



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTENIA**

**Estudio de la presentación serológica del Virus Respiratorio Sincitial y Virus  
de Parainfluenza tipo 3 en ovinos**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**MARÍA JOSEFINA CONTRERAS LUNA**

**TUTOR PRINCIPAL: JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. ARMANDO PÉREZ TORRES**  
Facultad de Medicina, UNAM  
**DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

MÉXICO D.F

Octubre 2014



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.

***"Y una vez que la tormenta termine, no recordarás como lo lograste, como sobreviviste.  
Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero una cosa si es  
segura. Cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entro en ella.***

***De eso se trata esta tormenta."***

***Haruki Murakami***

## DEDICATORIA

A mis padres pilar fundamental en mi vida, gracias a ustedes por forjar los principios y valores que poseo, por ellos soy la persona que soy ahora.

A mis hermanos, a ti Isabel porque siempre me cuidas y estas ahí para alentarme a seguir creciendo en lo personal y profesional.

A Diego eterno cómplice de la vida, el que siempre me hace reír con sus ocurrencias y siempre dispuesto a hablar y escuchar.

A Isaías que siempre tiene mil ¿porque? y no me permite no saber las respuestas. Cada uno de ustedes apporto algo valioso a esta tesis y a mi vida ¡¡¡Gracias!!!

A Luis mi compañero, mi mejor amigo y el amor de mi vida, que siempre estas a lado mío, nunca delante y nunca detrás, mi razón para crecer día con día. Te amo.

A Thora, Lola, Atlas, por su amistad, nobleza y permitirme compartir la vida con ustedes.

A la memoria de mi abuela Josefina García.

## AGRADECIMIENTOS

- ∅ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada para la realización de mis estudios de maestría con el número de CVU: 492430
  
- ∅ A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que a través del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) me otorgó el apoyo para realizar las actividades académicas que requirieron mis estudios de posgrado.
  
- ∅ Al proyecto PAPIIT No. IN223514 que financió mi investigación.
  
- ∅ Al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, CEIPSA, en especial al MVZ Javier Gutiérrez Molotla director técnico del centro y al Z. M en C Augusto César Lizarazo Chaparro por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.
  
- ∅ Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, CEIEGT, en especial al MVZ MPA Héctor Basurto Camberos director técnico del Centro y al MVZ Cristino Cruz Lazo por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.
  
- ∅ A mi tutor el Doctor José Iván Sánchez Betancourt por la confianza otorgada desde antes de conocerme, los consejos, el conocimiento y sobre todo el invaluable e incondicional apoyo que me ha brindado siempre. ¡Muchas gracias doctor!
  
- ∅ A los miembros de mi comité tutorial; la Doctora Rosa Elena Sarmiento Silva que me brindó su apoyo incondicional no solo académico sino también personal y que llegó al rescate en el momento adecuado, muchas gracias y al doctor Armando Pérez Torres por su valioso apoyo en la realización, escritura y sobre todo revisión de esta tesis, muchas gracias.
  
- ∅ A los doctores (as) Antonio Ortiz Hernández, Gladis Del Carmen Fragoso González, Rocío Gabriela Tirado Mendoza y José Francisco Morales Álvarez. miembros del jurado por su disponibilidad y tiempo que dedicaron a revisar mi tesis.
  
- ∅ A Tere López por orientarme en el laboratorio y tenerme mucha paciencia.

- ∅ A la doctora Ivette Rubio Gutiérrez por ser mi maestra y asesora en mis estudios de licenciatura pero sobre todo una amiga incondicional y única.
- ∅ Al doctor Manuel Corro Morales, por su valiosa contribución a mi formación como MVZ en mis estudios de licenciatura pero sobre todo por su amistad.
- ∅ Al Doctor Humberto Ramírez Mendoza y al laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Microbiología de la FMVZ-UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.
- ∅ Quiero agradecer especialmente a todas esas personas que de una forma u otra trataron de minarme o hicieron que las cosas tomaran un rumbo difícil en este proceso importante que es el posgrado, gracias a esas experiencias descubrí cuan fuerte puedo ser pero sobre todo aprendí a ser fiel a mis principios y valores. El resultado de ese proceso es este valioso trabajo, de verdad muchas gracias!!!

## ÍNDICE

	Página
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen	VII
Summary	IX
Introducción	1
Epidemiología	2
Etiología	3
Virus Respiratorio Sincitial	3
Características del virus	4
Proteínas virales y sus funciones	4
Signos clínicos	6
Lesiones	6
Virus Parainfluenza 3	7
Características del virus	7
Proteínas virales y sus funciones	8
Signos clínicos	9
Lesiones	10
Replicación de los <i>paramixovirus</i>	10
Patogenia	12
Inmunología	14
Diagnóstico	17
Manejo y prevención de la enfermedad respiratoria en ovinos	20

	<b>Página</b>
Justificación	<b>24</b>
Hipótesis	<b>25</b>
Objetivo general	<b>26</b>
Objetivos específicos	<b>26</b>
Material y métodos	<b>27</b>
Resultados	<b>34</b>
Discusión	<b>49</b>
Conclusiones	<b>58</b>
Referencias	<b>59</b>
Anexo	<b>73</b>



## Resumen

El complejo respiratorio es una de las principales causas de mortalidad en los rebaños; dos de los virus que lo conforman son el virus Respiratorio Sincitial (VRS) y virus de Parainfluenza tipo 3 (VPI3) que afectan ganado adulto y joven de todo el mundo, y causan pérdidas económicas por su manifestación clínica y subclínica. En México no existen reportes en ovinos de la circulación y asociación de estos virus a factores como edad y sistema de producción. En este trabajo se identificó la presencia de anticuerpos específicos contra VRS y VPI3 por etapa productiva en ovinos y se determinó la asociación de la presentación serológica con edad y sistema de producción. De 141 muestras de sangre de ovinos del altiplano en un sistema intensivo y 152 de ovinos del trópico de un sistema extensivo, se detectaron anticuerpos contra VRS por seroneutralización y detección de anticuerpos contra VPI3 por inhibición de la hemoaglutinación (IHA). De 293 ovinos 105 (51.4%) pertenecían al trópico y 99 (48.6%) al altiplano. La edad promedio fue 3.6 años en el trópico y de 3.4 en el altiplano. La seroprevalencia contra VRS en adultos fue 47% (49/105) en el trópico y 64% (63/99) en el altiplano. En corderos fue 52% (25/46) en el trópico y 71% (29/43) en el altiplano. Para VPI3 en adultos fue 78.8% (78/105) en el trópico y 83.9% (88/99) en el altiplano. En corderos fue 95.6% (44/46) en el trópico y 72.1% (31/43) en el altiplano. La diferencia entre el porcentaje de seropositividad para VRS en animales adultos del trópico y el altiplano fue estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con significancia estadística de la asociación entre la seropositividad y el sistema de producción ( $P = 0.003$ ) (OR=2.042) con un riesgo 2.042 veces mayor de tener anticuerpos en ovinos bajo un sistema de producción extensivo, para VPI3 también hubo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con significancia estadística de la asociación entre la seropositividad y el sistema de producción ( $P = 0.017$ , OR=0.475) con un riesgo 0.475 veces mayor de tener anticuerpos en ovinos bajo un sistema de producción extensivo. Por RT-PCR se demostró la presencia de VRS y VPI3 en muestras de hisopos nasales en corderos clínicamente sanos. Todos los resultados de serología indican que los ovinos son susceptibles a la infección por estos virus y los resultados de RT-PCR sugieren que los antígenos

identificados son productos de infecciones naturales y posibles re-infecciones. Este es el primer informe acerca de la detección BQRS y BPIV3 en ovinos en México.

**Palabras clave:** *Paramixovirus*, complejo respiratorio, VRS, VPI3, trópico, altiplano, serología, seroprevalencia, RT-PCR.

## SUMMARY

The respiratory complex is one of the leading causes of mortality in herds; two viruses that comprise it are the Respiratory Syncytial Virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) affecting adult and young cattle worldwide, causing economic losses due to clinical and subclinical manifestation. In Mexico there are no reports of the presence and association of this virus with factors such as age and production system in sheep flocks. The presence of specific antibodies against RSV and PIV3 by productive stage in sheep were identified and the association of age, production system and serological presentation was determined. In blood samples of 141 sheep in an intensive highland sheep, 152 of the tropic of an extensive system, were found antibodies against RSV by neutralization assay and antibodies against PIV3 by hemagglutination inhibition assay. 105 of 293 sheep (51.4%) belonged to the tropic and 99 (48.6%) to the highland. The mean age was 3.6 years in the tropic and 3.4 in the highland. Seroprevalence against RSV in adults was 47% (49/105) in the tropic and 64% (63/99) in the highland. In lambs was 52% (25/46) in the tropic and 71% (29/43) in the highland. For PIV3 in adults was 78.8% (78/105) in the tropic and 83.9% (88/99) in the highland. In lambs was 95.6% (44/46) in the tropic and 72.1% (31/43) in the highland. The difference between percentage of seropositivity for VRS in adult animals of the tropic and the highland was statistically significant ( $P < 0.05$ ) with statistical significance of the association between seropositivity and the production system ( $P = 0.003$ ) (OR = 2.042) with 2,042 times greater risk of having antibodies in sheep under an extensive production system, PIV3 was also statistically significant ( $P < 0.05$ ) with statistical significance ( $P = 0.017$ , OR = 0.475) a 0.475 times higher risk of having antibodies in sheep under an extensive production system. RT-PCR reaction showed the presence of RSV and PIV3 in nasal swabs in clinically healthy lambs. Serology results indicate that sheep are susceptible to infection by these viruses, and RT-PCR results suggest that the antigens identified are products of natural infections and possible re-infection. This is the first report on the detection of BRSV and BPIV3 in sheep of Mexico.

**Keywords:** *paramyxovirus*, respiratory complex, RSV, PIV3 tropic, highlands, serology, seroprevalence, RT-PCR.

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra BRSV en ovinos adultos y corderos por centro de producción	<b>35</b>
<b>Figura 2</b>	Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra BRSV en ovinos adultos por centro de producción	<b>36</b>
<b>Figura 3</b>	Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra BRSV en corderos por centro de producción	<b>37</b>
<b>Figura 4</b>	Porcentaje de seropositividad contra BRSV en ovinos adultos por centro de producción	<b>38</b>
<b>Figura 5</b>	Porcentaje de seropositividad contra RSV en corderos por centro de producción	<b>38</b>
<b>Figura 6</b>	Porcentaje de seropositividad a BRSV en corderos por edades en los dos centros	<b>39</b>
<b>Figura 7</b>	Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra PI3 en ovinos adultos y corderos por centro de producción	<b>41</b>
<b>Figura 8</b>	Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra PI3 en ovinos adultos por centro de producción	<b>42</b>
<b>Figura 9</b>	Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra VPI3 en corderos por centro de producción	<b>43</b>
<b>Figura 10</b>	Porcentaje de seropositividad contra VPI3 en ovinos adultos por centro de producción	<b>44</b>
<b>Figura 11</b>	Porcentaje de seropositividad contra VPI3 en corderos por centro de producción	<b>44</b>
<b>Figura 12</b>	Porcentaje de seropositividad a VPI3 en corderos por edades en los dos centros de producción	<b>45</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1</b> Títulos de sueros de referencia para la estandarización de la prueba de seroneutralización	<b>29</b>
<b>Cuadro 2</b> Títulos de sueros de referencia positivos y negativos para la estandarización de la prueba de IHA	<b>31</b>
<b>Cuadro 3</b> Diseño de oligonucleótidos para BVRS y BPI3 utilizados en la RT-PCR	<b>32</b>
<b>Cuadro 4</b> Frecuencia del título de anticuerpos contra BVRS en ovinos adultos y corderos por centro de producción	<b>34</b>
<b>Cuadro 5</b> Frecuencia del título de anticuerpos contra BVRS en ovinos adultos por centro de producción	<b>35</b>
<b>Cuadro 6</b> Frecuencia del título de anticuerpos contra BVRS en corderos por centro de producción	<b>36</b>
<b>Cuadro 7</b> Asociación entre la seropositividad en ovinos contra BVRS y el centro de producción	<b>40</b>
<b>Cuadro 8</b> Frecuencia del título de anticuerpos contra VPI3 en ovinos adultos y corderos por centro de producción	<b>40</b>
<b>Cuadro 9</b> Frecuencia del título de anticuerpos contra VPI3 en ovinos adultos por centro de producción	<b>41</b>
<b>Cuadro 10</b> Frecuencia del título de anticuerpos contra VPI3 en corderos por centro de producción	<b>42</b>
<b>Cuadro 11</b> Asociación entre la seropositividad en ovinos contra VPI3 y el centro de producción	<b>46</b>

## ÍNDICE DE IMÁGENES

	<b>Página</b>
<b>Imagen 1</b>	Replicación de los <i>paramixovirus</i> . <b>12</b>
<b>Imagen 2</b>	Testigo de células VERO <b>73</b>
<b>Imagen 3.</b>	Testigo células VERO infectadas con BVRS <b>73</b>
<b>Imagen 4</b>	Testigo de células MDBK <b>73</b>
<b>Imagen 5</b>	Testigo células MDBK <b>73</b>
<b>Imagen 6</b>	Células vero infectadas con BVRS ajustado a 100 y 300DICC 50% <b>74</b>
<b>Imagen 7</b>	RT-PCR Virus Respiratorio Sincitial <b>47</b>
<b>Imagen 8</b>	RT-PCR Parainfluenza 3 <b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AINES</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>BAL</b>	Lavado bronquio alveolar
<b>BVPI3</b>	Virus Parainfluenza-3 bovino
<b>BVRS</b>	Virus Respiratorio Sincitial bovino
<b>CXCL</b>	Interleucina
<b>CD14</b>	Proteína de recepción del complejo de lipopolisacárido y de la proteína de unión al lipopolisacárido.
<b>CICUAE</b>	Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación
<b>CEIEGT</b>	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical
<b>CEIPSA</b>	Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal
<b>DCs</b>	Células dendríticas intraepiteliales
<b>DI</b>	Dosis infectantes
<b>DICC50%</b>	Dosis infectante en cultivo celular capaz de infectar el 50% de las células
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FMVZ</b>	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
<b>HA</b>	Hemoaglutinina
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IHA</b>	Inhibición de la hemoaglutinación
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRF3</b>	Factor regulador de interferón 3
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MDA5</b>	Proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5

<b>MD2</b>	Proteína soluble que se asocia a dominios extracelulares de TLR4
<b>MEM</b>	Medio esencial mínimo Eagle
<b>NF-kappaB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>PAMPS</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKR</b>	Proteína cinasa C
<b>RANTES</b>	Regulador para la activación normal de células T expresadas y secretadas
<b>RIG-I</b>	Receptor intracelular de reconocimiento de patrones que participan en el reconocimiento de los virus por el sistema inmune innato
<b>RNPs</b>	Ribonucleoproteínas
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
<b>SN</b>	Seroneutralización
<b>STAT</b>	Transductores de señal y activadores de transcripción
<b>TAE</b>	Tria acetate EDTA
<b>TCD4</b>	Linfocitos T cooperadores
<b>TCD8</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>Th</b>	Células T helper
<b>TLR</b>	Receptores tipo toll
<b>TRAF3</b>	Proteína asociada al receptor del TNF 3
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>VPI3</b>	Virus Parainfluenza-3
<b>VRS</b>	Virus Respiratorio Sincitial



## Introducción

Las enfermedades respiratorias del ganado ovino se presentan como una combinación de varios factores ambientales, manejo y agentes patógenos por lo que se llaman complejo respiratorio. Entre los principales factores que predisponen a este padecimiento son la infección por un virus seguido por la de una o más bacterias a lo cual deben sumarse situaciones de estrés, cambios ambientales bruscos así como la falta de medidas preventivas (Scott, 2011, Pugh, 2002, Trigo, 1987).

Los virus se transmiten de un animal a otro a través de aerosoles, y por contacto directo. Es común que en una misma producción pecuaria se encuentren dos o más especies, comúnmente bovinos, ovinos o caprinos, y que permanecen la mayor parte del tiempo en contacto directo o comparten sitios comunes como potreros o corrales, lo cual puede favorecer la trasmisión de enfermedades (Solis-Calderon *et al.*, 2007).

El complejo respiratorio representa una de las principales causas de mortalidad en los rebaños ovinos. Las enfermedades respiratorias son el resultado de la exposición a condiciones climáticas adversas, hacinamiento, estrés, entre otros, lo que favorece la infección por virus y bacterias, esto afecta animales de todas las edades y razas, siendo los más pequeños o aquellos animales inmunocomprometidos los más afectados (Scott, 2011, Smith MC, 2009, Cabello, 2006, Martin, 1996). Este padecimiento causa importantes pérdidas económicas por la manifestación subclínica reflejada en la baja ganancia de peso, retraso en el crecimiento de los animales y tratamientos costosos (Trigo, 1987, Solis-Calderon *et al.*, 2005, Cortese, 1991).

La industria ganadera estadounidense estima una pérdida anual de hasta mil millones de dólares por enfermedad respiratoria bovina, debido a la pérdida de la producción, el aumento de los gastos de mano de obra, medicamentos y la muerte. Se estima que los productores pierden \$40.46 USD/becerro en un tratamiento, \$ 58.35 USD/becerro para 2 tratamientos, y \$ 291.93 USD/becerro por 3 o más tratamientos (Griffin *et al.*, 2010).

El complejo respiratorio de los pequeños rumiantes se caracteriza por una etiología mixta bacteriana y viral. Dentro de los principales virus que lo conforman se encuentran los virus de la familia *Paramyxoviridae* Parainfluenza-3 (VPI3) y Virus Respiratorio Sincitial (VRS) (Keles *et al.*, 1998).

Entre los signos que se pueden observar durante la infección son tos, anorexia, pirexia, descarga nasal y ocular, disnea y a veces diarrea. Estos agentes patógenos virales afectan a ganado tanto a adulto como jóvenes y están ampliamente distribuidos en todo el mundo (Solis-Calderon *et al.*, 2005, Zhu, 2011).

El VRS y VPI3 son considerados unos de los agentes patógenos con la más alta prevalencia en infecciones del tracto respiratorio superior e inferior; en humanos se han reportado mortalidades elevadas en infantes y ancianos (San Juan V, 2006). El VRS humano y bovino son las cepas del virus más reconocidas y dentro de este grupo se encuentran las cepas del VRS caprino y ovino (Maclachlan *et al.*, 2011). El VPI3 es una causa importante de infecciones de las vías respiratorias en niños, con altas tasas de morbilidad las infecciones por VPI 3 en ovinos parecen ser causadas por un serotipo distinto del responsable de infecciones virales en humanos (Jehan A.M. Gafer, 2009).

## **Epidemiología**

Se sabe que el complejo respiratorio representa una de las principales causas de mortalidad en los rebaños asociados a enfermedades secundarias (Martin, 1996) y de importantes pérdidas económicas por la manifestación subclínica reflejada en la baja ganancia de peso, retraso en el crecimiento de los animales y tratamientos costosos (Trigo, 1987, Solis-Calderon *et al.*, 2005, Cortese, 1991).

Estudios anteriores han reportado en ganado bovino seroprevalencias del 69.1% en Italia (Luzzago *et al.*, 2010), 87.8% en Perú (Cabello, 2006) para VRS y 88.9% en México (Solis-Calderon *et al.*, 2005), 81.8% en Perú (Cabello, 2006) y 71.7 en USA (Fulton *et al.*, 2000) para VPI3.

A raíz de estos hallazgos los autores han indicado la importancia de implementar medidas de control como vacunación o introducir/complementar prácticas de manejo (Fulton *et al.*, 2000).

En la especie ovina los reportes existentes en otros países sobre la seroprevalencia de estos agentes es de: 60.86% en Brazil (Calderon G, 2011) 49.3% en Perú (Cabello, 2006) para VRS y de 31.3 % en Bulgaria (Rusenova, 2009) 86.5% en Brazil (Calderon G, 2011) y 50% en Perú (Cabello, 2006) para VPI3. Esto refleja la susceptibilidad de los ovinos a la infección por estos virus debido a la mezcla con otras especies como bovinos, así como las diferentes condiciones ambientales y de manejo que se puedan presentar (Cabello, 2006, Rusenova, 2009).

Se ha demostrado que la principal causa de muertes en el ganado ovino, no importando la época del año se debe a padecimientos asociados a enfermedad respiratoria, representando un 26% del total (L and Hernández J, 2006).

## **Etiología**

### **Virus Respiratorio Sincitial**

El VRS se aisló por primera vez en 1956 de un chimpancé y fue llamado agente de coriza del chimpancé. Alrededor de los años 60's se logró aislar de un niño que presentaba signos de neumonía. En los años 70's el virus se logró aislar de bovinos con signos respiratorios, al mismo tiempo que se encontraban anticuerpos en ovinos que presentaban enfermedad aguda del tracto respiratorio. En la década de los 80's se aisló el virus de un ovino que presentaba rinitis (Maclachlan *et al.*, 2011, Duncan and Potgieter, 1993, Brodersen, 2010).

Este virus es reconocido como un patógeno de gran importancia en el ganado, es causa importante de enfermedades de las vías respiratorias, principalmente de animales jóvenes lo que ocasiona pérdidas económicas por el retraso en el crecimiento (Brodersen, 2010). Es un virus de distribución mundial cuya velocidad de diseminación depende del tipo de manejo productivo, es más rápida en animales en confinamiento (de 3 a 10 días para infectar a toda la población) con un periodo

de incubación de 5-7 días; presenta una morbilidad de hasta el 50% y una mortalidad del 5% (Pugh, 2002, Brodersen, 2010, Murphy, 1999).

### **Características del virus**

El VRS se encuentra clasificado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramixoviridae*, subfamilia *Pneumoviridae*, género *pneumovirus*. Es un virus envuelto no segmentado de sentido negativo 3' a 5' y de cadena sencilla de ARN de 15,222 nucleótidos aproximadamente, con diámetro entre 150 a 300 nm, posee 10 genes que codifican 11 proteínas (Brodersen, 2010, Vainionpaa and Hyypia, 1994).

### **Proteínas virales y sus funciones**

La glicoproteína G: Se encarga de mediar la adsorción del virus a la célula hospedera por la unión con glicosaminoglicanos presentes en la membrana plasmática (San Juan V, 2006). Estudios sugieren que esta proteína no es necesaria para la infección por el virus pero su coexpresión mejora la actividad de la proteína de fusión (Schlender *et al.*, 2003).

La proteína de fusión F: Media la unión del virus a las células y es responsable de la penetración del virus por fusión entre las membranas virales y la membrana de la célula hospedera. También es responsable de la fusión de las membranas celulares entre células infectadas y no infectadas lo que da lugar a los sincitios. Se sintetiza como un precursor F0 que requiere madurar en un heterodímero F1-F2, unidos por un enlace disulfuro. La subunidad F1 contiene en su extremo amino terminal el péptido de fusión mientras que la subunidad F2 es un determinante para la especificidad de especie del virus (San Juan V, 2006, Maclachlan *et al.*, 2011).

Proteína hidrófoba pequeña SH: Es una proteína integral de membrana pequeña, no esencial para la replicación del virus *in vitro* o *in vivo* y su función no está bien definida; puede jugar un papel en la fusión celular inducida por virus mediante la interacción con las proteínas F y G (Valarcher and Taylor, 2007).

Proteína M: Tiene un papel central en el ensamblaje de viriones maduros, proporcionando la relación estructural entre las glicoproteínas de la envoltura y la ribonucleoproteína. Está implicada en el control de los niveles de síntesis de ARNm, y desempeña un papel en la maduración y/o mantenimiento de los filamentos virales (Mitra *et al.*, 2012).

Proteínas asociadas a nucleocápside: La nucleocápside está constituida por la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L). En combinación con P, L y posiblemente M2-2, la proteína N es un elemento importante de la nucleocápside y protege el genoma viral ARN de RNAsas. La proteína P funciona como chaperona para N, un factor de regulación para la transcripción y replicación viral. La polimerasa L es responsable de la transcripción y la replicación viral (Collins and Graham, 2008, Zhang *et al.*, 2011).

Las proteínas M2-1 y M2-2 son factores que intervienen, respectivamente, en la transcripción y en la modulación del equilibrio entre la transcripción y replicación del ARN (Valarcher and Taylor, 2007, Collins and Graham, 2008).

Proteínas no estructurales (NS), NS1 y NS2. La proteína NS1 junto a la proteína M, es un fuerte inhibidor de la transcripción del ARN viral y la replicación. La proteína NS2 también parece ser un inhibidor de la transcripción, pero a un nivel más bajo que la proteína NS1. No son esenciales para la replicación del virus *in vitro*, aunque el crecimiento en cultivo celular de un virus que carece de una u otra de estas proteínas es atenuado. Las proteínas NS1 y NS2 tienen un papel importante en la regulación de interferón (IFN)  $\alpha / \beta$  (Valarcher and Taylor, 2007). NS1 se ha demostrado secuestra IRF3 (factor regulador de interferón 3) y degrada TRAF3 (proteína asociada al receptor del TNF 3) los dos jugadores clave de la vía de síntesis de IFN. NS2 interactúa con RIG-I (receptor intracelular de reconocimiento de patrones que participan en el reconocimiento de los virus por el sistema inmune innato), evitando la inducción de genes IFN por esta vía. Las proteínas NS,

individualmente y en conjunto, afectan también STAT2 esencial para la respuesta de IFN, probablemente a través de una combinación de mecanismo de proteasoma-ubiquitina dando lugar a la derogación de la respuesta IFN (Barik, 2013).

## **Signos clínicos**

Los animales afectados son principalmente corderos inmunodeprimidos. Presentan tos seca a húmeda, descarga nasal y ocular que va desde serosa a mucopurulenta, sobre todo cuando el cuadro se complica con bacterias oportunistas como *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

Se observa una disminución en la condición corporal que viene acompañada por pérdida de peso, debido a la disminución el consumo de alimento y por lo tanto, de la ganancia diaria de peso.

Otros signos son la cabeza baja, boca abierta, fiebre, disnea y depresión. A veces se pueden observar cuadros diarreicos asociados. En algunos casos, los animales pueden no presentar signos algunos, mismos que se hacen evidentes en presencia de situaciones que generen estrés como cuando se realizan manejos, transporte prolongado o movimiento entre corrales (Pugh, 2002, Trigo, 1987, Martin, 1996, Valarcher and Taylor, 2007).

## **Lesiones**

### Lesiones macroscópicas

La lesión macroscópica que se describe de forma más común es la de consolidación pulmonar que se manifiestan un estado de solidificación ó aumento de la densidad del parénquima pulmonar perdiendo sus características de colchón neumático (se solidifica), por lo general esto ocurre con una distribución craneal; el enfisema y la hemorragia se observaron ocasionalmente. También se observa bronquitis mucopurulenta acompañada de traqueitis leve con edema (Valarcher and Taylor, 2007, Sharma and Woldehiwet, 1990).

### Lesiones microscópicas

Los cambios histopatológicos incluyen infiltrados celulares peribronquiolares linfomononucleares, diversos grados de bronquiolitis, neumonía intersticial y células epiteliales multinucleadas (sincitios). También se han descrito alveolitis y bronquitis, pero con menos frecuencia. Otras lesiones son hiperplasia del epitelio bronquial, necrosis del epitelio bronquial y bronquiolar. Debido a la colonización bacteriana puede haber formación de membranas hialinas acompañadas de una bronconeumonía supurativa por bacterias (Trigo, 1987, Valarcher and Taylor, 2007, Sharma and Woldehiwet, 1990).

### **Virus Parainfluenza tipo 3**

El virus de VPI3 ha sido descrito desde la década de los 50's en humanos y bovinos (Ellis, 2010). Se aisló por primera vez en un carnero en 1966 y desde entonces se ha demostrado que la infección por este virus está ampliamente distribuida a nivel mundial (Jehan A.M. Gafer, 2009). Es considerado como uno de los principales factores etiológicos de enfermedades respiratorias agudas en los ovinos al predisponer a la infección, aparición del cuadro clínico y las lesiones producidas por *Mannheimia. haemolytica* y otras bacterias como *Corynebacterium spp.* (Pugh, 2002, Martin, 1996).

### **Características del virus**

El VPI3 se encuentra clasificado en el orden *Mononegavirales*, familia *Paramixoviridae*, subfamilia *Paramixovirinae*, género *Respirovirus*. Incluye los virus parainfluenza humanos tipos 1 y 3 (hPI1 hPI3 V y V, respectivamente), virus parainfluenza bovino tipo 3 y el virus Sendai de los ratones (MPI1 V).

Es un virus ARN de cadena sencilla de sentido negativo de 15,456 nucleótidos, esférico, envuelto y polimórfico, con un diámetro de 150 a 200nm (Maclachlan *et al.*, 2011, Vainionpaa and Hyypia, 1994, Ellis, 2010).

## **Proteínas virales y sus funciones**

Las proteínas C y V: Las proteínas no estructurales (C, V), participan en la regulación de la replicación viral, suprimen la respuesta inmune innata del hospedero (Schomacker *et al.*, 2012b).

La proteína C modula y reduce la síntesis de ARN viral para evitar la acumulación de ARN de doble cadena, evitando así la activación de PKR (proteína cinasa C) y MDA5 (proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5) que funcionan como receptores de reconocimiento de ARN de doble cadena que es un sensor para virus (Gotoh *et al.*, 2002). Con respecto a la señalización de IFN, las proteínas C se unen a STAT1 (transductores de señal y activadores de transcripción), secuestrándolo en los complejos que se acumulan en el citoplasma asociado con endosomas tardíos, evitando así la translocación STAT1 al núcleo (Schomacker *et al.*, 2012a).

La proteína V inhibe la inducción de IFN de dos maneras: mediante la unión y la inhibición de la activación de MDA5, también reduce la producción de ARN viral e inhibe la señalización de IFN mediante la unión y la promoción de la degradación de STAT2 (Andrejeva *et al.*, 2004).

NP: Interactúa con las proteínas P y L en la estructura de la nucleocápside, su papel preciso en la transcripción y la replicación no se conoce completamente.

Las proteínas L y P: Componentes fundamentales de la actividad de la ARN polimerasa, son responsables, de la actividad de la transcriptasa y de la metilación de los ARNm específicos de virus (Zhang *et al.*, 2011, Henrickson, 2003).

Hemaglutinina -neuraminidasa (HN): Tiene actividades hemaglutinantes, se une a moléculas de superficie celular (hospedero) que contienen residuos de ácido siálico, en glicolípidos y glicoproteínas. La neuraminidasa ayuda a la liberación de virus de las células infectadas por la eliminación de los residuos de ácido siálico (Henrickson, 2003).



Proteína de fusión (F): La proteína F se sintetiza como un precursor biológicamente inactivo (Fo), que se escinde después de la traducción para producir una forma activa de dos subunidades, el polipéptido proximal F1 y el polipéptido distal F2. La glicoproteína F está implicada en la hemólisis, fusión celular y la penetración del virus en la célula. (Henrickson, 2003). Las glicoproteínas transmembranales hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y de superficie (F) median la fusión y unión del virus (Heminway *et al.*, 1994).

En el cultivo celular es capaz de producir un efecto citopático de muerte celular, formación de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y redondeamiento celular (Liqun Zhang, 2011). Los viriones son sensibles al calor, solventes lipídicos, detergentes iónicos y agentes oxidantes. Pueden permanecer viables en las superficies por más de 12 h. El mecanismo de transmisión es por contacto directo y a través de aerosoles o fómites (Martin, 1996).

### **Signos clínicos**

La mayoría de las veces los síntomas de la infección por el virus VPI3 pasan desapercibidos pero ocasionalmente se puede observar signos de infección del tracto respiratorio superior. El periodo de incubación del virus es de 5 a 7 días. Los corderos son los más afectados y los signos que se observan son tos (poco común), anorexia, fiebre, descarga nasal que va de serosa a mucopurulenta, letárgia, dolor abdominal, apnea y en casos severos la muerte (R.C. Cutlip, 1993, D.H. DAVIES, 1981). La mayor parte de los sobrevivientes tienen una condición corporal pobre y la recuperación es lenta (Jehan A.M. Gafer, 2009, Ellis, 2010, D.H. DAVIES, 1981, Lehmkuhl and Cutlip, 1983).

La propagación de la infección es rápida, de modo que dentro de un corto período de tiempo muchos o la mayoría de los corderos muestran evidencia clínica de una infección leve. A veces los brotes son tan leves que los signos clínicos no se detectan (Martin, 1996).

## **Lesiones**

### Lesiones microscópicas

Se observan áreas focales de neumonía intersticial que consiste en la infiltración del intersticio con grandes células mononucleares y la acumulación peribronquial de algunos linfocitos. El epitelio de las vías respiratorias se observa necrótico o en varias etapas de degeneración con una o varias capas de células superficiales planas escamosas con vacuolización, frecuentemente con inclusiones en las capas celulares superiores y desprendimiento de células basales. Se pueden apreciar células multinucleadas con cuatro o menos núcleos (raros) en el epitelio (Martin, 1996, R.C. Cutlip, 1993, Lehmkuhl and Cutlip, 1983).

### Lesiones macroscópicas

Pueden llegar a observarse grandes áreas irregulares de consolidación en los pulmones y agrandamiento de los ganglios linfáticos mediastínicos, áreas consolidadas de los pulmones, predominantemente en los lóbulos diafragmáticos, color rojo oscuro (D.H. DAVIES, 1981, Lehmkuhl and Cutlip, 1983).

## **Replicación de los paramixovirus**

### **Unión, fusión, replicación y liberación de nuevos viriones**

El primer paso en el ciclo de infección es la unión de la partícula del virus a su receptor celular, un proceso mediado por la glicoproteína HN o por la proteína G. La proteína F cataliza la fusión de la envoltura del virus y la membrana celular. Una vez que el VPI3 ingresa al tracto respiratorio alto cuya mucosa posee un alto contenido de ácido siálico un sustrato natural para la actividad de la glicoproteína HN, en su porción  $\alpha$ -2,6, en la célula (Iorio and Mahon, 2008), el ácido siálico es un receptor que está presente en una variada gama de tipos celulares como células epiteliales traqueales, células ciliadas y no ciliadas de bronquios y neumocitos tipo I y II. Es probable que también se encuentren estos receptores en cavidad nasal y faringe (Brodersen, 2010). Existen varios receptores de VRS, como la molécula de

adhesión intercelular (ICAM) -1 a la que se une la proteína F, la heparina se une a la proteína G y puede ser el primer paso en la unión viral eficiente antes de la fusión a través de nucleolina que se considera otro importante receptor, existen otros receptores como la anexina II que se une a la proteína G y receptores tipo toll (TLR) 4 que se une la proteína F (Mastrangelo and Hegele, 2012).

Después de haber fijado el virión, las proteínas F virales se activan, fusionando las membranas del virión con membranas de las células diana a través de un proceso que es impulsado por el replegamiento de las proteínas F con la membrana de la célula lo que permite que el contenido del virión entre en el citoplasma de las célula diana y se lleve a cabo la replicación en el citoplasma celular (Aguilar and Lee, 2011). Otro mecanismo de entrada aunque no muy eficiente es por medio de endosomas. La partícula del virus rápidamente entra a las células a través de vesículas cubiertas (endosomas) mediado por clatrin (Hacking and Hull, 2002, Harrison *et al.*, 2010).

El genoma de sentido negativo del virus no puede funcionar directamente como ARNm, primero debe ser transcrito con la ayuda de la ARN polimerasa de la célula hospedera, cuya actividad se lleva a cabo por las proteínas L, P y NP y que es contactado por el promotor localizado en el extremo 3' de la célula. Durante la transcripción primaria, el ARN genómico se transcribe de forma secuencial empezando por el extremo 3' del genoma (Maclachlan *et al.*, 2011, International Committee on Taxonomy of Viruses. and King, 2012). Las glicoproteínas son procesadas durante su paso a través del complejo de Golgi a la membrana plasmática (Harrison *et al.*, 2010). El producto recién sintetizado de proteínas virales y ribonucleoproteínas (RNPs) se ensamblan juntos en las membranas plasmáticas de células infectadas, la concentración de NP regula las actividades de la polimerasa cuando hay un exceso de producción de copias del genoma, luego viene el ensamblaje de la nucleocapside por la proteína M que también se asocia con las glicoproteínas para poder liberar los viriones maduros por gemación y completar el ciclo (Vainionpaa and Hyypia, 1994, Maclachlan *et al.*, 2011, International Committee on Taxonomy of Viruses. and King, 2012, Murphy, 1999).

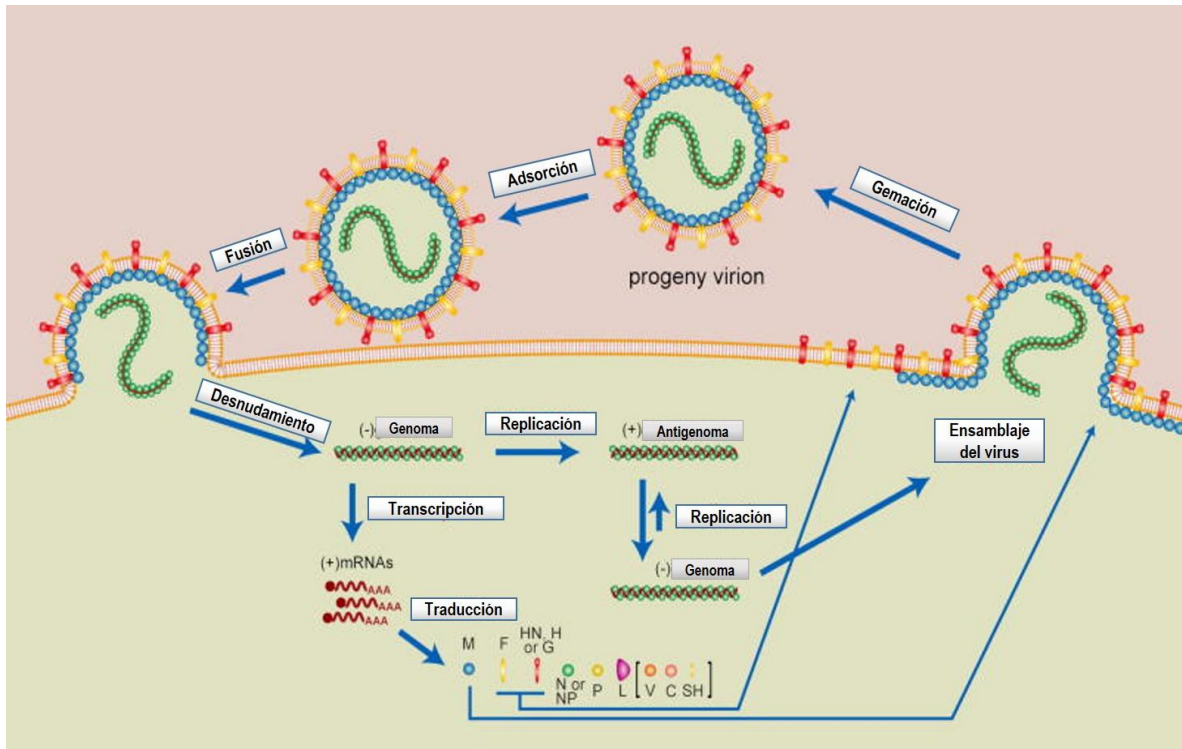


Imagen 1 Replicación de los paramixovirus. Modificado de Harrison, M.S. 2010 [49]

## Patogenia

Se estima que el período de incubación de la enfermedad respiratoria es de cinco a siete días y puede seguir por más días por propagación en el tracto respiratorio inferior. Al comienzo de la enfermedad los virus se replican en la nasofaringe. La principal vía de transmisión es por aerosoles y contacto directo (Heminway *et al.*, 1994, Hall, 2001).

Rinorrea, tos y fiebre de bajo grado son signos comunes de infección de vías respiratorias inferiores. La infección está altamente restringida a las células del epitelio respiratorio (Johnson *et al.*, 2007). Las células ciliadas de los bronquiolos pequeños y los neumocitos tipo 1 en los alvéolos son los tipos celulares que se infectan en las vías respiratorias inferiores. Otras células, incluyendo las no ciliadas y las células dendríticas intraepiteliales (DCs), también se ven infectadas (Schlender *et al.*, 2003).

El mecanismo por el cual el virus se propaga desde el tracto respiratorio superior a las vías respiratorias inferiores no es claro, pero se presume que es a través de difusión directa a lo largo del epitelio respiratorio y / o a través de la aspiración de secreciones nasofaríngeas (Domachowske and Rosenberg, 1999).

VRS y VPI3 pueden propagarse de célula a célula, sin emerger al medio extracelular, esto lo logra al inducir la fusión celular y formación de sincitios. Otro mecanismo para la propagación de VRS o VPI3 en el tracto respiratorio inferior es a través de la infección de macrófagos, así se da la migración a las vías respiratorias inferiores. En los animales jóvenes o en los bebés en el caso del humano, los signos del tracto respiratorio inferior, como taquipnea, sibilancias, o estertores, suelen aparecer de uno a tres días después de la aparición de rinorrea, esto indica la propagación viral hacia los bronquios y bronquiolos. Durante la bronquiolitis, las células epiteliales ciliadas son destruidas, y hay necrosis generalizada en el epitelio bronquiolar. Los títulos virales son mucho más abundantes en la neumonía fatal que en bronquiolitis fatal, lo que sugiere que la replicación del virus continúa a medida que progresa la insuficiencia respiratoria (Easton *et al.*, 2004). La recuperación clínica de la bronquiolitis por VRS o VPI3 puede ocurrir aun en presencia de virus, pero se ha demostrado que la eliminación del virus es resultado de la producción de la inmunoglobulina secretora específica A (IgA). (Domachowske and Rosenberg, 1999) que es el mediador humoral primario de la resistencia en el tracto respiratorio superior (Simoes, 1999).

En su forma más severa, la enfermedad del tracto respiratorio inferior implica infiltrados de células mononucleares peribronquiolares acompañadas por edema submucoso y broncorrea. Esto conduce a la obstrucción bronquiolar con atelectasia y zonas de enfisema compensatorio desigual, la neumonitis ocurre porque los alvéolos se llenan de fluido. La bronquiolitis grave puede llevar a una insuficiencia respiratoria aguda asociada con broncoespasmo moderado a severo, hipoxia severa, y la retención de dióxido de carbono (Domachowske and Rosenberg, 1999).

En los casos más leves de bronquiolitis, la infección afecta principalmente las vías respiratorias inferiores, con diversos grados de inflamación peribronquial e intersticial, se induce estasis ciliar completa de forma rápida y esto puede predisponer al empeoramiento de los síntomas obstructivos. En el caso del VRS, la formación de grandes sincitios y su desprendimiento en el lumen exacerban el proceso obstructivo de las vías respiratorias (Schomacker *et al.*, 2012b, Domachowske and Rosenberg, 1999, Easton *et al.*, 2004, Simoes, 1999).

## **Inmunología**

La respuesta inmune a la infección por paramixovirus se compone de una respuesta innata y después, por la activación de la inmunidad específica humoral y celular. La inmunidad innata al VRS o a PI3 comienza en las células epiteliales del tracto respiratorio, son la primera defensa en la respuesta inmune innata al virus (Domachowske and Rosenberg, 1999).

### Inmunidad innata

Las células epiteliales de las vías respiratorias además de ser la célula blanco al inicio de la infección por VRS o VPI3 son también la primera defensa en la respuesta inmune innata a los virus. Producen opsoninas, colectinas y secretan una variedad de citocinas como moléculas de adhesión intracelular ICAM-1 interleucina IL8 (CXCL8) y RANTES (regulador para las activaciones normales de células T expresadas y secretadas), para atraer neutrófilos, linfocitos T CD4 (T cooperadores) y eosinófilos (Hacking and Hull, 2002).

Los macrófagos alveolares juegan un papel importante en la defensa inmune innata, regulan la respuesta inmune y liberan citocinas inflamatorias cuando están infectados. En respuesta a las citocinas, se produce una infiltración de células inflamatorias, predominantemente neutrófilos, además de eosinófilos, basófilos y linfocitos B hacia las vías respiratorias (Domachowske and Rosenberg, 1999).

Éstos liberan mediadores inflamatorios, como histamina, leucotrienos e inmunoglobulina E (IgE), favorecen el desarrollo de broncoconstricción e

hiperreactividad bronquial. Las células dendríticas interactúan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) y producen tempranamente citocinas proinflamatorias y quimiocinas para promover las respuestas inmunitarias adaptativas posteriores como la modulación de la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo T helper 1 (Th1) o T helper 2 (Th2) (Hacking and Hull, 2002).

Otras moléculas de superficie celular como MD2 (proteína soluble que se asocia a dominios extracelulares de TLR4) y CD14 (proteína de recepción del complejo de lipopolisacárido y de la proteína de unión al lipopolisacárido o LBP) están implicados en la estimulación de TLR-4 dependiente (receptor de tipo Toll) y activación de NF-kappaB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) un mecanismo es similar a la activación celular por lipopolisacárido (LPS), que se une al complejo CD14/TLR4 para activar los macrófagos e iniciar la producción de citosinas (Gershwin, 2012).

### Inmunidad adaptativa

- Inmunidad celular

La producción temprana de interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) es la clave para que se presente una respuesta predominante Th1, mientras que una baja producción de INF- $\gamma$  se asocia con una respuesta Th2 predominante con eosinofilia pulmonar persistente (Hacking and Hull, 2002).

Las citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, y TNF (factor de necrosis tumoral) actúan sobre el cerebro para modificar el comportamiento mediando la aparición de la anorexia, fiebre y debilidad. Además son importantes en el reclutamiento de células inflamatorias adicionales. Por ejemplo IL-6 es un mediador importante de la fiebre, ya que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y cambiar la temperatura. Así, la interacción temprana de VRS o VPI3 con las células del sistema inmune innato inician el proceso de la enfermedad (Hoffman *et al.*, 2004).

La mayoría de las citocinas inflamatorias producidas por las vías respiratorias en respuesta a la infecciones experimentales se han detectado en el pulmón o el fluido

BAL (lavado bronco alveolar) de ratones infectados, son de inducción rápida y con picos tempranos, adicionalmente los macrófagos son importantes colaboradores directos o indirectos de la producción de las quimiocinas CCL3 y CCL5 así como TNF $\alpha$ , IL-6 y IFN $\alpha$  e inducen o regulan la expresión de moléculas de adhesión, contribuyendo así a la retención de las células inmunes reclutadas. Además, juegan un papel central en la activación de las células efectoras (Borchers *et al.*, 2013) y se ha encontrado una asociación positiva entre los niveles de TNF y la carga viral de BAL, mientras que las concentraciones de IL-6 están correlacionadas con la carga viral y la gravedad de la enfermedad (Henrickson, 2003, Gershwin, 2012, Borchers *et al.*, 2013, Hoffman *et al.*, 2004).

- Inmunidad humoral

La respuesta inmune humoral no altera el curso de una infección primaria una vez que se ha producido, pero hay evidencia de que la protección contra infecciones subsiguientes es mediada por anticuerpos (Hacking and Hull, 2002).

Los animales jóvenes obtienen anticuerpos maternos al consumir calostro o por vía transplacentaria, y son menos propensos a presentar neumonías graves pero no están exentos de presentar la infección [39] La inmunidad mediada por células, ante una infección primaria por VRS o VPI3 se desarrolla como una respuesta inmune celular dentro de los primeros 7 a 10 días posteriores a la infección (Gershwin, 2012).

La inmunidad humoral es mediada por células B y con respuestas antígeno específicas de células T, diversidad de reconocimiento del antígeno, la memoria, y la tolerancia inmune. La resistencia a la infección por VRS o VPI3 en las vías respiratorias superiores está mediada por la expresión transitoria y local de inmunoglobulinas como IgA secretora, pero la resistencia más duradera es la humoral que se asocia con IgM e IgG. La mayoría de la respuesta de anticuerpos parecen ser IgG1, los adultos tienen aumentos en IgG3 (la más eficiente como activador del complemento), IgG4 e IgA sérica (Henrickson, 2003, Gershwin, 2012).



Después de la infección con el virus, las células T CD4+ (cooperadores), CD8+ (citotóxicos) son estimulados. Las células TCD4+ se activan al reconocer péptidos derivados del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII) asociados a las células presentadoras de antígeno (Valarcher and Taylor, 2007).

Las células Th2 producen interleucina (IL)-4 que promueve la proliferación y diferenciación de Th2 e IL-13 y se considera que promueven la respuesta de células B, mientras que las células Th1 producen interferón (IFN)- $\gamma$  que promueve la diferenciación de IgG e IL-2 para promover la síntesis de citosinas (Henrickson, 2003, Hacking and Hull, 2002, Braciale, 2005).

Tras la infección con los virus los linfocitos se activan en los órganos linfoides secundarios (ganglio linfático, bazo) y se reclutan al sitio de infección. La actividad lítica de linfocitos CD8 sobre las células infectadas está mediada por la liberación de perforina y granzimas. Las perforinas permeabilizan la membrana de las células infectadas y las granzimas entran en la célula e inducen la apoptosis. Los linfocitos T citotóxicos también inducen la apoptosis de las células infectadas a través de interacciones de Fas/FasL, y reconocen las proteínas virales N, SH, F, M, M2 y NS2 pero no la proteína G, este fallo al reconocimiento de la proteína para inducir una respuesta de más linfocitos y es un factor significativo en la patogénesis de la enfermedad (Hacking and Hull, 2002).

## **Diagnóstico**

En el diagnóstico de las enfermedades respiratorias es muy importante su identificación virológica, es una herramienta primordial en el manejo del paciente y en el control de nuevos brotes (Maclachlan *et al.*, 2011). Este diagnóstico puede adoptar una doble estrategia:

- El diagnóstico directo. Existen varias estrategias que permiten recuperar virus mediante su aislamiento en cultivo celular o las que permiten detectar la presencia del virus en las secreciones respiratorias de los animales enfermos detectando antígenos y ácidos nucleicos virales.

- El diagnóstico indirecto. Evalúa la presentación de una respuesta inmunitaria de tipo humoral a través de la detección de anticuerpos específicos en suero.

La detección de antígenos y ácidos nucleicos permite la realización de un diagnóstico rápido y preciso que ayudará a la toma de decisiones terapéuticas oportunas. Por otro lado, el aislamiento en cultivo celular es un diagnóstico lento y tardío en la historia natural de la infección, pero de gran importancia porque la caracterización permite realizar estudios epidemiológicos, antigénicos y filogenéticos con el objetivo de prevenir y controlar la circulación de estos virus, a través del desarrollo de vacunas (Casas F. I., 2008, Hughes, 1993).

#### Aislamiento en cultivo celular

Las muestras adecuadas para el aislamiento de VPI3 y VRS son la obtención de hisopos faríngeos y nasales, también se recomienda el lavado nasal. Es importante inocular estas muestras rápido en el cultivo celular ya que debido a los cambios bruscos de temperatura y pH la infectividad de los virus puede decaer (Ausar *et al.*, 2005)

Las líneas celulares donde se ha comprobado su replicación son células primarias de riñón de mono rhesus (MK), cultivos de la línea celular MDBK (células de riñón de bovino) o LLC-MK (línea continua de células de riñón de mono), que manifiestan el efecto citopático característico del virus aunque su presentación es lenta. (Zhu, 2011, Brodersen, 2010, Schomacker *et al.*, 2012b). La tipificación se realiza por inmunofluorescencia (IF), inhibición de la hemoaglutinación utilizando sobrenadante del cultivo celular o por visualización del efecto citopático (Hughes, 1993).

#### Detección de antígenos

La detección de los antígenos se realiza directamente en muestras de órganos afectados por medio de sistemas inmunoenzimáticos como ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) empleando anticuerpos poli y monoclonales dirigidos contra el virus de interés. Se consideran métodos rápidos y económicos

con los que se puede procesar un elevado número de muestras, estos métodos poseen diferentes variaciones de sensibilidad y especificidad (Hughes, 1993, Jehan A.M. Gafer, 2009).

### Detección de ácidos nucleicos

La detección de ácidos nucleicos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la detección de ADN complementario al ARN viral que se produce mediante el uso de la transcriptasa inversa y un cebador de oligonucleótidos, el resultado se amplifica en una PCR tradicional. Pueden producirse hasta 1, 000,000 de copias con alta sensibilidad y especificidad. El producto de la PCR puede ser detectado por electroforesis en gel de agarosa y por el uso de métodos de hibridación de ácidos nucleicos o bien ser utilizados para la secuenciación directa, lo que permite comparaciones exactas de las cepas aisladas (Vainionpaa and Hyypia, 1994, Ellis, 2010).

### Serología

Para este diagnóstico se prefiere el suero en la fase aguda o convaleciente. Las pruebas serológicas como la inhibición de la hemaglutinación (IHA) se utilizan ampliamente para la detección de las respuestas de anticuerpos contra el VPI3 (Hierholzer and Suggs, 1969). Esta técnica puede ser utilizada para determinar la relación antigénica que pudiera existir entre diferentes virus, así como en la identificación y cuantificación de anticuerpos. La interferencia en la unión de la hemoaglutinina (HA) a los receptores presentes en la superficie de los glóbulos rojos por anticuerpos específicos para la HA constituye el principio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (PANAFTOSA-OPS/OMS, 2010).

La neutralización viral se define como la pérdida de la capacidad infectante del virus mediada por anticuerpos séricos específicos contra el virus, esto se debe a la acción de los anticuerpos neutralizantes que están dirigidos contra determinantes antigénicos de cepa o tipo. Esta técnica se utiliza para detectar anticuerpos específicos contra VRS (Murphy, 1999).

También se puede realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA

y cuyo objetivo es la detección de las diferentes clases de inmunoglobulinas (Hughes, 1993).

### **Manejo y prevención de la enfermedad respiratoria en ovinos**

Las consecuencias de las enfermedades respiratorias son la baja ganancia de peso vivo y la mortalidad elevada, esto provoca considerables pérdidas económicas para los productores de ovinos. Las enfermedades respiratorias en el ganado ovino suelen ser favorecidas por las condiciones climáticas adversas y el estrés fisiológico junto con las infecciones virales y bacterianas (Scott, 2011). La propagación de la enfermedad depende de varios factores, puede ser por el aire o transmitirse a través de fómites (forma horizontal), puede existir predisposición a la enfermedad ya sea por exceso o deficiencia nutricional. Por lo anterior la supresión de las causas y los factores por los que la enfermedad se propaga es una parte esencial para el control de la misma (Roger, 2008).

El diagnóstico de la enfermedad respiratoria en los rumiantes se basa generalmente en los hallazgos al momento de realizar el examen físico general, hay signos de inapetencia, fiebre (más de 40,5° C) y/o depresión. La auscultación del tracto respiratorio alto puede demostrar respiración normal o un aumento de la frecuencia respiratoria y del esfuerzo (Scott, 2010). Es importante la recolección de información detallada sobre el grupo de ovinos que se está tratando. En lo posible, la siguiente información debe ser considerada: la situación agrícola, el tamaño, diseño y su elevación sobre el nivel del mar, el clima y el tipo de suelo. En cuanto a los ovinos de la granja es importante tener en cuenta el número, raza, edad y detalles de su nutrición. También es importante cualquier información acerca de otras especies en la granja, otros usos de la tierra o de las instalaciones, cuándo y cómo se comercializan los animales y detalles de bioseguridad (Lovatt, 2010).

Existen diversos factores de riesgo que predisponen a los corderos a brotes de enfermedad respiratoria, entre los más importantes se contemplan: infecciones concurrentes que involucran a otros patógenos respiratorios, condiciones de alojamiento (densidad de población, humedad, niveles de amoníaco) cambios

bruscos en las condiciones climáticas, mezcla de animales de múltiples fuentes, estrés por manejo y transporte repetidos (Green, 2010).

### Tratamiento

Una buena respuesta al tratamiento requiere la detección rápida del cordero u ovino enfermo. Generalmente la complicación con bacterias como *Mannheimia haemolytica* o *Mycoplasma* requiere tratamiento con antibióticos que recientemente se utilizan en la enfermedad respiratoria bovina (tilmicosina, florfenicol), y han sido probados para el tratamiento de ovinos. Aún hay pocos datos sobre la eficacia, son costosos y en algunos países la tilmicosina tiene restricciones de seguridad y salud relativas a su administración, aun así hay fármacos antimicrobiano para el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina que también pueden ser eficaces en el tratamiento de la neumonía en el ganado ovino (Amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, dihidrato de oxitetraciclina, clorhidrato de procaína bencilpenicilina) (Duncanson and C.A.B. International., 2013). La administración de AINES (antiinflamatorios no esteroideos) ha demostrado otorgar una mejora más rápida de los síntomas clínicos. La estrategia terapéutica consiste en la combinación de un antibiótico para actuar en contra de los patógenos y un AINE para actuar contra la inflamación y el dolor (Scott, 2011).

### Prevención

La prevención de las enfermedades respiratorias se basa en la comprensión de la etiología de la enfermedad y en los métodos que se pueden aplicar en el rebaño o individuo para la interrupción del desarrollo y la propagación de la enfermedad (Roger, 2008).

La prevención puede conseguirse mediante el uso de herramientas como:

- La vacunación contra enfermedades específicas, por ejemplo, para enfermedades bacterianas como *Mannheimia haemolytica* o *Pasteurella* o *Clostridium*. Los corderos requieren un ciclo de 2 inyecciones con 4 a 6 semanas de diferencia desde las tres semanas de edad, seguido de un refuerzo anual de 4 a 6 semanas antes

del parto. Este régimen de vacunación sólo proporciona inmunidad pasiva a los corderos de hasta 5 semanas después del nacimiento. (Scott, 2011) Las vacunas clostridiales se inactivan y requieren dos dosis espaciadas cuatro a seis semanas. La inmunidad máxima se alcanza 14 días después de la segunda dosis((RUMA), 2006)

Se ha utilizado virus atenuado de Parainfluenza 3 bovina en una vacuna intranasal para ganado bovino y que está antigénicamente relacionado con subtipo ovino pero no parece reducir la incidencia de neumonía, para el Virus respiratorio sincitial no existen reportes de vacunación eficaz (Thonney ML, 2008).

Los corderos, que ingieren suficiente calostro en las primeras 18 horas de vida, están protegidos contra estas enfermedades además de reducir la incidencia de hipotermia. Esta inmunidad pasiva disminuye lentamente a diferentes tasas, existe evidencia de que esta inmunidad pasiva dura por lo menos doce semanas.((RUMA), 2006)

- Una nutrición adecuada de la hembra durante la gestación puede disminuir la incidencia de enfermedades y garantizar el nacimiento de un cordero sano y con tamaño y peso adecuados (Stubbs A., 2009). Las raciones deben ser formuladas de acuerdo a los requerimientos de cada individuo según su etapa productiva y su sistema de producción. La entrega de una ración inadecuada en energía y proteínas puede afectar negativamente a la salud y el rendimiento (Sweiger and Nichols, 2010).
- Las buenas prácticas de manejo ayudan a reducir la incidencia de enfermedades respiratorias en el ganado ovino.

La protección contra condiciones climáticas adversas en los alojamientos y una adecuada ventilación de las instalaciones y control de la densidad de población. (Scott, 2011)

El espacio aéreo no debe ser compartido con ovinos, portadores de los agentes causantes y los corderos comprados deben ser alojados separadamente. (RUMA, 2006)

Las estrategias de mejoramiento planificadas pueden otorgar la facilidad de parto y viabilidad del cordero, lo que reduce las pérdidas por hipotermia y la infección viral o bacteriana. Se debe tratar de reducir al máximo las condiciones que favorecen la propagación de enfermedades y tienen un potencial efecto adverso sobre el bienestar animal (por ejemplo, el hacinamiento, la falta de higiene, los cambios bruscos de temperatura o el alojamiento inadecuado (Roger, 2008).

## **JUSTIFICACIÓN**

En México no existen reportes, en ganado ovino, de la circulación del Virus Respiratorio Sincitial y Virus Parainfluenza 3 y su asociación a factores como la edad y el tipo de sistema de producción.

Estudios serológicos en bovinos en producciones pecuarias de varias regiones del país han evidenciado la presencia de agentes virales causantes de problemas respiratorios como son Virus Respiratorio Sincitial y Virus Parainfluenza 3. Es importante realizar estudios serológicos que evidencien la presencia de estos agentes en pequeños rumiantes para mostrar un panorama claro de la situación serológica en estas especies lo cual ayudará a definir nuevas herramientas de diagnóstico y prevención.



## **HIPÓTESIS**

- Los Virus Respiratorio Sincitial y Virus Parainfluenza tipo 3 circulan en ganado ovino y la respuesta serológica está asociada a los diferentes factores de riesgo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluación de la presencia de anticuerpos de los Virus Respiratorio Sincitial y Virus Parainfluenza 3 en ovinos en dos sistemas de producción.

### **Objetivos específicos:**

- Identificar la presencia de anticuerpos específicos contra los Virus Respiratorio Sincitial y Virus Parainfluenza 3 por etapa productiva en ovinos.
- Determinar la asociación en la presentación serológica de los Virus Respiratorio Sincitial y Virus Parainfluenza 3 con factores como la edad, y sistema de producción.
- Mostrar evidencia molecular de los virus VPI3 y VRS.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Población de estudio*

El trabajo fue aprobado por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la FMVZ-UNAM. Se realizó un estudio observacional y transversal en dos sistemas de producción de ovinos, uno ubicado en el altiplano, el clima de esta zona es semifrío semihúmedo con lluvias en verano y con una precipitación pluvial de 800 a 1200 milímetros anuales y una temperatura promedio de 19° C. La otra producción pertenece al trópico, cuyo clima es cálido húmedo con una temperatura y precipitación media anual de 23.4°C y 1840 mm, respectivamente. Entre julio de 2012 a marzo de 2013 se colectaron 285 muestras de sangre de las cuales 135 corresponden a ovinos del altiplano, y 150 a ovinos de trópico. Las edades de los ovinos para ambos centros van desde un mes hasta ocho años.

Para obtener el tamaño de muestra se utilizó la fórmula para cálculo de tamaño de muestra de Cannon and Roe (Thrusfield, 2007).

$$n = 1.96^2 P_{\text{exp}} (1 - P_{\text{exp}}) / d^2$$

Donde n = tamaño de muestra requerido

$P_{\text{exp}}$  = prevalencia esperada

d = precisión absoluta deseada

Esta fórmula es para el cálculo de tamaño de muestra en poblaciones infinitas o muy grandes. Las producciones que se muestrearon tienen poblaciones de alrededor de 400 individuos, por lo tanto se hizo un ajuste de tamaño de muestra para poblaciones pequeñas ( $n_{\text{adj}}$ ).

$$n_{\text{adj}} = N \times n / N + n$$

Donde  $n$  es el tamaño de la muestra, sobre la base de una población infinita (8,405,902 población total de ovinos en México según datos publicados por SAGARPA 2012 (SIAP-SAGARPA, 2012)) y  $N$  es el tamaño de la población de estudio. La prevalencia considerada fue de 56%, este porcentaje fue el promedio de prevalencias reportadas en ovinos en estudios en otros países (Solis-Calderon *et al.*, 2007, Cabello, 2006, Calderon G, 2011, Rusenova, 2009, Rosadio *et al.*, 1984, Lamontagne *et al.*, 1985).

Los ovinos del altiplano están bajo un sistema de producción intensivo, las razas predominantes son Pelibuey, Suffolk y Rambouillet. El sistema de producción de ovinos del trópico es de tipo extensivo con razas Pelibuey y Katahdin. En ninguno de las producciones se realiza vacunación contra algún agente viral.

### Muestras

#### *Sueros*

Se obtuvieron muestras de sangre por punción directa de la vena yugular con tubos vacutainer sin anticoagulante, las cuales fueron identificadas y transportadas al laboratorio de Virología Molecular de la FMVZ-UNAM, donde fueron obtenidos los sueros por centrifugación a 1500 rpm durante 15 minutos, se conservaron en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### *Secreciones nasales*

Las muestras de secreción nasal fueron colectadas de corderos con hisopos estériles. Se sujetó a los animales con la cabeza ligeramente levantada sin el uso de anestesia. Se insertó un hisopo estéril en la cavidad nasal y se colectó la secreción al frotar el hisopo en la mucosa nasal. Una vez colectado, el hisopo se guardó en crioviales con 1ml de medio esencial mínimo Eagle (MEM), conservados a  $4^{\circ}\text{C}$  para su transporte al laboratorio y posteriormente se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### Virus

Para la prueba de seroneutralización se utilizó una cepa del VRS bovino (ATCC VR-1485 Iowa) Se propagó en cultivo celular de la línea VERO (Ver imágenes 2 Y 3).

Para la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) se utilizó una cepa del VPI3 bovino (ATCC VR-281). Propagado en cultivo celular de la línea MDBK. (Ver imágenes 4 y 5)

### Detección de anticuerpos

Los anticuerpos contra el VRS fueron detectados por seroneutralización según la metodología descrita por Giangaspero, Savini et al. 2013 (Giangaspero *et al.*, 2013) con modificaciones.

El título del VRS fue de  $10^{5.1}$  DICCC/50  $\mu$ L por el método de REED AND MÜNCH (Del Castillo *et al.*, 2010) (ver anexo). Se realizó prueba de seroneutralización a 100 y 300DICCC 50% (Imagen 6). Se utilizaron varios sueros positivos y negativos como referencia (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Títulos de sueros de referencia para la estandarización de la prueba de seroneutralización**

Suero	100 DI	300 DI
Suero hiperinmune bovino	80	40
Conejo	5	0
Ovino	10	0
Bovino	20	0
Perro	10	0

Se obtuvieron monoestratos celulares confluentes de la línea VERO colocando 100  $\mu$ l de una concentración de  $10^5$  células/ ml en placas de 96 pozos con fondo plano en un volumen de 100  $\mu$ l. y se incubaron a 37° C en 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h para obtener un monoestrato celular confluyente. Una vez formado el monoestrato se hicieron diluciones dobles seriadas de los sueros completos iniciando 1:10 y hasta

1:1240 con medio de cultivo sin suero. Una vez finalizadas las diluciones, se colocaron 50 µl del virus con 100 DIC50% en todos los pozos en donde se hizo dilución del suero. Se incubaron los sueros diluidos con el virus durante una hora a temperatura ambiente, después de este tiempo se suplementaron todas las placas con medio adicionado con 2% de suero fetal en todos los pozos de la placa para su mantenimiento. Se colocó la placa en un estufa a 37° C en 5% CO<sub>2</sub> durante 96 h. Se consideró suero positivo con anticuerpos específicos para VRS al suero que tuvo la capacidad de proteger a varios monoestratos celulares, es decir se impide un efecto citopático por el virus.

Se consideró suero negativo aquel suero que al no tener anticuerpos contra la enfermedad de Virus Respiratorio Sincitial, no protegió a los monoestratos y se observó efecto citopático. El título del suero se da con el valor recíproco hasta donde se dio la máxima protección del suero ante el virus.

Para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra VPI3 se realizó la prueba IHA. Las muestras de sangre sin anticoagulante se centrifugaron a 2500rpm por 10 min para obtener el suero. Los sueros fueron tratados con una solución de caolín al 25% para eliminar inhibidores y glóbulos rojos de gallo al 5% para eliminar aglutininas inespecíficas e inactivados con calor a 56°C durante 30 min para la inactivación del complemento.

Se utilizaron eritrocitos de bovino al 0.5% para titular el virus y para realizar la prueba. El título del virus fue de 1:256. La prueba se realizó con placas de fondo en "V" y el virus fue ajustado a 8 UHA (unidades hemoaglutinantes). Se utilizaron varios sueros de referencia (Cuadro 2). Se hicieron diluciones dobles en serie iniciando 1:20 y hasta 1:2480, los títulos de sueros se consideraron positivos cuando el título obtenido fue igual o superior a 1:40 (Lamontagne *et al.*, 1985, Elazhary *et al.*, 1984).

**Cuadro 2 Títulos sueros de referencia positivos y negativos para la estandarización de la prueba de IHA**

SUERO	TÍTULO
SH BOVINO (+)	1280
VACA (+)	160
SFB (+)	1280
PERRO (-)	0
AVE (-)	0
VACA (-)	10

*Detección molecular de ARN viral en muestras de secreción nasal*

*Técnica de RT-PCR*

La detección de ARN viral se realizó en las muestras de secreción nasal contenidas en los hisopos. La extracción del ARN se realizó por la técnica de purificación de ARN viral QIAamp® Viral RNA (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del proveedor. Para la construcción del ADN complementario se utilizó la enzima transcriptasa-reversa One step® (Qyagen) y finalmente para RT-PCR se realizó con el kit QIAGEN OneStep RT-PCR Kit® (catalogo 210212), la reacción de secuencia se optimizó a 12 µl manteniendo el equilibrio entre los reactivos de la siguiente manera:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Buffer 5x	3 µl
DNTP's	0.6 µl
Fw	0.6 µl
Rw	0.6 µl
Inhibidor de RNAsas	0.3 µl
Taq	0.6 µl
Agua libre de RNAsas	3.3 µl
Templado	3 µl

La construcción de los primers se realizó de la siguiente manera:

<b>Cuadro 3. Diseño de oligonucleótidos para BVRS y BPI3 utilizados en la RT-PCR</b>			
<b>Virus</b>	<b>Oligos</b>	<b>Gen</b>	<b>Producto esperado</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Patente en Trámite EXPEDIENTE # Mx/a/2012/012701, Folio # Mx/E/2012/081439</li> </ul>		
BPI3 (PI3 Bovino)	Fw 5'AAAGGAGTAGTTCAGATTCTAGATG Rw ATATAGAGCCAGTTGCGTT	M	199pb
BVRS (VRS bovino)	Fw GTACCAATGTCAACCAAATTCC Rw TTTGCACATCGTAATTGGGTAT	N	245pb

Para las condiciones de amplificación se utilizó un Termociclador Mastercycler gradient eppendorf, bajo el siguiente esquema:

1. cDNA: 50 °C por 30 min
  2. PCR: 95 °C por 15 min
  3. Desnaturalización: 94 °C por 30 s
  4. Alineación 55°C por 30 s
  5. Extension: 72°C por 90 s
  6. Extensión final: 72°C por 10 min
- } 35 ciclos

Una vez obtenido el producto de RT-PCR para identificar que muestras fueron positivas se colocaron 5µl de estas con 2µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 2% en Buffer TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X y se corrió a 89 volts en cámara de electroforesis horizontal durante 45 minutos. Una vez terminado el corrimiento, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 10 minutos y se visualizó en un trasiluminador, identificando los amplicones esperados con ayuda de marcadores



de peso molecular de 100 a 1000pb. El tamaño del fragmento esperado para BVRS es de 245 bp y de 199 bp para BPI3.

### Análisis estadístico

Se colectaron los datos de sistema de producción de los animales de cada centro. La información recolectada se analizó mediante tablas de contingencia para determinar la asociación de la seropositividad a VPI3 y BVRS en los ovinos con factores predisponentes como edad, (>1 año, <1 año) y sistema de producción (extensivo CEIEGT, intensivo CEIPSA).

Se realizaron pruebas de independencia para establecer si existe asociación entre la seropositividad y la pertenencia a un centro de producción. Se utilizó el estadístico de Chi cuadrada. En todos los análisis se empleó el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.)

## RESULTADOS

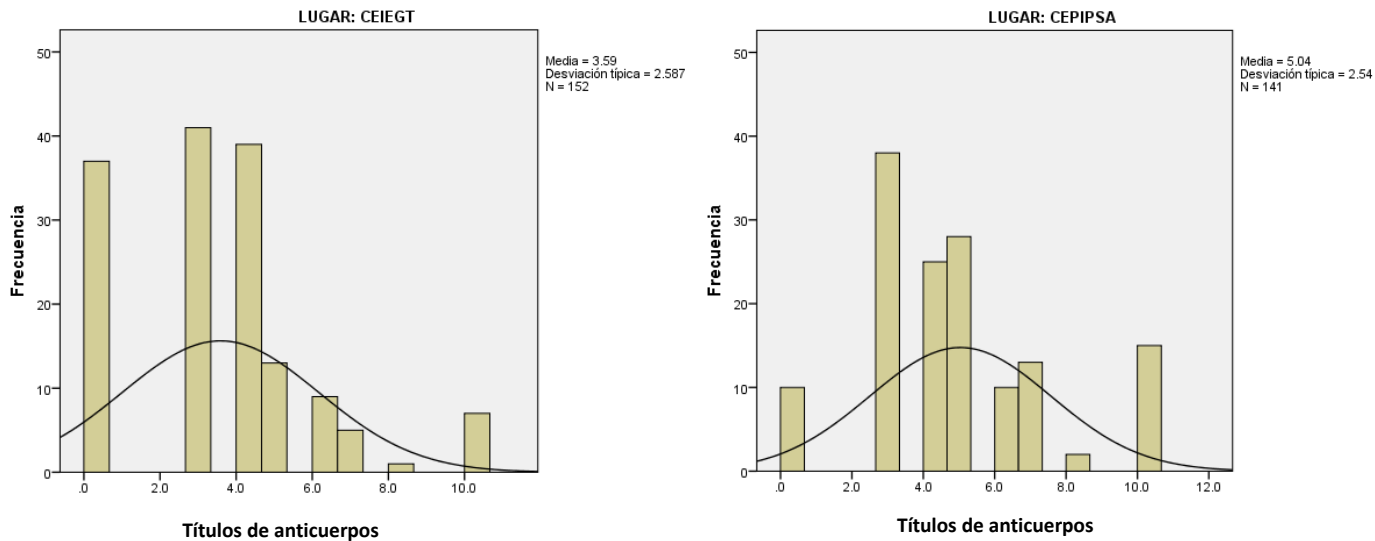
De 293 ovinos en el estudio 204 (69.6%) eran mayores a 1 año y 89 (30.4%) eran corderos. Del total de ovinos adultos 105 (51.4%) pertenecían al trópico (CEIEGT, sistema extensivo) y 99 (48.6%) al altiplano (CEPIPSA, sistema intensivo). La edad promedio fue de 3.6 años ( $\pm 2.8$ ) en el trópico y de 2.4 ( $\pm .75$ ) en el altiplano.

## VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL

Al analizar los títulos de anticuerpos en corderos y ovinos adultos (Cuadro 4 y Figura 1) se encontró que para el CEIEGT y CEPIPSA hubo títulos de anticuerpos desde 1:10 hasta 1:1280 siendo la mayor frecuencia de títulos de anticuerpos se encontró entre 1:10 (27%) y 1:20 (25.7%), para el caso del CEIEGT, y de 1:10 (27%) y 1:40 (19.9%) para el CEPIPSA.

**Cuadro 4. Frecuencia del título de anticuerpos contra BVR5 en ovinos adultos y corderos por centro de producción**

TÍTULO	CEIEGT n=151	CEPIPSA n=142
0	(37) 24.3%	(10) 7.1%
10	(41) 27%	(38) 27%
20	(39) 25.7%	(25) 17.7%
40	(13) 8.6%	(28) 19.9%
80	(9) 5.9%	(10) 7.1%
160	(5) 3.3%	(13) 9.2%
320	(1) .7%	(2) 1.4%
640	0	0
1280	(7) 4.6%	(15) 10.6%

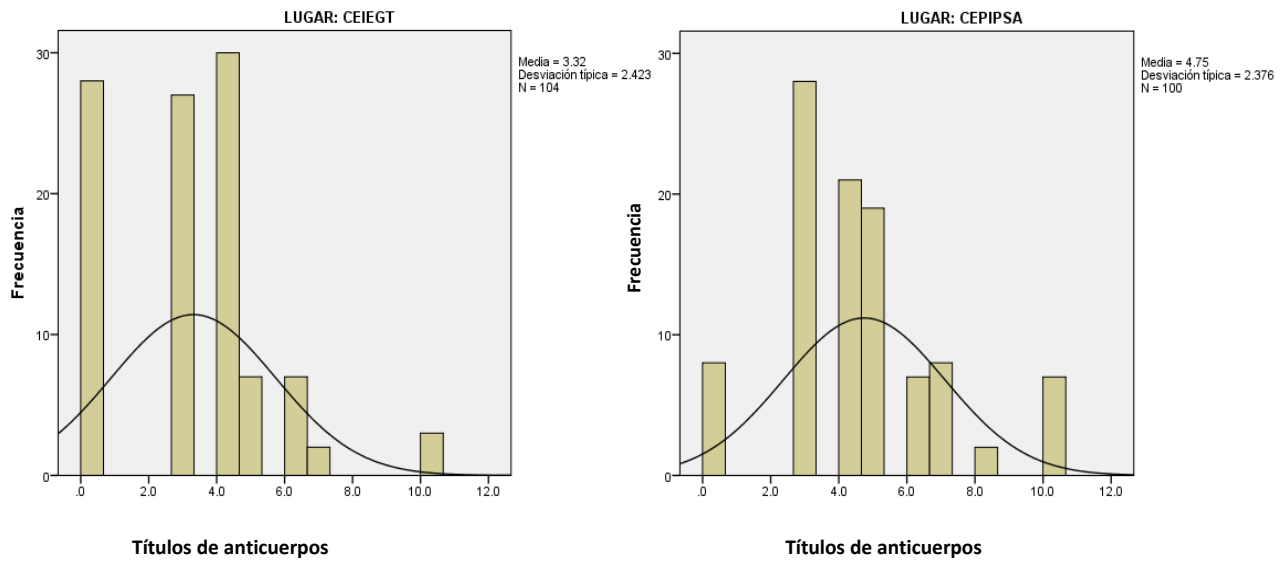


**Figura 1. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra BVR5 en ovinos adultos y corderos por centro de producción**

En el análisis por separado de ovinos adultos y corderos (Cuadro 5 y Figura 2), se observa que en ovinos adultos hubo títulos de anticuerpos desde 1:10 hasta 1:1280, la mayor frecuencia de títulos de anticuerpos se encontró ente 1:10 (26%) y 1:20 (28.8%), para el caso del CEIEGT, y de 1:10 (28%) y 1:20 (21%) para el CEIPSA.

**Cuadro 5. Frecuencia del título de anticuerpos contra BVR5 en ovinos adultos por centro de producción**

TÍTULO	CEIEGT n=105	CEIPSA n=99
0	(28) 26.9%	(8) 8%
10	(27) 26%	(28) 28%
20	(30) 28.8%	(21) 21%
40	(7) 6.7%	(19) 19%
80	(7) 6.7%	(7) 7%
160	(2) 1.9%	(8) 8%
320	0	(2) 2%
640	0	0
1280	(3) 2.9%	(7) 7%

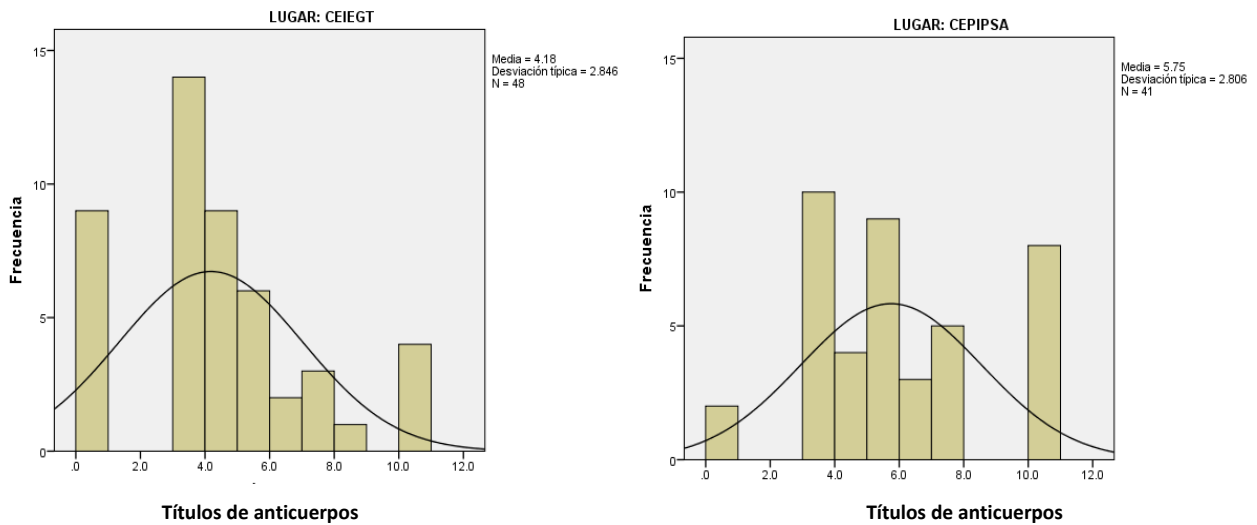


**Figura 2. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra BVRs en ovinos adultos por centro de producción**

En corderos (Cuadro 6, Figura 3) hubo títulos de anticuerpos desde 1:10 hasta 1:1280, la mayor frecuencia se encontró entre 1:10 (29.2%) y 1:20 (18.8%), para el caso del CEIEGT, y de 1:10 (24.4%) y 1:40 (22%) para el CEPIPSA.

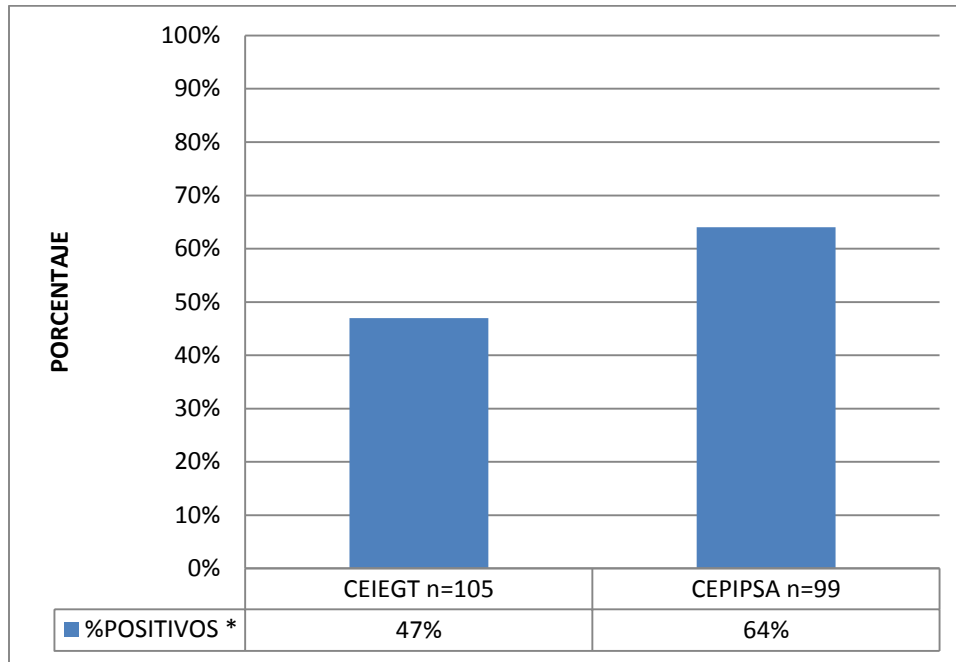
**Cuadro 6. Frecuencia del título de anticuerpos contra BVRs en corderos por centro de producción**

TÍTULO	CEIEGT n=46	CEPIPSA n=43
0	(9) 18.8%	(2) 4.9%
10	(14) 29.2%	(10) 24.4%
20	(9) 18.8%	(4) 9.8%
40	(6) 12.5%	(9) 22%
80	(2) 4.2%	(3) 7.3%
160	(3) 6.3%	(5) 12.2%
320	(1) 2.1%	0
640	0	0
1280	(4) 8.3%	(8) 19.5%

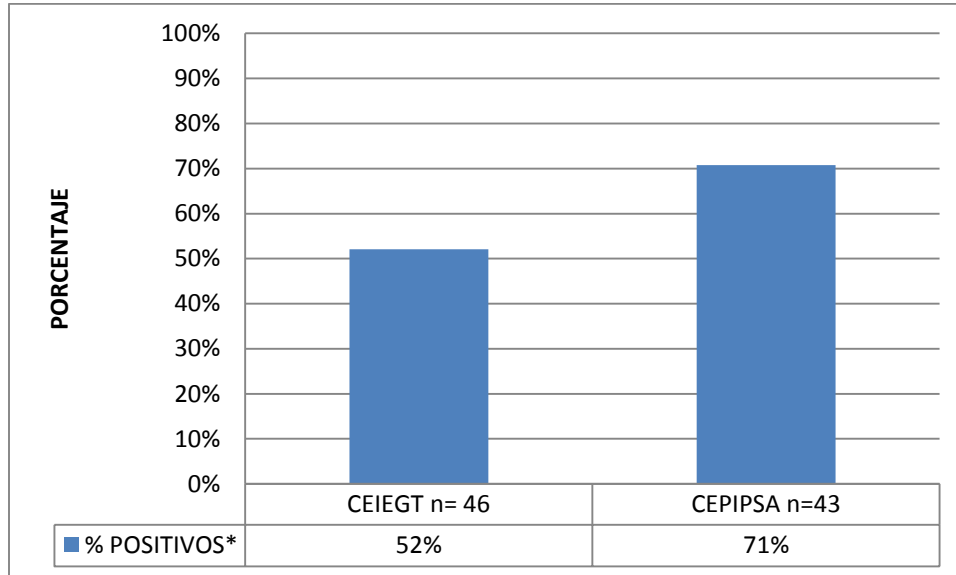


**Figura 3. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra BRS en corderos por centro de producción**

Se estableció un punto de corte de 1:20, es decir todos aquellos animales que presentaron títulos de anticuerpos iguales o mayores a 1:20 fueron considerados positivos. Para establecer este punto de corte se tomó el título de 1:40 que dio el suero de referencia positivo de, y un título de 1:10 el testigo negativo tuvo (Cuadro 2). Del total de ovinos adultos (204) 53% (112) fueron positivos, la seropositividad en ovinos adultos por centro de producción fue de 47 % (49) para el CEIEGT y de 64% (63) para el CEIPSA (Figura 4). Del total de corderos (89) 61% (54) resultaron positivos. La seropositividad en corderos por centro de producción fue de 52 % (25) para el CEIEGT y de 71% (29) para el CEIPSA (Figura 5).

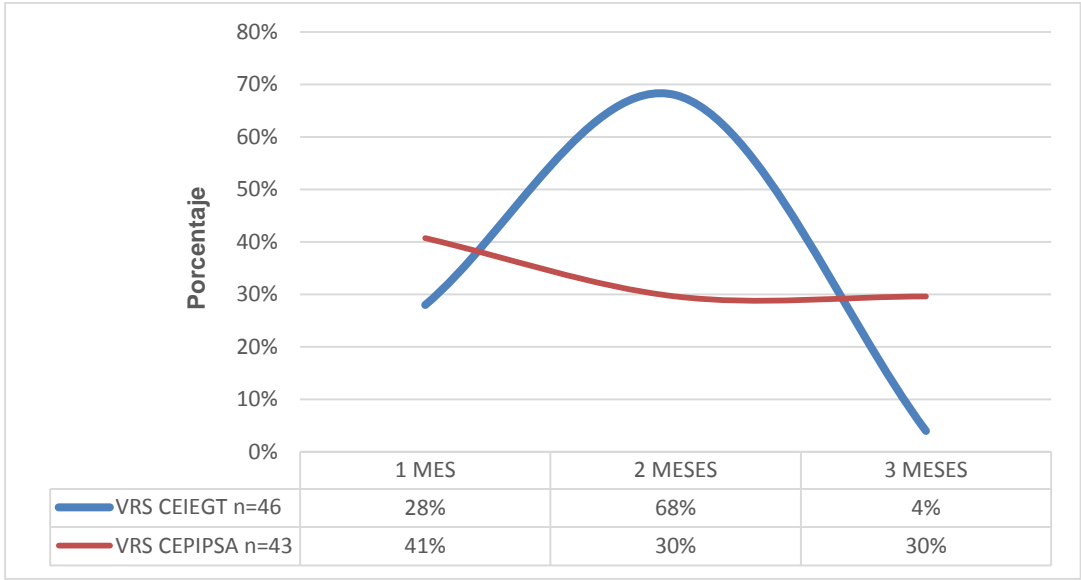


**Figura 4. Porcentaje de seropositividad contra BVRs en ovinos adultos por centro de producción**  
 \*Estadísticamente significativo  $p < 0.05$



**Figura 5. Porcentaje de seropositividad contra VRS en corderos por centro de producción**  
 \*Estadísticamente significativo  $p < 0.05$

El porcentaje de prevalencia de anticuerpos en corderos de acuerdo a la edad está representada en la Figura 6. Para el caso del CEIEGT se observa una curva de anticuerpos que se incrementa en el segundo mes de edad y que decrece al llegar al tercer mes, mientras que para el CEPIPSA la curva de anticuerpos disminuye al llegar al segundo mes de edad y se mantiene baja en el tercero.



**Figura 6. Porcentaje de seropositividad a BVRs en corderos por edades en los dos centros.**

Para establecer si existe asociación entre la seropositividad y la pertenencia a un centro de producción, se realizó una prueba de independencia con el estadístico de CHI cuadrada (Cuadro 7) y se encontró significancia estadística ( $P=0.003$ ) ( $OR=2.042$ ; intervalo de confianza 95% = 1.247, 3.273). Se observa que existe un riesgo 2.042 veces mayor de presentar anticuerpos en ovinos del centro de producción CEIEGT. No se encontró significancia estadística para la asociación de edad y presencia de anticuerpos contra VRS.

Ha: la presencia de anticuerpos depende del centro de producción.

Ho: la presencia de anticuerpos no depende del centro de producción.

**Cuadro 7. Asociación entre la seropositividad en ovinos contra BVRS y el centro de producción**

Variable	Categoría	N. de ovinos seropositivos	N. de ovinos seronegativos	Valor de P
Centro de producción	CEIEGT	74	78	0.003*
	CEPIPSA	93	48	

**\*Estadísticamente significativo  $p < 0.05$**

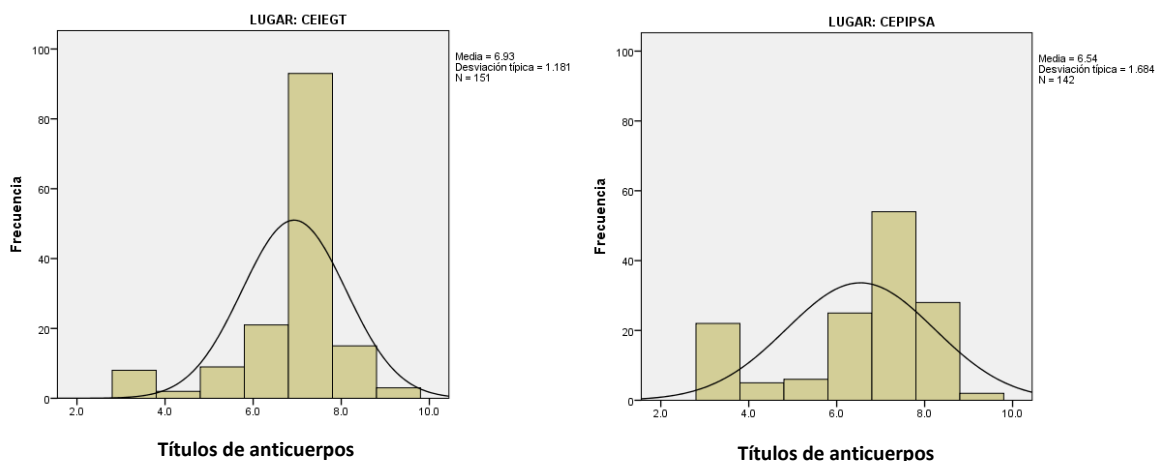
### Virus Parainfluenza 3

Al analizar los títulos de anticuerpos por centro de producción los corderos y ovinos adultos (Cuadro 8, Figura 7) tenían títulos de anticuerpos desde 1:20 hasta 1:640, la mayor frecuencia de estos se encontró entre 1:80 (13.9%) y 1:160 (61.6%), para el caso del CEIEGT y de 1:160 (38%) y 1:320 (19.7%) para el CEPIPSA.

**Cuadro 8. Frecuencia del título de anticuerpos contra VPI3 en ovinos adultos y corderos por centro de producción**

TÍTULO	CEIEGT n=151	CEPIPSA n=142
0	5.3%(8)	15.5%(2)
20	1.3%(2)	3.5%(5)
40	6%(9)	4.2%(6)
80	13.9%(21)	17.6%(25)
160	61.6%(93)	38%(54)
320	9.9%(15)	19.7%(28)
640	2%(3)	1.4%(2)



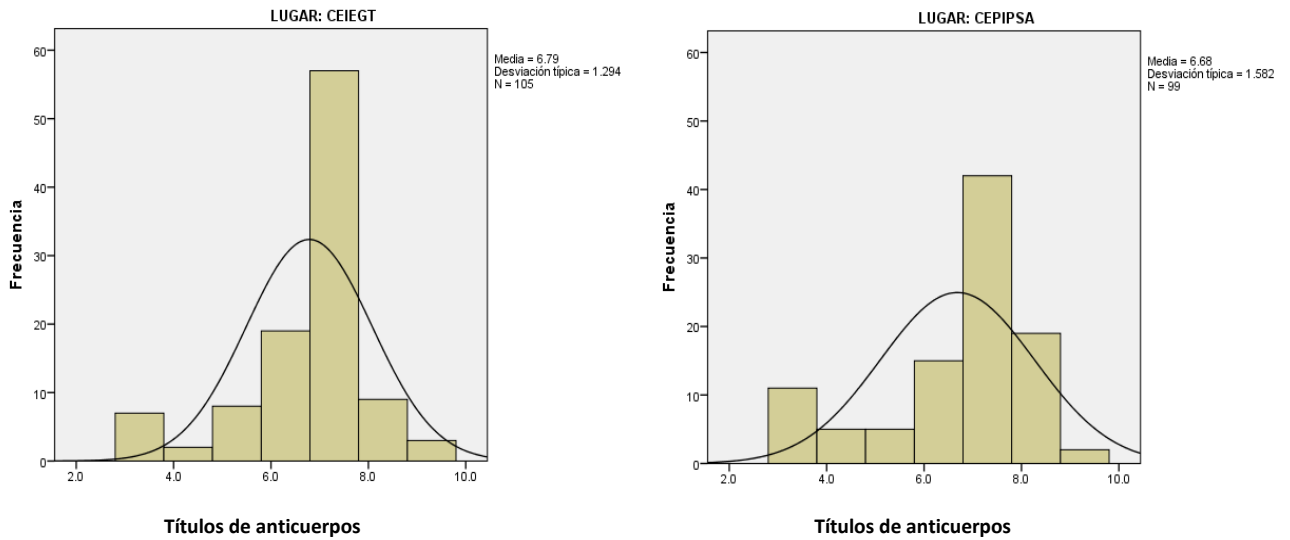


**Figura 7. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra PI3 en ovinos adultos y corderos por centro de producción**

Al hacer el análisis por separado de ovinos adultos y corderos, se observa que en ovinos adultos (Cuadro 9, Figura 8) hubo títulos de anticuerpos desde 1:20 hasta 1:640, con una mayor frecuencia de títulos entre 1:80 (18.1%) y 1:160 (54.3%) para el caso del CEIEGT, y de 1:160 (42.4%) y 1:320 (19.2%) para el CEPIPSA.

**Cuadro 9. Frecuencia del título de anticuerpos contra VPI3 en ovinos adultos por centro de producción**

TÍTULO	CEIEGT n=105	CEPIPSA n=99
0	6.7%(7)	11.1%(11)
20	1.9%(2)	5.1%(5)
40	7.6%(8)	5.1%(5)
80	18.1%(19)	15.2%(15)
160	54.3%(57)	42.4%(42)
320	8.6%(9)	19.2%(19)
640	2.9%(3)	2%(2)

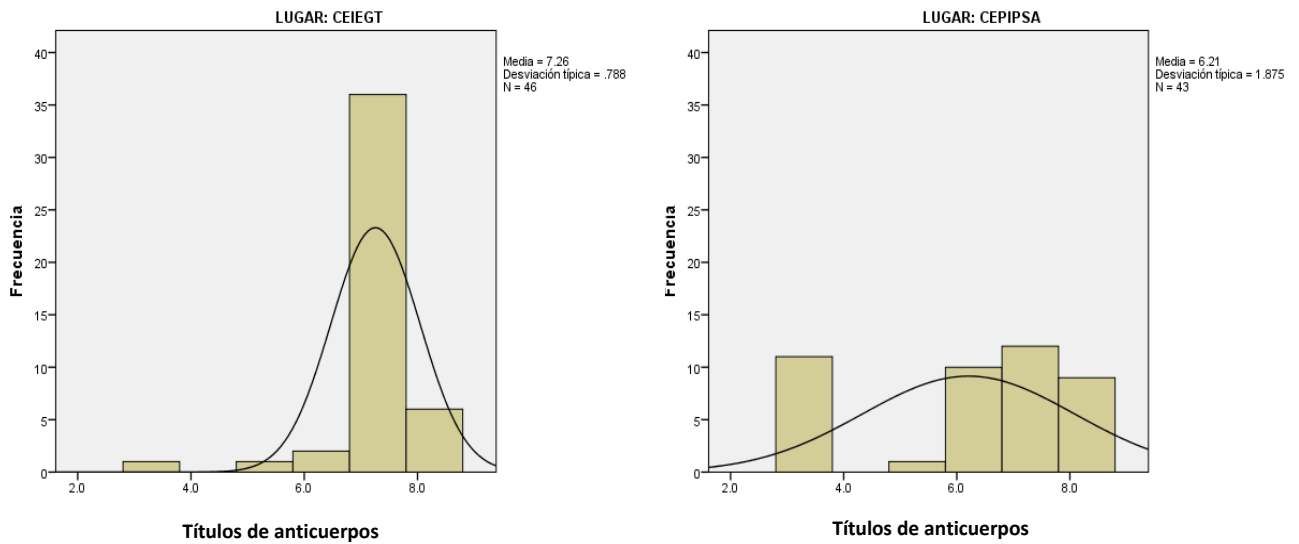


**Figura 8. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra PI3 en ovinos adultos por centro de producción**

En corderos (Cuadro 10, Figura 9) hubo títulos de anticuerpos desde 1:40 hasta 1:320, con mayor frecuencia entre 1:160 (78.3%) y 1:320 (13%) para el caso del CEIEGT, y de 1:80 (23.3%) y 1:160 (27.9%) para el CEIPSA.

**Cuadro 10. Frecuencia del título de anticuerpos contra VPI3 en corderos por centro de producción**

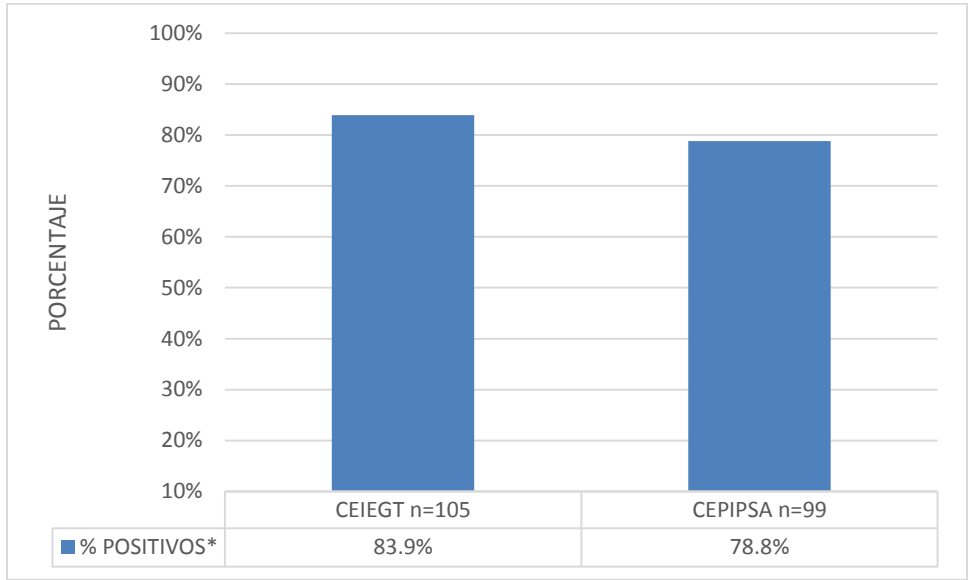
TÍTULO	CEIEGT n=46	CEIPSA n=43
0	2.2%(1)	25.6%(11)
20	0	0
40	2.2%(1)	2.3%(1)
80	4.3%(2)	23.3%(10)
160	78.3%(36)	27.9%(12)
320	13%(6)	20.9%(9)



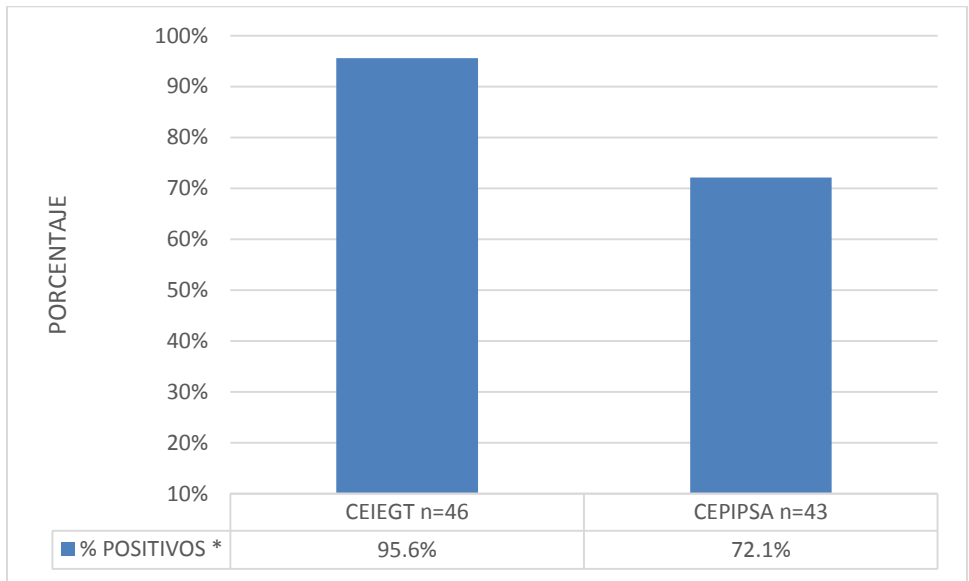
**Figura 9. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra VPI3 en corderos por centro de producción**

Se estableció un punto de corte de 1:80, es decir todos aquellos animales que presentaron títulos de anticuerpos iguales o mayores a 1:80 fueron considerados positivos. Este valor se estableció tomando en cuenta el título de 1:160 que se obtuvo del suero de referencia positivo de bovino.

Del total de ovinos adultos (204) 81.4% (166) fueron positivos. Esta seropositividad por centro de producción fue de 78.8 % (78) para el CEIEGT y de 83.9% (88) para el CEIPSA. (Figura 10) Del total de corderos (89) 84.3% (75) resultaron positivos. La seropositividad en corderos por centro de producción fue de 95.6 % (44) para el CEIEGT y de 72.1% (31) para el CEIPSA. (Figura 11)

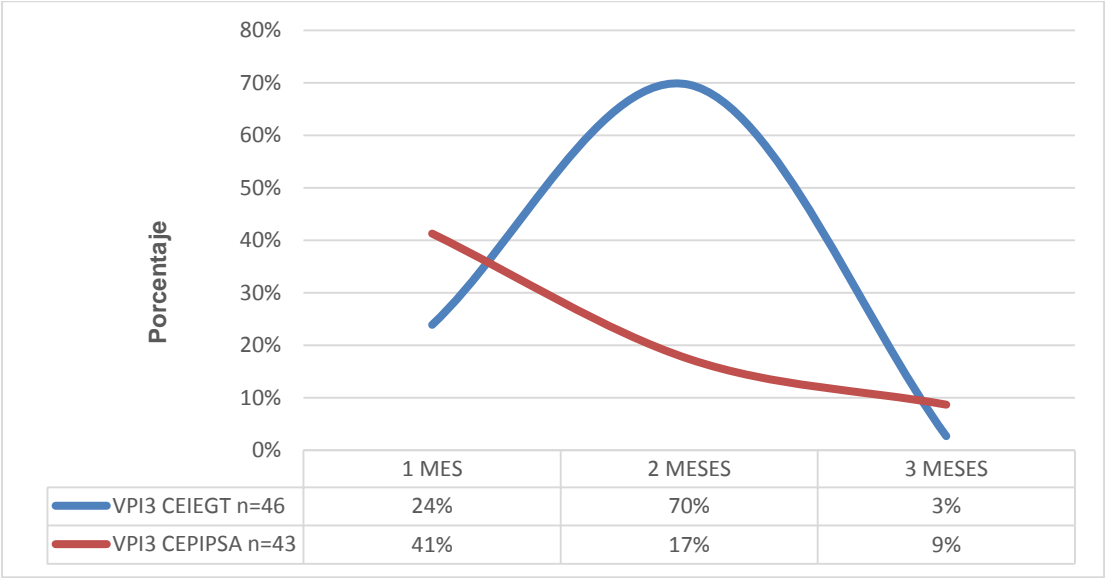


**Figura 10. Porcentaje de seropositividad contra VPI3 en ovinos adultos por centro de producción**  
 \*Estadísticamente significativo  $p < 0.05$



**Figura 11. Porcentaje de seropositividad contra VPI3 en corderos por centro de producción**  
 \*Estadísticamente significativo  $p < 0.05$

La seropositividad en corderos de los dos centros de producción está representada en la Figura 12, en la que se puede observar el porcentaje de prevalencia de anticuerpos contra VPI3 en corderos de acuerdo con la edad, para el caso del CEIEGT se observa una curva de anticuerpos que se incrementa en el segundo mes de edad y que decrece al llegar al tercer mes, mientras que para el CEPIPSA la curva de anticuerpos disminuye al llegar al segundo mes de edad y sigue disminuyendo en el tercero.



**Figura 12. Porcentaje de seropositividad a VPI3 en corderos por edades en los dos centros de producción**

Para establecer si existe asociación entre la seropositividad y la pertenencia a un centro de producción, se realizó una prueba de independencia con el estadístico de CHI cuadrada (Cuadro 11). Se encontró significancia estadística ( $P=0.017$ ) ( $OR=0.475$ ; intervalo de confianza 95% = 0.256, 0.883). Se observa que existe un riesgo 0.475 veces mayor de presentar anticuerpos contra VPI3 en ovinos del centro de producción CEIEGT. No se encontró significancia estadística para la asociación de edad y presencia de anticuerpos contra VPI3.

Ha: la presencia de anticuerpos depende del centro de producción.

Ho: la presencia de anticuerpos no depende del centro de producción.

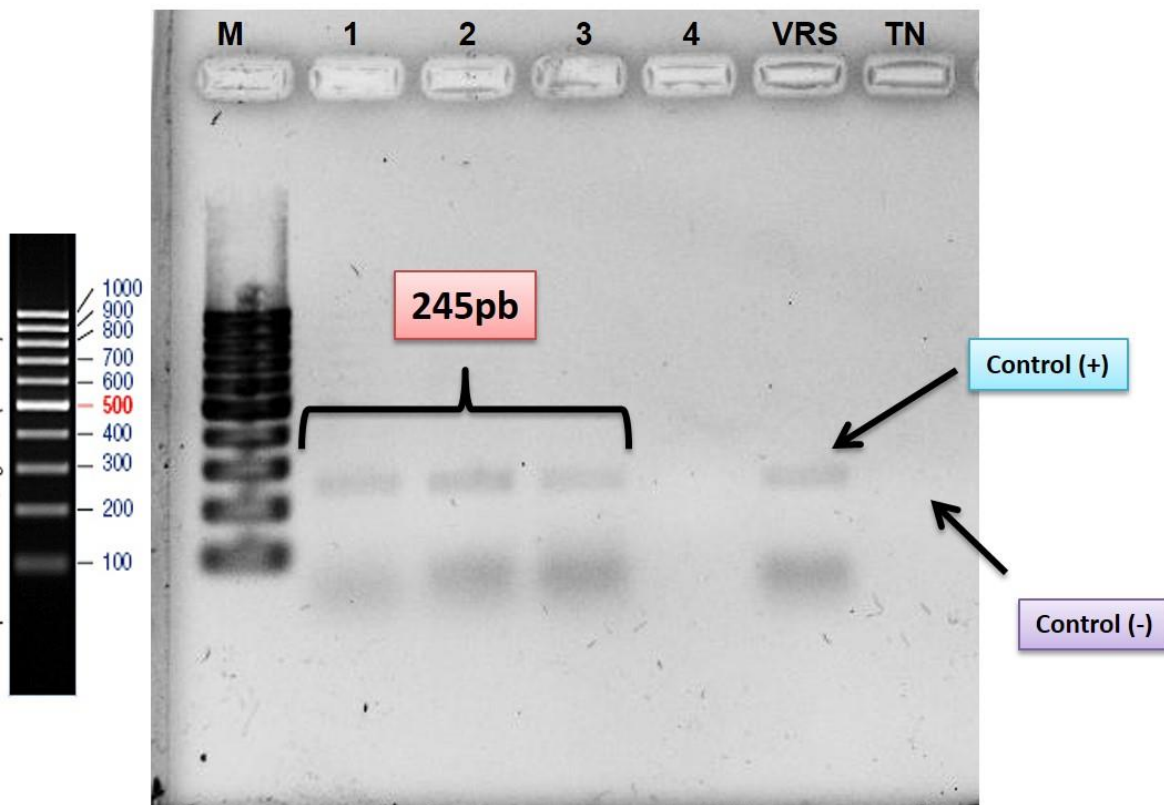
**Cuadro 11. Asociación entre la seropositividad en ovinos contra VPI3 y el centro de producción.**

Variable	Categoría	N. de ovinos seropositivos	N. de ovinos seronegativos	Valor de P
Centro de producción	CEIEGT	132	19	0.017*
	CEPIPSA	109	33	

\*Estadísticamente significativo  $p < 0.05$

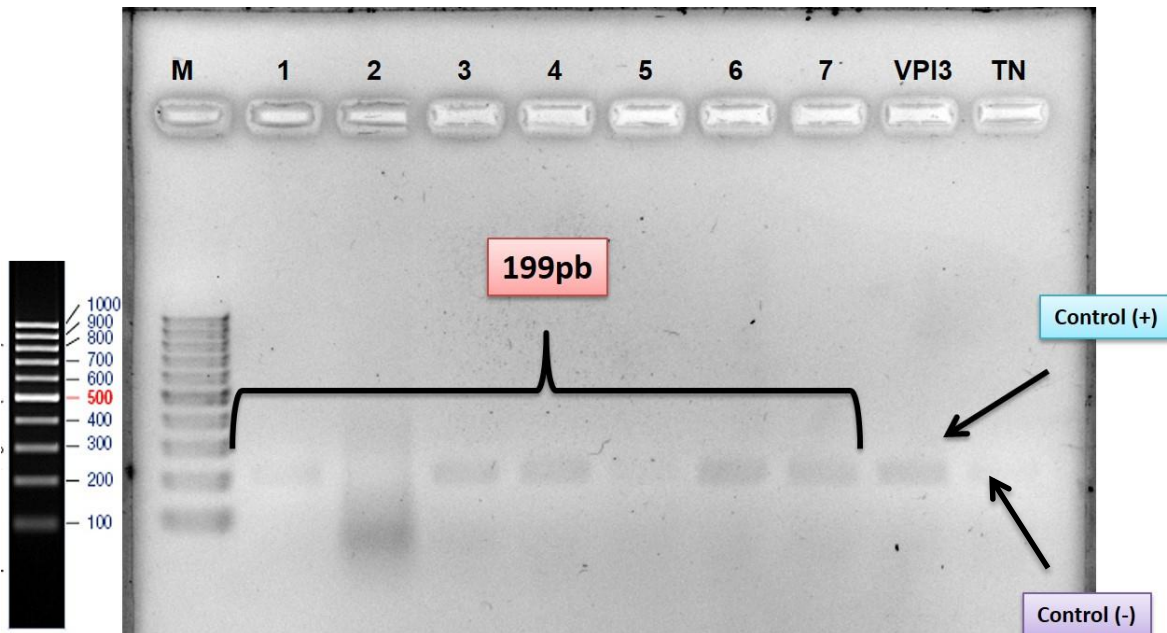
## RT- PCR PARA VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL BOVINO Y VIRUS PARAINFLUENZA 3 BOVINO

Se tuvo un total de 63 hisopos de corderos de entre uno y dos meses de edad, colectados de diciembre 2013 a febrero 2014 originarios de CEPIPSA. Se hicieron 12 “pools” de 5 hisopos cada uno y uno de 3 hisopos dando un total de 13 pools. Para el VRS de 13 muestras, cinco (38.4%) resultaron positivas, observándose bandas del tamaño esperado de 245 pb (Imagen 7).



**Imagen 7 RT-PCR Virus Respiratorio Sincitial. Gel agarosa 2%**  
Los amplicones obtenidos por RT-PCR (1,2,3,4) fueron analizados en una cámara de electroforesis utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 1000pb (M). Los siguientes controles fueron probados: Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRS) y control negativo (TN)

Para el VPI3 3 de 13 muestras nueve resultaron positivas (69.3%), observándose bandas del tamaño esperado de 199 pb (Imagen 8).



**Imagen 8 RT-PCR Parainfluenza 3. Gel agarosa 2%**

Los amplicones obtenidos por RT-PCR (1,2,3,4,5,6,7) fueron analizados en una cámara de electroforesis utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 1000pb (M). Los siguientes controles fueron probados: Virus de Parainfluenza 3 Bovino (VPI3) y control negativo (TN)



## Discusión

La presencia de virus del complejo respiratorio en pequeños rumiantes ha sido reportada frecuentemente desde hace varios años en diferentes países (Zhu, 2011, Jehan A.M. Gafer, 2009, Blount *et al.*, 1956, Rosenquist, 1974, Reisinger *et al.*, 1959, Nettleton *et al.*, 2003). También Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra VRS y VPI3 en ovinos desde los años 50's y hasta la actualidad, principalmente en América, África, Europa y Asia (Jehan A.M. Gafer, 2009, Rusenova, 2009, Giangaspero *et al.*, 2013, Hore, 1969, Adair *et al.*, 1984).

En México se han realizado diversos estudios que demuestran la presencia de anticuerpos contra estos virus en bovinos con prevalencias que van del 50% al 90% (Solis-Calderon *et al.*, 2007, Figueroa-Chavez *et al.*, 2012), lo que indica que estos virus están ampliamente distribuidos en el país. Sin embargo no se ha informado de esto en pequeños rumiantes.

Los resultados obtenidos en este estudio mediante la detección de anticuerpos, demuestran la circulación de VRS y VPI3 en ovinos de México lo cual implica que hay seroconversión contra estos virus. La seropositividad contra VRS de 53% en los ovinos es similar a lo que se ha reportado recientemente en bovinos de Colima, México con prevalencia de 60.8% (Figueroa-Chavez *et al.*, 2012) y parecido al 49.3% de prevalencia que se reportó en 2006 en ovinos de Perú (Cabello, 2006). Recientemente en el 2013 un estudio realizado en Japón evidenció una seropositividad en ovinos de 8.69% (Giangaspero *et al.*, 2013) muy por debajo de lo que se encontró en este estudio. Para VPI3 la seropositividad de 81.4% en los ovinos se asemeja a la reportada en bovinos de Yucatán, México con un 88% (Solis-Calderon *et al.*, 2007) y al 82% reportado en ovinos de Brasil en el 2010 (Calderon G, 2011), pero muy diferente a Japón donde un estudio reciente en ovinos mostró una prevalencia de 11.73% (Giangaspero *et al.*, 2013).

Estos datos demuestran la presencia de VRS y VPI3 en ovinos de México. Los anticuerpos detectados indican que la exposición a estos agentes es común y tienen

una amplia distribución. La respuesta serológica refleja una infección natural ya que la vacunación de los ovinos contra VRS y VPI3 no se lleva a cabo.

La seroprevalencia contra VRS en ovinos adultos del trópico fue de 47%, que es muy similar a lo reportado en ovinos de Italia en el 2000 con un 42% (Gaffuri *et al.*, 2006) y en ovinos en un sistema de rebaños mixtos de Perú con un 49.3% (Cabello, 2006) sin embargo en un estudio anterior en ovinos de la República Árabe Siria reportó una prevalencia mayor de 63.6% (Gaffuri *et al.*, 2006). Todos estos reportes son de ovinos que están bajo un sistema de pastoreo extensivo. La seroprevalencia encontrada en ovinos adultos del altiplano de 64% es alto comparado con los reportes de Italia y Perú, pero se asemeja a los de la República Árabe Siria. En rebaños de ovinos bajo un sistema de producción intensivo no se cuentan con reportes de seroprevalencia pero en el caso de bovinos bajo un sistema de producción intensivo se han reportado prevalencias mayores al 70% (Fulton *et al.*, 2000).

La presencia de anticuerpos contra VPI3 en ovinos adultos del trópico fue de 78.8% esto es alto comparado con el 31% reportado en ovinos de Bulgaria (Rusenova, 2009), o al 49.3% reportado en ovinos del Perú (Cabello, 2006). En ovinos del altiplano la prevalencia de anticuerpos es más alta con un 83.9% y no hay reportes en ganado ovino con prevalencias tan altas, pero sí de prevalencias de 84.4% en ganado bovino de Irán (Shirvani *et al.*, 2012) o de 85.6% en bovinos de Yucatán, México (Solis-Calderon *et al.*, 2007).

Esta diferencia en el porcentaje de anticuerpos en ovinos de ambos centros puede deberse al sistema de producción, ya que de los factores predisponentes a la infección por virus del complejo respiratorio son la convivencia con otros animales como bovinos, confinamiento de los animales (que se presentan más en sistemas de producción intensivos), exposición constante a contaminantes ambientales, cambios bruscos de temperatura y situaciones de estrés (Solis-Calderon *et al.*, 2007, Collins and Graham, 2008, Rahal *et al.*, 2014). Los ovinos del altiplano se manejan bajo un sistema de producción de tipo intensivo donde permanecen en corrales las 24 horas del día y además hay bovinos y caprinos en el mismo centro

de producción, aunque no tienen contacto directo si hay libre paso de personal de un área a otra. Además, se favorece el hacinamiento y el estrecho contacto entre animales enfermos y sanos. En el trópico el sistema de producción es de tipo extensivo donde los animales pastorean y no están sujetos a manejo continuo, además de que no hay otras especies que convivan directamente con los ovinos. Esto pudiera explicar el por qué la seroprevalencia tiende a ser más baja, aunque la gran proporción de humedad que hay en el trópico puede estar favoreciendo la infección por estos virus y por ello se monta una respuesta por parte del animal (Rahal *et al.*, 2014).

En las muestras de sueros de los ovinos del trópico, los títulos de anticuerpos más altos contra VRS fueron de 1:1280. La mayor frecuencia de títulos de anticuerpos se encontró entre 1:10 (27%) y 1:20 (25.7%). En el altiplano el título más alto encontrado también fue de 1:1280 y la mayor frecuencia de anticuerpos se situó entre 1:10 (27%) y 1:40 (19.9%). Estos resultados son mayores a los encontrados en ovinos del Perú donde la mayor frecuencia de títulos de anticuerpos fue de 1:16 a 1:64 (Cabello, 2006), y también son mayores a los encontrados en ovinos de Brasil que van desde 1:2 a 1:64 (Calderon G, 2011).

Para VPI3 en el trópico y en el altiplano los títulos más altos de anticuerpos fueron de 1:640, la mayor frecuencia para ovinos del trópico se encontró entre 1:80 (13.9%) y 1:160 (61.6%), mientras que para el altiplano entre 1:160 (38%) y 1:320 (19.7%). Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios en ovinos bajo sistemas semi-intensivos, donde los títulos de anticuerpos contra VPI3 son superiores a 1:128 (Calderon G, 2011) contrastando con los títulos encontrados menores a 1:80 en ovinos de Perú (Cabello, 2006).

La distribución de los títulos de anticuerpos que van desde 1:10 hasta 1:1280 para el VRS y desde 1:20 hasta 1:160 para VPI3 sugiere que la mayoría de los animales tiene constantes reinfecciones debido a que los virus recirculan continuamente a un nivel bajo o por posible reintroducción de los mismos (Elvander, 1996). Aunque estos títulos son altos, estudios en humanos han revelado que para conferir protección contra la infección contra VRS a nivel pulmonar se necesita un título de

anticuerpos protectores igual o superior a 1:380 mientras que se requieren títulos 10 veces más altos para proteger a nivel de tracto respiratorio superior (Melero and Moore, 2013). La protección efectiva contra VPI3 se ha observado con títulos de anticuerpos protectores iguales o superiores a 1:140 (Brideau *et al.*, 1993).

Aunque los animales demuestran la presencia de anticuerpos, cuando un virus es altamente infeccioso la respuesta inmune primaria no es suficientemente eficaz para prevenir la reinfección, ya que requiere una respuesta amplia a múltiples sitios antigénicos de los virus o a diferentes cepas circulantes (Melero and Moore, 2013, van Wyke Coelingh *et al.*, 1990).

La seroprevalencia de 61% contra VRS encontrada en los corderos es menor a lo que se ha reportado en rebaños de becerros con 83% de seropositividad (Angen *et al.*, 2009) aunque hay otros reportes en becerros de Bélgica donde se informa de prevalencias bajas de 4.3% (Pardon *et al.*, 2011). En corderos sólo existen reportes de infecciones experimentales con VRS y la seroconversión que reportan es del 37% o solo se busca replicar la infección en estos (Sharma and Woldehiwet, 1990, Sharma and Woldehiwet, 1996).

La presencia de anticuerpos contra VPI3 ha sido reportada en becerros de Bélgica con prevalencias de 9.4%, (Pardon *et al.*, 2011) o de 68% en becerros de Texas USA (Fulton *et al.*, 2000). Estas prevalencias son inferiores al 84.3% encontrado en las muestras de corderos de este estudio que constituyen el primer reporte de prevalencias contra estos virus en México.

La prevalencia en corderos para VRS fue diferente entre los centros de producción. Los corderos de trópico (CEIEGT) mostraron una prevalencia de 52% mientras que los corderos de altiplano (CEIPSA) tuvieron un 71%. Los resultados de seropositividad en corderos para VPI3 también fueron distintos entre los centros de producción. Los corderos de trópico (CEIEGT) mostraron una prevalencia de 95.6%, de los corderos de altiplano (CEIPSA) el 72.1%. Estos resultados son mayores a los encontrados en estudios realizados en becerros de engorda de Europa en donde se han reportado seroprevalencias con títulos de anticuerpos que van de 8.4 %

contra BVRS y 21.2% para VPI3 (Pardon *et al.*, 2013) pero similares a los encontrados en becerros de Texas, USA, donde se encontró un 75% de seropositividad contra BVRS y 50% para VPI3 (Gagea *et al.*, 2006) y hasta 77.9% contra BVRS y 68% contra VPI3 en becerros de Ontario (Fulton *et al.*, 2000).

Este es el primer reporte en México sobre la seroprevalencia contra estos virus en ovinos adultos y corderos. Sin embargo, es claro que los corderos en esta etapa productiva donde deben incrementar su tamaño y peso, los animales se están infectando y podrían estar presentando una baja en la producción ya que se ha demostrado que la enfermedad respiratoria en esta etapa productiva puede elevar la mortalidad hasta en un 10%, en el peor de los casos (Nash *et al.*, 1997) u ocasionar bajas ingestas de alimento y a su vez, bajas tasas de producción (Pardon *et al.*, 2013).

Es importante observar que en el sistema de producción de altiplano se observó la prevalencia más alta contra VRS, pero en el caso de los ovinos del trópico la prevalencia más alta fue contra VPI3. La calidad del aire inhalado tiene importantes implicaciones en la salud respiratoria de los animales. El sistema respiratorio de los ovinos es muy adaptable en contra de una gran cantidad de contaminantes del aire, pero la interrupción de los mecanismos de defensa para deshacerse de material inhalado se puede producir si un individuo está expuesto a diversas partículas muy concentradas, entre ellas los virus (Rahal *et al.*, 2014).

En los trópicos, las oscilaciones diurnas de la temperatura son mayores que las fluctuaciones estacionales, los cambios bruscos en la temperatura facilitan que muchos patógenos proliferen por la combinación de la disminución de la temperatura y el aumento de la humedad por la noche, provocando una mayor susceptibilidad en los animales a una infección o reinfección por estos virus (Gould and Higgs, 2009).

En el sistema de producción de altiplano, el clima se caracteriza por ser frío y los animales permanecen en encierro permanente. Se ha demostrado que el estrés por frío, junto con las heladas y la falta de ventilación puede predisponer a los corderos

a enfermedades de las vías respiratorias superiores y los pulmones y que se pueden complicar con otras enfermedades como septicemia por *Escherichia. coli* (Rahal *et al.*, 2014, Kuldeep Dhama, 2013). La exposición a otros animales o el tener muchos animales en el mismo corral es probable que aumente la humedad y el estrés. El estrés y el confinamiento se mencionan como los principales factores que predisponen a la enfermedad respiratoria en los pequeños rumiantes (Martin, 1996).

La presencia de anticuerpos contra VRS y VPI3 desde el primer mes de edad en los corderos, indica los efectos de la inmunidad pasiva. A una edad temprana, en el segundo mes de vida los títulos de anticuerpos se comportan de forma distinta por centro de producción, en el trópico (CEIEGT) se incrementan y es hasta el tercer mes donde estos porcentajes de prevalencia de anticuerpos comienzan a descender, mientras que en los corderos de altiplano (CEPIPSA) los anticuerpos comienzan a descender y se mantienen en ese rango (figuras 7 y 13). Este comportamiento es un indicador de que los corderos están en contacto con VRS Y VPI3 y por lo tanto están desarrollando una respuesta inmune humoral (Keles *et al.*, 1998), que en el caso de VRS hay un ascenso en la curva de anticuerpos y después descende, mientras que los anticuerpos contra VPI3 se mantienen en niveles bajos pero no inexistentes.

Los anticuerpos presentes en suero de los corderos se transfieren desde la madre hasta la cría por ingestión y absorción de calostro. La duración de esta inmunidad pasiva depende de la cantidad de anticuerpos ingeridos y absorbidos. La inmunidad pasiva adquirida puede proporcionar protección contra la enfermedad respiratoria causada por virus del complejo respiratorio (Belknap *et al.*, 1991).

En becerros se ha reportado que la inmunidad pasiva dura 4 a 6 meses, y es hasta la edad de 12 meses que desarrollan una respuesta humoral propia (Valarcher and Taylor, 2007, Ellis, 2010). Aun así hay reportes de la vida media de los anticuerpos maternos contra virus del complejo respiratorio que van desde los 21 hasta los 99 días de edad (Fulton *et al.*, 2004, Baker *et al.*, 1986). El tiempo requerido para que los anticuerpos del calostro este por debajo de las concentraciones detectables depende de la cantidad de anticuerpos que se consumen, se absorben y la tasa de

descomposición. La exposición a infecciones de campo podría afectar a la duración de los anticuerpos y estimular el desarrollo de la respuesta inmune humoral del individuo (Fulton *et al.*, 2004).

Algunos autores han señalado que la enfermedad respiratoria está asociada a diversos factores de riesgo, entre ellos el manejo, tamaño del hato, contacto con otros animales, edad (< a 1 año de edad), estrés, entre otros (Solis-Calderon *et al.*, 2005, Figueroa-Chavez *et al.*, 2012, Norstrom *et al.*, 2000).

En este estudio se encontró que sí existe significancia estadística entre el número de animales seropositivos para VRS y VPI3 en los dos sistemas de producción. Se puede decir que existe un riesgo 2.02 veces mayor de tener anticuerpos contra VRS y .475 veces mayor de presentar anticuerpos contra VPI3 en ovinos bajo un sistema de producción extensivo (CEIEGT), no se encontró significancia estadística entre la edad de los animales y la presencia de anticuerpos.

Saa y Perea (Saa *et al.*, 2012) mencionan que el hecho de que una producción tenga un sistema extensivo tienen un factor de riesgo potencial debido a la probable proximidad a otras producciones vecinas o a la presencia de animales silvestres que pudiesen estar actuando como reservorios de la enfermedad. Por otro lado Norström (Norstrom *et al.*, 2000) menciona que los rebaños que son visitados regularmente por varias personas, como compradores, veterinarios, técnicos o suplentes tienen un mayor riesgo de presentar infecciones respiratorias. El riesgo cada vez mayor del rebaño podría explicarse por un mayor contacto indirecto con otros rebaños debido al frecuente tráfico humano ya que estos centros de producción reciben semanalmente un alto número de estudiantes que van de un centro de producción a otro. Además, de acuerdo con lo que menciona Solís-Calderon (Solis-Calderon *et al.*, 2007) en el trópico los animales están más expuestos a factores climáticos como lluvia y humedad o altas temperaturas durante el día, propiciando estrés. Por otro lado el confinamiento se menciona como uno de los principales factores predisponentes de la enfermedad respiratoria en los rumiantes (Martin, 1996).

No se demostró que existiera relación entre las edades evaluadas y el riesgo de presentar anticuerpos contra estos virus, una posible explicación puede ser que todo el ganado es igual de susceptible a una infección por estos virus debido a que los virus han estado circulando de manera constante sin que se haya presentado algún brote de la enfermedad (Norstrom *et al.*, 2000).

La detección de los antígenos BVRS o BVPI3 se realiza con menos frecuencia en ganado vivo y la mayoría de las veces se prefiere tomar muestra de órganos en la necropsia. El muestreo de secreción nasal se utiliza actualmente para los lactantes humanos y algunas veces ha sido descrito en terneros (Belknap *et al.*, 1995). Se ha demostrado que en becerros jóvenes menores de 3 meses los anticuerpos maternos no previenen la infección de BRSV o VPI3 pero dificultan el diagnóstico serológico (Uttenthal *et al.*, 1996, Crowe, 2001).

Independientemente del agente infeccioso implicado, los signos clínicos de enfermedad respiratoria pueden ser muy similares. No se puede saber con certeza si se trata de un virus o una bacteria. Por otro lado, el aislamiento viral no siempre puede ser exitoso y los métodos alternos de detección como inmunofluorescencia pueden carecer de sensibilidad y especificidad en comparación con métodos de detección molecular (Thonur *et al.*, 2012, Choudhary *et al.*, 2013).

La prueba de RT-PCR para detección de BVRS y VPI3 demostró que en corderos clínicamente sanos a los que se les realizó un muestreo nasal hubo presencia de los virus en una proporción de 38.4% para VRS y 69.3% para VPI3. Todos los resultados de serología indican que los ovinos son susceptibles a la infección por estos virus y los resultados de RT-PCR sugieren que los antígenos identificados son productos de infecciones naturales y posibles re-infecciones (Elvander, 1996, Crowe, 2001). Este es el primer informe acerca de la detección BRSV y BPIV3 en ovinos en México.

Se observa que hay una diferencia de positividad en las muestras, es decir se encontró en mayor proporción VPI3 que de VRS. Es importante mencionar que las muestras no se procesaron inmediatamente después de la toma. Se almacenaron



a -70 °C y de alguna manera esto explica la diferencia entre un antígeno y otro ya que hay estudios que demuestran que VRS es un virus sensible a los cambios de temperatura y almacenamiento, es decir cuanto menor es la temperatura mayor es la supervivencia de virus infeccioso. La congelación y descongelación causan una marcada pérdida de infectividad (Ausar *et al.*, 2005, Hambling, 1964). Aun así la infección por BVRS o BVPI3 en ovinos se puede diagnosticar con precisión y de manera temprana mediante el uso de RT- PCR en muestras de hisopos nasales tomados en la fase aguda de un presunto brote. La técnica de RT-PCR es potencialmente útil basada en la nucleoproteína (N) o en la proteína de matriz (M) que se han descrito como los genes más conservados de los pneumovirus (Vainionpaa and Hyypia, 1994).

## Conclusiones

Los altos niveles de anticuerpos detectados en este estudio indican que los animales fueron expuestos al VRS y VPI3 por una infección natural tanto ovinos adultos como corderos. Estos resultados muestran evidencia serológica de que estos virus se encuentran circulando activamente en ovinos de México.

Este estudio reveló que existe diferencia entre las seroprevalencias de los centros de producción, y que estas prevalencias están asociadas a la pertenencia de los ovinos a un centro de producción. Esto nos permite asumir que lo anterior se podría deber a diferentes factores como clima y condiciones de manejo que están presentes en cada centro de producción.

Los corderos están en contacto con VRS y VPI3, se infectan a una edad temprana con estos virus y son capaces de montar una respuesta inmune.

El análisis estadístico de los datos indica que el sistema de producción de tipo extensivo es un factor de riesgo para la infección con VRS y VPI3 y no se encontró una relación entre la edad y el riesgo de presentar anticuerpos contra estos virus. En este estudio también se logró mediante la utilización de RT-PCR detectar la presencia de VRS y VPI3 en corderos clínicamente sanos. Los resultados de serología indican que los ovinos son susceptibles a la infección por estos virus y en este estudio se confirma por la técnica de RT-PCR la presencia de los virus. Lo cual sugiere la existencia de infecciones naturales y posibles re-infecciones.

Este estudio representa el primer reporte en México sobre la seroprevalencia contra VRS y VPI3 en ovinos adultos y corderos y además es el primer informe acerca de la detección BVRS y BPIV3 en ovinos en México.

## Referencias

- 1) Ruma, T. R. U. O. M. I. a. A. 2006. Responsible use of vaccines and vaccination in sheep production. *In: (RUMA), T. R. U. o. M. i. A. A. (ed.) NOAH Compendium of Data Sheets for Animal Medicines*. UK. Consultada en septiembre de 2014 <http://www.noahcompendium.co.uk>.
- 2) Adair, B. M.;Mcferran, J. B.;Mckillop, E. R. & Mccullough, S. J. (1984). Survey for antibodies to respiratory viruses in two groups of sheep in Northern Ireland. *Vet Rec*, 115, 403-6.
- 3) Aguilar, H. C. & Lee, B. (2011). Emerging paramyxoviruses: molecular mechanisms and antiviral strategies. *Expert Rev Mol Med*, 13, e6.
- 4) Andrejeva, J.; Childs, K. S.; Young, D. F.; Carlos, T. S.; Stock, N.;Goodbourn, S. & Randall, R. E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17264-9.
- 5) Angen, O.;Thomsen, J.;Larsen, L. E.;Larsen, J.;Kokotovic, B.;Heegaard, P. M. & Enemark, J. M. (2009). Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol*, 137, 165-71.
- 6) Ausar, S. F.;Rexroad, J.;Frolov, V. G.;Look, J. L.;Konar, N. & Middaugh, C. R. (2005). Analysis of the thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. *Mol Pharm*, 2, 491-9.

- 7) Baker, J. C.;Ames, T. R. & Markham, R. J. (1986). Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd. *Am J Vet Res*, 47, 240-5.
- 8) Barik, S. (2013). Respiratory syncytial virus mechanisms to interfere with type 1 interferons. *Curr Top Microbiol Immunol*, 372, 173-91.
- 9) Belknap, E. B.;Baker, J. C.;Patterson, J. S.;Walker, R. D.;Haines, D. M. & Clark, E. G. (1991). The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves. *J Infect Dis*, 163, 470-6.
- 10) Belknap, E. B.;Ciszewski, D. K. & Baker, J. C. (1995). Experimental respiratory syncytial virus infection in calves and lambs. *J Vet Diagn Invest*, 7, 285-98.
- 11) Blount, R. E., Jr.;Morris, J. A. & Savage, R. E. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*, 92, 544-9.
- 12) Borchers, A. T.;Chang, C.;Gershwin, M. E. & Gershwin, L. J. (2013). Respiratory Syncytial Virus-A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*.
- 13) Braciale, T. J. (2005). Respiratory syncytial virus and T cells: interplay between the virus and the host adaptive immune system. *Proc Am Thorac Soc*, 2, 141-6.
- 14) Brideau, R. J.;Oien, N. L.;Lehman, D. J.;Homa, F. L. & Wathen, M. W. (1993). Protection of cotton rats against human parainfluenza virus type 3 by vaccination with a chimeric FHN subunit glycoprotein. *J Gen Virol*, 74 ( Pt 3), 471-7.

- 15) Brodersen, B. W. (2010). Bovine respiratory syncytial virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 323-33.
- 16) Cabello, R. K., Rivera, G.H. (2006). Frecuenciadelos virus parainfluenza-3, respiratorio sincitial y diarrea viral bovina en un rebaño mixto de una comunidad campesina de Cusco :. *Rev Inv Vet Perú*, 17, 167-172.
- 17) Calderon G, A. (2011). Detection of serum antibodies to parainfluenza type 3 virus, respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, and herpes virus type 1 in sheep in the Region of Botucatu, São Paulo – Brazil. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 3, 1-5.
- 18) Casas F. I., E. A. 2008. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. España.
- 19) Collins, P. L. & Graham, B. S. (2008). Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*, 82, 2040-55.
- 20) Cortese, V. S., Cravens, R.L., Dominguez, J. (1991). The prevalence of bovine virus diarrhoea and bovine respiratory syncytial virus in Mexico. *Bovine Practitioner*, 26, 159-161.
- 21) Crowe, J. E., Jr. (2001). Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. *Clin Infect Dis*, 33, 1720-7.
- 22) Choudhary, M. L.;Anand, S. P.; Heydari, M.; Rane, G.; Potdar, V. A.; Chadha, M. S. & Mishra, A. C. (2013). Development of a multiplex one step RT-PCR that detects eighteen respiratory viruses in clinical specimens and comparison with real time RT-PCR. *J Virol Methods*, 189, 15-9.

- 23) D.H. Davies, M. H., B.A.H. Jones and D.C. Thurley (1981). The pathogenesis of sequential infection with parainfluenza virus type 3 and *Pasteurella haemolytica* in sheep. *Veterinary Microbiology*, 6, 173-182.
- 24) Del Castillo, C. E.; Noé, M. P. & Casillas, F. M. (2010). *Texto y cuaderno de trabajo. LABORATORIO DE VIROLOGÍA*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- 25) Domachowske, J. B. & Rosenberg, H. F. (1999). Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev*, 12, 298-309.
- 26) Duncan, R. B., Jr. & Potgieter, L. N. (1993). Antigenic diversity of respiratory syncytial viruses and its implication for immunoprophylaxis in ruminants. *Vet Microbiol*, 37, 319-41.
- 27) Duncanson, G. R. & C.A.B. International. (2013). *Farm animal medicine and surgery : for small animal veterinarians*, Wallingford, Oxfordshire ; Cambridge, MA, CABI.
- 28) Easton, A. J.; Domachowske, J. B. & Rosenberg, H. F. (2004). Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 17, 390-412.
- 29) Elazhary, M. A.; Silim, A. & Dea, S. (1984). Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus-1, and bovine parainfluenza-3 virus in sheep and goats in Quebec. *Am J Vet Res*, 45, 1660-2.
- 30) Elvander, M. (1996). Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Rec*, 138, 101-5.

- 31) Ellis, J. A. (2010). Bovine parainfluenza-3 virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 575-93.
- 32) Figueroa-Chavez, D.; Segura-Correa, J. C.; Garcia-Marquez, L. J.; Pescador-Rubio, A. & Valdivia-Flores, A. G. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 44, 1417-21.
- 33) Fulton, R. W.; Briggs, R. E.; Payton, M. E.; Confer, A. W.; Saliki, J. T.; Ridpath, J. F.; Burge, L. J. & Duff, G. C. (2004). Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus, bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine*, 22, 643-9.
- 34) Fulton, R. W.; Purdy, C. W.; Confer, A. W.; Saliki, J. T.; Loan, R. W.; Briggs, R. E. & Burge, L. J. (2000). Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res*, 64, 151-9.
- 35) Gaffuri, A.; Giacometti, M.; Tranquillo, V. M.; Magnino, S.; Cordioli, P. & Lanfranchi, P. (2006). Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *J Wildl Dis*, 42, 685-90.
- 36) Gagea, M. I.; Bateman, K. G.; Van Dreumel, T.; McEwen, B. J.; Carman, S.; Archambault, M.; Shanahan, R. A. & Caswell, J. L. (2006). Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest*, 18, 18-28.

- 37) Gershwin, L. J. (2012). Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35, 253-7.
- 38) Giangaspero, M.;Savini, G.;Orusa, R.;Osawa, T. & Harasawa, R. (2013). Prevalence of antibodies against Parainfluenza virus type 3, Respiratory syncytial virus and bovine Herpesvirus type 1 in sheep from Northern Prefectures of Japan. *Vet Ital*, 49, 285-9.
- 39) Gotoh, B.;Komatsu, T.;Takeuchi, K. & Yokoo, J. (2002). Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. *Rev Med Virol*, 12, 337-57.
- 40) Gould, E. A. & Higgs, S. (2009). Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103, 109-21.
- 41) Green, L. E. (2010). Epidemiological information in sheep health management. *Small Ruminant Research*, 92, 57-66.
- 42) Griffin, D.;Chengappa, M. M.;Kuszak, J. & Mcvey, D. S. (2010). Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 381-94.
- 43) Hacking, D. & Hull, J. (2002). Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response. *J Infect*, 45, 18-24.
- 44) Hall, C. B. (2001). Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*, 344, 1917-28.
- 45) Hambling, M. H. (1964). Survival of the Respiratory Syncytial Virus during Storage under Various Conditions. *Br J Exp Pathol*, 45, 647-55.



- 46) Harrison, M. S.; Sakaguchi, T. & Schmitt, A. P. (2010). Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 1416-29.
- 47) Heminway, B. R.; Yu, Y. & Galinski, M. S. (1994). Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins. *Virus Res*, 31, 1-16.
- 48) Henrickson, K. J. (2003). Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*, 16, 242-64.
- 49) Hierholzer, J. C. & Suggs, M. T. (1969). Standardized viral hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests. I. Standardization of erythrocyte suspensions. *Appl Microbiol*, 18, 816-23.
- 50) Hoffman, S. J.; Laham, F. R. & Polack, F. P. (2004). Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response. *Microbes Infect*, 6, 767-72.
- 51) Hore, D. E. (1969). A survey of sheep sera for antibodies to an ovine strain of parainfluenza 3 virus. *Br Vet J*, 125, 311-6.
- 52) Hughes, J. H. (1993). Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clin Microbiol Rev*, 6, 150-75.
- 53) International Committee on Taxonomy of Viruses. & King, A. M. Q. (2012). *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, London ; Waltham, MA, Academic Press.
- 54) Iorio, R. M. & Mahon, P. J. (2008). Paramyxoviruses: different receptors - different mechanisms of fusion. *Trends Microbiol*, 16, 135-7.

- 55) Jehan A.M. Gafer, H. a. H., I.M. Reda (2009). Isolation and characterization of PI-3 virus from sheep and goats. *International Journal of Virology*, 5, 28-35.
- 56) Johnson, J. E.;Gonzales, R. A.;Olson, S. J.;Wright, P. F. & Graham, B. S. (2007). The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol*, 20, 108-19.
- 57) Keles, I.;Woldehiwet, Z. & Murray, R. D. (1998). Replication of bovine respiratory syncytial virus in bovine and ovine peripheral blood lymphocytes and monocytes and monocytic cell lines. *Vet Microbiol*, 61, 237-48.
- 58) Kuldeep Dhama, E. A. (2013). Global warming and emerging infectious diseases of animals and humans: Current scenario, challenges, solutions and future perspectives – a review. *International Journal of Current Research*, 5, 1942-1958.
- 59) L, N. & Hernández J, E. A. (2006). Mortalidad de los ovinos de pelo en tres épocas climaticas en un rebaño comercial en la Chontalpa, Tabasco, México. *Universidad y ciencia*, 22, 119-129.
- 60) Lamontagne, L.;Descoteaux, J. P. & Roy, R. (1985). Epizootiological survey of parainfluenza-3, reovirus-3, respiratory syncytial and infectious bovine rhinotracheitis viral antibodies in sheep and goat flocks in Quebec. *Can J Comp Med*, 49, 424-8.
- 61) Lehmkuhl, H. D. & Cutlip, R. C. (1983). Experimental parainfluenza type 3 infection in young lambs: clinical, microbiological, and serological response. *Vet Microbiol*, 8, 437-42.
- 62) Liqun Zhang, P. L. C., Robert A. Lamb, Raymond J. Pickles (2011). Comparison of differing cytopathic effects in human airway epithelium of

parainfluenza virus 5 (W3A), parainfluenza virus type 3, and respiratory syncytial virus. *Virology*, 421, 67–77.

- 63) Lovatt, F. M. (2010). Clinical examination of sheep. *Small Ruminant Research*, 92, 72-77.
- 64) Luzzago, C.;Bronzo, V.;Salvetti, S.;Frigerio, M. & Ferrari, N. (2010). Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds. *Vet Res Commun*, 34, 19-24.
- 65) Maclachlan, N. J.;Dubovi, E. J. & Fenner, F. (2011). *Fenner's veterinary virology*, London, Academic.
- 66) Martin, W. B. (1996). Respiratory infections of sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 19, 171-9.
- 67) Mastrangelo, P. & Hegele, R. G. (2012). The RSV fusion receptor: not what everyone expected it to be. *Microbes Infect*, 14, 1205-10.
- 68) Melero, J. A. & Moore, M. L. (2013). Influence of respiratory syncytial virus strain differences on pathogenesis and immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 372, 59-82.
- 69) Mitra, R.;Baviskar, P.;Duncan-Decocq, R. R.;Patel, D. & Oomens, A. G. (2012). The human respiratory syncytial virus matrix protein is required for maturation of viral filaments. *J Virol*, 86, 4432-43.
- 70) Murphy, F. A. (1999). *Veterinary virology*, San Diego, California: London, Academic.
- 71) Nash, M. L.;Hungerford, L. L.;Nash, T. G. & Zinn, G. M. (1997). Risk factors for respiratory disease mortality in lambs. *Small Ruminant Research*, 26, 53-60.

- 72) Nettleton, P. F.; Gilray, J. A.; Caldwell, G.; Gidlow, J. R.; Durkovic, B. & Vilcek, S. (2003). Recent isolates of bovine respiratory syncytial virus from Britain are more closely related to isolates from USA than to earlier British and current mainland European isolates. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50, 196-9.
- 73) Norstrom, M.; Skjerve, E. & Jarpe, J. (2000). Risk factors for epidemic respiratory disease in Norwegian cattle herds. *Prev Vet Med*, 44, 87-96.
- 74) Panaftosa-Ops/Oms 2010. Diagnóstico de virus de Influenza en mamíferos y aves, Serie de Manuales Técnicos. *In: Aftosa.*, C. P. d. F. (ed.). Rio de Janeiro.
- 75) Pardon, B.; De Bleecker, K.; Dewulf, J.; Callens, J.; Boyen, F.; Catry, B. & Deprez, P. (2011). Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves. *Vet Rec*, 169, 278.
- 76) Pardon, B.; Hostens, M.; Duchateau, L.; Dewulf, J.; De Bleecker, K. & Deprez, P. (2013). Impact of respiratory disease, diarrhea, otitis and arthritis on mortality and carcass traits in white veal calves. *BMC Vet Res*, 9, 79.
- 77) Pugh, D. G. (2002). *Sheep & goat medicine*, Philadelphia, Pa. ; London, W.B. Saunders.
- 78) R.C. Cutlip, H. D. L. a. K. a. B. (1993). Chronic effects of coinfection in lambs with parainfluenza-3 virus and *Pasteurella haemolytica*. *Small Ruminant Research*, 11, 171-178.
- 79) Rahal, A.; Ahmad, A. H.; Prakash, A.; Mandil, R. & Kumar, A. T. (2014). Environmental Attributes to Respiratory Diseases of Small Ruminants. *Vet Med Int*, 2014, 853627.

- 80) Reisinger, R. C.;Heddleston, K. L. & Manthei, C. A. (1959). A myxovirus (SF-4) associated with shipping fever of cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 135, 147-52.
- 81) Roger, P. A. (2008). The impact of disease and disease prevention on sheep welfare. *Small Ruminant Research*, 76, 104-111.
- 82) Rosadio, R. H.;Evermann, J. F. & Demartini, J. C. (1984). A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. *Vet Microbiol*, 10, 91-6.
- 83) Rosenquist, B. D. (1974). Isolation of respiratory syncytial virus from calves with acute respiratory disease. *J Infect Dis*, 130, 177-82.
- 84) Rusenova (2009). Comparison of the seroprevalence against some respiratory viruses in mixed sheep-goat herds in two regions of Bulgaria. *Trakia Journal of Sciences*, 7, 58-62.
- 85) Saa, L. R.;Perea, A.;Jara, D. V.;Arenas, A. J.;Garcia-Bocanegra, I.;Borge, C. & Carbonero, A. (2012). Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. *Trop Anim Health Prod*, 44, 1423-7.
- 86) San Juan V, H., Mag, Shyam S, M, (2006). Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profilacticas. 22, *Salud Uninorte Barranquilla*, 135-153.
- 87) Scott, P. R. (2010). Lung auscultation recordings from normal sheep and from sheep with well-defined respiratory tract pathology. *Small Ruminant Research*, 92, 104-107.

- 88) Scott, P. R. (2011). Treatment and control of respiratory disease in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27, 175-86.
- 89) Schlender, J.;Zimmer, G.;Herrler, G. & Conzelmann, K. K. (2003). Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol*, 77, 4609-16.
- 90) Schomacker, H.;Hebner, R. M.;Boonyaratanakornkit, J.;Surman, S.;Amaro-Carambot, E.;Collins, P. L. & Schmidt, A. C. (2012a). The C proteins of human parainfluenza virus type 1 block IFN signaling by binding and retaining Stat1 in perinuclear aggregates at the late endosome. *PLoS One*, 7, e28382.
- 91) Schomacker, H.;Schaap-Nutt, A.;Collins, P. L. & Schmidt, A. C. (2012b). Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr Opin Virol*, 2, 294-9.
- 92) Sharma, A. K. & Woldehiwet, Z. (1996). Cell-mediated immune responses of lambs to experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 50, 79-91.
- 93) Sharma, R. & Woldehiwet, Z. (1990). Pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. *Vet Microbiol*, 23, 267-72.
- 94) Shirvani, E.;Lotfi, M.;Kamalzadeh, M.;Noaman, V.;Bahriari, M.;Morovati, H. & Hatami, A. (2012). Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). *Trop Anim Health Prod*, 44, 191-5.

- 95) Siap-Sagarpa. 2012. Ovino, población ganadera. [Acceso mayo, 29 2013] [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/ovino.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/ovino.pdf)
- 96) Simoes, E. A. (1999). Respiratory syncytial virus infection. *Lancet*, 354, 847-52.
- 97) Smith Mc, S. D. (2009). *Goat Medicine*. Wiley-Blackwell.
- 98) Solis-Calderon, J. J.;Segura-Correa, J. C.;Aguilar-Romero, F. & Segura-Correa, V. M. (2007). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus-3 in beef cattle of Yucatan, Mexico. *Prev Vet Med*, 82, 102-10.
- 99) Solis-Calderon, J. J.;Segura-Correa, V. M. & Segura-Correa, J. C. (2005). Bovine viral diarrhoea virus in beef cattle herds of Yucatan, Mexico: seroprevalence and risk factors. *Prev Vet Med*, 72, 253-62.
- 100) Stubbs A., A. G., Bencini R. (2009). *Dairy Sheep Manual. Farm Management Guidelines*, Rural Industries Research and Development Corporation.
- 101) Sweiger, S. H. & Nichols, M. D. (2010). Control methods for bovine respiratory disease in stocker cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 26, 261-71.
- 102) Thonney MI, S. M., Mateescu Rg, Et Al. (2008). Vaccination of ewes and lambs against parainfluenza 3 to prevent lamb pneumonia. *Small Rumin Research*, 74, 30-6.
- 103) Thonur, L.;Maley, M.;Gilray, J.;Crook, T.;Laming, E.;Turnbull, D.;Nath, M. & Willoughby, K. (2012). One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Vet Res*, 8, 37.

- 104) Thrusfield, M. V. (2007). *Veterinary epidemiology*, Oxford, Blackwell Science.
- 105) Trigo, T. F. 1987. *El complejo respiratorio infecciosos de los bovinos y ovinos*. Ciencia Veterinaria.
- 106) Uttenthal, A.;Jensen, N. P. & Blom, J. Y. (1996). Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology. *Vet Rec*, 139, 114-7.
- 107) Vainionpaa, R. & Hyypia, T. (1994). Biology of parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*, 7, 265-75.
- 108) Valarcher, J. F. & Taylor, G. (2007). Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res*, 38, 153-80.
- 109) Van Wyke Coelingh, K. L.;Winter, C. C.;Tierney, E. L.;Hall, S. L.;London, W. T.;Kim, H. W.;Chanock, R. M. & Murphy, B. R. (1990). Antibody responses of humans and nonhuman primates to individual antigenic sites of the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins after primary infection or reinfection with parainfluenza type 3 virus. *J Virol*, 64, 3833-43.
- 110) Zhang, L.;Collins, P. L.;Lamb, R. A. & Pickles, R. J. (2011). Comparison of differing cytopathic effects in human airway epithelium of parainfluenza virus 5 (W3A), parainfluenza virus type 3, and respiratory syncytial virus. *Virology*, 421, 67-77.
- 111) Zhu, Y. M. S., H. F. Gao, Y. R. Xin, J. Q. Liu, N. H. Xiang, W. H. Ren, X. G. Feng, J. K. Zhao, L. P. Xue, F. (2011). Isolation and genetic characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Vet Microbiol*, 149, 446-51.



## ANEXO



Imagen 2. Testigo de células VERO  
72h Objetivo. 10X

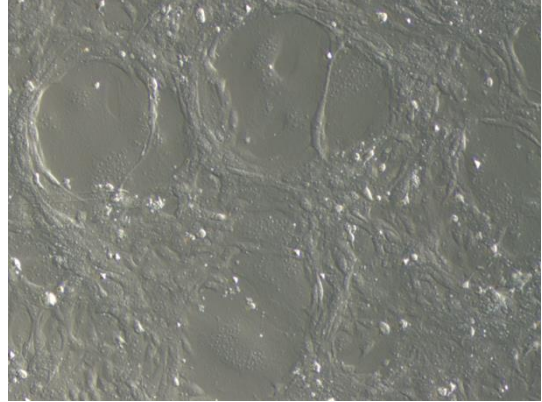


Imagen 3. Testigo células VERO  
infectadas con BVR5 72h. Objetivo  
10X

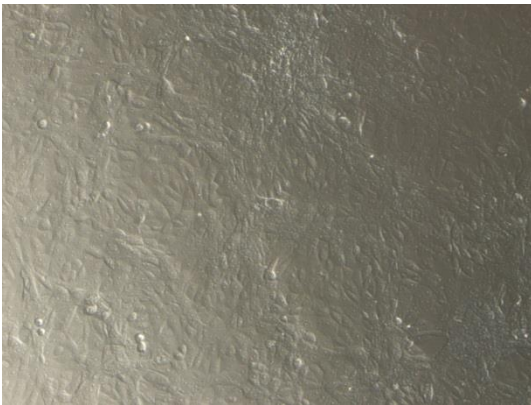


Imagen 4. Testigo de células MDBK  
72h. Objetivo 10X

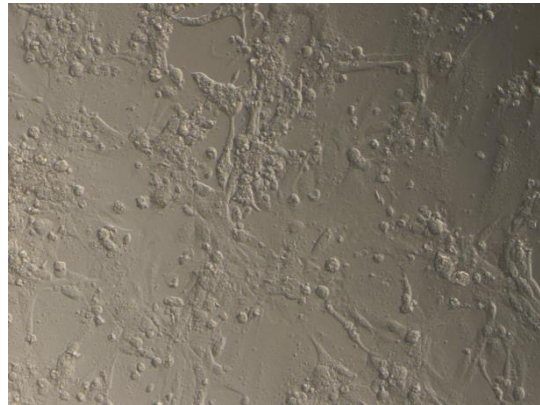


Imagen 5. Testigo células MDBK  
infectadas con BPI3 72h. Objetivo  
10X

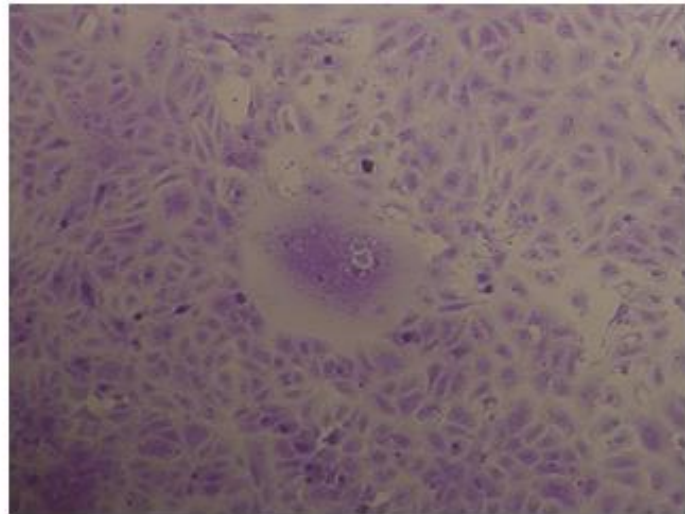
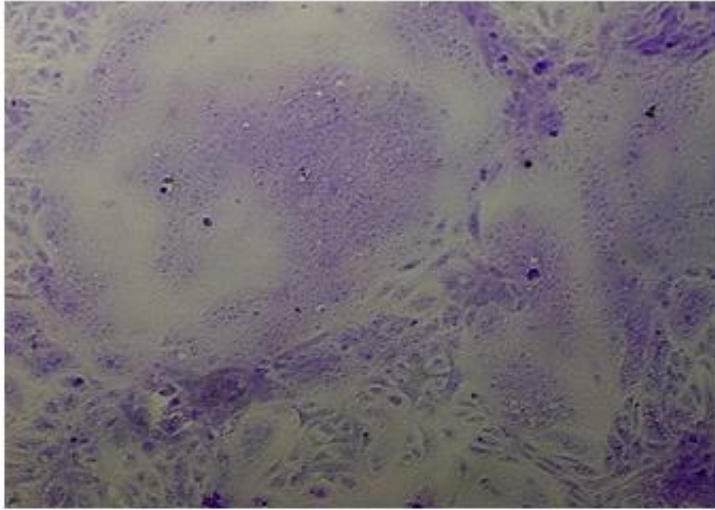


Imagen 6 Células vero infectadas con BRSV ajustado a 100 y 300DICC 50% 72h. Objetivo 10X

## Método de REED and MÜNCH (Del Castillo *et al.*, 2010)

Para calcular el número de partículas infecciosas de una determinada suspensión viral, se aplica el método de la dilución límite, en donde la actividad de un virus mata o infecta un porcentaje determinado. En este método el punto final se determina por interpolación a partir de las frecuencias acumuladas de respuestas positivas y negativas. El valor estadístico de este método está dado por el aumento del número de repeticiones que se obtiene por el cómputo de los valores acumulativos de las respuestas positivas o negativas.

- Método de Reed y Münch:

a) Disponer los resultados obtenidos en forma tabular

b) Abarcar diluciones tanto las más bajas donde se obtiene todas las respuestas positivas, como las más altas donde se obtienen todas las respuestas negativas. En la práctica puede utilizarse el método con 2 diluciones próximas al PF50%

c) Anotar el número de respuestas positivas sobre “n”

d) Separar el número de respuestas positivas y negativas

e) Hacer la acumulación de respuestas positivas, sumando desde la dilución más alta a la más baja

f) Hacer la acumulación de respuestas negativas, sumando desde la dilución más baja a la más alta

g) Obtener el total acumulado por dilución, sumando  $\Sigma R (+)$  más  $\Sigma R (-)$

h) Anotar la  $\Sigma$  de R (+) sobre el total acumulado

i) Obtener el % de respuestas positivas acumuladas del total acumulado

j) Aplicar la fórmula de DISTANCIA PROPORCIONAL (DP) a la que se estima debe estar el punto final 50%:

$$DP = \frac{\% > 50\% - 50}{\% > 50\% - \% < 50\%}$$

k) Determinar el PF50% con la siguiente fórmula:

$$PF50\% = \text{Log de la dilución del } \% > 50\% + (DP \times \text{log del factor de dilución})$$

l) Determinar el título con la siguiente fórmula:

$$\text{Título} = \text{Inverso del PF } 50\%$$