

Nº 218
REV.



**DETECCION VIROLOGICA Y SEROLOGICA DEL
PARAMYXOVIRUS DEL OJO AZUL EN LA RATA.**

Tesis presentada para la obtención del título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
Ante la División de Estudios Profesionales de la
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
de la
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
por
GERARDO RAMIREZ HERNANDEZ



Asesores: M.V.Z. Rosalba Carreón Nápoles
M.V.Z. Humberto Ramírez Mendoza

México, D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

CONTENIDO.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y METODOS.....	13
RESULTADOS.....	18
DISCUSION.....	19
CONCLUSION.....	21
LITERATURA CITADA.....	22
CUADROS	29

RESUMEN.

RAMIREZ HERNANDEZ GERARDO. Detección Viroológica y Serológica del Paramyxovirus del Ojo Azul en la Rata. Bajo la asesoría de : M.V.Z. Rosalba Carreón Nápoles y M.V.Z. Humberto Ramírez Mendoza.

El paramyxovirus del ojo azul (POA) aparece en la República Mexicana en el año de 1980 y hasta la fecha el cerdo es la única especie afectada. Se desconoce el papel que juegan en la diseminación de la enfermedad otras especies animales silvestres y/o domésticos. Existiendo la necesidad de determinar si éstas pueden tener implicación en la transmisión de la enfermedad. Para el presente trabajo se seleccionó a la rata. Se colectaron 25 especímenes de una granja a la que previamente se le había diagnosticado la enfermedad del ojo azul. Posteriormente a su captura, para el aislamiento viral se tomó el encéfalo realizándose inmunofluorescencia directa e inoculándose un monoestrato celular de la línea PK-15, éste se observó en el microscopio. Se hizo la prueba de hemoaglutinación de los sobrenadantes de los tubos de Leighton de las 96 horas postinoculación. Se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca para la detección serológica de anticuerpos contra POA utilizando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) y sueroneutralización (SN). El resultado de la inmunofluorescencia directa del encéfalo mostró tres muestras con fluorescencia. La inoculación de células PK-15 con macerado individuales de los encéfalos para el aislamiento viral no mostraron reacción en los tres pases ciegos realizados por lo tanto se consideraron negativos. La prueba de hemoaglutinación en placa resultó negativa. Las pruebas serológicas por IHA mostraron títulos de anticuerpos de 1:12 en 9 ratas, 1:6 en 2 ratas y las 14 restantes no reaccionaron a la prueba. De acuerdo a estos títulos, los resultados fueron considerados negativos dado que en la literatura se cita como criterio de positividad a títulos IH mayores de 1:16. En lo que respecta a la técnica de SN, todos los sueros resultaron negativos.

INTRODUCCION.

A lo largo de la historia de la humanidad el hombre ha diseñado una variedad infinita de técnicas para procurarse un medio propicio para su desarrollo. La mayoría de éstas técnicas han sido ideadas principalmente para aumentar la producción de alimentos de origen vegetal y animal. Se puede considerar que una de las actividades pecuarias de más desarrollo es la producción porcina, ya que el consumo de carne de cerdo es mayor que el de otras especies en todo el orbe, además al cerdo se le ha considerado como una excelente fuente de proteína de origen animal. Por esto es importante a nivel técnico mantener ésta producción y fomentarla. Sin embargo, ésta se ve afectada por las enfermedades ya que decrecen la productividad del 15 al 40 %; hay que tomar en cuenta que cuando se presentan por primera vez, pueden afectar a toda la piara y posteriormente permanecen en forma enzootica en la granja (37). Este es el caso de las enfermedades virales, como ejemplo tenemos a la enfermedad del ojo azul.

Esta enfermedad, se presentó en la Piedad, Michoacán, México en el año de 1980 (1,33). Se caracteriza por afectar al cerdo, siendo los lechones de 2 a 15 días de edad los más susceptibles, los principales signos son: nerviosos tales como incoordinación, rigidez principalmente en miembros posteriores, temblores musculares, marcha rígida o mediante brincos. Algunos cerdos padecen opacidad corneal que puede variar desde 1 hasta 50% de los animales afectados, ésta

generalmente es unilateral, pero en ocasiones llega a ser bilateral. Con frecuencia sólo se observa opacidad de la córnea sin signos nerviosos en lechones. No hay anorexia ya que el animal continúa mamando mientras pueda desplazarse hacia la madre. Algunos muestran hiperestecia, y si son levantados, hacen movimiento de pedaleo. Más tarde presentan postración, generalmente en decúbito lateral, y finalmente están letárgicos, con algunos movimientos involuntarios, mirada pérdida, pupila dilatada, ceguera y en ocasiones nistagmus. Al mismo tiempo de los signos descritos, puede presentarse fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, dorso arqueado, conjuntivitis, ligero edema palpebral, epífora. El porcentaje de morbilidad en las camadas afectadas varía del 20 al 90 % y la mortalidad va del 40 al 100 % (8), presentándose de 30 a 48 horas después del primer signo y entre 2 y 7 días en casos posteriores.

En animales de más de 30 días de edad, la enfermedad se inicia generalmente 2 ó 3 semanas después de que los cerdos son agrupados en los corrales y son sometidos a un intenso manejo (vacunaciones, baño, tratamiento individual) (2,28). Los signos nerviosos son raros y pocos mueren por la enfermedad, a menos que se asocie con otras infecciones de las cuales, las más frecuentes son las enfermedades respiratorias (Actinobacillus pleuropneumoniae, Pasteurella multocida, Mycoplasma hyopneumoniae) (17). El curso de la enfermedad es de 1 a 4 días (29). El porcentaje de mortalidad es menor al 1 % (3). Se reporta que menos del 1

hasta 20 % de los cerdos desarrollan opacidad de la córnea, uni o bilateral.

En el pie de cría se afectan los siguientes parámetros reproductivos: Aumento de hembras repetidoras (Baja de 15 a 20 % la fertilidad del hato persistiendo por 6 a 8 meses), aumento en el número de lechones nacidos muertos (2 al 24 %) y fetos momificados (1 al 5 %). En sementales afectados se ha referido, que a las 10 semanas postbrote, éstos presentan: anorexia, opacidad de la córnea unilateral, deterioro gradual de la condición física, orquitis aguda unilateral, atrofia del testículo, epididimitis bilateral a nivel de la cabeza con formaciones quísticas, deterioro progresivo de la libido y disminución de la motilidad espermática (24,28,31,32,33,34,36).

Dadas las características señaladas y los estudios realizados, esta enfermedad tiene un efecto importante en la porcicultura nacional (33). Se hace mención de un análisis económico de un brote en 1984 (al parecer combinado) de enfermedad del edema y POA, el cual arrojó los siguientes resultados de una población susceptible de 6,000 cerdos (de 15 a 40 Kg de peso), se afectaron 3,000 (50%), de éstos murieron 2034 (67.8%); con un costo promedio por animal de \$7,000.00, lo que dió un total de \$14'238,000.00. Los animales que no murieron (966) tuvieron un retraso promedio de 45 días para llegar al peso de venta (105 Kg). Se calculó un consumo de alimento diario de 2.5 Kg/día/cerdo, a razón de \$32.00 el kilo, lo que da un total de pérdidas, por este

concepto de \$3'477,600.00. Se mencionan pérdidas globales (por muerte y retraso del crecimiento) en el brote estudiado, que ascendieron a \$17'715,600.00 (21,27). Se debe mencionar que los costos anotados son de aproximadamente Julio de 1984, cuando la paridad con el dólar era de \$187.07.

Al virus en un principio se le conoció como virus del Síndrome del Ojo Azul (VSOA) (28), posteriormente se le denominó a las cepas aisladas como Paramyxovirus del Ojo Azul (FOA) por el equipo de Stephano y col. y como Paramyxovirus Porcino de la Piedad, Michoacán (PP-LPM) por el equipo de Moreno-López y col (19). En el presente trabajo se le designó como FOA.

El agente causal de la enfermedad ha sido clasificado dentro de la familia Paramyxoviridae, en ésta se encuentran tres géneros: Paramyxovirus, Morbillivirus y Pneumovirus. El virus pertenece al primero y sus principales características son: viriones pleomorfos, usualmente esféricos, de 150 nanómetros (nm) o más de diámetro. Envoltura lipídica de doble capa con proyecciones en la superficie y nucleocápside helicoidal firmemente estructurada. Genoma no segmentado con RNA lineal de tira única. La polimerasa del virión de RNA transcribe RNA viral en el mRNA complementario, que puede encontrarse también en el virión. Además éste contiene hemaglutinina y neuraminidasa. El virus es antigénicamente estable. Algunas especies que podemos encontrar son el virus de la enfermedad de Newcastle, virus 3 de parainfluenza

bovina; 3 de parainfluenza equina; 2 de parainfluenza canina; 2 de parainfluenza aviaria, parainfluenza del pavo, paramyxovirus del loro y virus sendai (4).

Este paramyxovirus es diferente antigénicamente con respecto a las demás especies reportadas previamente, ya que en estudios serológicos se observa que el virus aislado no está relacionado con paramyxovirus (PMV) 1 (Sendai-Newcastle), 2, 3, 4, 6 y 7. Tampoco está relacionado con el parainfluenza 1, 2, 3, 4a, 4b o 5. Y no se ha relacionado con antisueros de Paramyxovirus conocidos (19).

En otro trabajo se demostró que las proteínas estructurales, del patrón antigénico del POA, tales como: la proteína larga, la hemoaglutinina, la neuraminidasa, la núcleo proteína, la proteína de fusión y la proteína de matriz, muestran diferencias con otros paramyxovirus como virus de parainfluenza bovina tipo 3 (PIV3) cepa U-23 y con las del virus de la enfermedad de Newcastle cepa montana, por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (11,19).

Las partículas virales observadas por tinciones negativas de sobrenadante de células infectadas son de 2 tipos: pequeñas de 100 a 150 nm y grandes de 300 a 360 nm. Estas partículas se ven en el citoplasma, dentro de vesículas y próximas a la superficie de la membrana celular.

Esta enfermedad es causada por un virus ARN que muestra sensibilidad al éter, cloroformo, tiene resistencia a la actinomicina D.

Tiene capacidad de hemoaglutinar eritrocitos de mamíferos domésticos y aves tales como: vaca, caballo, cerdo, cabra, gato, cuye, hamster, rata, ratón, conejo, gallina y humano tipo A, B, AB y O (5,15,16).

En todas las especies se observa elusión a 37 °C entre 30 y 60 minutos (debido a la presencia de neuroaminidasa).

También produce hemoadsorción de los eritrocitos señalados en células PK-15 infectadas 72 horas antes (35).

El virus se inactiva a 56 °C después de 4 horas, mientras que la hemoaglutinación viral se pierde hasta las 48 a 60 horas a 56 °C. En otros trabajos se ha observado que el POA conserva sus propiedades hemoaglutinantes e infectivas en células PK-15 por 110 o más días de tratamiento a 37 °C. A 56 °C sus propiedades hemoaglutinantes se conservan por lo menos hasta los 30 minutos y su infectividad hasta los 15 ó más minutos. A 87 °C conserva su hemoaglutinación durante 1 minuto y su infectividad por lo menos durante 3 minutos (5).

El virus puede ser replicado en embrión de pollo y en las siguientes líneas celulares: Riñón de cerdo (PK-15), testículo de cerdo (TC), VERO (riñón de mono verde africano), riñón de gato (CK), embrión de bovino (BEK), riñón de hamster lactante (BHK21) y dermis equina (DE); así como en cultivos primarios de riñón de cerdo y de tiroides de bovino; en los cuales causa efecto citopático dentro de las 24 a 48 horas después de la inoculación: el cual consiste en formación de sincitios (caracterizado por fusión

de 3 a 20 células o más), se observan células individuales redondas voluminosas que se desprenden y quedan suspendidas en el medio de cultivo. Se forman vacuolas en el citoplasma, y a los 7 días se ve el efecto citopático completo (2,24,25,26,34). Las células VERO fueron las menos sensibles, en éstas el efecto citopático fue moderado y no se generalizó.

Otros autores han encontrado que, también en los siguientes tipos de cultivos celulares, el virus produce efecto citopático: 1) Células de Cerdo: de cornete, plexo coroideo y la línea celular IBRS; 2) De bovino: de cornete, riñón, testículo, piel, palatinas y de plexo coroideo; 3) Mono: células GMK; 4) Además de pulmón de visón y fetales humanas. Hay presencia de cuerpos de inclusión citoplásmaticos en la línea celular PK-15 y en mayor cantidad en células GMK (19).

En monoestrato de células PK-15 preparados en tubos de Leighton, infectadas con el POA, desde alrededor de las 40 a las 75 horas postinoculación se obtuvieron altos títulos de virus al titularlos por efecto citopático y desde las 65 horas postinoculación buenos títulos por hemoaglutinación. Es en ese tiempo cuando se podría recomendar hacer la cosecha de las células, para obtener los máximos títulos de antígeno para ser utilizado en pruebas serológicas y/o vacunas (2).

Experimentalmente se menciona que el 50 % de los embriones de pollo de 6 días de edad mueren en un período de

72 hrs, cuando el POA es inoculado en la cavidad alantoidea. Otro sistema hésped comunmente utilizado para el estudio de esta enfermedad son los ratones. Estos han sido inoculados por vía intracerebral con una suspensión viral de POA, mostrando temores y excitación y murieron entre los 3 y los 5 días postinoculación. En conejo adulto inoculado con POA por vía intramuscular, únicamente desarrollo anticuerpos (Ac's) (3).

La enfermedad sólo se ha reportado en nuestro país por lo que se puede considerar como exótica para el resto del mundo (25).

El POA se encuentra ampliamente distribuido en la República Mexicana, sin embargo La Piedad, Michoacán es considerada como el principal foco de infección. Se ha reportado serológicamente en los siguientes estados: 1980-1981.- Michoacán, Jalisco, Guanajuato. 1982.- Edo. de México. 1983.- D.F., Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Tabasco*, Yucatán. 1984.- Tamaulipas. 1988.- Puebla. 1990.- Campeche, Quintana Roo. 1991.- Sonora, Morelos, Colima, Veracruz (1,7,27,32,34).

Los brotes de POA pueden presentarse durante todo el año, pero su incidencia es mayor en los meses de marzo a julio (7,25).

La aparición de los brotes, esta relacionada con la entrada de animales infectados con o sin opacidad de la

* Casos detectados a nivel de rastro de animales
Provenientes del Bajío

córnea a granjas con cerdos susceptibles. La transmisión por contacto directo se facilita debido a que los cerdos portadores de más de 30 días son resistentes generalmente a la presentación de signos nerviosos y sólo un reducido número de ellos (1 al 10 %) desarrollan la opacidad de la córnea (25,26,35). También tiene importancia la entrada de vehículos y personas procedentes de granjas con problema de POA (7,23,25,26,30).

Hasta la fecha parece que el cerdo es el único animal afectado en forma natural. El papel que juegan en la diseminación de la enfermedad otras especies animales silvestres y/o domésticos, se desconoce, por lo que surge la necesidad de determinar o establecer otras especies animales que pueden ser susceptibles al POA, así como el papel que juegan dentro de la historia natural de la enfermedad (8,32,34).

En un experimento se utilizaron siete perros localizados en tres granjas porcinas diferentes, en donde previamente se diagnosticó el POA. A los siete perros se les dió de comer carne de cerdo con POA, permaneciendo asintomáticos durante 30 días y no desarrollaron anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra POA (29). También se inoculó por diferentes vías a un perro mestizo recién destetado de 4 semanas de edad con el POA. El perro fue observado durante 1 mes sin que se presentaran signos aparentes (3).

En otro trabajo se estudiaron 31 sueros de ratas, colectadas en 6 granjas de ciclo completo localizadas en los Estados de México, Morelos, Michoacán y Distrito Federal. Se trabajaron mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Obteniéndose los siguientes resultados: únicamente en el Estado de México el suero de una de 9 ratas estudiadas fue positivo con título de 1:20. En otra granja, de 5 sueros de ratas estudiados, 3 fueron positivos con títulos de 1:20. En las demás granjas todas las ratas fueron negativas, aunque en las cerdas se detectaron niveles de anticuerpos de 1:10 a 1:80 (22).

Como se puede observar falta mucho por investigar acerca de los posibles reservorios de la enfermedad, en éste estudio se ha seleccionado a la rata, para determinar el papel que desempeña en la historia natural del FOA, ya que dicho animal se encuentra en la mayor parte de los lugares donde el hombre se ha establecido, y debido a su íntima asociación, es muy frecuente observarlas en las explotaciones porcinas ya que al tener alimento disponible y accesible así como albergue, éstas proliferan y son probablemente reservorios de la enfermedad de ojo azul (21). Además de los daños que causan, estos roedores son portadores de enfermedades tales como brucelosis, erisipela, encefalomiocarditis, toxoplasmosis, leptospirosis y salmonelosis, que pueden afectar al hombre y/o a los animales con los que éste convive o explota con fines lucrativos (18,21).

HIPOTESIS.

La rata al estar en constante contacto con cerdos enfermos con el Paramyxovirus de Ojo Azul, puede infectarse y desarrollar anticuerpos.

OBJETIVOS.

Aislar el virus de POA a partir de encéfalos de ratas capturadas en una granja donde se diagnosticó la enfermedad.

Determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de POA en ratas capturadas en una granja con presencia de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS.

Se seleccionó una granja ubicada en San Juan de los Lagos, Jal. la cual tuvo un brote de la enfermedad del Ojo Azul en 1989, en 1990 para erradicar la enfermedad se fueron desechando los animales seropositivos, se lavaron y desinfectaron las instalaciones con la posterior utilización de animales centinelas. Con pruebas serológicas posteriores no se encontró la presencia de anticuerpos contra la enfermedad. En 1991 la granja se ve afectada nuevamente por el FOA.

Se utilizaron trampas de jaula y como cebo chorizo para la captura de 25 ratas del área de engorda donde hay más problemas ocasionados por FOA.

Para su manejo se les administró Clorhidrato de Ketamina* por vía intramuscular a dosis de 50 mg/Kg de peso vivo.

TOMA DE SANGRE Y EXTRACCION DE ENCEFALO.

Se realizó la punción cardíaca. La sangre se destinó a frascos estériles para la obtención del suero.

Posteriormente las ratas se sacrificaron por desnucamiento. A las cuales se les extrajo el encéfalo y se depositó en frascos estériles.

PROCESAMIENTO DEL ENCEFALO.

El encéfalo se seccionó longitudinalmente para realizar con una mitad la inmunofluorescencia directa del órgano y con la otra mitad se realizó un inóculo para el aislamiento

* KETALAR 50, LAB. PARKE DAVIS

viral en cultivo celular.

INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA DE ENCEFALO.

Se procedió a realizar cortes congelados de 4 micras del órgano. Los cortes fueron fijados en acetona por 2 minutos. Posteriormente se introdujeron en una cámara húmeda y se les puso el conjugado específico del POA. Se incubaron a 37 °C por 30 minutos. La muestra fue montada para su posterior observación al microscopio de inmunofluorescencia.

AISLAMIENTO VIRAL EN CULTIVO CELULAR.

El encéfalo fue macerado en medio esencial de EAGLE*. Se recolectó el sobrenadante y se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos. Se filtró, obteniendo así el inóculo para los monoestratos de las células PK-15. Las cuales fueron inoculadas con 1 ml de este sobrenadante.

Se inocularon 3 tubos de Leighton conteniendo un monoestrato de células PK-15, más un tubo testigo por cada muestra.

Los tubos de Leighton inoculados se observaron en un microscopio invertido esperando encontrar efecto citopático durante las 48, 72 y 86 horas postinoculación; después las laminillas fueron fijadas para su tinción, posteriormente se lavaron, se colocaron dentro de una cámara húmeda y se les cubrió con el conjugado específico para el POA y se metieron a incubar a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido este período de incubación se lavaron con agua destilada, se secaron y se fijaron a un portaobjetos con glicerina

* IN VITRO, S.A. DE C.V.

buferada.

Al no observarse inmunofluorescencia positiva en el primer pase se les dió un segundo pase ciego, el cual fue inoculado con el sobrenadante del tubo de Leighton de 96 horas, éste se filtró; al tercer pase ciego se le hizo lo mismo, si no se observó inmunofluorescencia en las laminillas, la muestra fue considerada negativa.

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION.

Al tubo de Leighton de 96 horas se le realizó la lisis celular, introduciendo el tubo al congelador de menos 70 °C y monitoreando el desprendimiento de las células, ya efectuado este se tomó 0.025 ml del sobrenadante y se realizó la hemoaglutinación en placa con eritrocitos de cuye al 0.75 % y ave al 0.5 % (4).

PREPARACION DE SUEROS.

La sangre obtenida fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos y el suero en forma estéril. Cabe mencionar que la cantidad de suero obtenida fue muy poca y por lo tanto se tuvo que diluir (1:3) con medio de eagle. Se inactivaron a 56 °C durante 30 minutos. Estos sueros se utilizaron para la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) y Sueroneutralización (SN).

TECNICA DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION.

PREPARACION DEL ANTIGENO.

El antígeno utilizado fue la cepa LPM* pase 3 propagada en células PK-15, congelada y descongelada dos veces y se

* Donada por el Dr. Moreno López.

centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos.

El virus se tituló por medio de la técnica de hemoaglutinación en microplacas de 96 pozos en forma de U, empleando como diluyente PBS con pH 7.2; las diluciones fueron de 1:2 a 1:256, el volumen inicial fue de 0.05 ml y el final 0.025 ml posteriormente se agregaron 0.025 ml por pozo de eritrocitos de cuye al 0.75 %. El antígeno se utilizó con un título de 8 UHA.

La técnica de IH (Método Beta para titulación del suero) desarrollada por Snyder (10).

TECNICA DE SUKRONKUTRALIZACION.

PREPARACION DEL ANTIGENO.

Para determinar la concentración del virus se realizan diluciones decuples de la alícuota original utilizando medio esencial de eagle.

Se utilizaron 8 tubos los cuales contienen cada uno 4.5 ml del medio. Al primero de éstos se le agrega 0.5 ml del virus, después de agitar se transfiere 0.5 ml del primero al 2 tubo y así sucesivamente. En el último tubo se desecha 0.5 ml.

La titulación se realizará en placa de 96 pozos.

Se agregan 0.050 ml por pozo hasta completar 8 pozos por dilución.

Posteriormente se agregan 0.150 ml de células PK-15 a cada pozo. La concentración de ésta es de 100,000 por ml.

Después de 6 a 7 días se lee el efecto citopático.

Para determinar el título del virus se utilizó el

método de Karber (10).

En la titulación del antígeno esta fue de $10^{4.8}$, para obtener las 300 dosis infectantes del cultivo celular se dividió $10^{4.8} / 10^{2.877121}$ el resultado fue de $10^{1.922879}$ por lo que el factor de dilución es de 10,540.92 que corresponde a las 300 dosis.

La técnica de SN (Método beta para la titulación de los sueros) descrita por Snyder (10).

RESULTADOS.

Mediante la prueba de inmunofluorescencia directa de los encéfalos de las 25 ratas, se obtuvieron tres muestras con fluorescencia.

Todos los encéfalos de las ratas fueron inoculados individualmente en tubos de Leighton con células PK-15 para el aislamiento viral y los resultados obtenidos a las 48, 72 y 96 horas postinoculación fueron negativos en el primero, segundo y tercer pase ciego.

Con el sobrenadante del cultivo de 96 horas postinoculación de la prueba anterior, se realizó la prueba de hemoaglutinación en placa, cuyos resultados fueron negativos.

En lo que respecta a la serología, por medio de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación 9 sueros tuvieron un título de anticuerpos de 1:12 y 2 con 1:6 (96 y 48 Unidades Inhibidoras de la Hemoaglutinación respectivamente); los 14 restantes no mostraron ninguna reacción.

En la Sueroneutralización se observó la lisis celular completa en todos los pozos de la placa, ocasionada por el virus, lo que demuestra la ausencia de anticuerpos en los sueros estudiados. Por lo tanto se consideraron negativos.

Los resultados se puede apreciar en el cuadro No. 1.

DISCUSION.

En la inmunofluorescencia de encéfalo se obtuvieron tres muestras con fluorescencia pero ésta no es una prueba muy específica ya que ésta puede ser ocasionada por reacciones inespecíficas, falla en la técnica o de observación, esto se comprobó con las técnicas siguientes al no obtener resultados positivos.

En los tres pases ciegos realizados en cultivo celular para el aislamiento viral no se mostró inmunofluorescencia que indica la presencia del virus por lo tanto se consideró negativo. El aislamiento viral es una prueba muy específica. Además en otros trabajos con enfermedades virales como son gastroenteritis transmisible, aujeszky y parvovirus porcina se ha comprobado que los agentes aunque se inoculen en grandes cantidades muchas veces no se logran aislar ya que se eliminan por pocas horas, por lo tanto no se pudo aislar el POA (6,9,12,13,19).

En la prueba de IHA se consideraron negativos los resultados, dado que en la literatura se cita como criterio de positividad a títulos IH mayores de 1:16., y se toma éste límite ya que el POA es un virus que nos puede dar reacciones cruzadas o tener hemaglutininas inespecíficas que nos pueden dar falsos positivos. Además éste método puede emplearse cuando no es posible analizar por las técnicas más sensibles. En trabajos realizados se ha comprobado que la prueba de IHA tiene un porcentaje de sensibilidad relativa

(%SR) del 65.9 (7,12). Con respecto a ésta prueba se obtuvieron resultados contradictorios a los obtenidos en un trabajo realizado en ratas y cerdas de granjas con la presencia de la enfermedad. En los que se obtuvieron títulos de anticuerpos para las ratas de 1:20, y para las cerdas de 1:20 a 1:40.

En lo que respecta a la técnica de SN en toda la placa se dió el efecto citopático esto indica que el antígeno puesto en los pozos al no tener anticuerpos específicos el suero problema, no se neutralizó el virus. Esta prueba es de las más específicas y muestra un %SR del 89.1. El rango de títulos positivos se consideró a partir de 1:8 (12).

CONCLUSIONES.

El POA no se aisló de los encéfalos de la rata ni se detectaron anticuerpos séricos contra el virus.

De los resultados obtenidos se recomienda realizar estudios en condiciones controladas utilizando el POA tanto en ratas de laboratorio como en las provenientes de granjas libres de la enfermedad.

LITERATURA CITADA.

- 1.- Carreón, N.R.; Fuentes, R.M.; Stephano, H.A. y Ramírez, M.H.: Estudios preliminares del paramyxovirus del ojo azul en la República Mexicana. Memorias del curso de actualización de enfermedades virales del cerdo. México, D.F. 1989. 78-82 Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. (1989).
- 2.- Colinas, T.A.; Martínez, L.A.; Correa, G.P. y Fajardo, M.R.: Curva de crecimiento del paramyxovirus porcino de la Piedad, Mich., en la línea de células PK 15. Memorias del XXII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Acapulco, Gro. 1986. 68-71. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. (1986).
- 3.- Correa, G.P.; Martínez, L.A. y Colinas, T.A.: Síndrome del ojo azul producido por el paramyxovirus porcino. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. CENID-MICROBIOLOGIA. 1990.
- 4.- Cottral, G.E.: Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology. Cornell University Press, Ithaca, New York. 1978.

5.- Cruz, G.H.; Martínez, L.A.; Correa, G.P. y Colinas, T.A.: Viabilidad del paramyxovirus porcino de la Piedad, Mich. (PP-LPM) a diferentes temperaturas. Memorias del XXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. León, Gto. 1988. 84-86 Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F.. (1988).

6.- Cutler, R.; Molitor, T.W.; Sauber, T.E. and Leman, A.D.: Role of the Rat in the Transmission of Porcine Parvovirus. Am. J. Vet. Res. 43: 493-496 (1982).

7.- Fuentes, R.M.; Carreón, N.R.; Stephano, H.A. y Trujillo, O.M.: Frequency of Blue Eye Paramyxovirus Antibodies in Mexico Pigs. Proceeding of International Pig Veterinary Society, 11 th Congress. Lausanne, Suiza 1990. 274 International Pigs Veterinary Society. Suiza (1990).

8.- Gay, G.M.: Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de ojo azul. Memorias del curso de actualización sobre enfermedades virales del cerdo. México D.F. 1989 83-84 Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. (1989).

9.- Gough, M.P. and Jorgenson, R.D.: Identification of Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus in House Flies (*Musca domestica* Linnaeus). Am. J. Vet. Res. 11: 44-48 (1983).

10.- Hedberg, G.; Reed, R.L. and Snyder, K.T.: Manual the Diagnostic Virology Laboratory. National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, 1989.

11.- Hernández, J.P.; Sundquist, A.; Berg, M.; Linne, T.; Moreno, L.J. y Gómez, C.E.: Análisis ultraestructural y determinación de las proteínas del paramyxovirus LPM-V del síndrome del ojo azul. Memorias del XXV Congreso Nacional de Medicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Puerto Vallarta, Jalisco. 1990. 54-56. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. (1990).

12.- Hernández, J.P.; Sundquist, A.; Fuentes, R.M.; Díaz, O.A. y Moreno, L.J.: Evaluación de una vacuna experimental para el paramyxovirus del síndrome del ojo azul. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Puerto Vallarta, Jalisco. 1990. 57-60. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. (1990).

13.- Joo, H.S. and Donaldson, R.: Antibody to Porcine, Feline and Rat Parvoviruses in Various Animal Species. Res. Vet. Sci. 21:112-113 (1976).

14.- Maes, K. and Kanitz, C.L.: Pseudorabies Virus Infections in Wild and Laboratory Rats. Am. J. Vet. Res. 40:45-50 (1979).

15.- Martínez, L.A. y Correa, G.P.: Un virus hemaglutinante similar a los paramyxovirus que producen encefalitis y mortalidad en cerdos. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México D.F. 1985 81-82 Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1985).

16.- Martínez, L.A.; Correa, G.P.; Fajardo, M.R. y Garibay, S.M.: Aislamiento y estudio de un virus porcino parecido a los paramyxovirus. Encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. México D.F. 1985. 15-21. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. . México D.F.(1985)

17.- Martínez, L.A.; Correa, G.P.; Rosales, E.P. y Garibay, S.M.: Perfil de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el paramyxovirus porcino de la Piedad, Mich. en una granja porcina. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1986. México D.F. 1986 162-170 Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1986).

18.- Marsh, R.E. and Howard, W.E.: The Rat: its Biology and Control. Division of Agricultural Sciences, University of California. E.U.A. November 1981.

19.- Moreno, L.J.; Correa, G. P. and Martínez, L.A.: Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the Brain of a Piglet in México. Arch. Virol. 91:221-231 (1986).

20.- Pilchard, E.I.: Experimental Transmission of Transmissible Gastroenteritis Virus by Starlings. Am. J. Vet. Res. 26:1117-1179. 1965.

21.- Pratt, H.D. and Brow, R.Z.: Biological Factors in Domestic Rodent Control. U.S. Department of health education and welfare public health service center for disease. Atlanta, Georgia. E.U.A. 1976.

22.- Rosales, E.F.; Ramos, R. I. y Correa, G.P.: Presencia de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el paramyxovirus porcino LPM en cerdas y ratas de las mismas granjas. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria. México 1987. 77-78 Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D.F. (1987).

23.- Rosales, E. F. y Corréa, G.P.: El síndrome del ojo azul. Técnica Pecuaria en México 1989. México D.F. 101-116 Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D.F. (1989).

24.- Stephano, H.A. and Gay G. M.: Experimental Studies on a New Viral Syndrome in Pigs Called "Blue Eye", Characterized by Encephalitis and Corneal Opacity. Proceeding o International Pig Veterinary Society 8 th Congress, Ghent, Belgium 1984. 71 International Pig Veterinary Society Belgium (1984).

25.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Síndrome del ojo azul en cerdos. Avances sobre enfermedades del cerdo. 1985. Memorias de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México D.F. 1985 299-311. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. (1985).

26.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: El síndrome del ojo azul en cerdos. Síntesis Porcina 4: 9-14. (1985).

27.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Síndrome del ojo azul en cerdos. Síntesis Porcina 4: 42-49 (1985)

28.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: El síndrome del ojo azul en granjas engordadoras del bajo. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México D.F. 1985. 94 Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1985)

29.- Stephano, H.A.; Gay, G.M. y Vergara, L.M.: Determinación de anticuerpos contra un virus aislado en cerdos afectados con el síndrome del ojo azul en sueros de perros en contacto. Memorias de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mérida, Yucatán 1985. 69-70. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mérida, Yucatán. (1985).

30.- Stephano, H.A.; Doperto, J.M. y Gay, G.M.: Estudio epidemiológico en 2 granjas porcinas, infectadas por el Síndrome del Ojo Azul. Proceeding of International Pig Veterinary Society, 9 th Congress. Barcelona, España 1986. 455 International Pig Veterinary Society. Barcelona, España. (1986).

31.- Stephano, H.A.; Gay, G.M. and Kreese, J.: Properties of a Paramyxovirus (Blue Eye Syndrome) Characterized by Encephalitis, Reproductive Failure and Corneal Opacity. Proceeding of International Pig Veterinary Society, 9 th Congress. Barcelona, España 1986. 456 International Pig Veterinary Society. Barcelona, España (1986).

32.- Stephano, H.A. y Gay, G.M. : Encefalitis, transtornos reproductivos y opacidad de la córnea, ojo azul. Síntesis Porcina 5:26-39 (1986).

33.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: El síndrome del ojo azul una nueva enfermedad en cerdos asociada a un paramyxovirus. Yet. Mex. 17:120-122 (1986).

34.- Stephano, H.A. y Gay, G.M.: Análisis de la cepa del virus del síndrome de ojo azul aislado de la córnea de cerdos. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México D.F. 1986. 163 Universidad Nacional Autónoma de México México D.F. (1986).

35.- Stephano, H.A.; Gay, G.M. and Ramírez, T.T.: Encephalomyelitis, Reproductive Failure and Corneal Opacity (Blue Eye) in Pigs Associated with a Paramyxovirus Infection. Yet. Rec. 122:6-10 (1988).

36.- Stephano, H.A.; Fuentes, R.M.; Hernández, J.P.; Herradora, L.M. y Carreón, N.R.: Encefalitis y opacidad de la córnea en cerdos destetados, inoculados experimentalmente con el paramyxovirus de ojo azul. Memorias del XXIII Congreso de la Asociación de Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. León, Gto. 58-59 1988 Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. León, Gto. (1988)

37.- Velasco, J.M.: Evaluación de los parámetros de productividad que determinan el impacto de las enfermedades. Memorias Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. México, D.F. 1985 27-36. México, D.F. (1985).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

29

CUADRO No.1 RESULTADOS VIROLOGICOS Y SEROLOGICOS.

NUMERO DE MUESTRA	IF ENCEFALO	IFCC			HA			IHA	SN	
		1ro.	2do.	3ro.	1ro.	2do.	3ro.		PK-15	BT
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

IF = INMUNOFLUORESCENCIA.

IFCC = INMUNOFLUORESCENCIA EN CULTIVO CELULAR.

HA = HEMOAGLUTINACION (ERITROCITOS DE CUYE 0.75% Y AVE 0.5%).

IHA = INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (PLACA EN FONDO EN U).

SN = SUERONEUTRALIZACION.

PK-15 = LINEA CELULAR DE RIÑON DE CERDO.

BT = LINEA CELULAR DE TESTICULO DE BOVINO.