependiendo del sitio de edición del ARNm (Berg *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 1998; Linné *et al.*, 1992; Sundqvist *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2007; Svenda *et al.*, 1997).

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

La HN es una proteína multifuncional que está constituida por 576 aminoácidos con un peso molecular de 66 kDa. La glicoproteína HN es responsable de reconocer el receptor y de la adhesión a las células blanco de la infección debido al reconocimiento específico de los residuos de ácido N- acetilneuramínico unidos por enlaces glicosídicos alfa 2-3 a galactosa (NeuAc α -2,3 Gal). El NeuAc α -2,3 Gal, es el oligosacárido determinante de la susceptibilidad y el tropismo tisular a la infección por el RVP, su expresión se presenta en mayor proporción en tejidos del sistema nervioso central en cerdos neonatos y en el tracto reproductor en cerdos

adultos (Reyes-Leyva *et al.*, 1997; Zenteno-Cuevas *et al.*, 1998; Vallejo *et al.*, 2000).

La HN presenta actividad hemaglutinante y de neuraminidasa, posee dos dominios funcionales, uno con capacidad para aglutinar eritrocitos y otro que se encarga de la eliminación de grupos de ácido siálico. Aglutina eritrocitos de una gran variedad de especies animales incluyendo cerdo, carnero, vaca, perro, conejo, ratón, rata, hámster, cobayo, pollo y humano tipos A, B y O debido al reconocimiento específico del ácido acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3 Gal) expresado en la superficie de todos los eritrocitos mencionados (Stephano y Gay 1988; Vallejo *et al.*, 2000; Reyes-Leyva *et al.*, 1993; Ramírez *et al.*, 1996).

La actividad de neuraminidasa o sialidasa de la HN permite hidrolizar los residuos de ácido siálico de los receptores celulares, y se ha considerado la posibilidad que esta actividad sea un factor de virulencia (Santos- López *et al.*, 2004).

La proteína HN es considerada como la proteína inmunodominante en la infección por RVP. Estudios recientes han reportado cambios en la secuencia de nucleótidos del gen codificante para la HN, que podrían influenciar en la virulencia y en las manifestaciones clínicas diferentes para cada aislamiento (Hernández J. *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2008).

La nucleoproteína (NP) forma parte integral de la nucleocápside, está constituida por 576 aminoácidos, su peso molecular es de 68 kDa. Durante el proceso de replicación y transcripción, cada molécula de la NP se encuentra unida a seis nucleótidos con alta afinidad lo que impide que el genoma del RVP se encuentre desnudo dentro de la célula huésped, esto constituye un mecanismo de protección al ARN viral para no ser degradado en la célula (Santos-López *et al.*, 2004; Sundqvist *et al.*, 1990; Kolakofsky *et al.*, 1998; Calain y Roux 1993).

La proteína P, formada por 404 aminoácidos, tiene un peso molecular de 52 kDa; se encuentra asociada a la proteína L y a la NP. Forma un complejo con la

proteína L, que tiene actividad de polimerasa responsable de la transcripción y replicación del genoma viral (Berg *et al.*, 1992).

La proteína L es la más grande del virión está constituida por 2251 aminoácidos y con un peso molecular aproximado de 200 kDa, y es el componente catalítico de la ARN polimerasa. Participa en los procesos de iniciación, elongación, metilación, edición y poliadenilación; dentro de sus funciones se encuentran las actividades catalíticas en la síntesis de ARN genómico y mensajero para poder transcribir y replicar partículas virales sin necesidad de ingresar al núcleo celular, ya que dichos eventos ocurren en el citoplasma (Svenda *et al.*, 1997; Santos-López *et al.*, 2004; Sundqvist *et al.*, 1990; Hercyk *et al.*, 1988).

La proteína de matriz (M) está constituida por 369 aminoácidos gran parte de los cuales son de carácter básico, con un peso molecular de 41.7 kDa, se localiza en la parte interna de la envoltura viral. Debido a su carga neta positiva tiene gran afinidad por la NP, característica importante que le permite intervenir en el ensamble de la partícula viral con un reducido gasto energético. Participa en el mantenimiento de la estructura del virión y en el ensamblaje de nuevos viriones (Berg *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2007; Santos-López *et al.*, 2004; Lamb y Kolakofsky 1996).

La glicoproteína F tiene una longitud de 541 aminoácidos y un peso molecular de 59 kDa; esta proteína tiene un dominio altamente hidrofóbico que participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo que permite que el virus se introduzca al citoplasma y que se difunda de célula a célula sin exponerse al medio extracelular (Berg *et al.*, 1997; Santos-López *et al.*, 2004; Sundqvist *et al.*, 1990). Esta característica da lugar a la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios) que son apreciables en tejidos y en cultivos celulares infectados por paramixovirus (Morrison y Pother 1991).

Las proteínas no estructurales, V de 249 aminoácidos con un peso molecular de 26.1 kDa; la proteína I de 174 aminoácidos con un peso molecular de 18.1 kDa; la P de 404 aminoácidos con un peso molecular de 42.kDa; y la proteína C de 126 aminoácidos con un peso molecular de 14.7 kDa, son codificadas por el genoma viral y se sintetizan al editarse el gen P. Al parecer estas proteínas participan en la regulación de la transcripción y en la evasión de la respuesta antiviral de la célula (Moreno-López *et al.*, 1986; Berg *et al.*, 1997; Santos-López *et al.*, 2004).

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.

El RVP es sensible a los solventes de lípidos como éter y cloroformo, formalina y β propiolactona. El virus se inactiva a 56°C después de 4 horas, mientras que la hemaglutinación viral se pierde hasta las 48 a 60 horas a 56°C (Stephano *et al.*, 1988).El virus se puede replicar en una gran variedad de líneas celulares como PK-15, Vero, MDBK, ST, Pt, BT, Bt, BHK-21, GMK, CK, BEK y en cultivos primarios de riñón de gato, embrión bovino, dermis equina, células fetales humanas, plexo coroideo porcino, plexo coroideo bovino y de pulmón de visón, causando efecto citopático en todas ellas, este virus puede ser replicado también en embrión de pollo (Moreno-López *et al.*, 1986; Martínez *et al.*, 1985; Ramírez *et al.*, 1987).

PATOGENIA

La transmisión del virus es por contacto directo, por la aspiración de aerosoles contaminados con el virus de animales portadores cuando este es eliminado a través de descargas nasales (Fuentes *et al.*, 1994; Berg *et al.*, 1992; Stephano 2000). La forma de transmisión del RVP ocurre de manera horizontal, de animales infectados a animales susceptibles y también existe evidencia de infección vertical, ya que el virus tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria (Martínez *et al.*, 1989; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004; Stephano y Gay 1983).

La vía de entrada natural del RVP es la cavidad oronasal, cuando las gotas de descargas nasales conteniendo el virus son grandes, el sitio de replicación inicial

es la cavidad oronasal, básicamente en la mucosa nasofaríngea y tejido linfático asociado (tonsilas). Cuando las gotas son muy pequeñas, el virus puede ingresar con la aspiración hasta el interior del pulmón y se deposita en los conductos aéreos superiores en donde la replicación es abundante y se disemina por vía sanguínea transportado por eritrocitos y leucocitos, iniciándose así la infección sistémica, propagación y replicación en diversos sitios inmunoprivilegiados de órganos linfáticos y reproductivos (Ramírez *et al.*, 1997; Allan *et al.*, 1996; Reyes-Leyva *et al.*, 2004).

El virus puede ingresar al SNC a través de las terminaciones del nervio olfatorio en la mucosa nasal, y posteriormente se puede diseminar al hipocampo, tallo cerebral y cerebelo (Allan *et al.*, 1996; Reyes-Leyva *et al.*, 2004; Santos-López *et al.*, 2004).

De manera experimental se ha producido la infección al inocular el RVP por vía intranasal, intratraqueal, intraocular, intracraneal, intraperitoneal e intramuscular (Ramírez *et al.*, 1997; Stephano y Gay 1988; Moreno-López *et al.*, 1986; Ramírez-Herrera *et al.*, 2001).

Se ha identificado que la distribución del RVP varía con la edad de los cerdos infectados. En neonatos el sitio de mayor replicación viral es el SNC (bulbo olfatorio, corteza del lóbulo piriforme, hipocampo, tálamo, tallo cerebral y cerebelo) y tejidos del tracto respiratorio; en cerdos destetados, la infección se presenta principalmente en el tracto respiratorio y en SNC (Moreno-López *et al.*, 1986; McNeily *et al.*, 1997).

En cerdos machos adultos el virus se replica principalmente en tejidos del sistema respiratorio y del tracto reproductor (testículo y epidídimo). En cerdas gestantes infectadas experimentalmente, se aisló el RVP principalmente en tracto respiratorio, tonsila y ovarios (Rivera-Benitez 2009; Stephano y Gay 1985).

La distribución tisular del RVP está determinada por la expresión de receptores celulares, en este caso específicamente del ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3 Gal), el cual está presente de manera abundante en tejidos

de cerdos neonatos en el sistema nervioso, respiratorio y linfático y en machos adultos en el sistema respiratorio y reproductor (Ramírez *et al.*, 1997; Reyes-Leyva *et al.*, 2002; Vallejo *et al.*, 2000; Allan *et al.*, 1996).

Los estudios que reportaron cambios en la virulencia de cuatro aislamientos (PAC-6, PAC-7, PAC-8, PAC-9) permitieron clasificar al RVP en tres grupos: el grupo uno formado por el LPMV y PAC-4; el segundo grupo formado por PAC-2, PAC-3 y CI-IV, y un tercer grupo formado por los aislamientos PAC-6, PAC-7, PAC-8 y PAC-9. Dichos cambios fueron resultado de alteraciones en la secuencia de aminoácidos del gen codificante para la proteína HN, lo cual confiere virulencia y cuadros clínicos con manifestaciones nerviosas en animales adultos y en la línea de engorda (Kolakofsky *et al.*, 1998).

La respuesta humoral contra el RVP se inicia con la presencia de anticuerpos específicos desde el noveno y decimo día posinfección (pi), con títulos de $4.6 \log_2$ y la máxima producción se ha observado entre la sexta y novena semana pi con $7.6 \log_2$. En estudios que han evaluado la presencia de anticuerpos durante infecciones experimentales prolongadas, se han detectado anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación desde la primera semana pi con un título de $2.85 \log_2$, los cuales alcanzan su pico a la novena semana con $5.0 \log_2$ y se mantienen constantes hasta por diecinueve semanas. Los anticuerpos generados están dirigidos contra las proteínas HN, NP y M (Fujinami y Oldstone 1980; Hernández *et al.*, 2004; Rivera-Benítez *et al.*, 2010).

EPIDEMIOLOGÍA

En condiciones naturales, el cerdo es el único animal conocido que es afectado clínicamente por RVP. A nivel experimental el RVP ha sido inoculado en ratones, ratas, embriones de pollo, conejos, perros y gatos; ninguno de estos animales presentó signos asociados a la infección. Sin embargo, se han encontrado anticuerpos en ratas, conejos, perros, gatos y pecaríes, infectados experimentalmente (Moreno- López *et al.*, 1986; Arellanes *et al.*, 1994; Cuetero *et*

al., 1995; Campos 1981). Lo que indica que el virus se puede replicar en estos animales, a pesar de no causar síntomas.

La enfermedad del ojo azul sólo ha sido descrita en México. Actualmente, la enfermedad se ha establecido y se reporta ocasionalmente en los Estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Distrito Federal y Querétaro (Fuentes *et al.*, 1994; Morilla *et al.*, 2002; Kirkland y Stephano 2006).

SIGNOS CLÍNICOS

En condiciones de campo los signos clínicos son variables dependiendo principalmente, de la edad de los cerdos, el tropismo, la dosis y la virulencia del RVP; en condiciones experimentales, también son variables, dependiendo además de los factores antes mencionados, la vía de inoculación (Stephano y Gay 1988; Martínez *et al.*, 1985; Stephano y Gay 1985; Pérez 1989).

Los signos clínicos más comunes que se presentan son alteraciones del SNC y elevada mortalidad en lechones en lactancia, falla reproductiva en animales adultos y opacidad de la córnea en cerdos de cualquier edad (Kirkland y Stephano 2006).

Los lechones de 2-15 días de edad son más susceptibles a la infección por el RVP, generalmente se encuentran postrados, deprimidos o muestran alteraciones del SNC. El cuadro se puede presentar inicialmente con fiebre, pelo erizado y lomo arqueado, acompañado por constipación o diarrea.

Posteriormente, los animales muestran un cuadro nervioso progresivo que incluye incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, principalmente de los miembros posteriores, temblores musculares, posturas anormales. Algunos animales se encuentran hiperexcitables y muestran movimientos involuntarios (pedaleo), permanecen letárgicos puede existir una ceguera aparente y en ocasiones nistagmo, algunos animales presentan conjuntivitis, ojos hinchados,

lagrimeo y exudado en parpados. El 1-10% de los lechones infectados presentan opacidad de la córnea (Kirkland y Stephano 2006).

En cerdas adultas se presenta falla reproductiva, aumentándose el número de cerdas que retornan al estro, reducción en la tasa de partos, aumenta el intervalo de días destete- primer servicio y por consiguiente los días no productivos. Ocasionalmente durante brotes agudos se llegan a presentar abortos, algunas cerdas llegan a presentar opacidad de la córnea, y recientemente se han descrito nuevas presentaciones en las cerdas manifestándose signos nerviosos hasta un 10% de las cerdas afectadas (Stephano y Gay 1988; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008). En las naves de maternidad se observa un incremento en el número de lechones nacidos muertos y momificados, la mortalidad en cerdas alcanza el 0.1% al 0.8%, sin embargo en brotes recientes de la EOA se ha encontrado un aumento de la mortalidad mayor al 15% (Sánchez- Betancourt 2008).

Los signos clínicos en machos adultos son pocos, puede presentarse anorexia y opacidad de la córnea. Los órganos seminales se ven seriamente afectados, en granjas infectadas se ha reportado el 29 al 73% de infertilidad, la cual puede ser temporal o permanente, la concentración espermática se ve disminuida y el porcentaje de anomalías espermáticas aumenta, en algunos casos el eyaculado puede obtenerse sin espermatozoides. Algunos sementales presentan inflamación testicular, se observan turgentes con marcado edema; posteriormente pueden adquirir una textura granulosa y pueden atrofiarse generalmente unilateral; la orquitis y epididimitis por lo general está presente (Ramírez *et al.*, 1997; Stephano y Gay 1988; Campos 1989).

LESIONES

En lechones, se observa con frecuencia una neumonía leve en los extremos ventrales de los lóbulos pulmonares craneales, puede haber congestión cerebral y aumento del líquido cefalorraquídeo. Se observa conjuntivitis y diferentes grados de opacidad de la córnea (Stephano y Gay 1988; Campos 1989).

Las principales lesiones microscópicas se localizan en cerebro y medula espinal donde se puede observar encefalitis no supurativa que afecta en particular la sustancia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral, incluyendo una gliosis multifocal y difusa, infiltración perivascular de linfocitos, células plasmáticas y reticulares, necrosis neural, neurofagia, meningitis y coroiditis (Stephano y Gay 1988; Stephano y Gay 1985). En las neuronas se encuentran cuerpos de inclusión citoplasmáticos, en los pulmones se observan áreas multifocales de neumonía intersticial, cuya característica es la infiltración de células mononucleares en la pared alveolar (Stephano y Gay 1988; Pérez 1989).

DIAGNÓSTICO

La historia clínica, así como los signos clínicos clásicos de la enfermedad, dan las bases para el establecimiento de un diagnóstico clínico presuntivo; sin embargo es necesario demostrar la presencia del virus (mediante su aislamiento e identificación), o de anticuerpos específicos del RVP en animales infectados; o en su caso, la presencia del genoma viral. La necropsia y el estudio histopatológico también ayudan en el diagnóstico (Stephano y Gay 1985; Stephano y Gay 1986).

El diagnóstico de la enfermedad del ojo azul se realiza por medio de pruebas que detectan la presencia del virus, tales como el aislamiento viral en cultivo celular (AV) evidenciado por la hemaglutinación (HA) e inmunofluorescencia (IF) directa e indirecta, la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) y RT-PCR anidada, han sido empleadas para detectar el material genético del virus en tejidos, suero y semen (Ramírez *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2006).

De las pruebas que detectan anticuerpos la más utilizada es la inhibición de la hemaglutinación (IHA), sin embargo también se utiliza la seroneutralización (SN), ELISA e inmunoperoxidasa (Ramírez *et al.*, 1996; Rivera-Benítez *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2006).

En estudios realizados para determinar cuál es la prueba serológica más confiable para el diagnóstico EOA se compararon las pruebas de ELISA, SN e IH, y se encontró que la SN y ELISA tenían una sensibilidad de 89.1%, mientras que la IH del 84%. En este estudio se concluyó que las mejores pruebas son SN y ELISA y que la IH puede emplearse como prueba de piara debido a su alta especificidad, misma que en estudios comparativos con otras técnicas (SN, ELISA) ha demostrado ser del 100%. La prueba es utilizada para detectar anticuerpos específicos de la clase IgG e IgM en suero, de la misma forma se considera útil para identificar aislamientos y patrones de circulación viral en una población durante un periodo de tiempo (Morilla *et al.*, 2000; Hernández- Jáuregui *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 1997; Sánchez-Betancourt 2004).

PREVENCIÓN Y CONTROL

Para el control o eliminación de la enfermedad del ojo azul son necesarias varias acciones que dependerán del tipo de granja (Campos 1989; Taylor, 1999).

En el pié de cría es necesario no mezclar animales de diferentes corrales, eliminar cerdos que presenten el cuadro clínico característico, evaluar a todos los sementales de la granja y eliminar aquellos que sean positivos a la enfermedad serológica o clínicamente, utilizar inseminación artificial por lo menos por seis semanas, intensificar el diagnóstico de gestación, con machos y ultrasonido en todas las hembras, incrementar el número de servicios en la medida que se incrementen las repeticiones, y cerrar la granja por lo menos durante 16 semanas. Manejar las salas “todo dentro – todo fuera”, lavar y desinfectar, salas y corrales, cuando salgan todos los animales (Campos 1989; Campos y Carbajal, 1992).

VARIABILIDAD ANTIGÉNICA Y GENÉTICA

Es posible que se estén registrando eventos de variabilidad genética y antigénica, especialmente considerando que la proteína HN es el elemento más antigénico y

la presión de selección puede originar cambios tanto en la superficie expuesta como en las diferentes propiedades biológicas de esta proteína multifuncional (Hernández- Jáuregui *et al.*, 1998). Las diferencias genéticas entre los diferentes aislamientos del RVP podrían generar diferentes respuestas antigénicas. En un estudio realizado en el 2004, se analizó la relación antigénica entre diferentes aislamientos y sueros de cerdos infectados bajo condiciones naturales, por medio de IHA. Los resultados mostraron que de siete diferentes aislamientos del RVP, se presentó un reconocimiento variable para cada uno de ellos, concluyendo que hay diferencias entre dichos aislamientos ya que no fueron reconocidos de la misma forma en todos los sueros analizados (Sánchez-Betancourt 2004).

En otro estudio donde se analizó la variabilidad antigénica de ocho aislamientos, los resultados mostraron variabilidad antigénica entre aislamientos. El uso de diferentes aislamientos del RVP en el diagnóstico permitirá evitar dar resultados falsos negativos, ya que la variación antigénica demostrada en este estudio aumenta la posibilidad de encontrar anticuerpos específicos cuando se usan diferentes aislados de campo en el laboratorio de diagnóstico (Riaño *et al.*, 2011). La comparación de la secuencias correspondientes al ORF del gen HN de cada uno de los aislamientos obtenidos de diferentes brotes durante varios años, con la secuencia del virus LPM aislado en 1984 mostró al menos dos líneas divergentes del gen HN, en donde los virus PAC2 y PAC3 forman un subgrupo viral caracterizado por 5 cambios; los virus PAC6 al PAC9 forman un segundo subgrupo viral en el que se presentan 11 cambios. Ninguna de las sustituciones de aminoácidos modifica la conformación estructural de la proteína HN, y sólo algunos de los cambios en aminoácidos podrían generar cambios importantes en el potencial electrostático de la proteína, tales como la sustitución de A291 D en el virus PAC3 y la modificación de E por K en la posición 514 en el virus PAC9 . Las mutaciones se encontraron en una zona de alta variabilidad constituida por los residuos 511-514; los virus LPMV, PAC4 y los virus CI-CIV (obtenidos del GenBank) poseen la secuencia de aminoácidos AIGE en esa región; los virus PAC2 y PAC 3 tienen la secuencia ATGE, y los virus PAC6, PAC7, PAC8 y PAC9

tienen la secuencia SIGK en la misma región. La mutación E514 K modifica notablemente las propiedades del potencial electrostático en la proteína PAC9, lo cual genera una carga positiva que afecta a los residuos D475 al V492, modificando la carga de residuos conservados T489 y V486; estos cambios en la superficie proteica pueden estar asociados a los cambios en las propiedades biológicas identificadas en la prueba de seroneutralización.

La glicoproteína HN del *Rubulavirus porcino*, al igual que las hemaglutininas de otros paramixovirus, está anclada a la membrana viral por la porción amino terminal; mientras que la región que contiene al extremo carboxilo terminal se encuentra en la superficie de la envoltura viral (Zenteno *et al.*, 1997) y por tal motivo está expuesta, es decir, la mayoría de los cambios que codifican para aminoácidos diferentes se encuentran expuestas en la superficie viral.

Desde el primer aislamiento de *Rubulavirus porcino*, se ha encontrado una variabilidad del gen Hemoaglutinin Neuraminidasa (HN) respecto a diferentes aislamientos obtenidos desde 1990 y hasta el 2003. Los estudios de biología molecular y de secuenciación del gen HN de distintos aislamientos de este virus han permitido identificar diferentes variantes (cuadro 2). Hasta el momento se encuentran descritas 11 secuencias diferentes del gen HN del *Rubulavirus porcino*, comparadas al primer virus aislado en La Piedad, Michoacán en 1984 (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Variabilidad genómica del gen HN del Rubulavirus porcino (Moreno-López et al 1986; Paniagua-Buelnas, 2000; Ramírez-Mendoza et al, 1997; Reyes-Leyva et al, 2002; Sánchez-Betancourt et al, 2008).

Virus	Año de aislamiento	Número de acceso a 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

2. JUSTIFICACIÓN.

Desde 1980 el *Rubulavirus porcino* ha permanecido en el centro de la República Mexicana, provocando signología nerviosa, respiratoria y reproductiva, presentando combinaciones entre estas, en animales de diferentes edades, generando grandes pérdidas económicas.

La secuenciación del gen HN de diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino*, permitirá identificar la variabilidad genética que presentan los virus actuales, con respecto al virus LPM obtenido en 1984; ya que mediante ensayos inmunológicos se han reportado diferencias antigénicas (Reyes- Leyva *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2004; Riaño *et al.*, 2011)

3. HIPÓTESIS.

Mediante la secuenciación del ORF del gen HN de diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino*, podremos identificar las variantes moleculares virales que existen actualmente.

4. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar genéticamente el gen HN del *Rubulavirus porcino* de siete diferentes aislamientos de la República Mexicana obtenidos en distintos años y comparar las secuencias de los diferentes aislamientos a través del tiempo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- I. Estudiar la variabilidad molecular del gen HN del *Rubulavirus porcino*, entre diferentes aislados virales.
- II. Identificar las relaciones moleculares evolutivas entre los diferentes aislamientos virales.

5. METODOLOGÍA.

SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS VIRALES.

Se utilizaron siete cepas virales procedentes de Michoacán, Guanajuato y Estado de México obtenidas en los años 2007 y 2008 a partir de muestras de encéfalo de lechones con signos nerviosos, semen de sementales sin signos clínicos y encéfalo de lechones de tres meses con opacidad de la córnea (Cuadro 3). Las cuales fueron utilizadas para secuenciar el ORF del gen HN de cada uno de ellos y caracterizar si existen cambios en este segmento genómico.

Cuadro 3. *Aislamientos del virus de Ojo Azul de los estados de Michoacán, Guanajuato y Estado de México.*

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

REPLICACIÓN VIRAL.

Cada aislamiento viral fue inoculado en monocapas de la línea celular Vero, con 24 horas de formación, una vez identificado el efecto citopático y la presencia de hemaglutinación de eritrocitos de pollo, bovino y cuyo, característico de este virus, se obtuvieron los sobrenadantes de cada aislamiento viral, con títulos de de hemaglutinación entre 1:32 a 1:128.

Posteriormente se realizó la siguiente metodología con la finalidad de obtener el gen hemaglutinina neuraminidasa (HN) de cada uno de los Rubulavirus, de los cuales se secuenció el marco de lectura (ORF) para compararesta secuencia entre los diferentes virus aislados.

OBTENCIÓN DEL ARN VIRAL.

La extracción del ARN de los aislamientos virales se realizó a partir de sobrenadantes de células Vero infectadas que presentaron efecto citopático y hemaglutinación y se realizo de la siguiente manera:

- a. Se colocó 500 µL de lisado celular en un tubo eppendorff.
- b. Se le adicionó 1 ml de Trizol Reagent y se homogenizó suavemente.
- c. Se incubó por 10 min a 4°C.
- d. Posteriormente se adicionó cloroformo frio (4°C) y se homogenizo con vortex por 10 seg.
- e. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min.
- f. Después se separó la fase acuosa de ARN de la fase orgánica en un nuevo tubo eppendorf (aprox. 500µl).
- g. Se colocó el mismo volumen de colecta con isopropanol frio (4°C) para después homogenizarse con vortex por 10 seg.
- h. Se incubó por 40 min a 4°C.
- i. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.
- j. Se decantó el isopropanol.

- k. Se lavo la pastilla (ARN) con 200µl de etanol al 70% y se homogenizo con vortex por 10 seg.
- l. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.
- m. Se decantó el etanol
- n. Se dejó secar la pastilla durante 24 hrs.
- o. Se resuspendió la pastilla de RNA en 50µl de agua DEPC (Dietilpirocarbonato) al 0.1% homogenizando la muestra.

TÉCNICA DE RT-PCR.

Para la estandarización de las reacciones de la PCR se utilizaron los virus con alto título (cuadro 4). Utilizamos los siguientes iniciadores, a una concentración de 10 pM.

NOMBRE	5´	3´	BASES
HNISBF1	CTA ACA AGG AGA ACT AGG CC		20
HNISBR1	AAA TTC ACC AAG TAG CAC TT		20

El ensayo se realizó con temperaturas en gradiente a partir de la Tm indicada por el proveedor del diseño sintético de oligonucleótidos y el establecido por el software Clone Manager V.7.0®.

Cuadro4. *Título viral de cada asilamiento del Rubulavirus porcino.*

Virus	Titulo
2	1:16
4	1:16
5	1:64
6	1:64
11	1:128
13	1:128
34	1:128

Se utilizó el kit de QIAGEN® “OneStep RT-PCR Kit”. Los reactivos se utilizaron con las mismas concentraciones para las diferentes reacciones.

Finalmente la reacción de RT-PCR se ajustó a un volumen final de 10µl para optimizar los reactivos del kit con las siguientes cantidades que se muestran en el (cuadro 5).

Cuadro 5. *Volumen final de la reacción de RT-PCR para el virus de Ojo Azul.*

Reactivos	Volumen
Agua libre de RNAasas	3.3 µl
5x Buffer	2 µl
Q Buffer	2 µl
dNTP ´s	0.4 µl
Oligonucleótidos Forward+Revers	0.4 µl
Mix de Enzimas	0.4 µl
Muestra de la extracción de RNA	1.5 µl
Volumen Total	10 µl

El protocolo de tiempos y temperaturas para la reacción de RT-PCR se estableció en un Termociclador Labnet® International Inc. Multigene Modelo TC9600-G. Software V3.3.34 B, bajo las siguientes condiciones:

- a. Una temperatura para Transcriptasa Reversa (RT): 50° C/30min.
- b. Una temperatura de Desnaturalización inicial: 95°C/15min.
- c. 35 ciclos de desnaturalización, alineación y extensión.
 - Desnaturalización: 94°C/30seg.
 - Alineación. 58.7°C/1min.
 - Extensión: 72°C/2min.
- d. Temperatura de extensión final: 72°C/10min.
- e. Temperatura final de conservación de la muestra: 4°C/10min.

PREPARACION DE LOS GELES DE AGAROSA Y ELECTROFORESIS.

Los geles de agarosa fueron preparados a una concentración de 1.5% en un volumen final de 30ml. Se utilizó una cámara de electroforesis CLP Bioscience Modelo 75.710, con una fuente de poder (BIO-RAD Power PAC 300) donde se ajustó el tiempo y voltaje de acuerdo al tamaño de amplicón, concentración del gel y buffer de corrida utilizado.

Como buffer de corrida se utilizó TAE (54 g. de Tris base, 27.5 de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0.5 molar pH 8.0 aforar a un 1000 ml de agua destilada estéril). Se cargaron los productos de PCR en los geles con 5 μ l y 3 μ l de Buffer de carga 6x (EDTA 0.2 M, Ficoll 400 25 %, azul de bromofenol 0.1 %) DNA Loading Dye de Fermentas® Life Science. El Marcador de Peso Molecular (MPM) utilizado fue de bajo peso y se cargaron 3 μ l en el gel. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μ g/ml (Br-eEt) durante 10-15 min y se visualizaron en un transiluminador Kodak Gel Logic 112, con cámara Kodak Molecular Imaging Software V.5.0.1.27 Standar Edition 2008.

PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Los productos amplificados de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa al 1% en TAE, empleando como marcador de peso molecular el DNA λ /BstEII, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por UV. Los fragmentos se cortaron del gel para su purificación, mediante el método de perlas de sílica, y posteriormente se evaluó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñido con BrEt y visualizado por luz UV. La concentración del ADN se determinó en un fluorómetro (Hoefler, DyNA Quant 200) siguiendo las instrucciones del proveedor.

SECUENCIACIÓN.

Para obtener las secuencias de los amplicones obtenidos se realizó la siguiente metodología.

REACCIÓN DE SECUENCIAS.

El fragmento purificado de ADN se empleó como templado para obtener la secuencia de nucleótidos correspondientes al ORF del gen H y N.

La reacción de secuenciación se realizó a partir 20 µl de producto de PCR purificado. La reacción de secuenciación se preparó mediante un KIT comercial "BigDye terminator Cycle Sequencing" (PE, *Applied Biosystems* Foster, CA USA), siguiendo las instrucciones del proveedor en el IFC de la UNAM en la unidad de biología molecular (UBM) bajo el método de SANGER, se utilizó un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE *Applied Biosystems*, Foster City USA), para la lectura de la secuencia y la obtención del electroferograma. Se utilizaron los mismos oligonucleótidos utilizados en la PCR, para obtener ambas cadenas y realizar un consenso de ellas.

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.

Las secuencias de nucleótidos de cada muestra se registraron de forma electrónica, en electroferogramas. El primer paso del análisis de la secuencia de nucleótidos fue identificar la calidad de la secuencia y eliminar las secuencias no confiables. Para ello fue requerido editar los errores que aparecieron en la lectura original, a partir de la identificación de los nucleótidos no definidos en los electroferogramas, utilizando el programa bioedit sequence alignment editor 7.1.

Las lecturas de ambas cadenas, después de su análisis y edición se utilizaron para la construcción de una cadena consenso del ORF2, de cada muestra empleando el programa BioEdi (biological sequence alignment editor and analysis program for Windows) para luego realizar la construcción del árbol utilizando las secuencias de nucleótidos. La fiabilidad del árbol Neighbor-Joining (NJ) se calculó

utilizando 1000 repeticiones de bootstrap. Las secuencias de nucleótidos se compararon por pares con distancias inferiores a 0.005 (lo que significa que son secuencias casi idénticas o idénticas, y se limita a un máximo de 3 diferencias nt y una diferencia de un aminoácido) y se representan como una secuencia en el análisis filogenético. Una vez obtenidas las secuencias de los siete virus se realizó una alineación para identificar los posibles cambios en la estructura del gen HN y tomando como referencia la secuencia del virus LPM (S77541) (Sundqvist *et al.* 1992).

6. RESULTADOS.

Se optimizo y estandarizo la técnica de RT-PCR, como se indicó en la metodología con procesos de gradientes de temperatura para la alineación de los oligonucleótidos, para posteriormente obtener la concentración mínima de RNA capaz de ser detectada por la PCR. De tal manera que el protocolo de tiempos y temperaturas se monto de la siguiente forma en la (imagen 1).

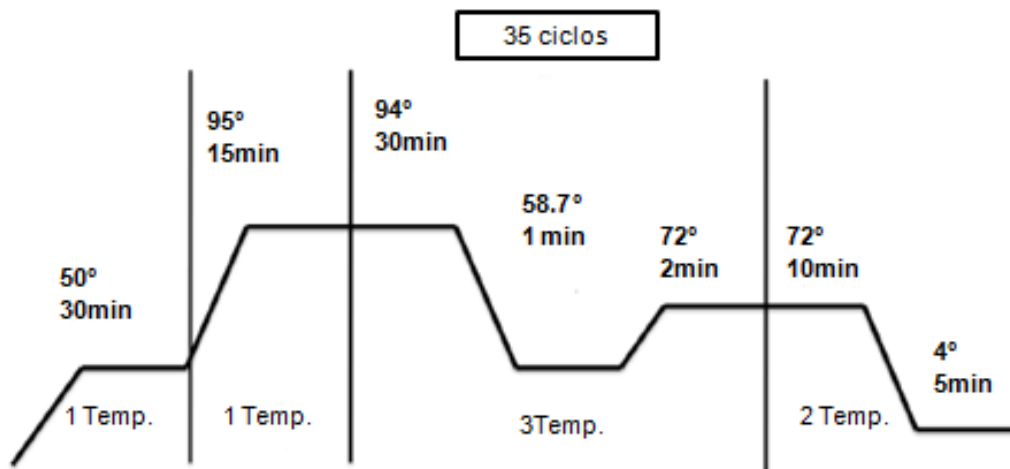


Imagen 1. Condiciones óptimas establecidas para la RT-PCR del virus de Ojo Azul.

AMPLIFICACIÓN DE LA RT-PCR.

Se logró amplificar el segmento genómico HN del *Rubulavirus porcino*. El tamaño del segmento genómico amplificado del gen HN fue muy similar entre los siete aislamientos virales, con un tamaño de amplicón de aprox. 1676 pb. (Imagen 2 y 3).

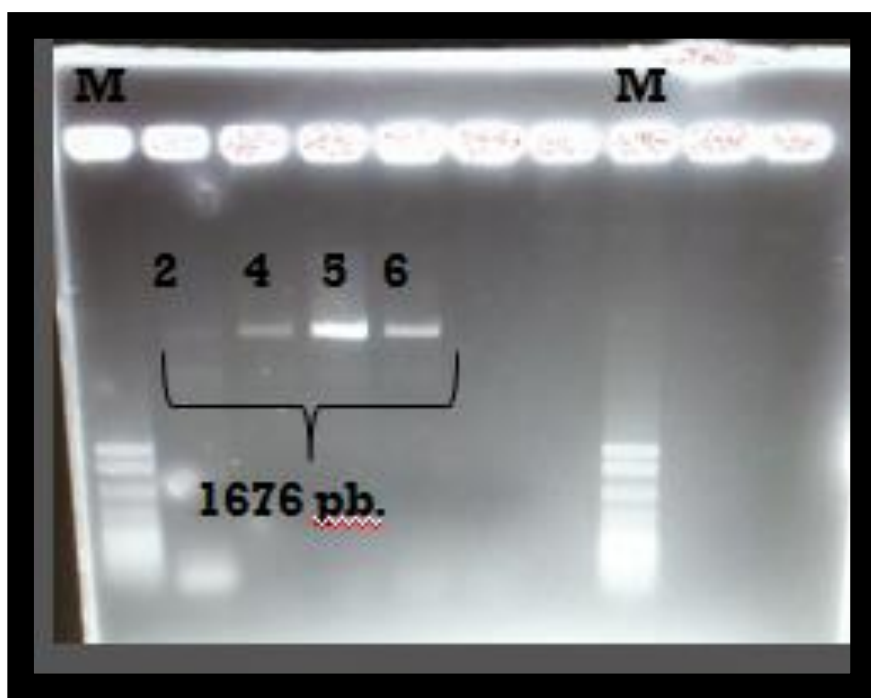


Imagen 2. Productos amplificados a partir de muestras de cultivo celular (2, 4, 5 y 6). Gel de agarosa al 1.5%. Utilizando marcador de bajo peso molecular (M).



Imagen 3. *Productos amplificados a partir de muestras de cultivo celular (11, 13, y 34). Gel de agarosa al 1.5%. Utilizando marcador de bajo peso molecular (M).*

SECUENCIACIÓN

Una vez obtenidas las secuencias de los siete virus se realizó un alineamiento para identificar los posibles cambios de nucleótidos y aminoácidos en la secuencia del gen HN y tomando como referencia la secuencia del virus (LPM 1984, imagen 4 y 5). En ambas imágenes muestra el alineamiento entre las diferentes secuencias en las que se muestra cada nucleótido o aminoácido en un color y se pueden distinguir las diferencias en secuencia con los cambios de color.

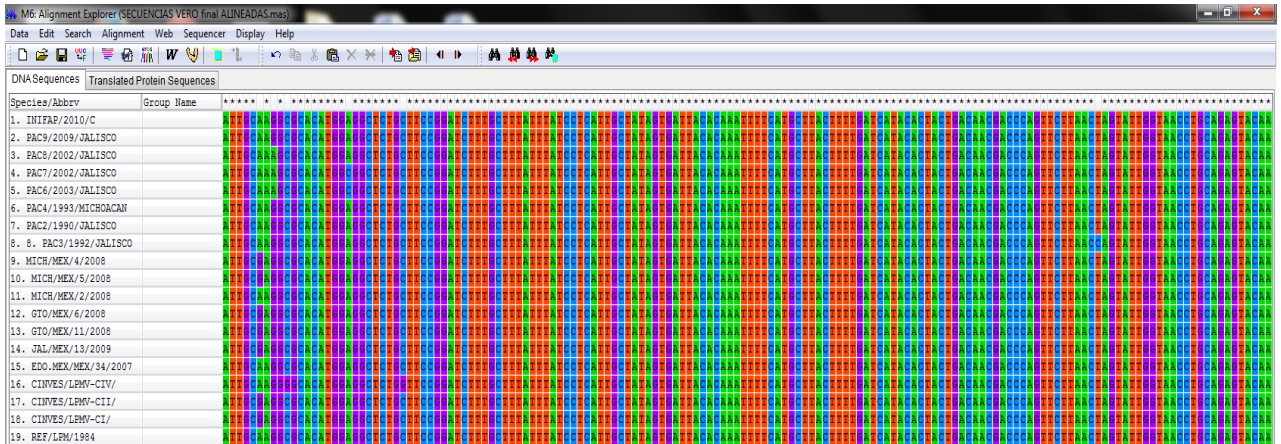


Imagen 4. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen HN de los siete aislamientos a la cepa de referencia LPM 1984.



Imagen 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen HN de los siete aislamientos a la cepa de referencia LPM 1984.

El análisis de las secuencias obtenidas del gen HN de los siete aislados virales del *Rubulavirus porcino*, mostró algunas variaciones de estas con respecto a la cepa de referencia (LPM 1984). Las secuencias muestran una similitud entre 97% y 99% de nucleótidos a la cepa de referencia (cuadro 6).

Cuadro 6. *Porcentaje de similitud y número de nucleótidos que cambian, con relación a la secuencia de referencia LPM 1984 de los siete virus utilizados.*

Aislamiento	# de Nucleótidos que cambian	% de Similitud
REF.LPM. 1984		
CINVES.LPM.CI	20	98
CINVES.LPM.CII	22	98
CINVES.LPMCIV	36	97
EDO.MEX.34.2007	33	98
GTO.MEX.6.2008	21	98
GTO.MEX.11.2008	21	98
INIFAP.2010	3	99
MICH.MEX.13.2009	20	98
MICH.MEX.2.2008	8	99
MICH.MEX.4.2008	20	98
MICH.MEX.5.2008	20	98
PAC2.JAL.1990	20	98
PAC3.JAL.1992	24	98
PAC4.MICH.1993	2	99
PAC6.JAL.2003	22	98
PAC7. JAL.2002	22	98
PAC8. JAL.2002	20	98
PAC9.JAL.2009	21	98

En el caso de análisis de secuencias de aminoácidos, las secuencias muestran una similitud entre 96% 98% y 99% a la cepa de referencia (LPM 1984, Cuadro 7).

Cuadro 7. *Porcentaje de similitud y número de aminoácidos que cambian, con relación a la secuencia de referencia LPM 1984 de los siete virus utilizados.*

Aislamiento	# de Aminoácidos que cambian	% de Similitud
REF.LPM. 1984	5	99
PAC4.MICH.1993	4	99
PAC2.JAL.1990	4	99
PAC3.JAL.1992	4	99
CINVES.LPM.CI	2	99
CINVES.LPM.CII	4	99
CINVES.LPM.CIV	10	98
PAC6.JAL.2003	11	98
PAC7.JAL.2002	11	98
PAC8.JAL.2002	10	98
PAC9.JAL.2009	11	98
GTO.MEX.6.2008	3	99
GTO.MEX.11.2008	3	99
GTO.MEX.13.2009	2	99
MICH.MEX.2.2008	10	98
MICH.MEX.4.2008	2	99
MICH.MEX.5.2008	2	99
EDOMEX.MEX.34.2007	19	96
INIFAP.2010	5	99

Los cambios más significativos de nucleótidos que dan lugar a cambios de aminoácidos entre los aislamientos y la secuencia de referencia se encuentran en las posiciones: 135, 150, 156, 157, 184, 192, 195, 209, 229, 282, 283, 283, 384, 462, 484 y 500.

En el análisis de aminoácidos se encontraron tres posiciones importantes en donde se encuentran cambios de aminoácidos muy idénticos en las tres posiciones (cuadro 8).

En la posición 462 los virus MICH4, MICH5, GTO6, GTO11, GTO13 y CII presentan un aminoácido (I 462) con respecto a los virus PAC2, PAC3, CI, CIII, CIV que presentan (N 462) en comparación con el virus LPM que tiene (S 462).

En la posición 484 los virus MICH4, MICH5, GTO6, GTO11 y GTO13 presentan un aminoácido (I 484) con respecto a los virus LPM, MICH2 y EDOMEX.34 que presentan (S 484). Los virus PAC2, PAC3, CI, CII, CIII, CIV presentan el mismo aminoácido (I 484).

En la posición 500 los virus MICH4, MICH5, GTO6, GTO11 y GTO13 presentan un aminoácido (I 500) al igual que los virus PAC2, PAC3, CI, CII, CIII, CIV, PAC6, PAC7, PAC8 y PAC9 en comparación con los virus LPM, MICH2 y EDOMEX.34 que tiene (T 500) posición antigénica (cuadro 9).

Cuadro 8. Cambios de aminoácidos del gen HN de los siete virus analizados en comparación con el virus LPM y los virus PAC.

Pos.	135	150	156	157	192	195	209	229	282	283	284	383	462	484	500
LPM	S	I	F	G	T	C	T	S	E	R	T	T	S	S	T
PAC2			L										N	I	I
PAC3			L										N	I	I
PAC4			L												I
PAC6			L												I
PAC7			L												I
PAC8			L												I
PAC9			L												I
MICH2			L		I		I	G	A	S	A				T
MICH4			L									A	I	I	I
MICH5			L									A	I	I	I
GTO6	N		L									A	I	I	I
GTO11	N		L									A	I	I	I
GTO13			L									A	I	I	I
EDOM EX34		S	I	S		S									I

Cuadro 9. Cambio de aminoácido de los siete virus secuenciados con respecto al virus LPM y virus PAC en la posición antigénica 500.

Virus	Muestra de aislamiento	Cambio de aa en posición antigénica 500
LPM	Encéfalo de lechón	T
PAC2	Encéfalo de lechón	I
PAC3	Encéfalo de animales con signología nerviosa	I
PAC4	Encéfalo de animales con signología nerviosa	I
PAC6	Pulmón	I
PAC7	Encéfalo	I
PAC8	Encéfalo de lechón	I
PAC9	Encéfalo de una hembra adulta	I
MICH2	Encéfalo de lechones con tremor y opacidad corneal	T
MICH4	Encéfalo con opacidad corneal	I
MICH5	Semen de sementales	I
GTO6	Semen de sementales	I
GTO11	Encéfalo	I
GTO13	Encéfalo de cerdos con opacidad corneal	I
EDOMEX34	Se desconoce	T

ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Luego de obtener las siete secuencias completas, editar y realizar su análisis, se construyó un árbol filogenético usando referencias del genbank donde se evidencia la relación entre ellas y la presencia de variantes del *Rubulavirus porcino* (imagen 6).

Los virus MICH4, MICH5, GTO6, GTO11 y GTO13 se colocan en un grupo diferente al virus EDOMEX34 y MICH2. En el árbol filogenético se observa que el virus LPM se encuentra con los virus PAC4, INIFAP 2010 y MICH2 secuenciado, formando una familia. De este grupo se desprende una rama evolutiva la cual indica que el virus EDOMEX34 se encuentra filogénicamente más distante que los anteriores. Los virus GTO6 y GTO11 indican ser virus idénticos al pertenecer a la misma familia y no presentar líneas que los separen. De esta familia se desprende una rama evolutiva en donde se encuentran los virus CINVESTAV I y II. En cuanto a los virus PAC2 y PAC3 son variantes similares pero se encuentran alejadas del virus de referencia LPM. En este grupo se encuentra el virus CINVESTAV VI que indica ser una variante más distante respecto a los demás aislamientos. Los virus PAC6 y PAC7 son iguales y el virus PAC8 difiere muy poco de estos, sin embargo, los tres forman un grupo diferente respecto al virus LPM y a los nuevos aislamientos secuenciados.

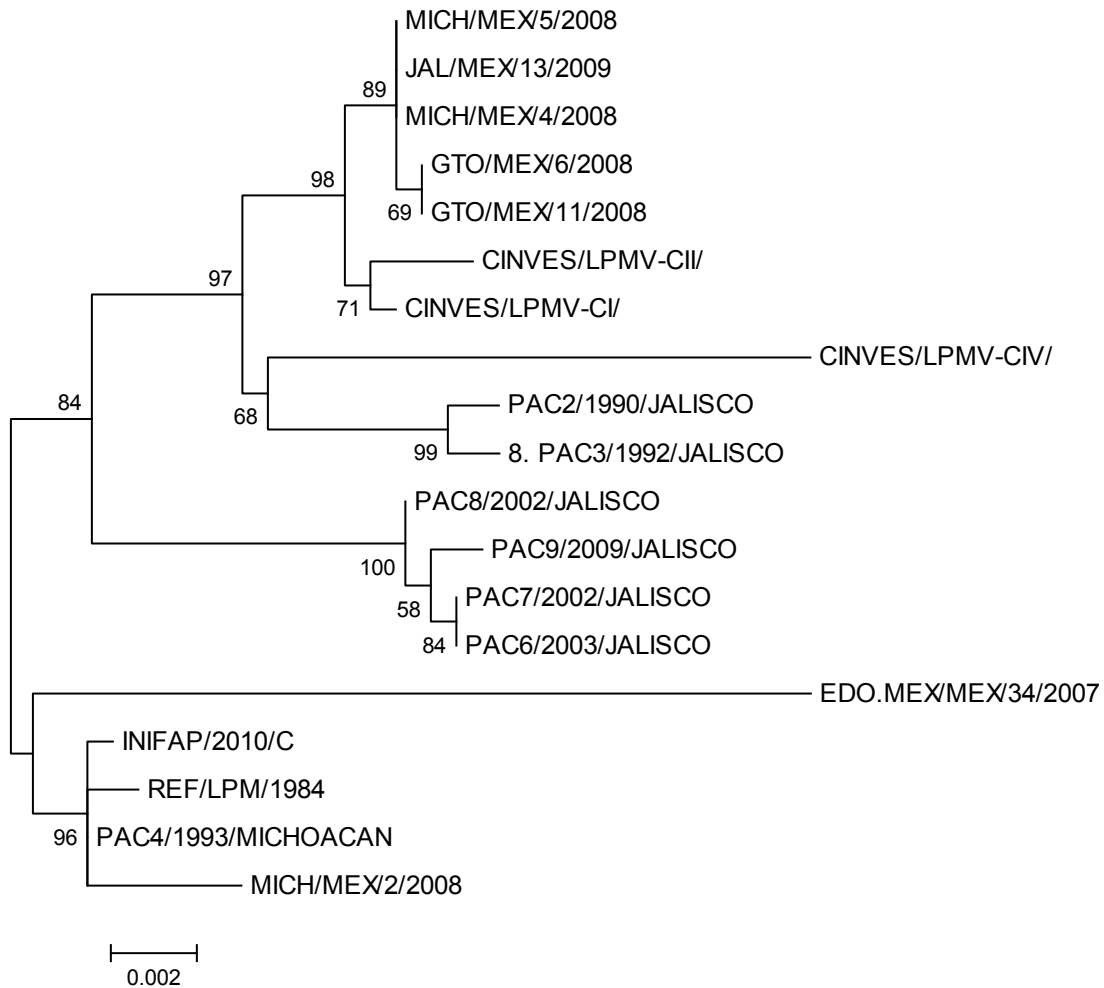


Imagen 6. *Árbol filogenético realizado a partir de los aminoácidos del gen HN de los Rubulavirus porcino estudiados. La fiabilidad del árbol Neighbor-Joining (NJ) se calculó utilizando 1000 repeticiones de bootstrap, utilizando el programa bioedit sequence alignment editor 7.1.*

7. DISCUSIÓN.

Desde que el *Rubulavirus porcino* fue aislado por primera vez, se ha encontrado una variabilidad del gen HN respecto a diferentes aislamientos obtenidos desde 1990 y hasta el 2003. La secuenciación del gen HN de aislamientos del virus ha permitido identificar diferentes variantes con respecto al primer virus aislado en La Piedad, Michoacán en 1984 (Sánchez-Betancourt et al., 2008).

Se han detectado diferencias antigénicas mediante la utilización de la técnica de Inhibición de la hemaglutinación (IH), al comparar los mismos aislamientos virales utilizados en este estudio (Riaño et al., 2011), contra sueros hiperinmunes del *Rubulavirus porcino*. Encontrando diferencias antigénicas entre cada aislamiento. También se ha reportado que la variabilidad antigénica, está asociada a las mutaciones en el gen HN en la secuencia de nucleótidos (secuencia primaria) que le permite al sistema inmune del cerdo generar anticuerpos específicos contra los epítopes modificados (Sánchez-Betancourt et al., 2008).

De acuerdo a estudios antes mencionados, los resultados de este trabajo indican un cambio evolutivo en diferentes aislados analizados en este estudio, ya que dichos aislamientos virales se agruparon en dos grupos diferentes y en clusters distantes.

El virus EDOMEX34 fue el que mostró mayores cambios agrupándose en una rama evolutiva diferente de los demás aislamientos ya reportados por Sánchez-Betancourt et al., 2008. En el análisis de aminoácidos se encontró que tiene 19 aminoácidos diferentes al virus LMP, lo cual indica que comparte un 96% de similitud con el virus de referencia.

El virus MICH2 fue otro virus que presentó más mutaciones con respecto a los demás aislamientos. En el análisis de aminoácidos se encontró con 10 aminoácidos diferentes y un 98% de similitud con el virus LPM agrupándose en la misma familia que este y los virus PAC4 e INIFAP 2010.

En el análisis de aminoácidos se encontraron tres posiciones importantes en donde se encuentran cambios de aminoácidos muy idénticos (posiciones 462,484 y 500 cuadro 8 y 9).

En esta posición cabe mencionar que en un estudio realizado por Sánchez-Betancourt et al., 2008 al analizar el potencial electrostático de las moléculas virales se encontraron nueve regiones antigénicas de las cuales tres presentaron cambios de aminoácidos con respecto al virus LMP, la primera región va del residuo 252-260 considerada altamente antigénica, en la cual hubo un cambio de aminoácido de V (Valina) a I (Isoleucina) en la posición 252; la segunda región que presentó un cambio es la que está constituida entre los residuos 488-501, la cual presentó un cambio de T (Treonina) a I (Isoleucina) en la posición 500.

Tal mutación se presentó en los virus MICH4, MICH5, GTO6, GTO11 y GTO13 de este estudio, lo cual indica que tienen el mismo aminoácido en esa región que es considerada altamente antigénica y que también difieren del virus LPM.

En un estudio realizado con aislamientos del *Rubulavirus porcino* (Virus de La Piedad Michoacán), un *paramixovirus* emergente detectado en México en 1980, se determinó la variabilidad de uno de los genes que codifican para su principal proteína de membrana HN, se deduce que la mayoría de los cambios se encuentran en la superficie de la proteína, expuestos al medio. Los cambios encontrados sugieren que este virus, como sucede con otros, está sometido a una presión de selección debido a la respuesta inmunitaria del hospedero (Borraz-Arguello et., al 2008).

A su vez en nuestro estudio podemos identificar que las variantes antigénicas se encuentran localizadas en diferentes estados de la República Mexicana, por ejemplo. Al analizar las secuencias del gen HN de cada aislamiento encontramos que el virus EDOMEX.34 aislado del estado de México se encuentra en una rama evolutiva diferente a los otros virus que fueron aislados del estado de Michoacán y Guanajuato lo cual indica que en cada estado de la república puede haber cepas diferentes que han sido modificadas por una adaptación evolutiva. Para determinar

esto tendríamos que hacer nuevos aislamientos de cada estado y determinar su variabilidad antigénica y genética.

En este trabajo podemos identificar que los aislamientos virales MICH4, MICH5, GTO6, GTO11 y GTO13 se agruparon en una rama y son aislamientos virales provenientes de Michoacán y Guanajuato del año 2008 y fueron aislados de semen de sementales y encéfalo de cerdos, lo cual nos indica que son cepas que tienen afinidad por sistema reproductivo y nervioso, de lechones y cerdos de finalización y son aislamientos que en cultivo celular presentaron un efecto citopático muy evidente. El virus MICH2 filogénicamente se encuentra muy cerca del virus LPM y PAC 4 el cual es un aislamiento de 1993 lo cual indica que tenemos una variante más actual aislada en el 2008. La cual presenta 10 aminoácidos diferentes respecto al LPM con una similitud del 98%.

8. CONCLUSIÓN.

- ✓ En este trabajo de caracterización genética el gen HN de los diferentes aislamientos provenientes de Guanajuato, Michoacán y estado de México se demostró que las cepas circulantes del *Rubulavirus porcino* presentan mutaciones importantes.
- ✓ El monitoreo constante de nuevas cepas virales, promoverán el conocimiento de variación antigénica y genética.
- ✓ Se debe de realizar un ensayo genómico de las cepas que circulan actualmente en México y relacionar la historia evolutiva, dando continuidad a posibles cambios evolutivos.
- ✓ Esta investigación dará fundamento para la elaboración de pruebas diagnósticas y vacunas eficientes.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linné T, Moreno-López J, Hernandez P, Kennedy S, Carrol BP, Henrron B, Foster JC, Aldair B. A sequential study of experimental porcine paramixovirus (LPMV) infections in pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996; 8: 405-413.

Arellanes AE, Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en el gato doméstico (*Felis catus*). *Rev. Vet. Méx.* 1994; 25: 239-241.

Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Analysis of the fusion protein gene of the porcine Rubulavirus LPMV: comparative analysis of the paramyxovirus f proteins. *Gen Virol.* 1997; 14: 55-61.

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

Berg M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Identification of the porcine paramyxovirus LPM matrix gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* 1991; 72: 1045-1050.

Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J. Virol.* 1993; 67: 4822-4830.

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: Important reservoir host of emerging viruses. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 19: 531-545.

Campos H. Carvajal F. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. Memorias de la XXIV Reunión de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Morelia (Michoacán) México. 1989.

Campos HR y Carbajal SM. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. Avances. Prod. Porcina, Vol. 1:243-251, 1992.

Campos HR. Dudosa etiología del Síndrome del ojo azul. Síntesis Porcina 1982; 1(11): 39.

Campos M. E. Síndrome del ojo azul o cerdos zarcos. Mem. XVII convención AMVEC- Ixtapa. Zihuatanejo, Guerrero, México. 1981.

Cuetero RS, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. Vet. Méx. 1995; 26: 231-236.

Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 4171-4175.

Fuentes RMJ, Gay GM, Herradora LMA, Retana RA. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. Vet. Méx. 1994; Vol. 25:3.

Fujinami RS, Oldstone MBA. Alterations in expression of measles virus polypeptides by antibody: molecular events in antibody induced antigenic modulation. J. Immunol. 1980; 125: 78-85.

Hercyk N, Horikami SM, Moyer SA. The vesicular stomatitis virus L-protein possesses the mRNA methyltransferase activities. Virology. 1988 163: 222-225.

Hernández J, Reyes-Leyva J, Ramírez H, Valenzuela O, Zenteno E. Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el *Rubulavirus porcino*. Vet. Méx. 2004; 35(1): 65-74.

Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez MH, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. Immunity to porcine Rubulavirus infection in adult swine. Vet. Immunol. Immunopath. 1998; 64: 367-381.

Hernández-Jáuregui P, Ramírez MH, Mercado GC, Moreno-López J, Kennedy S. Experimental porcine Rubulavirus (La Piedad- Michoacán virus) infection in pregnant gilts. *J. Comp. Path.* 2004; 130: 1-6.

Hernández-Jáuregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz-Orea A, Reyes-Leyva J, Hernández-Baumgarten E, Moreno-López J. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos. *Vet. Méx.* 1992; 23: 217-222.

International Committee on Taxonomy of Viruses. Homepage on the internet 2010. Virus Taxonomy. Disponible en: [http:// www.ictvonline.org/](http://www.ictvonline.org/)

Kirkland PD, Stephano A. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipha virus infections. In: Straw B, Zimmerman J, D'Allaire S, Taylor D. *Diseases of swine*. 9th Ed. EUA: Blackwell Publishing, 2006.

Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 1998; 72: 891-899.

Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D, Melero JA, Nagai Y, Oldstone MBA, Pringle CR, Rima BK. Family Paramyxoviridae. In: van Regenmortel MH, Fauquet CM,

Bishop DH, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Virus Taxonomy on line. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. 2000. doi: 10.1006/bkvt.2000.0054.

Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN., Knipe, D.M., Howlet P. M. (Eds). Fields Virology, Third Ed. EUA: Lippincot- Raven Publishers. 1996.

Linné T, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B, Moreno- López, J. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. Vet. Microbiol. 1992; 33: 263-273.

Martínez LA, Correa GP, Colinas TA, Galina PL. Opacidad corneal bilateral congénita en lechones de cerdas expuestas al paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán. Memorias del XIV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Morelia (Michoacán) México. (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1989.

Martínez LA, Correa GP, Fajardo MR, Garibay SM. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramixovirus. En: Correa P y Morilla A (eds). Encuentro sobre enfermedades infecciosas del Cerdo. México, D.F. 1985: 15-21.

Martínez LA, Correa-Girón P, Coba AMA, Córdoba LD. Propuesta para la estandarización del serodiagnóstico de la enfermedad del ojo azul por las pruebas de seroneutralización (SN) y de inhibición de la hemaglutinación (IH). Memorias del XXII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Ixtapa (Zihuatanejo) Guerrero, México. 1997.

Martínez LA, Pérez SJ, Correa-Girón P, Córdoba LD, Coba AMA. Utilidad del Rubulavirus porcino en la prueba de IH para el serodiagnóstico de la enfermedad del ojo azul y su comparación con otras pruebas diagnosticas. Memorias de la XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz (Veracruz) México. 2006.

McNeilly F, Walker I, Allan GM, Foster JC, Linné T, Merza M, Hernandez P, Kennedy S, Adair B. A. Comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacán paramixovirus (LPMV) infection in pigs. Vet. Diagn. Invest. 1997; 9:3-9.

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

Morilla A, Gonzalez-Vega D, Estrada E, Diosdado F. Seroepidemiology of blue eye disease. In: Morilla, A., Yoon, K, Zimmerman, J.(Eds). Trends in emerging viral infections of swine. USA: Iowa State University Press. 2002.

Morilla GA, Diosdado VF, González VD, Ojeda ZP, Mercado PM, Campomanes CA, Hernández JP, Moreno LJ. Estudio comparativo entre las pruebas de inmunoperoxidasa, ELISA e inhibición de la hemoaglutinación para el diagnóstico serológico de la enfermedad de ojo azul en cerdos. Memorias del Simposio internacional de enfermedades emergentes del cerdo. Academia Veterinaria Mexicana, A.C. Irapuato (Guanajuato) México. 2000.

Morrison TG, Pother A. Structure, function and intracellular processing of glycoproteins of *Paramyxoviridae*. In: Kingsbury DW (ed). The Paramyxoviruses. EUA: Plenum Press. 1991.

Pérez PF, Lesiones histológicas en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus del ojo azul. (Tesis licenciatura). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1989.

Pringle CR. Virus taxonomy. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during. Arch. Virol. 1998; 144: 421-429.

Ramírez- Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas-Jiménez JM, Mora- Galindo J, Dueñas- Jiménez SH. Electrophysiological and morphological alterations in

peripheral nerves by the pig paramixovirus of blue eye disease in neonatal pigs. J. Vet. Med. B. 2001; 48:477-487.

Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. Vet. Méx. 1996; 27:257-259.

Ramírez MH, Hernandez JP, Reyes LJ, Zenteno E, Moreno LJ, Kennedy S. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine Rubulavirus. J. Comp. Path. 1997; 117: 237-252.

Ramírez NR, Martínez LA, Correa GP, Colinas TA. Un brote de paramixovirosis encefalítica en cerdos de una granja del Estado de México. Mem. II Congreso ALVEC, XII Convención AMVEC, III Encuentro UNPC. Acapulco, Guerrero, México, 1987: 64-67.

Reyes- Leyva J, Espinosa B, Hernandez J, Zenteno R, Vallejo V, Hernandez- Jáuregui P, Zenteno E. NeuAc α 2,3 Gal-Glyconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine Rubulavirus LPMV. Com. Biochem. Physiol. 1997; 118: 327-332.

Reyes- Leyva J, García MO, Santos G, Vallejo V, Ramírez MH, Hernández J. Detección de la viremia en la infección experimental por *Rubulavirus porcino*. Arch. Med. Vet. 2004; 36: 39-47.

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

Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinosa B, Borraz MT, Ramírez MH, Vallejo V, Zenteno E. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus porcino*. En: Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E. (eds). Mensaje Bioquímico Vol. XXVI. México: Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM D.F. 2002.

Riaño CV. Identificación de Variación Antigénica del *Rubulavirus porcino* mediante la Técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (tesis de licenciatura). México: FMVZ- UNAM. 2011.

Rima B, Alexander DJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, Nagai Y, Örbel C, Pringle CR, Ter Mullen, V. Family *Paramyxoviridae*. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Matelli, G.P., Mayo, M.A. & Summers, M. D. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. EUA: Springer-Verlag, 1995.

Rivera – Benitez JF. Persistencia del *Rubulavirus porcino* en semen de verracos infectados experimentalmente (tesis de Maestría). México (DF): FMVZ-UNAM, 2009.

Rivera-Benítez JF, Martínez BR, García-Contreras A, Escobar LC, Hernández LJ, Ramírez MH. Assay of humoral immunity to porcine Rubulavirus (PoRV) experimental infection. In: D’Allaire, S. & Friendship, R. (Ed.) Proceedings of the 21 st IPVS Congress, Vancouver, Canada, 2010b.

Sánchez BJI. Evaluación de las afecciones reproductivas y caracterización del Rubulavirus porcino (tesis de Maestría). México: FMVZ-UNAM. 2004.

Sánchez-Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Doporto JM, Ramírez-MH, Hernández J, Reyes-Leyva J, Trujillo ME. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine Rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. Res. Vet. Sci. 2008; 85: 359-67.

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

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

Stephano Ha and Gay GM. Experimental studies of a new viral Syndrome in pigs called "Blue Eye" Characterized by Encephalitis and corneal opacity. Proc 8th Int Congr Pig Vet Soc, Ghent. P. 71 (1984).

Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, Maqueda AJ. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Memorias de la XVII Convención Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos: Ixtapa, (Guerrero) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1981.

Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet. Rec.1988; 122(2): 6-10.

Stephano HA, Gay GM. El síndrome del "ojo azul" estudio experimental. Memorias de Reunión de Investigación Pecuaria. México (DF), 1983.

Stephano HA, Gay GM. El síndrome del ojo azul en cerdos de granjas engordadoras del bajo. En: Memorias de Reunión de Investigación Pecuaria. México. 1985.

Stephano HA, Gay GM. El síndrome del ojo azul. Síntesis Porcina 1985; 4(5): 44.

Stephano HA, Gay GM. Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea, ojo azul. Síntesis porcina. 1986; 5 (12):26-39.

Stephano HA, Gay GM. Síndrome del ojo azul en cerdos II. Síntesis porcina, México, D.F. 1985; 4(6): 9-14.

Stephano HA, Gay GM. Síndrome del ojo azul en cerdos. En: Correa GP y Morilla GA. (eds). Encuentro sobre Enfermedades infecciosas del Cerdo. AMVEC. México, D.F. 1985: 1-13.

Stephano HA. Blue eye disease. In: B.E. Straw S, D'Allaire WL, Mengelin DJ. Taylor (eds). Diseases of swine. 8th ed. Ames, Iowa. Iowa State University Press. 1999; 103-112.

Stephano HA. El síndrome del ojo azul y la Investigación. Síntesis Porcina 1986; 5 (12): 16-17.

Stephano HA. Gay GM. El síndrome del ojo azul: una nueva enfermedad en cerdos asociada a un paramixovirus. Vet. Méx. 1986b; 17:120-122.

Stephano HA. Las enfermedades del ojo azul, signos clínicos y lesiones. Symposium Internacional de las Enfermedades del Cerdo. Irapuato (Guanajuato) México. Academia Mexicana, A.C. 2000.

Sundqvist A, Berg M, Hernandez-Jauregui P, Linné T, Moreno-López J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen. Virol.* 1990; 71: 609-613.

Sundqvist A, Berg M, Moreno-López J, Linné T. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch. Virol.* 1992; 122: 331-340.

Svenda M, Berg M, Moreno-López J, Linné T. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine Rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* 1997; 48: 57-70.

Taylor DJ. Rubulavirus infection and "Blue Eye". *Pig diseases* 7th ed. 54-55, 1999.

Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernandez J, Ramirez P, Delanoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol.* 2000, 126: 415-424.

Wang, LF, Hansson E, Yu M, Chua KB, Math N, Cramer, G, Rima, BK, Moreno-López J, Eaton BT. Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bats and pigs in the Americas. *Arch. Virol.* . 2007; 152: 1259-1271.

Zenteno-Cuevas R, Hernandez J, Espinosa B, Reyes-Leyva J, Zenteno, E.
Secondary structure prediction of the hemagglutinin- neuraminidase from a porcine
Rubulavirus. Arch. Virol. 1998; 143: 333-352.