

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL
RUBULAVIRUS PORCINO EN MUESTRAS SEROLÓGICAS DE JALISCO
MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES AISLADOS VIRALES

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ELENA SALGADO GARCÍA

ASESORES:

MVZ MC. Rosalba Carreón Nápoles
MVZ MC. María del Carmen Mercado García

México, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres Juan Salgado Luna y Laura M. García Utrilla, porque ustedes han estado conmigo en todo momento, han creído en mi depositando la confianza, amor, paciencia y todo su apoyo de manera incondicional. Gracias por todo lo que me han enseñado, por sus sabios consejos y los valores. Los admiro mucho. Agradezco infinitamente el regalo de ser su hija. Los amo.

A mis hermanos, por todo el apoyo que me demostraron. Gabriela, gracias por la confianza, por cuidarme siempre y tener tiempo en toda ocasión para mí dándome unas palabras de aliento o sólo escuchándome.

A mis sobrinos Ian, Melissa, Isabella y León, son la luz de mis días, la alegría en mi vida. Me hacen muy feliz.

A mis amigos, con sus muestras de cariño, apoyo, consejos, aportaciones ayudaron a concluir este trabajo. Gracias porque hacen los días más fáciles.

AGRADECIMIENTOS

A mí Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia porque me han ayudado a definir mi persona y mis ideales gracias a la formación académica y personal recibida.

A mi asesora, MC. Rosalba Carreón Nápoles, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, gracias por brindarme su apoyo incondicional, los conocimientos brindados, los consejos recibidos y todos los agradables momentos que compartimos, siempre la llevare conmigo.

A la MC. María del Carmen Mercado García por tomarse el tiempo para darme sus consejos y todas las aportaciones para este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Humberto Ramírez Mendoza, Dr. José Iván Sánchez Betancourt, Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y Dr. José Alberto Cano Buendía por todas sus aportaciones, consejos y comentarios en la revisión de este trabajo.

Al personal del Departamento de Medicina y Zootecnia en Cerdos por toda la ayuda recibida.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	34
REFERENCIAS.....	35

RESUMEN

ELENA SALGADO GARCÍA. Determinación de la presencia de anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* en muestras serológicas de Jalisco mediante el uso de diferentes aislados virales. (Bajo la supervisión de MC Rosalba Carreón Nápoles y MC María del Carmen Mercado García).

La Enfermedad de Ojo Azul (EOA) es causada por el *Rubulavirus porcino* (RVP) que pertenece a la familia de los Paramixovirus, es endémica de México. La zona que ha presentado la mayor incidencia es la del Bajío que comprende los estados de Querétaro, Guanajuato, Michoacán y Jalisco. El objetivo de la investigación fue evaluar la antigenicidad cruzada de 4 diferentes aislados virales del RVP. Se emplearon 200 sueros de cerdos de Jalisco provenientes de casos remitidos al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos desde el año 2002 hasta el 2013. Se utilizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación; cada suero fue confrontado contra los cuatro aislamientos virales. Los resultados demuestran que existe una diferencia en el reconocimiento de anticuerpos contra los virus utilizados. Los sueros que fueron confrontados con los aislamientos virales AV1-08, AV2-08, AV3-08 y que fueron positivos en los tres casos, mostraron una reactividad diferente con el aislamiento viral AV4-11. El conocer la existencia de variaciones antigénicas entre los diferentes virus de ojo azul servirá como herramienta para producir inmunógenos que generen una respuesta más amplia hacia las variedades que estén circulando en la zona; así como para utilizarlos en el diagnóstico con un reconocimiento de anticuerpos más completo.

Introducción:

El *Rubulavirus porcino* (RVP) es responsable de la Enfermedad de Ojo Azul (EOA), pertenece a la familia de los Paramixovirus, subfamilia Paramyxoviridae, género *Rubulavirus*. La EOA se presenta con mayor incidencia en el centro del país; afecta a cerdos de todas las edades. Los lechones desarrollan signos nerviosos. En línea de engorda causa problemas respiratorios. Los cerdos adultos presentan problemas reproductivos; los sementales presentan orquitis, atrofia testicular y epididimitis. Las hembras repetición del estro debido a la infertilidad que causa en los machos. Alterando así los parámetros productivos y/o reproductivos.^{1,2}

Antecedentes históricos

La enfermedad de ojo azul, fue identificada desde el año 1980, en La Piedad, Michoacán, México. Se caracteriza por afectar a los cerdos de cualquier edad, provocando encefalitis, problemas reproductivos en animales adultos y opacidad de la córnea ocasionalmente.³

La EOA es endémica de México. De acuerdo a un estudio acerca de la frecuencia de sueros positivos a la enfermedad de ojo azul se reportaron seropositividad en los estados de: Michoacán, Jalisco, Guanajuato (1980-1981); Estado de México (1992), Distrito Federal, Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Tabasco y Yucatán (1988), Tamaulipas (1984) y Puebla, Campeche y Quintana Roo (1990). La zona del Bajío (Michoacán, Guanajuato, Jalisco) es la que presentó una mayor incidencia con un mayor número de sueros positivos.⁴

La única especie hospedadora conocida es el cerdo. La transmisión es en forma horizontal y vertical. Horizontal debido a que se transmite de un individuo a otro por vía aérea a través de microgotas contaminadas, también se puede encontrar en el semen y en los fetos muertos procedentes de cerdas que fueron infectadas de manera horizontal, causando la transmisión vertical de la enfermedad a los productos, ya que el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria causando muerte y momificación fetal.^{5, 6, 7, 8, 9}

Los brotes de ojo azul se presentan durante todo el año, aunque su incidencia aumenta en los meses de marzo a julio. La aparición de brotes está relacionada con la entrada de animales infectados, así como vectores mecánicos o fomites.^{10, 11, 12, 13}

Agente etiológico

El agente causal es un virus clasificado de la siguiente manera; orden: Mononegavirales, familia: *Paramixoviridae*, subfamilia: *Paramyxoviridae*, género: *Rubulavirus*, especie: *Rubulavirus porcino*.^{5, 14, 15}

Los Paramixovirus se organizan en dos subfamilias y siete géneros. Hay cinco géneros de la subfamilia *Paramyxovirinae*: *Avulavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* y *Rubulavirus*; de la otra subfamilia llamada *Pneumovirinae* existen dos géneros llamados: *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. Existen agentes patógenos de animales y seres humanos en cada uno de estos géneros; por ejemplo, el virus de la enfermedad de Newcastle de las aves de corral en el género *Avulavirus*; moquillo canino y el sarampión humano del género

Morbillivirus; varios virus de parainfluenza humana y de los animales en el género *Respirovirus*; y en el género *Rubulavirus*, virus de las paperas en humanos, enfermedad de ojo azul, y el virus de Menangle, estos dos últimos virus son infecciosos para los cerdos. El género *Henipavirus* está integrado por dos paramixovirus, el virus de Hendra y Nipah, siendo diferentes de manera morfológica y genéticamente de otros paramixovirus.^{15,16, 17, 18, 19, 20}

La familia *Paramixoviridae* agrupa virus envueltos y de gran tamaño (150-400 nm de diámetro), son virus pleomórficos. El genoma se compone de una cadena de ácido ribonucleico (ARN) en sentido negativo dentro de una nucleocápside similar a una espiga. La nucleocápside está rodeada por una cápside conformada por la proteína M y una envoltura lipídica que contiene a las glicoproteínas de superficie.^{15, 16}

Los *Rubulavirus* están constituidos por 6 proteínas estructurales: polimerasa o proteína de alto peso molecular (L), nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la glicoproteína de fusión (F) localizadas en la envoltura viral. Las glicoproteínas HN y F son transmembranales, están más expuestas hacia el exterior del virión dejando un pequeño segmento intraviral haciendo contacto con la proteína M de la cápside. (Figura 1).^{2, 21, 22}

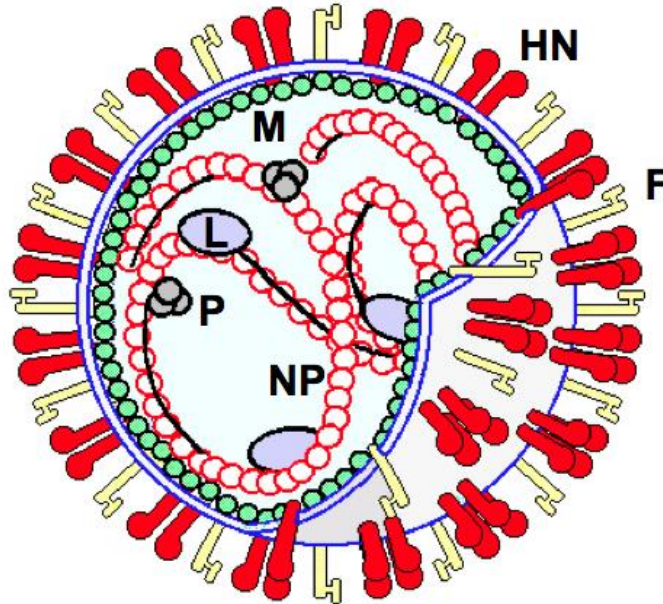


Figura 1. Esquema del Rubulavirus porcino y sus proteínas estructurales. En la envoltura se encuentran las glicoproteínas HN y F; en la parte interna se ubica la proteína de matriz (M). Íntimamente ligada a la cadena de ARN se encuentran las nucleoproteínas (NP) que conforman la nucleocápside helicoidal; las proteínas P y L que constituyen el complejo con actividad polimerasa del virus.¹⁷

La glicoproteína HN presenta actividad hemaglutinante y neuraminidasa, posee dos dominios, uno capaz de aglutinar eritrocitos y la otra elimina los residuos de ácido siálico³⁴; la aglutinación es debida al reconocimiento del ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAca-2,3 Gal) expresado en las superficies de eritrocitos de algunas especies como son: cerdo, carnero, vaca, perro, conejo, ratón, rata, hámster, cuye, pollo, humanos tipos A, B y O.^{7, 10,14, 23,}

24, 25, 26

De acuerdo a Sánchez-Betancourt y colaboradores en el año 2008 reportaron cambios en la secuencia de nucleótidos en el gen codificante para la HN; lo cuál aporta virulencia y manifestaciones clínicas diferentes para cada aislamiento. Esto puede generar diversas respuestas en las pruebas de laboratorio; tal como se demuestra en estudios anteriores, donde se ha evaluado la respuesta de diferentes sueros hacia algunos aislados, obteniendo respuestas variables demostrando que el virus no es reconocido de igual manera por todos los sueros analizados.^{27, 28, 29, 30}

En el año 2010 se demostró la variabilidad antigénica de 3 virus, PAC 4 (1993), PAC6 (2001), PAC 9 (2003) en 4 estados: Guanajuato, Jalisco, Estado de México y Michoacán. En dicho estudio se evaluó la seroprevalencia y se evidenció la presencia de anticuerpos mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación indicando diferente comportamiento con respecto a los títulos obtenidos contra los diferentes aislamientos virales, esto se asocia a la variación del potencial inmunogénico de cada aislamiento.²⁹

Más tarde se identificó la variación antigénica en ocho aislamientos virales del *Rubulavirus porcino* (2, 4, 5, 6, 7, 11, 13 y 34) mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Los resultados indicaron que si existen variaciones antigénicas entre el virus 34 y los virus 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11 y 13. El virus 2 no presentó variación antigénica con respecto a los virus 4, 5, 6, 7, 8, 11 y 13. El virus 4 no varía antigénicamente con respecto a los virus 5 y 6. El virus 5 no presenta variación antigénica con los virus 6, 7, 11 y 13. Los virus no comparten las mismas respuestas en las reacciones antígeno-anticuerpo, siendo un factor que podría dar

resultados falsos negativos si se usa un solo antígeno para el diagnóstico. Este estudio demuestra la posibilidad de encontrar anticuerpos específicos al usar diferentes aislados para su diagnóstico.²⁷

Replicación viral

El ciclo biológico del *Rubulavirus porcino* incluye las fases de reconocimiento, adsorción en la superficie celular, fusión de membranas, penetración a la célula, desnudamiento, transcripción, replicación del genoma, ensamble y liberación de viriones. La partícula se adsorbe a la membrana de la célula por medio de la proteína HN, que reconoce un receptor específico, generalmente glicosilado. Un cambio conformacional de la HN activa a la proteína F, que expone un dominio mediante el cual fusiona la membrana celular y la envoltura viral. La integración de la envoltura viral al sistema de membranas celulares provoca la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. Ya que el virión trae integrada su propia polimerasa, al liberarse el ARN viral se sintetiza una copia completa del genoma en sentido positivo que servirá de molde para los nuevos genomas, y se inicia la síntesis de los ARN mensajeros que codifican cada una de las proteínas virales. Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, en donde las proteínas virales NP, P y L son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se acumula en la parte interna de la membrana celular. Las glicoproteínas HN y F que fueron sintetizadas en el retículo endoplásmico, son modificadas por el aparato de Golgi y posteriormente expresadas en la cara externa de la membrana celular, en sitios de contacto estrecho con la proteína M. La afinidad de las

proteínas de la nucleocápside, NP, con la proteína de matriz, M, y de esta con las glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por gemación. (Figura 2)¹⁷

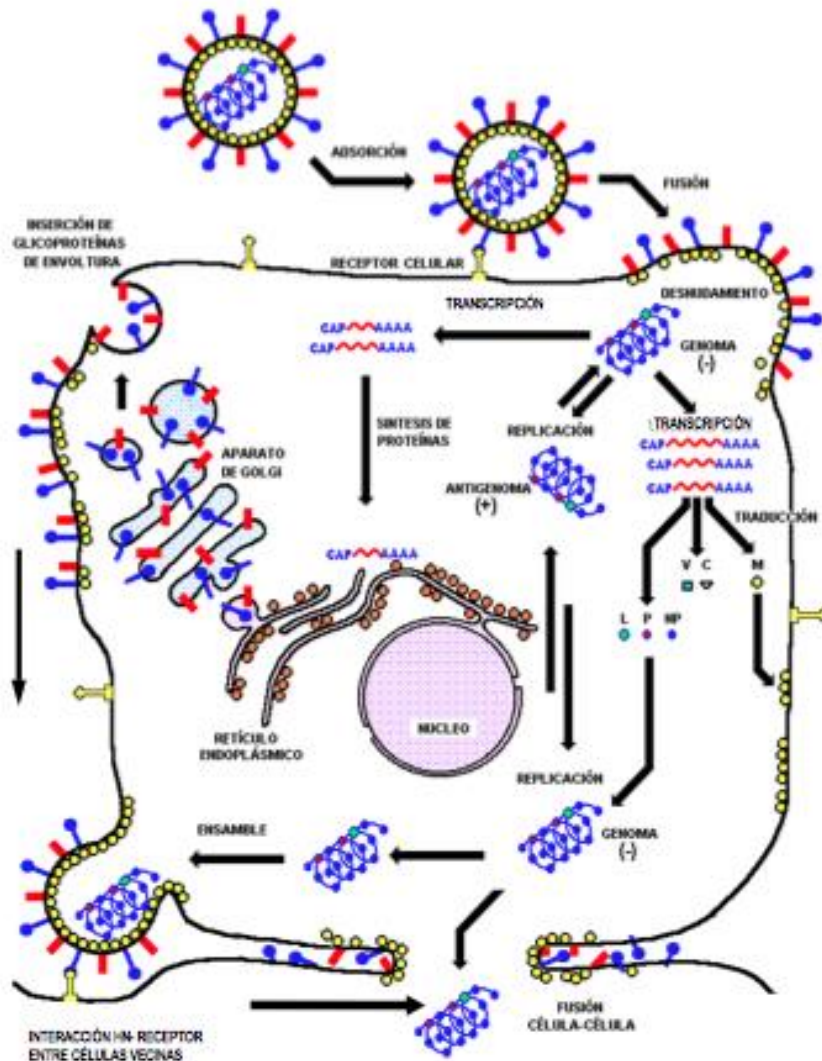


Figura 2. Ciclo biológico de los Rubulavirus

La replicación del *Rubulavirus porcino* se realiza en su totalidad en el citoplasma, por lo cual se forman aglomerados de nucleocápsides que se observan como grandes inclusiones intracitoplásmicas en las células infectadas.³¹

El material genético viral también puede pasar directamente de una célula infectada a una célula vecina sin que se libere una partícula viral, esto se debe a la fusión de membranas que existe entre las glicoproteínas HN y F. Así dan origen a las células gigantes multinucleadas o sincitios; siendo una de las características de las infecciones causadas por los paramixovirus.²¹ Los cambios consisten en células redondeadas, vacuolas citoplasmáticas y formación de sincitios. Algunas células también contienen cuerpos de inclusión virales.^{13, 14, 19, 26}

Respuesta inmune

Los principales mecanismos de respuesta inmune específica ante una infección viral son los anticuerpos y los linfocitos T.³²

La respuesta humoral contra el *Rubulavirus porcino* se inicia con la producción de anticuerpos desde la primera semana pos infección. Durante las primeras 4 semanas los títulos incrementan entre 4 y 6 log², en la quinta semana llegan a incrementarse hasta 8.5 log².³²

Los cambios en la estructura o en la expresión de las proteínas de superficie pueden ser importantes mecanismos mediante los cuales el virus evita el reconocimiento y la eliminación por anticuerpos.⁸

Los anticuerpos generados son dirigidos contra las proteínas HN, M y NP del virus, predominando contra HN. Los anticuerpos pueden reconocer al virus en forma libre o a células infectadas por el virus; estos controlan las infecciones neutralizando las partículas virales a través de citotoxicidad mediada o produciendo la muerte de las células infectadas por el complemento.³²

Al inicio de la infección se ha detectado la proliferación principalmente de linfocitos T; para la tercera semana pos infección disminuyen los linfocitos con fenotipo CD4+CD8- debido al reclutamiento de éstos en los órganos blanco infectados para participar en el control de la infección. La respuesta de memoria se caracteriza por la proliferación de linfocitos T CD4+CD8+ con un perfil de citocinas donde predomina IL-10.^{32, 33, 34, 35}

Patogenia

La transmisión es de forma horizontal y vertical; horizontal debido a que se transmite de un individuo a otro por vía aérea, también se puede encontrar en el semen y en los fetos muertos procedentes de cerdas que fueron infectadas de manera horizontal causando la transmisión vertical de la enfermedad a los lechones, ya que el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria causando muerte y momificación fetal.^{5, 6, 7, 8, 9}

El virus puede ser adquirido por vía aérea mediante la aspiración de microgotas contaminadas con el virus. Cuando el tamaño de la gota es muy grande, está queda atrapada en la mucosa oronasal y el virus tiene que buscar una célula susceptible para replicarse; cuando las gotas son muy pequeñas, el virus ingresa con la inspiración hasta el interior del pulmón y se deposita en los conductos aéreos superiores donde la replicación es abundante y pasa a vía sanguínea donde es transportado por eritrocitos y leucocitos iniciando la infección sistémica y la replicación en sitios inmunoprivilegiados de órganos linfáticos y reproductores.^{2, 14}

De manera experimental existen varias vías por las que se ha inoculado el *Rubulavirus porcino* por vía intranasal, intratraqueal, intraocular, intracraneal, intraperitoneal e intramuscular.^{7, 9, 10, 14, 36}

El virus puede ingresar a sistema nervioso central (SNC) por terminaciones del nervio olfatorio en la mucosa nasal, y posteriormente puede diseminarse a hipocampo, tallo cerebral y cerebelo.^{8, 37, 38}

En neonatos el sitio donde el virus se replica de manera exponencial es el SNC (bulbo olfatorio, corteza de lóbulo piriforme, hipocampo, tálamo, tallo cerebral y cerebelo) y tejidos del aparato respiratorio; cuando los lechones son destetados el virus se presenta principalmente en aparato respiratorio y SNC.^{7, 10, 14, 39}

En machos adultos el virus se replica con mayor frecuencia en tracto respiratorio y reproductor (testículo y epidídimo).⁹ En hembras gestantes, infectadas experimentalmente, el virus fue aislado en tracto respiratorio, tonsila y ovarios.⁵⁵

Las diferencias sobre la distribución tisular del *Rubulavirus porcino* está determinado por la expresión de receptores celulares, tal es el caso del ácido N-acetilneuramínico alfa 2,3 galactosa (NeuAc α -2,3 Gal), este receptor se encuentra en tejidos de neonatos en el sistema nervioso, respiratorio y linfático; en machos adultos está en aparato respiratorio y reproductor.^{2, 8, 24}

Signos clínicos

Los signos característicos de esta enfermedad desde su descubrimiento fueron los cuadros de meningoencefalitis en cerdos lactantes menores de un mes de edad.^{3,}

4

Los signos clínicos se presentan de acuerdo a las distintas etapas productivas. En cerdos lactantes de 2 a 21 días de vida, se caracteriza por encefalitis, neumonía y opacidad corneal. En algunos casos la enfermedad comienza con aparición repentina de fiebre, lomo arqueado y postración o depresión. Estos signos son seguidos de enfermedad neurológica progresiva con debilidad, ataxia, temblores musculares, postura anormal y rigidez, especialmente de las patas traseras. Algunos lechones se muestran hiperexcitables; chillan y realizan movimientos de pedaleo cuando son manipulados.^{7, 10, 13, 20}

Entre 1 y 10 % de los lechones desarrollan opacidad corneal unilateral o bilateral, que suele desaparecer de manera espontánea. Se han encontrado otros signos que pueden incluir conjuntivitis, ceguera aparente, nistagmo, constipación y diarrea. Con frecuencia los lechones afectados mueren. Los lechones generalmente mueren dentro de las 48 horas de la aparición de los signos clínicos; posteriormente se observan muertes después de 4 a 6 días de la enfermedad. Los cerdos destetados de más de 30 días de vida suelen mostrar signos moderados y transitorios que pueden incluir anorexia, fiebre, tos, estornudos y, ocasionalmente, opacidad corneal.²⁰

En los cerdos adultos se observan signos reproductivos. Las hembras muestran una disminución en las tasas de fertilidad, abortos, aumento de mortinatos y fetos

momificados; mientras que los machos se observa epididimitis, orquitis y baja calidad espermática. En algunos animales se puede presentar opacidad corneal o anorexia leve.^{7, 10, 20, 28}

Lesiones

Las lesiones se pueden dividir en macroscópicas y microscópicas; las lesiones macroscópicas más evidentes causadas por el *Rubulavirus porcino* son: conjuntivitis, equimosis, opacidad corneal en distintos grados frecuentemente encontrada en lechones menores de 30 días de edad que puede ser de manera unilateral o bilateral, se observa formación de vesículas, úlceras y keratocono, así como un exudado en la cámara anterior del ojo. Los lechones presentan neumonía en los lóbulos cráneo-ventrales, el estómago con coágulos de leche, la vejiga urinaria distendida y líquido peritoneal con fibrina; el cerebro presenta congestión y un aumento de líquido cerebroespinal. En los machos se observa una notoria inflamación en los testículos, la mayoría de veces de manera unilateral, y epidídimo con un aumento de tamaño debido al edema en casos agudos, conforme avanzan los casos se encuentra una orquitis y epididimitis. Al verse afectado el epidídimo se puede observar orquitis con fibrosis y adherencias en la túnica albugínea, también pueden encontrarse hemorragias en la túnica, epidídimo y/o testículo. También se pueden presentar hemorragias renales y en el pericardio.^{40, 41}

Las lesiones microscópicas se encuentran principalmente en cerebro y médula espinal donde se observa encefalitis no supurativa, característica de las

infecciones causadas por virus, afectando principalmente la materia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral; existe una gliosis difusa y multifocal, infiltración perivascular con linfocitos, células plasmáticas y reticulares, necrosis neuronal, neurofagia, meningitis y coroiditis. Al ser un virus RNA se encuentran cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.^{13, 42, 43}

Diagnóstico

Se puede realizar el diagnóstico presuntivo de la enfermedad mediante los signos observados como la opacidad corneal, calores repetidos en las cerdas, orquitis y epididimitis en los machos; así como por medio de los cambios histomorfofisiológicos que presentan los animales afectados como encefalitis no supurativa, uveítis, queratitis, orquitis, epididimitis, en SNC se pueden observar los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en las neuronas. Todo esto en conjunto facilita el diagnóstico de la Enfermedad de Ojo Azul sin embargo es necesario demostrar la presencia del antígeno o de los anticuerpos específicos contra éste.^{7,}

10, 13, 44

El antígeno puede ser detectado mediante pruebas como: el aislamiento en cultivo celular, inmunofluorescencia directa e indirecta; reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR). Está última ha sido de los métodos empleados para detectar el material genético en fluidos como suero o semen y tejidos.^{8, 23, 39, 45}

Las pruebas más comunes para detectar la presencia de anticuerpos son la inhibición de la hemaglutinación (IH), seroneutralización (SN), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) e inmunoperoxidasa (IP).^{23, 45, 46}

Al comparar las pruebas para la detección de anticuerpos: ELISA, SN, e IH, se demostró en los resultados que al usar estas pruebas en sueros, la prueba de SN y ELISA dieron 89.1% de sensibilidad, mientras que la IH 84.7%, concluyendo que la prueba de IH puede ser una prueba utilizada en la piara debido a su alta especificidad, en comparación con otras técnicas como SN y ELISA, ha demostrado ser del 100%. La prueba, IHA, es utilizada para detectar anticuerpos específicos de la clase IgG e IgM en suero.^{30, 47, 48, 49}

La inhibición de la hemaglutinación, es la prueba más utilizada para detectar la enfermedad de ojo azul (EOA) en nuestro país. En un estudio realizado en 1996 se evaluaron diferentes variables que participan en la prueba como son la concentración del antígeno, concentración y tipo de eritrocitos, tiempo de incubación de reacción antígeno-anticuerpo, temperatura y el origen del antígeno; se concluyó que los resultados más confiables y que menos inespecificidad generan se obtienen al usar eritrocitos de bovino al 0.5% con antígeno obtenido de cultivo celular con 8 unidades hemaglutinantes (UHA) y una temperatura de 20 a 25° C.²³

Prevención y control

El control está basado en el monitoreo y eliminación de animales positivos, así como la aplicación de las medidas pertinentes de bioseguridad necesarias para evitar la diseminación de la enfermedad en una explotación. Para prevenir la enfermedad se han desarrollado diversas vacunas, en un estudio, se evaluó una vacuna utilizando el Rubulavirus inactivado. Se determinaron los niveles de anticuerpos en los animales vacunados mediante la prueba de seroneutralización y se comprobó que hubo un 70% de protección obtenida a través del calostro en cerdos destetados a los 4, 28 y 38 días de edad provenientes de hembras vacunadas. Los lechones que provenían de madres no vacunadas murieron en su totalidad.⁵⁰

En un estudio publicado en el 2011 se observó que la presencia de anticuerpos específicos hacia la proteína HN del *Rubulavirus porcino* en los lechones procedentes de madres inmunizadas con una proteína recombinante, obtenida a partir de la expresión del gen HN del Rubulavirus porcino(HN-LPMV), demuestra una adecuada transferencia de anticuerpos específicos contra el Rubulavirus porcino. Esto representa un importante avance en la utilización de la vacuna HN-LPMV recombinante para su uso en el control de la Enfermedad del Ojo Azul en México.⁵¹

En la actualidad, hay dos vacunas de virus inactivados comerciales (Innovac® Ojo Azul® y Porcimune® SOA) aprobados para su uso en lechones, animales en desarrollo y pie de cría. Debido a la variabilidad antigénica del virus, aun no se ha podido garantizar la inmunidad total de la vacuna.

Hipótesis

A través de diferentes estudios se ha hecho evidente la presencia del virus de ojo azul en diversos estados de la República Mexicana. Debido a la variabilidad antigénica entre los aislamientos de Rubulavirus porcino, se espera encontrar un diferente reconocimiento de anticuerpos para cada uno de los distintos aislamientos virales mediante el uso de la técnica de inhibición de la hemaglutinación.

Objetivo

1. Evaluar la antigenicidad cruzada de 4 diferentes aislados virales del *Rubulavirus porcino* (AV1-08, AV2-08, AV3-08 y AV4-11) a través de la prueba de inhibición de la hemaglutinación de muestras obtenidas en el estado de Jalisco.

Material y métodos

Muestras

Se emplearon 200 sueros provenientes de cerdos de Jalisco remitidos al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC) desde el año 2002 hasta el 2013.

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

Virus

Se utilizaron los aislamientos virales *AV1-08*, *AV2-08*, *AV3-08*, *AV4-11* del RVP los cuales fueron obtenidos del DMZC. En el cuadro 1 se muestran los virus utilizados los cuáles fueron previamente seleccionados debido a la variación antigénica demostrada en un estudio previo.²⁷

Tabla 1. Origen de los aislamientos del virus de ojo azul utilizados.²⁷

AISLAMIENTO VIRAL	MUESTRA	ESTADO	AÑO DE AISLAMIENTO
AV1	Encéfalo de lechón con tremor y opacidad de córnea	Michoacán	2008
AV2	Encéfalo	Michoacán	2008
AV3	Encéfalo de cerdos de 3 meses con opacidad de la córnea.	Guanajuato	2008
AV4	Se desconoce	Estado de México	2011

Replicación y titulación Viral

Los virus se replicaron en un monoestrato confluyente de células VERO (riñón de mono verde africano), con 24 horas de crecimiento en botellas de cultivo, suplementado con medio mínimo esencial Eagle's (MEM) y 10% de suero de ternera recién nacido (Hyclone) e incubado a 37° C. Fueron inoculadas las células con 1ml de cada uno de los virus; los cultivos se mantuvieron con MEM, sin suero, se revisaron diariamente post-inoculación; se tomó sobrenadante y se observó la presencia o ausencia de efecto citopático (ECP) así como la actividad aglutinante al confrontar con glóbulos rojos de bovino.^{2, 10, 52}

Se tomaron 150 µl del sobrenadante del cultivo celular para confrontar con eritrocitos de bovino 0.5 % por separado para observar la presencia o ausencia de aglutinación para considerarlo como muestra positiva, y se clasificará de acuerdo a la intensidad de aglutinación como leve, media y moderada.

A los 6 días los cultivos celulares fueron congelados a -70°C, posteriormente se descongelaron y se clarificaron por centrifugación (5000 rpm/20 minutos).

Titulación

1. En una microplaca de fondo en "U" (Nunc) de 96 pozos, se colocaron 50µl de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) en todos los pozos.
2. Se adicionaron 50µl del sobrenadante clarificado en la fila "1" utilizando 2 hileras por cada virus en donde se utilizaron 2 placas para los 4 virus y las 2 últimas

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

3. Realizada la dilución, en todos los pozos de las hileras “1” a la “12” se agregó 50µl de una suspensión de eritrocitos de bovino al 0.5%.

Se consideró como título final como la máxima dilución que presentó hemaglutinación.

Procesamiento de los sueros

Todos los sueros fueron previamente inactivados a 56°C en baño maría durante 30 minutos; posteriormente para eliminar proteínas inespecíficas inhibidoras de la hemoaglutinación, se homogenizaron 200 µl de suero con 100µl de caolín y 100 µl de eritrocitos de bovino al 5%, se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas, posterior a la sedimentación del caolín y los eritrocitos, se extrajo el sobrenadante de cada suero para detectar la presencia de anticuerpos contra los distintos aislamientos virales.

Inhibición de la hemaglutinación

Los sueros fueron colocados en placas de 96 pozos con fondo en U (Nunc), con 50 µL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos), a partir del primer pozo se realizaron diluciones dobles seriadas, las cuales fueron desde 1:4 hasta 1:2048. Posteriormente se colocaron 50 µL de cada aislamiento (virus), con 8 unidades hemaglutinantes (UHA) respectivamente, en cada pozo; se incubó durante 30

minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 50 μ L de eritrocitos de bovino al 0.5% por pozo en toda la placa; la lectura se realizo a los 60 minutos.^{23, 53}

El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se expresó como la máxima dilución en la que el suero fue capaz de inhibir la actividad hemaglutinante del *Rubulavirus porcino*. En esta prueba se considera que un suero es positivo cuando presenta un título igual o mayor a 1:16 ($4 \log_2$). de acuerdo a lo reportado por Ramírez et al. 1996.¹⁴ Los títulos obtenidos se convirtieron a logaritmo base 2 para su posterior análisis estadístico.^{23, 32, 33}

Testigos:

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

Negativo: Se utilizó un suero conocido que no tenía anticuerpos contra el RVP, PBS, antígeno viral y eritrocitos. En este caso al no haber anticuerpos el antígeno se unió a los eritrocitos y se observó hemoaglutinación.

Análisis de la información:

Al realizar la prueba de inhibición de la hemaglutinación, se obtuvo el número y el porcentaje para cada uno de los aislamientos virales de las muestras que resultaron positivas hacia alguno de los aislados.

Se determinó la frecuencia de los títulos encontrados con los diferentes aislados de las muestras que resultaron positivas;

Los títulos de los sueros positivos se transformaron a log base 2 y se realizó la estadística descriptiva, se obtuvo: la media, mediana y moda de los sueros positivos por aislado. Se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis, utilizada para comparar más de dos grupos y determinar que la diferencia no se deba al azar; con esta prueba se analizarán las variables en estudio para determinar si existe diferencia entre los distintos aislados virales.

Resultados

Al analizar las 200 muestras de sueros provenientes del estado de Jalisco con cuatro diferentes aislados de Rubulavirus porcino, los resultados serológicos mostraron que el mayor número de sueros positivos obtenidos fue hacia el AV2-08 con 56 muestras (28%); seguido por el AV1-08 con 41 (20.5%), el AV3-08 con 39 (19.5%) y el AV4-11 con 12 (6%). (Figura 3)

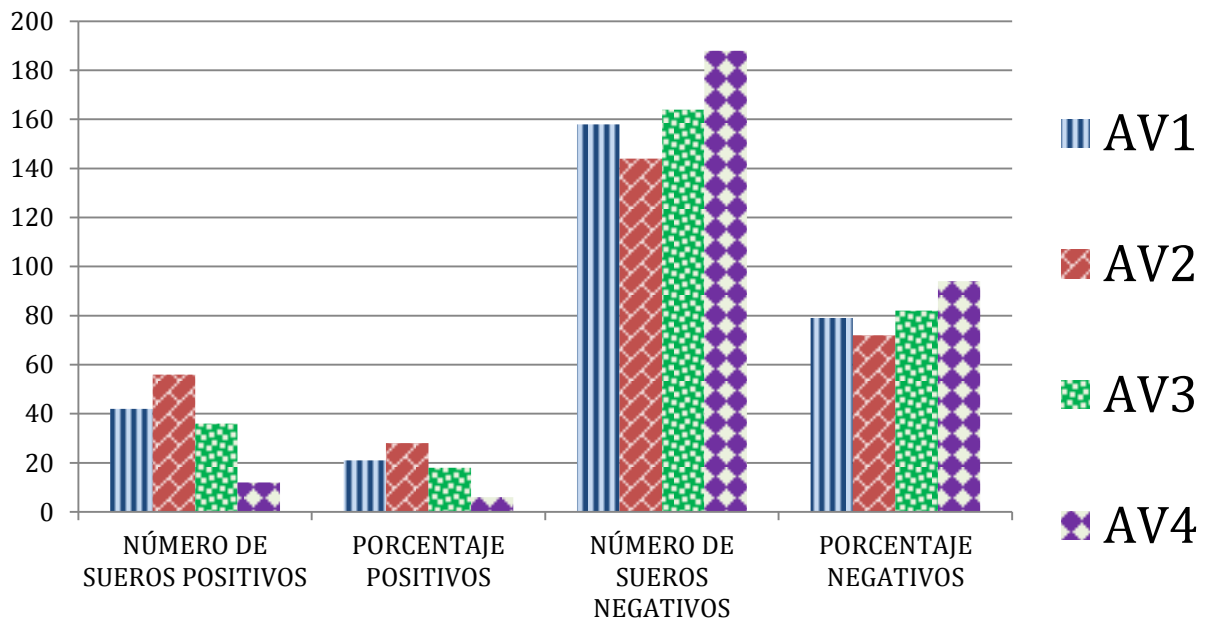


Figura 3. Número de sueros positivos y negativos, así como sus porcentajes respectivos confrontados con los cuatro aislamientos virales

Una vez que se determinó la presencia de muestras positivas para los cuatro antígenos, de manera complementaria se evaluó el número de muestras que compartieron el resultado positivo entre antígenos. El AV1-08 fue el que compartió más número de muestras positivas, ya que con el AV2-08 compartió 37 y con el AV3-08 fueron 33.

Los virus que compartieron menos muestras positivas fueron el AV3-08 con el AV4-11, con 9. (Figura 4)

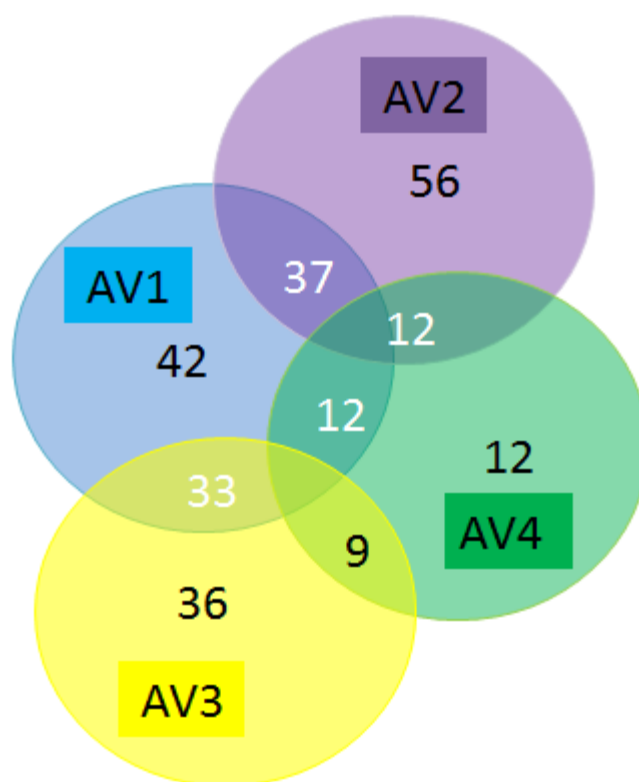


Figura 4. Diagrama de los 4 aislados. Se observan el número de sueros positivos a cada aislado y los sueros que comparten entre cada uno.

De los 200 sueros procesados se obtuvieron 60 sueros positivos a uno o más aislamientos, los cuales se muestran en las tablas 2 y 3 con sus respectivos títulos; predominaron los sueros positivos hacia el AV2-08. La información se dividió en 2 tablas que se muestran a continuación.

Tabla 2. Título de los sueros que fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* hacia uno o más aislamientos virales utilizados.

	TITULOS OBTENIDOS			
	AV1	AV2	AV3	AV4
1	1:64	1:64	1:64	(-)
2	(-)	1:32	(-)	(-)
3	1:64	1:64	1:32	1:32
4	1:32	1:64	1:32	(-)
5	(-)	1:16	(-)	(-)
6	1:16	1:16	1:16	1:16
7	1:16	1:16	(-)	1:16
8	1:16	1:16	(-)	1:16
9	1:32	1:128	1:32	1:32
10	1:32	1:64	1:32	1:32
11	1:32	1:128	1:32	1:32
12	1:16	1:16	(-)	(-)
13	1:32	1:64	1:16	1:32
14	1:16	(-)	(-)	(-)
15	1:32	1:32	1:16	1:64
16	(-)	1:16	(-)	(-)
17	(-)	1:16	(-)	(-)
18	1:32	1:64	1:64	1:16
19	(-)	1:16	(-)	(-)
20	(-)	1:16	(-)	(-)
21	1:32	1:64	1:32	1:16
22	(-)	1:16	(-)	(-)
23	(-)	1:16	(-)	(-)
24	1:16	(-)	(-)	(-)
25	1:16	(-)	(-)	(-)
26	1:16	(-)	(-)	(-)
27	1:16	1:32	1:16	(-)
28	1:16	1:32	1:16	(-)
29	1:16	1:32	1:16	(-)
30	1:16	1:64	1:32	(-)

Tabla 3. Título de los sueros que fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* hacia uno o más aislamientos virales utilizados.

	TITULOS OBTENIDOS			
	AV1	AV2	AV3	AV4
31	1:32	1:64	1:32	(-)
32	1:16	1:64	1:32	(-)
33	1:16	1:32	1:16	(-)
34	1:32	1:32	1:32	(-)
35	1:16	1:32	1:16	(-)
36	1:16	1:32	1:16	(-)
37	1:32	1:64	(-)	1:16
38	1:32	1:64	1:32	(-)
39	1:32	1:32	1:32	(-)
40	1:32	1:32	1:32	(-)
41	(-)	1:16	(-)	(-)
42	(-)	1:16	(-)	(-)
43	1:32	1:32	1:32	(-)
44	(-)	1:16	(-)	(-)
45	1:16	1:32	1:32	(-)
46	1:16	1:32	1:16	(-)
47	1:32	1:32	1:32	(-)
48	1:16	1:32	1:32	(-)
49	1:16	1:32	1:16	(-)
50	1:16	1:32	1:32	(-)
51	(-)	1:16	1:32	(-)
52	(-)	1:16	1:16	(-)
53	(-)	1:32	1:16	(-)
54	(-)	1:16	(-)	(-)
55	(-)	1:512	(-)	(-)
56	(-)	1:512	(-)	(-)
57	(-)	1:512	(-)	(-)
58	(-)	1:512	(-)	(-)
59	1:16	1:512	1:32	(-)
60	1:16	1:512	1:32	(-)

Al obtener los resultados se determinó la frecuencia de los títulos en los sueros positivos hacia cada aislado. El punto de corte de la prueba de IH se da en el título 1:16; se consideró los sueros a partir de este, positivos. El rango de títulos obtenidos para AV1-08, AV3-08 y AV4-11 oscila entre 1:16 hasta 1:64. Para el AV2-08 el rango de títulos se incrementa hasta 1:512. La moda para el AV1-08 fue del título 1:16 (23 sueros). En el AV2-08 se encontró una moda de 1:32 (19 sueros), fue el aislado que presentó títulos mayores de 1:128 (2 sueros) y 1:512 (6 sueros). El AV3-08 presentó una moda de 1:32 (22 sueros). El AV4-11 presentó en su moda títulos de 1:16 (6 sueros). (Tabla 4)

Tabla 4. Frecuencia de los títulos en los sueros que fueron positivos a la presencia de anticuerpos hacia uno o más aislamientos virales.

	AV1-2008			AV2-2008					AV3-2008			AV4-2011		
TÍTULO	1:16	1:32	1:64	1:16	1:32	1:64	1:128	1:512	1:16	1:32	1:64	1:16	1:32	1:64
NÚMERO DE SUEROS	23	16	2	17	19	12	2	6	12	22	2	6	5	1

Para poder obtener los datos de la estadística descriptiva: media, mediana y moda, los títulos de los 60 sueros positivos a alguno de los cuatro aislados se transformaron a log base 2. La media más alta se obtuvo con el AV2-08, la media más baja se obtuvo con el AV4-11. La moda de los títulos se encontró entre 4 y 5 para los cuatro aislados. (Tabla 5)

Tabla 5. Estadística descriptiva, media, mediana y moda obtenida con los sueros positivos.

	AV1-08	AV2-08	AV3-08	AV4-11
Media	3.1	5.05	2.8	0.91
Mediana	5	5	5	0
Moda	4	5	5	4

Las variables bajo estudio no se comportaron de manera normal ni se observó homogeneidad de varianzas. Debido a esto se realizó una prueba estadística no paramétrica de Kruskal- Wallis para comparar los aislamientos virales trabajados. Los datos fueron analizados en $\log^2 + (0.5)$ para que todos los datos se integran a la prueba.

Al analizar se observaron diferencias en el reconocimiento antígeno-anticuerpo entre los distintos aislados virales (AV1-08, AV2-08, AV3-08 Y AV4-11) ($P < 0.0001$). El AV2-08 es el que presenta un mayor reconocimiento de anticuerpos ($Md=173.533$), seguido por el AV1-08 ($Md=119.917$) y el AV3-08 ($Md=118.500$); el que mostró un menor reconocimiento fue el AV4-11 ($Md=70.050$). (Tabla 6)

Tabla 6. Resultados obtenidos mediante la prueba Kruskal- Wallis con los diferentes aislados.

Nivel	Aislamiento Viral	Rango medio
1	AV2-08	173.533
2	AV1-08	119.917
3	AV3-08	118.500
4	AV4-11	70.050

Discusión

La enfermedad de ojo azul (EOA) es endémica de la zona del altiplano mexicano, la zona del Bajío que comprende los estados de Michoacán, Guanajuato, Jalisco es la que ha presentado una mayor incidencia.⁴ Existen diferentes variantes genéticas entre los aislamientos del *Rubulavirus porcino* que generan distintas respuestas antigénicas las cuáles han sido reportadas en diversos estudios anteriores.^{2, 21, 22}

La técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA) se ha usado para evidenciar las diferencias entre aislamientos virales de acuerdo a las respuestas obtenidas por el reconocimiento antígeno-anticuerpo en la confrontación de un suero con antígenos del mismo género aislados de diferentes brotes en diversas granjas. La IHA es una prueba sencilla, de bajo costo y no requiere equipo especializado. La presencia de inhibidores específicos de origen proteico en algunos sueros puede constituir una desventaja para la prueba, para ello se han implementado métodos para reducir su efecto como el tratamiento con caolín, inactivación a 56° C durante 30 minutos y la adsorción con eritrocitos al 5%.^{23, 30, 33}

Los resultados mostraron que el mayor número de sueros positivos obtenidos fue hacia AV2-08 con 56 muestras (28%); seguido por el AV1-08 con 41 (20.5%), el AV3-08 con 39 (19.5%) y el AV4-11 con 12 (6%); El obtener una diferencia en el número de muestras positivas se debe a la utilización de diferentes antígenos, los cuales presentan variaciones antigénicas como lo reportado en 2004.³⁰ En dicho año se analizó la relación entre diferentes aislamientos obtenidos y sueros de cerdos infectados con el *Rubulavirus porcino* bajo condiciones naturales, por

medio de la técnica Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA). Se identificaron anticuerpos de los mismos sueros hacia los diferentes aislamientos. Los resultados mostraron que de 7 aislamientos del *Rubulavirus porcino* se presentó un reconocimiento diferente para cada uno de ellos, concluyendo que hay diferencias en el reconocimiento del mismo suero hacia los diferentes aislamientos, lo cual cumple con la hipótesis de este estudio.³⁰ Los resultados de este trabajo concuerdan con lo anterior ya que en algunos sueros existe una similitud de sueros positivos entre algunos virus mientras que otros se comportan totalmente diferente al no ser detectados.

Los distintos reconocimientos se muestran en los 60 sueros positivos que reaccionaron contra uno o más aislados. La mayoría de los sueros coincidieron en ser positivos con los virus: AV1-08, AV2-08 y AV3-08 mientras que al utilizar el AV4-11 los resultados fueron negativos. De acuerdo a la información analizada en el 2011 por Riaño y colaboradores, los resultados evidenciaron que el virus AV1-2008, con respecto a los virus AV2-2008 y AV3-2008 son antigénicamente idénticos al presentar los siguientes valores de relación antigénica (VRA): el AV3-08 con el AV4-11 presenta un VRA de 0.7. El AV2-08 presenta variación antigénica con el AV3-08 (0.7) Y AV4-11 (0.7). El AV3-08 presenta una relación antigénica de 0.5 con el AV4-11. El AV4-11 muestra diferencias antigénicas, tiene variación antigénica con respecto a AV1-08 (0.025), AV2-08 (0.7) y AV3-08 (0.5). Esos resultados indican que el AV4-11 es el virus que tiene mayor variabilidad antigénica con respecto a los demás aislados. Con los resultados expresados se demostraron los sueros que compartían entre los diferentes aislados virales. El AV1-08 comparte la mayor cantidad de sueros con el AV2-08 (37) y con el AV3-08

(36) mientras que con el AV4-11 comparte la menor cantidad de sueros (12). Esto concuerda con lo mencionado por Riaño acerca del comportamiento de los virus.²⁷

Los resultados de este estudio con relación al número de muestras positivas para cada uno de los diferentes aislados, concuerda con lo reportado por Escobar en el año 2010 donde se evaluó la seroprevalencia del *Rubulavirus porcino* utilizando 3 aislamientos diferentes. Los resultados, al igual que en el presente, mostraron diferencias en el reconocimiento de los sueros para cada uno de los virus; sin embargo cabe señalar que los virus utilizados en este trabajo fueron aislados obtenidos en los últimos años.²⁹

La diferencia encontrada en los títulos de los sueros trabajados pueden deberse a ciertos factores como: toma de las muestras, vacunación, curso de la enfermedad, etc. La mayoría de los títulos encontrados oscilan desde 1:16 hasta 1:64. Los mayores títulos alcanzados fueron de 1:128 y 1:512 obtenidos con el AV2-2008.

Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis se compararon las medias de los diferentes aislados para demostrar la desigualdad entre ellas. Los resultados mostraron diferencias entre las medias de cada aislamiento viral. El AV2-08 es el que presenta un mayor reconocimiento de anticuerpos ($Md=173.533$), seguido por el AV1-08 ($Md=119.917$) y el AV3-08 ($Md=118.500$); el que mostró un menor reconocimiento fue el AV4-11 ($Md=70.050$). Esto comprueba lo citado por Escobar y Riaño en años anteriores encontrando diferencias entre el reconocimiento antígeno-anticuerpo en cada aislado debido a la variabilidad antigénica del *Rubulavirus porcino*.^{27, 29}

Las zonas del Bajío y Centro han sido desde el comienzo de la Enfermedad de Ojo Azul zonas endémicas.; en ellas el monitoreo se han realizado principalmente a través de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) como método de diagnóstico, por ser una prueba confiable, rápida, sencilla y económica, sin embargo también ha sido una herramienta útil para detectar las diferencias entre las variantes antigénicas en esta y otras enfermedades.^{27, 54}

El conocer estas variaciones antigénicas identificadas con esta prueba, servirá para producir inmunógenos que generen una respuesta más completa hacia las variedades que estén circulando por estado o por zona del *Rubulavirus porcino*; así como para utilizarlas en el diagnóstico y evitar dar resultados falsos negativos.

27, 54

Conclusiones

Se logró identificar anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino* en los cuatro diferentes aislados a través de la técnica de inhibición de la hemaglutinación

Se evidencio que dependiendo del virus que se utilice, influirá en el número de muestras positivas que se obtengan, lo que es debido a la variación antigénica de este.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación es una herramienta útil, sencilla, rápida y económica en el laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad de ojo azul.

Al obtener diferentes respuestas entre antígeno- anticuerpo se puede inferir sobre las variaciones antigénicas que existen; esta prueba servirá como una herramienta para producir inmunógenos que generen una respuesta más completa hacia las variedades del *Rubulavirus porcino* que estén circulando por estado o por zona; también podrán ser utilizadas en el diagnóstico para obtener resultados más confiables y evitar resultados falsos negativos.

Referencias

1. Espinosa HS; Solís HM; Garfias Y,^í Mercado GC; Ramírez MH; Zenteno E, *et al.* (2000). Evaluación de semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad de ojo azul. *Memorias del XXXV Congreso de la Asociación de Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*, Acapulco (Guerrero), AC, 43.
2. Reyes-Leyva J, Santos Gerardo, Hernández Jesús, *et. Al.* (2002) Mecanismos Moleculares de la patogenia viral: Estudios con el *Rubulavirus porcino*. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXVI. 100-103.
3. Díaz PP, Ibarra PT, Maldonado MP, Rincón RFJ, Rodríguez GH., Santillán SS. "Correlación clínico patológica del síndrome de ojo azul (SOA). (1989) *Memorias de la XXIV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Morelia (Michoacán) ,67-69.
4. Mercado C, Ramírez H, Martínez O, Carreón R, Herradora M. (1998). Frecuencia de sueros positivos a la enfermedad de ojo azul remitidos al departamento de producción animal: cerdos. *Memorias de la XXXIII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinario Especialistas en Cerdos*. Guanajuato (Guanajuato), 59-61.
5. Correa-Girón P, Martínez LA. Pérez SJ. Coba MA, CENID-M, INIFAP. (1999). Investigación de la transmisión de la enfermedad del ojo azul a cerdos susceptibles a través del consumo de canales infectadas experimentalmente: II Alimentación de cerdos susceptibles con canales de lechones infectados con el

- RVP/LPM. *Memorias del XXXIV Congreso de la Asociación de Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos.* a (Yucatán), AC, 260-262.
6. Hernández J, Reyes-Leyva J, Ramírez H, Valenzuela O, Zenteno E. (2004). Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el *Rubulavirus porcino*. *Veterinaria Mexico*, 35 (1), 65-74.
 7. Stephano HA, Gay GM, Ramirez TC (1988) Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Veterinary Record* 122, 6-10.
 8. Allan GM, McNeilly F, Walker Y, Linné T, Moreno-Lopez, Hernandez –Jauregui P, Kennedy S, Carrol BP, Herron B, Foster JC, Adair B. (1996). A sequential study of experimental porcine paramixovirus (LPMV) infection of pigs: Immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest*, 8, 405-413.
 9. Ramirez-Mendoza H, Hernandez-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-Lopez J, Kennedy S. (1997), Lesions in the reproductive tract of boar experimentally infected with porcine *rubulavirus*. *J. Comp. Path*, 117, 237-252
 10. Stephano HA, Gay GM. (1986) Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea, ojo azul. *Síntesis porcina*, 5(12), 26-39.
 11. Stephano AH, Gay GM. (1983). El síndrome del ojo azul: Estudio experimental. In *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México*, 523–528.
 12. Stephano AH, Gay GM. (1984). Experimental studies of a new viral syndrome in pigs called “blue eye” characterized by encephalitis and corneal opacity. In *Proc Congr Int Pig Vet Soc*, 8, 71.
 13. Stephano AH, Gay GM. (1985). El síndrome del ojo azul en cerdos I. *Síntesis*

Porcina (México), 4, 42–49.

14. Moreno López J, Correa Girón P, Martínez A, Ericsson A. (1986). Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in México. *Arch Virol.*, 91, 221-231.
15. Rima B, Alexander DJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkins MA, Nagai Y, Orbel C, Pringle CR, Ter Mullen, (1995) .V. Family Paramyxoviridae, In: Murphy, FA., Fauquet, CM., Bishop, D.H., Ghabrial, S.A., Jarvis, A, W., Matelli, GP., Mayo M.A. & Summers, M.D. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. EUA: *Springer-Verlag*.
16. Pringle CR. (1998) 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.* 144, 421-429.
17. Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D, D, Melero JA, Nagai Y, Oldstone MBA, Pringle Cr, Rima BK.(2000) Family Paramyxoviridae. In: van Regermortel 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.
18. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. (2000) Bats: Important reservoir host of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19, 531-545.
19. International Committee on Taxonomy of Viruses. Homepage on the internet 2010. Virus Taxonomy. Disponible en:
http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20130431&taxa_name=Porcine%20rubulavirus.

20. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramírez A, Schwartz, KJ, Stevenson GW. (Eds) (2012). *Diseases of swine*. 10th edition. Iowa, USA: Wiley-Blackwell. 42, 2096-2113.
21. Lamb RA, Kolakofsky D (1996). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (Eds). *Fields Virology*. Tercera Ed. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia- Nueva York, 1177-1204.
22. Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linne T (1992). The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polipeptides, P, V and C; the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol*, 73: 1195-1200.
23. Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. (1996) Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet. Mex.*, 27, 257-259.
24. Vallejo V, Reyes Leyva J, Hernández J, Ramírez P, Delanoy P, Zenteno E. (2000). Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem Physiol*, 126, 415-424.
25. Reyes-Leyva J, Hernández Jáuregui P, Montañón LF, Zenteno E. (1993) The porcine paramixovirus LPM specially recognizes sialyl (alpha 2, 3) lactose-containing structures. *Arch Virol.*, 133, 195-200.
26. Stephano AH, Doportó JM, Gay M. (1986). Estudio epidemiológico en dos granjas afectadas por el ojo azul. In *Proc Congr Int Pig Vet Soc*, 9, 456.
27. Riaño, V. (2011). Identificación de variación antigénica del Rubulavirus porcino mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

28. Sánchez Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Doporto JM, Ramírez-MH, Hernández J, Reyes Leyva J, Trujillo ME. (2008). Molecular characterization of hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine Rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening adult pigs. *Res. Vet. Sc*, 85, 359-367.
29. Escobar, A. (2010) Determinación de la seroprevalencia del Rubulavirus porcino en el Estado de México, Jalisco, Guanajuato y Michoacán. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
30. Sánchez I. (2004). Evaluación de las afecciones reproductivas y caracterización del *Rubulavirus porcino*. Tesis de Maestría. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Hernández -Jáuregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Téllez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-López (2001). Uptake of porcine Rubulavirus (LPMV) by PK15 cells. *Arch. Med. Res.*, 32,400-409.
32. Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramirez M H, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E. (1998). Immunity to porcine Rubulavirus infection in adult swine. *Vet Immunol. Immunopath.* 64,367-381.
33. Ramírez, H.(1998) Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul del cerdo a nivel testicular. Tesis de Doctorado. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México.
34. Hernández J, Garfias Y, Nieto A, Mercado C, Montaña LF, Zenteno E. (2001). Comparative evaluation of the CD4+ CD8+ and CD4+ CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet. Immunopathol.*, 79, 249-259.
35. Cuevas JS, Rodríguez –Ropón A, Kennedy S, Moreno López J, Berg M, Hernández-Jáuregui P. (2009). Investigation of T –cell responses and viral

- mRNA persistence in lymphnodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 127, 148-152.
36. Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas-Jiménez JM, Mora-Galindo J, Dueñas-Jiménez SH. (2001). Electrophysiological and morphological alterations in peripheral nerves by the pig paramixovirus of blue eye disease in neonatal pigs. *J. Vet Med. B.*, 48, 477-487.
37. Santos-López G, Hernández J, Espinosa B, Borraz-Argüello MT, Ramírez Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet.*, 36, 119-136.
38. Reyes-Leyva J, García MO, Santos G, Vallejo V, Ramírez MH, Hernández J. (2004). Detección de la viremia en la infección experimental por Rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet.*, 36, 39-47.
39. McNeilly F, Walker I, Allan GM, Foster JC, Linné T, Merza M, Hernandez P, Kennedy S, Adair B. (1997). A Comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of la Piedad Michoacán paramixovirus (LMPV) infection in pigs. *Vet. Diagn. Invest.*, 9, 3-9.
40. Campos HR, Carbajal SM. (1989). Trastornos reproductivos de los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. *Memorias del XXIV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdos*, 162–164.
41. Stephano AH, Hernández D, Pérez C, et al. (1990). Boar infertility and testicle atrophy associated with blue eye paramyxovirus infection. In *Proc Congr Int Pig Vet Soc*, 11, 211.

42. Pérez PF, Stephano HA, Gay GM. (1988). Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. *Memorias del XXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdo, (AMVEC)*, 81-83.
43. Ramirez TCA, Stephano HA. (1982). Histological central nervous system lesions procede by hemmagglutinating virus in naturally infected piglets. Proc 7th Int Congr Pig Vet Soc., 154.
44. Stephano HA, Gay GM.(1985). Síndrome de ojo azul en cerdos. En: Correa GP y Morilla GA (eds), *Encuentro sobre Enfermedades infecciosas del Cerdo*. AMVEC. 1-13.
45. Martínez LA, Pérez SJ, Correa-Girón P, Córdoba LD, Coba AMA. (2006) Utilidad del Rubulavirus porcino en la prueba de IH para el serodiagnóstico de la enfermedad del ojo azul y su comparación con otras pruebas diagnósticas. Memorias de la XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz (Veracruz) México.
46. Rivera-Benítez JF, Martínez BR, García-Contreras A, Escobar LC, Hernández LJ, Ramírez MH. (2010) Assay of humoral immunity to porcine Rubulavirus (PoRV) experimental infection. In: D` Allaire, S. & Friendship, R. (Ed.) *Proceddings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada*.
47. Morilla GA, Diosdado VF, González VD, Ojeda ZP, Mercado PM, Campomanes CA, Hernández JP, Moreno LJ.(2000). 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.

48. Hernández-Jáuregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz-Orea A, Reyes- Leyva J, Hernández-Baumgarten E, Moreno-López J. (1992) Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemaglutinación y ELISA en sueros vacúnales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos. *Vet. Méx.*, 23, 217-222.
49. Martínez LA, Correa-Girón P, Coba AMA, Córdoba LD. (1997). 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).
50. Fuentes, J. (1993). 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. Tesis de licenciatura. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
51. Cuevas RS, Ramírez C, Alvarado IA, Mejía SP, Hernández B, Baule C, Berg M, Ramírez H, Rivera F, Vega MA. (2011). Detección de anticuerpos IgG contra la enfermedad del ojo azul, en cerdos lactantes procedentes de cerdas vacunadas con un antígeno recombinante del Rubulavirus porcino. XLVII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. *León, Guanajuato., 12*
52. Colinas TA, Martínez LA, Correa GP, Fajardo MR. (1987). Curva de crecimiento del paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán en la línea

celular PK-15. *Memorias del XXII Congreso de la Asociación de Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Acapulco (Guerrero).*

53. Leguizamo A. (2000) Determinación de los títulos de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de ojo azul en animales para abasto procedentes del bajío de la República mexicana. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
54. Juárez, G. (2013). Variación antigénica de diferentes aislamientos de influenza porcina en México. Tesis de Licenciatura. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México.
55. Hernández-Jáuregui P, Ramírez MH, Mercado GC, Moreno-López J, Kennedy S. (2004). Experimental porcine *Rubulavirus* (La Piedad-Michoacán virus) infection in pregnant gilts. *J. Comp. Path.*, 130, 1-6