

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DISTRIBUCIÓN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DEL OJO AZUL
EN CERDOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA
JASSO ESCUTIA MIGUEL ANGEL

Asesores:

Dr. Humberto Ramírez Mendoza
M.C José Francisco Rivera Benítez

México, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedicada a mis padres Miguel Ángel Jasso Padilla y Raquel Escutia Orta que lo son todo para mi, gracias por darme la oportunidad de vivir.

“Solamente dos legados duraderos podemos aspirar a dejar a nuestros hijos:
Uno, raíces; el otro, alas”

Hodding Carter

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: CONACYT AC-90024 “Estandarización de técnicas de diagnóstico para la enfermedad del ojo azul en cerdos”. PAPIIT IN224611 “Estudio de la interacción del Rubulavirus porcino y agentes virales implicados en el complejo respiratorio del cerdo. PAPIIT-IN211308 “Evaluación del Rubulavirus porcino en semen de verracos”. PAPIIME-PE/202709. “Apoyo a la docencia en las prácticas de laboratorio de la materia virología y enfermedades virales de los animales domésticos de la FMVZ-UNAM”.CONACYT SSA 126709. “Epidemiología del virus de la influenza y otros virus respiratorios en granjas de producción porcina en México”.

Agradezco especialmente a mi amigo y tutor José Francisco Rivera Benítez por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, así como muchas de las enseñanzas y las ganas de salir adelante, que siempre trató de inculcarme, algo que aprendí con el es que: “Para un investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que este sea”, gracias por todo hermano.

A mi tutor principal el Dr. Humberto Ramírez Mendoza por su compañerismo dentro y fuera del laboratorio, gracias por las 5333 veces que se tomo el tiempo y la dedicación que fue tan amable de brindarme, por su empeño y entrega para mantener unido al grupo por sobre toda problemática, por las ideas generadas durante todo este proyecto, pero principalmente gracias por su amistad.

Al Dr. Armando Pérez Torres de la Facultad de Medicina por la asesoría en la descripción histológica en cada una de las muestras, así como en la integración y revisión del protocolo de inmunohistoquímica empleado en esta tesis, gracias por su sencillez y todas las facilidades que durante todo el tiempo expresó.

A él histotecnólogo Alfredo Amadeo Díaz Estrada con matrícula de trabajo 844494 por la inclusión, preparación y su posterior corte de todos los tejidos en este trabajo.

A mi novia Mónica Ivonne Nuncio Limón por compartir esta experiencia profesional conmigo, tanto en las buenas como en las malas siempre estuvo ahí apoyándome y que sin duda sin su cariño y compañía esto no hubiera sido lo mismo.

A José Manuel Saavedra, Alberto Bravo, Pablo Hernández y Luis Ramírez por su increíble amistad, gracias por sus consejos pero sobre todo por su compañía.

A mis amigas de laboratorio Karina Rosas, Evelyn Camarillo, Karina Gaviña, Jazmín de la Luz, Mary Contreras, Tere López, Ceci Escobar, Ninnet Gómez, Claudia Valdez e Isabel Morales por su amistad y su apoyo.

A mi hermana Laura Verónica Jasso por darme la oportunidad de compartir como hermanos esta experiencia profesional.

A mis primos Angélica, Adriana, Alejandra (Valay's), Alejandro, Patricia, Rogelio (Marin's) y Susana Escutia por la fortuna de poder compartir juntos grandes momentos en mi vida.

A mis mejores amigos Ivette Ochoa, José Luis Ángeles, Osvaldo Jasso, Omar Jasso, Laura Puebla, Jorge Jasso, Irving Rojas, Rodrigo Kiessl, Gustavo Plascencia, Daniel Silva, Verónica Silva, Noemí Ortiz, Ximena Nuncio, Mónica Juárez, Georgina Cruz y Alejandra Ramírez por su inquebrantable amistad.

A mi tío José Luís Escutia por el apoyo económico durante mi carrera así como la atención y comentarios de aliento para la misma.

Y por último a mi abuelo Carlos Escutia Ortega y a mi abuela Ramona Orta Gloria, gracias por permitirme formar parte de esta gran familia.

RESUMEN

Distribución del virus de la Enfermedad de Ojo Azul en cerdos infectados experimentalmente

Miguel Ángel Jasso Escutia

Tutor principal: Dr. Humberto Ramírez Mendoza

Tutor secundario: M.C José Francisco Rivera Benítez

La Enfermedad del Ojo Azul afecta a cerdos de todas las edades, el Rubulavirus porcino es el agente causal de este padecimiento. La Enfermedad del Ojo Azul es endémica en la región Centro y Bajío de México. La presencia del virus en tejidos de animales infectados por periodos prolongados, evaluado por inmunohistoquímica no se ha realizado en estudios secuenciales. En este trabajo se evaluó la presencia del virus en riñón, bazo, hígado y pulmón, de 9 cerdos en crecimiento infectados con Rubulavirus porcino, sacrificados a los 7, 14 y 28 días post infección. También se evaluó la presencia de anticuerpos posterior a la infección experimental. El Rubulavirus porcino se distribuyó en todos los animales infectados, en tejidos de cerdos sacrificados a los 7 días post infección, solo se evidenció inmunopositividad en epitelio tubular de la corteza de tejido renal. En cortes de pulmón de cerdos sacrificados a los 14 y 28 días post infección se presentó un engrosamiento de la pared alveolar y una infiltración de células inflamatorias de tipo mononuclear sugerente a una inflamación crónica, sin embargo no se observó inmunopositividad en tejido pulmonar al antígeno mediante inmunohistoquímica. Se detectaron títulos de anticuerpos a partir de la muestra de los primeros 7 días post infección manteniendo una meseta hasta los últimos días del experimento. Los resultados sugieren que el virus de la enfermedad del ojo azul tiene afinidad por tejido renal, encontrándose una baja cantidad de virus por periodos prolongados, lo que posiblemente generara un daño tisular en tejido pulmonar.

El presente trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: CONACYT AC-90024 “Estandarización de técnicas de diagnóstico para la enfermedad del ojo azul en cerdos”. PAPIIT IN224611 “Estudio de la interacción del Rubulavirus porcino y agentes virales implicados en el complejo respiratorio del cerdo. PAPIIT-IN211308 “Evaluación del Rubulavirus porcino en semen de verracos”. PAPIIME-PE/202709. “Apoyo a la docencia en las prácticas de laboratorio de la materia virología y enfermedades virales de los animales domésticos de la FMVZ-UNAM”.CONACYT SSA 126709. “Epidemiología del virus de la influenza y otros virus respiratorios en granjas de producción porcina en México”.

Palabras clave: Enfermedad del Ojo Azul, Rubulavirus porcino, inmunohistoquímica, inmunopositividad, inflamación crónica, tejido renal, epitelio tubular.

Índice de CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Título	Página
1	Clasificación Taxonómica de la familia <i>Paramixoviridae</i> .	43
2	Distribución e intensidad de la inmunoreactividad para la proteína Hemoaglutinina-neuraminidasa del Rubulavirus porcino en cortes de tejidos incluidos en parafina analizados por inmunohistoquímica.	44
Figura	Título	Página
1	Organización del genoma del Rubulavirus porcino.	45
2	Inmunohistoquímica (IHQ-sistema biotina/avidina) y evaluación histológica Hematoxilina-Eosina (tinción HE) en riñón, bazo, hígado y pulmón de cerdo sacrificado a 7 días post infección (dpi).	45
3	Inmunohistoquímica de cerdo sacrificado a 7 días post infección, objetivo 10x.	46
4	Inmunohistoquímica de cerdo sacrificado a 7 días post infección, objetivo 20x.	46
5	Inmunohistoquímica de cerdo sacrificado a 7 días post infección, objetivo 40x.	47
6	Inmunohistoquímica (IHQ-sistema biotina/avidina) y evaluación histológica Hematoxilina-Eosina (tinción HE) en riñón, bazo, hígado y pulmón de cerdo sacrificado a 14 días post infección (dpi).	48
7	Inmunohistoquímica (IHQ-sistema biotina/avidina) y evaluación histológica Hematoxilina-Eosina (tinción HE) en riñón, bazo, hígado y pulmón de cerdo sacrificado a 28 días post infección (dpi).	49
8	Evaluación histológica Hematoxilina-Eosina de pulmón de cerdo, objetivo 20x.	50
9	Evaluación histológica Hematoxilina-Eosina (HE) de riñón de cerdos sacrificados a 7, 14 y 28 días post infección (dpi).	51
10	Curva de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra rubulavirus porcino (RVP) a diferentes días post infección mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.	52

ABREVIATURAS UTILIZADAS

μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico que contiene la información genética procedente del ADN para la síntesis de proteínas
BHK-21	Línea celular de riñón de hámster neonato
C	Proteína C no estructural del rubulavirus porcino
C3a	Componente anafiláctico del complemento
C5a	Componente anafiláctico del complemento
CD4+CD8-	Linfocitos dobles positivos en el cerdo que participan en el control de la infección
CD4+CD8+	Linfocitos dobles positivos en el cerdo que participan en la respuesta de memoria
DICC _{50%}	Dosis infectante en cultivo celular al _{50%}
dpi	Días post infección
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle
EOA	Enfermedad del Ojo Azul
F	Proteína estructural de fusión del rubulavirus porcino
F ₀	Polipéptido F ₀
F ₁	Proteína originada mediante la división por una proteasa del polipéptido F ₀
F ₂	Proteína originada mediante la división por una proteasa del polipéptido F ₀
HA	Hemoaglutinación
HE	Tinción hematoxilina-eosina

HN	Proteína estructural Hemaglutinina-neuraminidasa del rubulavirus porcino
hPIV-2	Virus de la Parainfluenza humana tipo 2
hPIV-4	Virus de la Parainfluenza humana tipo 4
I	Proteína I no estructural del rubulavirus porcino
IF	Inmunofluorescencia
IFID	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
IHA	Inhibición de la hemoaglutinación
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IP	Inmunoperoxidasa
IR	Inmunoreactividad
L	Proteína estructural de alto peso molecular
LPMV	Virus de la Piedad Michoacán
M	Proteína estructural de matriz del rubulavirus porcino
MenPV	Virus Menangle
MPRV	Virus Mapuera
MuV	Virus de la Parotiditis humana
NeuAc α -2,3Gal	N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa
nm	Nanómetro
NP	Proteína estructural Nucleoproteína del rubulavirus porcino
P	Fosfoproteína
PAC-1 – PAC-9	Producción animal 1 a 9
pi	Post infección
PK-15	Línea celular de riñón de cerdo
POA	Paramixovirus del Ojo Azul
POA-2	Paramixovirus del Ojo Azul 2
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RVP	Rubulavirus porcino
SN	Seroneutralización

SV-41 y -5	Virus símico
Th1, Th2	Linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 y 2
TioPV	Virus Tioman
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UHA	Unidades hemoaglutinantes
V	Proteína V no estructural del rubulavirus porcino

Índice

Unidad	Tema	Página
1	Introducción	1
1.1	Antecedentes históricos	1
1.2	Marco teórico	3
1.2.1	Clasificación Taxonómica	3
1.2.2	Tamaño y morfología	3
1.2.3	Organización genómica	4
1.2.4	Proteínas estructurales y no estructurales	4
1.2.5	Características fisicoquímicas y biológicas	5
1.3	Patogenia	5
1.3.1	Viremia	6
1.3.2	Susceptibilidad	7
1.3.3	Persistencia viral	7
1.3.4	Tropismo celular y tisular	10
1.3.5	Virulencia	10
1.4	Respuesta inmune	11
1.4.1	Humoral	11
1.4.2	Celular	12
1.5	Epidemiología	13
1.6	Signos clínicos	14
1.7	Lesiones	16
1.7.1	Lesiones macroscópicas	16
1.7.2	Lesiones microscópicas	17
1.8	Diagnostico	18
1.9	Prevención y control	19
2	Justificación	20
3	Hipótesis	21
4	Objetivos	22
5	Material y métodos	23
5.1	Animales de experimentación	23
5.2	Virus	23
5.3	Muestras sanguíneas	24
5.4	Infección experimental y necropsia	24
5.5	Inmunohistoquímica enzimática	25
5.6	Procesamiento de sueros	26
5.7	Inhibición de la hemoaglutinación	27
6	Resultados	28
6.1	Animales	28
6.2	Análisis inmunohistoquímico	28
6.3	Análisis histológico	30
6.4	Inhibición de la hemoaglutinación	30
7	Discusión	32
8	Conclusiones	36
9	Literatura citada	37

1. Introducción

1.1 Antecedentes históricos

En 1980 se describió la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) en cerdos de granjas del municipio de La Piedad, Michoacán, México, al observarse brotes de encefalitis y opacidad de la córnea en lechones. Inicialmente, el virus fue conocido como virus de La Piedad Michoacán (LPMV) por haberse realizado uno de los aislamientos entre los años 1979 y 1980. ¹ Posterior a su caracterización, se observó que poseía características similares a los miembros de la familia *Paramixoviridae*. ²

La EOA fue reproducida en lechones inoculados con un virus aislado en 1981, denominado paramixovirus del ojo azul (POA). Los hallazgos histopatológicos en cerdos infectados lactantes menores de 1 mes de edad, consistieron en meningoencefalitis no supurativa y neumonía intersticial. En cultivo celular producía efecto citopático con formación de sincitios en células PK-15 (células de riñón de cerdo) y actividad hemaglutinante. ^{3,4} Los signos clínicos iniciales observados incluían, incoordinación motora, hiperexcitabilidad, postración, movimientos de carrera o pedaleo y opacidad corneal presentándose un 90% de mortalidad de los animales infectados, una semana después de haberse presentado el cuadro clínico. La caracterización del virus aislado de un lechón con meningoencefalitis, permitió definir la etiología de la enfermedad, se confirmó que se trataba de un virus envuelto con genoma de ARN que poseía actividad hemaglutinante, hemolítica y formadora de sincitios. ⁵

En 1990, fueron identificadas las proteínas estructurales del virión: hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), de matriz (M), nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P) y la proteína de alto peso molecular (L).⁶ Posteriormente, en 1992, fueron obtenidas las secuencias de los genes que codifican las proteínas M, L, P y F. Estos estudios permitieron concluir que el LPMV está estrechamente relacionado con el virus de la parotiditis humana y el virus símico-5, por lo cual fue clasificado en el género *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*.^{4,7}

En 1992, se detectaron anticuerpos contra la enfermedad en Querétaro, Guanajuato, Nuevo León, Jalisco, Hidalgo, Tlaxcala, Distrito Federal, Campeche, Colima, Morelos, Puebla, Veracruz, Quintana Roo y Sonora.⁸ Posteriormente se presentaron brotes en los estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Distrito Federal y Querétaro,⁹ manteniéndose como un padecimiento endémico, principalmente en la zona del Bajío y Centro de México.

La EOA es reconocida por los signos clínicos que incluyen alteraciones del sistema nervioso, opacidad de la córnea (en cerdos lactantes y mayores a 30 días), falla reproductiva en hembras provocando un incremento en el número de repeticiones y abortos espontáneos, orquitis, epididimitis y baja en la calidad seminal en verracos.¹⁰⁻¹² Sin embargo, recientemente se reportó un cambio en la virulencia del Rubulavirus porcino (RVP) de cuatro aislamientos, encontrando cuadros clínicos con manifestaciones nerviosas en cerdos en la línea de engorda y en animales adultos.¹³

1.2 Marco teórico

1.2.1 Clasificación taxonómica

En 1995, el virus de la Enfermedad de ojo azul fue clasificado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, se incluyó en el nuevo género *Rubulavirus* y se le nombró *Rubulavirus porcino* (RVP).^{4, 7} En este género también se encuentra clasificado el virus de la parotiditis humana (MuV), el de la parainfluenza humana (hPIV)-2 y -4, el virus del simio (SV)-41 y -5, *Mapuera* (MPRV), *Menangle* (MenPV) y *Tioman* (TioPV).^{4, 7, 14}

Los miembros de la familia *Paramyxoviridae*, son virus envueltos, que poseen una cadena sencilla de ARN no segmentada en sentido negativo, divididos en las dos subfamilias *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*.^{4, 7} La clasificación taxonómica de la familia *Paramyxoviridae* se muestra en el cuadro 1.

Las especies del género *Rubulavirus* comparten propiedades biológicas y moleculares únicas, poseen actividad hemaglutinante y neuraminidasa y el grado de similitud en sus secuencias genéticas es muy alto. En específico, el RVP está relacionado estrechamente con el MPRV, MuV, SV-5 y el hPIV-2 y -4.

1.2.2 Tamaño y morfología

Las características morfológicas del RVP observado al microscopio electrónico son: estructura pleomórfica, generalmente esférica, no filamentosa, de 150 a 300nm de

diámetro, presenta una envoltura lipoproteica cubierta con proyecciones de 8-12nm, las cuales corresponden a las proteínas HN y F. La nucleocápside se observa como una hélice simple de 20nm de diámetro y 1000-1630 nm de longitud.^{5, 12}

1.2.3 Organización genómica

La estructura genómica (Figura 1), comprende seis genes que codifican 10 proteínas con funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas, los genes N, M, HN y L codifican una sola proteína, el gen F codifica un polipéptido llamado F₀ que es dividido por una proteasa celular en las proteínas F₁ y F₂ y el gen P que codifica a 4 proteínas mediante la edición del ARNm.^{3, 15-19}

1.2.4 Proteínas estructurales y no estructurales

El virión está compuesto por seis proteínas estructurales y tres no estructurales. Dentro de las proteínas estructurales la NP forma parte integral de la nucleocápside y se encuentra asociada al genoma, mientras que la P y la L forman el complejo con actividad polimerasa que se encarga de la transcripción y replicación viral; la proteína M permite tanto el ensamblaje como la gemación; la proteína HN es la proteína inmunodominante en la infección con RVP además de reconocer y adherirse al receptor específico en la célula y, finalmente, la proteína F que participa activamente en la fusión del virus a la célula.

Las proteínas no estructurales son sintetizadas a partir del gen P el cual contiene cuatro marcos de lectura abierta y puede dar origen a cuatro productos, las proteínas V, I y C, que se asocian a la regulación de la transcripción y la proteína P.^{3, 5, 8}

1.2.5 Características fisicoquímicas y biológicas

El RVP puede ser purificado en gradientes de sucrosa con una densidad de 1.21g/ml. La infectividad puede ser eliminada mediante tratamientos con éter, cloroformo, formalina (también elimina la capacidad hemaglutinante) y β -propiolactona. Es inactivado a 56° C después de 4 hrs.^{2, 12}

Se ha demostrado la capacidad hemaglutinante al confrontar el virus y la proteína HN purificada con eritrocitos de cerdo, carnero, caprino, bovino, equino, perro, conejo, rata, ratón, hámster, cobayo, pollo, pavo y humano tipos A, B, AB y O. La elusión se presenta entre los 30 a 50 minutos de incubación a 37° C.^{2, 12, 20}

1.3 Patogenia

La vía de entrada natural del RVP es la oronasal. La transmisión se produce principalmente por inhalación de aerosoles contaminados, los cuales, dependiendo del tamaño de la partícula, será el sitio de replicación inicial. Así, cuando las partículas conteniendo el virus son grandes, el sitio de replicación inicial es oronasal, básicamente en la mucosa nasofaríngea y tejido linfático asociado (tonsilas).

Cuando las partículas son muy pequeñas, el virus ingresa con la inspiración hasta el interior del pulmón y se deposita en los conductos aéreos superiores en donde la replicación es abundante. A partir de ahí, el RVP se disemina por vía sanguínea transportado por eritrocitos y leucocitos, iniciándose así, la infección sistémica, propagación y replicación en diversos órganos susceptibles tanto linfáticos como reproductivos.

El virus puede ingresar al sistema nervioso central a través de las terminaciones del nervio olfatorio en la mucosa nasal. Posteriormente se puede diseminar al hipocampo, tallo cerebral y cerebelo.²¹⁻²⁴

De manera experimental se ha producido la infección al inocular el RVP a los cerdos por vía intranasal, intratraqueal, intraocular, intracraneal, intraperitoneal e intramuscular.^{2, 5, 10, 21, 24-26}

1.3.1 Viremia

El estado de viremia ha sido detectado en los animales infectados experimentalmente con el RVP. Con inmunofluorescencia indirecta (IFID), se ha identificado positividad al antígeno viral en eritrocitos a partir del 4° día post-infección (dpi) permaneciendo positivos hasta el 12° dpi. En los leucocitos fue detectado el antígeno a partir del día 12 y hasta el día 20 post infección (pi). Sin embargo, debido a la corta duración del experimento (20 días), se desconoce que tan prolongado puede ser el tiempo en que el RVP se encuentre asociado a las células sanguíneas o presente en torrente sanguíneo promoviendo el estado de viremia.²⁴

1.3.2 Susceptibilidad

Se ha identificado que el RVP tiene una distribución variable dependiendo de la edad de los cerdos infectados. En cerdos neonatos se ha identificado que el sitio de mayor replicación viral es el sistema nervioso central y estructuras del tracto de la vía olfatoria. En cerdos destetados, la infección se establece predominantemente en el tracto respiratorio y en sistema nervioso central.^{2, 5, 27, 28}

En la infección experimental de cerdas gestantes, se logró aislar con mayor frecuencia al RVP en tracto respiratorio, ovarios y tonsilas; en los fetos de las cerdas infectadas también se aisló el RVP a partir de cerebro, pulmón e hígado, lo cual sugiere que el virus atraviesa la barrera placentaria y se produce la transmisión de forma vertical.¹¹

En los machos adultos se ha recuperado el RVP a partir de testículo y epidídimo a 30 y 45 dpi, respectivamente.^{10, 29}

Estos datos proporcionan evidencia de que el RVP tiene una distribución variable en los cerdos. Estas variaciones son influenciadas por el receptor celular que confiere el tropismo al virus.

1.3.3 Persistencia viral

La persistencia viral se define como la capacidad de un virus para permanecer dentro del organismo afectado por periodos prolongados, lo que ocasiona una infección

crónica. El estado de persistencia está influenciado por una baja tasa de replicación viral, producción de partículas virales defectuosas y baja expresión de las proteínas virales; sin embargo, la replicación viral puede reactivarse de manera efectiva y ocasionar una nueva infección aguda.³⁰⁻³²

La persistencia del ARN genómico y ARNm del RVP ha sido demostrada tras la infección experimental en cerdos convalecientes e inmunosuprimidos a 53 dpi, por medio de RT-PCR anidada con la que se amplificó el ARN del gen que codifica a la NP y al gen P; el ARNm se identificó a partir del análisis de los sitios de edición del gen P. Sin embargo, no se logró detectar al antígeno viral por medio de IFID, tampoco se pudo aislar al RVP en ninguno de los diversos tejidos analizados y esto se debe a la existencia de una carga viral baja así como la producción de partículas virales defectuosas incapaces de multiplicarse *in vitro*.³²

En condiciones normales³¹ se detectó con una RT-PCR anidada el ARN genómico del gen N y ARNm del gen P del RVP en sistema nervioso central, tonsila, glándula salival, pulmón y páncreas, de cerdos convalecientes hasta 13 meses después de la exposición al virus. Al introducir cerdos centinelas, se evidenció la transmisión al detectar el ARN genómico y ARNm del RVP. Sin embargo, en ninguno de los cerdos positivos se logró el aislamiento del virus y solamente en los cerdos convalecientes se detectó el antígeno por medio de inmunohistoquímica (IHQ). Se concluyó que el RVP genera un estado de persistencia prolongado en el sistema nervioso central y en órganos que son el sitio inicial de replicación viral. Los animales que se han recuperado de la infección aguda pueden mantenerse sin cuadros clínicos aparentes y funcionar como reservorios capaces de transmitir el RVP a cerdos susceptibles.

En un estudio experimental, fueron infectados cerdos vietnamitas de 17 días de edad con el LPMV (la cepa prototipo del RVP), los cuales exhibieron los signos característicos de la EOA, aunque sólo murió un cerdo de seis infectados al día 11 pi. Los cinco cerdos restantes se recuperaron de la enfermedad y fueron sacrificados a los 277 dpi. En estos se detectó, por RT-PCR anidada, el ARNm de los genes N y P en bulbo olfatorio, médula oblonga, cerebelo, linfonodos (mesentérico, cervical, submaxilar y parotídeo), páncreas y epidídimo. Sin embargo, el RVP no se pudo aislar en cultivo celular. Los autores concluyeron que el ARN del RVP que persiste en linfonodos, estimula continuamente el sistema inmune, generando una respuesta celular y humoral continua durante la infección crónica del RVP.³³

Bajo condiciones *in vitro*, se ha podido establecer en células PK-15 la persistencia del RVP, la cual se observó hasta por un año en cultivos con pases continuos, aunque la capacidad lítica del virus se modificó y permitió la multiplicación viral a títulos bajos.³⁴

Al evaluar la cantidad de transcritos del RVP en las células persistentemente infectadas, se encontró que la expresión de la proteína L disminuía considerablemente y la expresión de la proteína P se vio reducida. Estos cambios indicaban que la replicación y transcripción del RVP era afectada, ya que estas proteínas forman el complejo con actividad polimerasa indispensable para la replicación del virus. Se asumió que estas alteraciones en la expresión favorecían el estado de persistencia. También se observó que la expresión de la proteína V, relacionada con el control de la replicación viral, era mucho mayor que la de P. La presencia de ARN subgenómico puede inducir también el estado de persistencia al competir por la replicación con el ARN estándar.³⁵

1.3.4 Tropismo celular y tisular

El tropismo celular del RVP está definido por la expresión de receptores en la célula, en específico el ácido N-acetilneuramínico alfa 2-3 galactosa (NeuAc α -2,3Gal), componente terminal de diversas glicoproteínas celulares. Este receptor ha sido identificado abundantemente en regiones del sistema nervioso central (bulbo olfatorio, corteza del lóbulo piriforme, hipocampo, tálamo, tallo cerebral y cerebelo), del sistema respiratorio (mucosa nasal, tráquea, bronquios y pulmón) y en el sistema linfático (tonsilas y linfonodos) de cerdos neonatos. En cerdos machos adultos se ha identificado principalmente en el sistema respiratorio y en el sistema reproductor (testículo y epidídimo).^{10, 21, 22}

1.3.5 Virulencia

Desde el primer aislamiento del RVP, los factores asociados a la virulencia han sido estudiados. Se realizó una extensa revisión²² de los cuadros clínicos asociados a diferentes aislamientos realizados por el equipo de Dr. Ramírez-Mendoza en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los virus aislados fueron denominados POA-2 (Puebla/1988), PAC-1 (Michoacán/1990), PAC-2 (Jalisco/1990), PAC-3 (Jalisco/1992), PAC-4 (Michoacán/1993) y PAC-5 (Texcoco/1994). El estudio de los cuadros clínicos relacionados con cada aislamiento permitió definir tres grupos de virus: en el primero, el LPMV, POA y POA-2 provoca alteraciones nerviosas exclusivamente en lechones; en el segundo grupo, PAC-1, PAC-4 y PAC-5, provoca cuadros neurológicos y mortalidad alta en lechones, cuadros nerviosos en cerdos de 3-4

meses de edad y alteraciones reproductivas en adultos; y el tercer grupo, PAC-2 y PAC-3, provoca problemas reproductivos en adultos y cuadros nerviosos escasos en lechones.

Recientemente se han reportado nuevos cambios en la virulencia del RVP¹³ en cuatro aislamientos (PAC-6, PAC-7, PAC-8, PAC-9), encontrando cuadros clínicos con manifestaciones nerviosas en cerdos en la línea de engorda y en animales adultos. El cambio en la virulencia se relacionó con alteraciones en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica a la proteína HN. El análisis del árbol filogenético construido a partir de las secuencias disponibles, mostró una clara división en tres grupos, en los cuales el grupo uno se conforma por el LPM y PAC-4, el grupo dos PAC-2, PAC-3 y CI-IV, y el grupo tres formado por los aislados PAC-6 a PAC-9.

1.4 Respuesta inmune

1.4.1 Humoral

La presencia de anticuerpos neutralizantes se ha reportado desde la 1^a semana, con títulos de $4.6 \log_2$ y la máxima producción a la 5^a semana pi con $8.5 \log_2$.^{29, 36} En estudios que han evaluado la presencia de anticuerpos durante infecciones experimentales prolongadas, se han detectado anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación desde la 1^a semana pi con un título de $2.85 \log_2$, los cuales alcanzan su pico a la 9^a semana con $5.0 \log_2$ y se mantienen constantes hasta por 19^a semana.³⁷ Los anticuerpos generados están dirigidos contra las proteínas HN, NP y M. Los anticuerpos inhiben la unión del virus a su receptor celular y la penetración, favorecen la destrucción viral por complemento y llevan acabo mecanismos de neutralización, la

unión de los anticuerpos a la superficie de las células infectadas puede alterar la multiplicación al interior de la célula, suprimir la síntesis intracelular de proteínas virales y ARN viral contribuyendo a el control de la enfermedad

En cuanto a los linfocitos B (IgM+) se observa que la infección favorece la disminución de estas células en la 4^a semana pi.³⁸

1.4.2 Celular

Una característica importante del sistema inmune de los cerdos es que además de expresar linfocitos T CD4+ y CD8+ existe una población que expresan los marcadores CD4 y CD8, llamada doble positivos CD4+CD8+, estas células se encuentran normalmente en sangre periférica, en nódulos linfáticos y aumentan en número conforme con la edad del cerdo, estas son células previamente activas que se convierten en linfocitos pequeños después de expresar la molécula CD8.³⁸

Al inicio de la infección se ha detectado la proliferación principalmente de linfocitos T; para la tercera semana pi disminuyen los linfocitos con fenotipo CD4+CD8- debido al reclutamiento de éstos en los órganos blanco infectados para participar en el control de la infección. La respuesta de memoria se caracteriza por la proliferación de linfocitos T CD4+CD8+ hacia la décima semana pi.^{24, 29, 33, 38, 39}

En otras infecciones por paramixovirus, los monocitos son blanco preferido de estos virus, lo que hace sospechar que el rubulavirus porcino siga un camino similar. Experimentos enfocados a determinar la susceptibilidad de diferentes poblaciones

celulares por el reconocimiento e infección, revelan que los monocitos son una de las poblaciones más susceptibles, los monocitos disminuyen alrededor de la 4ª semana pi.³⁸

La producción de citocinas para linfocitos Th1 se caracteriza por la producción de IFN- γ e IL-2, mientras que los linfocitos Th2 por IL-4, IL-6 e IL-10. Experimentos realizados en laboratorio revelan que durante la 1ª semana pi, la infección induce transcritos para IFN- γ e IL-4 en células mononucleares de cerdos infectados en comparación con los cerdos testigos no infectados. Durante la respuesta de memoria, los linfocitos CD4+CD8+ y CD4+CD8- expresan diferentes patrones de citocinas: los linfocitos CD4+CD8- producen principalmente IL-2, mientras que los linfocitos CD4+CD8+ IL-10.³⁸

1.5 Epidemiología

La EOA se ha presentado en México desde 1980, principalmente en el Centro y Bajío del país. Los primeros brotes de la enfermedad fueron reportados en áreas con alta densidad de población porcina del estado de Michoacán en 1980; posteriormente se diseminó a los estados de Querétaro, Estado de México y Distrito Federal, debido a la intensa movilización de cerdos. Estudios serológicos han evidenciado la presencia de anticuerpos contra el RVP en cerdos reproductores y en animales menores de 45 días de edad en 16 estados de la República.^{9, 26} Algunos autores han concluido que la enfermedad es endémica y que afecta principalmente a los cerdos de la zona central del país.^{10, 28}

Actualmente, la enfermedad se ha establecido y se reporta ocasionalmente en los estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Distrito Federal y Querétaro.^{9, 12}

En condiciones naturales el cerdo es el único animal afectado clínicamente por el RVP. Experimentalmente el virus afecta a embriones de pollo, ratas de la cepa Winstar y ratones; se han inoculado de forma experimental conejos, perros y gatos, sin presentar signos clínicos.^{2, 5, 40-42}

El RVP se transmite comúnmente por contacto directo entre cerdos infectados y cerdos susceptibles. Es posible que la enfermedad se transmita a través de fomites.¹²

El virus se excreta a través de secreciones nasales, orina y heces; los machos infectados experimentalmente excretan el RVP en semen, aunque aún no ha sido demostrada la transmisión venérea.^{12, 21, 34, 37, 43}

1.6 Signos clínicos

La manifestación de signos clínicos durante la infección por RVP depende de la edad de los cerdos afectados. En lechones, los signos clínicos comprenden alteraciones del sistema nervioso central y alta mortalidad; en los animales adultos generalmente se observan alteraciones reproductivas y la opacidad corneal es una manifestación esporádica.¹²

Los lechones de 2 a 15 días de edad son más susceptibles a la infección por el RVP. Los signos se presentan súbitamente, se observa postración, animales deprimidos o con problemas nerviosos. Los primeros signos son fiebre, pelo erizado y lomo arqueado, acompañado por constipación o diarreas ocasionales. Posteriormente, los animales muestran alteraciones nerviosas progresivas como incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, temblores musculares, posturas y marchas anormales. Se pueden observar movimientos involuntarios, letargia y algunos animales presentan conjuntivitis, ceguera aparente, nistagmo, lagrimeo y exudado en párpados. En promedio, 10% de los cerdos afectados presentan opacidad corneal.^{2, 12}

En cerdos de más de 30 días, los signos se presentan ocasionalmente, la mortalidad es del 4% y la opacidad de la córnea puede estar presente o no. En cerdos de 15 a 45 kg se han observado cuadros nerviosos donde la mortalidad fue de 20%. La muerte se presenta 48 h posteriores a la aparición de los signos, aunque en algunos casos puede presentarse hasta 4 a 6 días después.^{2, 12}

El cuadro clínico en cerdas se manifiesta por falla reproductiva donde los parámetros productivos afectados muestran un aumento en la tasa de repeticiones, incremento en el intervalo de días destete-primer servicio y como consecuencia aumento en los días no productivos; se ha identificado también aumento en la tasa de mortinatos (2 a 24%) y fetos momificados (1 a 5%), así como abortos ocasionales durante brotes agudos; los signos nerviosos se manifiestan en un 10% de las cerdas afectadas. Recientemente se ha reportado que la mortalidad puede alcanzar más de 15%.^{12, 13, 44}

El porcentaje de camadas afectadas durante el brote oscila entre el 20 y 65%; en los lechones afectados la morbilidad varía de 20 a 50% y la mortalidad puede alcanzar un 87 a 99%; en brotes de la EOA del año 2000 al 2003, la mortalidad reportada fue del 30%.^{2, 12, 13, 45}

Los machos adultos pueden presentar anorexia y opacidad corneal, la falla reproductiva es evidente, ya que se afecta severamente la calidad del semen, la concentración espermática disminuye, las anormalidades espermáticas aumentan y el eyaculado pierde viabilidad. Se han reportado porcentajes de infertilidad de 29 a 73%. Puede presentarse inflamación y edema testicular, que progresa a atrofia, orquitis y epididimitis.^{10, 12, 46}

1.7 Lesiones

1.7.1 Lesiones macroscópicas

Se presenta un grado variable de opacidad corneal así como de conjuntivitis y quemosis. El espesor de la córnea aumenta de una a tres veces su tamaño normal. Ocasionalmente se presentan otro tipo de lesiones como vesículas, úlceras, y keratoconos en la córnea así como exudados en el segmento anterior.⁴⁷

En verracos se observa inflamación tanto de testículos como de epidídimo, con un marcado incremento del diámetro y peso, en casos agudos se observa edema. Estos cambios suelen ser unilaterales. El epidídimo tiene aspecto granular y firme al que conlleva la formación de granulomas espermáticos.

Subsecuentemente hay atrofia con fibrosis testicular y se desarrolla adherencia de la túnica albugínea. Ocasionalmente se presentan hemorragias en túnica albugínea, testículo y epidídimo.⁴⁷

En lechones se observa neumonía moderada que usualmente afecta la porción ventral de los lóbulos craneales del pulmón. Se observa una moderada distensión gástrica con la presencia de semi digeridos de leche. Hay una distensión moderada de la vejiga urinaria gracias a la acumulación de orina, en la cavidad peritoneal hay fibrina. El encéfalo puede estar congestionado y el líquido cerebroespinal puede estar incrementado. Ocasionalmente se pueden encontrar hemorragias pericardicas y renales. En infecciones crónicas las hemorragias tanto de riñón como de pulmón son muy comunes.⁴⁷

1.7.2 Lesiones microscópicas

Histológicamente, los cambios del encéfalo y la médula espinal se deben a una encefalitis no supurativa que afecta principalmente la sustancia gris del tálamo, cerebro medio y corteza cerebral, además de una gliosis tanto focal como difusa. Hay infiltración perivascular con linfocitos, células plasmáticas, necrosis neuronal, neurofagia, meningitis y coroiditis. Se han observado cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos dentro de las neuronas. La severidad y la extensión de las lesiones varían entre los cerdos.⁴⁷

El pulmón puede presentar neumonías tanto multifocales como intersticiales caracterizadas por el engrosamiento de los septos y una infiltración mononuclear.

Muchos de los cerdos afectados presentan una moderada tonsilitis con descamación de epitelio e infiltrado inflamatorio ocupando las criptas.⁴⁷

Diferentes grados de infiltración de neutrófilos y mononucleares se ven en la vasculatura endotelial y los tejidos adyacentes del ángulo iridocorneal, ángulo esclerocorneal y la córnea. En las células de la capa externa de la cornea se observa la formación de vesículas.⁴⁷

En verracos afectados, las lesiones testiculares son de diferentes tipos y grados, según el curso clínico de la enfermedad. El epitelio germinal puede mostrar áreas de degeneración y necrosis. El tejido intersticial puede mostrar hiperplasia de las células de Leydig, infiltración por células mononucleares, hialinización de las paredes vasculares y fibrosis. Las células epiteliales del epidídimo muestran formación de vesículas así como la pérdida de estereocilios. La ruptura de la pared del epitelio conduce a la salida de los espermatozoides hacia los espacios intertubulares, lo que ocasiona una infiltración de células inflamatorias y macrófagos, que fagocitan a los espermatozoides. Esto conduce a la formación de fibrosis, granulomas espermáticos y, consecuentemente, a la atrofia testicular.⁴⁷

1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la EOA se realiza por medio de pruebas que detectan la presencia del virus en tejidos, suero y semen, tales como el aislamiento viral en cultivo celular (AV) evidenciado por la hemaglutinación (HA) e inmunofluorescencia (IF) directa e

indirecta, la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) y RT-PCR anidada.^{21, 27, 32, 33, 36, 48, 49}

Dentro de las pruebas que detectan anticuerpos la más utilizada es la inhibición de la hemaglutinación (IHA), la seroneutralización (SN), el ELISA e la inmunoperoxidasa (IP).^{37, 48, 50}

1.9 Prevención y control

La prevención y control de la EOA se basa en acciones que mantengan la bioseguridad de las explotaciones, además de monitoreos serológicos.¹²

Se han utilizado vacunas formaliniazadas a partir de encéfalos de cerdos de un brote agudo, la eficacia de estas vacunas es desconocida, sin embargo también se han desarrollado vacunas inactivadas experimentales preparadas con virus cultivado en líneas celulares continuas demostrando buenos resultados en condiciones de campo contra desafíos naturales.⁵¹

De manera experimental se ha desarrollado una vacuna oleosa inactivada con rayos gamma, que ha demostrado ser segura y más antigénica que las vacunas comerciales, aunque ofrece protección variable que depende de la edad de los animales. Se ha probado en lechones desafiándolos con el RVP y el 100% de los vacunados sobrevivieron. También fue probada durante un brote, controlando los cuadros clínicos y la mortalidad seis a ocho días después de la vacunación, respectivamente.^{50, 52}

2. Justificación

El Rubulavirus porcino afecta a cerdos de todas las edades. Los estudios realizados hasta ahora definen en parte la patogenia y distribución del virus en el organismo del cerdo infectado. No se ha realizado un estudio secuencial que describa la presencia del virus en órganos de cerdos en crecimiento. Con el presente estudio se podrá contribuir a definir cuáles son los sitios de replicación más susceptibles para el rubulavirus porcino en cerdos de esta etapa.

3. Hipótesis

Si la baja tasa de replicación viral así como una producción de partículas virales defectuosas en la infección con rubulavirus porcino, han demostrado que permanece dentro del organismo afectado por periodos prolongados, entonces:

En tejidos de cerdos sacrificados a 28 días post infección, se podrá identificar la presencia del rubulavirus porcino mediante la técnica de inmunohistoquímica.

La distribución del rubulavirus porcino, en los tejidos analizados de cerdos infectados se verá influenciada a diferentes días de sacrificio.

4. Objetivos

Objetivo general

Identificar la presencia del rubulavirus porcino en tejidos de cerdos infectados experimentalmente.

Objetivos específicos

Detectar la presencia del rubulavirus porcino por medio de inmunohistoquímica en pulmón, bazo, hígado y riñón de 9 cerdos sacrificados a los 7, 14 y 28 días post infección.

Evaluar la respuesta inmune humoral mediante la inhibición de la hemoaglutinación tras la infección experimental con el rubulavirus porcino.

5. Material y Métodos

5.1 Animales de experimentación

Se emplearon 12 cerdos híbridos mestizos machos castrados de 2 meses de edad, 3 cerdos testigos negativos y 9 cerdos infectados, mantenidos en condiciones controladas en las unidades de aislamiento del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-MA; INIFAP). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a los lineamientos establecidos en dicho Centro.

5.2 Virus

Se empleó el aislamiento PAC-3 (Jalisco/1992). El virus se multiplicó en cultivos de la línea celular BHK-21 (células de riñón de hámster neonato). El sobrenadante de las células infectadas se clarificó por centrifugación a 3200 revoluciones por minuto (rpm) durante 45 min a 4° C. La capacidad infectante del virus fue evaluada en cultivos celulares en microplacas, usando diluciones decuples seriadas del virus en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM). Finalmente, la titulación del virus se determinó por el método de Kärber y el resultado se obtuvo en dosis infectantes en cultivo celular 50% (DICC_{50%}).^{25, 29}

5.3 Muestras sanguíneas

Se obtuvieron 5 ml de sangre por vía yugular de cada uno de los cerdos previos a la infección y a los 7, 14 y 28dpi. Posterior a la coagulación se centrifugaron a 1200 rpm por 10 min para obtención de suero. El suero fue conservado en congelación a -18°C hasta la realización de la IHA.

5.4 Infección experimental y necropsia

Se infectaron 9 cerdos por vía intranasal con 5 ml de la cepa PAC-3 (Jalisco/1992) a una dosis de 10^6 DICC_{50%}/ml. Los animales fueron monitoreados diariamente para detectar cambios en su estado físico general y la manifestación de signos clínicos. Como testigos negativos en la infección experimental se contaron con 3 cerdos de una granja libre de rubulavirus porcino. Se realizaron necropsias en tres tiempos posteriores a la infección experimental (7, 14 y 28 dpi), en cada grupo se sacrificó a 3 cerdos infectados y a un cerdo testigo por grupo. En todas las necropsias se realizó la inspección macroscópica y se colectaron muestras de 1 cm³, aproximadamente, de pulmón, bazo, hígado y riñón que fueron fijadas en formol amortiguado al 10% durante 24 h. Posteriormente, fueron procesados con la técnica histológica ordinaria para la obtención de cortes seriados en parafina de 4 µm de grosor. Unos cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE) para el análisis histopatológico y otros fueron utilizados para demostrar inmunoreactividad (IR) del virus inoculado utilizando IHQ enzimática.

5.5 Inmunohistoquímica enzimática

Después de desparafinar los cortes a 58°C por 15 min, fueron colocados en vasos de Coplin con amortiguador de citrato de sodio *ImmunoDNA Retriever 20X with Citrate* ⁽¹⁾ para realizar el desenmascaramiento de sitios antigénicos, utilizando una olla de presión a 120 °C durante 20 min. Luego, se dejó que llegaran a la temperatura y se procedió a bloquear la actividad de peroxidasa endógena por 15 min con la solución de bloqueo del kit comercial *Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP con DAB* ⁽¹⁾

Se realizó un segundo bloqueo, en esta ocasión para eliminar la actividad de biotina y avidina endógenas, de acuerdo a lo sugerido en el kit comercial *AVIDIN/BIOTIN Blocking Kit* ⁽²⁾ Posteriormente, los cortes fueron incubados con 100µl de anticuerpo monoclonal (IgG de ratón) anti-HN a una dilución 1/500 (proporcionado por la Dra. Sandra Cuevas, CENID-MA; INIFAP) en diluyente de anticuerpo *ImmunoDetector Protein Blocker / Antibody Diluent* ⁽¹⁾ se incubó por 72 h en refrigeración. Después de lavar los cortes, se bloqueó con suero de cabra normal al 5% por 1h. Se lavó y se agregó 150µl de anticuerpo biotinado del kit comercial *Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP con DAB* ⁽¹⁾ (suero de cabra conjugado con biotina anti IgG de ratón) por 15 min, se realizó un lavado y se agregó 150µl estreptavidina con peroxidasa de rábano del kit comercial *Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP con DAB* ⁽¹⁾ por 30 min a temperatura ambiente y la reacción fue revelada agregando 100µl de diaminobenzidina del kit comercial *Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP con DAB* ⁽¹⁾ por 5min.

1 Bio SB ® (United, State)

2 Invitrogen ® (Carlsbad, CA)

La contratinción se realizó con hematoxilina líquida por tres inmersiones y posteriormente una deshidratación en trenes de tinción con etanol de gradación ascendente y finalmente en xilol. Se cubrió con un medio de montaje y cubreobjetos y se observó con un microscopio de campo claro.

La distribución del RVP fue evaluada mediante la IR de la proteína HN del virus en órganos de cerdos a los 7, 14 y 28 dpi. El criterio de positividad fue la observación de un color marrón en citoplasma de células nucleadas, como sitio probable de replicación del RVP.

La distribución de la IR (y probable carga viral) en los órganos de los cerdos infectados se calificó con cruces: se consideró una inmunopositividad fuerte (+++), inmunopositividad mediana (++) , inmunopositividad leve (+) e inmunonegativo (-). (Cuadro 2)

5.6 Procesamiento de sueros

Con el propósito de eliminar proteínas inespecíficas inhibidoras de la hemaglutinación, se homogenizaron 100µl de suero con 50µl de caolín y 50µl de eritrocitos de bovino al 5%, se mantuvieron en refrigeración durante 24 h, posterior a la sedimentación del caolín y los eritrocitos, se colectó el suero.

5.7 Inhibición de la hemaglutinación

Los sueros fueron colocados en placas de 96 pozos con fondo en U (Nunc), con 50µl de PBS, a partir del primer pozo se realizaron diluciones dobles seriadas, las cuales fueron de 1:2 hasta 1:2048. Posteriormente se agregaron 50µl de virus de la cepa PAC3, conteniendo ocho unidades hemaglutinantes (UHA) en cada pozo; se incubó 30 min a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron 50µl de eritrocitos de bovino al 0.5% a toda la placa; la lectura fue realizada a los 60 min.

El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se expresó como la máxima dilución en la que el suero fue capaz de inhibir la capacidad hemaglutinante del RVP.

Los sueros se consideraron positivos a partir de la dilución 1:16.

6. Resultados

6.1 Animales

Los cerdos fueron muestreados desde el primer día tanto para muestra sanguínea y observación de signos clínicos.

Se observó disnea, secreciones nasales y fiebre ligera de 39° a 39.3°C a partir del 2° hasta el 4° dpi en 3 cerdos, las secreciones nasales se observaron hasta los 7 dpi.

6.2 Análisis Inmunohistoquímico

En el riñón de los cerdos de 7 dpi la distribución de la IR fue mayor en la corteza, localizándose principalmente en epitelio tubular registrando una inmunopositividad fuerte al RVP (+++) (Cuadro 2), comparado con el resto de los tejidos analizados, la presencia del virus abarcó homogéneamente toda la corteza renal visualizando en su mayoría reacciones positivas en citoplasma del epitelio tubular. (Figura 2-5).

Un marcaje moderado en tejido renal se evidenció en dos cerdos de este mismo grupo.

Para el grupo de cerdos correspondiente a 14 dpi la reacción fue menos evidente, en tres cerdos se presentó inmunopositividad moderada en tejido renal. (Figura 6).

Las distribución del RVP se mantuvo en epitelio tubular, registrando (++) (Cuadro 2), ya que se detectó inmunopositividad moderada hacia el antígeno, pero menor nitidez y menor distribución.

En el grupo de 28 dpi la inmunoreacción en el riñón fue menos evidente (Figura 7), la inmunopositividad ligera se ubicó en epitelio tubular registrando (+). (Cuadro2)

En tejido pulmonar, hepático y esplénico de los animales sacrificados a 7, 14 y 28 dpi resultaron inunonegativos a la prueba de IHQ.

Cerdos testigos negativos no presentaron inmunopositividad en ninguno de los tejidos estudiados.

Para eliminar el error entre cada una de las muestras por manejo y variables que pudieran presentarse durante la técnica se realizaron las pruebas con cortes de tejidos de las tres diferentes edades, para tejidos como el pulmón que no respondió en ninguna zona del tejido se utilizó una dilución 1/250 de anticuerpo primario, se incrementó la respuesta en los cerdos de siete dpi al RVP al formarse marcas inespecíficas por lo que se descartó y durante toda la fase de experimentación se utilizó la dilución 1/500, dicha dilución fue obtenida mediante pruebas en cultivo celular de la línea PK-15 con la prueba de IHQ en placa de 96 pozos.

6.3 Análisis histológico

Los resultados obtenidos mediante la evaluación histológica de la infección con RVP, revelaron alteraciones tisulares en tejido pulmonar en un 60% del corte histológico para los cerdos sacrificados a los 14 dpi así como un 80% del corte histológico para los cerdos sacrificados a los 28 dpi (Figura 8), se visualizó en cada uno de ellos, una infiltración de células inflamatorias de tipo mononuclear, tanto en epitelio alveolar, los sacos alveolares y conductos alveolares, generando así una inflamación de tipo crónica.. Los cerdos de 7 dpi y testigos negativos no presentaron inflamación e infiltración en tejido pulmonar en la evaluación histológica.

Tanto en cerdos infectados como cerdos testigos negativos se observaron artefactos de aspecto eosinofílico en tejido renal. (Figura 9).

6.4 Inhibición de la hemoaglutinación

Se colectaron muestras de sangre antes del desafío y durante el mismo para todos los cerdos en el experimento.

En la figura 10, se representa el promedio del título de anticuerpos que se obtuvieron con la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Los cerdos seroconvirtieron a partir del día 7 pi observando títulos con un valor promedio de $2.17 \log_2$. Del día 7 al día 10 pi se obtuvieron títulos con un valor a $5.33 \log_2$, que posteriormente a los 14 dpi descenderían a un valor de $4.5 \log_2$, para los últimos dpi que van de 14 hasta el día 28

pi, incrementarían los títulos a un valor de $6 \log_2$, para descender por último a un valor de $5 \log_2$ y mantenerse así representando una meseta.

En los cerdos testigos negativos no se encontraron títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el RVP.

7. Discusión

En este estudio se evaluó la presencia del RVP en una cinética de infección experimental. Los resultados obtenidos indican que la distribución viral en la infección experimental del RVP en cerdos destetados, solamente pudo ser detectada mediante la prueba de IHQ en epitelio tubular de la corteza renal, gran cantidad de epitelio tubular inmunopositivo a RVP se distribuyó ampliamente para los animales sacrificados a los 7 dpi hasta los animales de 30 dpi en los que fue menos evidente. En el proceso de maduración se presenta un cambio en los componentes de los receptores específicos que reconocen a las glicoproteínas virales, mediante estudios con lectinas ⁵³ se determinó que el reconocimiento de los receptores en los tejidos es dependiente de la edad del cerdo en lechones lactantes y en verracos esta distribución del isómero Neu5 α 2, 3 Gal, que es el receptor específico en una infección con RVP ²² se presenta en sistema nervioso y en sistema reproductor, respectivamente. En el tejido renal y pulmonar la expresión de receptores no se encuentra influenciada por el proceso de maduración, tanto los isómeros Neu5 α 2, 3 Gal y Neu5 α 2, 6 Gal se encuentran distribuidos ampliamente, en comparación con el sistema nervioso donde hay cambios conformacionales en la estructura de los receptores en tejidos de cerdos adultos ⁵³. En comparación con este trabajo previo, en los animales infectados con RVP de este experimento no se pudo detectar reacción alguna en el tejido pulmonar mediante la prueba de IHQ, pero si se pudo visualizar una inflamación en los alveolos pulmonares, aumentando 5 veces su grosor en animales sacrificados que van de 14 dpi hasta los animales con 30 dpi, posiblemente esta inmunonegatividad hacia la IHQ y la alteración histológica en tejido pulmonar caracterizada por el engrosamiento alveolar así como la infiltración linfocitaria se deba a que la inflamación es generada por componentes de

células activas de la respuesta inmune innata y adaptativa, estas dos respuestas participan conjuntamente en presencia de un agente extraño, mediante células dendríticas y macrófagos se liberan citocinas del tipo 1 y 6 así como $TNF\alpha$, que participan como mediadores de la inflamación así como también el complemento, que es un mecanismo molecular del sistema inmune innato que participa liberando componentes anafilácticos como C3a y C5a provocando la degranulación de células cebadas, por otra parte los basófilos, neutrófilos y plaquetas liberan o estimulan la síntesis de vasodilatadores como la histamina, leucotrienos, cininas y prostaglandinas que participan como mediadores de la inflamación provocando una permeabilidad vascular así como una vasodilatación. La EOA es un enfermedad de tipo persistente que genera proteínas defectuosas así como una baja tasa de replicación y expresión, el sistema inmune controla esta producción de proteínas virales mediante la respuesta inmune específica tanto celular como humoral ³⁴ produciendo anticuerpos de tipo neutralizante así como también subpoblaciones de linfocitos con perfil CD4+CD8- Y CD4+CD8+ los primeros como linfocitos de memoria y los segundos como linfocitos de ataque, mediante componentes liberados por células reactivas se genera una inflamación mediada por una hipersensibilidad de tipo 3 que generan un constante daño tisular, provocando un engrosamiento de la pared alveolar así como una infiltración linfocitaria. Dado que en un estudio previo ⁵⁴ en el cual se observaron cambios en pulmón como congestión pulmonar, falta de colapso pulmonar, neumonía de tipo intersticial así como una marcada infiltración linfocitaria en la pared alveolar por linfocitos mononucleares y polimorfonucleares, se llegó a la conclusión de que las alteraciones histológicas de la infección experimental con RVP en este trabajo no son significativamente representativas para demostrar que efectivamente esta infección generara una inflamación alveolar mediante la respuesta del sistema inmune, por lo

anterior se considera que se requieren de mas estudios para confirmar que la infección con RVP genera esta alteración a nivel microscópico.

Para el bazo no se pudo evidenciar ninguna reacción positiva al antígeno, en ninguna de las zonas tanto en la pulpa roja, pulpa blanca y zona marginal que es en donde se localizan las células dendríticas y macrófagos, este órgano inmune secundario es encargado de montar una respuesta inmune al capturar antígeno presente en torrente sanguíneo, está formado por una vaina alrededor de las arteriolas (vaina perioarteriolar) sitio en donde se encuentran tanto linfocitos T como B estos últimos formando folículos.

La respuesta de anticuerpos de tipo inhibidores fue evaluada mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, el rubulavirus porcino presenta una proteína extramembranal que es capaz de hemoaglutinar glóbulos rojos de diferentes especies, mediante esta prueba se detectan títulos de anticuerpos generados por el propio sistema inmune adaptativo del animal para contraatacar esas hemoaglutininas mediante anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación presentes en el suero, de esta forma animales que están infectados generan anticuerpos que son detectados mediante la confrontación del suero con el virus y glóbulos rojos, en cambio los animales que no fueron infectados el virus en ausencia de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación son capaces de hemoaglutinar glóbulos rojos, en estudios anteriores se demostró que la prueba de inhibición de la hemoaglutinación comparada con otras pruebas como virus seroneutralización, inmunofluorescencia indirecta y ELISA de bloqueo, detectaron eficazmente anticuerpos de cerdos infectados ²⁷. Una característica de la infección con el rubulavirus porcino es la de generar una seroconversión

permanente formando una meseta al final, en estudios previos la inmunidad a la infección por rubulavirus porcino en el cerdo adulto se identificaron anticuerpos tanto neutralizantes como inhibidores de la hemoaglutinación ²⁵, en comparación con este trabajo se encontraron títulos a partir del día 7 para incrementar el máximo pico del día 14 al 25 para al final mantenerse día 28 formando una meseta, característica de una infección con RVP. En este estudio la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con los suero de los animales infectados con RVP, señalo una respuesta inmune debido a la presencia de anticuerpos en el suero a partir de una dilución $2.17 \log_2$ a la primera semana, 3 cerdos infectados no seroconvirtieron en la primera semana si no hasta los 14 dpi, con esta prueba se corroboró que los animales infectados generaron una respuesta frente al antígeno en todos los días de sacrificio, serologías previas de los sueros de todos los animales mostraron que los animales resultaron negativos a la prueba al no encontrarse títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra RVP, los cerdos testigos negativos correspondientes a cada uno de los días de sacrificio resultaron negativos a títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación durante el experimento.

8. Conclusión

- Se concluye que el Rubulavirus porcino permanece al menos por 28 días en animales infectados.
- En tejido pulmonar se evidenció un engrosamiento de la pared alveolar con una infiltración linfocitaria a 14 y 28 días post infección, se requieren de más estudios para corroborar que la infección con rubulavirus porcino o la respuesta del sistema inmune a la infección haya provocado estos daños tisulares a nivel histológico.
- La respuesta de tipo humoral se presentó a partir de los 7dpi detectando anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en todos los animales infectados.

9. Literatura citada

1. Stephano, H. A., Gay, G. M., Ramírez, T. C. & Maqueda, A. J. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. *En: Memorias de la XVII Convención Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos*. Ixtapa, Guerrero. 1981
2. Stephano, H. A., Gay, G. M. & Ramírez T. C. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 1988. 122:6-10.
3. Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-López J, Linné T.. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of the paramyxovirus f proteins. *Virus Gen.* 1997; 14: 55-61.
4. Rima B, Alexander DJ, Billeter MA, Collins PL, Kingsbury DW, Lipkind MA, Nagai Y, Örbel C, Pringle CR, Ter Mullen, V. Family *Paramyxoviridae*. In: Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Ghabrial S. A., Jarvis, A. W., Matelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. EUA: Springer-Verlag, 1995.
5. Moreno-López J, Correa-Girón P, Martínez A, Ericsson A. Characterization of a Paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch. Virol.* 1986; 91: 221-231.
6. Sundqvist, A., Berg, M., Hernández-Jauregui, P., Linné, T. & Moreno-López, J. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J. Gen. Virol.* 1990. 71: 609-613.
7. Lamb, R. A., Collins, P. L., Kolakofsky, D., Melero, J. A., Nagai, Y., Oldstone, M. B. A., Pringle, C. R. & Rima, B. K. *Family Paramyxoviridae*. In: van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. *Virus Taxonomy on line. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press. doi: 10.1006/bkvt.2000.0054. 2000.
8. Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el Paramyxovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. *Vet. Méx.* 1992; 23:37-39.

9. Morilla A, González-Vega D, Estrada E, Diosdado F. Seroepidemiology of blue eye disease. In: Morilla A, Yoon K, Zimmerman J. (Eds). Trends in emerging viral infections of swine. EUA: Iowa State University Press. 2002.
10. Ramírez-Mendoza, H., Hernández-Jauregui, P., Reyes-Leyva, J., Zenteno, E., Moreno-López, J. & Kennedy, S. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J. Comp. Path.* 1997. 117:237-252.
11. Hernández-Jáuregui, P., Ramírez, M. H., Mercado, G. C., Moreno-López, J. & Kennedy, S. Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacan virus) infection in pregnant gilts. *J. Comp.Path.* 2004. 130: 1-6.
12. Kirkland P. D. & Stephano A. Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipha virus infections. In: Straw B., Zimmerman J., D'Allaire S. & Taylor D. Diseases of swine. 9ª Edición. Blackwell Publishing. USA. 2006.
13. Sánchez-Betancourt, J. I., Santos-López, G., Alonso, R., Doporto, J. M., Ramírez-Mendoza, H., Mendoza, S., Hernández, J., Reyes-Leyva, J. & Trujillo, M. E. Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Res. Vet. Sci.* 2008. 85: 359-67
14. Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V. & Schountz, T. Bats: Important reservoir host of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000. 19: 531-545.
15. Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J. & Linné, T. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *J. Gen. Virol.* 1991. 72: 1045-1050.
16. Linné, T., Berg, M., Bergvall, A. C., Hjertner, B. & Moreno-López, J. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet. Microbiol.* 1992. 33: 263-273.
17. Sundqvist, A., Berg, M., Moreno-Lopez, J. & Linne, T. The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch. Virol.* 1992. 122: 331-340.
18. Svenda, M., Berg, M., Moreno-López, J. & Linné, T. 1997. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* 48: 57-70.
19. Wang, L. -F., Hansson, E., Yu, M., Chua, K. B., Mathe, N., Cramer, G., Rima, B. K., Moreno-Lopéz, J. & Eaton, B. T. Full-length genome séquence and genetic

- relationship of two paramyxoviruses isolated from bats and pigs in the Americas. *Arch. Virol.* 2007. 152: 1259-1271.
20. Reyes-Leyva, J., Espinosa, B., Santos, G., Zenteno, R., Hernández, J., Vallejo, V., Zenteno, E. Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine rubulavirus LPMV. *Glycoconj. J.* 1999. 16:517-522.
21. Allan, G. M., McNeilly, F., Walker, I., Linné, T., Moreno-López, J., Hernández, P., Kennedy, S., Carrol, B. P., Henrron, B., Foster, J. C. & Aldair, B. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infections in pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996. 8: 405-413.
22. Reyes-Leyva, J., Santos, G., Hernández, J., Espinosa, B., Borraz, M. T., Ramírez, M. H., Vallejo V. & Zenteno, E. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus porcino*. *En: Cea Bonilla, A., del Arrenal Mena, I. P., Riveros Rosas, H. & Vázquez Contreras, E. (eds). Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. 2002*
23. Santos-López, G., Hernández, J., Borraz-Argüello, M. T., Ramírez-Mendoza, H., Vallejo, V. & Reyes-Leyva, J. Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus porcino*. *Arch. Med. Vet.*, 2004. 36: 119-136.
24. Reyes-Leyva, J., García, M. O., Santos, G., Vallejo V., Ramírez, M. H. & Hernández, J. Detección de la viremia en la infección experimental por rubulavirus porcino. *Arch. Med. Vet.* 2004. 36: 39-47.
25. Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Zenteno R., Ramírez, M. H., Hernández-Jauregui, P. & Zenteno, E. 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immunol. Immunopath.* 64: 367-381.
26. Ramírez-Herrera, M. A., Mendoza-Magaña, M. L., Dueñas-Jiménez, J. M., Mora-Galindo, J., Dueñas-Jiménez, S. H. Electrophysiological and morphological alterations in peripheral nerves by the pig paramyxovirus of blue eye disease in neonatal pigs. *J. Vet. Med. B.* 2001. 48:477-487.
27. McNeilly, F., Walker, I., Allan, G. M., Foster, J. C., Linné, T., Merza, M., Hernández, P., Kennedy, S. & Adair, B. A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997. 9: 3-9.

28. Hernández-Jáuregui, The pathogenesis of porcine rubulavirus (LPMV): Infection in PK-15 cultured cells and in experimentally infected pigs. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 2003.
29. Ramírez, M. H. 1998. Fisiopatología del paramixovirus del ojo azul del cerdo a nivel testicular. Tesis de Doctorado. FMVZ-UNAM. México.
30. Puglielli, M. & Ahmed, R. Persistent viral infections. *In*: Granoff, A. & Webster, R. (Eds). Encyclopedia of virology. Oxford academic press. USA. 1999.
31. Cuevas-Romero. S. Persistence of porcine rubulavirus (PoRV-LPMV) in naturally infected pigs. Master Science Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 2002.
32. Wiman, A. C., Hjertner, B., Linné, T., Herron, B., Allan, G., McNeilly, F., Adair, B., Moreno-López, J & Berg, M. Porcine Rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J. Neurovirol.* 1998. 4: 545-52.
33. Cuevas, J. S., Rodríguez-Ropón, A., Kennedy, S., Moreno-López, J., Berg, M., Hernández-Jáuregui, P. Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009. 127:148-152.
34. Hjertner, B., Linné, T. & Moreno-López, J. Establishment and characterisation of a porcine rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. *Acta Vet. Scand.* 1997. 38: 213-224.
35. Hjertner, B., Wiman, A. C., Svenda, M., Berg, M., Moreno-López, J., Linné, T. Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). *Arch. Virol.* 1998. 143:425-439.
36. Espinosa HS. Evaluación del semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad del ojo azul. (tesis de Maestría). México (DF): FMVZ-UNAM, 2001.
37. Rivera-Benitez JF, Martínez BR, García-Conteras A, Escobar LC, Hernández LJ, Ramírez MH. Assay of humoral immunity to porcine rubulavirus (PoRV) experimental infection. *In*: D'Allaire, S. & Friendship, R. (Ed.) Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada, 2010b.
38. Hernández, J., Reyes-Leyva J., Ramírez, M. H., Valenzuela O., Zenteno, E. Characteristics of the immune response of pigs infected with porcine rubulavirus. *Rev. Vet. Mex* 2004; 35: 1-10.

39. Hernández J, Garfías Y, Nieto A, Mercado C, Montaña LF, Zenteno E. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol* 2001; 79:249-259.
40. Stephano HA, Gay GM El síndrome del ojo azul en cerdos de granjas engordadoras del bajo. *En: Memorias de Reunión de Investigación Pecuaria. México. 1985.*
41. Arellanes AE, Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en el gato doméstico (*Felis catus*). *Rev. Vet. Mex* 1994; 25: 239-24.
42. Cuetero RS, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. *Rev. Vet. Mex* 1995; 26: 231-236.
43. Solís M, Ramírez MH, Mercado GC, Espinosa S, Vallejo V, Reyes Leyva J, Hernández J. Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Res. Vet. Sci.* 2007; 83: 403-409.
44. Stephano H.A, Gay GM Experimental studies of a new viral Syndrome in pigs called "Blue eye" characterized by encephalitis and corneal opacity. *In: Proceedings of the 7th International Pig Veterinary Society Congress. Ghent, Belgium. 1984.*
45. Campos H, Carvajal F. Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul. *Memorias de la XXIV Reunión de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Morelia (Michoacán) México. 1989.*
46. Rivera-Benitez JF. Persistencia del *Rubulavirus* porcino en semen de verracos infectados experimentalmente (tesis de Maestría). México (DF): FMVZ-UNAM, 2009.
47. Stephano, Alberto. Clinical Signs and Lesions of blue eye disease *In: Trends in emerging viral infections of swine. Morilla, A., Yoon, K. & Zimmerman, J. Iowa State University Press. USA. 2002*
48. Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez T J. 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; 27:257–259.

49. Nordengrahn A, Svenda M, Moreno-López J, Bergvall A, Hernández P, Mcneilly F, Allan G, Merza M. Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus La Piedad Michoacan virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999; 11: 319-323.
50. Martínez LA, Pérez SJ, Correa-Girón P, Córdoba LD, Coba AMA. Utilidad del rubulavirus porcino en la prueba de IH para el serodiagnóstico de la enfermedad del ojo azul y su comparación con otras pruebas diagnósticas. *Memorias de la XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz (Veracruz) México. 2006.*
51. Stephano, Alberto. Vaccination Against Blue Eye Disease *In: Trends in emerging viral infections of swine.* Morilla, A., Yoon, K. & Zimmerman, J. Iowa State University Press. USA. 2002
52. Fuentes RJ, Gay GM, Herradora LM, Retana RA. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad, inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. *Vet. Méx.* 1994; 22: 243-246.
53. Vallejo Verónica, Reyes Leyva Julio, Hernández Jesús, Ramírez M. H., Delannoy Philippe, Zenteno Edgar. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 126 (2000) 415 – 424
54. Pérez Ponce Francisco. Lesiones histológicas en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus del ojo azul. (Tesis de licenciatura). México (DF): FMVZ-UNAM, 1989.

Cuadro 1

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA FAMILIA *Paramyxoviridae*

Subfamilia	Género	Especie	Hospederos	
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Avulavirus</i>	<i>Paramyxovirus aviar</i> -2 a -9	Aves	
		<i>Virus de la enfermedad de Newcastle</i> (<i>Paramyxovirus aviar</i> -1)	Aves	
	<i>Henipavirus</i>	<i>Virus Hendra</i>	Humanos	
		<i>Virus Nipah</i>	Humanos	
			Murciélagos	
	<i>Morbillivirus</i>		Equinos	
			Cerdos	
		<i>Virus del moquillo canino</i>	Caninos	
		<i>Morbillivirus de los cetáceos</i>	Cetáceos	
		<i>Virus del sarampión</i>	Humanos	
		<i>Virus de la peste de los pequeños rumiantes</i>	Rumiantes	
	<i>Respirovirus</i>		<i>Virus del moquillo de las focas</i>	Focas
			<i>Virus de la peste de los bovinos</i>	Rumiantes
			<i>Virus de la parainfluenza bovina</i> -3	Rumiantes
			<i>Virus de la parainfluenza humana</i> -1, -3	Humanos
			<i>Virus Sendai</i>	Humanos
				Roedores
			<i>Virus símico</i> -10	Simios
			<i>Virus de la parainfluenza humana</i> -2, -4	Humanos
			<i>Virus Mapuera</i>	Murciélagos
		<i>Virus de la parotiditis humana</i>	Humanos	
<i>Rubulavirus</i>		<i>Rubulavirus porcino</i>	Cerdos	
		<i>Virus símico</i> -5, -41	Simios	
		<i>Virus Tioman</i>	Murciélagos	
			Cerdos	
		<i>Virus Menangle</i>	Murciélagos	
			Cerdos	
			Murciélagos	
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Metapneumovirus</i>	<i>Metapneumovirus aviar</i>	Aves	
		<i>Metapneumovirus humano</i>	Humanos	
	<i>Pneumovirus</i>	<i>Virus respiratorio sincitial bovino</i>	Rumiantes	
		<i>Virus respiratorio sincitial humano</i>	Humanos	
		<i>Virus de la neumonía de los murinos</i>	Murinos	

Adaptado de Rima *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2000; Calisher *et al.*, 2006; ICTV, 2007.

Cuadro 2

DISTRIBUCIÓN E INTENSIDAD DE LA INMUNOREACTIVIDAD PARA LA PROTEÍNA HEMOAGLUTININA-NEURAMINIDASA DEL RUBULAVIRUS PORCINO EN CORTES DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA ANALIZADOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Días post infección		Bazo	Hígado	Pulmón	Riñón
7	Testigos positivos	-	-	-	++
		-	-	-	+++
		-	-	-	++
	Testigo negativo	-	-	-	-
14	Testigos positivos	-	-	-	+
		-	-	-	++
		-	-	-	+
	Testigo negativo	-	-	-	-
28	Testigos positivos	-	-	-	+
		-	-	-	+
		-	-	-	+
	Testigo negativo	-	-	-	-

Inmunonegatividad (-); inmunopositividad leve (+); inmunopositividad moderada (++); inmunopositividad fuerte (+++).

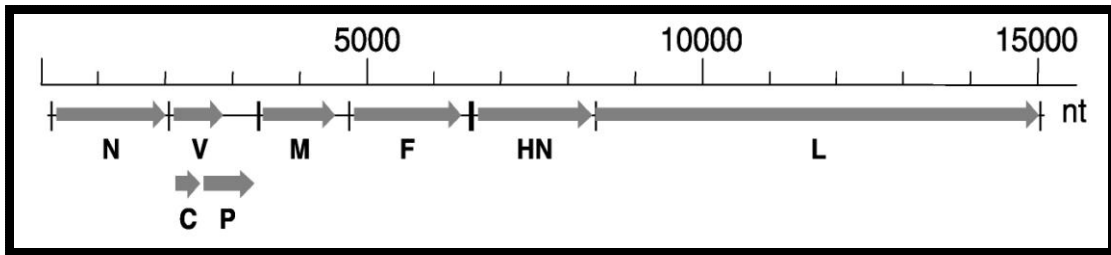


Figura 1. Organización del genoma del Rubulavirus porcino (Modificado de Wang *et al.*, 2007).

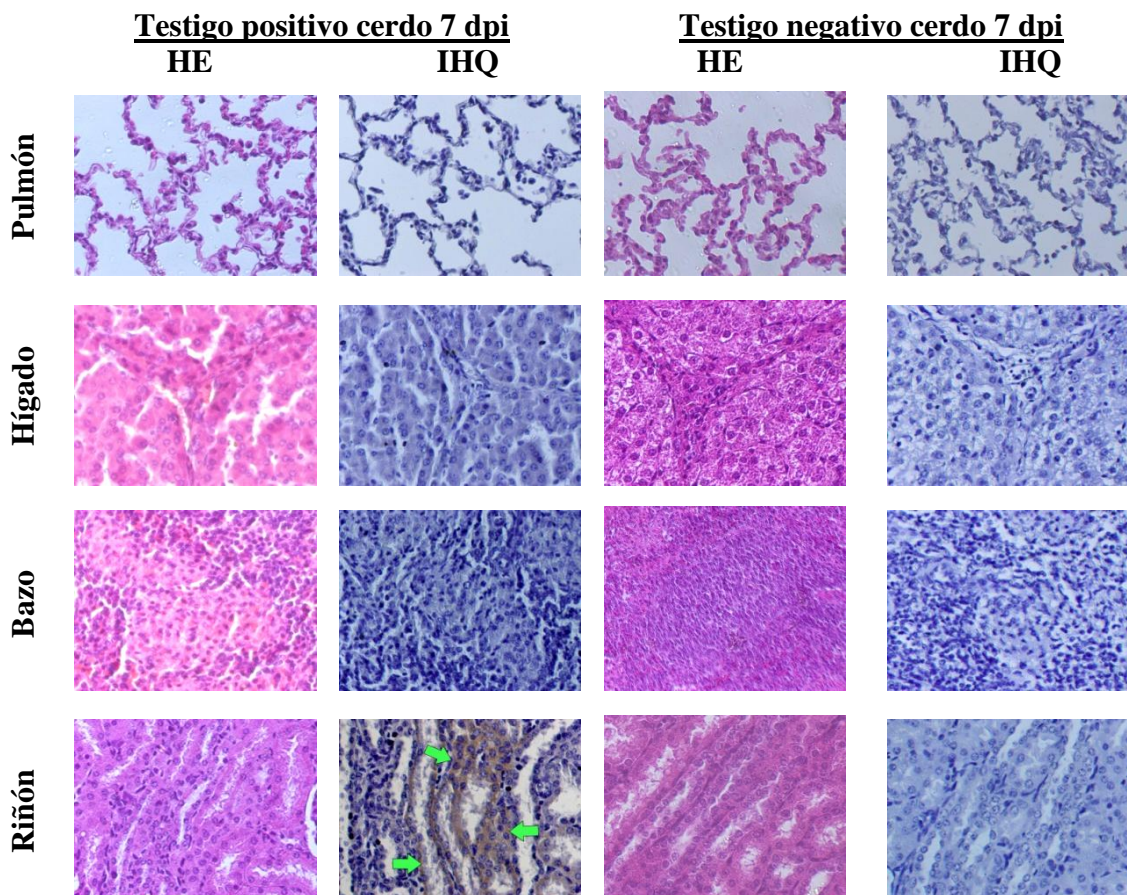


Figura 2. Inmunohistoquímica (IHQ-sistema biotina/avidina) y evaluación histológica Hematoxilina-Eosina (tinción HE) en riñón, bazo, hígado y pulmón de cerdo sacrificado a 7 días post infección (dpi). Inmunopositividad fuerte a rubulavirus porcino en epitelio tubular de tejido renal (flechas).

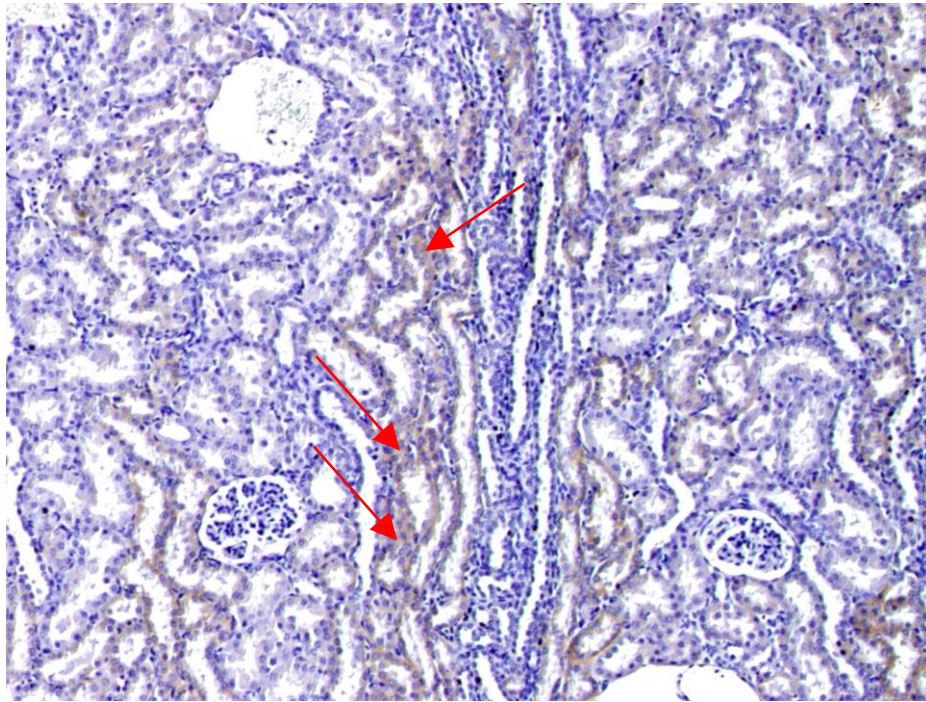


Figura 3. Inmunohistoquímica de cerdo sacrificado a 7 días post infección, objetivo 10x. Epitelio tubular inmunopositivo a rubulavirus porcino en corteza renal, se marcan de color marrón, contrastados con

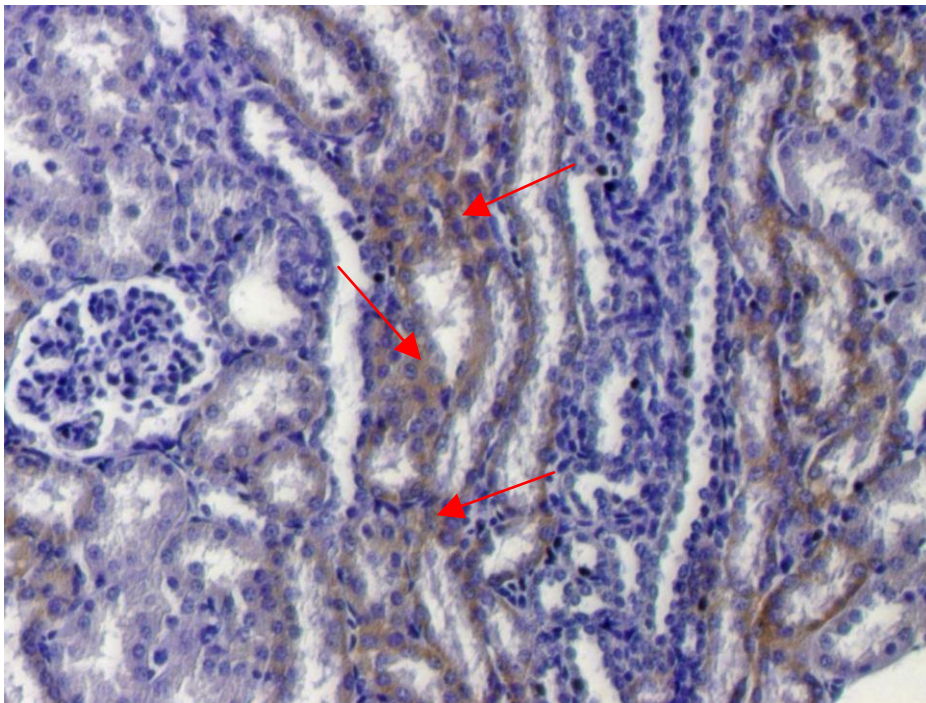


Figura 4. Inmunohistoquímica de cerdo sacrificado a 7 días post infección, objetivo 20x. Inmunopositividad fuerte (flechas) a rubulavirus porcino en epitelio tubular de la corteza renal, contrastados con hematoxilina.

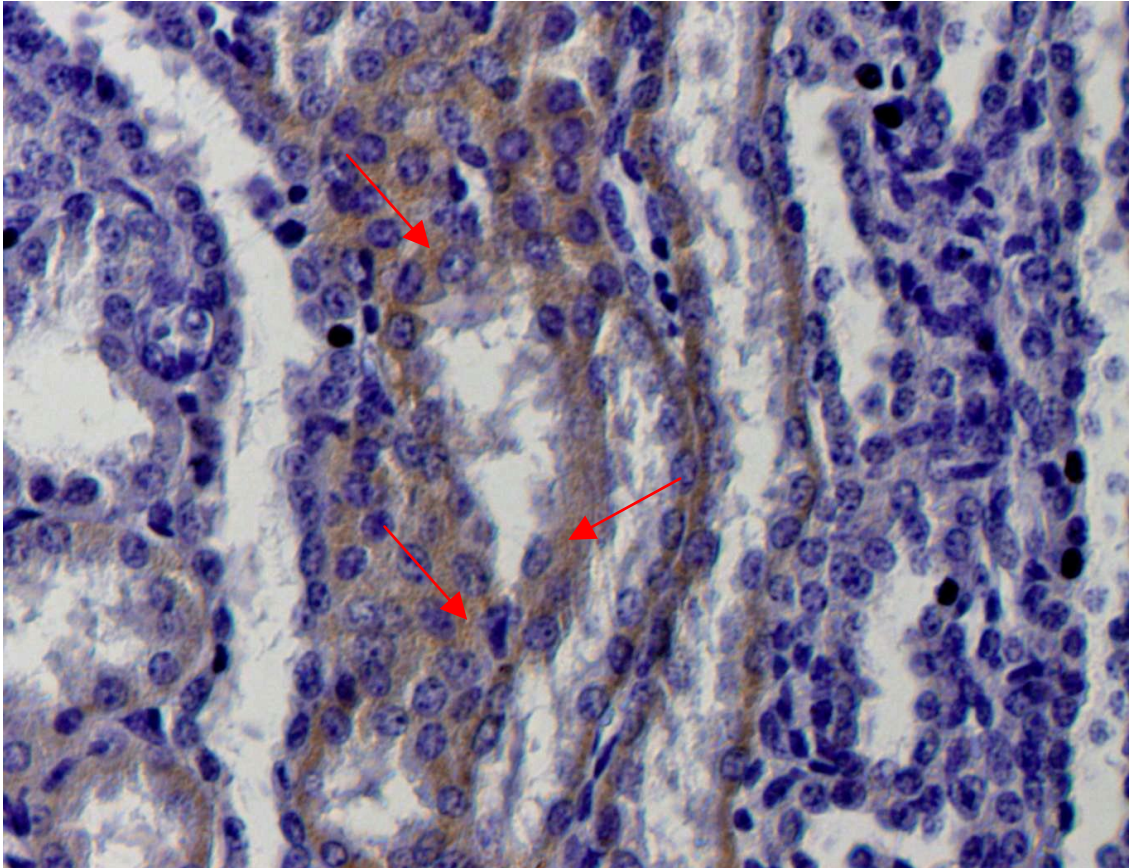


Figura 5. Inmunohistoquímica de cerdo sacrificado a 7 días post infección, objetivo 40x. Inmunopostividad fuerte (flechas) a rubulavirus porcino en citoplasma de epitelio tubular de la corteza renal, contrastados con hematoxilina

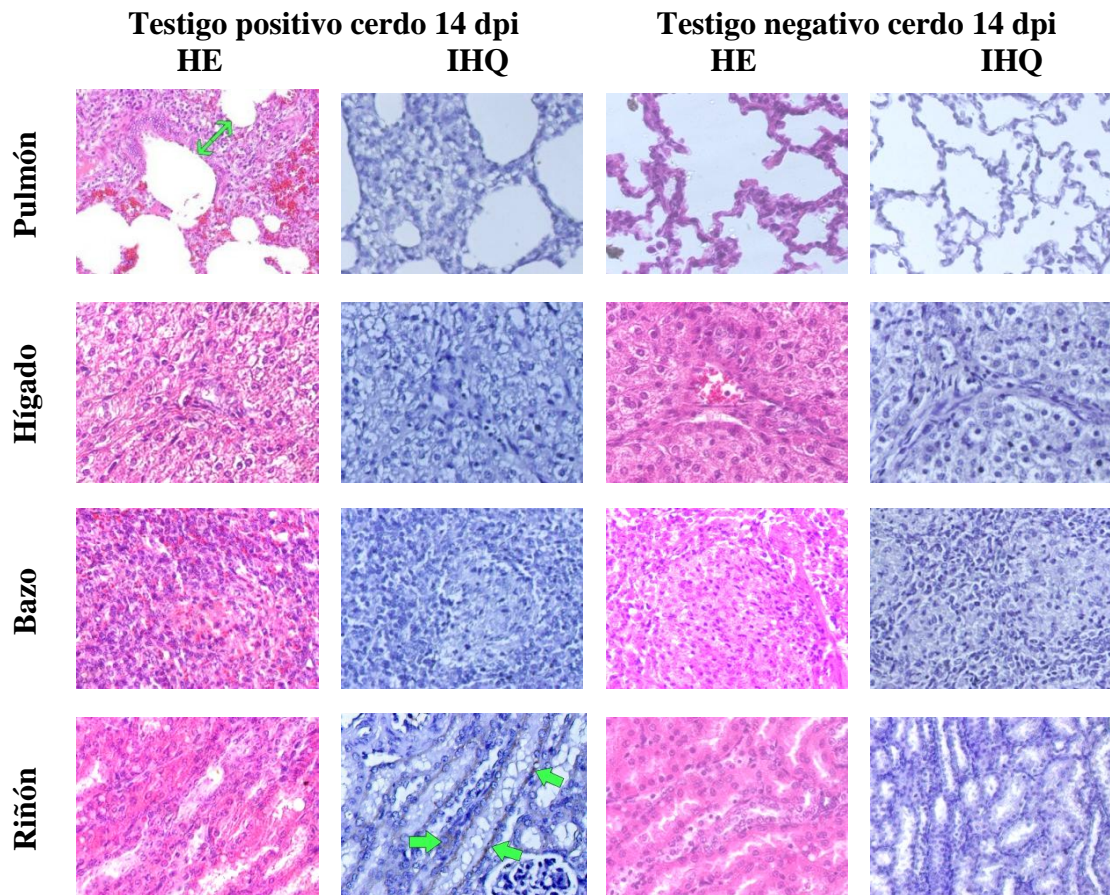


Figura 6. Inmunohistoquímica (IHQ-sistema biotina/avidina) y evaluación histológica Hematoxilina-Eosina (tinción HE) en riñón, bazo, hígado y pulmón de cerdo sacrificado a 14 días post infección (dpi). Inmunopositividad moderada a rubulavirus porcino en epitelio tubular de tejido renal de cerdos infectados (flechas). Inflamación e infiltración linfocitaria en alveolos pulmonares (flecha).

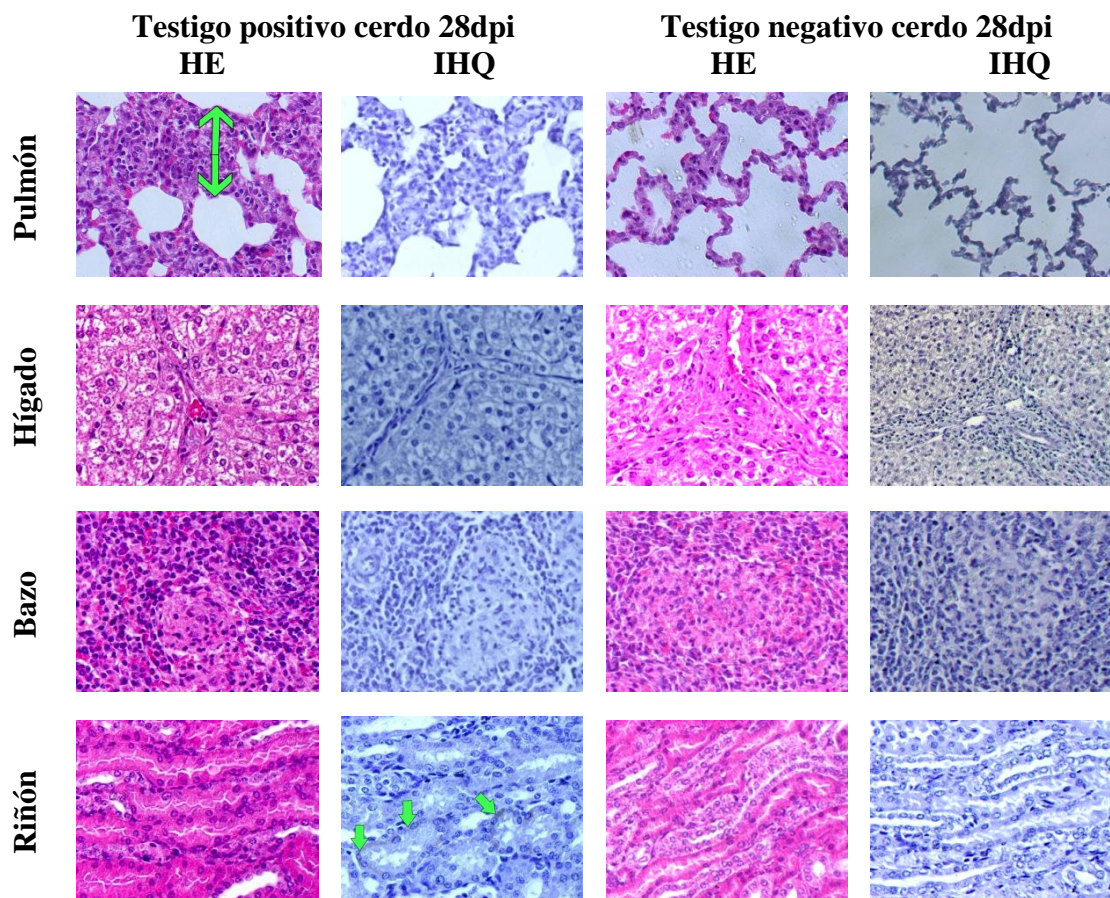


Figura 7. Inmunohistoquímica (IHQ-sistema biotina/avidina) y evaluación histológica Hematoxilina-Eosina (tinción HE) en riñón, bazo, hígado y pulmón de cerdo sacrificado a 28 días post infección (dpi). Inmunopositividad leve a rubulavirus porcino en epitelio tubular en tejido renal de cerdos infectados (flechas). Inflamación crónica e infiltración linfocitaria en alveolos pulmonares

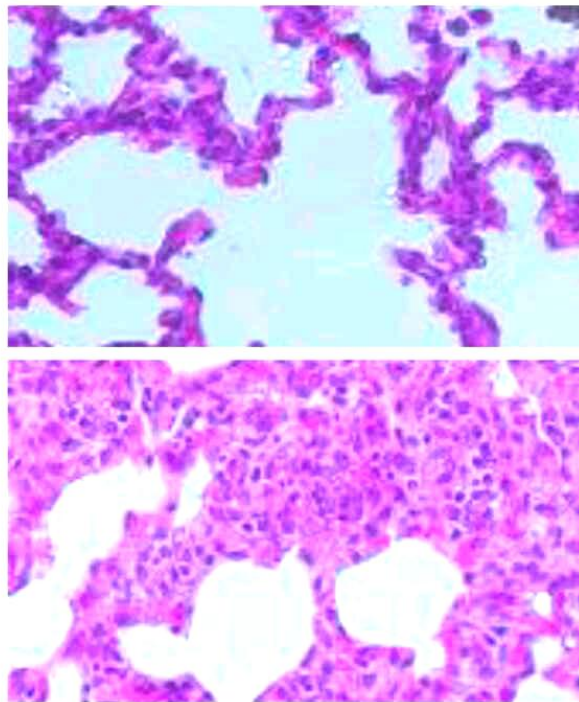


Figura 8. Evaluación histológica Hematoxilina-Eosina de pulmón de cerdo, objetivo 20x. Imagen superior muestra un pulmón de cerdo testigo negativo a rubulavirus porcino, imagen inferior muestra pulmón de cerdo sacrificado a 28 días post infección con rubulavirus porcino, se observa un engrosamiento de la pared alveolar e infiltración linfocitaria,

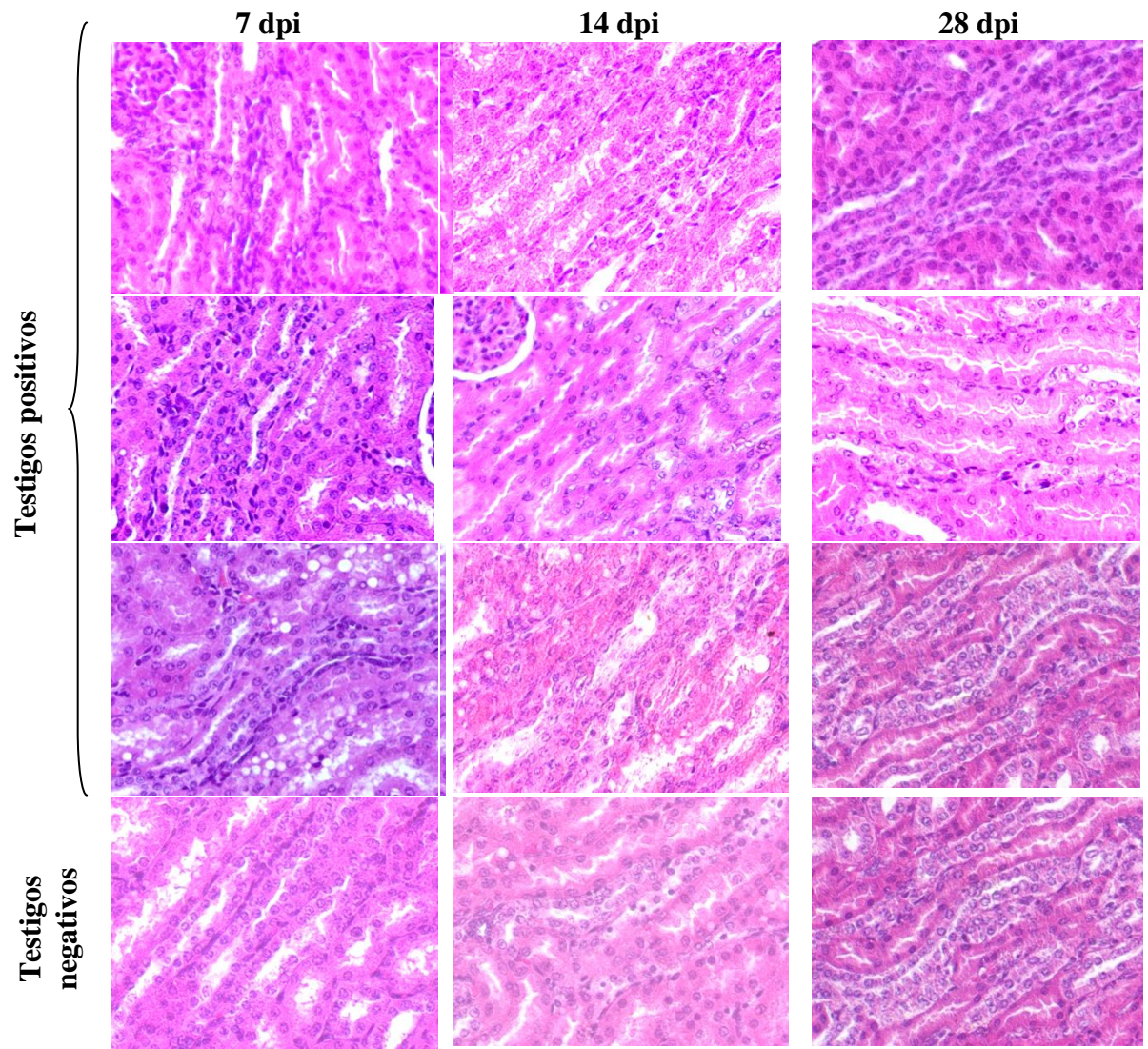


Figura 9. Evaluación histológica Hematoxilina-Eosina (HE) de riñón de cerdos sacrificados a 7, 14 y 28 días post infección (dpi). Artefactos de aspecto eosinofílico en epitelio tubular de tejido renal en cerdos infectados y testigos negativos a rubulavirus porcino.

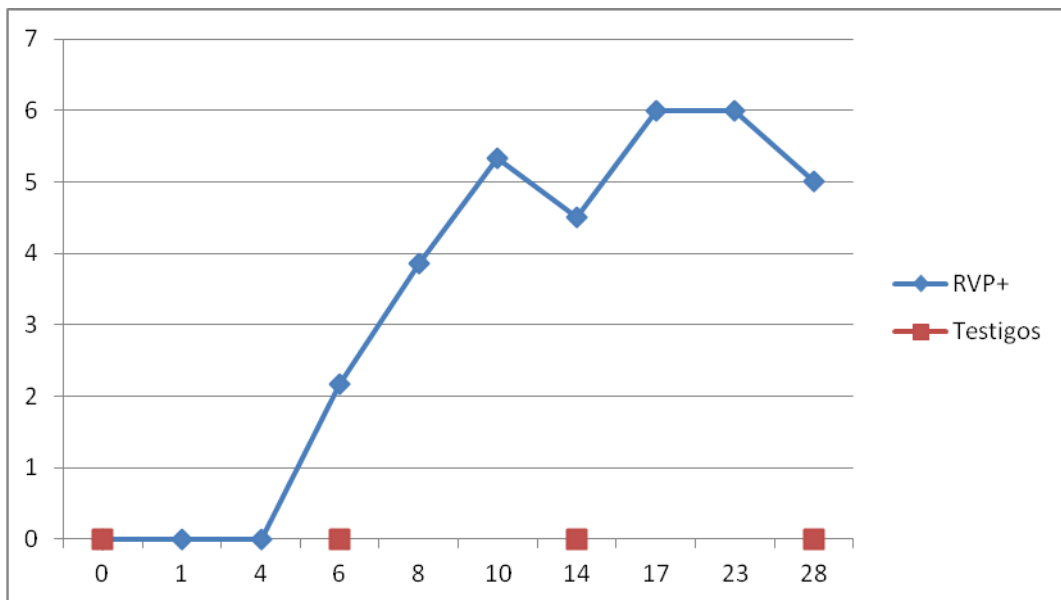


Figura 10. Curva de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra Rubulavirus porcino (RVP) a diferentes días post infección mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.