



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL RUBULAVIRUS PORCINO DE OJO
AZUL A PARTIR DE MUESTRAS SEROLÓGICAS PROCEDENTES DEL ESTADO DE
MICHOACÁN, MEDIANTE LA TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN
UTILIZANDO DIFERENTES ANTÍGENOS**

TESIS

Que para obtener el título de

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ADRIANA BERENISE OLVERA GARCÍA

Asesores

M en C María del Carmen Mercado García

M en C Rosalba Carreón Nápoles

Ciudad Universitaria Cd. Mx. 2016



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.

DEDICATORIA

A mi madre, Martha por darme las bases para elegir y enseñarme directa e indirectamente

lo que quiero para mi vida.

A mis hermanos, César por marcar el camino correcto por el que debía andar y mostrar la

inspiración necesaria para seguirlo, a Fernando por mostrar que siempre se puede ir más

allá de lo imaginado.

A mis abuelos, tíos y primos, por darme el sentido de pertenencia necesario para recordar

de dónde venimos y sustentar hacía donde nos dirigimos, por ser el conjunto de personas

que convive, se respalda, se cuida, se protege y demás, con un objetivo en común, por

ejemplificar a la perfección la definición de FAMILIA.

A mis amigos, por ser y estar en cada una de las etapas de mi vida, por ganarse día a día

mi confianza, admiración y respeto, tengo a los mejores.

AGRADECIMIENTOS

A todos los que contribuyeron, desde la mínima aportación y en su propio ámbito, para la culminación de este trabajo, por su enseñanza, esmero, dedicación y paciencia, aunque en algún momento se veía lejana la meta, jamás dejaron de confiar en mí.

CONTENIDO

| | Página |
|--------------------|--------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| HIPÓTESIS | 20 |
| OBJETIVO | 20 |
| MATERIAL y MÉTODOS | 21 |
| RESULTADOS | 24 |
| DISCUSIÓN | 28 |
| CONCLUSIONES | 33 |
| REFERENCIAS | 34 |

RESUMEN

OLVERA GARCÍA ADRIANA BERENISE. Detección de anticuerpos contra el Rubulavirus porcino de ojo azul a partir de muestras serológicas procedentes del estado de Michoacán, mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación utilizando diferentes antígenos. (Bajo la dirección de: M en C María del Carmen Mercado García y M en C Rosalba Carreón Nápoles)

En 1980, apareció en la Piedad Michoacán, un padecimiento denominado “síndrome del ojo azul o cerdos zarcos” caracterizado por encefalitis en lechones de entre 4 y 10 días de edad, que presentaron un cuadro con sinología nerviosa (incoordinación, temblores musculares, postración, movimientos de carrera y opacidad de la córnea) y alta mortalidad. De estos animales se recuperó un virus hemoaglutinante con características similares a los paramixovirus, llamándose inicialmente Paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán (LPM), y posteriormente reclasificado como Rubulavirus porcino de Ojo Azul (RVP). Se ha reportado que existen diferencias genéticas en distintos aislados del RVP, lo que podría generar distintas respuestas antigénicas. El objetivo del presente estudio fue la detección de anticuerpos contra el Rubulavirus Porcino mediante la técnica: Inhibición de la Hemoaglutinación en 167 sueros procedentes de Michoacán en 2013, confrontándolos con 3 diferentes aislamientos virales (AV 1, AV 2 y AV 3), con el fin de determinar si existen diferencias en la identificación y títulos de anticuerpos en cada suero hacia los aislamientos utilizados. Los virus fueron replicados en cultivo de la línea celular VERO. Se encontró que 78% de las

muestras analizadas fueron positivas para el AV 1, 93% para el AV 2 y 66% para el AV 3. El análisis estadístico demostró que existe diferencia significativa del AV 3 para con los demás aislamientos. Es importante seguir realizando estudios por estado o por área geográfica que evidencien la variabilidad antigénica en este virus, ya que es continuo su cambio para la actualización de los antígenos de referencia y los inmunógenos utilizados para el control de la enfermedad.

Introducción

Antecedentes

En 1980, en La Piedad Michoacán, se observó un padecimiento denominado “síndrome del ojo azul o cerdos zarcos” (Campos, 1981); en mayo del mismo año, se presentó un brote de encefalitis en lechones, de entre 4 y 10 días de edad que duró 9 semanas. Murieron 600 lechones aproximadamente, al presentar un cuadro con signología nerviosa: incoordinación, temblores musculares, postración, movimientos de carrera y opacidad de la córnea. De estos animales se recuperó un virus hemoaglutinante que producía efecto citopático con formación de sincitios en cultivo de riñón de cerdo (PK-15) (Stephano, 1981). En el transcurso de ese año, la enfermedad afectó granjas próximas en los estados de Guanajuato, Jalisco y Michoacán, y para 1983 se observaron brotes en Hidalgo y Nuevo León (Stephano, 1983).

No fue posible determinar cómo fue el brote inicial ni el origen del mismo, pues en La Piedad Michoacán se da entrada de cerdos procedentes de otras zonas porcícolas del país, así como de Estados Unidos y Canadá, además de la compra de numerosos biológicos y semen de EU (Stephano, 1983).

En 1984 se aisló otro virus con propiedades aglutinantes, similar a los paramixovirus, a partir de cerdos en engorda, que también mostraban signos nerviosos y opacidad de la córnea (Martínez, 1985). Para 1986, ambos virus recuperados se ubicaron dentro de la familia Paramixoviridae, el último fue llamado Paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán (LPM) (Moreno, 1986).

Desde 1992, la Enfermedad de Ojo Azul (EOA) es considerada una de las cinco enfermedades más importantes de los cerdos en México, ya que causa pérdidas anuales de alrededor de \$20 millones de dólares norteamericanos (Flores, 1992).

Esta enfermedad no se ha reportado fuera de México, se presenta principalmente en el centro del país con brotes esporádicos en el resto del territorio nacional (Mercado, 2000; Kirkland, 2006).

Agente etiológico

Los estudios clínicos, patológicos y virológicos, indicaron que la enfermedad es causada por un virus perteneciente al grupo de los paramixovirus (Stephano, 1988) por su similitud genómica con los virus de la parotiditis humana (VPH), los de la parainfluenza humana 2 y 4 y el virus 5 de simio (Sundqvist, 1990). El virus de la EOA se clasificó en el orden de los Mononegavirales, familia Paramixoviridae, subfamilia Paramixovirinae, genero Rubulavirus, especie Rubulavirus Porcino (RVP) (Rima, 1995; Mayo, 2002).

El patrón de proteínas es similar al virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la Parainfluenza bovina 3 (PIV-3) y el Sendai virus (Rima, 1995). No se ha encontrado relación serológica con otros paramixovirus (Moreno, 1986).

Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos, la mayoría esféricos de 180 a 300 nm de diámetro, formados por una nucleocápside helicoidal protegida por una envoltura lipoprotéica con prolongaciones de 8-12 nm, correspondientes a las glicoproteínas HN y F, responsables de las actividades hemoaglutinantes, hemolítica, de neuroaminidasa y formadora de sincitios

(Moreno, 1986; Reyes, 1999). También tiene la capacidad de hemoadsorber glóbulos rojos de pollo, cuyo, bovino, cerdo, caballo, conejo, oveja, cabra, rata, pavo y humano del tipo ABO, así como de producir elución espontánea. El virus crece en una gran variedad de tipos celulares, formando sincitios en algunos de ellos, y prefiere el cultivo celular a los embriones de pollo. Se ha observado que el efecto citopático *in vitro*, consiste en vacuolización, formación masiva de sincitios y destrucción de la monocapa celular en 16 horas (Moreno, 1986).

Su genoma está constituido por ARN y está dividido en 6 genes que codifican 10 proteínas con funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas; cada gen codifica una proteína, excepto el gen F que codifica el polipéptido F0, que se divide por una proteasa celular en las proteínas F1 y F2, además del gen P que codifica las proteínas P, I, V y C, que se expresan por edición del ARN mensajero F y P (Moreno, 1986; Santos, 2004).

El RVP está conformado estructuralmente por las proteínas:

- Hemaglutinina-neuroaminidasa (HN), que forma parte de la envoltura viral, se ha implicado en el reconocimiento y enlace con gran afinidad a las estructuras celulares que contienen ácido siálico, esto es constante en los diferentes paramixovirus (Zenteno, 1998).
- Proteína de fusión (F): responsable de la fusión de las membranas celular y viral, la lisis de eritrocitos, así como la formación de sincitios en cultivos celulares.
- Fosfoproteína (P): involucrada en la replicación viral.
- Nucleoproteína (NP): que al parecer solo posee función estructural (1990).

- Proteína de matriz (M): organiza a la nucleocápside en las zonas de la membrana celular en donde abundan las glicoproteínas virales y también se le implica en la regulación de la síntesis del ARN.
- Proteína de alto peso molecular (L) (Sundqvist, 1990; Ramírez, 1997; Santos, 2004).

Las proteínas NP, P y L, se encuentran asociadas al genoma viral; mientras M, HN y F se localizan en la membrana viral, las últimas dos son transmembranales. La mayor parte de ellas está expuesta al exterior del virión y su pequeño segmento intraviral hace contacto con la proteína M. Las unidades de NP se unen mediante interacciones hidrofóbicas al ARN para formar la nucleocápside; cada NP se enlaza a 6 nucleótidos y no se separan durante la replicación ni la transcripción. A la nucleocápside se asocian cerca de 50 complejos con actividad de ARN polimerasa, cada uno formado por 3 unidades P y 1 de L, siendo esta última el componente catalítico de la polimerasa, además de relacionarse con la transcripción y replicación (Lamb, 1996; Kolakofsky, 1998). Se identificaron otras dos proteínas no estructurales, V y C, codificadas por la edición del gen P, que al parecer participan en la regulación de la transcripción y replicación viral (Berg, 1992).

Ciclo viral

El primer paso para la infección viral, es el reconocimiento de las estructuras celulares que actúan como receptores específicos; esta actividad determina el tropismo tisular y lo realizan las proteínas de adhesión viral. En los paramixovirus, como ya se mencionó, el reconocimiento de los receptores de la célula es realizado por la proteína NH, glicoproteína que reconoce específicamente al ácido

siálico, el cual inhibe su actividad hemoaglutinante; este ácido (resultante del metabolismo del ácido neuramínico) es expresado ampliamente en células animales y está regulada por el desarrollo (Reyes, 1997). Esta unión da el tropismo del virus a estructuras con este componente, contenido en complejos como los gangliósidos, presentes en el epitelio bronquial, lo que explica las manifestaciones neurológicas y pulmonares de la infección. La alta tasa de gangliósidos y carbohidratos expresados en recién nacidos da la relación edad-susceptibilidad para la infección del RVP (Reyes, 1993). Luego del acoplamiento se da un cambio conformacional de HN que activa a F, exponiendo su dominio altamente hidrofóbico para la fusión de las membranas celular y viral, lo que provoca la liberación de la nucleocápside al citoplasma. El virión trae integrada su propia polimerasa, al liberarse el ARN viral se sintetiza una copia completa del genoma; por otro lado, se inicia la síntesis de los ARN mensajeros, que codifican a cada uno de las proteínas virales. Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, donde las proteínas 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 se sintetizan en el retículo endoplásmico y son modificadas en el aparato de Golgi, para ser expresados en la cara externa de la membrana, en sitios de contacto estrecho con M, su afinidad con NP es determinante para el ensamble del virión liberado de la célula (Lamb, 1996).

La replicación se realiza en el citoplasma, formando aglomerados de nucleocápsides observadas como grandes inclusiones citoplasmáticas en las células infectadas (Hernández, 2004).

El material genético viral también puede pasar directamente de una célula infectada a una vecina sin necesidad de la liberación de viriones, debido a la fusión de las membranas celulares realizada por las proteínas HN y F. De esta manera se originan las células gigantes multinucleadas o sincitos, características de las infecciones por paramixovirus (Lamb, 1996).

Respuesta inmune

La respuesta inmune frente al virus se inicia con la producción de interferón- α por las células infectadas, lo que aumenta el potencial lítico de las células NK y la expresión del MCH-I facilitando la acción de los linfocitos T citotóxicos CD8, importantes en la erradicación de las infecciones virales. El resultado de la actividad citotóxica de las diversas células efectoras (NK, linfocitos CD8 o CD4) sobre las células infectadas, provoca que se liberen antígenos virales endógenos. Estos pueden ser fagocitados, procesados y presentados como antígenos exógenos por el MCH-II. Este proceso induce la proliferación de linfocitos cooperadores CD4+, los cuales responden con la producción de citocinas como la IL-2 e interferón- γ por parte de los Th₁ o IL-4 e IL-10 a partir de los Th₂ (Abbas, 2004). Parte de la inmunidad adaptativa frente a las infecciones víricas depende de los anticuerpos que bloquean la unión del virus a la célula huésped y su entrada a ella, así como de los linfocitos T citotóxicos (LCT) que combaten la infección mediante la destrucción de las células infectadas (Abbas, 2004).

Durante la infección, los virus de la familia Paramyxoviridae producen anticuerpos tanto contra las proteínas externas como internas; sin embargo, solo los anticuerpos contra las proteínas HN y F han demostrado ser importantes en la obtención de una respuesta neutralizante del virus. La HN induce anticuerpos

neutralizantes más eficientes, aunque la mejor respuesta protectora se consigue si los anticuerpos están dirigidos hacia ambas proteínas (Norby, 1975; Paterson, 1987; Spriggs, 1988).

La respuesta humoral contra el RVP se inicia con la producción de anticuerpos desde la primera semana post infección. Durante las primeras 4 semanas los títulos se incrementan entre 4 y 6 log₂ (unidades logarítmicas en base 2) y a partir de la quinta semana llegan a incrementarse hasta 8.5 unidades logarítmicas (Hernández, 1998). En animales infectados adultos se observan altos títulos de anticuerpos neutralizantes que inhiben la hemoaglutinación. Los anticuerpos reconocen específicamente las proteínas HN, M y NP del Rubulavirus porcino. Los anticuerpos son capaces de reconocer al virus en forma libre o células infectadas por el virus; ellos controlan las infecciones neutralizando las partículas virales o produciendo la muerte de las células infectadas a través de citotoxicidad mediada por complemento o por células citotóxicas (Zenteno, 1998; Hernández 1998).

La producción de anticuerpos contra las proteínas NP y M coincide con el momento en que los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzan sus niveles más elevados, lo cual ocurre al mismo tiempo en que la respuesta linfoproliferativa se encuentra en su máximo nivel. Esto sugiere que el incremento de los títulos de anticuerpos ocurre por el reconocimiento de proteínas internas del virón, evento que es posiblemente mediado por los mecanismos de procesamiento antigénico y de cooperación entre linfocitos T y B (Hernández, 1998). Esto es acorde al desarrollo de la respuesta anticuerpos dependientes de células T contra la NP en diversas infecciones por paramixovirus (Ray, 1990; Lamb, 1996).

Durante el desarrollo intrauterino, las inmunoglobulinas no cruzan la placenta por lo que los lechones no poseen γ -globulinas al nacimiento (Hammerberg, 1989). La supervivencia depende directamente de la adquisición de la inmunidad materna a través de la leche y el calostro (Bohl, 1975; Saif, 1994). La protección por la inmunidad materna está mediada por ciertos factores, incluida la inmunidad humoral sistémica específica, que implica IgG e IgA maternas transferidas en calostro y absorbidas dentro de las primeras 36 horas de vida (Leece, 1973; Xu, 2007). El aumento en la calidad del calostro, es decir la cantidad de inmunoglobulinas presentes en éste, depende de la estimulación de la inmunidad sistémica (Donovan, 1994; Sinkora, 2009). En un trabajo realizado por Martínez, en 1986, se observó que durante una infección, los títulos más altos de anticuerpos correspondieron a las madres y a los lactantes. Las madres que padecieron la infección desarrollaron inmunidad y transfirieron buena cantidad de anticuerpos a su descendencia, permanecieron las primeras semanas de vida y disminuyeron al mínimo entre las 8 y 12 semanas. En el ciclo productivo, los cerdos que enfermaron entre las 10 y 13 semanas de edad y entre las 8 y 12 semanas tuvieron los títulos más bajos de anticuerpos contra el virus LPM (Martínez, 1986).

La inmunidad humoral es de gran importancia en el control de la diseminación sistémica de la infección ya que títulos elevados de anticuerpos coinciden con la desaparición de la viremia (García, 1999). En la infección natural se han encontrado anticuerpos hasta 18 meses después de presentados los signos clínicos de la enfermedad (Stephano, 1988).

Se ha observado que los anticuerpos séricos con actividad neutralizante, solo protegen la infección por virus de Parainfluenza (paramixovirus) en el tracto respiratorio inferior, mientras que la protección en el tracto respiratorio superior depende de la producción de anticuerpos secretorios en las mucosas (Ray, 1988).

Los lechones son protegidos por la ingestión de calostro de la madre previamente expuesta al virus; de las hembras que entraron en contacto en el tercer tercio de gestación, nacen lechones muertos o débiles (Martínez, 1985).

Transmisión

La transmisión se lleva a cabo de un individuo a otro por vía aérea, multiplicándose inicialmente en la mucosa nasofaríngea y en el tejido linfático asociado, para diseminarse por vía aérea a pulmones y vía sanguínea a todo el organismo (Stephano, 1988; Allan, 1996; Ramírez, 1998). El virus se transporta asociado a eritrocitos y monocitos, permitiéndole replicarse en sitios inmunoprivilegiados de órganos linfáticos y reproductores (Hernández, 1998; García, 1999; Ramírez, 1997).

Su ingreso al sistema nervioso central parece ocurrir a través de las terminaciones del nervio olfatorio, para dirigirse al hipocampo, tallo cerebral y cerebelo para replicarse (Allan, 1996; Ramírez, 1997).

Signos clínicos

Los signos clínicos son variables y dependen principalmente de la edad del cerdo. Los animales menores a 15 días son más susceptibles y en ellos aparecen súbitamente: postración, depresión o desordenes nerviosos; también se pueden

encontrar fiebre, dorso arqueado, que puede estar acompañado por diarrea o constipación, con el avance progresivo de los signos nerviosos; ataxia, debilidad, rigidez de miembros principalmente los posteriores, temores musculares y posturas anormales (Stephano, 1988).

El signo patognomónico de la enfermedad es la opacidad corneal; del 1 al 10% de los cerdos afectados con esta, ya sea bilateral o unilateral, puede no tener presente ningún otro signo; es común que el problema se resuelva espontáneamente. Solo del 1 al 4% de los cerdos mayores de 30 días de edad son afectados y la mortalidad es muy baja (Stephano, 1988).

En animales de 3 meses se desarrolla signología respiratoria, fiebre, conjuntivitis y desorden nervioso (Moreno, 1986).

La manifestación de estos signos nerviosos se observa en animales de 15 a 45kg, pero solo en granjas con mala administración, en sistemas de engorda y la continua recepción de animales de diversas procedencias (Stephano, 1988).

Las hembras jóvenes y cerdos adultos ocasionalmente desarrollan opacidad corneal; en servicio se incrementa el número de animales que retornan a estro, duran de 6 a 8 meses. Durante el brote se incrementan los mortinatos y los fetos momificados (Stephano, 1988).

En verracos infectados se observa fiebre (40-41°C), anorexia, constipación, conjuntivitis y aumento en el tamaño testicular, ya sea uni o bilateral (Solís, 2007).

Lesiones

Como ya se mencionó, la lesión característica de la enfermedad es la opacidad corneal. También se observa edema corneal en cerdos destetados o en engorda y

la formación de úlceras o vesículas en la parte externa de la córnea. En algunas ocasiones también se observa queratocono. La córnea se puede observar de 1 a 3 veces mayor de su espesor normal. Se sugiere que la opacidad corneal se deba a una reacción inmunológica de hipersensibilidad de tipo 3 por deposición de complejos inmunes (Moreno, 1986; Stephano, 1988).

A la necropsia se puede observar a los lechones emaciados, con congestión pulmonar, neumonía en bordes de ventrales de los lóbulos craneales pulmonares, falta de colapso pulmonar, distensión gástrica y acumulación de leche, distensión de la vejiga urinaria debido a la acumulación de orina y leve presencia de fluido con fibrina en la cavidad peritoneal (Stephano, 1988).

La histología del cerebro de animales enfermos muestra meningoencefalitis con marcada infiltración perivascular de linfocitos, gliosis y necrosis. Neuronofagia, necrosis neuronal y de la glía, meningitis y coronoiditis. Las áreas más afectadas son el tálamo, mesencéfalo y corteza cerebral. También se observa neumonía intersticial, afecta el lóbulo craneal y ventral (Moreno, 1986).

Los verracos afectados presentan lesiones testiculares de diferente tipo y grado, dependiendo de la evolución clínica de la enfermedad. El tejido intersticial puede presentar hiperplasia de células de Leydig, infiltración de células mononucleares, hialinización de las paredes vasculares y fibrosis. Se puede presentar ruptura de las paredes epiteliales, lo que conduce a fuga de espermatozoides en los espacios intertubulares, infiltración de células inflamatorias y macrófagos; en consecuencia, la fagocitosis de los espermatozoides (Stephano, 1988; Ramírez, 1997).

Diagnóstico

De forma clínica podemos sospechar de la EOA, si observamos signos nerviosos y respiratorios en lechones, fallas reproductivas en hembras y machos; así como opacidad corneal en cualquier edad, por lo que se puede realizar un diagnóstico diferencial con la Enfermedad de Aujeszky (Morilla, 1995).

Debido a la variedad de signos asociados con la infección por RVP, se dificulta la realización del diagnóstico. Las pruebas para identificar al agente consisten en la técnica de aislamiento del virus en cultivo celular (VERO: riñón de mono verde africano, PK-15: riñón de cerdo, ST: testículo de cerdo, MDBK: riñón bovino Badin Marb y BHK-21: riñón de hámster lactante) evidenciado por la hemoaglutinación e inmunofluorescencia directa e indirecta, la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RTP-PCR) y RTP-PCR anidada (Martínez, 1986; Allan, 1996; Ramírez, 1996; McNeilly, 1997). Para el diagnóstico serológico, la prueba más utilizada es la inhibición de la hemoaglutinación, la cual es rápida y con buena sensibilidad (Nordengrahn, 1999). La presencia de inhibidores inespecíficos 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 heparina y $MgCl_2$ (McNeilly, 1997; Nordengrahn, 1999), así como caolín, la inactivación a 56° durante 56 minutos y la adsorción con eritrocitos de bovino al 5% (Martínez, 2006). Algunas otras pruebas para la detección de anticuerpos son: ELISA de bloqueo basada en un anticuerpo monoclonal contra la proteína HN, que tiene un 99% de sensibilidad y 97% de especificidad, la inmunofluorescencia indirecta y la virusneutralización, pero estas últimas son lentas y costosas (Nordengrahn, 1999).

Prevención y Control

La mejor manera de prevenir son los programas de salud del hato, siendo el método más seguro para evitar la introducción de enfermedades a la granja. Los nuevos cerdos deberán ser separados de los sanos y puestos en cuarentena antes de su introducción. Las medidas de bioseguridad proporcionan un seguro contra la infección; la eliminación de la EOA de los hatos infectados se ha logrado mediante prácticas de manejo, algunas de ellas son: barda perimetral, separación de áreas de vestidores y regaderas, control de fauna nociva: eliminación de residuos del sistema y de cerdos muertos, control de la circulación del personal, visitantes y vehículos (Kirkland, 2006). La eficacia de estos procedimientos debe ser monitoreada por las pruebas serológicas y la introducción de animales centinelas (cerdos seronegativos a la EOA) para confirmar la eliminación de la enfermedad (Leguízamo, 2000).

Los perfiles serológicos en las piaras porcinas han sido un método útil para determinar el patrón de infecciones dentro de los rebaños y el efecto de las intervenciones específicas sobre la circulación del virus, los cuales ayudan al control y manejo de la enfermedad dentro de las producciones porcinas. Dentro de las piaras, el perfil serológico se realiza mediante el muestreo de 10 cerdos por estrato (Edad: 15 días y 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses, hembras jóvenes y paridades 1, 2, 3, 4 y 5) (Martínez, 1986; Rosales, 1987; Morilla, 1995).

Una medida de control es el uso de terapia con antimicrobianos para prevenir infecciones secundarias por agentes oportunistas (Kirkland, 2006).

Para prevenir la enfermedad se han desarrollado vacunas:

Vacunas preparadas a partir de cerebros de cerdos que mueren de forma aguda de la enfermedad, su eficiencia se desconoce y la vacuna inactivada preparada con virus cultivado en líneas celulares de origen porcino (PK-15) bajo condiciones experimentales (Zamora, 1990).

En 1993, Fuentes reportó una vacuna preparada con virus inactivado, la cual protegió al 71% de los cerdos a través del calostro (Fuentes, 1993).

En un estudio realizado por Diosdado en 2004, se sugirió la posible asociación de la EOA con otros patógenos (PRRS, enfermedad de Aujeszky, Influenza porcina, gastroenteritis transmisible, parvovirus porcino, *Leptospira interrogans*); concluyendo que la EOA y los patógenos existentes en las piaras, no son reflejo de sinergia; sin embargo, es un reflejo de la situación sanitaria de las granjas en las que estaba presente la EOA. Por lo consiguiente, la infección por OA se ve agravada por la presencia de otros patógenos (Diosdado, 2004).

Variabilidad antigénica

Se ha reportado previamente que se están presentando eventos de variabilidad genética y antigénica en diferentes aislados del virus de Ojo Azul, sobre todo porque la proteína HN es el elemento más antigénico y la presión de selección puede originar cambios tanto en la superficie expuesta como en las diversas propiedades biológicas de esta proteína multifuncional (Leguizamó, 2000). Las diferencias genéticas entre los aislamientos del RVP podrían generar distintas respuestas antigénicas. En un estudio realizado en el 2004, se analizó la relación entre diferentes aislamientos y sueros de cerdos infectados bajo condiciones naturales, por medio de la prueba de IHA. Los resultados mostraron que de 7

aislamientos del RVP, se presentó un reconocimiento variable para cada uno de ellos, se concluyó que hay diferencias entre dichos aislamientos al no ser reconocidos de la misma forma por los anticuerpos de los sueros analizados (Sánchez, 2004).

Desde el primer aislamiento de Rubulavirus porcino, se ha encontrado una variabilidad del gen HN respecto a diferentes aislamientos obtenidos desde 1990 hasta el 2015. Los estudios de biología molecular y de secuenciación del gen HN de distintos aislamientos de este virus han permitido identificar diferentes variantes. Hasta el momento se encuentran descritas 18 secuencias diferentes del gen HN del RVP, comparadas al primer virus aislado en La Piedad, Michoacán en 1984 (Sánchez, 2008; Riaño 2015).

La comparación de las 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. Ninguna de las substituciones 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 (Sánchez, 2010; Riaño 2015).

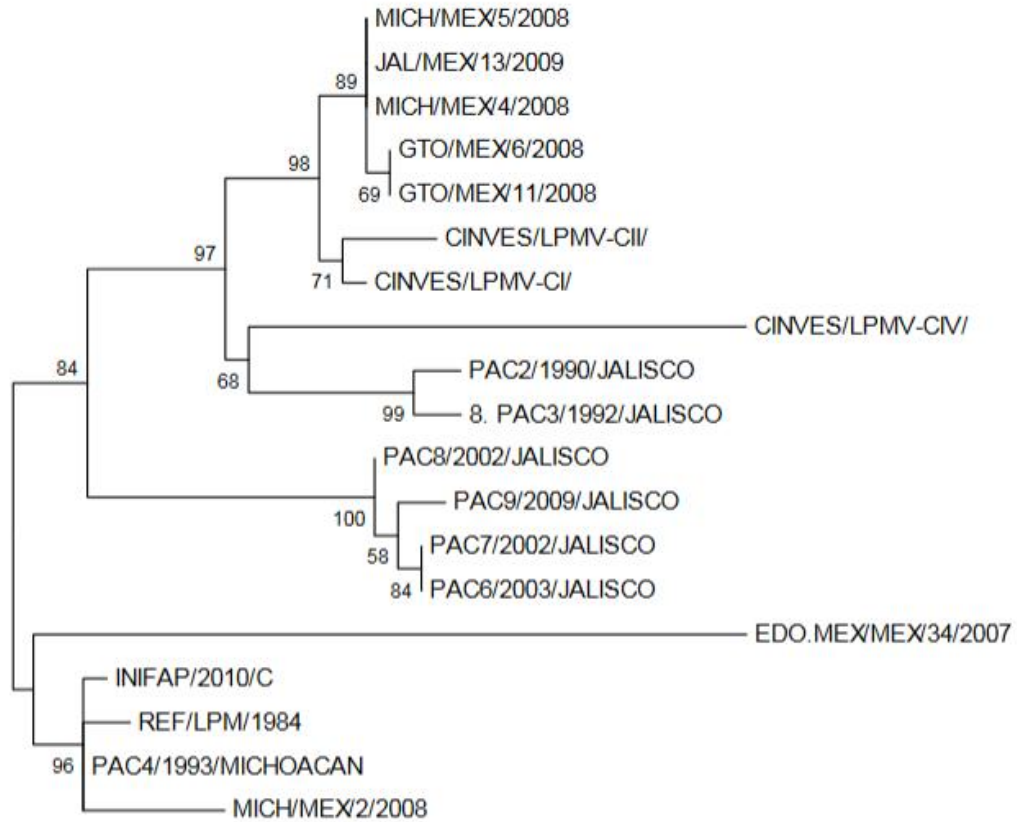


Imagen 1. Árbol filogenético elaborado a partir de los aminoácidos del gen HN de los Rubulavirus porcino estudiado (Riaño, 2015).

Justificación

Dependiendo el subtipo viral que se encuentre en una granja y de las diferencias genéticas entre virus, se podrá generar una signología clínica que pudiera ser nerviosa, respiratoria o reproductiva o alguna combinación de las mismas, por lo que es importante el desarrollo de pruebas de laboratorio y de biológicos más sensibles y específicos para el control de la enfermedad. Ya que los resultados de las pruebas de laboratorio que detectan anticuerpos pueden ser menos específicas cuando se confrontan con un subtipo viral diferente o heterólogo, se podría estar ocasionando la emisión de resultados falsos negativos, debido al virus utilizado para confrontar los sueros de animales sospechosos. Además, la eficiencia de los biológicos disponibles en el mercado, dependerá del antígeno que contenga y de la capacidad de éste para generar anticuerpos que protejan contra virus heterólogos. Por esto, es importante identificar las posibles variaciones que pudieran estar ocurriendo en los diversos estados el país (por zona geográfica), para hacer más sensibles y específicas las pruebas diagnósticas y generar biológicos que protejan contra virus heterólogos.

HIPÓTESIS

Debido a la variabilidad antigénica entre los aislamientos de *Rubulavirus porcino*, se espera que los sueros analizados, procedentes de Michoacán, presenten diferencia en los títulos de anticuerpos, hacia uno o varios de los aislamientos utilizados como antígeno en la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación.

OBJETIVO

1. Detectar la presencia de anticuerpos frente a diferentes aislamientos virales del *Rubulavirus porcino* de sueros procedentes del estado de Michoacán.
2. Determinar si existen diferencias en la identificación y títulos de anticuerpos en sueros de animales positivos al utilizar diferentes aislamientos del *Rubulavirus porcino* en los sueros procesados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se emplearon 167 muestras de cerdos del banco de sueros del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC) de la FMVZ de la UNAM, obtenidos desde el año 2013, procedentes de varios municipios del Estado de Michoacán. Los sueros permanecieron congelados hasta su procesamiento mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IHA).

Virus

Se utilizaron 3 aislamientos virales (AV) (cuadro 1) de diferente procedencia, los cuales han servido en estudios previos (Sánchez, 2004; Riaño, 2015), mostraron que antigénicamente los AV utilizados presentan diferencias en diversa proporción en el reconocimiento de anticuerpos.

Cuadro 1. Aislamientos Virales utilizados en el experimento

| Aislamiento | Muestra origen | Procedencia | Año de aislamiento |
|-------------|--|----------------|--------------------|
| 1 | Encéfalo de lechón con tremor y opacidad de córnea | Michoacán | 2008 |
| 2 | Encéfalo de cerdos de 3 meses con opacidad de córnea | Guanajuato | 2008 |
| 3 | Se desconoce | Edo. de México | 2007 |

Cultivo celular

Se propagó la línea celular VERO (riñón de mono verde africano), utilizando como medio de mantenimiento DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino. Una vez que el monoestrato alcanzó confluencia del 80%, se infectó por separado con cada uno de los aislamientos, se mantuvieron con DMEM sin ninguna otra suplementación en incubación a 36°C durante 72 h. Estos aislamientos no provocaron efecto citopático apreciable, por lo que se tituló por su capacidad aglutinante, utilizando eritrocitos de bovino. Este proceso se repitió hasta que se obtuvieron los lotes de trabajo.

Tratamiento de los sueros

Con el propósito de eliminar proteínas inespecíficas inhibidoras de la hemoaglutinación, los sueros se homogenizaron con caolín y eritrocitos de bovino, se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas; posterior a la sedimentación del caolín y los eritrocitos, se extrajo el suero clarificado para ser trabajado por la prueba de IH, utilizando como antígenos cada uno de los aislamientos previamente descritos (Ramírez, 1998).

Prueba de Inhibición de la hemoaglutinación

Se realizó un ensayo para cada aislamiento viral del cuadro 1.

Los sueros se colocaron en placas de 96 pozos con fondo en U (Nunc), con PBS, a partir del primer pozo se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1:4 hasta 1:512 (Ramírez, 1996). El título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación se expresó como la máxima dilución en la que el suero fue capaz de inhibir la

capacidad hemoaglutinante del RVP. Los sueros se consideraron como positivos a partir de la dilución 1:16 (Ramírez, 1996; Ramírez, 1998).

En cada ensayo se emplearon testigos de prueba: control de virus y control de eritrocitos.

Análisis estadístico

Se realizó estadística descriptiva para los datos obtenidos mediante la prueba de IH, buscando determinar si existen diferencias entre las seropositividades de los sueros para cada uno de los aislamientos virales confrontados. Las respuestas de los títulos de anticuerpos obtenidos por aislamiento viral, se transformaron a Log base 2, para aplicar prueba de χ^2 , posteriormente se convirtieron a anti Log base 10 y se usó la prueba HDS (Diferencia Honestamente Significativa) de Tukey, para comparación de medias.

RESULTADOS

En la Figura 1 aparecen los porcentajes de las muestras que fueron positivas y negativas para cada aislamiento viral del RVP utilizado. Se observa que de las 167 muestras procesadas, para el AV 1, se obtuvieron 36 (22%) negativas y 131 (78%) positivas; para el AV 2, 12 (7%) fueron negativas y 155 (93%) positivas; para el AV 3, 57 (34%) fueron negativas y 110 (66%) positivas. Con el AV 2 se encontró el mayor porcentaje de muestras positivas y con el AV 3 el menor.

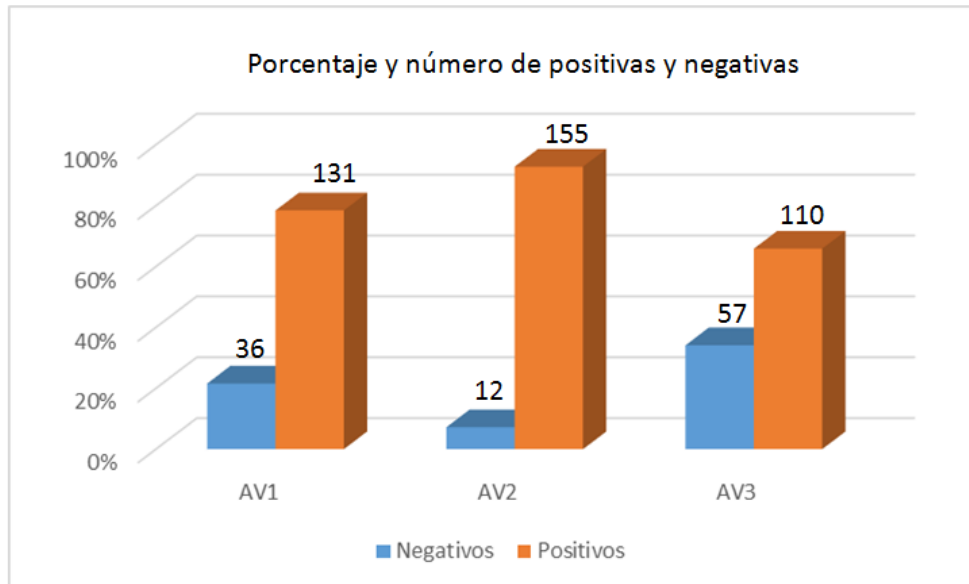


Figura 1. Porcentaje y número de muestras positivas y negativas para los Aislamientos virales 1, 2 y 3.

En la figura 2 se presenta la relación existente en el reconocimiento de las muestras positivas solo hacia un AV, además de aquellas que fueron reconocidas por dos y por los tres AV utilizados. El mayor número de muestras reconocidas por solo un virus fue para el AV 2 con 11 sueros, seguida de 7 para el AV 1 y 2 para el AV 3; mientras que 37 muestras positivas son compartidas por el AV 1 y AV 2; para el caso de AV 2 y AV 3 fueron 21 muestras positivas y 1 muestra coincide entre el AV 3 y el AV 1. Se muestra un mayor reconocimiento por el AV 2: 86 de las muestras son positivas tanto para AV 1, AV 2, como para AV 3.

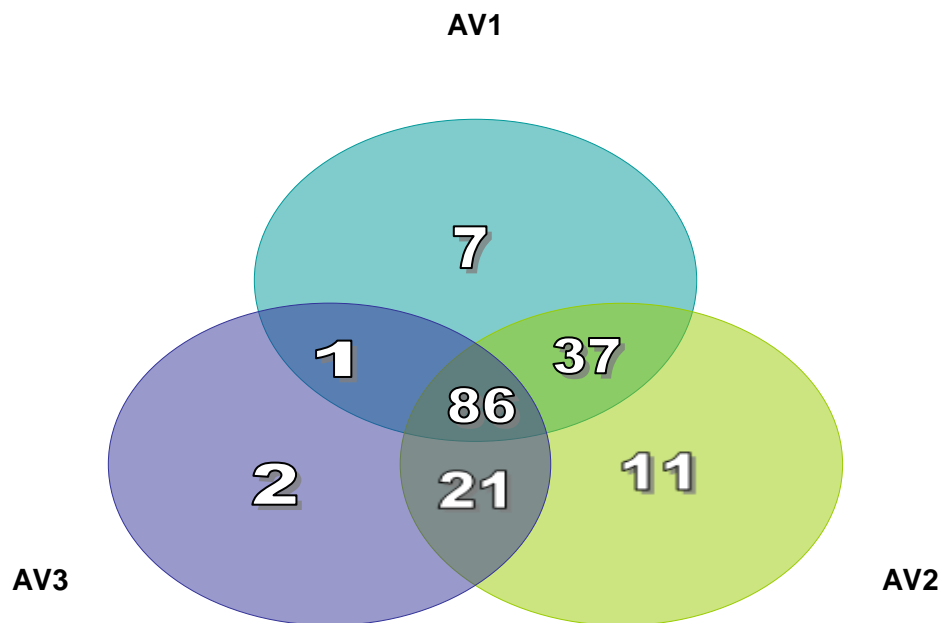


Figura 2. Relación entre el reconocimiento de las seropositividades para los 3 AV.

En el cuadro 2 se observa la estadística descriptiva: moda, mediana y media, obtenida luego de la transformación de los títulos a Log base 2, donde se muestra que para el AV 1 y AV 3 la moda es 2 y para el caso del AV 2 es 5, lo que indica que los títulos de anticuerpos más altos se obtuvieron en los sueros confrontados con este último AV. En cuanto a la mediana, observamos que para el AV 2 es mayor, siendo 5 y para los AV 1 y AV 3 es 4. Las medias resultantes fueron la mayor para el AV 2 (4.52) y la menor para el AV 3 (3.68).

| | AV 1 | AV 2 | AV 3 |
|---------|------|------|------|
| Moda | 2 | 5 | 2 |
| Mediana | 4 | 5 | 4 |
| Media | 4.21 | 4.52 | 3.68 |

Cuadro 2. Estadística descriptiva: moda, mediana y media de los títulos de anticuerpos de los sueros para cada aislamiento.

En la Figura 3 aparece la frecuencia de títulos por AV; se puede observar que la frecuencia más alta corresponde al AV 2 con el título de 1:32, seguida por los AV 1 y 2 con los títulos de 1:256, ambos con 7 muestras positivas.

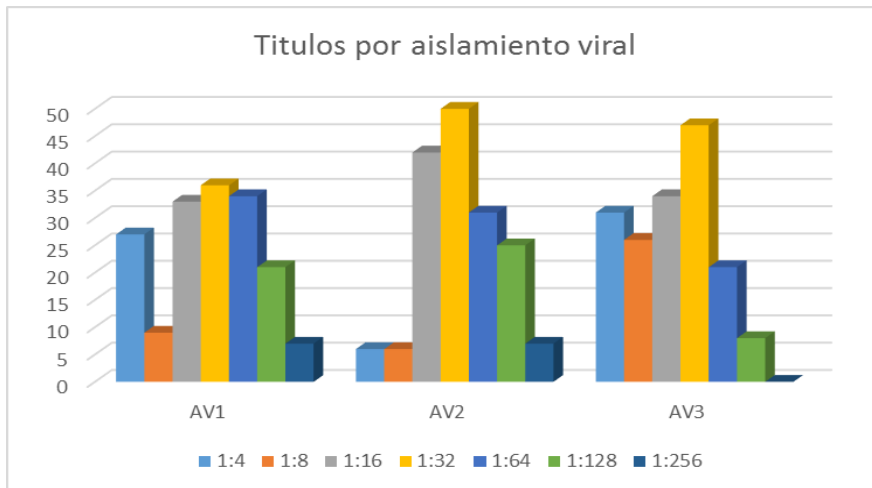


Figura 3. Frecuencia de títulos de anticuerpos por AV.

Al aplicar la prueba de χ^2 , comparando la frecuencia de sueros positivos y negativos entre los 3 aislamientos, el AV 3 es el que muestra mayor diferencia en el reconocimiento entre positivos y negativos con respecto del resto de los aislamientos con una significancia de 0.0001.

Una vez convertidos los datos a antilogaritmo base 10, se realizó una prueba de normalidad, obteniendo una F de 5.5 y una significancia del 0.004, para la posterior aplicación de una prueba de comparaciones múltiples o HDS de Tukey. Esto arrojó que entre el aislamiento 1 y 2 no existe diferencia estadísticamente significativa (0.05), es decir, que es similar el reconocimiento entre las muestras serológicas para los AV 1 y 2, no así para el aislamiento 3, donde se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa (0.001) para con el resto de los aislamientos; por lo que se puede decir que se encontró variación en la identificación de las muestras con el AV 3 con respecto de los demás aislamientos.

DISCUSIÓN

De las 167 muestras serológicas recolectadas del estado de Michoacán para este estudio, obtuvimos un porcentaje de seropositividad de 78% con el AV1, 93% con el AV 2, así como 66% con el AV 3, confirmando la persistencia de la enfermedad en este estado y la circulación además de varios subtipos. Stephano afirmaba desde 1983, que la enfermedad se había mantenido desde 1980 en el centro de México, desde la aparición de los primeros brotes donde se aisló el Paramixovirus de Ojo Azul del estado de Michoacán, Jalisco y Guanajuato (Stephano, 1983); diseminándose rápidamente a los estados de Querétaro, Estado de México y Distrito Federal, debido a la intensa movilización de cerdos, sin embargo, Fuentes, en 1992, mostró a través de evidencia serológica, la presencia de anticuerpos contra el RVP en cerdos reproductores y animales menores a 45 días de edad, en al menos 16 estados de la República Mexicana (Fuentes, 1992). Así mismo, un estudio realizado en 2012 sobre la prevalencia del RVP en Michoacán, demostró la presencia del virus en 20% de los sueros analizados (Escobar, 2010). Sin embargo, para el 2013, Rivera-Benítez estableció a las granjas de la región centro-oeste de México, como una zona endémica de baja virulencia, llegando a una prevalencia del 36% (Rivera, 2013); respaldando los resultados del presente estudio, lo que implica un aumento en la circulación viral de uno o más virus de Ojo Azul. Según un informe sobre salud animal de la SAGARPA en conjunto con la FAO, en 2006, se observa que en el Estado de Michoacán la organización ganadera se encuentra dividida y no cuenta con planes estratégicos para su desarrollo, dando como resultado, el pobre establecimiento de compromisos para

la generación de las condiciones sanitarias competentes (SAGARPA-FAO, 2006), es esta la principal problemática en la ganadería del estado, incluidas la baja calidad genética, malas prácticas de manejo e insalubridad pecuaria (Gob. de Michoacán, 2013). Se ha reportado que las unidades de producción porcina a gran escala, en la zona centro del país, tienen mayor riesgo de presentar enfermedades como el Ojo Azul. Dicho riesgo es inherente al manejo que conllevan estas producciones (Galindo, 2015). La presencia de éste y otros patógenos existentes en las piaras, no es reflejo de sinergia; sin embargo, es un reflejo de la situación sanitaria de las granjas en las que está presente la EOA (Diosdado, 2004). Como se confirma en el último reporte sobre la situación zoonosológica en el país publicado por el SENASICA en 2016, este estado es de los últimos en ser declarados libres en la enfermedad de Aujeszky (DEAR, 2016), lo que indica la pobre eficiencia en las medidas de bioseguridad para impedir la entrada y movilización de las enfermedades en el estado.

La prueba de IHA, utilizada en este experimento, ha servido para realizar una gran cantidad de estudios epidemiológicos, como en el 2011, donde se evaluaron sueros hiperinmunes elaborados en una especie heteróloga al cerdo. De estos se obtuvieron resultados diferentes al confrontar cada uno de los sueros con distintos aislamientos del RVP (Riaño, 2011), lo que evidencia la variabilidad antigénica existente en los diferentes aislamientos donde se usó la técnica de IHA, confirmando que la técnica es confiable para el diagnóstico de la EOA. Además, es útil para otras enfermedades: se utilizó en un estudio de 2010 donde se demostró la presencia de anticuerpos contra el Virus de la Influenza Porcina en

cerdos de la Ciudad de México mediante esta técnica (Carrera, 2012); también se utilizó en 2013 para identificar variaciones antigénicas entre distintos aislamientos de IP en diferentes estados de la República Mexicana, respaldando la seguridad de la prueba (Juárez, 2013).

Se ha analizado 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 (Riaño, 2015). Un estudio similar donde se utilizó la técnica de IHA para identificar diferencias entre los aislamientos virales del Ojo Azul, permitió conocer que los virus presentan diferencias entre ellos y mediante esta técnica se puede identificar el virus que está circulando en ese momento en la granja; a su vez se sugirió la presencia de variantes virales (Sánchez, 2004). Esto coincide con lo encontrado en este estudio ya que se observa diferente reconocimiento y título de anticuerpos de un mismo suero hacia diferentes aislamientos virales.

Los resultados encontrados en este estudio indican que es igual el reconocimiento de la seropositividad de las muestras hacia los AV 1 y 2, así como la existencia de variación en la identificación de anticuerpos en las muestras al utilizar el AV 3, respaldándonos en un trabajo que evalúa el reconocimiento de sueros de campo ante diferentes virus del RVP aislados, utilizando la técnica de sueroneutralización se indica que tampoco es similar, es decir, no todos los virus son reconocidos con

los mismos títulos por un suero; se encontró que al evaluar las respuestas heterólogas no todos los virus responden con el mismo título, al confrontarlo con su antisuero homólogo y heterólogo (Becerra, 2006). En un estudio realizado por Riaño en 2011, se analizó la variabilidad antigénica mediante IHA utilizando anticuerpos específicos hacia ocho aislamientos procedentes del Estado de México, Michoacán y Guanajuato; 3 de ellos utilizados en este estudio. Los resultados mostraron que el AV 1 y el AV 2 son antigénicamente idénticos, con una VRA de 1, no así para el caso del AV 3 con una VRA de 0.025 y 0.7 respectivamente, lo que demuestra la variabilidad antigénica entre nuestros aislamientos (Riaño, 2011). En 2010, se evidenció la variación del título de anticuerpos utilizando la técnica de IHA y diferentes AV; su análisis estadístico reveló que los diferentes aislamientos no presentaron títulos de anticuerpos de manera similar. Este comportamiento podría asociarse a la variación del potencial inmunogénico de cada aislamiento viral (Escobar, 2012). Ya se ha reportado que la variabilidad antigénica está asociada a las mutaciones en el gen HN, específicamente en la secuencia de nucleótidos, que le permite al sistema inmune del cerdo generar anticuerpos específicos contra los epítopes modificados (Sánchez, 2004). Al analizar el potencial electrostático de las moléculas virales del RVP se encontraron nueve regiones antigénicas (Sánchez, 2010). En otro trabajo realizado por Riaño en 2015, se compararon 14 secuencias del gen HN y se observó que existían cambios importantes de aminoácidos con respecto al virus LMP en 3 de estas 9 regiones, en las posiciones: 462, 484 y 500, consideradas altamente antigénicas. Esto puede afectar el resultado de las pruebas de

laboratorio que detectan anticuerpos (Nordengrahn et al., 1999), lo que explica los hallazgos.

CONCLUSIÓN

Se identificaron diferentes títulos de anticuerpos (desde 1:8 hasta 1:256) utilizando los diferentes Aislamientos Virales del RVP en las muestras analizadas procedentes del Estado de Michoacán.

Existe diferente respuesta de anticuerpos hacia cada aislamiento viral utilizado.

Con el AV 2 se pudo identificar un mayor porcentaje de muestras positivas, por lo que se esperaba se pudiera utilizar como antígeno de referencia para las pruebas de IH o ser un buen candidato como inmunógeno.

Es importante realizar estudios que evidencien la variabilidad antigénica que se está presentando en este virus por estado o por zona geográfica, ya que su cambio es continuo, por lo que es necesario darle seguimiento a estos experimentos para la actualización de antígenos de referencia, así como de los inmunógenos utilizados para el control de la enfermedad.

REFERENCIAS

Abbas AK, Litchman AH. 2004. *Inmunología celular y molecular*. 7^a ed. Madrid. España. Elsevier.

Allan GM, McNeilly F, Walker Y, Linné T, Moreno-Lopez, Hernández – Jáuregui P, Kennedy S, Carrol BP, Herrón B, Foster JC, Adair B. 1996. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: Immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 8: 405-413

Becerra J. 2006. *Estudio de diferentes cepas del Rubulavirus porcino mediante la técnica de seroneutralización* [tesis de maestría]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Berg M, Hjertner B, Moreno-Lopez 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. *Journal of General of Virology*. 73: 1195-1200.

Bohl EH, Saif LJ. 1975. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infection and Immunity*. 11:23–32.

Campos ME. 1981. Síndrome del ojo azul o cerdo zarco. *Memorias del XVII Convención AMVEC-Ixtapa Zihuatanejo*, Guerrero, México.

Carrera V. 2012. *Estudio serológico retrospectivo (2000-2009) de influenza porcina subtipos H1N1 y H3N2 en el Distrito Federal* [tesis de licenciatura]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

DEAR. 2016. Situación Zoonosológica en los estados de la República Mexicana al 2016-08-09. 9 de agosto de 2016. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=30061> [consulta: 10 ago 2016]

Diosdado F, González D, Moles P, Morilla A. 2004. Asociación entre anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico y respiratorio porcino y anticuerpos contra otros patógenos. *Revista Veterinaria México*. 35(2):148-152.

Donovan SM, McNeil LK, Jiménez-Flores R, Odle J. 1994. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in porcine serum and milk throughout lactation. *Pediatric Research*. 36:159–168.

Escobar A. 2010. *Determinación de la seroprevalencia del Rubulavirus porcino en el Estado de México, Jalisco, Guanajuato y Michoacán* [tesis de licenciatura]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Escobar-López AC, Rivera-Benítez JF, Castillo-Juárez H, Ramírez-Mendoza H, Trujillo-Ortega ME and Sánchez-Betancourt JI. 2012. Identification of antigenic variants of the porcine Rubulavirus in sera of field swine and their seroprevalence. *Transboundary and Emerging Diseases*. 59: 41–420.

Flores H., A.O. 1992. *Symposium sobre enfermedades del cerdo con implicaciones en el comercio internacional*. México, D.F. 86-89.

Fuentes RJ. 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]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Fuentes RMJ, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo OME, Fraire I. 1992. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el Paramyxovirus del Ojo Azul en cerdos en la República Mexicana. *Veterinaria México*, 23:37-39

Galindo L. 2015. Identificación de factores de riesgo para la presentación del Rubulavirus porcino en el bajo mexicano [tesis de maestría]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

García O. 1999. *Estudio de la viremia en una infección experimental por Rubulavirus porcino* [tesis de licenciatura]. Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Gobierno del Estado de Michoacán, SAGARPA, Comité Técnico Estatal de Evaluación y Seguimiento, Entidad Consultora Estatal. 2013. Evaluación de resultados del programa de prevención y manejo de riesgos-Componentes sanidades 2013 en Michoacán.

Hammerberg C, Schurig GG, Ochs DL. 1989. Immunodeficiency in young pigs. *American Journal of Veterinary Research*. 50:868–874.

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

Hernández-Jáuregui P. 2003. *The pathogenesis of the porcine rubulavirus (LPMV): Infection in PK-15 cultured cells and in experimentally infected pigs* [tesis doctoral]. Uppsala, Suecia: University of Agricultural Sciences.

Juárez G. 2013. *Variación antigénica de diferentes aislamientos de influenza porcina en México* [tesis de licenciatura]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Kirkland PD, Stephano A. 2006. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipha virus infections. En: Straw B, Zimmerman J, D'Allaire S, Taylor D. *Diseases of swine*. 9th ed. EUA: Blackwell Publishing. 455-467.

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

Lamb RA, Kolakofsky D. 1996. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. En: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley y col. (ed.). *Fields Virology*. 3a ed. USA: Lippincott- Raven Publishers.

Leece JG. 1973. Effect of dietary regimen on cessation of uptake of macromolecules by piglet intestinal epithelium (closure) and transport to the blood. *Journal of Nutrition*. 103:751–756.66.

Leguizamo R 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]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Martínez LA, Correa GP, Fajardo MR, Garibay SM. 1985. Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los Paramixovirus. *Memorias del Encuentro sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo*. Ciudad de México, México.15-21.

Martínez LA, Correa GP, Rosales EF, Vásquez PC, Garibay SM. 1986. Respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) contra el Paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán. (LPM) en cerdos de diferentes edades. *XXI Reunión Nacional de AMVEC 1986*.

Martínez LA, Correa P, Rosales F. 1986. Títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) contra el paramixovirus de La Piedad, Michoacán (LPM) en cerdos de diferentes edades. *International Pig Veterinary Society Congress 9th*: 313.

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, México.

Mayo MA. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*.147 (8):1655-63.

McNeilly F, Walker I, Allan GM, Foster JC, Linné T, Merza m, Hernández P, Kennedy S, Adair AB. 1997. Comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacán Paramixovirus (LPMP) infection in pigs. *Veterinary of Diagnostic Investigation*. 9:3-9.

Mercado GC, Garfias Y, Espinosa HS, Solis HM, Ramírez MH, Zenteno E, Hernández J. 2000. Susceptibilidad in vitro de linfocitos de cerdo al Rubulavirus Porcino. *Memorias del XXXV Congreso de la Asociación de Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Acapulco, México.

Moreno-López J, Correa GP, Martinez LA, Ericsson A. 1986. Characterization of a Paramixovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of virology*. 91: 221-231.

Morilla A, Diosdado F, Corona E. 1995. Perfiles serológicos de granjas porcinas infectadas con el virus de la enfermedad de Aujeszky. *Técnica Pecuaria en México*. 33:92-99.

Nguyen TV, Yuan L, Azevedo MS, Jeong KI, Gonzalez AM, Saif LJ. 2007. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Veterinary of Immunology and Immunopathology*. 117:236–248.

Nordengrahn A, Svenda M, Moreno-López J, Bergvall A, Hernández P, McNeilly F, Allan G, Merza M. 1999. Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus, La Piedad Michoacán Virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 11(4):319-2.

Norrby E, Enders-Ruckle G, Meulen V. 1975. Differences in the appearance of antibodies to structural components of measles virus after immunization with inactivated and live viruses. *Journal of Infectious Disease*. 132:262–269.

Paterson RG, Lamb RA, Moss B, Murphy BR. 1987. Comparison of the relative roles of the F and HN surface glycoproteins of the paramyxovirus simian virus 5 in inducing protective immunity. *Journal of Virology*. 61:1972–1977.

Ramírez M H. 1998. *Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul del cerdo a nivel testicular* [tesis de doctorado]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Ramírez MH, Carreón N R, Mercado G C, Rodríguez T J. 1996. Hemoaglutinación e Inhibición de la Hemoaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Veterinaria México*. 27: 257-259.

Ramírez-Herrera MA, Mendoza-Magaña ML, Dueñas SH. 1997. Experimental infection of swine and cat central nervous systems by the pig paramyxovirus of the blue eye disease. *Zentralbl. Veterinarmed*. 44: 461-476.

Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jauregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S. 1997. Lesions in the reproductive tract of boars

experimentally infected with porcine rubulavirus. *Journal of Comparative Pathology*. 117: 237-252.

Ray R, Compans RW. 1990. Paramyxoviruses. En: M.H.B. Van Regenmortel, A.R. Neurath ed. *Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines*. USA, New York. Elsevier.

Ray R, Glaze B, Compans S. (1988). Role of individual Glycoproteins of Human Parainfluenza Virus Tipe 3 in the induction of a Protective Immune Response. *Journal of Virology*. 62(3):783-787.

Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernandez J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. 1997. NeuAc α 2,3Gal-Glycoconjugate Expression determines cell susceptibility to the porcine Porcine Rubulavirus LPMV. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 118(B):327-332.

Reyes-Leyva J, Espinoza B, Santos G, Zenteno R, Hernández J, Vallejo V, Zenteno E. 1999. Purification and characterization of the Hemagglutinin-Neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconjugate Journal*. 16:517:522.

Reyes-Leyva J, Hernández-Jáuregui P, Montaña LF, Zenteno E. 1993. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (α 2,3) lactose-containing structures. *Archives of Virology*. 133: 195-200.

Riaño V. 2011. *Identificación de variación antigénica del Rubulavirus porcino mediante la técnica de la inhibición de la Hemaglutinación* [tesis de licenciatura]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Riaño V. 2015. *Caracterización genética del gen hemaglutinina-neuraminidasa (NH) de diferentes aislamientos del Rubulavirus porcino* [tesis de maestría]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Rima B, Alexander DJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, Nagai Y, Örvell C, Pringle CR, Ter Mullen V. 1995. Family Paramyxoviridae. En: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DH, Ghabrial SA, Jarvis AW, Matelli GP, Mayo MA, Summers MD. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. EUA. Springer- Verlag. 265-274.

Rima BK, Earle JAP, Baczko K, Rota PA, Bellini WJ. 1994. Measles virus strain variation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 191: 65-83.

Rivera-Benítez Francisco, Cuevas-Romero Sandra, Pérez-Torres Armando, Reyes-Leyva Julio, Hernández Jesús, Ramírez-Mendoza Humberto. 2013. Respiratory disease in growing pigs after Porcine Rubulavirus experimental infection. *Virus Research*. 176:137–143.

Rosales F, Ramos I, Sánchez-Mejorada P, Correa P. 1987. Presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán en cerdos encefalíticos con y sin opacidad corneal. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México*. 79–80.

SAGARPA-FAO (2006). Informe de evaluación nacional-Subprograma de saludanimal.[http://www.faoevaluacion.org.mx/pagina/documentos/sistemas/eval2006/resultados2006/informes/nacionales/Informe de evaluacion](http://www.faoevaluacion.org.mx/pagina/documentos/sistemas/eval2006/resultados2006/informes/nacionales/Informe_de_evaluacion) [consulta: 21 marzo 2016]

Saif LJ, van Cott JL, Brim TA. 1994. Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus infections in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 43:89–97.

Sánchez BJI. 2004. Evaluación de las afecciones reproductivas y caracterización del Rubulavirus porcino [tesis de maestría]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Sánchez I. 2010. Caracterización del gen HN del Rubulavirus porcino y determinación de la eficiencia protectora de una vacuna polivalente [tesis de doctorado]. Ciudad de México, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Santos-López G, Hernández J, Borraz-Argüello MT, Ramírez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. 2004. Proteins of porcine Rubulavirus: structure, function and pathological implications. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 37:119-136.

Sinkora M, Butler JE. 2009. The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental and Comparative Immunology*. 33(3):273-283

Solís S, Ramirez-Mendoza H, Mercado C, Espinosa S, Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernandez J. 2007. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Research in Veterinary Science*. 83:403-409.

Spriggs MK, Collins PL, Tierney E. 1988. Immunization with vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 (PIV3) protects monkeys against PIV3 infection. *Journal of Virology*. 62:1293–1296.

Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, Maqueda AJJ. 1981. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. *Memorias del XVII Congreso de la Asociación de Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Ixtapa, México.

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

Stephano HA, Ramírez TC, Flores AH. 1983. Situación actual del síndrome de encefalitis y opacidad de la córnea conocida como "ojo azul". *Memorias del XIX Congreso de la Asociación de Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Ixtapa, México.

Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jáuregui P, Linné T, Moreno-López J. 1990. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *Journal of General Virology*. 71: 609-613.

Zamora J, Martínez A, Correa P, Colinas A. 1990. Estudio preliminar, en cerdos, de 2 vacunas inactivadas experimentales, elaboradas con el paramixovirus porcino de La Piedad, Michoacán. *Memorias del XXV Congreso Nacional de la Asociación de Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Puerto Vallarta, México. 61-64.

Zenteno-Cuevas R, Hernández J, Espinoza B, Reyes J, Zenteno E. 1998. Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Archives of Virology*. 143: 333–352.