



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL

ESTUDIO DE LAS DIFERENTES CEPAS DEL RUBULAVIRUS PORCINO  
MEDIANTE LA TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JOSÉ CONCEPCIÓN BECERRA LÓPEZ

TUTOR:

DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

COMITÉ TUTORAL:

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

MVZ MSc JOSÉ MIGUEL DOPORTO DÍAZ

MÉXICO DF

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme llegar a esta etapa tan importante en mi vida profesional.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por ser mi "*alma mater*" y permitirme contribuir con un granito de arena en el desarrollo de México.

A mi tutora principal: **Dra. Maria Elena Trujillo Ortega**, por ser el pilar en el desarrollo de mi vida académica como profesional, por brindarme su confianza y responsabilidad depositada en mi desde el momento en conocernos, gracias por todo, no la defraudaré.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dra. Susana Mendoza Elvira y el Dr. José Miguel Doporto Díaz que me supieron guiar para lograr este importante paso en mi vida profesional y por confiar en mi. Muchas gracias.

A los integrantes de mi jurado: Dr. Abel Ciprian Carrasco y el Dr. Daniel Motas Rojas, por sus aportaciones y sugerencias hechas a esta tesis. Gracias

A la empresa Proteína Animal S.A. de C. V. y al Sr. Manuel Romo que financiaron el proyecto, y que sin el no se hubiera logrado esta investigación.

A la Dra. Ma. del Carmen Mercado García y al Dr. Iván Sánchez Betancurt, por su desinteresado apoyo en la realización de este trabajo y apoyarme en todo momento.

A la Dra. Esperanza Galván Pérez, por guiarme, darme muy buenos consejos y siempre apoyarme en mis decisiones en mi vida. Muchas gracias.

Al personal del Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM.

A todos mis amigos, familiares, y personas que siempre estuvieron a mi lado, por su apoyo incondicional que me han brindado y sobre todo por la lealtad y confianza.

*A los cerdos, por su nobleza y fidelidad a pesar de todo.*

## **DEDICATORIA**

A **MARISOL**, por amarme, cuidarme y estar a mi lado, por darme la dicha y felicidad de ser padre y sobre todo por que contigo conocí el verdadero amor. Te amo y siempre te amaré (No tengo más patria que tu corazón).

A mi hijo **PABLO**, por haberme enseñado el amor, la entrega, responsabilidad y paciencia que se debe tener hacia un hijo. Hijo Dios te bendiga toda la vida.

A mi MADRE, PADRE Y AMIGA: **REBECA LÓPEZ**, ya que con su ejemplo de fortaleza y tenacidad me enseñó lo bueno y malo de la vida. Gracias por tu confianza y siempre apoyo.

A mis hermanos: Lourdes, María, Alfredo, Luis, Jesús y Juan, por su apoyo incondicional.

A las Familias Castro y Orta, por permitirme ser parte de sus vidas y el apoyo, confianza y ayuda que siempre me han ofrecido.

<b>CONTENIDO</b>	
<b>DEDICATORIA</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>CONTENIDO</b>	vi
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2.0 ANTECEDENTES</b>	2
2.1 ETIOLOGÍA	2
2.2 EPIDEMIOLOGÍA	3
2.3 SIGNOS CLÍNICOS	4
2.4 LESIONES	6
2.4.1 MACROSCÓPICAS	6
2.4.2 MICROSCÓPICAS	6
2.5 CICLO BIOLÓGICO	8
2.6 PATOGENIA	9
2.7 PREVENCIÓN Y CONTROL	10
2.8 DIAGNÓSTICO	11
<b>3.0 JUSTIFICACIÓN</b>	13
<b>4.0 HIPÓTESIS</b>	14
<b>5.0 OBJETIVO GENERAL</b>	15
<b>6.0 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	16
<b>7.0 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	17
7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA GRANJA	17
7.2 AISLAMIENTOS VIRALES	17
7.3 METODOLOGÍA DE LOS VIRUS AISLADOS	18
7.3.1 TULACIÓN DE LOS VIRUS AISLADOS	18
7.3.2 RECONOCIMIENTO DE LOS VIRUS AISLADOS	19
7.4 TITULACIÓN DE LOS 6 AISLAMIENTOS	20
7.4.1 TITULACIÓN VIRAL POR INFECCIÓN EN TEJIDO CELULAR	20
7.4.2 TITULACIÓN POR HEMOAGLUTINACIÓN	21
7.5 INOCULACIÓN A CONEJOS	22
7.6 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN	22
7.6.1 CONTROLES DE LA PRUEBA DE IH	23
7.7 RESPUESTAS HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS	24
7.7.1 CONTROLES PARA LAS RESPUESTAS HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS	25
A. POR ACTIVIDAD AGLUTINANTE	25

B. POR EFECTO CITOPÁTICO	25
7.8 CONFRONTACIÓN DE SUEROS DE CAMPO	26
<b>8.0 RESULTADOS</b>	<b>28</b>
8.1 AISLAMIENTOS VIRALES	28
8.2 RESPUESTAS HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS	29
8.3 MONITOREO SEROEPIDEMIOLÓGICO	30
<b>9.0 DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
<b>10.0 CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>11.0 LITERATURA CITADA</b>	<b>39</b>
<b>FIGURAS</b>	
FIGURA 1. OBSERVACIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE AGLUTINACIÓN PRODUCIDA POR EL RUBULAVIRUS PORCINO	47
FIGURA 1A. AGLUTINACIÓN AUSENTE	47
FIGURA 1B. AGLUTINACIÓN LIGERA (+)	47
FIGURA 1C. AGLUTINACIÓN MODERADA (++)	47
FIGURA 1D. AGLUTINACIÓN ABUNDANTE (+++)	47
<b>CUADROS</b>	
CUADRO 1. AISLAMIENTOS VIRALES POR TEJIDO, OBTENIDOS DE CERDOS CON SIGNOLOGÍA SUGERENTE A INFECCIÓN POR EL RUBULAVIRUS PORCINO	48
CUADRO 2. NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS POR EDAD A LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL	49
CUADRO 3. TÍTULOS DE LAS RESPUESTAS HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS DE CADA VIRUS CON SU ANTISUERO ESPECÍFICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN	50
CUADRO 4. TÍTULOS DE MUESTRAS DE SUEROS DE CAMPO CONFRONTADOS CONTRA 6 AISLAMIENTOS VIRALES	51
CUADRO 5. NÚMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS DE CAMPO POSITIVOS Y NEGATIVOS E LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS VIRALES	52
CUADRO 6. NÚMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS DE CAMPO POSITIVOS Y NEGATIVOS DE ACUERDO AL NÚMERO DE PARTO O EDAD DE LOS ANIMALES DE LA GRANJA A ESTUDIO	53
<b>GRÁFICAS</b>	
GRÁFICA 1. RESPUESTAS HOMÓLOGAS DE CADA VIRUS CON SU ANTISUERO ESPECÍFICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN	54
GRÁFICA 2. RESPUESTAS HETERÓLOGAS DE CADA VIRUS CON SU ANTISUERO ESPECÍFICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN	55

## RESUMEN

La enfermedad del ojo azul constituye un padecimiento de los cerdos causada por un virus de la familia paramixoviridae, el objetivo de este estudio es utilizar la técnica de seroneutralización con seis aislamientos virales aislados en diferentes granjas y años. El estudio fue realizado en una granja de producción porcina con 15,000 hembras en producción, localizada en el estado de Jalisco, México. Se realizaron respuestas homologas y heterólogas con los seis aislamientos virales para establecer si la técnica de seroneutralización permite identificar variaciones entre ellos. Además se hizo un monitoreo serológico transversal con 64 sueros provenientes animales de diferentes partos y edades de la granja a estudio para observar el reconocimiento de estos hacia los 6 aislamientos virales. Se encontró que la técnica proporciona una mayor sensibilidad y especificidad, ya que permite identificar tal variación entre los diferentes aislamientos virales, además, que el reconocimiento de los sueros de campo no son reconocidos con el mismo título por un determinado suero.

## **ABSTRACT**

The blue eye disease constitutes a suffering of the pigs caused by a virus of the paramixoviridae family; the objective of this study is to use the technique of seroneutralization with six isolated viral isolations in different farms and years. The study was carried out in a pig farm with 15,000 sows in production, located in the state of Jalisco, Mexico. Homology and Heterology responses were made with the six viral isolations in order to state if the seroneutralization technique allows identifying variations among them. In addition we did a transversal serology monitoring with 64 serums coming from animals of different parities and ages from the studied farm to observe the recognition of these towards the 6 viral isolations. We found that the technique provides a greater sensitivity and specificity, since it allows identifying such variation between the different viral isolations, moreover, that the recognition of field serums are not recognized with the same title by a certain serum.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La enfermedad del ojo azul afecta a cerdos de todas las edades y es provocada por un virus del género *Rubulavirus* de la familia *paramixoviridae* (Stephano, *et al.* 1981). Esta enfermedad fue observada por primera vez en México a principios de 1980, en granjas de La Piedad, Michoacán (Stephano y Gay, 1985). Desde entonces ha sido un problema enzootico y de difícil control (Fuentes, *et al.* 1992).

La enfermedad ha sido diagnosticada únicamente en México, la principal zona afectada es el centro del país comprendida por los estados de Jalisco, Guanajuato y Michoacán. Para 1983 su difusión abarcó los estados de Nuevo León, DF., Hidalgo, Tlaxcala, Campeche, Puebla, Tamaulipas y Querétaro (Stephano y Gay, 1985) y para 1992 había abarcado 16 estados de la República Mexicana (Fuentes, *et al.* 1992).

Los primeros signos y lesiones observados en cerdos infectados menores de 30 días y alta mortalidad sugerían una enfermedad viral con características diferentes a las enfermedades existentes (Stephano, *et al.* 1985; Stephano y Gay, 1986b). Los estudios iniciales mostraron que se trataba de una encefalitis no supurativa y se aisló un virus hemoaglutinante (Stephano, *et al.* 1981), las características físico-químicas, morfológicas y de cultivo, así como la serología realizada mostraron que se trataba de un nuevo virus que se designó como "paramixovirus del ojo azul" (POA), y se replicó la enfermedad en cerdos inoculados experimentalmente (Stephano y Gay, 1986b; 1988; Stephano, 1999; Fuentes, *et al.* 1992).

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 ETIOLOGÍA

El *Rubulavirus* porcino tiene forma esférica y mide de 100 a 360 nm, el núcleo semeja a una hélice o espiral contenido dentro de una membrana altamente frágil compuesta de grasa y proteínas provenientes de la célula huésped. Esta contiene dos proteínas de suma importancia en la biología del virus, la proteína de fusión (F) que participa en la unión del virus a la membrana para su posterior penetración a la célula, también es la responsable en la fusión con células vecinas ocasionando la propagación de la infección en el área local. La otra proteína es la neuraminidasa (HN) que se encarga de la eliminación de grupos de ácido siálico y otra de sus funciones es la actividad hemoaglutinante, con la cual se produce la aglutinación o lisis al contacto con glóbulos rojos.<sup>8</sup> Este virus se caracteriza por ser un virus hemoaglutinante de glóbulos rojos de mamíferos tales como bovino, cerdo, cuy, caballo, gato, hámster, rata, ratón, conejo y humanos tipo A, B, AB y O, también de ave (Torres, 2004).

Los virus pertenecientes a la familia de los Paramixovirus producen importantes problemas en la salud veterinaria y humana, dentro de ellos se encuentra el virus sincitial respiratorio, los virus de la parainfluenza causante de infecciones en vías respiratorias bajas en niños y animales jóvenes. También se encuentran virus que provocan infecciones neurológicas y sistémicas, como los virus del moquillo canino, sarampión, newcastle y el de la parotiditis humana,<sup>10</sup> éste último produce inflamación de las glándulas salivales parótidas y en casi el 50% de los casos hay complicaciones neurológicas, en ocasiones la infección viral abarca el parénquima nervioso produciendo encefalitis (Stephano y Gay, 1985a).

El virus de la enfermedad del Ojo azul se clasificó en el orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus* y especie *Rubulavirus* porcino (Rima *et al.*, 2002). No presenta

reacción antigénica cruzada con los virus de la parainfluenza 1, 2, 3 y 4, ni con los virus de la enfermedad de Newcastle, Sarampión, el Sincitial respiratorio y con el de la Parotiditis (Moreno-López *et al.*, 1986; Stephano, 1999).

El *Rubulavirus* posee alta homología estructural y genética con el virus de la parotiditis humana y comparte con él su tropismo tisular y sus características patológicas, por lo que es un modelo adecuado para estudiar los factores de patogenicidad de los paramixovirus; además por su similitud genómica de los virus de parainfluenza humana 2 y 4 y el virus 5 de simio (Sundqvist *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 1991 y 1992).

## **2.2 EPIDEMIOLOGÍA**

Algunos miembros de la familia *Paramixoviridae* han sido aislados en otros países; tales como en Canadá, que se aisló el virus a partir de encéfalo de cerdo en un brote de la enfermedad de encefalitis hemoaglutinante, éste aislamiento se inoculó en cerdos y no se pudieron generar signos y lesiones en los animales; y en Israel, a partir de hisopos nasales de animales sanos (Lipkind *et al.*, 1986). Hasta la fecha no se ha podido establecer relación alguna entre el *Rubulavirus* y otros paramixovirus.

En México, el primer reporte de la enfermedad ocurre en 1980, en una granja de 2 500 hembras en La Piedad, Michoacán; (Stephano *et al.*, 1981) en ese mismo año en los estados de Jalisco y Guanajuato también se observaron signos clínicos. En 1982 la enfermedad fue diagnosticada en el Estado de México y para 1983 había abarcado el Distrito Federal, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, Tlaxcala, Tabasco y Yucatán. Para 1985 la enfermedad ha habido sido identificada en 12 estados de la República Mexicana (Stephano *et al.*, 1986).

En 1989 y 1990, en un estudio de prevalencia se obtuvo que en 13 estados de 27, se encontraron cerdos serológicamente positivos (Stephano y Gay, 1985a).

Se sabe que el cerdo es el único animal clínicamente afectado por el *Rubulavirus*, cuando ocurre la infección de forma natural, sin embargo experimentalmente afecta a embriones de pollo y ratones; por otro lado los conejos, perros y gatos inoculados experimentalmente no presentan signología; sin embargo hay desarrollo de anticuerpos (Stephano y Gay, 1986b; Stephano, 1988).

El virus puede diseminarse a través de personas, fomites y posiblemente a través de aves y el viento (Stephano, 1999).

## **2.3 SIGNOS CLÍNICOS**

Los signos clínicos pueden iniciar en cualquier área de la granja, pero usualmente se observan primero en las salas de maternidad, en donde hay signos nerviosos y alta mortalidad en lechones, algunos de los cuales presentan opacidad corneal. Casi al mismo tiempo, se puede observar opacidad de la cornea en algunos cerdos del área de destete o engorda (Stephano y Gay, 1985a; Stephano, 1988).

Los signos clínicos son variables y dependen principalmente de la edad de los cerdos afectados, pero también, del tipo de granja, sistema de producción, manejo de los cerdos y enfermedades concomitantes: los lechones de 2 a 15 días de edad son los más susceptibles. Los signos se presentan rápidamente, algunos lechones quedan súbitamente postrados lateralmente o muestran signos nerviosos progresivos.

La enfermedad generalmente se presenta con un curso que empieza con fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado, a veces acompañado por constipación o diarrea. Estos son seguidos por signos nerviosos progresivos, tales

como ataxia, debilidad, rigidez principalmente de las patas traseras, temblores musculares y posturas anormales, como posición del perro sentado.

Algunos lechones están hiperirritables y muestran movimientos de pedaleo o chillan al sujetarlos. Otros signos incluyen letargo con movimientos involuntarios, pupilas dilatadas, aparente ceguera y algunas veces nistagmus. Se observa conjuntivitis, párpados hinchados y lagrimeo, con frecuencia los párpados están pegados con exudado y del 1 al 10 % de los cerdos afectados presentan opacidad corneal uni o bilateral. La muerte ocurre con frecuencia después de un curso de 4 a 6 días de enfermedad (Stephano y Gay, 1986b; Stephano, 1988, 1999; 2000b).

De los lechones nacidos durante un brote, se afectan del 20 al 65%, en estas camadas la morbilidad está entre el 20 y 50% y la mortalidad entre 87 y 90% de los afectados (Stephano, 2000b).

En cerdos de más de 30 días de edad, los signos nerviosos son raros y pocos animales mueren, el único cambio observado es la opacidad corneal del 1 al 4% de los cerdos infectados. Cuando llegan a presentarse los signos existe: anorexia, depresión, incoordinación, marcha en círculos y movimientos pendulares de cabeza. También se presenta conjuntivitis y opacidad de la cornea, se ha sugerido retraso del crecimiento y disminución del consumo de alimento (Stephano y Gay, 1986b; Stephano, 1988 y 1999).

En cerdas gestantes pueden no presentar signología, en las hembras donde se presentan signos clínicos también éstos son moderado, con frecuencia manifiestan anorexia 1 o 2 días antes de que aparezcan los signos clínicos en los lechones y en algunas se presenta opacidad corneal, sin embargo la falla reproductiva afecta diferentes parámetros por 2 a 11 meses, generalmente por 4. Durante los brotes hay incremento en el número de hembras que retornan al estro, disminuye el porcentaje de partos e incremento en el intervalo de días de destete a primer servicio. También hay marcado incremento en los mortinatos y

fetos momificados, lo que consecuentemente causa reducción en el número de cerdos nacidos vivos y en número de lechones nacidos totales por parto (Stephano, 2000a; 2000b).

El 1998 se observaron severos casos de ésta enfermedad asociado con el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (VPRRS), donde los parámetros reproductivos mostraron alteraciones más severas que con el Rubulavirus o VPRRS solos (Stephano, 2000a; 2000b).

En sementales con frecuencia no se observan signos clínicos, pero en ocasiones hay anorexia moderada y opacidad de la cornea. En un estudio se determinó que del 29 al 73% de los sementales se afectaban. La evaluación del semen muestra alteraciones moderadas a severas con disminución de la concentración de espermatozoides, aumento en las anormalidades, bajo porcentaje de motilidad y viabilidad. En algunos sementales hay azospermia y necropermia, donde el color del eyaculado se presenta de coloración anormal, en algunos se observa aumento en el tamaño testicular y epidídimo, en éste último algunos presentan textura granular (Stephano y Gay, 1986b; Stephano, 2000a y 2000b).

## **2.4 LESIONES**

### **2.4.1 MACROSCÓPICAS**

Las lesiones macroscópicas que se han encontrado en cerdos infectados con el *Rubulavirus* porcino son conjuntivitis y diferentes grados de opacidad corneal, principalmente en lechones menores de treinta días. La cornea se engruesa 1 a 3 veces de su grosor normal, en ocasiones hay otras alteraciones en el ojo como formación de vesículas, úlceras y queratocono en córnea, así como exudado en la cámara anterior (Stephano y Gay, 1985a; 1985b)

En sementales el virus provoca inflamación de los testículos y epidídimo, con un aumento marcado en el diámetro debido al edema en casos agudos, cuando el curso progresa se observa epididimitis y orquitis con fibrosis y adherencias en la túnica albugínea; ocasionalmente hemorragias en la túnica, epidídimo o testículo (Campos y Carbajal, 1989; Stephano *et al.*, 1990).

#### 2.4.2 MICROSCÓPICAS

Los cambios histológicos más frecuentes observados se localizan principalmente en cerebro y médula espinal, donde se puede encontrar encefalitis no supurativa, afectando principalmente la materia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral e incluye gliosis difusa y multifocal. Hay infiltración perivascular con linfocitos, células plasmáticas, células reticulares, necrosis neuronal, neuronafagia, meningitis y coroiditis. Se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticas en las neuronas debido que es un virus RNA y su replicación se lleva a cabo en el citoplasma (Ramírez y Stephano, 1982; Stephano y Gay, 1985a; Pérez *et al.*, 1988).

En los ojos, los cambios son engrosamiento caracterizado por edema y uveítis anterior. Hay diferentes grados de infiltración por neutrófilos, macrófagos y células mononucleares en endotelio vascular y tejido adyacente del ángulo iridocorneal (Ramírez y Stephano, 1982; Stephano y Gay, 1985a).

En testículos de sementales se han encontrado diferentes grados y tipos de lesiones dependiendo de la evolución del caso. Hay áreas de degeneración y necrosis del epitelio germinal. El tejido intersticial muestra hiperplasia de las células de Leydyg, infiltración por células mononucleares y fibrosis. En epidídimo las células epiteliales muestran formación de vesículas y pérdida de cilios, después se presenta fibrosis y granulomas espermáticos con atrofia testicular (Ramírez y Mendoza, 1997).

## 2.5 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de los Rubulavirus incluye las fases de reconocimiento, adsorción a la superficie celular, fusión de membranas, penetración a la célula, desnudamiento, transcripción, replicación del genoma, ensamble y liberación de viriones. La partícula viral se adsorbe a la membrana de la célula por medio de la proteína HN, que reconoce el receptor específico, generalmente glicosilado. Un cambio conformacional de la HN activa a la proteína F, que expone un dominio , que expone un dominio altamente hidrofóbico mediante el cual fusiona las membranas celular y viral. Este evento ocurre en la superficie celular y a pH neutro, por lo que es independiente de enzimas lisosomales, como ocurre en otros virus. La integración de la membrana viral al sistema de membranas celulares provoca la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. Y que el virión trae integrada su propia polimerasa, al liberarse el ARN viral se sintetiza una copia completa del genoma en sentido positivo, que servirá de molde para los nuevos genomas, y por otro lado, se inicia la síntesis de los ARN mensajeros que codifican cada una de las proteínas virales.

Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, en donde las proteínas NP, P y L son acopladas al ARN recién sintetizadas y la proteína M se acumula en la parte interna de la membrana celular. La glicoproteínas HN y F que fueron sintetizadas en el retículo endoplásmico, son modificadas en el aparato de Golgi y posteriormente expresadas en la cara externa de la membrana, en sitios de contacto estrecho con la proteína M. La afinidad de las proteínas de la nucleocápside , NP, con la proteína M y de ésta con las glicoproteínas es determinante en el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis (Lamb y Kolakofsky, 1996). La replicación de los Rubulavirus se realiza totalmente en el citoplasma, por lo cual se forman aglomerados de nucleocápside que se observan como grandes inclusiones citoplasmáticas en las células infectadas (Hernández-Jauregui *et al.*, 2001).

El material genético viral también puede pasar directamente de una célula infectada a una célula vecina sin que haya necesidad de que se libere la partícula, esto debido al proceso de fusión de membranas celulares realizado por las proteínas HN y F. De ésta manera se originan las células gigantes multinucleadas o sincitios, características de las infecciones por paramixovirus (Lamb y Kolakofsky, 1996).

## **2.6 PATOGENIA**

La transmisión del virus es por contacto directo, por la aspiración de microgotas contaminadas con el virus de animales portadores cuando éste es eliminado a través de descargas nasales (Berg *et al.*, 1992; Fuentes *et al.*, 1992; Stephano, 2000b; Torres, 2004) siendo la ruta natural de infección la nasofaringe. Cuando la gota es muy grande queda atrapada en la mucosa oronasal y el virus busca una célula susceptible para replicarse, cuando las gotas son muy pequeñas el virus ingresa por la aspiración y se localiza en los conductos aéreos inferiores (Coller *et al.*, 2000)

La multiplicación inicial se lleva a cabo en la mucosa nasofaríngea y tejido linfático asociado, después se disemina a por vía aérea bronquios y pulmones, donde también se replica y se disemina en todo el organismo vía sanguínea (Allan *et al.*, 1996; Ramírez y Mendoza, 1997; Reyes-Leyva, en prensa).

El ingreso del virus al sistema nervioso central ocurre a través de terminaciones nerviosas que se encuentran en la porción olfatoria de la mucosa nasofaríngea, ascendiendo por nervios olfatorios a los lóbulos olfatorios y diseminándose en hipocampo, tallo cerebral y cerebelo donde se replica abundantemente (Allan *et al.*, 1996; Reyes-Leyva *et al.*, 1997) aunque hay propuestas de que por vía sanguínea atraviesa la barrera hematoencefálica (Ramírez y Mendoza, 1997).

A órganos linfáticos y reproductores, ingresa durante la fase de viremia y produce una infección sistémica (Ramírez *et al.*, 1997; Hernández-Jauregui *et al.*, 1998; García, 1999).

La respuesta humoral contra el Rubulavirus se inicia con la presencia de anticuerpos específicos a partir de la primera semana posinfección (PI). Durante las primeras cuatro semanas PI los títulos fluctúan entre 4 y 6 log<sub>2</sub>, a partir de la quinta semana PI se incrementan, llegando hasta 8.5 log<sub>2</sub> (Fujinami y Oldstone, 1980). En infecciones naturales, los anticuerpos se pueden detectar hasta después de 18 meses de infección. (Hernández-Jauregui *et al.*, 2004)

El Rubulavirus porcino, es un virus con capacidad para desarrollar persistencia *in vivo* e *in vitro* (Hjertner *et al.*, 1998; Wiman *et al.*, 1998). Se ha observado que es posible identificar material genético del virus en líneas celulares permanentemente infectadas, (Hjertner *et al.*, 1997) y en el sistema nervioso de cerdos hasta después de 50 días de infección (Wiman *et al.*, 1998)

## **2.7 PREVENCIÓN Y CONTROL**

Para el control o eliminación de la enfermedad del ojo azul las acciones necesarias van a depender del tipo de granja. En el pie de cría es necesario no mezclar animales de diferentes corrales, eliminar cerdos que presenten signología característica, evaluar todos los sementales de la granja, utilizar inseminación artificial por lo menos durante seis semanas, intensificar el diagnóstico de gestación, incrementar el número de servicios a medida que se incrementan las repeticiones, cerrar la granja por lo menos durante 16 semanas (Campos y Carbajal, 1989).

En el área de lactancia es necesario evitar el estrés, reduciendo el manejo de animales, no mezclar lechones de diferentes corrales, mantener temperatura adecuada dependiendo de su edad, sacrificar lechones enfermos (Stephano, *et*

*al.* 1986). En granjas donde se realiza manejo adecuado, con flujo de animales “todo dentro-todo fuera”, lavado, desinfección y otros manejos, la enfermedad se autolimita (Stephano y Gay, 1988).

En el sitio dos y tres es necesario evitar el hacinamiento, mantener temperatura, humedad y ventilación de acuerdo a su etapa productiva, no mezclar animales de diferentes edades (Stephano *et al.*, 1986b).

El virus se inactiva con agentes químicos como éter, formalina y  $\beta$ -propiolactona temperatura de 56°C en un periodo mayor a 4 horas (Stephano *et al.*, 1986b).

## **2.8 DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la enfermedad del Ojo azul se realiza dependiendo del momento de infección. Si la circulación del virus se encuentra presente, será conveniente observar los signos clínicos, además de realizar la necropsia, histopatología, aislamiento viral, inmunofluorescencia directa e indirecta en cultivo celular o en tejido mediante microscopía electrónica.

Sí el brote infeccioso no se encuentra presente, pero se desea evaluar la presencia de inmunidad generada por el virus, se pueden realizar pruebas serológicas, como inhibición de la hemoaglutinación (IH), actualmente la más utilizada; seroneutralización (SN); ELISA e inmunoperoxidasa, recientemente desarrollada, en un estudio serológico se demostró que tiene el 100% de correlación con la prueba de SN (Fuentes *et al.*, 1992; Ramírez *et al.*, 1996; Morilla *et al.*, 2000).

Se han realizado estudios para determinar cuál es la prueba serológica más confiable para el diagnóstico, uno de los cuales Morilla, *et al.* 2000, compararon las pruebas de ELISA, SN e IH en 46 animales después de un brote de campo y

se encontró que la SN tenía una sensibilidad del 89.1%, ELISA 89.1% e IH el 84%; en 35 animales inmunizados con una vacuna experimental se encontró que la sensibilidad para la SN fue del 94%, ELISA 91.4% e IH de 80%; en 94 animales vacunados en una granja durante un brote, se encontró que la sensibilidad para la prueba de ELISA fue del 91.5% e IH del 98.9%. Concluyéndose en este estudio que las mejores pruebas son SN y ELISA y que la IH puede emplearse como prueba de piara, aunque detecte un pequeño porcentaje de falsos positivos.

En este estudio se menciona únicamente la sensibilidad a la muestra, no así si esta prueba es capaz de determinar las diferentes cepas del agente, con lo cual en la actualidad se ha encontrado que esta puede variar dependiendo del órgano de donde se aisló, es decir, pulmón o encéfalo, provocando diferente signología, lo cual redundo en las pérdidas económicas al incrementar la mortalidad y morbilidad en una explotación.

En otro estudio donde se utilizó la prueba de IH para identificar diferencias entre siete aislamientos virales se concluye que se identificaron tales diferencias y un virus aislado de encéfalo de lechón fue el más reconocido por los sueros obtenidos de una granja multisitios con 15, 000 hembras en producción en el estado de Jalisco, determinando que éste virus era el causante del brote en la granja (Sánchez, 2004).

Actualmente se desarrollo la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), como diagnóstico aplicable a la enfermedad del Ojo azul, en éste procedimiento de estandarización se utilizaron 7 aislamientos virales identificados mediante la presencia de Hemoaglutinación y Efecto Citopático (ECP) Sánchez *et al.*, 2004).

### 3.0 JUSTIFICACIÓN

Debido a que actualmente no existen técnicas de laboratorio que permitan establecer de forma específica diferentes cepas del *Rubulavirus* porcino, es necesario estandarizar la técnica de seroneutralización, basada en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, para identificar variaciones entre aislamientos virales obtenidos en diferentes granjas y en el transcurso del tiempo.

Por tal motivo la presente investigación pretende identificar, las posibles diferencias entre los aislamientos virales obtenidos a través de los años, mediante la técnica de seroneutralización.

La seroneutralización es una técnica que se define como la pérdida de la capacidad infectante del virus por la reacción del mismo con un anticuerpo específico.

La actividad biológica de un anticuerpo se centra en su capacidad para unirse específicamente a un epitopo determinado del virion, los cuales intervienen en el proceso de adsorción del virus a la célula huésped. Los epitopos son específicos de cepa o tipo, de ahí que la neutralización viral sea la técnica más sensible y específica para la caracterización viral por métodos serológicos.

La técnica de seroneutralización puede utilizarse para:

- ◆ Identificación de un virus aislado
- ◆ Detección de la presencia de anticuerpos en el suero de animales sospechosos de padecer una enfermedad de etiología viral.
- ◆ Medida de concentración de anticuerpos después de la administración de una vacuna.
- ◆ Estudio de relaciones antigénicas entre cepas de un virus.

## 4.0 HIPÓTESIS

Debido a la alta especificidad y sensibilidad que proporciona la técnica de seroneutralización, utilizando antisueros específicos, es posible determinar si existen variaciones entre los diferentes aislamientos virales del *Rubulavirus* porcino obtenidos a través de los años.

## **5.0 OBJETIVO GENERAL**

Identificar si el virus que está circulando actualmente en granjas porcícolas del estado de Jalisco presenta el mismo reconocimiento al confrontarlos contra los diferentes aislamientos obtenidos en diferentes brotes y años, mediante el uso de la técnica de seroneutralización.

## 6.0 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar el *Rubulavirus* porcino que afecta actualmente en granjas porcícolas del estado de Jalisco.
  
- Establecer si la técnica de seroneutralización permite identificar variaciones entre los diferentes aislamientos virales del *Rubulavirus* porcino.
  
- Realizar un monitoreo serológico de las diferentes cepas virales en una granja porcícola positiva a la enfermedad del ojo azul en el estado de Jalisco mediante la técnica de seroneutralización.

## **7.0 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA GRANJA**

El presente estudio se realizó en un sistema de producción porcina de tres sitios múltiples, localizado en el municipio de San Juan de los Lagos en el estado de Jalisco, en la zona prevalece un clima templado con lluvias durante el verano, oscila una temperatura promedio anual de 22°C.

La granja cuenta con dos sitios uno, con capacidad para 7,500 hembras en producción cada una y su fin zootécnico es la producción de cerdo para abasto y la carne producida es importada hacia otros países.

En la granja se realizan muestreos serológicos periódicos para diferentes enfermedades como: Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), enfermedad del Ojo Azul (OA), enfermedad de Aujeszky (EA), Fiebre Porcina Clásica (FPC) y Parvovirus Porcino (PPV), por lo que cuenta con un programa de control y erradicación de enfermedades y se mantiene el mejor estado sanitario dentro de la misma.

### **7.2 AISLAMIENTOS VIRALES**

Para realizar los aislamientos virales se utilizaron 27 animales divididos en dos grupos: 11 animales con edad entre 15 y 20 días y 16 entre 90 y 120 días de edad (CUADRO 2), que presentaron signos clínicos respiratorios y/o nerviosos asociados con la enfermedad del Ojo Azul.

La técnica de necropsia para los cerdos muertos y sacrificados se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Aluja y Constantino (2002).

Se obtuvieron 27 muestras de encéfalo y 27 de pulmón; a partir del encéfalo se obtuvieron porciones de cerebro, lóbulos olfatorios y corteza cerebral; del pulmón muestras de lóbulos.

Las muestras se maceraron con medio de cultivo y filtraron con portafiltros y pre-filtros de 1.2, 0.6, 0.45 y por último por filtros de 0.22 $\mu$  de forma estéril.

Con 1 ml de cada sobrenadante filtrado se infectaron monoestratos de la línea celular vero (Riñón de Mono Verde) de 24 hrs. de formación y a los 3 y 6 días pos-inoculación se observó la presencia o ausencia de efecto citopático (ECP).

Se obtuvieron 200 $\mu$ l del sobrenadante y se confrontó 50 $\mu$ l de con eritrocitos de ave, bovino y cuye al 0.5% por separado; para diagnosticar como positiva o negativa la muestra, se observó la presencia o ausencia (FIGURA 1A) de aglutinación producida el Rubulavirus Porcino, reportándose la aglutinación como muestra positiva, de acuerdo a ésta aglutinación se clasificó como aglutinación leve, media y moderada. (FIGURAS 1B, 1C Y 1D)

### **7.3 METODOLOGÍA DE LOS VIRUS AISLADOS**

Una vez diagnosticados como positivos o negativos los aislamientos virales, se seleccionaron dos de ellos, el primero a partir de encéfalo de lechón menor de 30 días de edad (E-L) y el segundo proviene de encéfalo de un animal de más de 90 días de edad (E-E).

#### **7.3.1 TITULACIÓN DE LOS VIRUS AISLADOS**

1. En una microplaca de fondo en "U" de 96 pozos (NUNC 262179) se vertieron 50  $\mu$ l de PBS (solución amortiguadora de fosfatos con pH de 7.2) en todos los pozos.

2. Se adicionaron de la hilera "1" a la "6", 50  $\mu$ l del virus E-L en una placa y de la misma forma en otra placa del virus E-E.
3. Se utilizaron las hileras "7" y "8" como control negativo (sin virus) y las hileras "8" y "9" como control positivo (colocando 50  $\mu$ l de un virus conocido).
4. Se transfirieron 50  $\mu$ l de la fila "A" a la fila "B" y así hasta llegar a la fila "H", para realizar la dilución de cada virus.
5. Ya realizada la dilución, en todos los pozos de las hileras "1" a la "9" se colocó 50  $\mu$ l de una suspensión de eritrocitos de ave al 0.5%.
6. Se consideró como título final de la hemoaglutinación el pozo anterior a donde se presentó sedimentación de glóbulos rojos.

### 7.3.2 RECONOCIMIENTO DE LOS VIRUS AISLADOS

Para el reconocimiento de los virus aislados y no confundirlos con otros virus hemoaglutinantes, se realizó la caracterización inmunológica de los dos virus mediante la técnica de seroneutralización.

Para ello se confrontaron con un suero conocido (PAC 3), siguiendo la metodología para la técnica:

1. Se adsorbió el suero PAC 3 para eliminar inhibidores específicos de la hemoaglutinación.
  - a. En una microplaca de 96 pozos e fondo en "U", se vertieron 100  $\mu$ l del suero en 4 pozos.
  - b. En cada uno de ellos, se adicionó 50  $\mu$ l de caolín y 50  $\mu$ l de eritrocitos de bovino al 5%.
  - c. Se incubaron a 4°C durante 24 horas.
2. Se depositaron en una microplaca de 96 pozos con fondo en "U"
  - a. 50  $\mu$ l de PBS en todos los pozos.

- b. 50  $\mu$ l del sobrenadante del suero adsorbido en la línea "A" de la hilera 1 a la 6.
- c. Se realizaron diluciones dobles seriadas de la línea "A" a la "H" y se eliminaron al final 50  $\mu$ l. Se consideraron las hileras 7 y 8 como control negativo y las hileras 9 y 10 como control positivo.
- d. Se agregaron 50  $\mu$ l de los virus aislados y previamente titulados con 8UHA en cada pozo de las hileras 1 a la 3 con el virus E-L y de las hileras 4 a la 6 con el virus E-E.
- e. Se incubó la placa durante 30 min. a temperatura ambiente.
- f. Se adicionaron 50  $\mu$ l de eritrocitos de bovino al 0.5% en cada pozo de toda la placa.
- g. Se incubó finalmente durante 30-60 min. a temperatura ambiente.

Se considera como reacción positiva cuando el título es mayor o igual a 1:16.

Los aislamientos anteriores y cuatro cepas restantes, las cuales se obtuvieron de muestras remitidas para su diagnóstico al Departamento de Producción Animal: Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México procedentes de la zona porcícola del bajío de la República Mexicana, a los cuales se les denominó PAC 1(Michoacán 1990), PAC 2 (Jalisco 1990), PAC 3 (Jalisco 1992) y PAC 4 (Guanajuato 2003) de acuerdo al lugar y fecha de aislamiento.

#### **7.4 TITULACIÓN DE LOS 6 AISLAMIENTOS**

Estos 6 aislamientos virales se titularon mediante la infección en tejido celular de la siguiente manera:

##### **7.4.1 TITULACIÓN VIRAL POR INFECCIÓN EN TEJIDO CELULAR**

1. Se realizaron diluciones décuples de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  de cada uno de los 6 virus con medio de cultivo sin suero.
2. Se agregó 50 $\mu$ l de cada dilución y 50 $\mu$ l de medio de cultivo MEM (SIGMA M0643) sin suero a monocapas de cultivo celular de 24 hrs. de formación previamente preparados en microplacas de fondo plano (NUNC 167008) (se realizó por duplicado para cada virus).
3. Se colocaron en incubación dentro de una estufa a 37°C.
4. A los 3 días de incubación se tomó 50 $\mu$ l del sobrenadante y se aglutinó con eritrocitos de ave al 0.5% y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.
5. A los 6 días pos infección se realizó el mismo procedimiento de aglutinación y además se realizó tinción de la placa con cristal violeta (SIGMA No. De CATÁLOGO C3886) para evidenciar el efecto citopático producido por cada virus.
6. El título de cada virus se obtuvo utilizando el Método de Karber.

Estos seis aislamientos también se titularon por hemoaglutinación utilizando la siguiente metodología:

#### **7.4.2 TITULACIÓN POR HEMOAGLUTINACIÓN**

1. En microplacas con fondo en "U" de 96 pozos (NUNC 262179) se vertieron 50  $\mu$ l de PBS (solución amortiguadora de fosfatos con pH de 7.2) en todos los pozos.
2. Se adicionaron 50  $\mu$ l de cada virus en la primera hilera vertical (por triplicado de cada uno).
3. Para la diluir cada virus se transfirieron 50  $\mu$ l al pozo siguiente iniciando desde el primero y hasta el antepenúltimo pozo, dejando el penúltimo como control negativo (sin virus) y el último como control positivo (en el cual se colocan 50  $\mu$ l de virus de diferencia).

4. Ya realizada previamente la dilución, en la primera hilera de cada dilución del virus se colocó 50 µl una suspensión de eritrocitos de ave, en la segunda dilución de bovino y en la tercera de cuye al 0.5%.
5. Se consideró como título final de la hemoaglutinación el pozo anterior a donde se presenta sedimentación de glóbulos rojos.

## **7.5 INOCULACIÓN A CONEJOS**

Obtenido el mismo título de 32 unidades Hemoaglutinantes (UHA) o  $1 \times 10^{-5}$  de cada aislamiento, se inocularon 2 conejos para cada uno de los virus, 1 ml vía intramuscular y 0.5 ml vía intranasal utilizando 0.5 ml de hidróxido de aluminio como adyuvante.

A los 14 y 21 días pos-inoculación se obtuvieron muestras de sangre en vacutainer sin anticoagulante, para posteriormente recuperar el antisuero de cada virus; se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación para identificar la presencia o ausencia de anticuerpos.

## **7.6 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN**

De las muestras de sangre obtenidas de los conejos se obtuvo la mayor cantidad posible de suero, para esto fue necesario, que desde el momento que se obtuvo la sangre, el vacutainer sin anticoagulante se mantuvo de forma transversal previo a la centrifugación.

Una vez obtenido el suero:

1. Se inactivaron las proteínas del complemento incubando el suero en baño María a 56°C durante 30 min.
2. Se adsorbieron para eliminar inhibidores específicos de la hemoaglutinación, por lo que los sueros fueron tratados de la siguiente manera:

- a. En una microplaca de 96 pozos de fondo en "U" se vertieron 100µl de cada suero por separado.
  - b. Se adicionaron 50µl de caolín y 50µl de eritrocitos de bovino al 5%.
  - c. Se incubaron a 4°C durante 24 hrs.
3. Se depositaron en microplacas de 96 pozos con fondo en "U"
- a. 50µl de PBS (solución de fosfatos con pH de 7.2) en todos los pozos.
  - b. 50 µl del sobrenadante del suero adsorbido en la línea "A".
  - c. Se realizaron diluciones dobles seriadas de la línea "A" a la "H" y se eliminaron al final 50µl. Se consideraron que las dos últimas hileras sirvieran como controles positivo y negativo.
  - d. Se agregaron 50 µl de cada antígeno viral con 8 UHA en cada pozo a partir de la línea "B" a la "H".
  - e. Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente.
  - f. Y se adicionaron 50µl de eritrocitos de bovino al 0.5 % en cada pozo.
  - g. Finalmente se incubaron durante 30-60 min a temperatura ambiente.

### 7.6.1 CONTROLES

*Positivo:* se utilizó suero con título conocido de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, PBS, antígeno viral y eritrocitos. Hay unión antígeno-anticuerpo, por lo que se observa la formación de un botón al sedimentarse los eritrocitos.

*Negativo:* Se utilizó suero conocido que no contenía anticuerpos antivirales, PBS, antígeno viral y eritrocitos. No hay anticuerpos, por lo que el antígeno se une a los eritrocitos observándose hemoaglutinación.

En la prueba de IH se considera que un suero es positivo cuando presenta título igual o mayor a 1:16.

Una vez identificado el título de 1:32 en la IH en cada uno de los sueros específicos se utilizaron para identificar las respuestas homólogas y heterólogas, es decir, la reacción de un virus con su antisuero y el reconocimiento de éste, con los otros antisueros; mediante la técnica de Seroneutralización por el método suero variable-virus fijo.

## **7.7 RESPUESTAS HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS**

Para identificar las respuestas homólogas y heterólogas de cada uno de los virus se siguió la metodología de la técnica de seroneutralización suero variable-virus fijo, en la cual se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano y se realizaron diluciones dobles seriadas de cada uno de los antisueros (por separado pero con el conocimiento de la previa titulación por IH de cada uno de ellos con 32 UHA).

Se colocaron 50µl de medio MEM sin suero en todos los pozos de la columna 1 a la 9; 50µl de cada antisuero en la línea "A" del pozo 1 al 6, los pozos 7, 8 y 9 se utilizaron para los controles negativo, de virus y de células respectivamente, se pipeteo 7 veces y se diluyó de la columna "A" a la "B" y así sucesivamente hasta la "H", al final se eliminaron 50µl. En todos los pozos de las columnas 1 a 8 se adicionaron 50µl del antígeno a una dosis de 300 DICC 50% previa titulación del virus. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

En placas con células VERO previamente preparadas con un monoestrato de 24 horas de formación, se decantó el medio y se transfirieron 100µl de la dilución que se preparó con anterioridad a cada uno de los pozos según correspondía.

La placa se incubó dentro de una estufa a 37°C, se realizó una revisión diaria de la placa para observar la presencia o ausencia de efecto citopático; a los 3 y 6 días de incubación se tomó 50µl del sobrenadante y se aglutinó con

eritrocitos de bovino al 0.5% en placas con fondo en “U” las cuales se incubaron a temperatura ambiente durante 30 a 60 min. para observar la presencia o ausencia de hemoaglutinación, anotándose el título correspondiente.

A los 6 días se tiñó la placa con cristal violeta para evidenciar el efecto citopático producida por el virus y así detectar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes.

Este mismo procedimiento se realizó para los seis aislamientos del virus a estudio con los seis antisueros.

### **7.7.1 CONTROLES PARA LAS RESPUESTAS HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS**

#### **A. POR ACTIVIDAD AGLUTINANTE**

*Positivo:* sobrenadante positivo y eritrocitos de bovino al 5%; hay unión antígeno-anticuerpo y los eritrocitos sedimentan mientras existan anticuerpos. Cuando ya no hay anticuerpos se presenta aglutinación.

*Negativo:* sobrenadante negativo y eritrocitos de bovino; no hay unión antígeno-anticuerpo y los eritrocitos se aglutinan.

*Virus:* antígeno y eritrocitos; se observa aglutinación de los eritrocitos.

*Células:* Sobrenadante del cultivo celular y eritrocitos de bovino. Los eritrocitos sedimentan.

\*El título del suero se dio en la dilución inversa a donde se presento aglutinación.

#### **B. POR EFECTO CITOPÁTICO.**

*Positivo:* suero positivo, MEM sin suero y antígeno; Hay unión antígeno-anticuerpo, por lo que no se observa efecto citopático mientras existan anticuerpos.

*Negativo:* suero negativo, MEM sin suero y antígeno; No hay unión antígeno-anticuerpo, por lo que se observa efecto citopático.

*Virus:* MEM sin suero y antígeno; El antígeno infecta las células por lo cual se observa efecto citopático.

**Células:** células VERO y MEM sin suero; El monoestrato se observa íntegro.

\*El título del suero se dio en la dilución inversa a donde se presentó efecto citopático.

A partir de 32 unidades seroneutralizantes para la para la técnica de seroneutralización se considera un suero positivo.

## **7.8 CONFRONTACIÓN DE SUEROS DE CAMPO**

Se realizó un monitoreo transversal de una granja del estado de Jalisco, en la cual se encuentra circulando el *Rubulavirus* porcino, esto mediante la confrontación de 64 sueros contra 6 los virus a estudio, utilizando la técnica de seroneutralización en su variación suero variable-virus fijo.

Los 64 sueros aislados, pertenecían a animales de diferentes partos y edades: 10 sueros de cerdas de 0 a 1 parto; 9 de 3 a 4 partos y 9 de más de 5 partos. Para los cerdos de la línea de producción fueron 6 sueros de 20 a 30 días; 10 para animales de 35 a 60 días; 10 de 60 a 90 días y para cerdos de 90 a 120 días, 10 sueros.

El procedimiento utilizado de la técnica de seroneutralización en su variación suero variable-virus fijo, fue el siguiente:

Procedimiento:

1. Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano estéril para hacer las diluciones.
2. Colocar 50 µl de medio sin suero en todos los pozos de la columna "1" a la "10".
3. Poner 50 µl de los sueros en la línea "A", pipetear 7 veces y diluir 50 µl de la columna "A" a la "B" y así sucesivamente hasta la línea "H". Al final eliminar 50 µl.
4. Depositar los controles positivo y negativo en la columna "10" y "11" respectivamente, estos se manejaron como en el punto 2 y 3.

5. Se adicionaron 50 µl de antígeno a una dosis de 300 DICC 50%, previa titulación del virus.
6. Se incubaron durante 60 min. a temperatura ambiente.
7. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se transfirieron 100 µl de cada línea a una placa con un monoestrato de células VERO de 24 hrs. de formación.
8. Se realizó la revisión diaria de las placas para observar la presencia o ausencia de efecto citopático.
9. A las 72 horas, se transfirieron 50 µl de sobrenadante en placas con fondo en "U" y se agregaron 50 µl de eritrocitos de bovino al 0.5%.
10. A las 120 horas se realizó la lectura previa al microscopio invertido y posteriormente se tiñó la placa con cristal violeta.

A partir de un título 1:32 se considera positivo para la enfermedad del Ojo Azul.

Si alguno de los controles no corrió adecuadamente, la técnica se consideró no válida.

El mismo procedimiento se utilizó para todos los sueros que se confrontaron contra los seis aislamientos virales por separado.

## 8.0 RESULTADOS

### 8.1 AISLAMIENTOS VIRALES

En el cuadro 1 se observan los aislamientos virales por tejido obtenidos de cerdos con signología sugerente a infección por el *Rubulavirus* porcino. En este cuadro se presenta el número de pase en el que se encontró el virus y tejido de procedencia, así como el rango de edad de cada cerdo.

De los 22 aislamientos virales de cerdos adultos (de 90 a 120 días de edad); 8 de ellos (4 aislados de pulmón y 4 de encéfalo) se aislaron en el primer pase, 6 aislamientos en el segundo pase (2 de encéfalo y 4 a partir de pulmón) y en el tercer pase se aislaron 8 virus restantes (4 a partir de encéfalo y 4 de pulmón).

En cuanto a los aislamientos virales obtenidos de lechones entre 15 a 20 días de edad, 2 se aislaron de encéfalo en el primer pase y 10 en el segundo (6 aislados de encéfalo y 4 a partir de pulmón).

El mismo cuadro 1, se observa que de los cerdos identificados como animal 3 y 7 de 100 y 120 días de edad respectivamente los aislamientos se obtuvieron de pulmón, pero no así de encéfalo; en cambio los lechones con números 17, 18, 21 y 24, estos aislamientos solo fueron de encéfalo, estos últimos pertenecientes al grupo de animales entre 15 a 20 días.

Cabe mencionar que de los cerdos identificados como animal 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 23, 25, 25 y 27 los virus aislados fueron de ambos órganos, es decir de encéfalo y pulmón, estos en diferentes pases del virus.

Se seleccionaron los 2 aislamientos virales; El cerdo identificado como número 21 (Cuadro 1) menor a 20 días, donde el aislamiento provino de encéfalo y el cerdo 11 (Cuadro 1) mayor a 90 días, de donde se obtuvo el aislamiento del mismo origen que el primero.

En el cuadro 2 se muestran los 27 animales de los cuales se obtuvieron las muestras de encéfalo y pulmón; 16 de ellos pertenecían a animales de entre 90 a 120 días de edad y 11 a cerdos entre 15 y 20 días de edad.

También se presenta el tejido de procedencia (encéfalo o pulmón) de cada virus aislado; de las 54 muestras a estudio, 34 resultaron positivas; 18 procedentes de encéfalo y 16 a pulmón.

Al momento de agrupar los aislamientos virales de acuerdo a la edad de los animales, 12 provenían de animales del grupo de 15 a 20 días de edad y 22 del grupo de 90 a 120 días de edad.

Al analizar la procedencia de lo virus por grupo de edad, se encontró que de las 12 muestras positivas de lechones del grupo de 15 a 20 días de edad, 8 de ellas provenían de encéfalo y 4 de pulmón, lo que corresponde al 66% y 34% respectivamente. En cambio, el patrón de comportamiento en los animales adultos es diferente, ya que, de las 22 muestras positivas del grupo de animales entre 90 a 120 días de edad, 10 de ellas se obtuvieron de encéfalo y 12 de pulmón, lo que corresponde al 45.5% y 54.5% respectivamente.

## **8.2 RESPUESTAS HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS**

En el cuadro 3 se presentan los títulos obtenidos de las respuestas homólogas y heterólogas de cada virus con su antisuero específico mediante la técnica de seroneutralización.

En el título obtenido en las respuestas homólogas ,es decir, la confrontación de el virus con su antisuero específico no se observan diferencias entre los virus E-L y PAC 1; entre los virus E-E, PAC 2 y PAC 3; pero si hay tal diferencia entre los dos grupos y estos con el virus PAC 4 (Gráfica 1).

Pero al momento de revisar los títulos obtenidos en las respuestas heterólogas, es decir, la confrontación de un virus con los otros antisueros, la reacción neutralizante es diferente entre todos los aislamientos virales (Gráfica 2).

### **8.3 MONITOREO SEROEPIDEMIOLÓGICO**

En el cuadro 4, se presenta los títulos obtenidos de muestras de sueros de campo provenientes de una granja del estado de Jalisco, la cual presentó un brote de la enfermedad del Ojo azul, los sueros pertenecen a 64 animales de diferentes partos y edades, los cuales se confrontaron contra los seis aislamiento virales, se consideró como suero positivo todo aquel que obtuvo un título superior o igual a 32 unidades seroneutralizantes.

En el cuadro 5, se presentan en número y porcentaje los sueros de campo que resultaron positivos y negativos al confrontarlos contra los seis aislamientos virales, se puede observar que, al ser confrontados contra los 6 diferentes aislamientos el porcentaje de animales positivos para cada uno de los virus es diferente, solo porcentajes iguales de reconocimiento ante ellos fueron entre el PAC 1 y el PAC 3 cuyo porcentaje fue de 32.8% sueros, aunque los que tuvieron mayor reconocimiento fueron el PAC 2 y el PAC4 con el 51.6 y 53.1% y el de menor reconocimiento fue el E-E con solo el 20.3% de positividad en los sueros de campo.

Si analizamos los número y porcentajes de los sueros de campo de acuerdo al numero de parto o edad de los animales (Cuadro 6) encontramos que, los sueros provenientes de cerdas de 3 a 4 partos, así como los de hembras de cinco

partos, el 100% de ellos fue reconocido y resultaron positivos contra al menos uno de los virus. Caso contrario a las cerdas de 0 a 1 parto, en las cuales los sueros resultaron negativos en el 88.9 % de ellos.

En los cerdos de la línea de producción, los animales entre 20 a 30 días de edad resultaron positivos el 50 % de los sueros; y de 35 a 60 días el 70%; en el grupo de 60 a 90 días de edad resultó más bajo porcentaje de positivos con el 10% de ellos, pero no así con los cerdos del grupo entre 90 a 120 días de edad, en los cuales el 90% de los mismos resultó positivo (Cuadro 5).

## 9.0 DISCUSIÓN

Al analizar el número de aislamientos virales obtenidos de acuerdo a la edad de los cerdos y al tejido de donde estos provienen; de las 12 muestras positivas del grupo de lechones de 15 a 20 días de edad el 64% se obtuvieron de encéfalo y el 36% a partir de pulmón, por tal motivo es importante relacionar la edad del animal con el posible aislamiento viral, ya que en un estudio Reyes-Leyva *et al.*, (1993 y 1997) reportan la relación directa que existe entre la edad del animal y el tropismo tisular, debido al reconocimiento celular que tiene el virus sobre la molécula del disacárido Neu5Ac $\alpha$ 2,3-Gal y la cantidad presente en los tejidos y al grado de maduración y desarrollo del animal, ya que esta molécula se encuentra en mayores concentraciones en el sistema nervioso en lechones, en cambio con los sementales, en los cuales esta concentración mayor se presenta en el tejido testicular.

En cuanto al número de aislamientos virales obtenidos de pulmón; 12 de ellos fueron de animales de 90 a 120 días de edad y 4 de lechones entre 15 a 20 días de edad, esto quiere decir que el aislamiento a partir de este tejido representa una alternativa más para la detección a partir de aislamiento del Rubulavirus porcino, del tejido proveniente de animales de engorda con signología respiratoria, ya que el virus cuando entra por vía nasal a través microgotas puede ser identificado en los lóbulos pulmonares craneales (Allan *et al.*, 1996; Reyes-Leyva *et al.*, 1997) y provoca neumonía intersticial (Lorio *et al.*, 1986; Collier y Oxford, 2000; Chua *et al.*, 2000 y Bowden *et al.*, 2001). Sin embargo también se ha encontrado en hígado y bazo (Moreno *et al.*, 1986).

En lo que respecta al número de virus aislados de encéfalo, del total de aislamientos 8 fueron de animales entre 15 a 20 días de edad y 10 de animales entre 90 y 120 días, número mayor a los aislamientos a partir de pulmón en animales menores a 20 días, ya que este órgano es el principal donde ocurre la

replicación del virus, infectando a los 7 días pos-infección estructuras mesencefálicas, hipocampo, tálamo e hipotálamo (Reyes-Leyva *et al.*, 1997).

Ramírez *et al.*, permitieron definir tres grupos virales de acuerdo a las alteraciones observadas y a la edad de población más afectada. El primer grupo con los virus, con alteraciones neurológicas presentadas exclusivamente en lechones; en el segundo grupo los virus que producen alteraciones neurológicas y alta mortalidad en lechones, presentación de alteraciones neurológicas en cerdos de 3-4 meses y reproductivas en machos adultos; y un tercero como causante de problemas reproductivos en adultos y manifestaciones escasa en lechones.

En este estudio de los 34 aislamientos virales positivos sugerentes a la enfermedad del Ojo azul, durante el primer pase resultaron sin actividad hemoaglutinante 24 aislamientos y de esos 24 en el segundo pase viral 10. Reyes-Leyva *et al.*, en el 2002, realizaron un seguimiento de la infección de cultivos celulares con las cepas LPM, PAC 1 y PAC 3, pertenecientes a cada uno de las variantes patogénicas descritas por Ramírez *et al.*, y se observó que en virus PAC 3 emerge de la célula hospedera antes que las otras dos cepas, por lo que al menos *in vitro*, la cepa PAC 3 es más virulenta que las otras dos, es liberada más rápido de la célula y probablemente dispersarse con mayor facilidad en busca de otras células. Sin embargo, se mostró que las otras dos cepas poseen una elevada actividad hemolítica, reflejo de su proteica de fusión, por lo que algunas cepas tardan más tiempo en liberarse más rápido de las células y por consiguiente mayor el tiempo en la infección a otras células.

La Prueba más utilizada en México para determinar la difusión del *Rubulavirus* porcino y establecer el patrón de circulación del virus dentro de las granjas porcinas es la prueba de Hemoaglutinación (Martínez *et al.*, 1986). Siendo así la más utilizada desde inicios de la enfermedad, debido a la facilidad y especificidad que se presenta por la reacción antígeno-anticuerpo. Esta técnica ha sido evaluada, donde la sensibilidad alcanzada en una granja con brotes de la

enfermedad del Ojo Azul, fue del 98.9% de sensibilidad (Morilla *et al.*, 2000), sin embargo este último reporte, se realizó con un antígeno que alcanzaba un título 1:32 UHA (Unidades Hemoaglutinantes), en donde se consideró que un suero positivo era con una dilución 1:80 en adelante.

También esta técnica es la más comúnmente utilizada en todo el mundo para la determinación de niveles de anticuerpos frente a varios virus tal es el caso de la Diarrea viral bovina (Reinhardt *et al.*, 2001), Fiebre porcina clásica (Islas *et al.*, 1997), los virus de la Influenza porcina A y B, y de la Parainfluenza 1 y 2 (Frank *et al.*, 1980), también ésta prueba se utiliza como prueba de referencia para la determinación y diferenciación de cepas virales de diversas enfermedades, ya que se considera altamente específica, que se basa en la detección de anticuerpos neutralizantes que surgen como respuesta protectora del animal frente a una infección viral (Dinter, 1989).

Respecto a la utilización de la técnica en su modalidad virus fijo – suero variable para realizar caracterización inmunológica, donde se determinan las posibles diferencias entre aislamientos virales obtenidas a través de los años, es importante mencionar que esta investigación es la primera donde se utiliza dicha técnica para identificar diferencias virales, de acuerdo a las respuestas obtenidas por el reconocimiento antígeno-anticuerpo de la confrontación de un mismo antisuero con antígenos del mismo género que fueron aislados de diferentes brotes en diversas granjas de la zona del Bajío y Occidente del País.

Cabe decir que en un estudio similar en el 2004 se utilizó la técnica de inhibición de la hemoaglutinación para identificar tales diferencias entre aislamientos virales del ojo azul, la cual permitió conocer que los virus presentan tales diferencias entre ellos y que mediante esta técnica se puede identificar el virus que está circulando actualmente en la granja (Sánchez, 2004).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio no se observan diferencias entre el título obtenido entre los virus E-L y PAC 1; resultado similar al reportado por Sánchez (2004) en cuya investigación menciona que estos dos virus presentaron el mismo patrón de reconocimiento al confrontarlos con sueros de campo mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación. Entre los virus E-E, PAC 2 y PAC 3 en este estudio tampoco se encontraron diferencias en el patrón de reconocimiento en las respuestas homólogas; pero si entre estos dos grupos y estos con el virus PAC 4. Por tal motivo se puede pensar que en los dos grupos de virus tienen un mismo origen dentro de cada grupo, aunque su aislamiento haya sido en diferentes años y granjas; ya que presentan diferencias estructurales con respecto a los demás aislamientos virales Reyes-Leyva *et al.*, (2002), quienes al evaluar las reacciones antigénicas cruzadas entre diferentes aislamientos virales propusieron que algunos de ellos pudieran ser variantes silvestres de los aislados en los primeros brotes de la enfermedad del ojo azul.

Al momento de observar las respuestas heterólogas, la reacción neutralizante es diferente entre todos los aislamientos, por lo que se puede deducir que la variación entre estos, lo cual se hace evidente al utilizar una prueba de laboratorio más sensible y específica (Hernández-Jáuregui *et al.*, 1992).

Al observar los títulos obtenidos de muestras de sueros de campo provenientes de una granja del estado de Jalisco, la cual presentó un brote de la enfermedad del ojo azul, los sueros pertenecen a 63 animales de diferentes partos y edades y que se confrontaron contra los seis aislamientos virales, se consideró como suero positivo todo aquel que obtuvo un título superior o igual a 32 unidades seroneutralizantes.

Y se encontró que al momento de contabilizar los sueros de animales positivos y negativos al ser confrontados contra los seis diferentes aislamientos virales el porcentaje de reconocimiento es diferente para cada uno, a excepción de los virus PAC 1 y el PAC 3 cuyo porcentaje de reconocimiento fue igual (32.8%);

los virus que tuvieron mayor reconocimiento fueron los virus PAC 2 y el PAC4 con el 51.6 y 53.1% y el de menor reconocimiento fue para E-E con solo el 20.3% de positividad en los sueros de campo.

En esta investigación se encontró que la seropositividad en las hembras reproductoras es diferente de acuerdo al número de parto al que se encuentren ya que los sueros provenientes de cerdas de 3 a 4 partos, así como los de hembras de cinco partos, el 100% de ellos fue reconocido y resultaron positivos contra al menos uno de los virus, caso contrario a las cerdas de 0 a 1 parto, en las cuales los sueros resultaron negativos en el 88.9 % de ellos, es importante mencionar que los resultados concuerdan con lo encontrado por Morilla *et al.*, (2000) y Sánchez (2004), en donde los porcentajes de seropositividad a la enfermedad del ojo azul mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación variaron del 40 al 100% para hembras de 1 a 5 partos.

Los resultados serológicos en hembras reproductoras son variables, ya que el porcentaje de seropositividad varía de acuerdo al momento del muestreo, el manejo de la granja y el tipo de producción, por lo tanto el porcentaje de de hembras positivas al Rubulavirus porcino puede variar (Sánchez, 2004).

Es importante mencionar que en la serología de la línea de producción se encontró que los animales entre 20 a 30 días de edad resultaron positivos el 50 % de los sueros; en cerdos de 35 a 60 días el 70%; este resultado no concuerda con lo encontrado por Martínez *et al.*, (1987), Morilla (2000) y Sánchez (2004), los cuales mencionan que la seropositividad de animales menores inicia a partir de los 75 días de edad, pero si concuerda con lo encontrado en animales de los grupos de 60 a 90 días de edad, el cual resultó más bajo porcentaje de positivos con el 10% de ellos y de los cerdos entre 90 a 120 días de edad, en cuyos sueros el 90% de los mismos resultó positivo, esto, mencionan que es posible que entre el segundo y el tercer mes de edad ocurra una infección que se refleja por el incremento del número de cerdos seropositivos a partir del tercer mes de edad.

Es importante mencionar que la técnica de seroneutralización (SN), consiste en una prueba punto final seroneutralizante, que permite identificar y cuantificar la capacidad de los anticuerpos séricos para inhibir o neutralizar el efecto citopático de una cepa dada y que los anticuerpos neutralizantes son responsables del efecto protector del suero y están dirigidos contra determinantes antigénicos específicos de la superficie del virus (FAO, 1985). Por tal motivo los resultados encontrados en este estudio difieren en algunos resultados con los demás estudios, donde se utilizan otras pruebas o técnicas de laboratorio, ya que esta técnica se considera como una técnica con alta sensibilidad y especificidad (Hernández-Jauregui *et al.*, 1992).

## 10.0 CONCLUSIONES

- Se encontró que en los aislamientos virales, fueron obtenidos principalmente de animales de engorda y la mayoría pertenecían a partir de pulmón, y caso contrario en animales menores a 20 días de edad, donde principalmente se obtuvieron a partir de encéfalo
- La técnica de seroneutralización proporciona una mayor sensibilidad y especificidad y por ello puede ser utilizada como técnica de referencia para identificar el o los virus circulantes en granja.
- La técnica de seroneutralización permite identificar variaciones entre los diferentes aislamientos virales del *Rubulavirus* porcino.
- El reconocimiento de los sueros de campo ante los diferentes virus aislados no es similar, es decir no todos los virus son reconocidos con los mismos títulos por un determinado suero.

## 11.0 LITERATURA CITADA

Allan GM, McNelly F, Walker Y, Linné T, Moreno-López, Hernández-Jáuregui P, Kennedy S, Carrol 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. *Journal Veterinary Diagnostic Invest.* 1996, 8: 405-413.

Aluja SA, Constantino CF. *Técnicas de necropsias en animales domésticos.* 2ª ed. El Manual Moderno. 2000; 10.

Berg MA, Hjertner B, Moreno LJ, Linné. The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polipeptides, P, V and C; the P protein mRNA is edited. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 1195-1200.

Berg MA, Sundqvist A, Moreno-Lopez J, Linne T. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* 1991, 72: 1045-1050.

Campos HR, Carbajal SM. Trastornos reproductivos de los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. *Memorias del XXIV Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos.* Morelia, México. 1989: 43.

Chua KB, Bellini WJ, Rota PA et al. Nipah virus, a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 2000, 288:1432-1435.

Borden TR, Westernberg M, Wang LF, Eaton BT, Boyle DB. Molecular characterization of Menangle virus, a novel paramyxovirus which infects pigs, fruit Bats, and humans. *Virology* 2001, 283: 358-373.

Collier L, Oxford J. Childhood infections caused by paramixovirus. Human Virology. Second Edition. Oxford University Press. 2000; 75-81.

Dinter Z. Diagnóstico Virology. A review of methods at the National Veterinary Institute. Coordinated research programme on animal disease diagnostic. National Veterinary Institute. 1989.

García O. Estudio de la viremia de una infección experimental por Rubulavirus porcino. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla (Pue), México. 1999.

FAO, ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Manual de técnicas de diagnóstico virológico. 1985.

Frank AL, Puck J, Hughes BJ, Cate TR. Microneutralization test for Influenza A and B and Parainfluenza 1 and 2 viruses that uses continuous cell lines and fresh serum enhancement. Journal of Clinical Microbiology. 1980; 426-432.

Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo OME, Fraire de I. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el Paramixovirus del Ojo Azul en cerdos de la República Mexicana. Vet. Méx. 1992; 23: 37-39.

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

Hernández-Jauregui P, Ramírez MH, Centeno CR, Monroy BJ, Reyes LJR, Centeno E. Neumonitis inducida por el rubulavirus porcino. Rev. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 1997; 38: 213-224.

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

Hernández-Jauregui P, Sundqvist A, Fuentes M, Díaz OA, Reyes LJ, Hernandez BE, Moreno LJ. Correlación entre las pruebas de virus neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del síndrome del ojo azul en cerdos. *Vet Mex*. 1992, 23:217-222.

Hernández-Jauregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Téllez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-López J. Uptake of porcine Rubulavirus (LPMV) by PK 15 cell. *Arch. Med. Res*. 2001, 32: 400-409.

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

Hjertner B, Linné T, Moreno L. Establishment and characterization of a Porcine Rubulavirus (LPMV) persistent in porcine kidney cell. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1997a, 38: 213-224.

Hjertner B, Wiman AC, Svenda M, Berg M. Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine Rubulavirus (LPMV). *Arch. Virol*. 1998; 143: 425-439.

Islas A, Quinteros G, Flores M, Quezada M, Díaz N, Sierra M. Detección de anticuerpos de la peste porcina clásica mediante la prueba inmunoenzimática (CIV-ELISA) y seroneutralización. *Arch Med Vet*. 1997, 29: 2.

Lamb RA, Kolakofsky D. Paramixoviridae: The viruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM *et al.* (Eds). Fields Virology. Tercera Ed. Lippincott-Raven Publishers. Filadelfia-NY. 1996, 1177-1204.

Lorio RM, Borgman JB, Glickman RL, Bratt MA. Genetic variation within a neutralizing domain on the haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. J. Gen. Virol. 1986, 67: 1393-1403.

Moreno-Lopez, Correa G, Martínez A, Ericsson A. Caracterización de paramixovirus isolates from the brain of a piglet in Mexico. Arch Virol. 1986, 91: 221-231.

Morilla GA, Diosado VF, González VD, Ojeda ZP, Mercado PM, Campumanes CA, Hernández JP, Moreno LJ. Estudio comparativo entre las pruebas de inmunoperoxidasa, ELISA e inhibición de la hemoaglutinación para el diagnóstico serológico de la enfermedad del ojo azul en cerdos. Symp. Int. de Enf. Em. Del cerdo. Guanajuato (Irapuato). Academia Veterinaria Mexicana AC, abril 2000.

Pérez PF, Stephano HA, Gay GM. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus de ojo azul. Memorias del XXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. León (Guanajuato). México, 1988: 81-83.

Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. Vet. Méx. 1996: 27 (3): 257-259.

Ramírez MH. Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul del cerdo a nivel testicular. (Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias). México (DF). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 1998.

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

Ramírez TCA, Stephano HA. Histological central nervous system lesions produced by hemoagglutinating virus in naturally infected pigs. *Proc 7<sup>th</sup> Int. Congr. Pig Vet. Soc. Mexico City.* 1982: 154.

Ramírez HMA, Mendoza MML, Dueñas SH. Experimental infection of swine and cat central nervous system by the pig paramyxovirus of the blue eye disease. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 1997, 4: 461-476.

Ramírez HMA, Hernández J, Santos-López G, Garfias Y, Zenteno E, Reyes-Leyva J. Clinicopatológica caracterización de Porcine Rubulavirus aislados. Manuscrito en preparación.

Reyes-Leyva, Hernández JP, Montañón LF, Zenteno E. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl(a2,3)lactose-containing structures. *Arch viro.*, 1993, 133: 195-200.

Reyes-Leyva J, Ramírez H, Hernández J, Rodríguez J, Mercado C, Carreón R, Adair B, Herron B, Alan G, Kennedy S, Centeno E, Hernández JP. El sistema olfatorio vía de ingreso del rubulavirus porcino al sistema nervioso central: I. Infección experimental y detección del antígeno. II. Distribución y papel de los ácidos siálicos. *Revista Biomédica.* 1997. 8 (2): 128-130.

Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinoza B, Borraz MT, Ramírez H, Vallejo V, Zenteno E. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudios con el Rubulavirus porcino. Mensaje Bioquímico, vol. XXVI. Departamento Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM. México DF. 2002: 99-127

Reyes-Leyva J, García O, Santos LG, Vallejo V, Hernández J. 2004. Detección de la viremia en la infección por Rubulavirus porcino. Arch. Med. Vet. En prensa.

Reinhardt G, Carrasco L, Tadich N, Riedemann S. Comparación entre do técnicas de diagnóstico para diarrea viril bovina (DVB) en 50 predios de la X región, Chile. Seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA I). Arch. Med. Vet. 2001. 33: 2.

Sánchez BJI. Evaluación de las afecciones reproductivas y caracterización del Rubulavirus porcino. Tesis de Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2004.

Sánchez BJI, Trujillo OME, Doporto DJM, Reyes LJ, Mendoza ES. Diagnóstico del Rubulavirus porcino (Enfermedad del Ojo azul) mediante la técnica de PCR. XL Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Yucatán, México. 2004.

Stephano HA. An outbreak of blue eye disease associated with PRRSV. Proceedings of the 25<sup>th</sup> Allen D. Leman Swine Conference. College of Veterinary Medicine, University of Minnesota. 1988: 71-73.

Stephano HA. Blue eye disease. Disease of swine 8<sup>th</sup> edition 1999. Editors: Straw BE, Mengelin WC, D'Allaire S, Taylor DJ. Iowa State University. Press. Iowa, USA. 1999: 237-241.

Stephano HA. Las enfermedades del ojo azul, signos clínicos y lesiones. Memorias del Symposium Internacional sobre Enfermedades Emergentes del cerdo. 2000a.

Stephano HA. Las enfermedades del ojo azul, signos clínicos y lesiones. Symposium Internacional de las Enfermedades del cerdo. Irapuato, Gto. México. Academia Mexicana A.C. 2000b.

Stephano HA, Gay GM. El síndrome del ojo azul en granjas engordadoras. Memorias del XIX Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Mérida. México, 1985a: 71-74.

Stephano HA. Gay GM. El síndrome del ojo azul en cerdos. Síntesis Porcina. 1985b; 4 (5): 42-49.

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

Stephano HA. Gay GM. Ramírez TCA. Encefalomyelitis and corneal opacity in pigs: A new viral disease named blue eye syndrome. Vet. Rec. 1985.

Stephano HA, Gay GM, Kreese J. Properties of a paramixovirus associated to new syndrome (blue eye syndrome) characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proc. 9<sup>th</sup> IPVS Congress. Barcelona, Spain. 1986: 455.

Stephano HA, Hernández D, Pérez C, González CT, Ramírez MH, Cervantes A. Boar infertility and testicle atrophy associated with blue eye paramixovirus infection. Proc 11<sup>th</sup> Int. Congr. Pig Vet. Soc. Lausanne, Switzerland. 1990: 211.

Stephano HA, Ramírez TCA, Gay GM, Maqueda AJJ. Estudios de un brote de encefalitis y opacidad de la córnea en lechones. Memorias del XVII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Guerrero (Ixtapa, Zihuatanejo). México, 1981: 43.

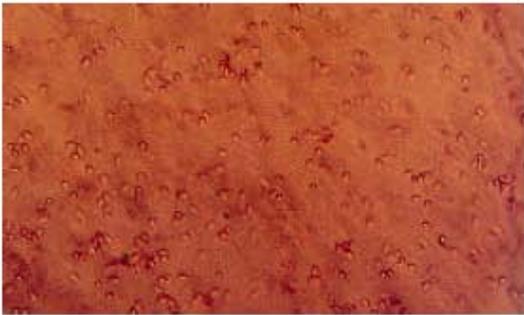
Stephano HA. Gay GM. Ramírez TCA. Encefalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. Vet. Rec. 1988, 122: 6-10.

Sundqvist A, Berg M, Hernandez JP, Linné T, Moreno-Lopez J. The neuraminidase gene of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxovirus closest to simian virus 5 and mumps virus. Arch. Virol. 1991, 122: 331-340.

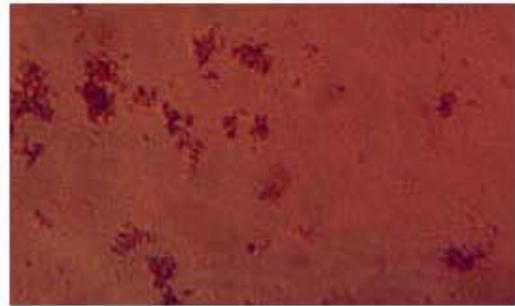
Torres CML. Fomento a la Investigación:  
<http://www.unam.mx/puis/foment2a.html>. 2004

Wiman AC, Hjertner B, Linné T, Herron B, Allan G, McNelly F, *et al.* Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. J. Neurovirol. 1998; 4: 545-552.

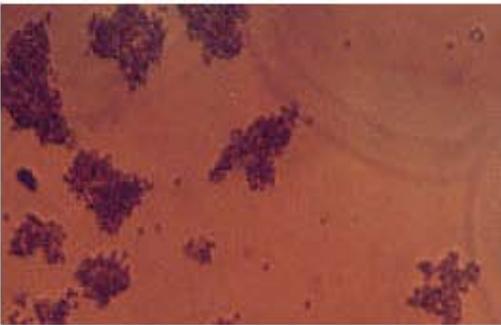
**FIGURA 1. OBSERVACIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE AGLUTINACIÓN PRODUCIDA POR EL RUBULAVIRUS PORCINO**



**FIGURA 1A. AGLUTINACIÓN AUSENTE**



**FIGURA 1B. ( + ) AGLUTINACIÓN LIGERA**



**FIGURA 1C. ( ++ ) AGLUTINACIÓN MODERADA**



**FIGURA 1D. ( +++ ) AGLUTINACIÓN ABUNDANTE**

**IMÁGENES OBSERVADAS EN MICROSCÓPIO INVERTIDO CONVENCIONAL. OBJETIVO 10X**

**CUADRO 1. AISLAMIENTOS VIRALES POR TEJIDO OBTENIDOS DE CERDOS CON SIGNOLOGÍA SUGERENTE A INFECCIÓN POR EL RUBULAVIRUS PORCINO.**

ANIMAL	EDAD (DÍAS)	MUESTRA	TEJIDO	RESULTADO	PASE VIRAL		
					1°	2°	3°
1	100	1	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		2	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
2	100	3	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		4	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
3	115	5	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		6	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(+++)	
4	60	7	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(+)	(+++)
		8	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(+)	(+++)
5	80	9	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+)
		10	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+)
6	120	11	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+++)
		12	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+)
7	95	13	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		14	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+++)
8	95	15	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
		16	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
9	90	17	ENCÉFALO	POSITIVO	(+) 3 D	(+++)	
		18	PULMÓN	POSITIVO	(+) 3 D	(+++)	
10	105	19	ENCÉFALO	POSITIVO	(+) 3 D	(+++)	
		20	PULMÓN	POSITIVO	(+) 3 D	(+++)	
11	95	21	ENCÉFALO	POSITIVO	(+) 3 D	(+++)	
		22	PULMÓN	POSITIVO	(+) 6 D	(++)	
12	95	23	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		24	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
13	100	25	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		26	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
14	100	27	ENCÉFALO	POSITIVO	(+) 3 D	(+++)	
		28	PULMÓN	POSITIVO	(+) 6 D	(+++)	
15	120	29	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+++)
		30	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+)
16	110	31	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+)
		32	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(-)	(+)
17	15-20	33	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
		34	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
18	15-20	35	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
		36	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
19	15-20	37	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		38	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
20	15-20	39	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		40	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
21	15-20	41	ENCÉFALO	POSITIVO	(+) 6 D	(++)	
		42	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
22	15-20	43	ENCÉFALO	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
		44	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
23	15-20	45	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
		46	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
24	15-20	47	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
		48	PULMÓN	NEGATIVO	(-)	(-)	(-)
25	15-20	49	ENCÉFALO	POSITIVO	(+) 6 D	(++)	
		50	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
26	15-20	51	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
		52	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
27	15-20	53	ENCÉFALO	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	
		54	PULMÓN	POSITIVO	(-) 6 D	(++)	

D= DÍAS DE INFECCIÓN (+) AGLUTINACIÓN LIGERA (IMAGEN 2) (++) AGLUTINACIÓN MODERADA (IMAGEN 3)  
(+++) AGLUTINACIÓN ABUNDANTE (IMAGEN 4)

**CUADRO 2. NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS A OJO AZUL EN TOTAL Y POR EDAD**

	TOTAL	EDAD (Días)	
		15-20	90-120
<b>NÚMERO ANIMALES</b>	27	11	16
<b>ANIMALES (+)</b>	20	8	12
<b>MUESTRAS (+)</b>	34	12	22
<b>ENCÉFALO</b>	18	8	10
<b>PULMÓN</b>	16	4	12

**CUADRO 3. TÍTULOS DE LAS RESPUESTAS HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS DE CADA VIRUS CON SU ANTISUERO ESPECÍFICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN**

SUERO	VIRUS					
	E-L	E-E	PAC 1	PAC 2	PAC 3	PAC 4
E-L	128	256	128	256	128	128
E-E	64	256	128	256	128	256
PAC 1	64	256	128	256	128	64
PAC 2	64	128	128	256	128	64
PAC 3	256	256	256	256	256	256
PAC 4	64	256	128	256	128	64

**CUADRO 4. TÍTULOS DE MUESTRAS DE SUEROS DE CAMPO CONFRONTADOS CONTRA 6 AISLAMIENTOS VIRALES**

PARTO/EDAD	AISLAMIENTOS VIRALES						RESULTADO
	E-E	E-L	PAC 1	PAC 2	PAC 3	PAC 4	
0-1		16	4	8	2	4	NEGATIVO
	4	32	8	16	16	32	POSITIVO
		4	4	4	16	4	NEGATIVO
		8	4	4	8	8	NEGATIVO
		2	4	2	4	4	NEGATIVO
		8	4	4	8	16	NEGATIVO
		2	4	4	4	8	NEGATIVO
		2		2	4	4	NEGATIVO
3-4	2	8	16	4	16	16	NEGATIVO
	2	32	32	64	64	64	POSITIVO
	64	256	256	256	256	256	POSITIVO
	64	256	256	256	256	256	POSITIVO
		16	4	64	4	8	POSITIVO
	4	16	16	128	8	64	POSITIVO
	2	8	4	64	8	8	POSITIVO
	8	32	32	64	16	64	POSITIVO
>5		2	2	64	2	32	POSITIVO
	128	256	256	256	256	256	POSITIVO
	256	256	256	256	256	256	POSITIVO
	256	256	256	256	256	256	POSITIVO
	64	256	128	256	256	256	POSITIVO
	16	64	32	128	32	64	POSITIVO
	4	16	16	64	16	64	POSITIVO
	8	256	64	128	64	128	POSITIVO
20-30	8	256	64	256	32	256	POSITIVO
	256	256	256	256	256	256	POSITIVO
	8	32	16	32	64	64	POSITIVO
				2			NEGATIVO
						8	NEGATIVO
	8	32	16	16	16	32	POSITIVO
		8	4	16	4	16	NEGATIVO
	32	256	128	256	256	256	POSITIVO
35-60		2	2	2	4	8	NEGATIVO
	4	64	16	16	16	64	POSITIVO
		8				2	NEGATIVO
	2	16	4	32	8	16	POSITIVO
	8	32	16	64	16	64	POSITIVO
	4	64	16	64	16	64	POSITIVO
	4	64	16	32	16	32	POSITIVO
		8	4	16	4	32	POSITIVO
60-90				4		4	NEGATIVO
				4		4	NEGATIVO
				16		8	NEGATIVO
				4		8	NEGATIVO
		8		4		4	NEGATIVO
						2	NEGATIVO
		4	4	4	4	8	NEGATIVO
						8	NEGATIVO
90-120	8	8	8	16	16	64	POSITIVO
				16		4	NEGATIVO
	4	16	16	256	16	64	POSITIVO
	32	128	128	256	128	256	POSITIVO
	8	32	32	256	32	128	POSITIVO
	32	128	128	256	128	256	POSITIVO
	8	32	64	256	32	128	POSITIVO
	32	128	128	256	128	256	POSITIVO
		4					NEGATIVO
	32	256	128	256	32	256	POSITIVO
	4	8	8	64	8	128	POSITIVO
	8	64	64	256	32	128	POSITIVO

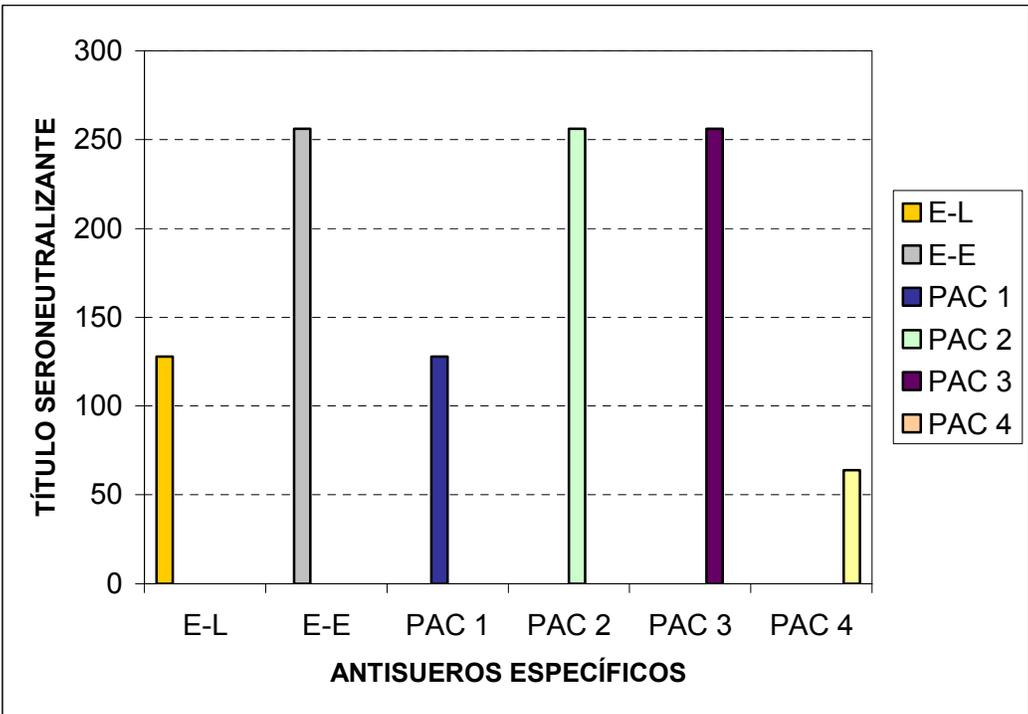
SE CONSIDERA COMO SUERO POSITIVO A PARTIR DE 32 UNIDADES SERONEUTRALIZANTES

**CUADRO 5. NÚMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS DE CAMPO POSITIVOS Y NEGATIVOS DE LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS VIRALES**

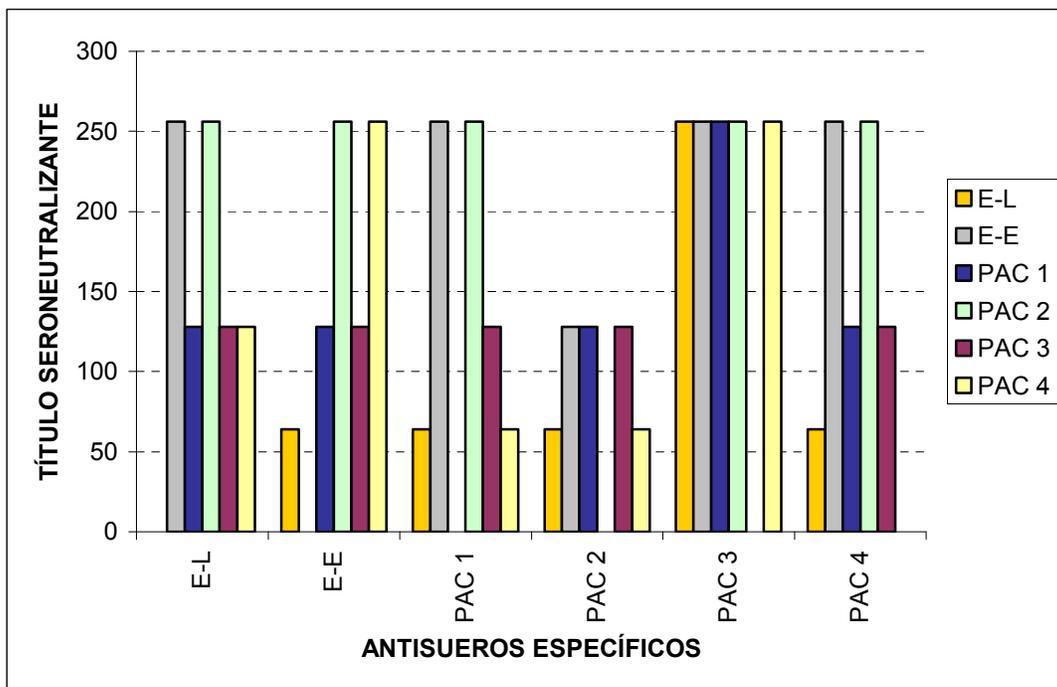
	<b>VIRUS</b>	<b>E-E</b>	<b>E-L</b>	<b>PAC 1</b>	<b>PAC 2</b>	<b>PAC 3</b>	<b>PAC 4</b>
<b>POSITIVOS</b>	NÚMERO	13	28	21	33	21	34
	PORCENTAJE	20.3	43.8	32.8	51.6	32.8	53.1
<b>NEGATIVOS</b>	NÚMERO	51	36	43	31	43	30
	PORCENTAJE	79.7	56.2	31.2	48.4	67.2	46.9

**CUADRO 6. NÚMERO Y PORCENTAJE DE SUEROS DE CAMPO POSITIVOS Y NEGATIVOS DE ACUERDO AL NÚMERO DE PARTO O EDAD DE LOS ANIMALES DE LA GRANJA A ESTUDIO**

PARTO/EDAD	POSITIVOS		NEGATIVOS	
	NÚMERO	PORCENTAJE	NÚMERO	PORCENTAJE
0-1	1	11.1	8	88.9
3-4	9	100	0	0
>5	9	100	0	0
20-30	3	50	3	50
35-60	7	70	3	30
60-90	1	10	9	90
90-120	9	90	1	10
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>61.9</b>	<b>24</b>	<b>38.10</b>



**GRÁFICO 1.** RESPUESTAS HOMÓLOGAS DE CADA VIRUS CON SU ANTISUERO ESPECÍFICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN



**GRÁFICO 2.** RESPUESTAS HETERÓLOGAS DE CADA VIRUS CON SU ANTISUERO ESPECÍFICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE SERONEUTRALIZACIÓN