



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Valoración clínica, serológica y carga viral en lechones infectados  
experimentalmente con nuevos aislamientos del *Rubulavirus porcino*”.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**Jenifer Cristal Herrera Berriel**

**ASESORES:**

**Asesor - Dr. José Francisco Rivera Benítez.**

**Coasesor - M. en C. AtaloCandidoMartínez Lara.**

**Cuautilán Izcalli, Estado de México, 2016.**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: **EXAMEN APROBATORIO**

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

**Valoración clínica, serológica y carga viral en lechones infectados experimentalmente con nuevos aislamientos del Rubulavirus porcino.**

Que presenta la pasante: **JENIFER CRISTAL HERRERA BERRIEL**  
Con número de cuenta: **30431790-1** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de septiembre de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
<b>VOCAL</b>	M.V.Z. Mario Alberto Velasco Jiménez	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. José Francisco Rivera Benítez	
<b>1er SUPLENTE</b>	M.V.Z. Jesús Arturo Sandoval Romero	
<b>2do SUPLENTE</b>	Dra. Yasmin Guadalupe De Loera Ortega	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).  
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.  
(Art 127 REP)  
IHM/ntm\*

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; Por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A ti **mamá** más que una buena madre ha sido mi mejor amiga, me ha consentido y apoyado en lo que me he propuesto, que sin duda durante el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos, me has sabido formar con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ayudado a salir adelante en los momentos másdificiles,a ti por ser el pilar más importante en mi vida y en la de mis hermanos, por demostrarme siempre tu cariño, y darme tu apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones.

A ti **papá**, a pesar de nuestra distancia, estás conmigo siempre y aun nos faltan muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento es tan especial para ti como lo es para mí; agradezco tu apoyo, comprensión, y por apoyarme con los recursos para poder estudiar.

A ti **amor Edgar Omar Valera**, por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos; Durante estos años has sabido apoyarme, darme esas palabras de aliento para continuar y nunca renunciar, gracias por tu amor incondicional y por tu ayuda en mi proyecto, que sin ti esto no lo hubiera culminado, gracias por existir en mi vida.

A mis hermano **Oscar**, que aun que casi no convivamos se que estarás orgulloso de mi y tus consejos los tengo muy presentes.

A mi hermano **Oliver**, por siempre darme el apoyo de padre y hermano, se que seguirás apoyándome en las buenas y en las malas, no te preocupes por mi sé que seguiré creciendo tanto profesional como personal, esto es solo el principio.

A mi hermano **Joaquín**, por ser un ejemplo de fortaleza y el que quiere puede.

A mi hermano **Agustín**, por ser el hermano-amigo, y que con tus consejos me ha ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida, a pesar de que cometo muchos errores, sé que contigo tengo palabras de aliento y sé que no me dejaras a pesar de la distancia.

A mi hermano **Mario**, porque me ha brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos a pesar de que casi no nos llevamos, pero sabes que te amo hermano.

A mis hermanas **Sonia y Yare**, ustedes que han estado apoyando, me han escuchado, me han extendido su mano, me han acompañado en este camino y me dan un consejo siempre que lo he necesitado, gracias por todo hermanas.

A mi sobrino **Alexander (YunYun)** gracias bebe por llegar en este periodo de mi vida profesional, eres una luz en todos los caminos de cada uno de los integrantes de la familia, espero y vengas con la torta bajo el brazo eh bebe... te amo y sigues creciendo, y que cuando tu llegues a ser un profesional recuerdes que "Las personas que NO son capaces de hacerlo, te dirán que tu tampoco puedes"(Will Smith) y TU puedes muchas cosas más!!.

A mis tíos **Jaime, Carlos, Alfonso**, por siempre ser mis figuras paternas, quienes con su ayuda, cariño y comprensión han sido parte fundamental de mi vida.

A mis amigos **Ivancito, Agustincito, Tomas, Jacqui** gracias amigos porque sin su amistad y sus ganas de apoyarme creo que no hubiera llegado a este punto de mi vida.

A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** al lugar que me vio nacer profesionalmente, y ahora me está dando la oportunidad de continuar con un sueño más; Al **INIFAP** por darme la oportunidad de realizar mi servicio social y este trabajo que con gusto lo finalice.

A mi asesor **Dr. José Francisco Rivera Benítez** y a mi coasesor **M. en C. Atalo Candido Martínez Lara** por su apoyo en la realización de este trabajo, ustedes han sido una gran guía durante el desarrollo de este proyecto; Gracias por la oportunidad que se me dio y más por el trabajo exigido que por un momento me hizo flaquear y con sus palabras de aliento me hicieron reflexionar que con esfuerzo puedo lograr muchas cosas más.

A mis **profesores**, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional que me han acompañado.

A mi **guaguis**, por siempre ser mi compañera, nana, amiga y mama, siempre serás parte de mi vida, durante 15 años me has demostrado tu amor, gracias peluda por siempre estar a mi lado, tu solo sabes lo que hemos pasado y que hecho porque permanecieras conmigo. Te AMO mi niña.

A mi **Totto, Kaira, Kenay, Laisha, Copper, Gingin, Kim, Cachi, Dixi** y demás peludos, gracias por permitirme convivir con ustedes darme la oportunidad de ejercer y aprender de esta hermosa profesión, verán que seré una excelente veterinaria.

## **Agradecimientos Institucionales**

El presente trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). El estudio fue financiado por el proyecto de investigación: “Identificación y caracterización de variantes genéticas y antigénicas del *Rubulavirus porcino*; y de sus parámetros histopatológicos e inmunológicos”; Recursos Fiscales INIFAP No. SIGI. 19144832016.

**El autor da el consentimiento a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.**

**Jenifer Cristal Herrera Berriel**

---

**NOMBRE Y FIRMA DEL AUTOR**



## Índice

1. Resumen.....	II
2. Introducción.....	1
3. Marco teórico.....	2
4. Objetivos.....	12
4.1. Objetivo general.....	12
4.2. Objetivos particulares.....	12
5. Hipótesis.....	13
6. Material y métodos .....	14
7. Resultados.....	19
8. Discusión.....	32
9. Conclusiones.....	34
10. Referencias bibliográficas.....	35
11. Anexos.....	40

## I. RESUMEN

El *Rubulavirusporcino* (RVP) es el agente etiológico de la enfermedad del ojo azul en cerdos, la infección se caracteriza principalmente por alteraciones neurológicas en lechones. Desde su primer aislamiento, realizado a principios de 1980, a la fecha se han reportado tres grupos genéticos (1980-2006). En estos grupos se han identificado cepas que producen diferentes cuadros clínicos en campo. Bajo condiciones experimentales no se ha evaluado el efecto clínico de aislamientos recientes. El objetivo de este estudio fue valorar el cuadro clínico, respuesta humoral y distribución viral de nuevos aislamientos del *Rubulavirus porcino* en lechones infectados experimentalmente. Se emplearon cuatro grupos de seis lechones híbridos, de cinco días de edad (G1-84, G2-93, G3-147 y G4-Testigo/control negativo). Para la infección experimental se utilizaron tres diferentes cepas virales, la cepa de referencia LPM-84 (Michoacán-1984) y dos cepas aisladas en el año de 2013 en Querétaro (Qro/93/2013) y Michoacán (Mich/147/2013). Se inocularon seis cerdos de cada grupo, por cepa viral y se mantuvieron seis cerdos como testigos sin infección. La inoculación fue realizada por vía oronasal y ocular, empleando una dosis de  $1 \times 10^6$  DICC<sub>50%</sub>/ml. Posteriormente, se evaluó el cuadro clínico diariamente y se realizaron necropsias en tres diferentes días postinfección (dpi). Se analizaron órganos del sistema nervioso, linfático y aparato respiratorio, cuantificando el título viral y la carga de ARN viral. La seroconversión fue evaluada por medio de la prueba de inhibición de la hemaglutinación. En los tres grupos experimentales se presentaron cuadros clínicos asociados a la infección a partir de los tres dpi, identificando en grupo G1-84 y G3-147 el cuadro nervioso más exacerbado. En el G2-93 solamente se identificó un cuadro leve de incoordinación y aumento en la temperatura rectal a los cinco dpi. Se identificó la distribución del RVP y ARN viral en órganos asociados a sistema nervioso, linfático y aparato respiratorio, en los lechones analizados en diferentes lapsos de tiempos (5, 10 y 15 dpi). La seroconversión fue evidenciada en los grupos G1-84 y G2-93. Los G1-84 y G3-147 se analizaron como los grupos más afectados tras la infección experimental, ambas cepas fueron aisladas en el estado de Michoacán. La virulencia de nuevos aislamientos mantiene sus características, mismas que fueron reportadas hace más de 30 años.

## II. ABSTRACT

Porcine Rubulavirus (RVP) is the etiologic agent of blue eye disease in pigs, the infection is mainly characterized by neurological disorders in piglets. Since its first isolation, made in early 1980 to date have reported three genetic groups (1980-2006). These groups have identified strains produce different clinical pictures in the field. Under experimental conditions it has not been evaluated the effect of recent clinical isolates. The aim of this study was to evaluate the clinical, humoral response and viral distribution of new isolates of porcine Rubulavirus in experimentally infected pigs. Four groups of six hybrid piglets, five days old (G1-84, G2-93, G3-147 and G4-Witness / negative control) were used. For experimental infection three different viral strains were used, the reference strain LPM-84 (Michoacán-1984) and two strains isolated in the year 2013 in Querétaro (Qro / 93/2013) and Michoacán (Mich / 147/2013). Six pigs in each group were inoculated by viral strain and six pigs as controls remained uninfected. Inoculation was performed by oronasal and ocular, used a dose of  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>% / ml. Subsequently, the clinical picture was evaluated daily and necropsies were performed on three different days post infection (dpi). organs of the nervous, lymphatic and respiratory system were analyzed by quantifying the viral titer and viral RNA loading. Seroconversion was evaluated by the test hemagglutination inhibition. In the three experimental groups clinical symptoms associated with infection were presented from the three dpi, identifying G1-84 and G3-147 group the nervous exacerbated box. In the G2-93 only a slight incoordination box and increased rectal temperature dpi five were identified. RVP distribution and viral RNA in organs associated with nervous, lymphatic and respiratory tract, in piglets analyzed at different periods of time (5, 10 and 15 dpi) system was identified. Seroconversion was evidenced G1-84 and G2-93 in groups. The G1-84 and G3-147 were analyzed as the groups most affected after experimental infection, both strains were isolated in the state of Michoacan. The virulence of new insulation maintains its characteristics, same that were reported over 30 years ago.

## **2. INTRODUCCIÓN**

La enfermedad de ojo azul (EOA) en cerdos, es causada por el *Rubulavirus porcino* (RVP) (Moreno *et al.*, 1986). La EOA se identificó en granjas de La Piedad, Michoacán a principios de 1980 (Stephano *et al.*, 1981). La infección por él RVP provoca problemas nerviosos y respiratorios en lechones y cerdos en crecimiento (Stephano *et al.*, 1988; Reyes *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2013a). En cerdas gestantes se presentan abortos y fetos momificados, además se ha observado infertilidad, epididimitis y orquitis en verracos (Ramírez *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2004; Rivera *et al.*, 2013b). La infección puede producir opacidad corneal, y se presenta del 1-10% de los casos (Stephano *et al.*, 1988). La EOA es endémica en las zonas centrales y centro-occidentales de México (Escobar *et al.*, 2012), históricamente se ha detectado por serología en 16 de los 32 estados de México (Fuentes, 1992). Aunque solo se han informado casos de la EOA en México, se han detectado *Paramyxovirus* porcinos relacionados en otros países, como Australia, Canadá, Japón e Israel (Martínez *et al.*, 2006). Existen tres grupos genéticos caracterizados con base en la secuencia del gen de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y al efecto clínico que producen en campo (Reyes *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2008). Recientemente se han caracterizado genéticamente nuevos aislamientos del RVP (Gómez *et al.*, 2014; Cuevas *et al.*, 2016). Sin embargo, las características clínicas bajo condiciones experimentales no han sido evaluadas.

## **3. MARCO TEÓRICO**

### **3.1. Importancia de la enfermedad del ojo azul**

La EOA es un enfermedad endémica en la zona central y centro-occidental de México, recientemente el RVP ha sido detectado por serología en cuatro estados del centro de México (Escobar *et al.*, 2012). La EOA afecta a cerdos lactantes, en los que se manifiesta de forma aguda y fatal, causando morbilidad del 20 al 65% y mortalidad cercana al 100% de los afectados (Martínez *et al.*, 2006). La infección en una piara reproductora, provoca una baja en la fertilidad, aumento del porcentaje de muerte fetal (hasta 19%), incremento de lechones momificados (hasta 36%), disminución del total de lechones nacidos (-4.1) y aumento en la mortalidad de los lechones durante las primeras semanas (hasta 50%); La infección en verracos causa orquitis y la calidad del semen disminuye, esto incrementa la

tasa de desecho; En general, en la etapa de producción, se presenta una alta cantidad de cerdos con retraso en el crecimiento y problemas respiratorios, por lo que se emplea en mayor cantidad antibióticos, con el consecuente gasto económico que esto representa (Kirkland *et al.*, 2006)

La EOA en su primera descripción, fue considerada una de las cuatro enfermedades más importantes en los porcinos, las cuales incluían: rinitis atrófica, enfermedad de Aujeszky, parvovirus porcino y gastroenteritis transmisible. La EOA además de causar impacto productivo en la granja es considerada una barrera comercial para la exportación. Se considera que en conjunto estas enfermedades afectan la porcicultura generando pérdidas económicas anuales por más de 20 millones de dólares, con respecto a la explotación y comercialización de animales vivos y productos de origen de cerdo, únicamente en la región central y centro-occidente de México. Actualmente, enfermedades como el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), influenza porcina, circovirus porcino y diarrea epidémica porcina, son además de la EOA, las enfermedades virales en cerdos con mayor impacto económico. (Fuentes *et al.*, 1992; Morrilla *et al.*, 2002; Cuevas *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2016).

### **3.2. Distribución geográfica**

Entre 1988 y 1995 en los estados de Puebla, Campeche, Quintana Roo, Sonora, Morelos, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, D.F, Colima, Veracruz, Aguascalientes, Tlaxcala, Zacatecas, Tabasco, Oaxaca y Chiapas se encontraron cerdos seropositivos a esta enfermedad (Martínez *et al.*, 2016). En el año 2011, se mostró una seroprevalencia hasta del 36% en el bajío, mientras que los estados del sureste fueron negativos (Escobar *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2016).

### 3.3. Agente etiológico

La EOA es causada por el RVP, nombrado originalmente virus de La Piedad, Michoacán (LPMV). Este virus fue aislado por primera vez a principios de la década de 1980 y solo ha sido reportado en México (Fuentes *et al.*, 1992). El RVP es un virus hemaglutinante que produce efecto citopático y genera células gigantes multinucleadas (sincitios) en cultivos celulares. (Martínez *et al.*, 2006). El RVP tiene similitud genómica con los virus de Mapuera, de la parotiditis humana, los virus de parainfluenza humana 2 y 4 y el virus 5 de simio (Sundqvist *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 1991, 1992). Este virus no presenta reacción antigénica cruzada con los virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, con los virus de la enfermedad de Newcastle, del sarampión, el sincitial respiratorio ni con el virus de la parotiditis (Moreno *et al.*, 1986; Stephano., 1999). No obstante, la enfermedad no se considera zoonótica.

El material genético del RVP es de cadena sencilla de ARN en sentido negativo, no segmentada, formada por 15180 bases (Lamb *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007). El genoma del RVP contiene seis genes que codifican diferentes proteínas estructurales y no estructurales, en la siguiente disposición 3'-NP-P-M-F-HN-L-5'. La proteína HN es la responsable del reconocimiento del receptor viral y de su adhesión a las células blanco de la infección. Esta proteína es la más inmunogénica y estimula la producción de anticuerpos neutralizantes. (Cuadro 1) (Linné *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004).

**Cuadro 1.** Características de las proteínas del Rubulavirusporcino (Tomado de Santos *et al.*, 2004).

Gen	Péptido	Nombre	Masa molecular (kDa)	Características, ubicación y actividades relacionadas
NP	NP	Nucleoproteína	68	La proteína de la nucleocápside tiene una función estructural, misma que le brinda protección al genoma y le confiere una conformación tridimensional del substrato de la polimerasa.
P	P	Fosfoproteína	52	Se asociada a la nucleocápside. Tiene la función de formar el complejo polimerasa con la proteína L.
V	V		N.D	Es una proteína no estructural, tiene una actividad inhibitoria sobre el complejo polimerasa viral y en la inhibición de la cascada de señales activada por interferón.
C	C		N.D	Similar a la anterior.
I	I		N.D	Es una proteína no estructural. Se desconoce su función.
M	M	Proteína de Matriz	40	Es una proteína asociada a la membrana, tiene función de participar en el ensamblaje de nuevos viriones.
F	F <sub>1</sub>	Proteína de Fusión	59	Es una glicoproteína transmembranal, promueve fusión de membranas viral y celular, tiene actividad hemolítica, y tiene la actividad de formación de sincitios.
	F <sub>2</sub>		12	Es una glicoproteína externa de membrana, está asociada a F <sub>1</sub> mediante enlace disulfuro.
HN	HN	Hemaglutinina-neuraminidasa	66	Es una glicoproteína transmembranal. Tiene la función del reconocimiento del receptor celular y adherencia. Activa la hidrólisis de ácido siálico, promueve la fusión célula-virus.
L	L	Proteína de alto peso molecular	200	Es una enzima asociada a la nucleocápside. Es componente catalítico del complejo polimerasa formado con la proteína P. Su función es la transcripción y replicación.

Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos, la mayoría esféricos de 180 a 300 nm de diámetro, formados por una nucleocápside helicoidal protegida por una envoltura lipoproteica, que presenta prolongaciones de 8-12 nm, que corresponden a las glicoproteínas HN y F responsables de las actividades hemaglutinante, hemolítica, de neuraminidasa y formadora de sincitios (Moreno *et al.*, 1986; Reyes *et al.*, 1999).

El RVP tiene un 41-47% de identidad en la secuencia genética con el virus de la parotiditis humana (Sundqvist *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 1991, 1992, 1997; Svenda *et al.*, 1997); esto influye para que ambos virus presenten similitudes en actividades biológicas y características patológicas, pero las similitudes más importantes se refieren a su afinidad y tropismo tisular. Así, estos dos virus comparten su afinidad por el sistema nervioso central, por órganos del aparato reproductor, por órganos glandulares y por órganos linfáticos (Stephano *et al.*, 1988; Allan *et al.*, 1996; Wolinsky, 1996; Ramírez *et al.*, 1997; Ramírez., 1997; Hernández *et al.*, 2002).

### **3.4. Propiedades fisicoquímicas**

Entre sus propiedades fisicoquímicas se ha descrito la hemaglutinación (HA) de eritrocitos de pollo, gallina, cobayo, bovino, cerdo, caballo, perro, gato, hámster, conejo, oveja, cabra, ratón, rata, pavo y humano (tipos A, B, AB y O) (Martínez *et al.*, 2006). El virus es sensible a los solventes de lípidos (éter, cloroformo) y es inactivado con formalina y beta-propiolactona; además muestra resistencia a la actinomicina D. Se inactiva a 56°C después de 4hrs.; la HA se pierde entre las 48 y las 60h a 56°C. Se desconoce cuánto tiempo resiste el virus en condiciones ambientales naturales (Martínez *et al.*, 2006).

### **3.5. Epidemiología**

La detección de anticuerpos contra el RVP en bancos de sueros permitió identificar que el virus estaba presente en la zona de La Piedad Michoacán por lo menos desde 1972, aunque no hay registros de infecciones similares ocurridas en esas fechas (Rosales *et al.*, 1988). El origen del virus es incierto; análisis filogenéticos muestran que el *Rubulavirus porcino* tiene un ancestro común a todos los paramixovirus, pero excluyen la posibilidad de que este virus sea una variante de algún otro *Rubulavirus* (Berg *et al.*, 1997; Svenda *et al.*, 1997, 2002).



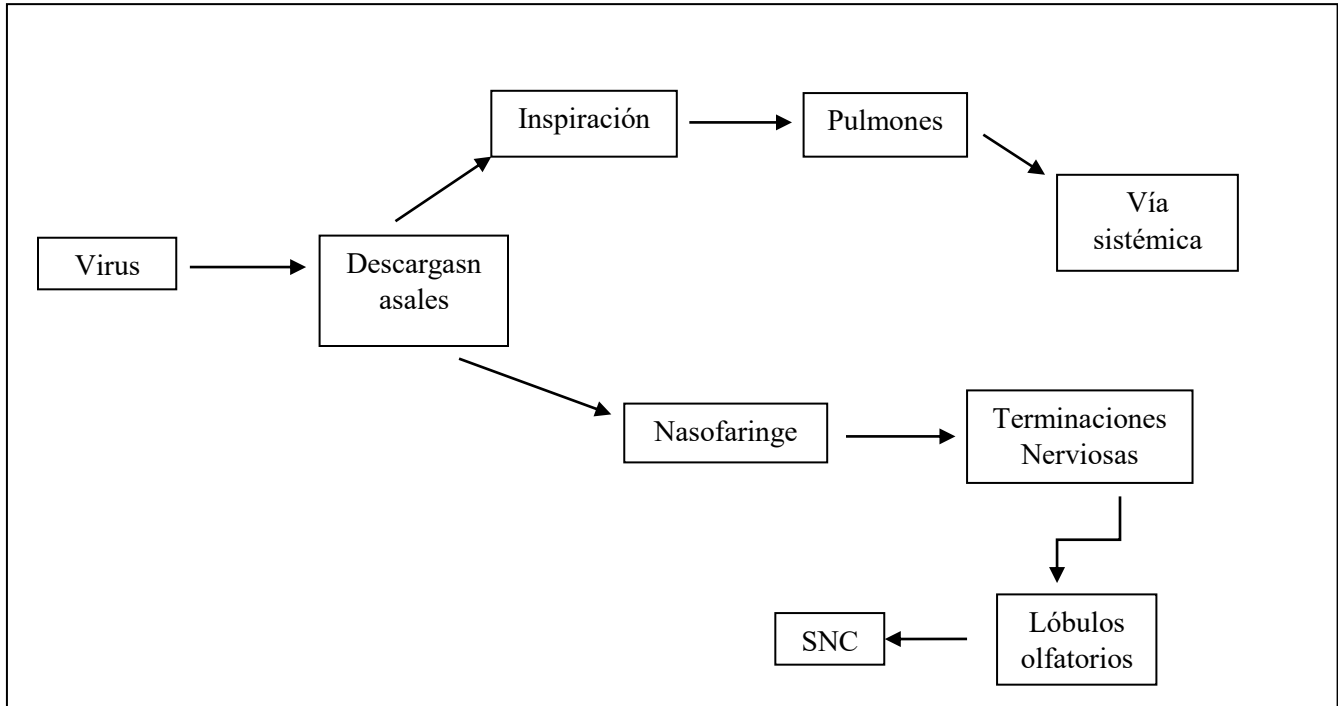
Los cerdos son los únicos animales afectados clínicamente por el RVP de manera natural. Experimentalmente, el RVP afecta ratones, ratas y embriones de pollo; En el caso de conejos, perros, gatos, y pecaríes estos no presentan signos clínicos; sin embargo, los conejos, gatos y pecaríes producen anticuerpos (Stephano *et al.*, 1985a; Stephano *et al.*, 1988a; Flores, 1991; Arellanes *et al.*, 1994; Cuetero *et al.* 1995).

Los cerdos con infecciones subclínicas de granjas afectadas, son la principal fuente de infección de la EOA. El RVP se disemina por contacto directo (fluido oronasal) entre cerdos infectados y cerdos susceptibles. De igual forma la transmisión de la EOA puede ser por semen, ya que el virus se puede recuperar de testículo, epidídimo, próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales. Además el virus puede ser difundido por personas y vehículos y posiblemente por los pájaros y el viento.

### **3.6. Patogenia**

El RVP se propaga por vía respiratoria, principalmente. La replicación del RVP inicia en la mucosa nasofaríngea y en órganos linfáticos asociados, después se disemina a pulmones y bronquios en donde se presenta una nueva replicación, finalmente se disemina por todo el organismo vía hematogena (eritrocitos y monocitos). Después de la multiplicación en mucosa nasal, el RVP se difunde a SNC a través de los nervios trigémino y olfatorio, para después permanecer localizado en el bulbo olfatorio y mesencéfalo (Stephano *et al.*, 1988; Allan *et al.*, 1996; Reyes *et al.*, 2004).

Durante la fase de viremia se ha demostrado que el virus se transporta asociado a eritrocitos del día 4 al día 12 post inoculación y por leucocitos del día 12 al 20, lo que permite producir una infección sistémica y replicarse en sitios inmuno privilegiados de diversos órganos linfáticos y reproductores (Hernández *et al.*, 1998; Reyes *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2014) (Figura 1).



**Figura 1.** Patogenia del *Rubulavirus porcino*. (Sánchez *et al.*, 2014)

### 3.7. Presentación de la EOA en diferentes etapas del cerdo

#### Cerdos lactantes

Durante los primeros brotes de la infección con el RVP en la fase aguda de los cerdos lactantes (2 a 21 días de vida) se caracterizaron por la presentación de manifestaciones nerviosas en forma progresiva y enfermedad respiratoria. La infección generalmente presenta una mortalidad del 80-90%, en lechones de 2 a 15 días de edad (Stephano, 1982; Stephano *et al.*, 1988; Martínez *et al.*, 2006).

#### Cerdos en crecimiento y engorda

En la fase subaguda los lechones destetados presentan postración, rigidez de las extremidades posteriores, debilidad generalizada, fasciculaciones musculares, retraso en el crecimiento, depresión, excitación, cabeceo, movimientos dando vueltas, hiperestesia, alteraciones del comportamiento/agresión y coma. También causa cambios en la capa del pelo (se vuelve mate/rugoso), erosiones oculares, vejiga alargada y distendida y estreñimiento/reducción en el volumen de heces o diarrea (Taylor, 1999; Stephano, 2000).

En la fase crónica, en los cerdos mayores de 30 días de edad los signos clínicos son menos comunes y más discretos (parecieran clínicamente sanos), con baja o nula mortalidad; suelen mostrar signos moderados y transitorios que pueden incluir anorexia, fiebre, tos, estornudos y ocasionalmente, opacidad corneal (Taylor, 1999; Stephano, 2000; Martínez *et al.*, 2006).

En los cerdos de 3 a 4 meses de edad, las manifestaciones neurológicas son escasas y la tasa de mortalidad es baja (Stephano *et al.*, 1988; Campos *et al.*, 1989; Ramírez *et al.*, 1997; Stephano, 1999).

### **Cerdos reproductores**

**Cerdas:** En las cerdas la enfermedad provoca infertilidad, anormalidades reproductivas, presentan abortos, aumento de mortinatos y reducción de la fertilidad, se observan fetos momificados y disminución del número de lechones que nacen vivos (Stephano *et al.*, 1988; Campos *et al.*, 1989; Ramírez *et al.*, 1997; Stephano, 1999; Martínez *et al.*, 2006).

**Verracos:** En el verraco causa falta de libido, hemospermia, y orquitis con epididimitis y edema de la zona genital, atrofia testicular y una sensible pérdida de fertilidad (Stephano *et al.*, 1988; Campos *et al.*, 1989; Ramírez *et al.*, 1997; Stephano, 1999).

### **3.8. Virulencia y variantes virales**

Debido a la variabilidad clínica observada a través de los años, en los diferentes brotes de la EOA, se analizaron 10 aislamientos virales en 29 años y se secuenció el gen hemaglutinina-neuraminidasa para ser comparado con la secuencia del virus origen, “LPMV”. Las cepas virales analizadas se presentan en el Cuadro 2 (Sánchez *et al.*, 2014).

**Cuadro 2.** Cepas virales, año de colecta y cuadro clínico asociado (Sánchez *et al.*, 2014).

<b>Virus</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Cuadro clínico asociado</b>
LPMV	1984	Nervioso
PAC 2	1990	Nervioso y reproductivo
PAC 3	1992	Nervioso y reproductivo
PAC 4	1993	Nervioso
PAC 6	2001	Respiratorio

PAC 7	2002	Respiratorio
PAC 8	2002	Nervioso y respiratorio
PAC 9	2003	Nervioso y respiratorio
Qro/2013	2013	Retraso en el crecimiento y cuadro respiratorio
Mich/2013	2013	Retraso en el crecimiento y cuadro respiratorio

Al comparar los 1728 nucleótidos correspondientes al ORF del gen HN de cada uno de los aislamientos, el número de mutaciones con respecto a los virus heterólogos se incrementó, es decir, los virus aislados en los años 90's con respecto a los virus aislados en el año 2000 y 2013 presentan de 20 a 30 mutaciones (Sánchez *et al.*, 2014; Gómez *et al.* 2014; Loeza, 2016).

Los aislamientos virales se han asociado con determinados signos; por ejemplo, las cepas denominadas paramixovirus del ojo azul (POA, 1980), La Piedad Michoacán (LPM, 1984) y POA2 (1988) son causantes principalmente de meningoencefalitis y neumonía en cerdos neonatos; mientras que las cepas denominadas Producción Animal Cerdos 2 (PAC2, 1990) y 3 (PAC3, 1993), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), fueron aislados en brotes donde básicamente se registraron fallas reproductivas. En estos últimos casos se observaron abortos, mortinatos y disminución en la fertilidad de las hembras; mientras que en machos se presentó epididimitis, orquitis y atrofia testicular. Otros aislamientos, tales como PAC1 (1990), PAC4 (1993) y PAC5 (1994) se recuperaron de granjas donde se presentaron signos respiratorios severos y meningoencefalitis en cerdos neonatos y también signos reproductivos en cerdos adultos (Reyes *et al.*, 2002). Las cepas PAC6-9 fueron aislados de cerdos en engorda y en reproductores, en estos animales se reportaron cuadros neurológicos severos (Cuadro 3) (Sánchez *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2014). La cepas Qro/93/2013 y Mich/147/2013, fueron aisladas recientemente por el grupo de trabajo del INIFAP, estas cepas fueron colectadas en granjas de cerdos con retraso en el crecimiento y con problemas respiratorios (Martínez *et al.*, 2014).

**Cuadro 3.** Número de mutaciones de aminoácidos en la proteína HN (Sánchez *et al.*, 2014).

	<b>LPMV</b>	<b>PAC2</b>	<b>PAC3</b>	<b>PAC4</b>	<b>PAC6</b>	<b>PAC7</b>	<b>PAC8</b>	<b>PAC9</b>
<b>PAC 2</b>	20	-						
<b>PAC 3</b>	24	4	-					
<b>PAC 4</b>	2	18	22	-				
<b>PAC 6</b>	22	28	<b>30</b>	20	-			
<b>PAC 7</b>	22	28	<b>30</b>	20	0	-		
<b>PAC 8</b>	20	26	38	18	2	2	-	
<b>PAC 9</b>	21	27	29	19	3	3	3	-

### 3.9. Diagnóstico de la EOA

La infección por el RVP se puede diagnosticar mediante una combinación del análisis de la historia y signos clínicos, serología, lesiones, aislamiento o detección molecular del virus.

El diagnóstico puede ser confirmado mediante el aislamiento del virus en cultivo celular. La detección del antígeno y ARN viral se ha realizado mediante hemaglutinación (HA), inmunofluorescencia (IF), RT-PCR y *q*RT-PCR (Allan *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 1996; McNeilly *et al.*, 1997; Wiman *et al.*, 1998; Nordengrahn *et al.*, 1999; Rivera *et al.*, 2013a).

La evaluación a nivel histológico puede ser de ayuda para establecer el diagnóstico, las lesiones que se observan son: encefalitis no supurativa, uveítis anterior, queratitis, orquitis y epididimitis, presencia de cuerpos de inclusión en tejido nervioso y epitelio córneo, además de neumonía intersticial (Stephano *et al.*, 1988; Kirkland, 2006; Rivera *et al.*, 2013).

### **3.10. Prevención y control de la EOA**

Para el control y erradicación de la EOA en las granjas positivas, se deben de implementar diferentes acciones que se basen en el diagnóstico y eliminación. Las pruebas para poblaciones, tales como inhibición de la hemaglutinación permiten la detección de animales convalecientes, es necesario complementar el diagnóstico serológico con pruebas que permitan la detección del agente viral, una de ellas puede ser la RT-PCR punto final y en tiempo real (Rivera *et al.*, 2013).

Existen en el mercado dos vacunas comerciales (Innovac Ojo Azul, AVIMEX, Reg. SAGARPA B0258-070 y Porcimune SOA, Lapisa, Reg. SAGARPA B-2083-017) de virus inactivado que se usan ampliamente para controlar la enfermedad del ojo azul. En ambos casos, los laboratorios productores recomiendan aplicar dos dosis con diferentes intervalos por vía intramuscular en cerdos sanos. No obstante de la aplicación de vacunas, se deben seguir estableciendo medidas pertinentes de bioseguridad, para evitar la entrada de esta enfermedad a las granjas.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

Evaluar la patogenia y virulencia de aislamientos recientes del *Rubulavirus porcino* en lechones lactantes.

### **4.2. Objetivos particulares**

- Valorar el cuadro clínico en lechones inoculados con diferentes aislamientos del RVP.
- Identificar la distribución del RVP en órganos asociados a sistema nervioso, respiratorio y linfático de lechones lactantes.
- Cuantificar la carga viral (virus infeccioso) en cultivos celulares a partir de órganos de lechones inoculados experimentalmente.
- Cuantificar la carga viral (copias de ARN viral) mediante *qRT-PCR* en órganos de lechones inoculados experimentalmente.
- Cuantificar la respuesta serológica producida en lechones inoculados experimentalmente.

## **5. Hipótesis**

Los aislamientos recientes de *Rubulavirus porcino* presentarán diferencias clínicas, serológicas y patológicas en comparación con la cepa de referencia aislada en el año de 1984.



## **6. Material y métodos**

### **6.1. Cepas virales**

Se emplearon tres diferentes cepas virales para la infección experimental, la cepa LPMV/1984, Qro/93/2013 y Mich/147/2013. La cepa LPMV/1984 fue aislada en un brote de la EOA en La Piedad, Michoacán, en donde se registraron cuadros neurológicos y alta mortalidad en cerdos en crecimiento y de engorda (Moreno *et al.*, 1986). La cepa Qro/93/2013 fue aislada en 2013, en una granja de ciclo completo en donde el cuadro clínico únicamente incluyó, retraso en el crecimiento y signos respiratorios en cerdos de crecimiento y engorda (Martínez *et al.*, 2014). La cepa Mich/147/2013 fue aislada en La Piedad, Michoacán en una granja que presentó cuadros respiratorios en cerdos en crecimiento (Martínez *et al.*, 2014). Las cepas empleadas en este estudio (aisladas en el año 2013), fueron caracterizadas genética y antigénicamente previamente. Ambas cepas pertenecen al genotipo parental, LPMV y PAC4 (Gómez *et al.*, 2014; Loeza, 2016).

Los aislados virales se replicaron en células PK-15 (riñón de cerdo), mantenidas en medio mínimo esencial de Dulbecco (D-MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino y con antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 mg/ml) (Reyes *et al.* 1997). La titulación de los lotes virales se realizó mediante el cálculo de dosis infecciosas en cultivo celular al 50%, empleando el método de Spearman-Kärber.

### **6.2 Animales de experimentación**

Se emplearon cuatro grupos experimentales de seis lechones cada uno. Los animales fueron recibidos a los 5 días de edad y se alojaron en las unidades de aislamiento del CENID-Microbiología Animal. Los lechones fueron colocados en una cama de paja, con clima controlado a 30° C. Se suministró alimentación artificial con sustituto de leche, cada cuatro horas, así como alimento preiniciador y agua a libre acceso. Los cerdos provenían de una granja libre de la EOA, misma que fue evaluada previamente mediante pruebas serológicas y qRT-PCR en tiempo real. Cada grupo fue ingresado con un intervalo de un mes entre grupo, en este intervalo de tiempo se realizó la descontaminación y reacondicionamiento del área.

### **6.3. Diseño e infección experimental**

Los procedimientos experimentales se llevaron de forma similar para cada grupo. Los grupos fueron identificados de acuerdo a la cepa con la cual fueron infectados experimentalmente, las identificaciones se presentan a continuación:

- G1-84, grupo de seis lechones inoculados con la cepa LMPV/1984 (cepa de referencia).
- G2-93, grupo de seis lechones inoculados con la cepa Qro/93/2013 (cepa aislada en el estado de Querétaro en el año 2013).
- G3-147, grupo de seis lechones inoculados con la cepa Mich/147/2013 (cepa aislada en el estado de Michoacán en el año 2013).
- G4-T, grupo de seis lechones empleados como testigos sin infectar.

La inoculación experimental se realizó por las vías (2.5ml) oral, (4ml) nasal y (1ml) ocular, respectivamente. La dosis viral empleada fue ajustada a un título de  $1 \times 10^6$  DICC<sub>50%</sub>/ml.

### **6.4. Evaluación clínica**

Desde su llegada y hasta la finalización de los ensayos, los cerdos fueron inspeccionados para identificar signos clínicos asociados a la infección experimental. Se registraron en la bitácora de trabajo los siguientes datos:

- Temperatura rectal.
- Peso corporal.
- Presencia de signos nerviosos (excitación, tremor, sialorrea, incoordinación, ataxia, opistótonos, postración y muerte).
- Presencia de signos respiratorios (estornudos, tos, disnea, secreciones nasales).
- Presencia de signos digestivos (anorexia, diarrea)
- Otros signos (depresión, secreciones oculares, conjuntivitis)

Cada signo fue considerado como ausente, asignando valor de cero, o presente asignando valor de uno, con esta valoración se logró cuantificar el puntaje clínico (valor de cero a 16 puntos), mismo que fue registrado en cada grupo experimental.

### **6.5. Colecta de muestras, necropsia y evaluación macroscópica**

Se colectaron muestras de sangre para la obtención de suero el día cero y cada tres días posterior a la infección experimental en todos los grupos analizados. Las necropsias fueron programadas para realizarse a los cinco, 10 y 15 días posinfección. La selección de los animales para necropsia fue el cuadro clínico o signos agudos de la enfermedad. La necropsia de los animales se realizó mediante sedación con azaperona y sobredosificación con pentobarbital sódico. En la necropsia se colectaron órganos del sistema nervioso central (encéfalo anterior, medio y posterior en los lóbulos derechos e izquierdos, cerebelo, plexo coroideo, nervio trigémino, médula oblonga y médula espinal), respiratorio (mucosa nasal, tráquea, bifurcación traqueal o tráquea posterior, lóbulo craneal, lóbulo medio, lóbulo caudal y lóbulo accesorio, de ambos pulmones) y linfático (timo, linfonodo cervical, retro faríngeo, parotídeo, submandibular, preescapular, mediastínico, traqueo bronquial, gastro hepático, mesentérico, inguinal, poplíteo, tonsila y bazo), mismos que fueron almacenados a  $-196^{\circ}$  C en nitrógeno líquido, para su posterior uso. En todos los grupos experimentales se registraron las lesiones macroscópicas.

### **6.6. Preparación de las muestras**

Se realizaron macerados de los órganos para emplearlos en el aislamiento viral y la cuantificación de ARN viral. El procedimiento se describe brevemente: las muestras de órganos fueron descongeladas de forma gradual, primero fueron transferidas del nitrógeno líquido a un ultracongelador, en donde permanecieron por dos horas, posteriormente se almacenaron en temperatura de refrigeración por una hora, y finalmente se descongelaron en un recipiente térmico durante 30 minutos. Se colectó un gramo de cada órgano y se colocó en un mortero a temperatura de  $-70^{\circ}$  C, se añadieron 4ml de DMEM (pH 7.2) frío. Se maceró con un pistilo y se decantó el sobrenadante en un tubo cónico de 15 ml. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos. Una alícuota del sobrenadante fue separada para la extracción de ARN, el fluido restante fue filtrado bajo condiciones estériles empleando una membrana de nitrocelulosa de 0.22 micras. Los fluidos filtrados y las alícuotas para la extracción de ARN fueron conservados a  $-70^{\circ}$  C hasta su uso.

## 6.7. Aislamiento y titulación viral

Los fluidos filtrados fueron empleados como inóculos, el procedimiento se describe a continuación: se sembraron placas de 96 pozos con la línea celular PK-15, se colocaron aproximadamente 10,000 células por pozo. Las placas fueron incubadas durante 24 horas empleando DMEM con 5% de suero fetal bovino. Los pozos de las placas fueron evaluados para confirmar el crecimiento celular y una confluencia del 80%, se retiró el medio de cultivo y se inocularon 50µl del filtrado estéril, una muestra en cada pozo de la línea A, posteriormente se realizaron diluciones decuples y dobles seriadas de cada una de las muestras hasta alcanzar la dilución  $10^{-5}$ . Se dejó adsorber durante 30 minutos y posteriormente se agregó MEM con 5% de TPB. Los pozos infectados y una serie de pozos sin infectar (control pozos 11 y 12) se revisaron diariamente, hasta alcanzar un periodo de incubación de cinco días y así, cuantificar el efecto citopático. Los sobrenadantes de las células en cultivo se extrajeron y se realizaron dos pases ciegos, posteriormente se determinó la cantidad de unidades hemaglutinantes por inóculo, empleando eritrocitos de pavo al 0.8%, bajo el esquema estándar descrito previamente por (Martínez *et al.*, 2006).

## 6.8. Cuantificación de la carga viral por qRT-PCR

El ARN total de los fluidos de macerados sin filtrar se extrajo empleando el kit de RNeasy Mini (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de 350 µl de muestra se obtuvo 80 µl de ARN total. El ensayo de qRT-PCR se llevó a cabo empleando el kit LightCycler 480 RNA master hydrolysis probes (ROCHE), con los siguientes volúmenes en la mezcla de reacción: iniciador delantero (10µM) 0.75µl, iniciador reverso (10µM) 0.75µl, sonda de hidrolisis (10µM) 0.5µl, activadores de la reacción 1.3µl, RNA master Mix 7.4 µl, reactivo para aumentar la eficiencia de la reacción (enhancer) 1.0µl y 1µl de cada muestra de ARN.

El programa consistió en: 63°C/15 min., transcripción inversa (900s), 95°C/30s, 95°C/10 s, 60°C/30s y 72°C/30 s., repitiendo 45 ciclos, estos últimos dos pasos para su amplificación.

La curva de calibración se realizó empleando un ARN sintético elaborado previamente en el laboratorio, el procedimiento fue realizado de acuerdo a lo descrito por Rivera *et al.*, 2013.

## **6.9. Inhibición de la hemaglutinación (IHA)**

Los sueros colectados fueron tratados térmicamente, se incubaron a 56° C durante 20 minutos, este procedimiento permite inactivar el complemento de la muestra. Posteriormente, los sueros fueron adsorbidos añadiendo 50µl de eritrocitos de pavo al 10% a una solución de suero diluido 1:2 con PBS en un volumen final de 100µl. Se añadieron 50µg de caolín, se homogenizó y se dejó reposar en refrigeración durante toda la noche. Al siguiente día se colectó el suero clarificado y se empleó para realizar diluciones dobles seriadas en una placa de fondo en U, se realizaron diluciones desde 1:10 hasta 1:1280, en un volumen final de 50µl. A cada pozo con los sueros diluidos se agregaron 50µl de *Rubulavirus porcino* (LPMV/84, Qro/93/2013, Mich/147/2013, respectivamente) ajustado a 8 unidades hemaglutinantes y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 50µl de eritrocitos de pavo al 0.8% y se realizaron las lecturas a los 30 minutos. El título de anticuerpos fue determinado como la última dilución en la que el suero fue capaz de inhibir la hemaglutinación del virus.

## 7. Resultados

### 7.1. Animales de experimentación

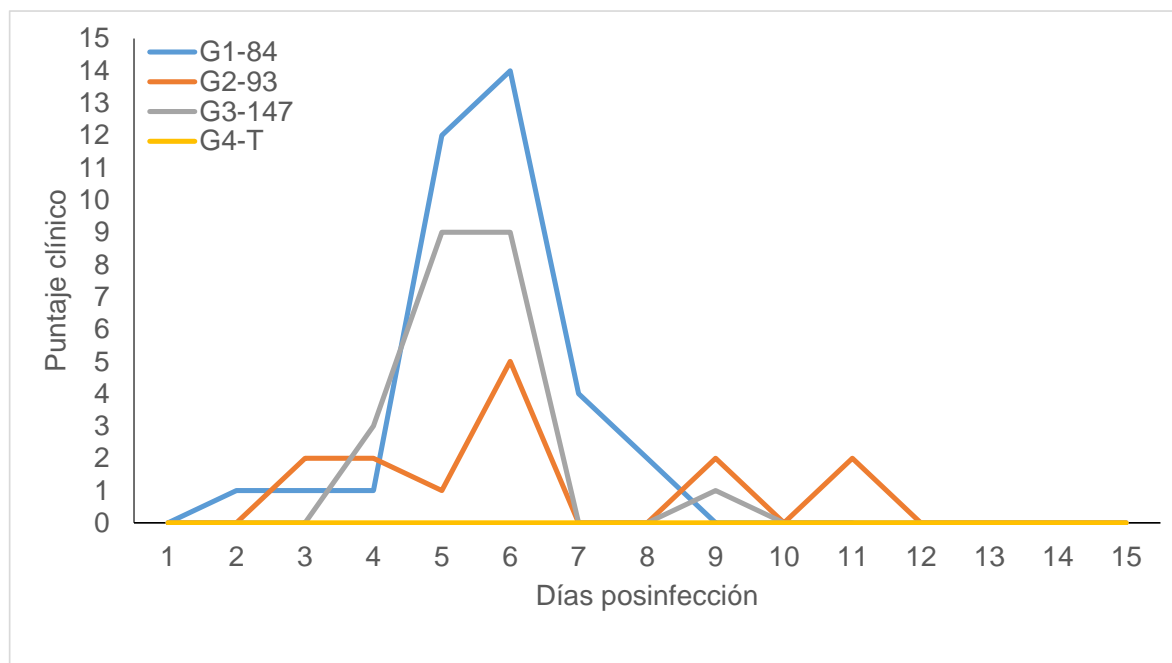
Los lechones se recibieron por grupos de seis cada uno. En el primer grupo (G1-84), dos de los lechones murieron a consecuencia de onfalitis, estos cerdos fueron excluidos del experimento, por lo que el G1-84 solo contó con cuatro cerdos. En el resto de los grupos no existieron problemas al iniciar cada experimento.

### 7.2. Infección experimental

La infección experimental se llevó a cabo por las vías y dosis mencionadas anteriormente. Se evaluó el estado de salud de cada lechón previo a la inoculación. Las madres de estos cerdos habían sido diagnosticadas como libres de la enfermedad del ojo azul, empleando pruebas serológicas y moleculares.

### 7.3. Signos clínicos

Posterior a la infección experimental, se detectaron signos clínicos asociados a la infección en los grupos G1-84, G2-93 y G3-147. El puntaje clínico observado se presenta en la Figura 2.

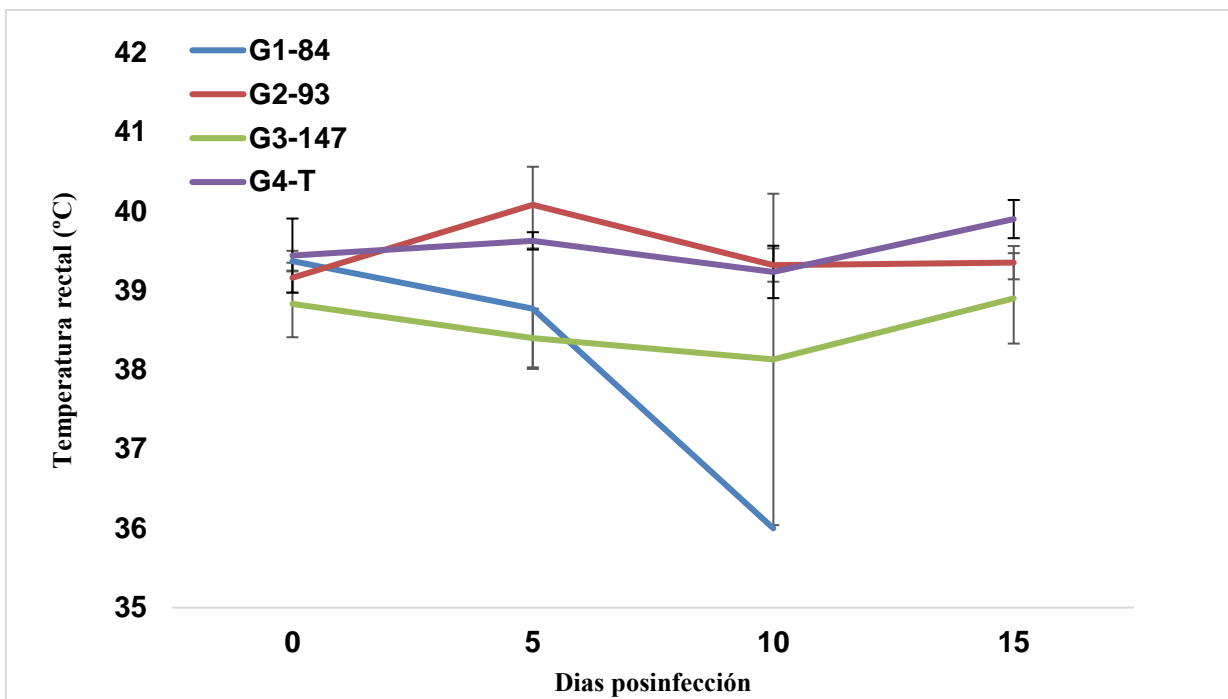


**Figura 2.** Puntaje clínico de los cerdos en los diferentes grupos de experimentación.

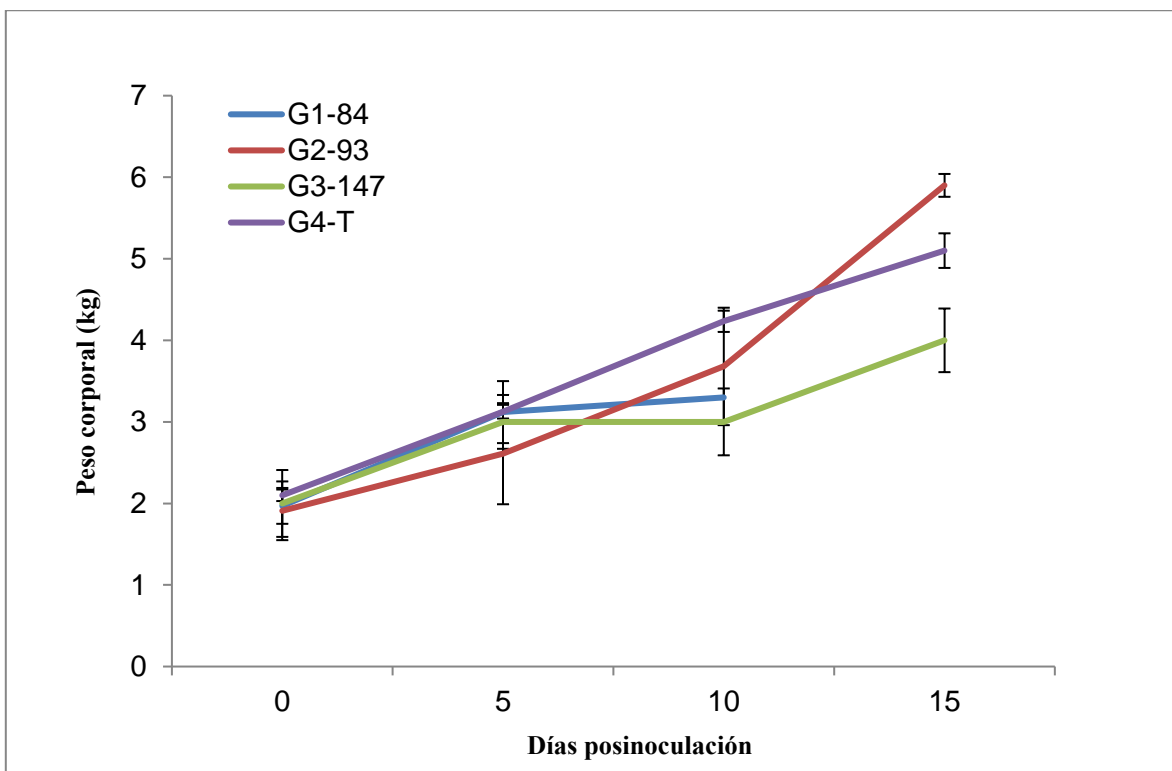
Brevemente, los cuatro lechones del G1-84 presentaron depresión, descargas nasales, diarrea, hundimiento ocular, lagañas, temblores musculares, sialorrea e incoordinación, a partir del cuarto dpi. Uno de los lechones inoculados mostró depresión, respiración rápida y corta acompañado de disnea y descarga nasal, al igual que hundimiento ocular y lagañas en ambos ojos, anorexia, espuma en la boca, incoordinación, opistótonos e hipotermia. De los seis lechones infectados en el G2-93, dos presentaron una ligera parálisis temporal del tren posterior, mismo que fue intermitente. Otros dos lechones presentaron uno o más signos de acuerdo a la clasificación previamente descrita, sin embargo, no se contabilizaron valores similares a los del G1-84. En el G3-147, los lechones mostraron signos moderados de la enfermedad, tres de los lechones presentaron hundimiento ocular y lagañas, así como temblores musculares e incoordinación leve.

La temperatura rectal de los diferentes grupos se presenta en la Figura 3. No existieron alteraciones relacionadas con un aumento excesivo de temperatura (fiebre), sin embargo, si se registraron valores de hipotermia. Estos datos están relacionados con los signos nerviosos (incoordinación y temores) y a la anorexia de los cerdos mayormente afectados.

Se registró el peso de los lechones durante el tiempo que permanecieron en experimentación. La tendencia de la ganancia de peso del G4-T fue lineal, en los G1-84 y G3-147 se registró una caída en la ganancia de peso a los 10 dpi, posteriormente el G3-147 recuperó peso, sin embargo no regresó a valores comparables con el G4-T. El G2-93 mostró una menor ganancia de peso a los cinco dpi, sin embargo, a los siguientes días de muestreo recuperaron peso, obteniendo valores más altos que el G4-T a los 15 dpi.



**Figura 3.** Temperatura rectal registrada en los cerdos durante el experimento.



**Figura 4.** Peso corporal promedio registrado en los diferentes grupos analizados.



#### 7.4. Necropsia y lesiones macroscópicas

Cada grupo de lechones inoculados y el grupo testigo fueron distribuidos para realizar la necropsia en tres diferentes tiempos, a los cinco, 10 y 15 dpi. La descripción de los hallazgos macroscópicos se presenta en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Lesiones macroscópicas observadas en los grupos experimentales.

Órganos/lesión	G1-84				G2-93						G3-147					
	5dpi		10 dpi		5dpi		10 dpi		15dpi		5 dpi		10dpi		15 dpi	
<u>Lechones No.</u>	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<b>Linfonodos</b>																
Congestión	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Aumento de tamaño	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Pulmón</b>																
Neumonía	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Congestión	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<b>Encéfalo y cerebelo</b>																
Congestión	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Edema	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<b>Otros</b>																
Vejiga pletórica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Líquido ascítico	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidropericardio	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Opacidad de la córnea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

dpi = días post inoculación

+ = Presento alteración

- = No presento alteración

En general en los grupos: G1-84, G2-93 y G3-147, en la necropsia se observó congestión y aumento de tamaño en linfonodos regionales (cervicales, parotídeos, inguinales, mediastínicos y mesentéricos). Se observaron cambios a nivel de tracto respiratorio, principalmente ligeras zonas neumónicas y de congestión en lóbulos medio y caudal. La vejiga urinaria se observó pletórica en todos los casos, sin alteraciones en riñón. En tracto digestivo no se observaron lesiones macroscópicas. En encéfalo y cerebelo se observó congestión de leve a moderada. En ningún caso se detectó opacidad de la córnea. En el G4-T no se detectaron lesiones macroscópicas relacionadas con las descritas en los grupos experimentales.

### 7.5. Serología

La serología se realizó empleando el antígeno viral similar al que fue inoculado, se utilizaron ocho unidades hemaglutinantes en la prueba. El punto de corte de la prueba fue 1:20, los sueros que obtuvieron un valor similar o mayor fueron considerados como positivos. Los títulos de anticuerpos obtenidos se presentan en los Cuadros 5, 6 y 7.

**Cuadro 5.** Título de anticuerpos registrado en el G1-84.

<b>Días posinfección</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>
<b>0</b>	10	0	10	0
<b>5</b>	10	0	0	10
<b>10</b>			<b>80</b>	<b>80</b>

L1= Lechón 1 L2= Lechón 2 L3= Lechón 3 L4= Lechón 4

**Cuadro 6.** Título de anticuerpos registrado en el G2-93.

<b>DPI</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>L6</b>
0	0	10	10	0	0	0
5	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	10	<b>20</b>	<b>40</b>
10			<b>20</b>	<b>20</b>	<b>160</b>	<b>20</b>
15					<b>160</b>	<b>320</b>

L1= Lechón 1 L2= Lechón 2 L3= Lechón 3 L4= Lechón 4 L5= Lechón 5 L6= Lechón 6

**Cuadro 7.** Título de anticuerpos registrado en el G3-147.

<b>DPI</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>L6</b>
0	0	0	10	0	0	0
5	0	0	10	0	0	0
10			10	0	0	0
15					640	0

L1= Lechón 1 L2= Lechón 2 L3= Lechón 3 L4= Lechón 4 L5= Lechón 5 L6= Lechón 6

### **7.6. Aislamiento viral y titulación en cultivo celular**

Se aisló y tituló el RVP en cultivos celulares, la titulación se realizó mediante efecto citopático y se confirmó mediante la prueba de hemaglutinación. Los resultados de cada grupo experimental se presentan por sistema analizado en los Cuadros 8, 9 y 10.

La distribución del RVP por cepa se presentó de forma homogénea. En el G1-84, el tracto respiratorio presentó una mayor proporción de muestras positivas (86%) a los cinco dpi. En el G2-93, los sistemas en donde se detectó el 100% de muestras positivas fueron el linfático y respiratorio a los 10 dpi y el nervioso a los 15 dpi. En el G3-147, se detectaron menor cantidad de muestras positivas, el sistema en donde se detectó la mayor proporción fue el nervioso, con un 22% a los 10 dpi.

**Cuadro 8.** Distribución del *Rubulavirus porcino* en órganos del sistema nervioso de lechones inoculados experimentalmente.

Grupo experimental/órgano analizado	5 días posinfección			10 días posinfección			15 días posinfección		
	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147
<b>Sistema nervioso</b>									
Encéfalo anterior derecho	*1/**1 (1.3)	ND	0/2	1/2 (1)	ND	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
Encéfalo anterior izquierdo	2/2 (1.5)	1/2 (1)	0/1	2/2 (1)	2/2 (1.3)	1/2 (1)	NA	1/1 (1.2)	0/2
Encéfalo medial derecho	2/2 (1.8)	ND	1/2 (1)	1/2 (1)	1/1 (1.2)	0/2	NA	1/1 (1.2)	1/2 (1)
Encéfalo medial izquierdo	1/1 (1.6)	0/1	0/2	2/2 (1)	2/2 (1.2)	1/2 (1.6)	NA	2/2 (1.2)	0/2
Encéfalo posterior derecho	1/1 (1)	ND	0/1	2/2 (1)	2/2 (1.2)	1/2 (1)	NA	ND	1/2 (1)
Encéfalo posterior izquierdo	1/1 (1)	ND	0/2	1/2 (1)	1/2 (1.2)	0/2	NA	1/1 (1.2)	2/2 (1)
Cerebelo	1/2 (1.6)	0/1	0/2	1/2 (1)	2/2 (1.2)	1/2 (1)	NA	2/2 (1.2)	0/2
Plexo coroideo	0/1	0/1	0/2	1/2 (1)	1/2 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1)	0/2
Nervio trigémino	0/1	0/1	0/2	1/2 (1)	1/1 (1)	0/2	NA	2/2 (1)	0/2
Médula oblonga	1/2 (1)	ND	0/2	1/1 (1)	2/2 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
Médula espinal	1/2 (1)	0/1	1/2 (1)	1/2 (1)	1/1 (1.2)	1/2 (1)	NA	ND	0/2
<b>Total muestras positivas/total de muestras analizadas</b>	<b>11/16</b>	<b>1/7</b>	<b>2/20</b>	<b>14/21</b>	<b>15/17</b>	<b>5/22</b>		<b>15/15</b>	<b>4/24</b>
<b>Porcentaje de positivos</b>	<b>68%</b>	<b>14%</b>	<b>10%</b>	<b>66%</b>	<b>88%</b>	<b>22%</b>		<b>100%</b>	<b>18%</b>
<b>Título viral promedio (Log<sub>10</sub>)/total de muestras analizadas</b>	<b>0.81</b>	<b>0.14</b>	<b>0.10</b>	<b>0.66</b>	<b>1.10</b>	<b>0.24</b>		<b>1.13</b>	<b>0.18</b>

Las muestras con efecto citopático al segundo pase y con título hemaglutinante superior a 1:10 fueron consideradas como positivas al aislamiento viral. Entre paréntesis se muestra el promedio del título en logaritmo base 10.

\*: Muestras positivas.

\*\* : Muestras analizadas.

(\*/\*\*: Muestras positivas/ muestras analizadas)

NA: No Aplica      ND: No Determinado

**Cuadro 9.** Distribución del *Rubulavirus porcino* en órganos del sistema linfático de lechones inoculados experimentalmente.

Grupo experimental/órgano analizado	5 días posinfección			10 días posinfección			15 días posinfección		
	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147
<b>Sistema linfático</b>									
Timo	*0/**2	ND	0/2	ND	1/1 (1.2)	0/2	NA	1/2 (1.2)	1/2 (1)
L. cervical	2/2 (1)	1/1 (1)	0/1	0/2	1/1 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/1
L. retro faríngeo	ND	ND	0/2	2/2 (1)	ND	0/2	NA	0/1	0/1
L. parotideo	0/1	0/1	0/2	1/2 (1)	2/2 (1)	0/1	NA	2/2 (1)	0/2
L. submaxilar	2/2 (1.2)	ND	0/2	2/2 (1.3)	ND	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
L. preescapular	0/1	ND	0/1	ND	ND	0/1	NA	2/2 (1.2)	0/1
L. mediastínico	2/2 (1.4)	ND	0/2	0/1	1/1 (1)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
L. traqueo bronquial	0/1	0/1	0/1	2/2 (1)	2/2 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
L. gastro-hepático	1/2 (1)	0/1	0/2	1/2 (1)	1/1 (1)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
L. mesentérico	2/2 (1)	1/2 (1)	1/2 (1)	0/2	1/1 (1.2)	0/1	NA	2/2 (1.2)	1/2 (1)
L. inguinal	2/2 (1)	1/2 (1)	0/2	1/2 (1)	1/1 (1.2)	1/2 (1)	NA	2/2 (1.2)	0/2
L. poplíteo	1/2 (1)	1/1 (1)	0/2	0/1	1/1 (1)	0/2	NA	0/1	0/2
Tonsila	2/2 (1.5)	2/2 (1)	0/2	1/2 (1)	2/2 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
Bazo	2/2 (1)	1/2 (1)	0/2	1/2 (1)	2/2 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
<b>Total muestras positivas/total de muestras analizadas</b>	<b>16/22</b>	<b>7/13</b>	<b>1/25</b>	<b>11/22</b>	<b>15/15</b>	<b>1/25</b>		<b>23/26</b>	<b>2/25</b>
<b>Porcentaje de positivos</b>	<b>72%</b>	<b>53%</b>	<b>4%</b>	<b>50%</b>	<b>100%</b>	<b>4%</b>		<b>88%</b>	<b>8%</b>
<b>Título viral promedio (Log<sub>10</sub>)/total de muestras analizadas</b>	<b>0.85</b>	<b>0.58</b>	<b>0.08</b>	<b>0.62</b>	<b>1.12</b>	<b>0.04</b>		<b>1.04</b>	<b>0.08</b>

Las muestras con efecto citopático al segundo pase y con título hemaglutinante superior a 1:10 fueron consideradas como positivas al aislamiento viral. Entre paréntesis se muestra el promedio del título en logaritmo base 10.

\*: Muestras positivas. \*\*: Muestras analizadas. (\*/\*\*: Muestras positivas/ muestras analizadas) NA: No Aplica ND: No Determinado

**Cuadro 10.** Distribución del *Rubulavirus porcino* en órganos del sistema respiratorio de lechones inoculados experimentalmente.

Grupo experimental/órgano analizado	5 días posinfección			10 días posinfección			15 días posinfección		
	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147
<b>Sistema respiratorio</b>									
Mucosa nasal	*2/**2 (1)	1/1 (1)	0/2	0/1	1/1 (1)	0/2	NA	1/1 (1)	0/2
Tráquea	ND	1/2 (1)	0/2	1/1 (1)	ND	0/2	NA	ND	0/2
Bifurcación traqueal	1/1 (1)	1/2 (1)	1/2 (1)	0/1	1/1 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1)	0/2
Lóbulo craneal derecho	1/2 (1.3)	1/2 (1)	0/2	ND	1/1 (1.3)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
Lóbulo craneal izquierdo	1/2 (1)	2/2 (1)	1/2 (1)	0/1	2/2 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/1
Lóbulo medio derecho	2/2 (1.2)	2/2 (1.2)	0/2	1/1 (1)	1/1 (1.2)	1/2 (1)	NA	2/2 (1.2)	0/1
Lóbulo medio izquierdo	2/2 (1)	1/1 (1)	0/2	1/2 (1)	1/1 (1.3)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
Lóbulo caudal derecho	1/1 (1)	2/2 (1)	2/2 (1.2)	1/2 (1)	1/1 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
Lóbulo caudal izquierdo	1/1 (1.9)	1/1 (1)	0/2	2/2 (1)	2/2 (1.2)	0/2	NA	2/2 (1.2)	0/2
Lóbulo accesorio	2/2 (1.4)	1/1 (1)	0/2	1/2 (1)	1/1 (1.2)	0/2	NA	1/1 (1.2)	0/2
<b>Total muestras positivas/total de muestras analizadas</b>	<b>13/15</b>	<b>13/16</b>	<b>4/20</b>	<b>7/13</b>	<b>11/11</b>	<b>1/20</b>		<b>16/16</b>	<b>0/18</b>
<b>Porcentaje de positivos</b>	<b>86%</b>	<b>81%</b>	<b>20%</b>	<b>53%</b>	<b>100%</b>	<b>5%</b>		<b>100%</b>	<b>0%</b>
<b>Título viral promedio (Log<sub>10</sub>)/total de muestras analizadas</b>	<b>0.94</b>	<b>0.85</b>	<b>0.21</b>	<b>0.53</b>	<b>1.18</b>	<b>0.05</b>		<b>1.13</b>	<b>0</b>

Las muestras con efecto citopático al segundo pase y con título hemaglutinante superior a 1:10 fueron consideradas como positivas al aislamiento viral. Entre paréntesis se muestra el promedio del título en logaritmo base 10.

\*: Muestras positivas.

\*\* : Muestras analizadas.

(\*/\*\*: Muestras positivas/ muestras analizadas)

NA: No Aplica      ND: No Determinado

### **7.7. RT-PCR en tiempo real cuantitativa**

A partir de los macerados de órganos se cuantificó la carga de ARN viral. La presencia del ARN viral se detectó en la mayoría de los órganos, sin embargo la carga viral en cada grupo experimental fue diferente. Los resultados se presentan en los Cuadros 12, 13 y 14 y en Anexo. En sistema nervioso se detectó la mayor carga viral promedio (7.79 Log 10) en el G1-84 a los cinco dpi. En sistema linfático se detectó la mayor carga viral promedio (7.57 Log 10) en el G1-84 a los cinco dpi. En sistema respiratorio se detectó la mayor carga viral promedio (7.02 Log 10) en el G3-147 a los cinco dpi. Los grupos con menor carga viral fueron, G3-147, en sistema nervioso y respiratorio y el G2-93 en sistema linfático, a los 15 dpi en ambos casos.

**Cuadro 11.** Distribución y cuantificación del ARN del *Rubulavirus porcino* en órganos del sistema nervioso de lechones inoculados experimentalmente.

Grupo experimental/órgano analizado	5 días posinfección			10 días posinfección			15 días posinfección		
	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147
<b>Sistema nervioso</b>									
Encéfalo anterior derecho	2/2 (9.69)	1/2 (9.83)	2/2 (8.66)	2/2 (8.11)	1/2 (8.55)	1/2 (8.47)	NA	1/2 (3.83)	0/2
Encéfalo anterior izquierdo	2/2 (8.33)	1/1 (9.73)	1/1 (9.41)	1/2 (8.09)	0/2	1/2 (9.92)	NA	1/1 (4)	0/2
Encéfalo medial derecho	2/2 (8.55)	0/1	2/2 (6.67)	2/2 (8.40)	1/2 (4.94)	1/2 (7.53)	NA	ND	0/2
Encéfalo medial izquierdo	2/2 (8.28)	1/1 (7.21)	1/2 (7.61)	2/2 (7.23)	1/2 (8.24)	1/2 (9.40)	NA	1/2 (3.94)	0/2
Encéfalo posterior derecho	2/2 (7.63)	1/2 (7.38)	1/1 (5.42)	2/2 (6.79)	0/1	1/2 (9.54)	NA	ND	0/2
Encéfalo posterior izquierdo	2/2 (6.75)	2/2 (6.62)	2/2 (6.44)	1/2 (5.89)	1/2 (7.14)	1/2 (7.25)	NA	0/1	2/2 (5.76)
Cerebelo	2/2 (6.80)	2/2 (5.40)	2/2 (6.79)	2/2 (7.01)	1/2 (5.43)	1/2 (6.90)	NA	0/2	0/2
Plexo coroideo	1/1 (6.33)	0/1	2/2 (5.28)	2/2 (6.09)	1/2 (3.92)	1/2 (4.92)	NA	0/2	0/2
Nervio trigémino	ND	0/1	1/2 (5.10)	1/2 (6.16)	0/1	2/2 (6.79)	NA	0/2	0/2
Médula oblonga	1/1 (7.51)	0/1	2/2 (6.19)	2/2 (8.72)	1/2 (5.25)	1/2 (6.03)	NA	0/2	0/2
Médula espinal	2/2 (7.12)	1/2 (4.37)	2/2 (5.82)	1/2 (4.70)	0/1	1/2 (5.63)	NA	0/1	1/2 (5.49)
<b>Total muestras positivas/total de muestras analizadas</b>	<b>18/18</b>	<b>9/16</b>	<b>18/20</b>	<b>18/22</b>	<b>7/19</b>	<b>12/22</b>		<b>3/15</b>	<b>3/22</b>
<b>Porcentaje de positivos</b>	<b>100%</b>	<b>56%</b>	<b>90%</b>	<b>81%</b>	<b>36%</b>	<b>54%</b>		<b>20%</b>	<b>13%</b>
<b>Carga viral promedio (número de copias de ARN/ml expresado en Log<sub>10</sub>)/total de muestras analizadas</b>	<b>7.79</b>	<b>3.91</b>	<b>5.96</b>	<b>5.89</b>	<b>2.29</b>	<b>4.05</b>		<b>0.79</b>	<b>0.77</b>

Entre paréntesis se muestra el promedio del número de copias de ARN/ml expresado en Log<sub>10</sub>.

\*: Muestras positivas. NA: No Aplica ND: No Determinado

\*\* : Muestras analizadas.

(\*/\*\*: Muestras positivas/ muestras analizadas)



**Cuadro 12.** Distribución y cuantificación del ARN del *Rubulavirus porcino* en órganos del sistema linfático de lechones inoculados experimentalmente.

Grupo experimental/órgano analizado	5 días posinfección			10 días posinfección			15 días posinfección		
	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147
<b>Sistema linfático</b>									
Timo	ND	0/2	0/2	ND	0/2	0/2	NA	ND	1/2 (5.63)
L. cervical	2/2 (9.05)	0/1	1/1 (5.75)	2/2 (9.05)	0/1	1/1 (5.75)	NA	1/2 (3.82)	0/1
L. retro faríngeo	ND	ND	1/1 (6.01)	ND	ND	1/1 (6.01)	NA	0/1	0/1
L. parotideo	1/1 (7.49)	1/1 (6.87)	1/2 (6.43)	1/1 (7.49)	1/1 (6.87)	1/2 (6.43)	NA	0/2	0/2
L. submandibular	2/2 (8.10)	2/2 (6.67)	2/2 (6.62)	2/2 (8.10)	2/2 (6.67)	2/2 (6.62)	NA	0/2	0/2
L. preescapular	1/1 (9.96)	1/1 (7.14)	1/1 (5.79)	1/1 (6.96)	1/1 (7.14)	1/1 (5.79)	NA	0/2	0/2
L. mediastínico	2/2 (7.18)	0/1	2/2 (6.33)	2/2 (7.18)	0/1	2/2 (6.33)	NA	0/2	0/2
L. traqueo bronquial	1/1 (8.15)	1/1 (6.28)	1/1 (5.21)	1/1 (8.15)	1/1 (6.28)	1/1 (5.21)	NA	1/2 (3.94)	0/2
L. gastro-hepático	1/1 (6.43)	1/1 (5.97)	1/2 (5.74)	1/1 (6.43)	1/1 (5.97)	1/2 (5.74)	NA	0/2	1/2 (4.71)
L. mesentérico	2/2 (7.05)	0/1	1/2 (5.05)	2/2 (7.05)	0/1	1/2 (5.05)	NA	1/2 (3.76)	0/2
L. inguinal	1/1 (6.94)	1/2 (6.36)	2/2 (6.58)	1/1 (6.94)	1/2 (6.36)	2/2 (6.58)	NA	0/2	1/2 (5.15)
L. poplíteo	2/2 (7.54)	1/1 (6.93)	2/2 (5.74)	2/2 (7.54)	1/1 (6.93)	2/2 (5.74)	NA	0/1	0/2
Tonsila	1/1 (8.29)	1/2 (7.70)	2/2 (6.92)	1/1 (8.29)	1/2 (7.70)	2/2 (6.92)	NA	0/2	0/2
Bazo	1/1 (6.62)	2/2 (5.38)	2/2 (6.47)	1/1 (6.62)	2/2 (5.38)	2/2 (6.47)	NA	0/2	0/1
<b>Total muestras positivas/total de muestras analizadas</b>	<b>15/17</b>	<b>11/18</b>	<b>19/24</b>	<b>17/17</b>	<b>11/18</b>	<b>21/22</b>		<b>3/24</b>	<b>3/25</b>
<b>Porcentaje de positivos</b>	<b>88%</b>	<b>61%</b>	<b>79%</b>	<b>100%</b>	<b>61%</b>	<b>95%</b>		<b>12%</b>	<b>12%</b>
<b>Carga viral promedio (número de copias de ARN/ml expresado en Log<sub>10</sub>)/total de muestras analizadas</b>	<b>7.57</b>	<b>3.96</b>	<b>4.89</b>	<b>4.93</b>	<b>2.02</b>	<b>2.35</b>		<b>0.48</b>	<b>0.62</b>

Entre paréntesis se muestra el promedio del número de copias de ARN/ml expresado en Log<sub>10</sub>.

\*: Muestras positivas. \*\*: Muestras analizadas. (\*/\*\*: Muestras positivas/ muestras analizadas) NA: No Aplica ND: No Determinado

**Cuadro 13.** Distribución y cuantificación del ARN del *Rubulavirus porcino* en órganos del sistema respiratorio de lechones inoculados experimentalmente.

Grupo experimental/órgano analizado	5 días posinfección			10 días posinfección			15 días posinfección		
	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147	G1-84	G2-93	G3-147
<b>Sistema respiratorio</b>									
Mucosa nasal	2/2 (6.86)	2/2 (5.55)	2/2 (7.29)	1/1 (4.95)	0/1	0/2	NA	1/1 (3.74)	1/1 (5.13)
Tráquea	ND	1/2 (4.15)	2/2 (5.63)	1/2 (4.92)	0/1	0/2	NA	ND	0/2
Bifurcación traqueal	1/1 (8.31)	1/1 (7.62)	2/2 (6.04)	1/1 (5.58)	1/2 (5.49)	1/2 (6.76)	NA	0/2	0/2
Lóbulo craneal derecho	1/1 (7.05)	2/2 (9.24)	2/2 (8.87)	ND	1/2 (4.60)	2/2 (7.58)	NA	0/2	0/2
Lóbulo craneal izquierdo	1/1 (7.88)	2/2 (7.31)	2/2 (5.63)	ND	1/2 (5.67)	0/2	NA	0/2	0/1
Lóbulo medio derecho	2/2 (6.51)	1/1 (10.44)	2/2 (8.59)	1/1 (5.02)	0/1	1/2 (8.53)	NA	0/2	1/1 (5.49)
Lóbulo medio izquierdo	2/2 (6.65)	0/1	2/2 (7.67)	1/1 (5.73)	0/1	0/1	NA	1/2 (3.77)	1/2 (5.74)
Lóbulo caudal derecho	ND	1/1 (10.23)	2/2 (8.03)	1/1 (5.16)	1/2 (6.26)	1/2 (7.51)	NA	0/2	0/2
Lóbulo caudal izquierdo	1/1 (6.10)	1/1 (10.08)	1/2 (6.97)	1/1 (5.15)	0/2	1/2 (6.16)	NA	1/2 (3.77)	0/2
Lóbulo accesorio	2/2 (7.19)	2/2 (9.23)	2/2 (9.03)	2/2 (6.95)	0/2	1/2 (5.59)	NA	1/1 (3.89)	0/2
<b>Total muestras positivas/total de muestras analizadas</b>	<b>12/12</b>	<b>13/15</b>	<b>19/20</b>	<b>9/10</b>	<b>4/16</b>	<b>7/19</b>		<b>4/16</b>	<b>3/17</b>
<b>Porcentaje de positivos</b>	<b>100%</b>	<b>86%</b>	<b>95%</b>	<b>90%</b>	<b>25%</b>	<b>36%</b>		<b>25%</b>	<b>17%</b>
<b>Carga viral promedio (número de copias de ARN/ml expresado en Log<sub>10</sub>)/total de muestras analizadas</b>	<b>6.98</b>	<b>7.01</b>	<b>7.02</b>	<b>5.04</b>	<b>1.37</b>	<b>2.62</b>		<b>0.95</b>	<b>0.91</b>

Entre paréntesis se muestra el promedio del número de copias de ARN/ml expresado en Log<sub>10</sub>.

\*: Muestras positivas. NA: No Aplica ND: No Determinado

\*\* : Muestras analizadas.

(\*/\*\*: Muestras positivas/ muestras analizadas)

## 8. Discusión

La enfermedad del ojo azul fue descrita por primera vez por Stephano *et al.* (1981), a principios de la década de 1980. El agente etiológico fue caracterizado como un paramixovirus hemaglutinante y fue nombrado paramixovirus porcino (PPMV). Posteriormente, Moreno *et al.*, (1986), aislaron y caracterizaron al PPMV y lo nombraron virus de La Piedad Michoacán (LPMV), en ambos casos se aisló y caracterizó al agente etiológico, sin embargo las descripciones de los signos que causaban eran de los cuadros clínicos reportados en campo.

Posteriormente bajo condiciones experimentales, el cuadro fue reproducido y se logró identificar que el LPMV causaba un cuadro neurológico en lechones lactantes (Moreno *et al.*, 1986; Stephano *et al.*, 1988), reportaron un cuadro clínico similar, coincidiendo ambos autores que la opacidad de la córnea es un evento poco común. En el presente trabajo no fue posible identificar a ningún cerdo con este signo, sin embargo si se detectaron cuadros neurológicos en los diferentes grupos experimentales, siendo más evidentes en el G1-84 y el G3-147. La característica de producir alteraciones nerviosas, se mantiene presente en cepas virales de reciente aislamiento (Mich/147/2013).

En pocos casos se presentaron alteraciones respiratorias, esto puede deberse probablemente al corto periodo en que fue evaluada la virulencia de las cepas virales y a la edad de los lechones empleados. Se ha descrito, anteriormente, que cerdos de mayor edad pueden ser afectados por el RVP a nivel respiratorio (Rivera *et al.*, 2013). De acuerdo al puntaje clínico, temperaturas rectales, ganancia de peso y lesiones macroscópicas, se determinó que los grupos G1-84 y G3-147, fueron los que resultaron más afectados clínicamente. Estas cepas virales fueron aisladas de La Piedad, Michoacán, las características clínicas que se presentaron pueden estar relacionadas por tratarse de virus aislados de la misma región. Sin embargo, la granja en donde se aisló la cepa Mich/147/2013 no presentaba cuadros clínicos agudos de la EOA, esta situación puede deberse a que la infección se ha establecido endémica y la inmunidad de la granja mantiene una baja prevalencia de signos asociados.

La respuesta serológica reportada en este estudio fue menor a estudios previos. En estudios de infección experimental se ha reportado la seroconversión de los grupos experimentales desde los 5-7 dpi (Hernández *et al.*, 1998; Reyes *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 2013a,b), en este

estudio se evidenció en diferentes dpi y con bajos títulos, esta situación se puede asociar a la baja capacidad de los lechones de montar una respuesta inmune frente a infecciones agudas.

El aislamiento viral, título y carga de ARN viral se registraron en todos los grupos experimentales, se presentaron valores más altos en los primeros días posinfección. En el G2-93 se mantuvo la positividad con valores altos a los 15 dpi, en otros estudios se ha reportado la persistencia del virus en cerdos por periodos prolongados posterior a la infección experimental (Cuevas *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2013a). En el presente estudio, debido a la corta duración esta evaluación no fue posible, sin embargo los resultados son similares a los reportados por Allan *et al.*, (1996), quienes señalan la distribución del RVP en cerdos de tres y 18 días de edad. El tropismo del virus puede verse afectado por la presencia del receptor específico NeuAc  $\alpha$ 2-3 galactosa, el cual se distribuye de acuerdo a la edad, en lechones neonatos es más común en sistema nervioso, conforme los cerdos maduran la distribución aumenta en sistema respiratorio, en cerdos en crecimiento y en sistema reproductor, en cerdos adultos (Vallejo *et al.*, 2000).

En el presente estudio, de acuerdo al cuadro clínico registrado y a la carga viral se observó que el sistema nervioso, respiratorio y linfático son sitios de replicación del RVP.

Con base en lo registrado se determinó que la virulencia de nuevos aislamientos mantiene sus características, mismas que fueron reportadas hace más de 30 años.

## 9. Conclusiones

- Se reprodujo el cuadro clínico de la enfermedad del ojo azul empleando nuevos aislamientos virales.
- Se observaron diferencias clínicas en el G2-93, con respecto a la cepa de referencia LPMV/1984.
- La distribución del *Rubulavirus porcino* fue diferente entre los grupos analizados.
- Las cepas aisladas en La Piedad, Michoacán conservan las mismas características de virulencia, después de 30 años de su primera descripción.
- La cepa Qro/93/2013 no provocó un cuadro agudo de la enfermedad, esta característica puede deberse al origen geográfico, por lo que se comprueba la hipótesis planteada en el presente trabajo.

## 10. Referencias bibliográficas

1. Moreno-López J, Correa-Girón JP, Martínez A, Ericsson A. (1986). *Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico*. Arch. Virol. 91: 221-231.
2. Stephano H., A; Gay G., M.; Ramirez., C. y Maqueda A., J. J., (1981)., *Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante*. Mem. XVII Convención AMVEC- Ixtapa 81. Gro., del 1 al 5 de julio.
3. Reyes-Leyva J, García-Morales O, Santos-López G, Vallejo V, Ramírez-Mendoza H, Hernández J. (2004). *Detección de la viremia en la infección experimental por Rubulavirus porcino*. Arch. Med. Vet. 2004; 36: 39-47.
4. Reyes-Leyva J, Santos G, Hernández J, Espinoza B, Borrás MT, Ramírez H, Vallejo V, Zenteno E. (2002). *Mecanismos moleculares de la patogenicidad viral, Estudios con el Rubulavirus Porcino*. In: Cea-Bonilla A, Arenal-Mena IP, Reveros-Rosas H, Vázquez-Contreras E. Mensaje Bioquímico XXVI. Depto. Bioquímica. Fac. Medicina. UNAM. México DF. Pp. 99-129.
5. Rivera-Benítez F., Martínez-Bautista R., García A., Reyes-Leyva, J., Hernández J., Ramírez M.H. (2009): *Persistencia del A. Rubulavirus porcino en semen de verracos infectados experimentalmente.*; Memorias XLIV Congreso Nacional AMVEC, Puerto Vallarta, Jal., Méx., 22 -25 Julio: p. 171.
6. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, (1988), *Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection*. Vet Rec 122:6-10
7. Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jáuregui P, Reyes-Leyva J, Zenteno E, Moreno-López J, Kennedy S. (1997), *Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus*. J Comp Pathol. 1997 Oct; 117(3):237-252.

8. Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez H, Hernández-Jauregui P, Zenteno E, (1998), *Immunity to porcine Rubulavirus infection in adult swine. Veterinary Immunology and Immunopathology.* 64: 367-381.
9. Rivera -Benítez, F., Martínez- Bautista, R., García, A., Reyes -Leyva, J., Hernández J., Ramírez, M. H.,(2009), *Evaluación de pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad del ojo azul.*; Mem. XLIV Cong. Nal. AMVEC, Puerto Vallarta, Jal., Méx., 22- 25 Julio: p. 175.
10. Escobar-López AC, Rivera-Benítez J F, Castillo-Juárez H, Ramírez-Mendoza, H, Trujillo-Ortega ME, Sánchez-Betancourt JI. (2011) *Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in sera of Field Swine and their Seroprevalence. Transboundary and Emerging Diseases.*
11. Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo ME, Fraire BI. (1992). *Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana.* Veterinaria México, 23:37-39.
12. Martínez Lara A., Correa GP, Zamora GJ. (2006). *La enfermedad del ojo azul producida por el rubulavirus porcino.* Libro técnico No. 1. INIFAP. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. 46 p.
13. Sánchez Betancourt., (2008), *"Implicaciones de la variabilidad genética y antigénica del virus de ojo azul"*, AMVEC 6to congreso.
14. Martínez Lara A., Coba M.A., Gómez L., Diosdado F., Córdova D., Socci G., Cuevas S., Santiago J., Carrera E., Zapata L., (2014), *" Isolation of BEDV from pigs with respiratory diseases, decreased growth rates, and without characteristic signs of BED"*, AMVEC 23rd International Pig Veterinary Society(IPVS) Congress, pág. 326.
15. Gómez-Núñez L, Martínez-Pereyra DA, Diosdado-Vargas F, Socci-Escatell G, Valera-González E, Martínez-Lara AC. (2014). *Caracterización antigénica y molecular de nuevas variantes del rubulavirus porcino.* Mem. 1er Congreso Nacional de Investigaciones Microbiológicas, del 26 al 28 de noviembre, Puebla, Pue.

16. Cuevas-Romero S., Rivera-Benítez J. F., A.-L. Blomström, M. Ramliden.,(2016)., *Molecular characterisation of Porcine rubulavirus (PorPV) isolates from different outbreaks in Mexico.*, in *Virus Genes* ., México – Toluca
17. Kirkland PD, Stephano A. (2006) Paramyxoviruses: *Rubulavirus, Menangle* and *Nipha* virus infections. In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D. *Diseases of swine*, 9<sup>th</sup>edn, pp. 455-459. Blackwell Publishing, USA.
18. Morilla. M., Gonzalez D. -Vega, E. Estrada, F. Diosdado., (2002), in *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, ed. by A. Morilla, K. Yoon, J. Zimmerman (Iowa State University Press, Ames, p. 59 [CrossRef](#)
19. Cuevas – Romero S., (2012)., *Detección de portadores de la enfermedad del Ojo Azul mediante PCR - tiempo real*, Mexico- Toluca CENID MICROBIOLOGIA ANIMAL., AMVEC
20. Martínez A., Diosdado Vargas F., Rivera Benítez F., Valera González. E., (2016), *Enfermedad del ojo azul de los Porcinos.*, Folleto técnico No.1 INIFAP CENID MICROBIOLOGIA ANIMAL, 24p.
21. Sundqvist, A., M. Berg, P. Hernández-Jáuregui, T. Linne, J. Moreno-Lopez. (1991), *The haemagglutinin-neuraminidase gene of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxovirus revealed the closest to simian virus 5 and mumps virus.* *Arch. Virol.* 122: 331-340.
22. Berg M., Hjertner B, Moreno-López J, Linné T. (1992). *The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides, P, V and C, the P protein mRNA,* is edited. *J. Gen. Virol.* 73: 1195-1200.
23. Stephano, H.A. (1999). *Blue eye disease.* In: B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengelin, D.J. Taylor. *Diseases of swine.* 8<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa. Iowa State University Press. Pp 103-112.
24. Wang, L. F., Hansson, E., Yu, M., Chua, B., Mathe, N., Crameri, G., Rima, K., Moreno-L. J., Eaton, T., (2007), *Arch. Virol.* 152, 7
25. Lamb, R.A., D. Kolakofsky. (1996). *Paramyxoviridae: The viruses and their replication.* In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley y col. *Fields Virology.* Third ed. Lippincott- Raven Publishers, E.U.A.

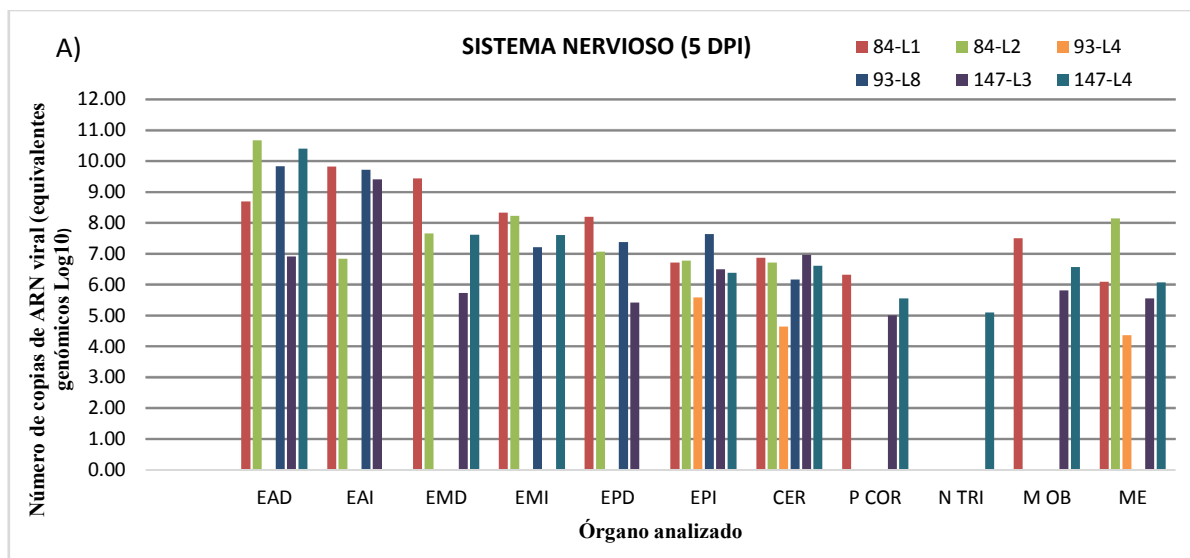


26. Hernández J, Reyes-Leyva J, Ramírez H, Valenzuela O, Zenteno E. (2004) *Características de la respuesta inmune de los cerdos infectados con el Rubulavirus porcino*. Veterinaria México. 35: 65-71.
27. Linne, T., M. Berg, A.-C. Bergvall, B. Hjertner, J. Moreno-Lopez. (1992). *The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV*. Vet. Microbiol. 33: 263-273.
28. Santos-López G, Hernández J, Borraz-Argüello M, Ramírez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. (2004). *Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino*. Arch. Med. Vet.; 36(2): 119-136.
29. Svenda, M., B. Hjertner, T. Linne, M. Berg. (2002). *Both the P and V proteins of the porcine rubulavirus LPMV interact with the NP protein via their respective C-terminal unique parts*. VirusRes. 83(1-2):31-41.
30. Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linné T, Moreno-López J, Hernández P, Kennedy S, Carroll BP, Herron B, Foster JC, Adair B. (1996). *A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation*. J Vet Diagn Invest. Oct; 8(4):405-413.
31. Ramírez-Herrera, M.A., M.L. Mendoza-Magaña, S.H. Dueñas. (1997). *Experimental infection of swine and cat central nervous systems by the pig paramyxovirus of the blue eye disease*. J. Vet. Med. B44: 461-476.
32. Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC. (1982)., *Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection*. Vet Rec 122:6-10
33. Stephano HA. (2002). *Blue eye disease: clinical signs and lesions*. In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermaan, J. Trends in Emerging Viral Infections of Swine, pp. 47-50. Iowa State University Press, USA.
34. Taylor DJ (1999). *Rubulavirus infection and "Blue Eye"*. Pig diseases 7th ed.:54-55.
35. Campos, H.R., S.M. Carvajal. (1989). *Trastornos reproductivos en los sementales de una granja porcina de ciclo completo ante un brote de ojo azul*. Memorias de la XXVI Reunión Nacional de AMVEC, Manzanillo, Col., México, pp. 62-64.
36. Sánchez JI, Doporto JM, Trujillo OM, Reyes LJ, Becerra FA. (2003), *Alteraciones reproductivas en hembras reproductoras después de un brote de Ojo Azul*. Memorias XXXIX Congreso AMVEC 2003. Guadalajara Jal. Mex. Pg 251.

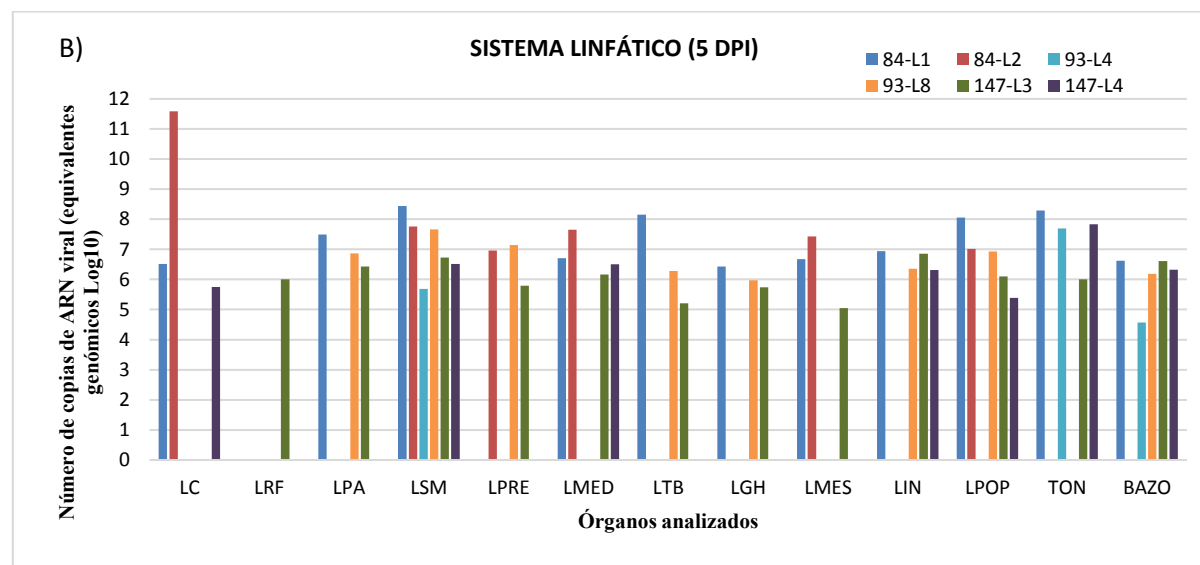
37. Loeza Cortina, JG., (2016)., *Caracterización antigénica y genética de nuevos aislamientos del Rubulavirus porcino*, (Tesis licenciatura) Universidad veracruzana
38. Mcneilly, F., Y. Walker, G.M. Allan, J.C. Foster, T. Linne, M. Merza, P. Hernandez, S. Kennedy, B. Adair. (1997). *A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in Pigs. J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 3-9.
39. Wiman A-C, Hjertner, B, Linné T, Herron B, Allan G, McNeilly F, Adair B, Moreno-López J, Berg M.,(1998), *Porcine Rubulavirus LPMV RNA persist in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection.* Journal of Neuro Virology; 4 (5): 545-552.
40. Nordengrahn A, Moreno-López J, Merza M. (2002). *New Approaches in the Diagnosis of Porcine Rubulavirus (LPMV)*. In: Morilla, A., Yoon, K., Zimmermaan, J. Trends in Emerging Viral Infections of Swine, pp. 51-53. Iowa State University Press, USA.
41. Reyes-Leyva, J., B. Espinosa, J. Hernández, R. Zenteno, V. Vallejo, P. Hernández-Jáuregui & E. Zenteno. (1997). *Neua3-Gal glycoconjugate expresion determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV.* Comp. Bioch. Physiol. 118B:327-332.
42. Cuevas JS, Rodríguez-Ropón A, Kennedy S, Moreno-López J, Berg M, Hernández-Jáuregui P. (2009), *Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with Porcine rubulavirus.* Vet Immunol Immunopathol; 127: 148–52.
43. Vallejo V, Reyes Leyva J, Hernández J, Ramírez H, Delannoy P, Zenteno E., (2000), *Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process.* Comp Biochem Physiol; 126: 415–24.

## ANEXO

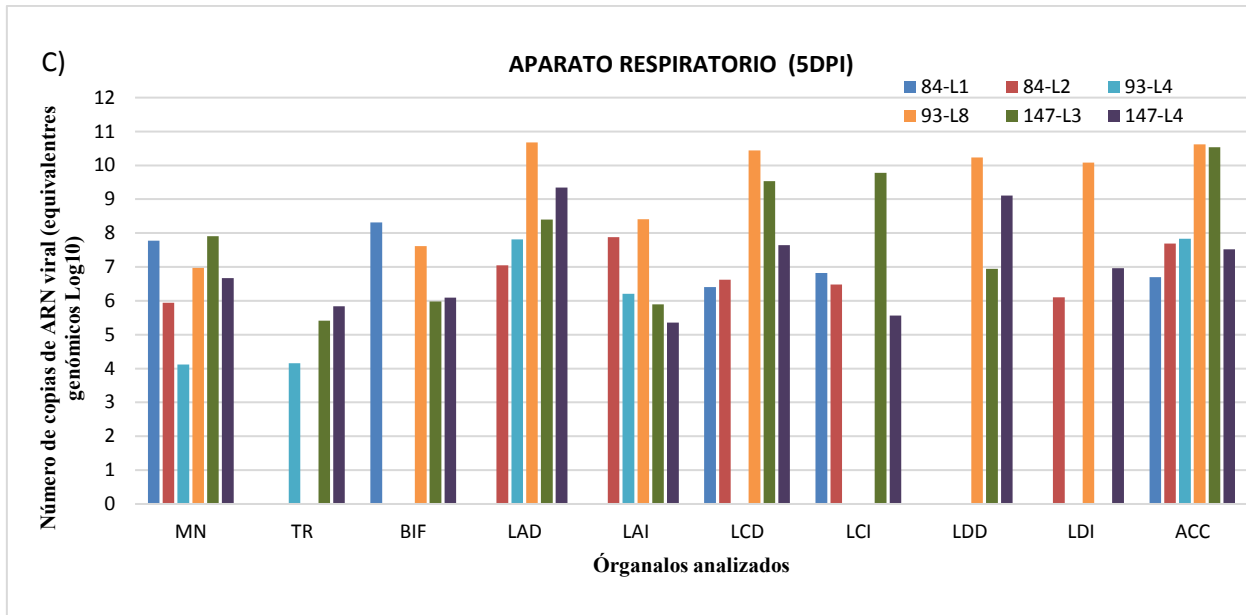
Distribución gráfica de la carga viral del RVP en los diferentes grupos analizados.



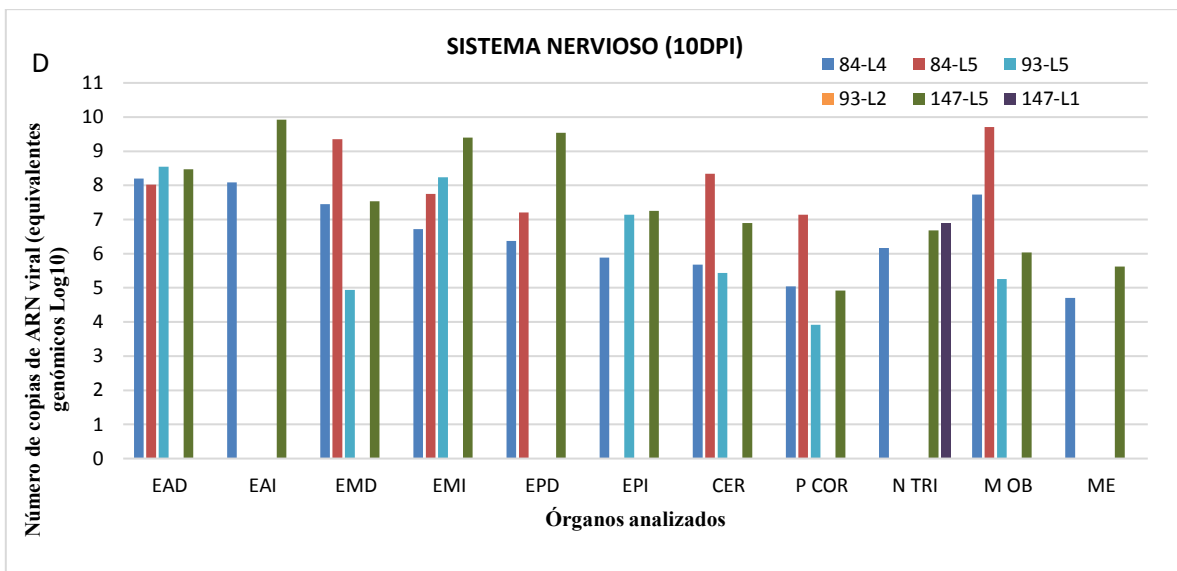
Abreviaturas: EAD, Encéfalo anterior derecho; EAI, Encéfalo anterior izquierdo; EMD, Encéfalo medial derecho; EMI, Encéfalo medial izquierdo; EPD, Encéfalo posterior derecho; EPI, Encéfalo posterior izquierdo; CER, Cerebelo; PCOR, Plexo coroideo; N. TRI, Nervio trigémino; M. OB, Medula oblonga; ME, Medula espinal.



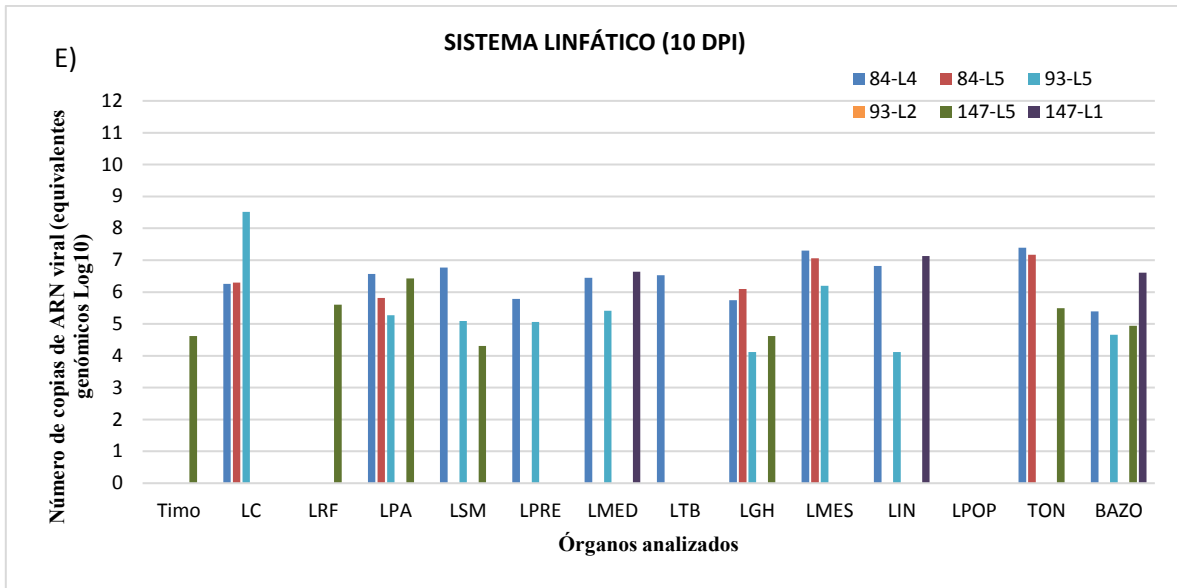
Abreviaturas: LC, Linfonódo Cervical; LRF, Linfonódo Retro faríngeo; LPA, Linfonódo Parotídeo; LSM, Linfonódo Submandibular; LPRE, Linfonódo Pre escapular; L MED, Linfonódo Mediastínico; LTB, Linfonódo Traqueo Bronquial; LGH, Linfonódo Gastro Hepático; LMES, Linfonódo Mesentérico; LING, Linfonódo Inguinal; LPOP, Linfonódo Poplíteo; TON, Tonsila; Bazo.



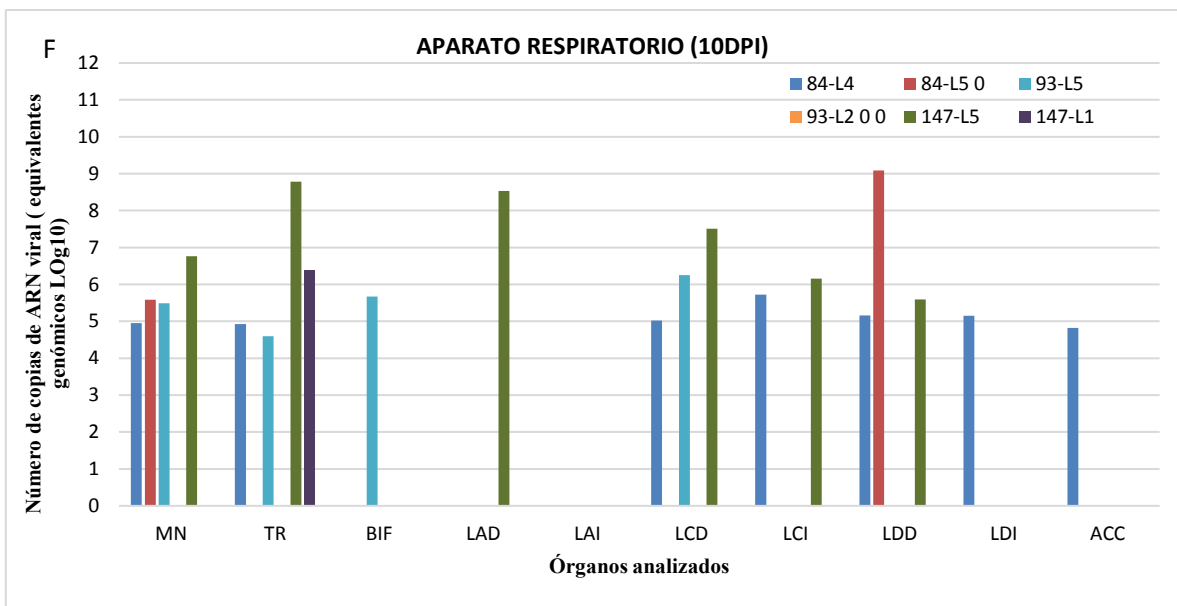
Abreviaturas: MN, Mucosa nasal; TR, Tráquea; BIF, Bifurcación traqueal; LAD, Lóbulo anterior derecho; LAI, Lóbulo anterior izquierdo; LCD, Lóbulo caudal derecho; LCI, Lóbulo caudal izquierdo; LDD, Lóbulo dorsal derecho; LDI, Lóbulo dorsal izquierdo; ACC, Lóbulo accesorio.



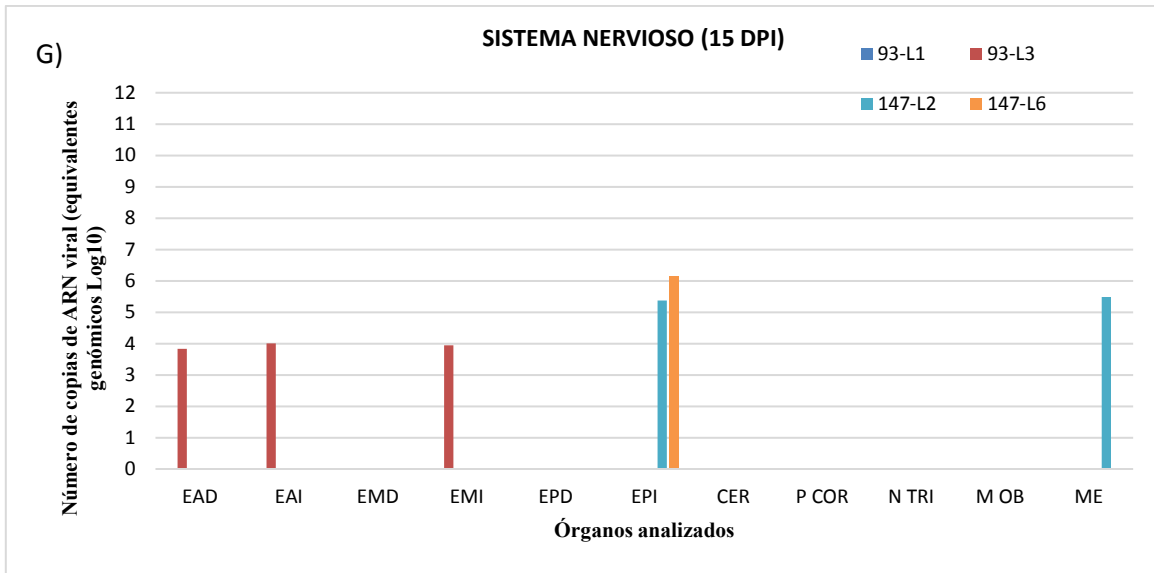
Abreviaturas: EAD, Encéfalo anterior derecho; EAI, Encéfalo anterior izquierdo; EMD, Encéfalo medial derecho; EMI, Encéfalo medial izquierdo; EPD, Encéfalo posterior derecho; EPI, Encéfalo posterior izquierdo; CER, Cerebelo; PCOR, Plexo coroideo; N. TRI, Nervio trigémino; M. OB, Medula oblonga; ME, Medula espinal.



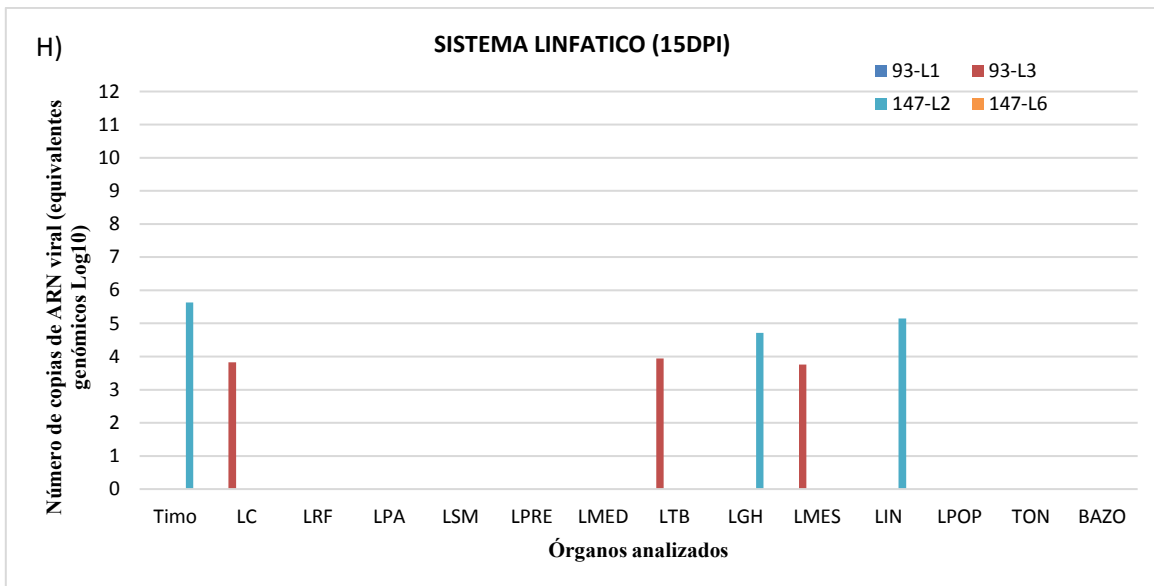
Abreviaturas: Timo; LC, Linfonódo Cervical; LRF, Linfonódo Retro faríngeo; LPA, Linfonódo Parotídeo; LSM, Linfonódo Submandibular; LPRE, Linfonódo Pre escapular; L MED, Linfonódo Mediastínico; LTB, Linfonódo Traqueo Bronquial; LGH, Linfonódo Gastro Hepático; LMES, Linfonódo Mesentérico; LING, Linfonódo Inguinal; LPOP, Linfonódo Poplíteo; TON, Tonsila; Bazo.



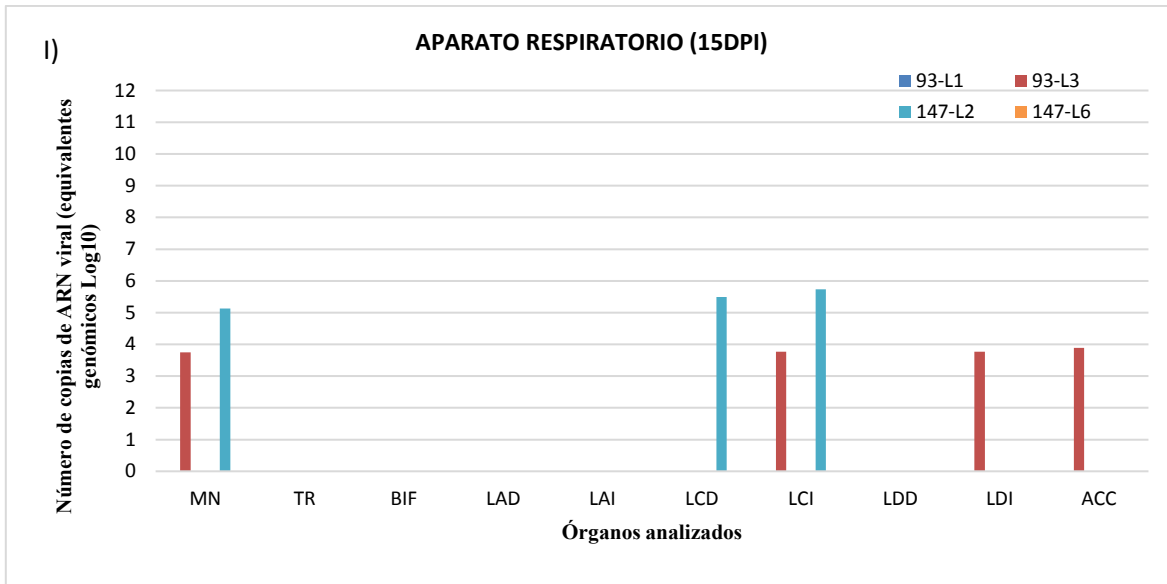
Abreviaturas: MN, Mucosa nasal; TR, Tráquea; BIF, Bifurcación traqueal; LAD, Lóbulo anterior derecho; LAI, Lóbulo anterior izquierdo; LCD, Lóbulo caudal derecho; LCI, Lóbulo caudal izquierdo; LDD, Lóbulo dorsal derecho; LDI, Lóbulo dorsal izquierdo; ACC, Lóbulo accesorio.



Abreviaturas: EAD, Encéfalo anterior derecho; EAI, Encéfalo anterior izquierdo; EMD, Encéfalo medial derecho; EMI, Encéfalo medial izquierdo; EPD, Encéfalo posterior derecho; EPI, Encéfalo posterior izquierdo; CER, Cerebelo; PCOR, Plexo coroideo; N. TRI, Nervio trigémino; M. OB, Medula oblonga; ME, Medula espinal.



Abreviaturas: Timo; LC, Linfonódo Cervical; LRF, Linfonódo Retro faríngeo; LPA, Linfonódo Parotídeo; LSM, Linfonódo Submandibular; LPRE, Linfonódo Pre escapular; L MED, Linfonódo Mediastínico; LTB, Linfonódo Traqueo Bronquial; LGH, Linfonódo Gastro Hepático; LMES, Linfonódo Mesentérico; LING, Linfonódo Inguinal; LPOP, Linfonódo Poplíteo; TON, Tonsila; Bazo.



Abreviaturas: MN, Mucosa nasal; TR, Tráquea; BIF, Bifurcación traqueal; LAD, Lóbulo anterior derecho; LAI, Lóbulo anterior izquierdo; LCD, Lóbulo caudal derecho; LCI, Lóbulo caudal izquierdo; LDD, Lóbulo dorsal derecho; LDI, Lóbulo dorsal izquierdo; ACC, Lóbulo accesorio.