



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL
DIAGNÓSTICO DE *RUBULAVIRUS* PORCINO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

HIDALGO LARA DIEGO RAFAEL

Asesores:

Dr. Humberto Ramírez Mendoza

Dr. José Francisco Rivera Benítez

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

2017



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, la persona más encantadora que conoceré.

A mi hermano Jorge, gran amigo e influencia.

A Mitzy y Eleanor, mis mejores amigas.

En memoria de Miguel Ángel Hidalgo Lara.

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y en el Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

El estudio fue financiado por los proyectos de investigación: “Identificación y caracterización de variantes genéticas y antigénicas del *Rubulavirus* porcino; y de sus parámetros histopatológicos e inmunológicos”; Recursos Fiscales INIFAP No. SIGI. 19144832016 y FMVZ-UNAM. PAPIIT-IN208814-3. Patogenia del *Rubulavirus* porcino en cerdos en crecimiento, explantes de tejidos y cinética de multiplicación viral en leucocitos.

A todo el personal e investigadores del laboratorio de Virología del CENID-Microbiología Animal del INIFAP, que hicieron posible el desarrollo del presente estudio, principalmente al Dr. José Francisco Rivera.

A todo el personal y académicos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM, que hicieron posible el desarrollo del presente estudio, en especial, el Dr. Humberto Ramírez Mendoza.

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Organización genómica de <i>Rubulavirus</i> porcino	6
2	Viriones de RVP en tinción negativa en microscopía electrónica	7
3	Ciclo replicativo de <i>Rubulavirus</i> porcino	11

Índice de cuadros

Cuadro	Título	Página
1	Sensibilidad, especificidad, coeficiente <i>kappa</i> y valores predictivos de las pruebas de IHA, SN e IPMA, valores obtenidos de las lecturas del observador 1.	40
2	Título promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las pruebas de IHA, valores obtenidos de las lecturas del observador 1.	40
3	Sensibilidad, especificidad, coeficiente <i>kappa</i> y valores predictivos de las pruebas de IHA, SN e IPMA, valores obtenidos de las lecturas del observador 2.	41
4	Título promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las pruebas de IHA, valores obtenidos de las lecturas del observador 2.	41
5	Sensibilidad, especificidad, coeficiente <i>kappa</i> y valores predictivos de las pruebas de IHA, SN e IPMA, valores obtenidos de las lecturas del observador 3.	42
6	Título promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las pruebas de IHA, valores obtenidos de las lecturas del observador 3.	42
7	Variación interobservador en las pruebas serológicas empleadas.	43

Lista de abreviaturas y siglas

°C	Grados centígrados
κ	Coeficiente <i>kappa</i>
μ l	Microlitros
AEC	3-amino-9-etilcarbazol
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CD2	Molécula de adhesión celular cuyos ligandos son CD58 (en no roedores) y CD48 (en roedores)
CD4	Receptor específico de moléculas de tipo II del complejo mayor de histocompatibilidad, clave en el proceso de reconocimiento de antígeno por linfocitos T cooperadores
CD4 ⁺ CD8 ⁺	Linfocitos dobles positivos en el cerdo que participan en la respuesta celular de memoria
CD4 ⁻ CD8 ⁺	Linfocitos que participan en el control de la infección
CD8	Receptor específico de moléculas de tipo I del complejo mayor de histocompatibilidad. Se expresa en linfocitos T citotóxicos
CENID-MA	Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal
CO ₂	Dióxido de carbono

DICC _{50%}	Dosis infectantes en cultivo celular al 50%
D-MEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
dpi	Días post-infección
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EOA	Enfermedad del ojo azul
F	Proteína de fusión
FC	Fijación del complemento
GenBank	Base de datos de secuencias genéticas
GR	Glóbulos rojos
HN	Proteína hemaglutinina-neuraminidasa
HPIV-2	Virus de parainfluenza humana tipo 2
HPIV-4	Virus de parainfluenza humana tipo 4
HRP	Peroxidasa de rábano
ID	Inmunodifusión doble
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
IHA	Inhibición de la hemaglutinación
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IPMA	Ensayo de inmunoperoxidasa en monoestrato celular
kg	Kilogramo
L	Proteína de alto peso molecular
LPMV	Virus La Piedad Michoacán
M	Proteína de matriz
MDA-5	Proteína asociada a la diferenciación de melanoma 5
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MprPV	Virus Mapuera

MuV	Virus de parotiditis humana
N	Nucleoproteína
NeuAc α 2,3Gal	Ácido neuramínico alfa 2, 3 galactosa
nm	Nanómetros
P	Fosfoproteína
PAC	Producción animal cerdos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCV-2	<i>Circovirus</i> porcino tipo 2
pH	Potencial de hidrogeniones
PK-15	Línea continua de células epiteliales de riñón de cerdo
PRRS	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa – transcriptasa reversa
RVP	<i>Rubulavirus</i> porcino
SFB	Suero fetal bovino
SN	Seroneutralización
SNC	Sistema nervioso central
SOA	Síndrome de ojo azul
spi	Semana post-infección
SV-5	Virus símico tipo 5
SV-41	Virus símico tipo 41
UHA	Unidades hemaglutinantes
V/C/I	Proteínas no estructurales de evasión inmune, reguladoras de la replicación viral e inhibidoras de apoptosis inducida por virus

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Antecedentes históricos.....	3
1.2 Importancia económica.....	4
1.3 Agente etiológico.....	4
1.4 Replicación viral.....	8
1.5 Patogenia.....	9
1.6 Respuesta inmune.....	11
1.7 Epidemiología.....	12
1.8 Signos clínicos.....	13
1.9 Lesiones.....	15
1.10 Diagnóstico.....	16
1.11 Prevención y control.....	18
1.12 ANTECEDENTES.....	19
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVO GENERAL.....	24
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
6. RESULTADOS.....	29
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIÓN.....	40
9. REFERENCIAS.....	41

Resumen

Evaluación de pruebas serológicas para el diagnóstico de *Rubulavirus* porcino. Diego Rafael Hidalgo Lara. Asesor principal: Humberto Ramírez Mendoza. Asesor secundario: José Francisco Rivera Benítez.

La enfermedad del ojo azul fue identificada a principios de la década de 1980, afecta a cerdos de todas las edades, produciendo alteraciones nerviosas, respiratorias y reproductivas, el agente causal es el *Rubulavirus* porcino. La enfermedad geográficamente es endémica en el centro y en la región del Bajío. Es importante contar con métodos confiables para realizar el diagnóstico de la infección. El objetivo de este estudio fue comparar la sensibilidad, especificidad, coeficiente *kappa* y valores predictivos de tres pruebas serológicas, diferentes protocolos de inhibición de la hemaglutinación, inmunoperoxidasa en monoestrato celular y seroneutralización. Se evaluaron 49 sueros en cada prueba, cada una con cuatro réplicas intra e interensayo. Mediante el coeficiente *kappa*, fue evaluada la variación interobservador para cada una de las pruebas. La prueba de inhibición de la hemaglutinación registró valores de sensibilidad y especificidad del 89 y 100 %, respectivamente, la prueba de inmunoperoxidasa un 85 y 100 % y la prueba de seroneutralización el 91 y 96 %. El coeficiente de *kappa* resultó ser de 1.0 en una de las diferentes combinaciones probadas de inhibición de la hemaglutinación, comparando las lecturas obtenidas entre los tres observadores, demostrando ser adecuada para el diagnóstico por su repetibilidad y su fácil lectura. Los resultados de la inhibición de la hemaglutinación y seroneutralización, mostraron la importancia del sistema de complemento u otros inhibidores en la realización del diagnóstico serológico. Los resultados indican que la inmunoperoxidasa puede ser una excelente opción como prueba tamiz en áreas libres de la enfermedad.

Palabras clave: *Rubulavirus* porcino, pruebas serológicas, inmunoperoxidasa, sensibilidad, especificidad.

1. Introducción

La enfermedad del ojo azul (EOA) fue descrita por primera vez en 1980, en La Piedad, Michoacán, lugar donde se presentaron numerosos brotes de encefalitis, acompañados de opacidad corneal y alta mortalidad en lechones (17.2 – 23.3%). Las principales lesiones microscópicas en animales afectados fueron encefalitis no supurativa y neumonía intersticial, también se logró aislar un virus con actividad hemaglutinante (1). La enfermedad fue reproducida en cerdos infectados experimentalmente, corroborando los postulados de Koch (2–5). El agente etiológico fue nombrado inicialmente virus La Piedad Michoacán-LPMV, debido al lugar de donde fue aislado (6). El LPMV es un virus envuelto, su genoma está constituido por una cadena sencilla de ácido ribonucleico (ARN) en sentido negativo no segmentado. Posee actividad hemaglutinante, hemolítica y formadora de sincitios (6). Por medio de secuenciación de genes se demostró que el LPMV está relacionado con el virus de parotiditis humana (MuV), virus símico tipo 5 (SV-5), virus de parainfluenza humana tipo 2 (HPIV-2) y tipo 4 (HPIV-4) (7–11), sugiriendo la clasificación del LPMV en el género *Rubulavirus*, familia *Paramyxoviridae* y orden *Mononegavirales* (12). Los signos clínicos varían de acuerdo a la edad del animal, tipo de pira, sistema de producción, manejo y presencia de otros patógenos (13). Inicialmente se caracterizó como un síndrome neurológico y respiratorio, con presentación de opacidad corneal en 1-10% de los casos. Posteriormente se registró la presencia de abortos y fetos momificados en hembras gestantes e infertilidad en sementales, debido a lesiones en el tracto reproductivo, como epididimitis, orquitis y atrofia testicular (1,14). En animales de engorda se han observado cuadros neurológicos severos y respiratorios (15). Estudios recientes indican que la enfermedad es endémica en la zona centro y centro-occidental del país (16), anteriormente, en 1992 un estudio sobre la frecuencia de anticuerpos identificó seropositividad en 16 estados de la República Mexicana (17). Para el diagnóstico serológico, la prueba más usada es la inhibición de la hemaglutinación (IHA), otras pruebas utilizadas en el diagnóstico serológico son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), seroneutralización (SN) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (18), sin embargo, no existe un

consenso en los procedimientos y condiciones mínimas para su desarrollo, por ello es importante la estandarización de pruebas altamente sensibles y específicas, que puedan ser implementadas en programas de monitoreo y control de la enfermedad.

1.1 Antecedentes históricos

Desde 1980, en México, se han presentado numerosos brotes del llamado inicialmente, síndrome del ojo azul (SOA). Estos brotes se caracterizaban por la presentación de meningoencefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea. El primer brote reportado tuvo lugar en una granja de 2,500 hembras reproductoras, localizada en La Piedad, Michoacán. Durante la misma época, ocurrían brotes en los estados de Jalisco y Guanajuato (1). Más adelante la enfermedad fue reproducida en cerdos infectados experimentalmente, corroborando los postulados de Koch (2–5). En los primeros estudios se identificaron algunas características del agente etiológico, como su actividad hemaglutinante, formadora de sincitios y en tinción negativa al microscopio electrónico se identificaron viriones con morfología similar a los paramixovirus, en estos estudios se le nombró virus La Piedad Michoacán (LPMV) (1,6).

En 1990 se identificaron las proteínas estructurales del LPMV por ensayos inmunolectroforéticos y al compararlas con proteínas de otros paramixovirus (virus Sendai, virus de Newcastle y Parainfluenza tipo 3) se determinó que el virus era de origen porcino y se propuso su clasificación en el género *Rubulavirus* (19).

Durante la década de 1990 se logró la secuenciación genes que codifican para las proteínas estructurales del LPMV, como la proteína de matriz (M), fosfoproteína (P), proteína de fusión (F), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de alto peso molecular (L). Mediante ensayos comparativos con otros paramixovirus, se determinó que el mayor grado de homología en secuencia de aminoácidos fue con el MuV y SV5, con un 41% y 43%, respectivamente (7–11).

En el año de 1992, la enfermedad había sido diagnosticada por medio de técnicas serológicas en 16 estados del país (17). Estudios más recientes evidenciaron la presencia de la enfermedad en la zona centro-occidente del país y el bajío, reportándose seroprevalencia de distintas cepas de *Rubulavirus* porcino (RVP) en los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Estado de México, del 23.7, 36.5, 20.9 y 10.3 %, respectivamente (16).

1.2 Importancia económica

El impacto económico después de la infección con el RVP está relacionado a baja fertilidad, debido al aumento en repeticiones de estro, al aumento en el porcentaje de lechones nacidos muertos (hasta 19%) y momificaciones (hasta 36%), la disminución del número de lechones nacidos totales (-4.1), al aumento en la mortalidad de lechones durante las primeras semanas (hasta 50%) y retraso en el crecimiento. También hay pérdidas económicas asociadas a la eliminación de sementales debido a orquitis y baja calidad seminal, con un incremento en costos por un mayor uso de antibióticos (20).

1.3 Agente etiológico

Clasificación taxonómica. El RVP está clasificado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus* y especie *Rubulavirus* porcino. En este género se encuentran clasificados el virus de parainfluenza humana tipo 2 (HPIV-2), virus de parainfluenza humana tipo 4 (HPIV-4), virus Mapuera (MprPV), virus de parotiditis humana (MuV), virus de parainfluenza 5 (PIV5) y virus símico 41 (SV-41). Todas las especies del género *Rubulavirus* poseen actividad hemaglutinante y neuraminidasa (12).

Relación del RVP con otros paramixovirus. Previamente se ha demostrado que no existe antigenicidad cruzada entre el LPMV y otros paramixovirus (virus de parainfluenza humana tipo 1-3, virus de parotiditis humana, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial humano y virus de la enfermedad de Newcastle), al utilizar pruebas de fijación del complemento (FC), inmunodifusión doble (ID), SN e IHA (6).

Por análisis de identidad de aminoácidos de la proteína M, se demostró que el RVP está más relacionado al MuV. Análisis posteriores de los genes P, HN y F confirmaron la relación entre estos virus (7–10). Recientemente se identificó que existe una relación más estrecha con el MprPV, por medio de análisis de secuencias de la proteína N y M, con un 56 % de identidad. Además de que la organización del genoma de estos virus es idéntica (Figura 1) (21).

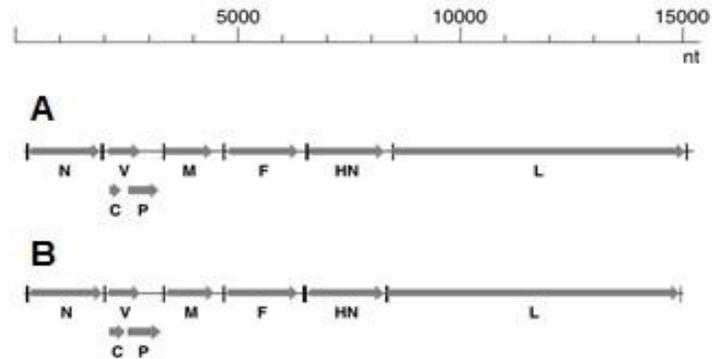


Figura 1. Organización genómica de *Rubulavirus* porcino. Arriba se muestra el tamaño del genoma. Organización genómica de MprPV (A). Organización genómica de RVP (B). Tomado de Wang *et al.*, 2007.

Morfología. Los viriones miden entre 135 a 148 nm por 257 a 360 nm, las nucleocápsides tienen un diámetro de 20 nm y una longitud de 1000–1630 nm (Figura 2) (20). Los viriones son pleomórficos, usualmente de forma esférica. Se conforman por una envoltura lipídica que rodea a la nucleocápside. La envoltura se deriva de la membrana de la célula hospedadora por gemación. Presenta proyecciones de 8 nm de longitud que corresponden a las proteínas HN y F. En la cara interna de la envoltura se encuentra asociada una proteína no glicosilada o proteína M. La nucleocápside consiste de genoma de ARN con cadena sencilla en sentido negativo y las proteínas L y P, éstas últimas con actividad ARN polimerasa (12).

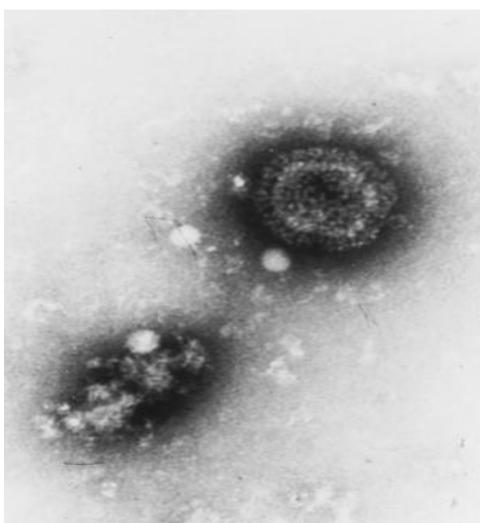


Figura 2. Viriones de RVP en tinción negativa en microscopía electrónica (X108, 200). Tomado de Stephano *et al.*, 1985.

Organización del genoma. Excepto para los extremos 5' y 3', ha sido determinada la secuencia completa de nucleótidos del RVP. La organización del genoma es similar o idéntica a la de otros virus del género *Rubulavirus*. Está organizado iniciando en 3', gen N, gen P, gen M, gen F, gen HN, gen L y finalmente, el extremo 5'. La longitud completa del genoma es de 15,193 nucleótidos (22). Más recientemente, secuencias de aislamientos más actuales de RVP provenientes de casos clínicos de campo fueron analizadas genética y filogenéticamente. La comparación de secuencias de aminoácidos de la proteína HN de aislamientos obtenidos en diferentes años (2007, 2008, 2009 y 2013) demostró pocos cambios de aminoácidos en esta proteína. A lo largo de más de 30 años, solamente han cambiado 24 de 1728 nucleótidos, lo que corresponde a un 2 % de la proteína, lo que sugiere un alto nivel de conservación de dicha proteína (23).

Proteínas estructurales y no estructurales. La proteína N es una proteína de 545 aminoácidos, componente estructural de la nucleocápside, junto con el ARN viral y las proteínas L y P (22).

La proteína F ha sido implicada en la virulencia del RVP, debido a que induce la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y la diseminación del virus de célula a célula por medio de la formación de sincitios (23). Es una glicoproteína de superficie y consta de 541 aminoácidos. La proteína F necesita ser dividida en dos subunidades para ser activa, estas son F1 y F2 (22).

La HN es una glicoproteína de superficie y está formada por 576 aminoácidos. Tiene dos actividades: unión a residuos de ácido siálico en receptores celulares (hemaglutinación) y separación del ácido siálico (neuraminidasa) de los mismos receptores. La HN se une específicamente al ácido neuramínico alfa 2, 3 galactosa (NeuAc α 2,3Gal) de células susceptibles (24,25). Hasta la fecha es la proteína más estudiada del LPMV, debido a su potencial inmunogénico (26).

La proteína M se encuentra en la parte interior de la envoltura del virión, consta de 369 aminoácidos. Participa en el ensamble del virión durante la gemación (27).

El gen de la proteína L, conocida también como proteína de alto peso molecular, constituye 45 % del genoma viral, de 6786 nucleótidos y codifica una proteína de 2251 aminoácidos. Lleva a cabo las funciones de polimerasa (iniciación, elongación, metilación, edición, poliadenilación) (11).

El gen P está constituido por 1373 nucleótidos, tiene la capacidad de codificar varias proteínas. En el caso del LPMV, el gen puede codificar las proteínas P, V, I y C (8). La proteína V consiste de 249 aminoácidos, ha sido implicada en mecanismos para evadir o prevenir la producción y la traducción de señales de respuesta a interferón (IFN) y ha sido identificada como un importante factor de virulencia que interfiere con la inmunidad del hospedador al inactivar al receptor de reconocimiento citosólico de patógenos MDA-5. Se ha sugerido que un incremento en los niveles de proteína V promueve una infección persistente en estudios *in vitro* e *in vivo* (8,23,28–30). La proteína C contiene 126 aminoácidos y es relativamente rica en leucina (17.5 %). Es benéfica para el virus por interferir con la respuesta inmune

mediada por IFN. Esta proteína ha sido asociada a la regulación de transcripción/replicación viral y al antagonismo de la respuesta antiviral del hospedador (8,23).

Características biológicas y fisicoquímicas. El RVP es capaz de aglutinar eritrocitos de diferentes especies: ave, cobayo, bovino, cerdo, caballo, conejo, borrego, cabra, rata, pavo y sangre humana tipo A, B y O. Se obtienen títulos más altos al emplear eritrocitos de ave, cobayo y humana tipo A. La actividad hemaglutinante disminuye drásticamente después de 15 minutos de incubación a 65°C y es completamente inhibida después de 30 minutos de incubación a 37°C o 3 minutos a 85°C. La elución en eritrocitos ocurre a los pocos minutos de incubación a 37°C, esto se adjudica a la actividad neuraminidasa. Esta actividad permite hidrolizar los residuos de ácido siálico de los receptores celulares; se realiza a un pH de 3.3 y es muy estable en un rango de temperatura de 30-55°C. El virus puede ser inactivado a 90°C durante 10 minutos. La HN del RVP puede ser purificada por ultracentrifugación en un gradiente de sucrosa continuo de 20-60% y cromatografía de intercambio iónico (6,25,31).

1.4 Replicación Viral

La partícula viral se adhiere a la membrana de la célula hospedadora por medio de la proteína HN, que reconoce como receptor específico al oligosacárido NeuA α 2,3Gal (paso 1). Un cambio conformacional de la proteína HN activa la proteína F, la cual expone un dominio altamente hidrofóbico, lo cual promueve la fusión de la membrana celular y la envoltura viral (paso 2), provocando que el ARN viral sea liberado en el citoplasma (paso 3). Ya que los *Rubulavirus* poseen su propia polimerasa, es posible sintetizar su genoma en sentido positivo, que sirve de molde para genoma de nueva síntesis (paso 4), por otro lado, se sintetizan diferentes ARNm (paso 5) que codifican las proteínas virales (paso 6a). Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, las proteínas NP, P y L son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular (paso 7). Las glicoproteínas (HN y F), sintetizadas en

retículo endoplásmico, son modificadas en aparato de Golgi (paso 6b) y posteriormente expresadas en la membrana citoplásmica, en contacto con la proteína M (paso 8). La afinidad de las proteínas del genoma (NP, P y L) con la proteína M y de ésta con las glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis (paso 9). La actividad neuraminidasa permite que los viriones no se unan a los receptores de la célula ya infectada. Es característico en los paramixovirus que además de la formación de viriones por gemación, los virus puedan infectar las células inmediatamente vecinas a través de la fusión membranal célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera (paso 10), lo cual le permite dispersarse sin necesidad de salir al medio extracelular (32). El ciclo replicativo se ilustra en la figura 3.

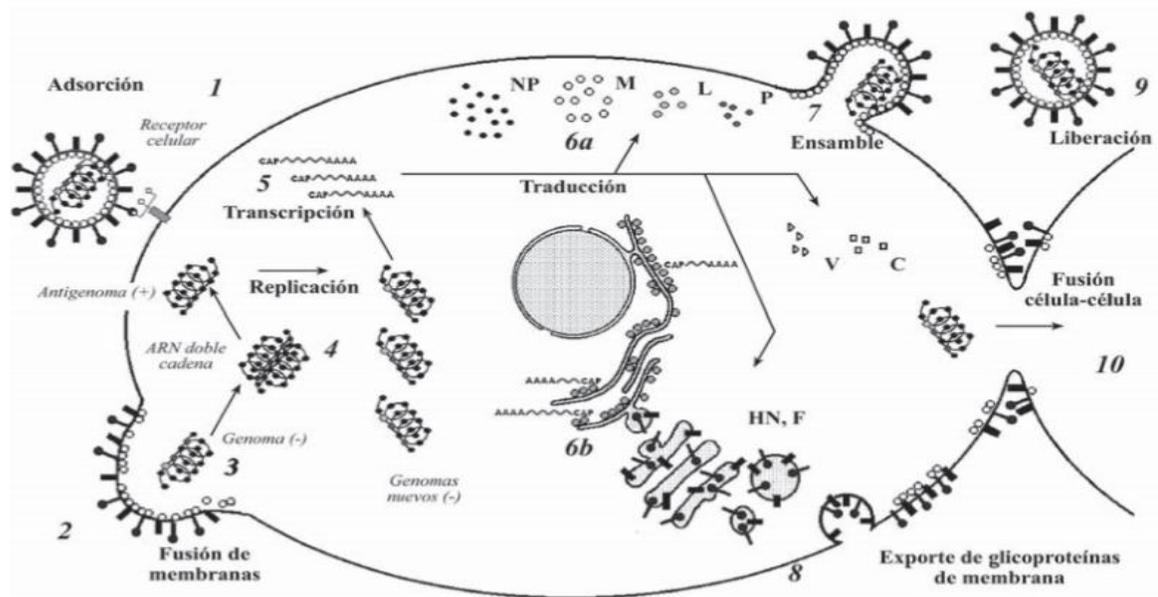


Figura 3. Ciclo replicativo de *Rubulavirus* porcino, cada proceso se encuentra descrito en el texto. Tomado de Santos-López *et al.*, 2004.

1.5 Patogenia

La vía de infección más común es por inhalación de aerosoles contaminados. Experimentalmente, han sido efectivas las vías de infección intracerebral, intratraqueal, intranasal, ocular e intramuscular. El sitio primario de infección es la

mucosa nasal y tonsilas. El virus también ha sido detectado en axones neuronales (20). Desde el sitio primario de replicación, el RVP se disemina rápidamente al sistema nervioso central, a través del nervio olfatorio y trigémino, y hacia los pulmones por vía aérea. El virus se disemina sistémicamente asociado a eritrocitos y leucocitos. El antígeno viral ha sido identificado asociado a eritrocitos, por medio de inmunofluorescencia directa, a partir del 4 dpi hasta los 12 dpi y en leucocitos a partir de los 12 dpi hasta 20 dpi (33).

Tropismo. La infección está regulada por la presencia del ácido neuramínico en unión a galactosa, por enlaces α 2,3 (NeuAc α 2,3Gal), en cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas o lipoproteínas. Esto se corroboró al realizar ensayos de inhibición de infectividad en monoestratos de células Vero, donde la infectividad fue completamente bloqueada al utilizar la lectina *Mackia amurensis*, específica para NeuAc α 2,3Gal, receptor identificado para el RVP (24).

La presencia del receptor fue evaluada por medio de lectinas en diferentes órganos de cerdos neonatos y adultos. En cerdos de tres días de edad, el receptor se presentó de manera abundante en sistema nervioso central (nervio olfatorio, bulbo olfatorio, lóbulo piriforme, frontal, temporal y occipital de la corteza cerebral, hipocampo, tálamo, hipotálamo y cerebelo) y aparato respiratorio (mucosa nasal, tráquea, bronquios y pulmones), de manera menos abundante en aparato genitourinario (riñón, testículo y epidídimo) y tejido linfoide (linfonodo mesentérico, bazo y timo), aunque en tonsila la expresión fue muy abundante. En cerdos adultos, la expresión del receptor es menor en SNC, especialmente en estructuras olfativas y lóbulo piriforme; en aparato respiratorio la expresión es igual en adultos que en lechones; en testículo y epidídimo la expresión de NeuAc α 2,3Gal es considerablemente mayor que en lechones; en cuanto a tejido linfoide, la expresión aumenta en órganos de animales adultos (34). Por medio de infecciones experimentales, ha sido demostrada la presencia del virus o ARNm en la mayoría de estos órganos, incluyendo el páncreas (14,35–38).

1.6 Respuesta inmune

Inmunidad humoral. Se ha evidenciado la producción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y seroneutralizantes. La seroconversión se presenta desde la primera semana post-infección (spi), con títulos de 4-6 (log2) de anticuerpos neutralizantes durante las primeras cuatro spi. El título de anticuerpos aumenta a 8.5 (log2) desde la quinta hasta la séptima spi. Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se identifican a partir de la segunda semana pi, con título de 5 (log2) y se mantienen constantes hasta la séptima spi (26). En otro estudio, se identificó seroconversión a partir de 8 dpi, por técnicas de IHA, ELISA, SN e IFI (36). Asimismo, se han detectado anticuerpos hasta veinte spi por técnicas de SN, IFI, IHA e inmunoperoxidasa (IPMA) (39).

Con ensayos inmunolectroforéticos se determinó la HN como la proteína más inmunogénica, al presentarse anticuerpos específicos en 85.7 % de los sueros evaluados en la segunda semana pi y el 100 % a partir de la tercera semana pi. Anticuerpos contra la proteína M fueron identificados en la cuarta semana pi en el 28.6 % de las muestras y en el 42.6 % desde la quinta hasta la séptima spi. La respuesta contra la proteína N se identificó en el 57.1 % de las muestras en la quinta spi y en el 85.7 % en las semanas 6 y 7 pi (26).

Inmunidad celular. Ensayos *in vitro* de proliferación mediante el uso de lectinas mitogénicas han demostrado que ésta es baja en células mononucleares de sangre periférica durante la primera spi, en la segunda a quinta y en la séptima spi se observa proliferación de células mononucleares de sangre periférica, mientras que en la sexta vuelve a disminuir la proliferación, la baja proliferación de estas células durante la primera semana de infección podría predisponer a infecciones por otros agentes patógenos (1,26).

En lechones a los 5 y 17 días de edad se ha observado un relativo aumento en los niveles de CD2⁺ y CD8⁺ durante la fase aguda de la enfermedad, lo cual sugiere su participación en la eliminación del virus (38,40). En cerdos adultos infectados

experimentalmente se han visto niveles aumentados de células T CD2⁺ y monocitos (PoM1⁺) durante la fase inicial de la enfermedad, mientras que la población de linfocitos B disminuye en la tercera y cuarta spi. Las células T CD4⁺ se ven disminuidas a las 3 spi, mientras que las CD4⁺CD8⁺ aumentan a las 4 spi. (26,40).

En animales adultos, durante la primera semana pi se observaron los niveles más altos de células T CD4⁺CD8⁺, frecuentemente asociadas con actividad citotóxica. Se han detectado células T CD4⁺ y CD8⁺ hasta 277 dpi, lo cual puede corresponder a linfocitos dobles positivos. La proliferación de células CD4⁺CD8⁺ en condiciones *in vitro* por estimulación con antígeno sugiere función de memoria en este fenotipo celular (26,38).

1.7 Epidemiología

La infección por RVP fue reportada inicialmente en el año de 1980 en La Piedad, Michoacán (1), sin embargo, en un estudio serológico retrospectivo se demostró seropositividad desde el año 1972 mediante la prueba de IHA en sueros provenientes del Estado de México (41).

En 1992, se realizó un estudio para determinar la frecuencia de anticuerpos en la República Mexicana, los estados con seropositividad fueron Campeche, Colima, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, Sonora y Veracruz, previamente había sido diagnosticada en la Ciudad de México, Nuevo León, Tlaxcala y Quintana Roo (17).

Un estudio serológico realizado durante 1999-2000, demostró que la EOA se encuentra distribuida principalmente en áreas de alta densidad porcina de los estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo y Querétaro, concluyendo que la EOA es endémica de la zona centro del país (42).

En 2011, se determinó la seroprevalencia de EOA en el Estado de México, Guanajuato, Jalisco y Michoacán, los rangos de prevalencia fueron 10, 23.7, 25 y

20.9%, respectivamente. En este trabajo fueron empleados tres diferentes aislamientos de RVP para la prueba de IHA, PAC-4, PAC-6 y PAC-9 y se comprobó que no existe antigenicidad cruzada completa entre estos aislamientos. En Guanajuato la prevalencia más alta fue para PAC-4, PAC-6 en Jalisco, PAC-9 en Michoacán y para el Estado de México hubo baja prevalencia para las tres cepas de aproximadamente 10% (16).

Especies susceptibles a infección. Los embriones de pollo son susceptibles a la infección por RVP y en ratones la virulencia depende de la ruta de infección. En ratas cepa Wistar al ser inoculadas por vía intramuscular no se evidencian signos clínicos, sin embargo, hay una respuesta inmune humoral, también se puede detectar la excreción del virus en heces y orina. Se ha demostrado también que el gato doméstico tiene la capacidad de seroconvertir durante la infección experimental (6,43,44).

Animales infectados persistentemente, que presentan cuadros subclínicos, son la principal fuente de RVP. El virus se disemina por contacto directo entre cerdos infectados y susceptibles. El virus también puede ser diseminado por aerosoles, personas, vehículos y posiblemente por aves (20).

Vías de excreción. El RVP se excreta principalmente por aeroloses, el virus ha sido aislado a partir de mucosa nasal, heces y orina. También se ha identificado ARN en semen y epidídimo, sugiriendo la diseminación por medio de monta natural o inseminación artificial (35,45).

1.8 Signos clínicos

En 1980, se presentaron brotes de encefalitis y alta mortalidad en lechones (17.2 – 23.3%). En cerdos mayores a los 30 días de edad, los signos eran menos frecuentes y severos (morbilidad de 1-4 %), la mortalidad en esta etapa era baja o nula (1). En 1983, se registraron numerosos brotes de encefalitis acompañada de cuadros respiratorios y hasta 30 % de mortalidad en cerdos de 15 a 45 kg (46).

Los lechones de 2-15 días de edad son los más susceptibles. Los primeros signos clínicos incluyen fiebre, pelo hirsuto, xifosis, y algunas veces constipación y diarrea. Luego se presentan signos nerviosos, como, ataxia, debilidad, rigidez en miembros posteriores, tremor muscular, hiperexitabilidad, pataleo y posturas anormales. Otros signos incluyen letargia, midriasis, ceguera, nistagmo, conjuntivitis, blefaritis y lagrimeo. Frecuentemente se observa exudado en pestañas y del 1-10 % de los lechones afectados desarrolla opacidad corneal. La opacidad corneal a veces se presenta sin la manifestación de algún otro signo clínico (1,4).

En cerdos mayores a 30 días de edad, los signos frecuentes son anorexia, fiebre, estornudos y tos. Cuando el sistema nervioso central se ve afectado se observa letargia, incoordinación, marcha en círculo, movimientos involuntarios de cabeza y postración. Se llega a presentar opacidad corneal uni o bilateral en 1-4% de los casos y la mortalidad suele ser baja (3).

En hembras en maternidad se observa anorexia de 1-2 días previos de la presentación de signos en su camada. También pueden desarrollar opacidad corneal. Los parámetros reproductivos se ven afectados, hay un aumento en los días para el retorno al estro, en el intervalo destete-servicio y en los días abiertos. El aborto no es común, pero se puede llegar a presentar en un porcentaje variable en un brote agudo de la enfermedad. También se incrementa el número de mortinatos, momificaciones, y, por ende, disminuye el número de lechones nacidos vivos. Infecciones con cepas del genogrupo 3 (PAC6 – PAC9) del RVP ocasionan presentación de signos nerviosos en hembras adultas, en cambio, infecciones con cepas del genogrupo 2 (PAC2 – PAC3) se relacionan a falla reproductiva (1,15).

En sementales, al principio se observa anorexia y ocasionalmente opacidad corneal. La libido disminuye temporal o permanentemente. Algunos sementales desarrollan orquitis y epididimitis. Ocasionalmente se forman nódulos en la cabeza del epidídimo. Después tiene lugar la atrofia testicular (comúnmente unilateral). La

calidad del semen también se ve alterada, hay disminución en la concentración espermática, así como en la motilidad y viabilidad, incluso puede haber azoospermia o necropermia, en tales casos el eyaculado tiene apariencia translúcida o marrón/grisácea, respectivamente (14).

También se han descrito brotes de la enfermedad con semiología nerviosa en animales adultos infectados con la cepa PAC9, debido posiblemente a mutaciones en el gen HN (15).

1.9 Lesiones

Lesiones macroscópicas. En lechones, principalmente hay neumonía moderada en la porción ventral de los lóbulos craneales. Puede observarse distensión gástrica. También puede haber distensión de vejiga urinaria, acumulación de fluidos y presencia de adherencias de fibrina en cavidad peritoneal. El cerebro se muestra congestionado y hay aumento de líquido cefalorraquídeo. También es posible la observación de hemorragias en pericardio y corteza renal (13).

En cerdos en crecimiento, se ha producido experimentalmente una neumonía multifocal ligera (47).

Experimentalmente, en hembras se produce congestión local y hemorragias de la placenta y endometrio cuando la infección se da a las 10 semanas de gestación. Los fetos disminuyen de tamaño y presentan hemorragias difusas en la piel, deshidratación y autólisis. También se producen momificaciones (48).

A nivel experimental, en machos puede haber edema en escroto y túnica vaginal. También se pueden desarrollar nódulos en la cabeza del epidídimo. Cuando se presenta la atrofia testicular, esta puede ir acompañada de zonas de hemorragia desde la túnica albugínea hasta el parénquima testicular (14).

Lesiones microscópicas. Las principales lesiones histológicas se localizan en cerebro y médula espinal. Se produce una encefalitis no supurativa en la materia gris del tálamo, encéfalo y corteza cerebral que se caracteriza por gliosis multifocal y difusa, infiltración linfocitaria perivascular, necrosis neuronal, neuronofagia, meningitis y coroiditis (1).

Experimentalmente en cerdos en crecimiento, a nivel pulmonar se producen las siguientes lesiones: hiperplasia de tejido linfoide asociado a bronquios, hiperplasia de tejido linfoide asociado a vasos sanguíneos, neumonía intersticial, aumento en el número de macrófagos alveolares. En el epitelio que recubre las criptas tonsilares, se observa infiltración de linfocitos, neutrófilos e incremento de detrito celular en el interior de las criptas. Además, hay hiperplasia en la mayoría de los nódulos linfáticos y se evidenció la presencia de centros germinales con cuerpos apoptóticos. En el epitelio pseudoestratificado de la tráquea se evidenció hiperplasia de células caliciformes e infiltración de células mononucleares (47).

Lesiones en el aparato reproductor del macho incluyen formación de granulomas espermáticos que se caracterizan como cavidades llenas de espermatozoides rodeadas de macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfocitos y plasmocitos. Se pueden observar espermatozoides en el lumen de vasos sanguíneos de la cabeza del epidídimo. Se observa severa vacuolización en células epiteliales de la cabeza del epidídimo, necrosis e infiltración de células mononucleares. También hay degeneración de túbulos seminíferos e infiltración intersticial de células mononucleares. En células intersticiales también se observan vacuolas e hipoplasia (14).

1.10 Diagnóstico

El diagnóstico temprano se orienta con base en los signos clínicos, como encefalitis, opacidad corneal, falla reproductiva en hembras y orquitis y epididimitis en machos. El análisis de las lesiones histológicas ayuda en la orientación del diagnóstico definitivo, después de la infección por RVP se observa encefalitis no supurativa,

uveítis anterior, queratitis, neumonía intersticial, orquitis y epididimitis. La presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en neuronas y epitelio de la córnea, además de los signos clínicos y otras lesiones histológicas nos ayuda a confirmar el diagnóstico (20).

Es necesario considerar el diagnóstico diferencial con otras enfermedades que ocasionen encefalitis como fiebre porcina clásica, enfermedad de Aujeszky, meningitis bacteriana (*Streptococcus suis* tipo 2), toxoplasmosis, tétanos, y no infecciosas, como intoxicación por sal (49).

En afecciones del aparato respiratorio, el diagnóstico diferencial debe hacerse con los virus de influenza y síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), además de otros organismos implicados en el complejo respiratorio porcino, como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyopneumoniae*. Sin embargo, en el caso de *Bordetella bronchiseptica* se produce rinitis y en infecciones por *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* los principales hallazgos en la necropsia son adhesiones en la región torácica y artritis. En casos de aborto los principales diagnósticos diferenciales son las infecciones por *Brucella suis*, *Leptospira* spp., *Chlamydia* spp., *Circovirus* porcino tipo 2 (PCV-2) y PRRS, si se presentan momificaciones se debe descartar infección por *Leptospira* spp. y *Parvovirus* porcino (50).

Las pruebas serológicas que han sido empleadas para el diagnóstico de la EOA son la IHA, SN y ELISA competitivo, anteriormente se utilizaba un paquete comercial de inmunoperoxidasa (Pronabive, México). Técnicas de inmunofluorescencia indirecta también han sido empleadas para evaluar el comportamiento de la respuesta humoral (20,36,39).

Se ha hecho uso de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica para identificar la distribución del antígeno en tejidos de animales infectados experimentalmente (35,51).

Para el aislamiento viral los tejidos más adecuados son el bulbo olfatorio, mucosa nasal, pulmón y tonsila (35,36). Se han desarrollado técnicas de biología molecular como la RT-PCR anidada para la detección de los genes N y P, así como RT-PCR punto final y en tiempo real para la detección del gen HN y N, respectivamente (15,28,52).

1.11 Prevención y control

Las medidas básicas de bioseguridad son efectivas para evitar la introducción del virus a la granja, ej. barda perimetral, tapete y vado sanitario, áreas de carga separadas, vestidores y regaderas, control de fauna, personal específico por áreas, control en movimiento de visitantes y vehículos, entre otras. También es recomendable realizar vigilancia serológica y molecular en animales de reemplazo.

Una vez que la infección está presente en la granja es posible su eliminación implementando prácticas de manejo, como limpieza y desinfección de áreas, sistema de producción todo dentro/todo fuera y de programas de vacunación. Después de ejecutar estas prácticas se deben realizar pruebas serológicas e introducir animales centinelas para confirmar la eliminación del RVP.

Actualmente existen dos vacunas comerciales elaboradas a partir de virus inactivado, que se utilizan en hembras gestantes, hembras de reemplazo, sementales y lechones. Previamente ha sido evaluada una vacuna experimental inactivada con radiación gamma, la eficacia e inmunogenicidad de dicha vacuna fue demostrada (20,53).

1.12 Antecedentes

Desarrollo de pruebas serológicas para RVP

Actualmente, son escasos los trabajos previos comparativos de técnicas serológicas para diagnosticar la infección por RVP. Han sido comparadas las técnicas de SN, ELISA competitivo e IHA usando sueros de un brote agudo de la enfermedad, se observaron valores de sensibilidad relativa de 89.1 % para la SN y ELISA, para la IHA la sensibilidad fue de 84.7 %. Al evaluar sueros de animales de 30-45 días de edad inmunizados con una vacuna experimental, observaron valores de sensibilidad 94.2, 91.4 y 80 %, para la SN, ELISA e IHA, respectivamente. Se concluyó que la SN es la prueba más sensible, sin embargo, la prueba de ELISA presentó valores de sensibilidad muy cercanos y por su fácil elaboración, interpretación y bajo costo, los autores la propusieron como prueba tamiz (54).

Otros autores compararon cuatro técnicas serológicas para el diagnóstico del RVP. En ese estudio fueron evaluadas la IHA, SN, ELISA indirecto e IFI. Todas las pruebas fueron capaces de identificar anticuerpos desde los 8 dpi. Se propuso que cualquiera de las tres pruebas puede ser utilizada en el diagnóstico, sin embargo, hay que considerar las ventajas y desventajas que mostraron cada una de las pruebas. Concluyeron que la IHA es de rápida y fácil elaboración, pero muestra resultados falsos positivos en bajas diluciones de la muestra debido a la presencia de inhibidores inespecíficos y que éstos sólo son removidos completamente al realizar un pretratamiento de las muestras con solución de heparina/MgCl². La SN e IFI requieren más tiempo en su elaboración. El ELISA indirecto mostró poca especificidad, debido a una reacción inespecífica del conjugado anti-cerdo (36).

Nordengrahn *et al.* (1999), evaluaron IHA, SN, IFI, ELISA indirecto y ELISA competitivo, con el objetivo de desarrollar una técnica más específica, sensible, de bajo costo, fácil elaboración y capaz de evaluar una gran cantidad de muestras. Este ELISA competitivo fue estandarizado empleando sueros de campo y de animales infectados experimentalmente. Los valores de sensibilidad y especificidad del ELISA competitivo fueron de 99 y 97 %, respectivamente (18).

Un trabajo posterior comparó una técnica comercial de ELISA (Svanova Biotech, Uppsala, Suecia), IPMA (Laboratorios Pronabive, Ciudad de México) y un protocolo de IHA propuesto previamente por McNeilly *et al.* (1997). Al evaluar las pruebas con sueros de animales en zonas libre de la enfermedad, las tres pruebas resultaron 100 % específicas. Cuando se evaluaron sueros de animales provenientes de granjas infectadas, la prueba de ELISA detectó 58 % del total de las muestras como positivas, la IPMA al 44 % y la IHA al 55 %. Al usar la prueba de ELISA como estándar de oro, la sensibilidad de la IPMA resultó de 68.4 %, su especificidad de 96.5 % y el coeficiente *kappa* de 0.60; la sensibilidad de la IHA en comparación con la ELISA resultó de 76.0 %, su especificidad de 83.4% y su coeficiente de *kappa* de 0.58. La IHA al ser comparada con la IPMA obtuvo 66.2 % de sensibilidad, 92.7 % de especificidad y un coeficiente de *kappa* de 0.62 (55).

Aranda *et al.* (2006), propusieron el empleo del ELISA como prueba serológica tamiz, argumentando la imprecisión de la IHA y la complejidad de la SN. Compararon el ELISA con la SN, al evaluar sueros negativos obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad del 100 %, en ambas pruebas. Cuando se evaluaron los sueros de animales inmunizados con vacunas comerciales, los sensibilidad del ELISA fue de 100, 77, 100, 92.6 y 89.2 % en los días postvacunación 0, 30, 45-135, 150 y 165, respectivamente (56).

Rivera *et al.* (2010), evaluaron el desempeño de cuatro pruebas serológicas en la detección de anticuerpos producidos durante la fase aguda y crónica de la enfermedad. Los resultados mostraron que la identificación de anticuerpos es posible hasta 20 spi. Se demostró que no hay diferencias en la prueba de IHA al utilizar 8 o 16 UHA. En la prueba de SN se obtuvieron títulos de anticuerpos más altos al determinar el punto final de la prueba mediante la hemaglutinación de los sobrenadantes de cultivos celulares. Los resultados obtenidos demostraron la utilidad e importancia del uso de pruebas con antígenos inactivados (39).

Quezada *et al.* (2010), evaluaron tres pruebas serológicas utilizando sueros positivos a cepas vacunales, de campo y de granjas libres de la enfermedad. Al ser evaluados con sueros vacunales, la SN mostró un 95 % de sensibilidad, el ELISA y la IHA, 73 y 70 %, respectivamente. En cuanto a especificidad, la SN e IHA mostraron valores de 100 %, mientras que el ELISA obtuvo el 82 %. Al evaluar sueros de campo, la SN identificó un mayor número de muestras positivas, seguida del ELISA (57).

2. Justificación

Debido a que la EOA es una enfermedad endémica de la región centro occidente del país, es necesaria la implementación de técnicas serológicas confiables para el monitoreo en áreas libres y en control de la enfermedad. El desarrollo de pruebas serológicas que empleen antígeno inactivado puede representar una opción para el diagnóstico principalmente en áreas libres de la enfermedad.

3. Hipótesis

No existen diferencias de sensibilidad y especificidad entre inhibición de la hemaglutinación, seroneutralización e inmunoperoxidasa en monoestrato de cultivos celulares para el serodiagnóstico del RVP.

4. Objetivo general

Evaluar la sensibilidad y especificidad de algunas de las pruebas serológicas disponibles para identificar anticuerpos contra el RVP.

4.1 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones para emplear la inhibición de la hemaglutinación como método de diagnóstico serológico para el RVP.
- Establecer las condiciones para realizar la prueba de seroneutralización para RVP.
- Establecer la prueba de inmunoperoxidasa para el serodiagnóstico del RVP.
- Determinar los coeficientes de *kappa* y valores predictivos de las pruebas serológicas empleadas para el RVP.

5. Material y métodos

Muestras de suero

Las muestras fueron obtenidas del banco de sueros del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-MA), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y del Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM. Se emplearon 28 sueros específicos para la cepa PAC-3, 9 sueros inmunes dirigidos a diferentes aislamientos (virus vacunales y aislamientos del año 1984 y 2013) y 12 sueros no inmunes.

Virus

La cepa PAC-3 del RVP (Jalisco/1992; número de acceso al GenBank: EF413173) fue replicada en cultivo celular de células epiteliales de riñón de cerdo (PK-15), en medio mínimo esencial de Dulbecco (D-MEM) suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB). Se tituló el virus mediante el método de Reed y Muench para obtener el valor en dosis infecciosas en cultivo celular al 50% (DICC_{50%}) y por medio de hemaglutinación para determinar las unidades hemaglutinantes (UHA).

Inhibición de la hemaglutinación (IHA)

Se realizó el tratamiento de los sueros, con ligeras modificaciones a lo previamente descrito (16). Brevemente, para el tratamiento con caolín, se homogenizaron 100 µl de suero (inactivado a 56 °C durante 30 minutos), 200 µl de caolín y 200 µl de eritrocitos de ave o bovino al 10% y se mantuvieron a 4°C durante 24 horas. Una vez que los eritrocitos y el caolín sedimentaron, se extrajo el sobrenadante y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Otras variantes del tratamiento de los sueros consistieron en solamente inactivar térmicamente el suero a 56 °C durante 30 minutos y una variante sin ningún tratamiento.

Para la prueba, se depositaron 50 µl de las muestras séricas en placas de 96 pozos de fondo en U con 50 µl de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se realizaron diluciones dobles seriadas, empezando desde 1:2 ó 1:10 (sueros con tratamiento completo) hasta 1:256 ó 1:1280. Después se añadieron 50 µl de virus (PAC-3/1992) ajustado a 4 u 8 UHA, en cada pozo. Las placas se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 50 µl de eritrocitos de ave o bovino al 0.5% a cada pozo de la placa y se realizó la lectura a los 30 o 90 minutos. El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se expresó como el recíproco de la dilución máxima en la cual el suero inhibió la actividad hemaglutinante del virus. Para el análisis estadístico, los títulos fueron transformados a logaritmo base 2 (26,58). Fueron considerados como resultados positivos títulos iguales o mayores a 1:2.

Los diferentes protocolos de IHA evaluados se designaron de la siguiente manera:

IHA 1= 4 UHA, G.R. Ave 0.5%, suero sin tratamiento.

IHA 2= 8 UHA, G.R. Ave 0.5%, suero sin tratamiento.

IHA 3= 4 UHA, G.R. Ave 0.5%, suero inactivado.

IHA 4= 8 UHA, G.R. Ave 0.5%, suero inactivado.

IHA 5= 4 UHA, G.R. Ave 0.5%, suero inactivado y adsorbido con caolín y G.R. Ave 10%.

IHA 6= 8 UHA, G.R. Ave 0.5%, suero inactivado y adsorbido con caolín y G.R. Ave 10%.

IHA 7= 4 UHA, G.R. Bov 0.5%, suero sin tratamiento.

IHA 8= 8 UHA, G.R. Bov 0.5%, suero sin tratamiento.

IHA 9= 4 UHA, G.R. Bov 0.5%, suero inactivado.

IHA 10= 8 UHA, G.R. Bov 0.5%, suero inactivado.

IHA 11= 4 UHA, G.R. Bov 0.5%, suero inactivado y adsorbido con caolín y G.R. Bov 10%.

IHA 12= 8 UHA, G.R. Bov 0.5%, suero inactivado y adsorbido con caolín y G.R. Bov 10%.

Seroneutralización

La prueba se realizó con modificaciones a lo previamente descrito (26,39). El suero fue diluido con D-MEM suplementado con 2% de suero fetal bovino. Se realizaron diluciones dobles seriadas de todos los sueros desde 1:2 hasta 1:4096 en microplacas de 96 pozos y fondo plano, con un volumen final de 50 μ l. Luego se añadieron 50 μ l del PAC-3/1992 ajustado a 300 DICC_{50%}, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se agregaron 100 μ l de suspensión de células PK-15 (10^4 células/pozo) y se incubaron durante 72 horas a 37 °C con una atmósfera del 5% de CO₂. El punto final se determinó mediante hemaglutinación (HA) en los sobrenadantes, empleando glóbulos rojos de ave al 0.5%. El recíproco de la última dilución del suero que neutralizó completamente la producción de virus hemaglutinante fue considerado el título de anticuerpos neutralizantes.

Inmunoperoxidasa en monoestrato de cultivos celulares (IPMA)

La prueba se realizó con modificaciones a lo descrito (39). Se cultivaron monoestratos de células PK-15 en placas de 96 pozos. Los monoestratos fueron infectados con 1000 DICC_{50%} de la cepa PAC-3 del RVP (Jalisco/1992). Las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 48 horas y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4%. Se realizaron lavados con PBS y posteriormente la actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol, durante 20 minutos. Se realizaron diluciones dobles seriadas del suero iniciando 1:2 hasta 1:4096, las cuales se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (22°C). Después de realizar tres lavados con PBS, se agregaron 50 μ l de proteína A HRP (diluida 1:300) a todos los pozos y se incubaron las placas a temperatura ambiente por 30 minutos. Nuevamente se realizaron lavados con PBS y se agregaron 50 μ l de sustrato 3-amino-9-etil carbazol (AEC). Se permitió la reacción por 10 minutos, se lavaron las placas con PBS y se examinaron en el microscopio invertido.

Diseño experimental

Se evaluaron 28 sueros de cerdos convalecientes, infectados experimentalmente con la cepa PAC-3, 9 sueros inmunes dirigidos a diferentes aislamientos (virus vacunales y aislamientos del año 1984 y 2013) y 12 sueros no inmunes. Cada prueba se realizó con cuatro repeticiones intraensayo y con cuatro repeticiones interensayo, para evaluar repetibilidad y reproducibilidad, respectivamente. Además, se evaluó la variabilidad interobservador en las lecturas de las pruebas IHA y SN (59). Como estándar de oro se consideró la historia clínica del animal del cual se obtuvo la muestra, es decir, si fue infectado experimentalmente o inmunizado, para realizar el cálculo de la sensibilidad, especificidad, coeficiente *kappa* y valores predictivos de las pruebas diagnósticas.

5.7 Variación interobservador

Para evaluar la variabilidad interobservador se calculó el coeficiente *kappa* tomando como referencia los resultados obtenidos de las lecturas del observador con más experiencia. El coeficiente *kappa* se interpretó del siguiente modo: $\kappa \leq 0.20$ (bajo), $0.21 \leq \kappa \leq 0.40$ (leve), $0.41 \leq \kappa \leq 0.60$ (moderado), $0.61 \leq \kappa \leq 0.80$ (bueno) y ≥ 0.80 (muy bueno) (60). Las pruebas fueron interpretadas por tres operadores con diferentes grados de experiencia, además de desconocer los resultados reportados por cada operador.

6. Resultados

Inhibición de la hemaglutinación

En los protocolos donde se emplearon 8 UHA los valores de especificidad fueron mayores al compararlos con los resultados obtenidos al trabajar con 4 UHA.

La prueba resultó más sensible al emplear glóbulos rojos de ave (hasta 99 %), sin embargo, la especificidad de la prueba se vio afectada, mostrando valores de 65, 67 y 23 % en algunos protocolos, de acuerdo a las lecturas de los observadores 1, 2 y 3, respectivamente. La mayor inespecificidad se presentó en protocolos donde los sueros solamente fueron inactivados térmicamente. El protocolo IHA 5, obtuvo valores sensibilidad y especificidad de 89 y 100 %, respectivamente, de acuerdo a las lecturas de los tres observadores. En el protocolo IHA-6 se registraron valores sensibilidad y especificidad de 89 y 100 %, respectivamente, sin embargo, de la lectura del observador 3 se obtuvo 89% de sensibilidad y 76% de especificidad. Al utilizar glóbulos rojos de bovino la sensibilidad de la prueba resultó ser más baja en comparación con los protocolos que emplean eritrocitos de ave, los valores de sensibilidad fueron de 38 hasta 82 %, siendo los valores más bajos correspondientes a los protocolos donde se realizó tratamiento completo del suero. En contraste, los valores de especificidad fueron más altos al ser comparados con los resultados obtenidos en los protocolos que emplean eritrocitos de ave, obteniendo valores de 83 hasta 100 %, igualmente una constante fue, la baja especificidad en las pruebas donde el suero solo fue inactivado térmicamente. Los resultados de especificidad y sensibilidad se muestran en el Cuadro 1, 3 y 5.

Los valores de cero en la desviación estándar y coeficiente de variación en los testigos negativos indican la reproducibilidad de los protocolos IHA 5 y 6, además de que no se presentan resultados falsos positivos, de acuerdo a las lecturas de los observadores 1 y 2. Las desviaciones estándar, coeficientes de variación y títulos promedio se muestran en los Cuadros 2, 4 y 6.

Seroneutralización.

El protocolo empleado mostró sensibilidad de 88 a 91 %, sin embargo, hubo cuatro resultados falsos positivos, restándole especificidad. Los resultados de especificidad y sensibilidad se muestran en el Cuadro 1, 3 y 5. Las desviaciones estándar, coeficientes de variación y títulos promedio se muestran en los Cuadros 2, 4 y 6.

Inmunoperoxidasa en monoestrato de cultivos celulares (IPMA)

La prueba de IPMA mostró buena sensibilidad y excelente especificidad, los valores de cero en la desviación estándar y coeficiente de variación en los testigos negativos indican la reproducibilidad de la prueba, sin la presentación de resultados falsos positivos. Los resultados de especificidad y sensibilidad se muestran en el cuadro 1. Las desviaciones estándar, coeficientes de variación y títulos promedio se muestran en el Cuadro 2. En la Figura 4, se muestran una reacción de inmunodetección por IPMA positiva y negativa.

Variación interobservador.

La concordancia entre el observador 1 y 2 fue buena solamente en una lectura de las pruebas de IHA (IHA-3, $\kappa=0.76$), en el resto de las lecturas la concordancia muy buena ($\kappa=0.83-1.00$), en la prueba de SN la concordancia fue muy buena ($\kappa=0.94$) entre estos observadores. La concordancia de los resultados de las lecturas de las pruebas de IHA entre el observador 1 y 3 fue leve en uno de los casos (IHA-4, $\kappa=0.40$), moderada en otro (IHA-1, $\kappa=0.60$), en cuatro fue buena ($\kappa=0.60-0.77$) y en seis muy buena ($\kappa=0.81-1.00$). En la prueba de SN la concordancia de los resultados obtenidos por el observador 2 y 3 en relación al observador 1 fue muy buena $\kappa=0.94$ y $\kappa=0.93$, respectivamente. Cabe destacar que en las lecturas de la prueba IHA-5 la concordancia entre los tres observadores fue de $\kappa=1.00$. En el Cuadro 7 se muestran completos los valores de concordancia de los resultados obtenidos por los observadores 2 y 3, en comparación a los obtenidos por el observador 1.

Cuadro 1. Sensibilidad, especificidad, coeficiente *kappa* y valores predictivos de las pruebas de IHA, SN e IPMA, valores obtenidos de las lecturas del observador 1.

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Coef. <i>Kappa</i>	VPP	VPN
IHA 1	95	77	0.74	0.93	0.84
IHA 2	94	98	0.86	0.99	0.83
IHA 3	98	65	0.68	0.89	0.92
IHA 4	94	67	0.63	0.90	0.83
IHA 5	89	100	0.80	1.00	0.75
IHA 6	89	100	0.80	1.00	0.75
IHA 7	79	98	0.65	0.99	0.62
IHA 8	79	100	0.65	1.00	0.62
IHA 9	73	90	0.51	0.95	0.53
IHA 10	77	90	0.56	0.96	0.57
IHA 11	43	100	0.28	1.00	0.38
IHA 12	44	100	0.29	1.00	0.38
SN	91	96	0.80	0.99	0.77
IPMA	85	100	0.73	1.00	0.68

VPP= Valor predictivo positivo

VPN= Valor predictivo negativo

Cuadro 2. Título promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las pruebas de IHA, valores obtenidos de las lecturas del observador 1.

Prueba	Testigos positivos			Testigos negativos		
	Título	DE	CV	Título	DE	CV
IHA 1	6.7	0.37	0.10	0.8	0.75	0.44
IHA 2	6.3	0.51	0.09	0.2	0.21	0.00
IHA 3	6.8	0.43	0.06	1.6	1.44	0.34
IHA 4	6.3	0.76	0.15	1.4	1.26	0.53
IHA 5	5.9	0.45	0.07	0.0	0.00	0.00
IHA 6	5.9	0.45	0.07	0.0	0.00	0.00
IHA 7	4.0	0.51	0.15	0.0	0.04	0.00
IHA 8	3.5	0.52	0.20	0.0	0.00	0.00
IHA 9	3.2	1.42	0.35	0.4	0.76	0.00
IHA 10	3.4	0.71	0.35	0.3	0.48	0.30
IHA 11	1.9	0.07	0.01	0.0	0.00	0.00
IHA 12	2.1	0.62	0.32	0.0	0.00	0.00
SN	6.1	1.19	0.20	0.1	0.11	0.30
IPMA	5.7	1.10	0.20	0.0	0.00	0.00

DE= Desviaciones estándar

CV= Coeficiente de variación

Cuadro 3. Sensibilidad, especificidad, coeficiente *kappa* y valores predictivos de las pruebas de IHA, SN e IPMA, valores obtenidos de las lecturas del observador 2.

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Coef. <i>Kappa</i>	VPP	VPN
IHA 1	95	79	0.74	0.94	0.87
IHA 2	94	94	0.85	0.98	0.84
IHA 3	96	67	0.65	0.90	0.84
IHA 4	92	73	0.65	0.91	0.74
IHA 5	89	100	0.80	1.00	0.75
IHA 6	89	100	0.80	1.00	0.75
IHA 7	79	100	0.66	1.00	0.62
IHA 8	80	100	0.67	1.00	0.63
IHA 9	71	90	0.48	0.95	0.50
IHA 10	76	90	0.54	0.96	0.56
IHA 11	38	100	0.24	1.00	0.36
IHA 12	44	100	0.28	1.00	0.38
IPMA	ND	ND	ND	ND	ND
SN	88	96	0.75	0.99	0.73

VPP= Valor predictivo positivo

VPN= Valor predictivo negativo

ND= No disponible

Cuadro 4. Título promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las pruebas de IHA, valores obtenidos de las lecturas del observador 2.

Prueba	Testigos positivos			Testigos negativos		
	Título	DE	CV	Título	DE	CV
IHA 1	6.7	0.54	0.17	0.8	1.14	0.90
IHA 2	6.6	0.30	0.05	0.2	0.04	0.02
IHA 3	6.8	0.51	0.14	1.7	1.60	0.78
IHA 4	6.2	0.75	0.25	1.2	1.04	0.53
IHA 5	5.9	0.53	0.09	0.0	0.00	0.00
IHA 6	5.3	0.97	0.18	0.0	0.00	0.00
IHA 7	3.8	0.39	0.14	0.0	0.00	0.00
IHA 8	3.6	0.49	0.19	0.0	0.00	0.00
IHA 9	3.0	1.44	0.77	0.4	0.78	0.75
IHA 10	3.4	0.86	0.40	0.3	0.37	0.54
IHA 11	1.8	0.33	0.18	0.0	0.00	0.00
IHA 12	2.1	0.37	0.16	0.0	0.00	0.00
IPMA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SN	5.9	1.35	0.25	0.1	0.16	0.46

DE= Desviaciones estándar

CV= Coeficiente de variación

ND= No disponible

Cuadro 5. Sensibilidad, especificidad, coeficiente *kappa* y valores predictivos de las pruebas de IHA, SN e IPMA, valores obtenidos de las lecturas del observador 3.

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Coef. <i>Kappa</i>	VPP	VPN
IHA 1	96	52	0.52	0.86	0.86
IHA 2	94	67	0.63	0.90	0.79
IHA 3	97	44	0.45	0.85	0.94
IHA 4	99	23	0.29	0.80	0.94
IHA 5	89	100	0.80	1.00	0.75
IHA 6	95	73	0.68	0.92	0.87
IHA 7	71	94	0.51	0.97	0.53
IHA 8	82	83	0.57	0.95	0.61
IHA 9	76	83	0.49	0.94	0.52
IHA 10	74	83	0.48	0.95	0.63
IHA 11	52	100	0.36	1.00	0.42
IHA 12	51	100	0.34	1.00	0.41
IPMA	ND	ND	ND	ND	ND
SN	91	85	0.73	0.95	0.76

VPP= Valor predictivo positivo

VPN= Valor predictivo negativo

ND= No disponible

Cuadro 6. Título promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las pruebas de IHA, valores obtenidos de las lecturas del observador 3.

Prueba	Testigos positivos			Testigos negativos		
	Título	DE	CV	Título	DE	CV
IHA 1	7.2	0.58	0.12	2.7	2.19	0.65
IHA 2	6.7	0.51	0.13	1.5	1.41	0.55
IHA 3	7.2	0.63	0.11	3.5	2.21	0.47
IHA 4	7.0	0.59	0.10	3.9	1.28	0.48
IHA 5	6.2	0.37	0.06	0.0	0.00	0.00
IHA 6	6.0	1.20	0.28	1.2	1.75	1.14
IHA 7	3.4	1.12	0.35	0.2	0.34	0.45
IHA 8	4.1	0.90	0.36	0.9	1.60	1.19
IHA 9	4.1	1.85	0.67	1.0	1.56	0.98
IHA 10	3.8	1.23	0.64	1.0	1.75	1.19
IHA 11	2.4	0.39	0.15	0.0	0.00	0.00
IHA 12	2.5	0.75	0.20	0.0	0.00	0.00
IPMA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SN	6.3	1.35	0.25	0.4	0.68	0.83

DE= Desviaciones estándar

CV= Coeficiente de variación

ND= No disponible

Cuadro 7. Variación interobservador de las pruebas serológicas empleadas.

Prueba	Coeficiente <i>Kappa</i>	
	Observador	Observador
	2*	3*
IHA 1	0.87	0.60
IHA 2	0.95	0.77
IHA 3	0.76	0.66
IHA 4	0.84	0.40
IHA 5	1.00	1.00
IHA 6	1.00	0.72
IHA 7	0.94	0.81
IHA 8	0.98	0.83
IHA 9	0.94	0.84
IHA 10	0.83	0.76
IHA 11	0.91	0.83
IHA 12	0.92	0.85
IPMA	ND	ND
SN	0.94	0.93

ND= No disponible

* En comparación al observador 1

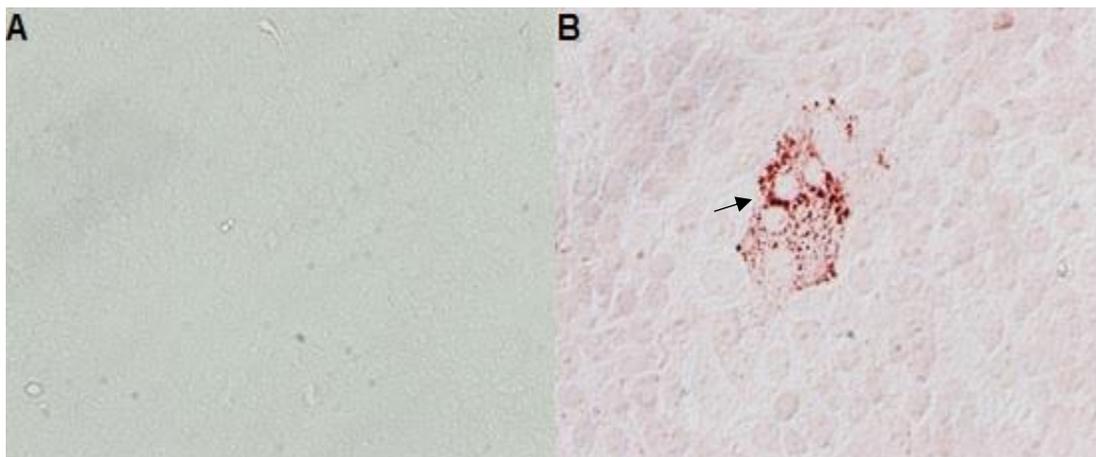


Figura 4. IPMA negativa (A) y positiva (B), dilución de suero 1:1024, aumento 400 X. La flecha señala cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.

7. Discusión

Desde 1980 han ocurrido brotes de EOA principalmente en el centro del país, región considerada endémica de la enfermedad, aunque también ha sido diagnosticada por técnicas serológicas en diferentes estados del país (16,17). Los estudios epidemiológicos sobre la enfermedad han utilizado ampliamente la prueba de IHA, debido a que es fácil de realizar y a que ha mostrado buena sensibilidad y especificidad en comparación con otras pruebas, como SN y ELISA (36,54).

Es de suma importancia determinar las variables bajo las cuales las pruebas se llevarán a cabo, con el fin de poder obtener resultados objetivos, precisos y reproducibles. En este estudio se identificó que el protocolo que ofreció la mayor reproducibilidad y concordancia ($\kappa= 1.0$), entre las lecturas de tres observadores, fue el IHA 5, corroborando la importancia de la inactivación de las proteínas del sistema de complemento y remoción de inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación (26,36).

Tres clases de inhibidores de la hemaglutinación para el virus de Influenza A, han sido designados como alfa, beta y gamma, identificados en suero de diferentes especies animales, incluido el humano (61,62). Los inhibidores del tipo alfa y gama son glicoproteínas sializadas, su mecanismo de acción es competir con los receptores celulares para unirse a la hemaglutinina (63). Los receptores para los virus de influenza A, son NeuAc α 2,3Gal y NeuAc α 2,6Gal, dependiendo de la especie animal que el virus infecte (64), por esto, es posible que estos inhibidores sean similares para el *Rubulavirus* porcino. Los inhibidores beta son componentes termolábiles, que tienen actividad neutralizante e inhibidora de la hemaglutinación (65–67). Los inhibidores alfa son termoestables, sin embargo, no son neutralizantes (68). Mientras que los inhibidores del tipo gamma son termoestables y poseen actividad neutralizante (69). Es necesario remover o suprimir la actividad de estos inhibidores para evaluar de manera más precisa la presencia de anticuerpos dirigidos a la proteína HN.

McNeilly *et al.* (1997), desarrollaron un método que remueve totalmente a los inhibidores de la hemaglutinación, este método emplea una suspensión de glóbulos rojos de cobayo al 10% y heparina/MgCl₂, por lo cual, los autores propusieron que los inhibidores de la hemaglutinación para el RVP son lipoproteínas. También emplearon un pretratamiento de los sueros con caolín y glóbulos rojos de cobayo, con este pretratamiento obtuvieron resultados falsos positivos. Sin embargo, en el estudio presente, al realizar el pretratamiento de las muestras con suspensión de glóbulos rojos de ave al 10 % y caolín, fue posible remover completamente los inhibidores de la hemaglutinación, por lo que proponemos, que la naturaleza de los inhibidores puede ser lipoproteica o glicoproteica (70).

La prueba IHA 5 generó muy buenos valores de sensibilidad y especificidad, 89 y 100 %, respectivamente, debido a esto, podría ser empleada ampliamente como prueba tamiz en áreas endémicas de la enfermedad y también como prueba confirmatoria. Además, fue la única prueba en la que las lecturas de los tres observadores coincidieron totalmente ($\kappa = 1.0$), es decir, es de fácil lectura y de menor margen de error al interpretar los resultados.

El antígeno usado en este estudio fue la cepa PAC-3 debido a su alta actividad hemaglutinante, además de que la antigenicidad cruzada es buena con algunas otras cepas de RVP, especialmente las pertenecientes al genogrupo 1 (71,72). Además, los resultados de este estudio demostraron la capacidad de la cepa PAC-3 para reconocer anticuerpos dirigidos a cepas más recientes y hacia cepas vacunales.

La prueba de IPMA resultó muy sensible y específica, la elección de la línea celular fue adecuada, ya que soporta la replicación viral y es fácil observar la inmunodetección de los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos. Esta prueba posee varias ventajas, entre ellas, la fácil preparación de las placas y la infección de las células, la estabilidad de la tinción permite almacenar las muestras durante

meses y la seguridad de trabajar con un antígeno inactivado, lo cual la hace una adecuada prueba diagnóstica a ser empleada en zonas libres de la enfermedad.

En la SN se obtuvieron buenos niveles de sensibilidad y especificidad, hasta 91 % y 96 %, respectivamente. Los resultados falsos positivos que se obtuvieron, fueron de títulos de hasta 2 Log₂ y podrían ser debidos a la actividad del sistema de complemento, previamente se ha demostrado con otros *Rubulavirus*, que éste es activado mediante la vía alterna (73).

8. Conclusión

En la prueba de IHA es crucial la elección de la especie de los glóbulos rojos, la inactivación térmica de los sueros y la adsorción de los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación. En este trabajo se propone un método de IHA, que ofrece valores altos de sensibilidad y especificidad, este método incluso podría ser utilizado como prueba serológica confirmatoria. En este método se emplearon 4 UHA, glóbulos rojos de ave al 0.5% y el tratamiento completo de las muestras séricas. Es importante destacar la utilidad de realizar lecturas por dos personas para establecer un mejor criterio diagnóstico.

El ensayo de inmunoperoxidasa en monoestrato celular mostró valores de sensibilidad y especificidad similares a los de la seroneutralización. El desarrollo de esta prueba, permitiría su implementación en áreas libres de la enfermedad, con bajo riesgo de diseminación de la enfermedad por el uso de antígenos inactivados.

De acuerdo a la metodología empleada en la seroneutralización, se concluye que el sistema de complemento u otros inhibidores de la infectividad viral tienen actividad en sistemas *in vitro* en el diagnóstico del RVP.

9. Referencias

1. Stephano HA, Gay GM, Ramírez T. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet Rec.* 1988;2:6–10.
2. Stephano HA, Gay G. El síndrome del ojo azul: Estudio experimental. En: *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria.* Mexico City, Mexico; 1983. p. 523–8.
3. Stephano HA, Gay G. Experimental studies of a new viral syndrome in pigs called “blue eye” characterized by encephalitis and corneal opacity. En: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress.* Ghent, Belgium; 1984. p. 71.
4. Stephano HA, Gay G. El síndrome del ojo azul en cerdos. *Síntesis Porcina.* 1985;42–9.
5. Stephano HA, Gay GM, Kresse J. Properties of a paramyxovirus associated to a new syndrome (blue eye) characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. En: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress.* Barcelona, Spain.; 1986. p. 455.
6. Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Ericsson A. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch Virol.* 1986;91(3–4):221–31.
7. Berg M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: Comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J Gen Virol.* 1991;72(5):1045–50.
8. Berg M, Hjertner B, Moreno-López J, Linné T. The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: The P protein mRNA is edited. *J Gen Virol.* 1992;73(5):1195–200.
9. Sundqvist A, Berg M, Moreno-López J, Linné T. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol.* 1992;5:331–40.

10. Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: Comparative analysis of paramyxovirus F proteins. *Virus Genes*. 1997;14(1):55–61.
11. Svenda M, Berg M, Moreno-López J, Linné T. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: Identification of possible functional domains. *Virus Res*. 1997;48(1):57–70.
12. Wang LF, Collins PL, Fouchier RAM, Kurath G, Lamb RA, Randall RE, Rima B. Paramyxoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E, editor. *Virus Taxonomy Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 9th ed. California, USA: Academic Press; 2012. p. 672–85.
13. Stephano H. Blue Eye Disease: Clinical Signs and Lesions. In: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman J, editor. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*. 1st ed. Iowa, USA: Iowa State Press; 2002. p. 47–50.
14. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S. Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J Comp Pathol*. 1997;117:237–52.
15. Sánchez-Betancourt JI, Santos-López G, Alonso R, Dopporto JM, Ramírez-Mendoza H, Mendoza SE, Hernández-López J, Reyes-Leyva J, Trujillo-Ortega M. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Res Vet Sci*. 2008;85(2):359–67.
16. Escobar-López AC, Rivera-Benítez JF, Castillo-Juárez H, Ramírez-Mendoza H, Trujillo-Ortega ME, Sánchez-Betancourt J. Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in Sera of Field Swine and their Seroprevalence. *Transbound Emerg Dis*. 2012;59:416–20.
17. Fuentes-Rangel M, Carreón-López R, Ramírez-Mendoza H, Trujillo-Ortega ME, De Fraire I. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. *Vet México*.

- 1992;23(1):37–9.
18. Nordengrahn A, Svenda M, Moreno-López J, Bergvall A, Hernández-Jáuregui P, McNeilly F, Allan GM, Merza M. Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus, La Piedad Michoacan Virus. *J Vet diagnostic Investig.* 1999;11(4):319–23.
 19. Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jáuregui P, Linné T, Moreno-López J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen Virol.* 1990;71(3):609–13.
 20. Kirkland PD, Stephano A. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle, and Nipah Virus Infections. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor D, editor. *Diseases of Swine.* 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006. p. 1153.
 21. Wang LF, Hansson E, Yu M, Chua KB, Mathe N, Crameri G, Rima BK, Moreno-López J, Eaton B. Full-length genome sequence and genetic relationship of two paramyxoviruses isolated from bat and pigs in the Americas. *Arch Virol.* 2007;152(7):1259–71.
 22. Berg M, Moreno-López J. The Molecular Biology of Porcine Rubulavirus (La Piedad Michoacán Virus, LPMV). In: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman J, editor. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine.* 1st ed. Iowa, USA: Iowa State Press; 2002. p. 71–6.
 23. Cuevas-Romero SJ, Rivera-Benítez JF, Blomström AL, Ramliden M, Hernández-Baumgarten E, Hernández-Jáuregui P, Ramírez-Mendoza H, Berg M. Molecular characterisation of Porcine rubulavirus (PorPV) isolates from different outbreaks in Mexico. *Virus Genes.* 2016;52(1):81–90.
 24. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo-Ruiz V, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E. NeuAc2,3Gal-glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol.* 1997;118(2):327–32.
 25. Reyes-Leyva J, Espinosa B, Santos-López G, Zenteno R, Hernández-López J, Vallejo-Ruiz V, Zenteno E. Purification and characterization of the Hemagglutinin-Neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj J.*

- 1999;16(9):517–22.
26. Hernández-López J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;64(4):367–81.
 27. Linné T, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B, Moreno-López J. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet Microbiol.* 1992;33(1–4):263–73.
 28. Wiman AC, Hjertner B, Linné T, Herron B, Allan GM, McNeilly F, Adair B, Moreno-López J, Berg M. Porcine Rubulavirus LPMV RNA Persists in the Central Nervous System of Pigs After Recovery From Acute Infection. *J Neurovirol.* 1998;4(5):545–52.
 29. Hjertner B, Wiman AC, Svenda M, Berg M, Moreno-López J, Linné T. Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). *Arch Virol.* 1998;143(3):425–39.
 30. Flores-Ocelotl M, Rosas-Murrieta NH, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J, Herrera-Camacho I, Santos-López G. Transcription of interferon stimulated genes in response to porcine rubulavirus infection in vitro. *Brazilian J Microbiol.* 2011;42(3):1167–75.
 31. Santos-López G, Flores E, Baños R, Herrera-Camacho I, Reyes-Leyva J. Purification of the Porcine rubulavirus attachment protein by liquid isoelectric focusing. *Protein Expr Purif.* 2004;35(1):120–5.
 32. Santos-López G, Hernández-López J, Borraz-Argüello MT, Ramírez-Mendoza H, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. *Arch Med Vet.* 2004;36(2):119–36.
 33. Reyes-Leyva J, García-Morales O, Santos-López G, Vallejo-Ruiz V, Ramírez-Mendoza H, Hernández-López J. Detection of viremia in the Porcine rubulavirus experimental infection. *Arch Med Vet.* 2004;36(1):39–47.
 34. Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J, Hernández-López J, Ramírez-Mendoza H, Delannoy P, Zenteno E. Differential expression of sialic acid on porcine organs

- during the maturation process. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2000;126(3):415–24.
35. Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linné T, Moreno-López J, Hernández P, Kennedy S, Carroll BP, Herron B, Foster JC, Adair B. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest*. 1996;8(4):405–13.
 36. McNeilly F, Walker I, Allan GM, Foster JC, Linné T, Merza M H-JP, Kennedy S, Adair B. A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J Vet diagnostic Investig*. 1997;9(1):3–9.
 37. Cuevas-Romero SJ, Hernández-Baumgarten E, Kennedy S, Hernández-Jáuregui P, Berg M, Moreno-López J. Long-term RNA persistence of Porcine rubulavirus (PorPV-LPMV) after an outbreak of a natural infection: The detection of viral mRNA in sentinel pigs suggests viral transmission. *Virus Res*. 2014;188:155–61.
 38. Cuevas-Romero SJ, Rodríguez-Ropón A, Kennedy S, Moreno-López J, Berg M, Hernández-Jáuregui P. Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;127(1–2):148–52.
 39. Rivera-Benítez JF, Martínez-Bautista R, Escobar-López AC, García-Contreras A, Hernández-López J, Reyes-Leyva JR, Ramírez-Mendoza H. Assay of humoral immunity to porcine rubulavirus (PoRV) experimental infection. In: *Proceedings of the 21st IPVS Congress*. Vancouver, Canada; 2010. p. 857.
 40. Rodríguez-Ropón A, Hernández-Jáuregui P, Sánchez-Torres L, Favila-Castillo L, Estrada-Parra S, Moreno-López J, Kennedy S. Apoptosis in lymph nodes and changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of pigs infected with porcine rubulavirus. *J Comp Pathol*. 2003;128(1):1–8.
 41. Rosales-Espinosa JAF, Ramos-Rivera MI, Martínez-Lara A, Correa-Girón P. Análisis retrospectivo (1972-1986) de la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación contra el Paramyxovirus porcino LPM, al parecer

- asociado con el “Síndrome del ojo azul.” Técnica Pecu México. 1988;26(3):304–11.
42. Morilla A, González-Vega D, Estrada E, Diosdado F. Seroepidemiology of Blue Eye Disease. In: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman J, editor. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. 1st ed. Iowa, USA: Iowa State Press; 2012. p. 59–64.
 43. Arellanes E, Fuentes-Rangel MC, Carreón-Nápoles R, Ramírez-Mendoza H. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en el gato doméstico (*Felis catus*). Vet México. 1994;25(3).
 44. Cuetero-Reyes S, Ramírez-Mendoza H, Carreón-Nápoles R, Campuzano-Granados J. Inoculación experimental del paramixovirus de ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar), vía intramuscular. Vet México. 1995;26(3):231–5.
 45. Solís M, Ramírez-Mendoza H, Mercado-García C, Espinosa S, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J, Hernández-López J. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. Res Vet Sci. 2007;83(3):403–9.
 46. Stephano HA, Gay G. El síndrome del ojo azul en cerdos en granjas engordadoras. En: Memorias del XXX Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdos (AMVEC). Puerto Vallarta, Jalisco.; 1983. p. 71–4.
 47. Rivera-Benítez JF, Cuevas-Romero SJ, Pérez-Torres A, Reyes-Leyva J, Hernández-López J, Ramírez-Mendoza H. Respiratory disease in growing pigs after Porcine rubulavirus experimental infection. Virus Res. 2013;176(1–2):137–43.
 48. Hernández-Jáuregui P, Ramírez Mendoza H, Mercado-García C, Moreno-López J, Kennedy S. Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) infection in pregnant gilts. J Comp Pathol. 2004;130(1):1–6.
 49. Dewey C. Diseases of the Nervous and Locomotor Systems. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor D, editors. Diseases of Swine. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006. p. 1153.

50. Sørensen V, Jorsal SE, Mousing J. Diseases of the Respiratory System. In: In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor D, eds. Diseases of Swine. 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006. p. 1153.
51. Jasso-Escutia M. Distribución del virus de la enfermedad del ojo azul en cerdos infectados experimentalmente. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.
52. Rivera-Benítez JF, García-Contreras A, Reyes-Leyva J, Hernández-López J, Sánchez-Betancourt JI, Ramírez-Mendoza H. Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. *Arch Virol.* 2013;158(9):1849–56.
53. Correa-Girón P, Martínez A, Pérez J, Coba MA SM. Vaccination Against Blue Eye Disease. In: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman J, editors. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. 1st ed. Ames, Iowa: Iowa State Press; 2002. p. 65–9.
54. Hernández-Jáuregui P, Sundquist A, Fuentes M, Díaz-Orea A, Reyes-Leyva J, Hernández-Baumgarten E, Moreno-López J. Correlación entre las pruebas de Virus Neutralización, Inhibición de la Hemaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el Paramixovirus del Síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Vet México.* 1992;23:217–22.
55. González-Vega D., Diosdado F., Nordengrahn A., Mercado M., Hernández-Jáuregui P., Moreno-López J. In: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman J, eds. Trends in Emerging Viral Infections of Swine. 1st ed. Ames, Iowa: Iowa State Press; 2002. p. 387.
56. Aranda M, Wence J, Lara J, Antillón A, Palomino I, Escamilla J, Soto E, Sarfati D, Lozano B. Sensibilidad y especificidad de la técnica de virus suero neutralización y ELISA para detectar anticuerpos contra la enfermedad de ojo azul. En: Memorias del XLI Congreso Nacional de AMVEC. Ixtapa, Guerrero; 2006. p. 196.
57. Quezada-Monroy F, Echeveste R, Verde-Rojo E, Lozano-Dubernard B, Sarfati-Mizrahi D, Soto-Priante E, Carreon-Napoles R, Lara-Puente H. Comparison between Virus Neutralization (VN) test, ELISA test and

- Hemmagglutination Inhibition (HI) test for Blue Eye Disease (BED) diagnosis. In: Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress. Vancouver, Canada; 2010. p. 229.
58. Ramírez-Mendoza H, Carreón-Nápoles R, Mercado-García C, Rodríguez-Torres J. Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. *Vet México*. 1996;27:257–9.
 59. Phetsouvanh R., Thojaikong T., Phoumin P., Sibounheuang B. Phommasone K., Chansamouth V., Lee SJ., Newton PN. Blacksell SD. Inter- and Intra-Operator Variability in the Reading of Indirect Immunofluorescence Assays for the Serological Diagnosis of Scrub Typhus and Murine Typhus. *Am J Trop Med Hyg*. 2013. 88(5):932-6.
 60. Landis JR, Koch G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.
 61. Križanová O, Rathová V. Serum Inhibitors of Myxoviruses. In: Arber W, Braun W, Cramer F, Haas R, Henle W, Hofschneider PH, et al., editors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1969. p. 125–51.
 62. Gottschalk A., Belyavin G BF. Glycoproteins: Their composition, structure and function. 2nd ed. Gottschalk A, editor. New York, USA: Elsevier; 1972. P. 1378.
 63. Cohen A, Belyavin G. Hemagglutination inhibition of Asian influenza viruses: A new pattern of response. *Virology*. 1959;7(1):59–74.
 64. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Cambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. *J Virol*. 2000;74(24):11825–31.
 65. Ginsberg HS, Horsfall F. A labile component of normal serum which combines with various viruses; neutralization of infectivity and inhibition of hemagglutination by the component. *J Exp Med*. 1949;90(5):475–95.
 66. Chu C. The action of normal mouse serum on Influenza virus. *J Gen Microbiol*. 1951;5:739–57.

67. Burnet FM, McCrea J. Inhibitory and Inactivating Action of Normal Ferret Sera against an Influenza Virus Strain. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1946;24(4):277–82.
68. Francis T. Dissociation of hemagglutinating and antibody measuring capacities of Influenza virus. *J Exp Med.* 1947;85(1):1–7.
69. Ryan-Poirier KA, Kawaoka Y. Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. *J Virol.* 1991;65(1):389–95.
70. Haukenes G, Hjeltnes B. Kinetics of the binding of immunoglobulins, antibodies and virus haemagglutination inhibitors to kaolin. *Biologicals.* 1991;19(1):31–5.
71. Sánchez-Betancourt JI, Trujillo-Ortega ME, Mendoza SE, Reyes-Leyva J, Alonso R. Genetic and antigenic changes in porcine rubulavirus. *Can J Vet Res.* 2012;76(3000):33–7.
72. Borraz-Argüello M, Santos-López G, Vallejo-Ruiz V, Herrera-Camacho I, Reyes-Leyva J. Caracterización biológica de tres aislamientos naturales del Rubulavirus porcino (México). *Rev Biol Trop.* 2008;56(2):487–99.
73. Johnson JB, Capraro GA, Parks G. Differential mechanisms of complement-mediated neutralization of the closely related paramyxoviruses simian virus 5 and mumps virus. *J Virol.* 2008;376(1):112–23.