



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 ZOOTECNIA

Comparación de la técnica de virus suero neutralización a través de inmunofluorescencia y  
efecto citopático en el diagnóstico de la enfermedad de ojo azul en cerdos

Tesis que para optar por el grado de Maestra en Ciencias de la  
producción y de la salud animal

Presenta

Erika Nayeli Salazar Jiménez

Tutor principal:

Humberto Ramírez Mendoza

Miembros del Comité tutor:

Dr. Armando Pérez Torres Fac Med

Dr. Jesús Hernández López CIAD

Dr. Joaquim Segalés i Coma CReSA

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **DEDICATORIA**

A mi madre, por ser mi ejemplo de fuerza y determinación.

A mi hermana, por su comprensión y palabras de aliento.

A Daniel, por el apoyo brindado en más de media vida.

A Rodrigo, gracias por ser y estar.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

El estudio fue financiado por los proyectos PAPIIT IN181920 y PAPIIT IN213321.

Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza por su orientación, paciencia y disposición en cada paso de este proceso.

Al Dr. Francisco Rivera Benítez por proporcionar los sueros con los que se elaboró este estudio.

Al Dr. Gabriel Campos por su apoyo en el análisis estadístico de este estudio.

## RESUMEN

La enfermedad del ojo azul afecta a cerdos de todas las edades y es causada por el *Orthorubulavirus porcino*, un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. La presencia de este patógeno se ha reportado únicamente en México y específicamente en la región centro-norte-occidente del país, conocida como El Bajío. Debido a la variabilidad de los signos asociados con la enfermedad del ojo azul es difícil diagnosticarla clínicamente, por lo que es importante realizar el diagnóstico definitivo con pruebas de laboratorio. Para el diagnóstico serológico, la prueba más utilizada es la inhibición de hemoaglutinación; sin embargo, en un muestreo realizado a nivel nacional en el año de 1990 se utilizó esta prueba y se obtuvieron resultados falsos positivos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la concordancia entre tres modificaciones a la técnica de suero neutralización convencional al analizar sueros de cerdo positivos y negativos contra el *Orthorubulavirus porcino*. Estas modificaciones fueron: suero neutralización a partir de hemoaglutinación de sobrenadantes, suero neutralización a través del efecto citopático y suero neutralización a través de inmunofluorescencia indirecta. Se compararon los resultados y se observó una correlación de 0.991 entre suero neutralización a partir de hemoaglutinación de sobrenadantes-suero neutralización a través de inmunofluorescencia indirecta, 0.9896 entre suero neutralización a través del efecto citopático-suero neutralización a través de inmunofluorescencia indirecta y de 0.9981 entre suero neutralización a partir de hemoaglutinación de sobrenadantes-suero neutralización a través del efecto citopático, por lo que se concluye que cualquiera de estas variaciones a la técnica de suero neutralización es útil para corroborar un diagnóstico inicial proveniente de inhibición de la hemaglutinación.

**Palabras clave:** *Orthorubulavirus porcino*, inmunofluorescencia indirecta, neutralización viral efecto citopático.

## ABSTRACT

Blue eye disease affects pigs of all ages and is caused by *porcine Orthorubulavirus*, a virus belonging to the *Paramyxoviridae* family. The presence of this pathogen has only been reported in Mexico and specifically in the central-north-western region of the country, known as El Bajío. Due to the variability of the signs associated with blue eye disease, it is difficult to diagnose it clinically, so it is important to make a definitive diagnosis with laboratory tests. For serological diagnosis, the most widely used test is hemagglutination inhibition; however, in a sample carried out at the national level in 1990, this test was used and false positive results were obtained. The objective of the present work was to evaluate the concordance between three modifications to the conventional serum neutralization technique when analyzing positive and negative swine sera against *porcine Orthorubulavirus*. These modifications were: serum neutralization from hemagglutination of supernatants, serum neutralization through the cytopathic effect, and serum neutralization through indirect immunofluorescence. The results were compared and a correlation of 0.991 was observed between serum neutralization from hemagglutination of supernatants-serum neutralization through indirect immunofluorescence, 0.9896 between serum neutralization through the cytopathic effect-serum neutralization through indirect immunofluorescence and 0.9981 between neutralization serum from hemagglutination of supernatants-neutralization serum through the cytopathic effect, so it is concluded that any of these variations to the neutralization serum technique is useful to corroborate an initial diagnosis from hemagglutination inhibition.

Keywords: *Porcine Orthorubulavirus*, indirect immunofluorescence, serum neutralization, cytopathic effect.

## Contenido

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS... ..	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Estructura viral .....	1
1.3 Ciclo replicativo.....	5
1.4 Distribución geográfica.....	7
1.5. Signos clínicos .....	11
1.6 Inmunidad .....	12
1.7 Diagnóstico serológico.....	14
2. JUSTIFICACIÓN .....	17
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVO GENERAL.....	17
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
7. RESULTADOS.....	22
8. DISCUSIÓN .....	34
9. REFERENCIAS.....	35

## Lista de cuadros

Cuadro	Título	Página
1	Organización taxonómica de la familia <i>Paramyxoviridae</i> .	2
2	Valor del título de los sueros positivos obtenidos en cada repetición por prueba serológica.	29
3	Medias aritméticas para la suero neutralización con inmunofluorescencia, suero neutralización con sobrenadantes y suero neutralización a través de efecto citopático. n=44 incluyendo testigos negativos.	30



## Lista de figuras

Figura	Título	Página
1	Esquema del <i>Orthorubulavirus porcino</i> y sus proteínas constituyentes. b) Mapa genómico del <i>Orthorubulavirus porcino</i> (Santos-Lopez <i>et al.</i> , 2004).	4
2	Microfotografía electrónica donde se observan partículas virales del <i>Orthorubulavirus porcino</i> (x108,200) (Kirkland <i>et al.</i> , 2012).	5
3	Representación gráfica del ciclo de los paramixovirus. (Reyes-Leyva <i>et al.</i> , 2002).	7
4	Células multinucleadas que corresponden a la presencia de sincitios (Hernández-Jáuregui <i>et al.</i> , 2001).	8
5	Distribución geográfica del <i>Orthorubulavirus porcino</i> (S. Cuevas-Romero <i>et al.</i> , 2016).	9
6	Análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de la proteína HN del <i>Orthorubulavirus porcino</i> . (Herrera <i>et al.</i> , 2017).	10
7	Esquema de la prueba de hemoaglutinación realizada a partir de sobrenadantes, donde la sedimentación muestra la presencia de anticuerpos que inhiben la acción aglutinante del <i>Orthorubulavirus porcino</i> al contrario de la aglutinación.	22
8	Esquema de la prueba de suero neutralización a través del efecto citopático donde el color morado indica sueros con presencia de anticuerpos que neutralizan la acción del virus sobre el monoestrato celular.	23
9	Esquema de la prueba de suero neutralización a través del efecto citopático donde el color morado indica sueros con presencia de anticuerpos que neutralizan la acción del virus sobre el monoestrato celular.	24

- 10 Tinción con cristal violeta a las 72 h. Objetivo 20X A) Efecto citopático (ausencia de anticuerpos), B) Suero positivo (presencia de anticuerpos). 27
- 11 Inmunofluorescencia a las 72 horas A) Fluorescencia que indica presencia de anticuerpos en el pozo, objetivo 10X, B) Monoestrato íntegro sin fluorescencia que corresponde a un pozo negativo (ausencia de anticuerpos). Objetivo 10X, C) Presencia de fluorescencia. Objetivo 40X, D) Pozo negativo. Objetivo 40X. 28
- 12 Grafica de dispersión que muestra la correlación entre las variables suero neutralización con sobrenadantes (HAS)- suero neutralización con inmunofluorescencia (IF), suero neutralización a través de efecto citopático (EC)- suero neutralización con inmunofluorescencia (IF) y suero neutralización a través de efecto citopático (EC)- suero neutralización con sobrenadantes (HAS). 32

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

En 1980 en el centro de México, específicamente en la Piedad Michoacán se presentaron numerosos brotes de una enfermedad en lechones caracterizados por afectación del sistema nervioso central, opacidad de la córnea, así como una alta mortalidad. Posteriormente en 1982 en una granja de engorda, de la misma zona se observaron cerdos de 10-45 kg con incoordinación, marcha sin rumbo o en círculos, golpeaban objetos, opacidad corneal uni o bilateral (hasta el 20%), convulsiones y una mortalidad del 20%, a este desorden clínico-patológico se le denominó síndrome del ojo azul (SOA) (Stephano & Gay., 1983). Algunos años después otros investigadores lo nombraron virus de La Piedad Michoacán (LPMV), debido al lugar del primer brote (Moreno-López *et al.*, 1986). De acuerdo a los reportes generados hasta el momento, se sabe que esta enfermedad afecta únicamente a cerdos, en neonatos causa signos nerviosos y en adultos fallas reproductivas (Mendoza-Magaña *et al.*, 2001). El *Orthorubulavirus porcino* es un virus que pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y se ha restringido al centro de México (Kirkland *et al.*, 2012; Cuevas-Romero *et al.*, 2015).

## 1.2 Estructura viral

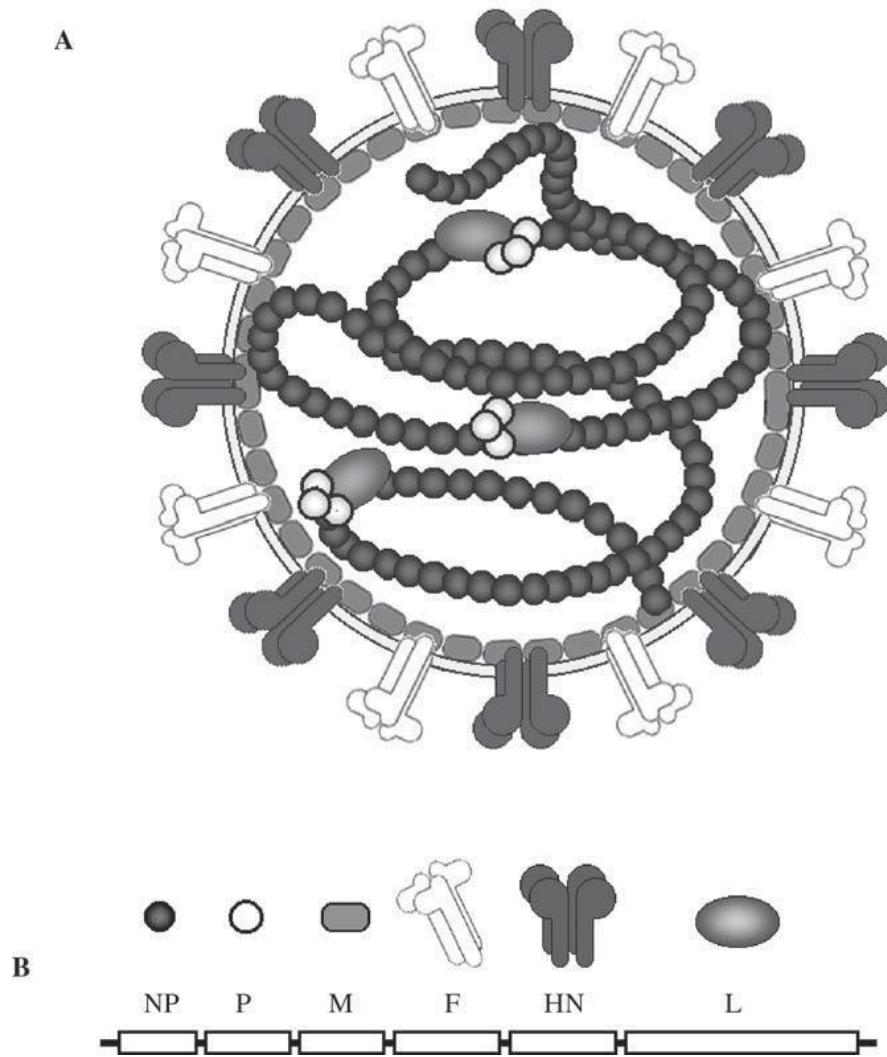
El *Orthorubulavirus porcino* pertenece a la familia *Paramyxoviridae* (Cuadro 1), es un virus de apariencia pleomórfica, con una envoltura formada por una nucleocápside interna que contiene genoma de ARN en sentido negativo monocatenario lineal, con un tamaño aproximado de 15.5 kb (Nagai, 1999).

Cuadro1. Organización taxonómica de la familia *Paramyxoviridae*.

Subfamilia	Género	Patógenos importantes
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>  <i>Rubulavirus</i>  <i>Morbillivirus</i>	<i>V. Parainfluenza</i> <i>1, 3</i>  <i>V. Sendai</i>  <i>V. Parotiditis,</i> <i>Orthorubulavirus</i> <i>porcino</i>  <i>V. Parainfluenza</i> <i>2, 4;</i>  <i>V. Enf. De</i> <i>Newcastle</i>  <i>V. Hendra</i>    <i>V. Nipah</i>  <i>V. Sarampión</i>  <i>V. Moquillo</i> <i>Canino</i>
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>  <i>Metapneumovirus</i>	<i>V. Sincitial</i> <i>Respiratorio</i>  <i>V. de la</i> <i>rinotraqueitis del</i> <i>pavo</i>

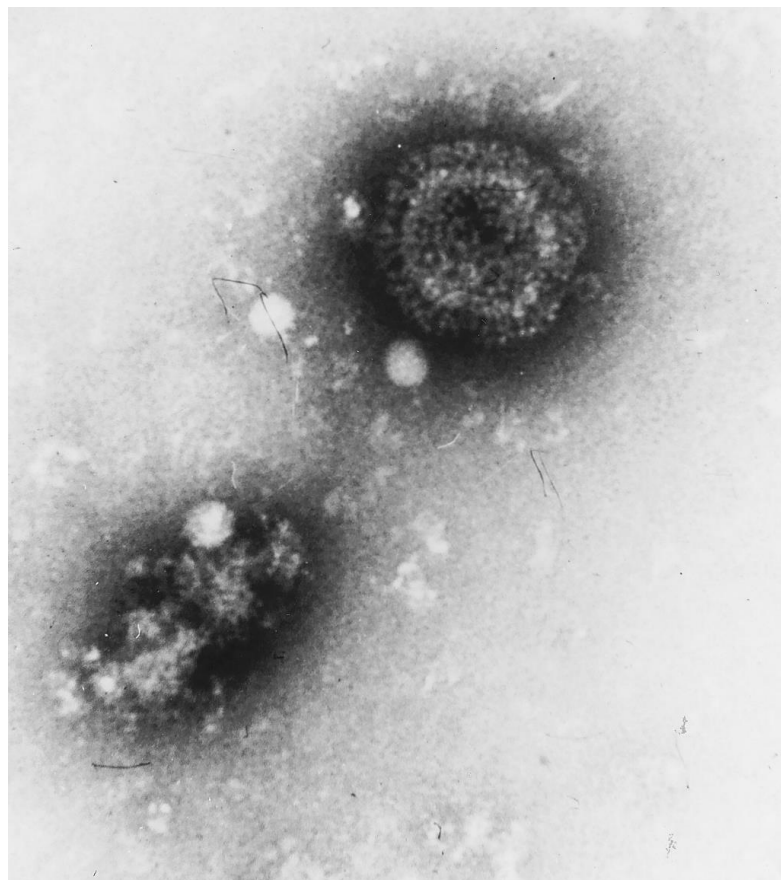
Adaptado de Reyes-Leyva *et al.*, 2002; ICTV, 2023.

Codifica para seis proteínas estructurales: la nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), la proteína grande (L) (Svenda *et al.*, 1997), la proteína de matriz (M) y una envoltura externa de lipoproteínas que contiene peplómeros virales, que consisten en glicoproteínas como la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F) (Figura 1) (Berg *et al.*, 1991; Cox & Plemper, 2017). El análisis comparativo de la secuencia del gen M del *Orthorubulavirus porcino* reveló una estrecha relación con el virus de la parotiditis humana (MuV), con una homología del 55 % en la secuencia de nucleótidos y del 46 % en la secuencia de aminoácidos y (Linné *et al.*, 1992), el análisis del gen F del LPMV también demostró una cercanía con los genes F del MuV y del virus de los simios tipo 5 y, por lo tanto, se clasificó en el género *Orthorubulavirus* (Berg *et al.*, 1997)



**Figura 1.** a) Esquema del *Orthorubulavirus porcino* y sus proteínas constituyentes. b) Mapa genómico del *Orthorubulavirus porcino* (Santos-Lopez *et al.*, 2004).

En el 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 transmembranales HN y F implicadas en la unión de virus a las células y la fusión de las membranas (formación de sincicios) observadas en el *Orthorubulavirus porcino* (Figura 2) (Moreno-López *et al.*, 1986; Reyes-Leyva *et al.*, 1999; Morrison y Portner, 1991; Chang & Dutch, 2012).



**Figura 2.** Microfotografía electrónica donde se observan partículas virales del *Orthorubulavirus porcino* (x108,200) (Kirkland *et al.*, 2012)

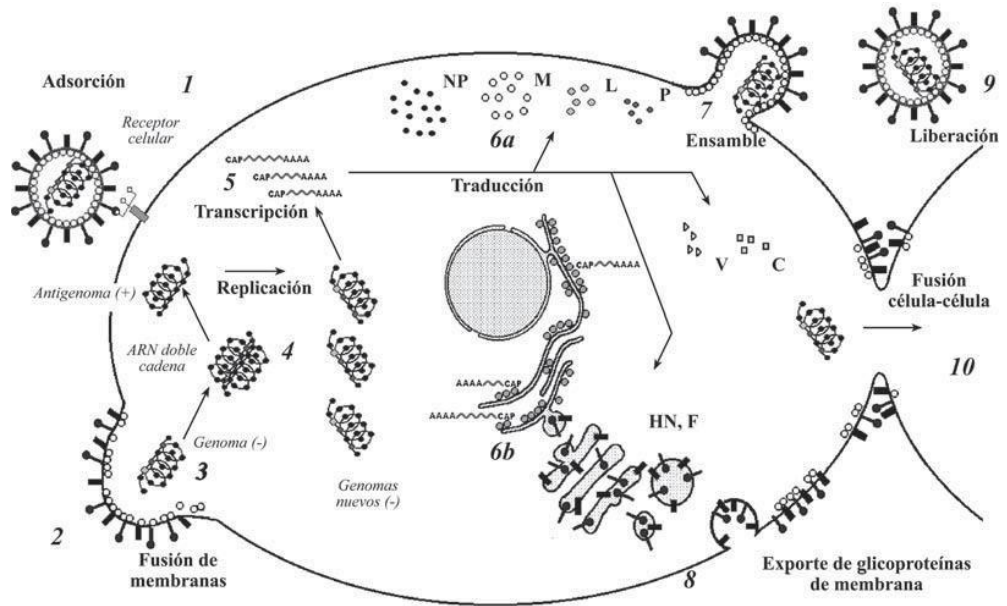
### 1.3 Ciclo replicativo

El ciclo biológico de los rubulavirus incluye las fases de reconocimiento, adsorción a la superficie celular, fusión de membranas, penetración a la célula, desnudamiento, transcripción, replicación del genoma, ensamble y liberación de viriones (Figura 3). La partícula viral se adsorbe a la membrana de la célula por medio de la proteína HN, que reconoce ácido siálico específicamente la configuración NeuAC (α2-3)Gal (Reyes-Leyva et al., 1993). Un cambio conformacional de la HN activa la proteína F, que expone un dominio altamente hidrofóbico mediante el cual fusiona las membranas celular y viral. Este evento ocurre en la superficie celular y a pH neutro. La integración de la membrana viral al sistema de membranas celulares provoca la liberación de la nucleocápside en el citoplasma. Ya que el virión trae integrada su propia polimerasa, al liberarse el ARN viral se sintetiza una copia completa del genoma en sentido positivo que servirá de molde para los nuevos genomas, por otro lado, se inicia la síntesis de los ARN mensajeros que codifican cada una de las proteínas virales. Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, en donde las proteínas NP, P y L son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se acumula en la parte interna de la membrana celular. Las glicoproteínas HN y F que fueron sintetizadas en el retículo endoplásmico, son modificadas en el aparato de Golgi y posteriormente expresadas en la cara externa de la membrana, en sitios de contacto estrecho con la proteína M. La afinidad de las proteínas de la nucleocápside (NP) con la proteína M es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis. La replicación de los rubulavirus se realiza totalmente en el citoplasma, por lo cual se forman aglomerados de nucleocápsides que se observan como grandes inclusiones citoplasmáticas en las células infectadas (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2001).

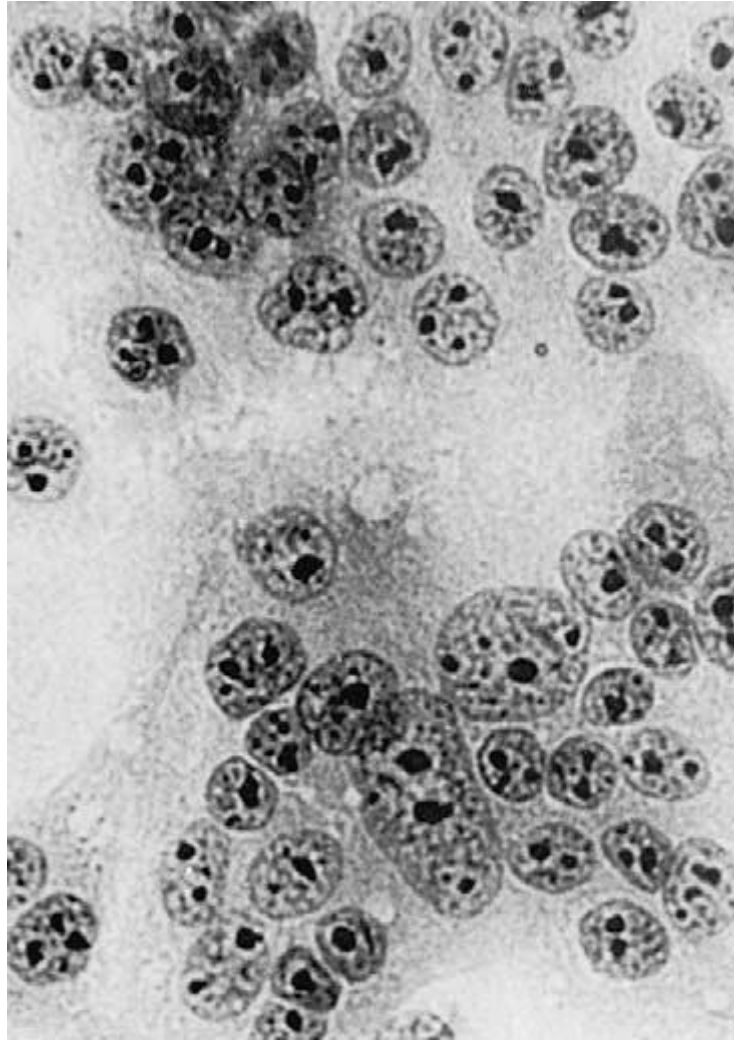
El material genético viral también puede pasar directamente de una célula infectada a una célula vecina sin que haya necesidad de que se libere la partícula viral, esto es debido al proceso de fusión de membranas celulares realizado por las proteínas HN y F.



De esta manera se originan las células multinucleadas o sincitios (figura 4) características de las infecciones por paramixovirus (Reyes-Leyva *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Representación gráfica del ciclo de los paramixovirus. (Reyes-Leyva *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Células multinucleadas que corresponden a la presencia de sincitios (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2001).

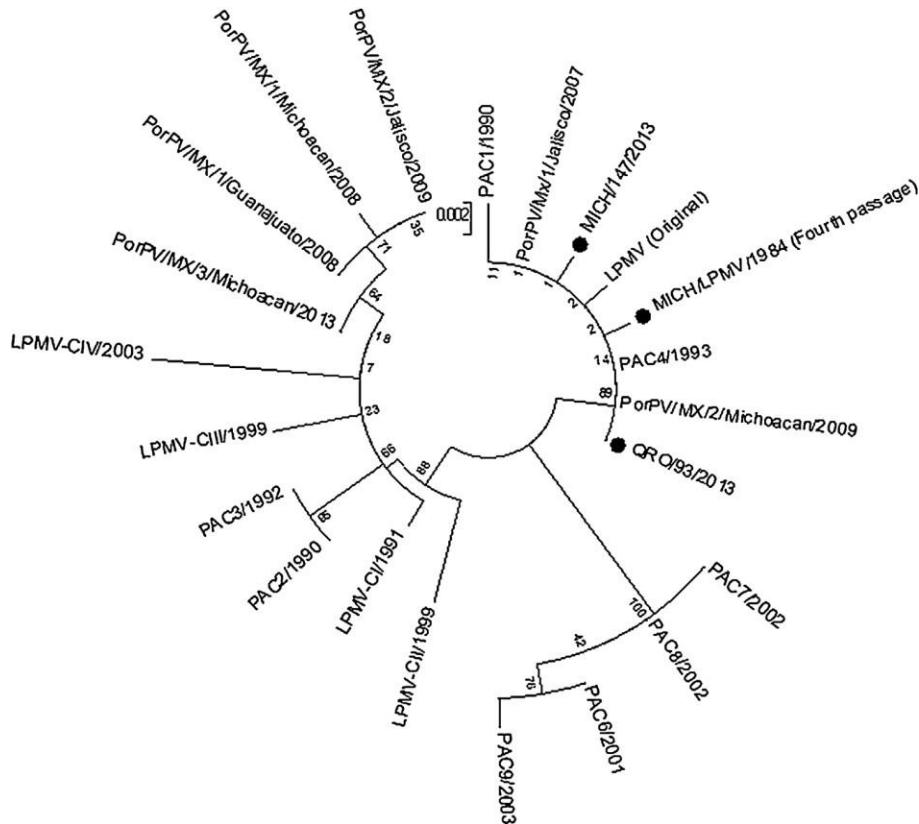
#### **1.4 Distribución geográfica**

Varios virus porcinos de la familia *Paramyxoviridae* han sido identificados, pero hasta el presente, la enfermedad de ojo azul y su agente etiológico se ha reportado únicamente en México (Stephano *et al.*, 1999; S. Cuevas-Romero *et al.*, 2016), específicamente en la zona conocida como “El Bajío” (Figura 5).



**Figura 5.** Distribución geográfica del *Orthorubulavirus porcino*. (S. Cuevas-Romero *et al.*, 2016).

La secuencia de aminoácidos comparaciones y análisis filogenético de la proteína HN reveló tres linajes genéticamente diferentes: el Grupo 1 comprende PorPV-LPMV/1984 y PorPV-PAC-4/1993 y es caracterizada exclusivamente por la presencia de trastornos neurológicos signos en lechones; el grupo 2 comprende PorPV-PAC-2/1990, PorPV-PAC-3/1992 y PorPV-CI-IV y se caracteriza por signos neurológicos, alta mortalidad tanto en lechones como cerdos mayores (3–4 meses) y lesiones en el tracto reproductivo en cerdos adultos; y el grupo 3 comprende PorPV-PAC-6/2001, PorPV-PAC-7/2002, PorPV-PAC-8/2002 y PorPV-PAC-9/2003 y se asocia con signos clínicos neurológicos en animales adultos y en líneas comerciales de engorda. (S. Cuevas-Romero *et al.*, 2016). La virulencia de los nuevos aislamientos mantiene características similares a las reportadas hace más de 30 años (Figura 6) (Herrera *et al.*, 2017).



**Figura 6.** Análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de la proteína HN del *Orthorubulavirus porcino* (Herrera *et al.*, 2017).

Nueve mutaciones de aminoácidos distinguieron los virus PAC6-PAC9 altamente neurovirulentos, mientras que cinco mutaciones caracterizaron a los virus PAC2 y PAC3 de baja neurovirulencia (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2008).

En 2012 se publicaron los resultados del análisis de los títulos de anticuerpos séricos contra los aislados PAC-4/1993, PAC-6 /2001 y PAC-9/2003 de *Orthorubulavirus porcino*, este análisis se hizo mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI, por sus siglas en inglés). El estudio incluyó 1013 cerdos no vacunados, de los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán y el Estado de México. Los resultados revelaron diferencias antigénicas entre los aislamientos evaluados (Escobar-López *et al.*,2012).

## 1.5. Signos clínicos

Debido a que la glicoproteína HN reconoce ácido siálico, específicamente la configuración NeuAC( $\alpha$ 2-3) Gal los signos clínicos de la enfermedad del ojo azul son variables dependiendo de la edad del cerdo. El SNC del recién nacido expresa abundantemente Neu5Ac  $\alpha$ 2,3Gal, pero débil o escasamente expresado en la etapa adulta. La maduración del SNC indujo cambios drásticos en la expresión de ácido siálico, estos cambios incluyen la disminución o pérdida completa de residuos NeuAc  $\alpha$  2,3Gal, principalmente en las estructuras olfativas y la corteza cerebral (Vallejo *et al.*, 2000).

Los lechones de 2 a 15 días de edad son los más susceptibles, por lo general sucumben a los trastornos del sistema nervioso dentro de las primeras 48h después del inicio de los signos clínicos, con una mortalidad de hasta el 90%. Al presentar fiebre, pelaje áspero y arqueamiento de la espalda, seguidos por una ataxia progresiva, debilidad, rigidez muscular, temblor, postura anormal y la muerte (Allan *et al.*, 1996; Stephano A, 2002). Hasta el 10% de los lechones infectados desarrollan opacidad corneal (Stephano *et al.*, 1988).

Cuando se inoculó *Orthorubulavirus porcino* en el músculo, este entró en contacto con los nervios periféricos de las extremidades posteriores y fue transportado al SNC, no causó la muerte (Ramírez-Herrera *et al.*, 2001), pero si se inoculan vía oronasal presentan alteraciones neurológicas a partir de 3 días post infección, esta presentación puede ser con signos leves como: ligera incoordinación motora y aumento de la temperatura rectal o signos más exacerbados como: depresión, descargas nasales, diarrea, hundimiento del globo ocular, secreciones oculares, temblores musculares, sialorrea y falta de coordinación (Herrera *et al.*, 2017). Puede unirse a neuronas de cerdo en las regiones del cerebro como tejido neuronal del tronco encefálico, bulbo olfatorio, hipocampo, cerebelo, corteza cerebral frontal, temporal y parietal (Mendoza-Magaña *et al.*, 2001).

La mortalidad es baja en cerdos mayores de 30 días con signos moderados (Stephano *et al.*, 1988), y los trastornos nerviosos se vuelven escasos. Aunque en etapa de crecimiento la enfermedad de ojo azul genera problemas respiratorios por sí solo, también existe sinergismo con otros agentes infecciosos como el Ortomixovirus que provoca influenza

(Cuevas-Romero, *et al.*, 2013; Rivera- Benitez *et al.*, 2013; Rivera-Benitez *et al.*, 2016).

En cerdos en etapa de crecimiento que padecieron la enfermedad el virus se puede recuperar de secreción nasal aún después de los 23 días post infección (Rivera-Benitez *et al.*, 2013). Los verracos pueden desarrollar orquitis, epididimitis, y atrofia testicular (Stephano *et al.*, 1988). El análisis del semen en verracos mostró que la infección no disminuye el volumen del eyaculado, pero se observaron alteraciones en la concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides. Además, se detectó antígeno viral en semen, la fracción de plasma seminal o en la fracción de esperma (Solís *et al.*, 2007). Con el estudio realizado al semen de verracos persistentemente infectados se identificó que el semen representa una fuente importante de virus y es un factor de riesgo para la propagación de la enfermedad del ojo azul en las poblaciones porcinas (Rivera-Benitez *et al.*, 2013).

Las cerdas pueden volver al celo con más frecuencia o experimentan abortos, mortinatos o fetos momificados (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004).

## **1.6 Inmunidad**

Durante la infección por *Orthorubulavirus porcino* se producen anticuerpos tanto contra proteínas internas (M y NP) como externas (HN y F) (Hernández-López *et al.*, 1998). Se ha demostrado que las glicoproteínas HN y F son importantes para provocar una respuesta neutralizante del virus, la glicoproteína HN induce los anticuerpos neutralizantes más eficientes contra los paramixovirus, aunque la mejor respuesta protectora se logra si los anticuerpos se producen contra ambas proteínas (HN y F) (Norrby *et al.*, 1975; Paterson *et al.*, 1987; Spriggs *et al.*, 1988 ; Siañez-Estrada *et al.*, 2020).

Hernández-López *et al.*, (1998), analizó la respuesta inmune humoral frente al *Orthorubulavirus porcino* en cerdos adultos infectados experimentalmente. La producción de anticuerpos se determinó mediante pruebas de virus suero neutralización (VSN) y la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI). La seroconversión comenzó a los siete días post infección y alcanzó el pico de producción a las cinco semanas post infección, estos títulos se mantuvieron altos hasta el final del estudio (siete semanas).

El reconocimiento de las glicoproteínas estructurales se realizó por medio de la técnica de Western blot, la cual mostró que a las dos semanas post infección había anticuerpos contra HN, mientras que la respuesta contra la proteína M fue a partir de las cuatro semanas post infección. Se identificaron anticuerpos contra la proteína NP a las cinco semanas post infección y no se identificaron anticuerpos contra las proteínas F, P o L a las siete semanas. La inmunogenicidad del Orthorubulavirus porcino se confirmó mediante la inducción de una respuesta proliferativa en células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) de cerdos infectados; esta respuesta fue evidente a las dos semanas post infección, mostrando un pico a las cuatro semanas post infección. Las PBMC de cerdos no infectados no proliferaron después de la incubación in vitro con antígeno viral. Este trabajo de investigación reveló que la subpoblación de células T CD4+ CD8- corresponde al proceso agudo de la infección y la subpoblación CD4+CD8+ corresponde al proceso crónico asociado a células de memoria.

En otro estudio realizado por Rodríguez-Ropón *et al.*, (2003), se observó que los cerdos de cinco días de edad infectados no mostraron signos clínicos durante los primeros 6 dpi. A los siete dpi se observaron signos respiratorios, que iban desde un aumento de la frecuencia respiratoria hasta disnea grave. Estos signos fueron seguidos de fiebre, ataxia, debilidad, rigidez muscular y temblores, adopción de una posición de perro sentado, movimientos involuntarios que concluían en muerte. En las amígdalas y ganglios linfáticos se detectaron porcentajes significativamente mayores de la subpoblación de células T CD2+ y CD8+, también se encontraron linfocitos en sangre periférica, mientras que los porcentajes de CD4+ y los linfocitos MHC de clase II se redujeron significativamente.

Se infectaron también cerdos de 17 días de edad que mostraron porcentajes de CD2+ y CD4+ elevados, al igual que los linfocitos MHC de clase II en sangre periférica también aumentaron significativamente; el porcentaje de linfocitos MHC de clase II permaneció elevado a los 15 días pi. Lo que indica que este virus induce cambios en las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica.

## 1.7 Diagnóstico serológico

La enfermedad del ojo azul en cerdos se describió por primera vez en 1980 en El Bajío (Stephano *et al.*, 1983), durante ese año en la región se producía el 75% de la producción porcina total del país (Ernesto *et al.*, 2010). Para conocer la distribución de anticuerpos contra esta enfermedad, entre 1989 y 1990 se tomaron muestras sanguíneas a los cerdos de 27 de los 32 estados que conforman la República Mexicana. La prueba serológica que se utilizó fue la inhibición de la hemoaglutinación, los resultados mostraron que 13 estados tenían animales con anticuerpos contra el virus que provoca la enfermedad del ojo azul, estos estados fueron Campeche, Colima, Estado de México, Jalisco, Sonora, Quintana Roo, Hidalgo, Puebla, Michoacán, Guanajuato, Morelos, Veracruz y Querétaro (Fuentes *et al.*, 1992).

Cuando se evalúan anticuerpos contra influenza, en aves, caballos, cerdos o perros es frecuente el utilizar la prueba de inhibición de la hemaglutinación cuya confiabilidad es alta (Killian, 2020). Sin embargo, la prueba de inhibición de la hemaglutinación para la enfermedad del ojo azul se ha considerado poco confiable debido a que la prueba ha dado falsos positivos debido a la variabilidad de protocolos que maneja cada laboratorio. Existe un trabajo de investigación en donde también se evaluaron sueros positivos y negativos a través de la inhibición de la hemaglutinación. En este trabajo se lograron resultados positivos en sueros negativos cuando el suero no fue tratado para retirar inhibidores no específicos antes de hacer la prueba serológica (Hidalgo-Lara *et al.*, 2021).

Existe otra investigación donde se evaluó la hemaglutinación con el *Orthorubulavirus porcino*

utilizando eritrocitos de pollo, bovino, caballo, cerdo, conejo, cobayo y perro a diferentes concentraciones (0.5%, 0.75% y 1.0%), a diferentes temperaturas (25° C y 37° C), e incluso diferentes tipos de placas usadas en la prueba (fondo en “U” y “V”).



Se llegó a la conclusión que los eritrocitos menos convenientes para ser utilizados en la prueba de hemoaglutinación son los de cobayo, cerdo, perro y conejo. También se determinó que la temperatura menos óptima a utilizar en esta prueba son los 37 °C (Albarrán-Rodríguez *et al.*, 2022).

La prueba que se utilizó en el primer estudio epidemiológico de ojo azul en México utilizó eritrocitos de cobayo a 37°C (Fuentes *et al.*, 1992). Con esto eritrocitos y a esta temperatura se generó la elución en menos de 30 min. Al observarse sedimentación en la mayoría de los sueros analizados se concluyó que existían anticuerpos contra la enfermedad del ojo azul en la mayoría de los estados de la República Mexicana. Los trabajos más recientes de (Hidalgo-Lara *et al.*, 2021) y (Albarrán-Rodríguez *et al.*, 2022) permitieron la estandarizaron de la técnica de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación en la enfermedad del ojo azul; sin embargo, es importante tener otras técnicas que respalden los resultados que se obtengan a partir de esta primera prueba, sobre todo en los casos sospechosos.

La familia de paramixovirus contiene muchos virus patógenos humanos comunes, incluidos los virus del sarampión, de la parotiditis, la parainfluenza, el virus sincitial respiratorio, el metapneumovirus humano y los henipavirus zoonóticos, Hendra y Nipah. La activación y desencadenamiento de la proteína de fusión es un proceso esencial en la infectividad viral que dan como resultado la formación de sincitios, un efecto citopático (EC) característico, pero no exclusivo de esta familia (Chang & Dutch, 2012). Es conveniente aprovechar esta característica del virus para usarlo como un método de diagnóstico tanto para la identificación del virus como para la identificación de anticuerpos.

La técnica de inmunofluorescencia (IF) es un método que detecta antígenos o anticuerpos en una muestra determinada. Estos ensayos emplean colorantes fluorescentes, también conocidos como fluoróforos, que permiten la visualización mediante microscopía de fluorescencia. Hay dos tipos diferentes de IF directa e indirecta, la serología de inmunofluorescencia utiliza este último tipo. Inicialmente, los antígenos inmovilizados son reconocidos por los anticuerpos presentes en las muestras de suero. Posteriormente, se introducen anticuerpos de detección marcados con fluoróforos, permitiendo su

visualización y cuantificación (Dowlatshahi *et al.*, 2021). El procedimiento para la IF es relativamente complejo, lleva mucho tiempo, es costoso, sin embargo, por ser una prueba muy sensible es una opción de diagnóstico.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de ojo azul es endémica de México, específicamente de la región centro occidente y para diagnosticarla lo más común es detectar anticuerpos. La prueba diagnóstica más ofrecida y empleada en los laboratorios que ofrecen este servicio es la inhibición de la hemaglutinación debido a que es barata, rápida y no requiere de esterilidad, sin embargo, esta prueba fue utilizada en las primeras investigaciones epidemiológicas y se obtuvieron resultados falsos positivos. Al comparar los resultados de diferentes técnicas como la técnica virus suero neutralización a través de hemoaglutinación de sobrenadantes, virus suero neutralización a través de inmunofluorescencia indirecta y virus suero neutralización a través de la lectura del efecto citopático se puede determinar si son útiles como pruebas confirmatorias ante un diagnóstico dudoso y considerando que esa prueba con resultado dudoso sea la inhibición de la hemaglutinación.

En esta tesis se compararán variaciones a la técnica de VSN, con tres métodos de revelado diferente y serán: virus suero neutralización con hemoaglutinación de sobrenadantes, virus suero neutralización con inmunofluorescencia indirecta y virus suero neutralización a través de la lectura del efecto citopático.

### **3. HIPÓTESIS**

Existe un alto grado de concordancia entre la técnica virus suero neutralización a través de hemoaglutinación de sobrenadantes, virus suero neutralización a través de inmunofluorescencia indirecta y virus suero neutralización a través de la lectura del efecto citopático para la identificación de anticuerpos contra el *Orthorubulavirus porcino* en cerdos.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Comparar tres diferentes métodos de lectura a partir de la prueba de virus suero neutralización para la identificación de anticuerpos contra *Orthorubulavirus porcino*.

#### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar la correlación entre virus suero neutralización con hemoaglutinación de sobrenadantes, virus suero neutralización con inmunofluorescencia indirecta y virus suero neutralización a través la lectura del efecto para la identificación de anticuerpos contra *Orthorubulavirus porcino* para saber si existe relación entre estas.
- Determinar si alguna lectura es más confiable que otra y así poder elegir la más exacta.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Líneas celulares**

Se cultivaron células de plexo coroideo ovino (SCP de ATCC) en medio esencial mínimo de Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU).

### **Virus**

La cepa usada en este estudio fue la cepa PAC3/1992 debido a su alta actividad hemoaglutinante, además de su antigenicidad cruzada con algunas otras cepas de *Orthorubulavirus porcino* (PAC2/1990 y PAC4/1993).

La cepa PAC3/1992 del *Orthorubulavirus porcino* (Jalisco/1992; número de acceso al GenBank: EF413173) fue replicada en cultivo celular de SCP, en medio mínimo esencial de Dulbecco (D-MEM) suplementado con 2 % de suero fetal bovino. Se tituló el virus mediante el método de Reed y Muench para obtener el valor en dosis infecciosas en cultivo celular al 50% (DICC50%) a través de inmunofluorescencia, hemoaglutinación a partir de los sobrenadantes del cultivo celular y efecto citopático. La cepa viral se propagó y tituló en células SCP, posterior a su titulación el lote viral se almacenó a -80 °C.

### **Sueros**

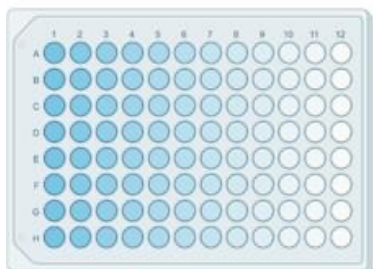
Las muestras fueron obtenidas del banco de sueros del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-MA), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se emplearon 27 sueros específicos para la cepa PAC-3, y 17 sueros negativos frente al virus.

### **Suero neutralización a través de hemoaglutinación de sobrenadantes**

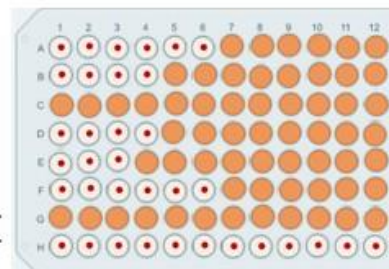
La prueba se realizó con ligeras modificaciones a lo previamente descrito por Hernández-López *et al.*, (1998). Se realizó inactivación del suero a 56 °C durante 30 min, posteriormente el suero fue diluido con D-MEM suplementado con 2% de SFB. Se realizaron diluciones dobles seriadas de todos los sueros iniciando 1:4 hasta 1:8192 en microplacas de 96 pozos con fondo plano, con un volumen final de 50 µl. Posteriormente, se añadieron 50 µl del PAC-3/1992 ajustado a 300 DIC50%, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se agregaron 100 µl de suspensión de células SCP (10<sup>4</sup> células/pozo) y se incubaron durante 72 h a 37°C con una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>.

El punto final se determinó mediante hemoaglutinación a partir de sobrenadante (HAS); 50 µl de cada pozo y 50 µl de eritrocitos frescos de ave (*Gallus gallus domesticus*) al 0.5% se colocaron en una placa con fondo en U. El recíproco de la última dilución del suero que neutralizó completamente el virus hemoaglutinante fue considerado como el título de anticuerpos neutralizantes.

1:2 → 1:4096



Diluciones dobles seriadas del suero+300 DICC<sub>50%</sub> del *Orthorubulavirus porcino*.



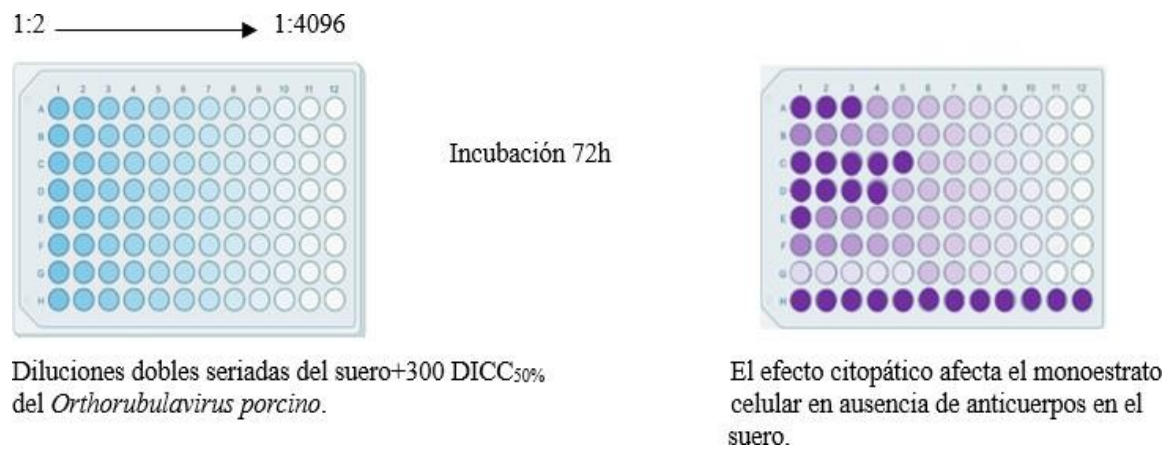
Sobrenadantes de la placa enfrentados a 50µl de eritrocitos de ave al 0.5%.

**Figura 7.** Esquema de la prueba de hemoaglutinación realizada a partir de sobrenadantes, donde la sedimentación muestra la presencia de anticuerpos que inhiben la acción aglutinante del *Orthorubulavirus porcino* al contrario de la aglutinación.



### Suero neutralización a través de efecto citopático

La prueba de suero neutralización se realizó como se describió previamente, pero para su lectura la placa se tiñó con cristal violeta al 0.05% en metanol y el efecto citopático se observó al microscopio. El punto final se determinó a partir de la dilución más alta donde se observó el efecto citopático. El recíproco de la última dilución del suero que neutralizó completamente la producción de virus fue considerado el título de anticuerpos neutralizantes.

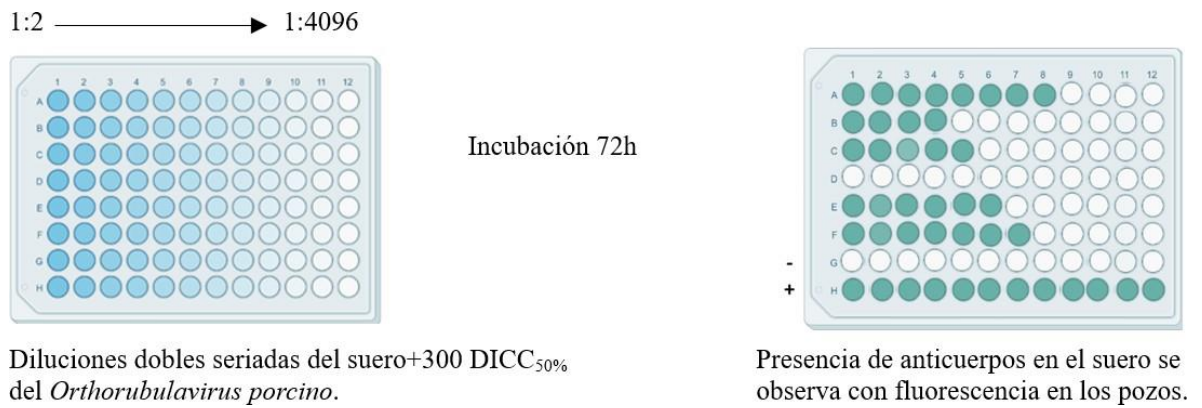


**Figura 8.** Esquema de la prueba de suero neutralización a través del efecto citopático donde el color morado indica sueros con presencia de anticuerpos que neutralizan la acción del virus sobre el monoestrato celular.

### Suero neutralización a través de inmunofluorescencia

La prueba de suero neutralización se realizó como se describió previamente, en este caso las placas se fijaron a las 72 h con 50 µl de acetona al 80% en PBS que se mantenía a -20°C. La solución se dejó en placas hasta que se volatilizó, posteriormente se realizó un lavado con 100 µl de agua destilada, se decantó el contenido, se añadieron 50 µl de un anticuerpo anti-IgG de cerdo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución 1:320 a cada pocillo y se incubó durante 1 h a 37°C.

Después se realizó un lavado con 100  $\mu$ l de agua destilada, se visualizó la señal con un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus, Corporation, Tokio, Japón).



**Figura 9.** Esquema de la prueba de suero neutralización a través del efecto citopático donde el color morado indica sueros con presencia de anticuerpos que neutralizan la acción del virus sobre el monoestrato celular.

### Diseño experimental

Se evaluaron 27 sueros específicos contra la cepa PAC-3, y 17 sueros negativos. Para cuantificar los anticuerpos de cada suero se realizaron las pruebas de suero neutralización a través de inmunofluorescencia (abreviado únicamente como IF) hemoaglutinación a partir de sobrenadantes (abreviado únicamente como HAS) y lectura del efecto citopático (EC). De cada prueba se realizaron tres ensayos, para evaluar el error de medida de cada prueba y de esta manera determinar la repetibilidad de cada protocolo.

### **Estudio estadístico**

Con el programa JMP 16.1 se obtuvieron los valores de media de cada una de las variables y la correlación existente entre cada una de ellas.

Se calculó el coeficiente Kappa para evaluar la concordancia entre las pruebas de IFA, HAS y EC.

## 7. RESULTADOS

Se realizaron tres métodos distintos para evaluar la suero neutralización a través de la IF, HAS y EC. De cada prueba se realizaron tres repeticiones para evaluar el error de medida de cada prueba y de esta manera determinar la repetibilidad de cada protocolo.

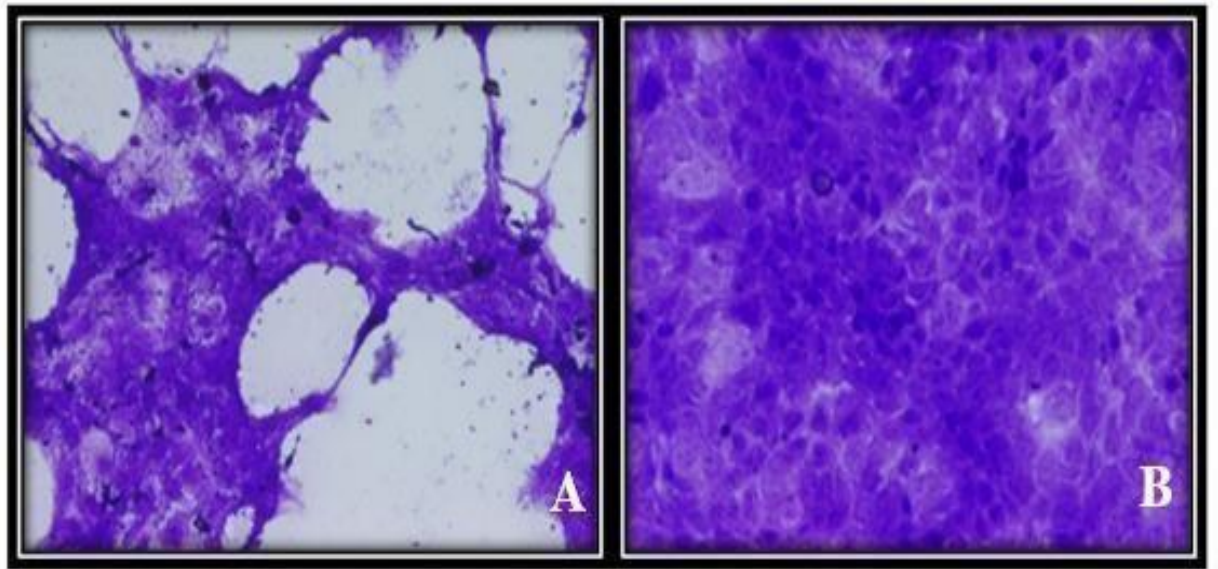
Con cada prueba se obtuvo la titulación de anticuerpos en los sueros, este valor se convirtió a logaritmo base 2. Solo se muestran los resultados de los sueros positivos, ya que los negativos todos fueron igual a cero (Cuadro 1).

En el caso de la suero neutralización con efecto citopático se evaluó la presencia de anticuerpos, al observar el monoestrato celular intacto se consideraron positivos a la presencia de anticuerpos. Si en los pozos había formación de sincicios o destrucción del monoestrato celular, el suero se consideró negativo (sin presencia de anticuerpos que neutralizaran la acción del virus en las células) (Figura 7).

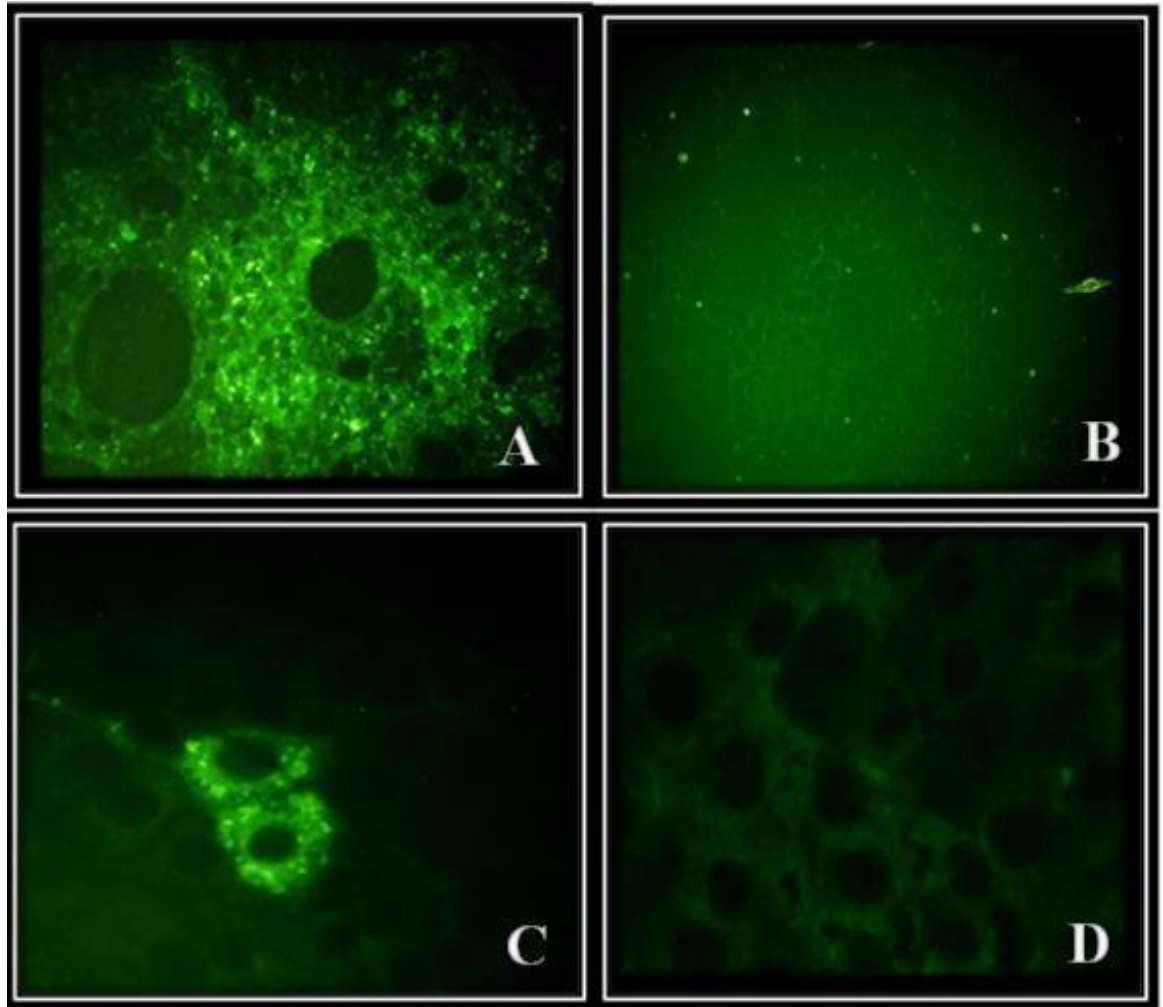
En la suero neutralización con inmunofluorescencia los pozos que presentaron fluorescencia se consideraron positivos a la presencia de anticuerpos ya que el anticuerpo marcado con fluoresceína se une a la IgG de cerdo y este último a su vez se une al virus en la célula, al no observar fluorescencia se consideraron negativos a la presencia de anticuerpos (Figura 8).

En la neutralización con hemaglutinación se tomaron sobrenadantes y se colocaron en placas con fondo en U para posteriormente enfrentarlos con eritrocitos de ave al 0.5%, un pozo con aglutinación fue indicativo de ausencia de anticuerpos ya que se permitió la multiplicación viral, un pozo con sedimentación se consideró lo contrario, presencia de anticuerpos.

Para comparar el grado de concordancia primero se calcularon la media aritmética, la desviación estándar, el porcentaje de positivos y negativos de cada prueba (Cuadro 2).



**Figura 10** . Tinción con cristal violeta a las 72 h. O bjetivo 20X A) Efecto citopático (ausencia de anticuerpos), B) Suero positivo (presencia de anticuerpos).



**Figura 11.** Inmunofluorescencia a las 72 horas A) Fluorescencia que indica presencia de anticuerpos en el pozo, objetivo 10X, B) Monoestrato íntegro sin fluorescencia que corresponde a un pozo negativo (ausencia de anticuerpos). Objetivo 10X, C) Presencia de fluorescencia. Objetivo 40X, D) Pozo negativo. Objetivo 40X.

**Cuadro 2.** Valor del título de los sueros positivos obtenidos en cada repetición por prueba serológica.

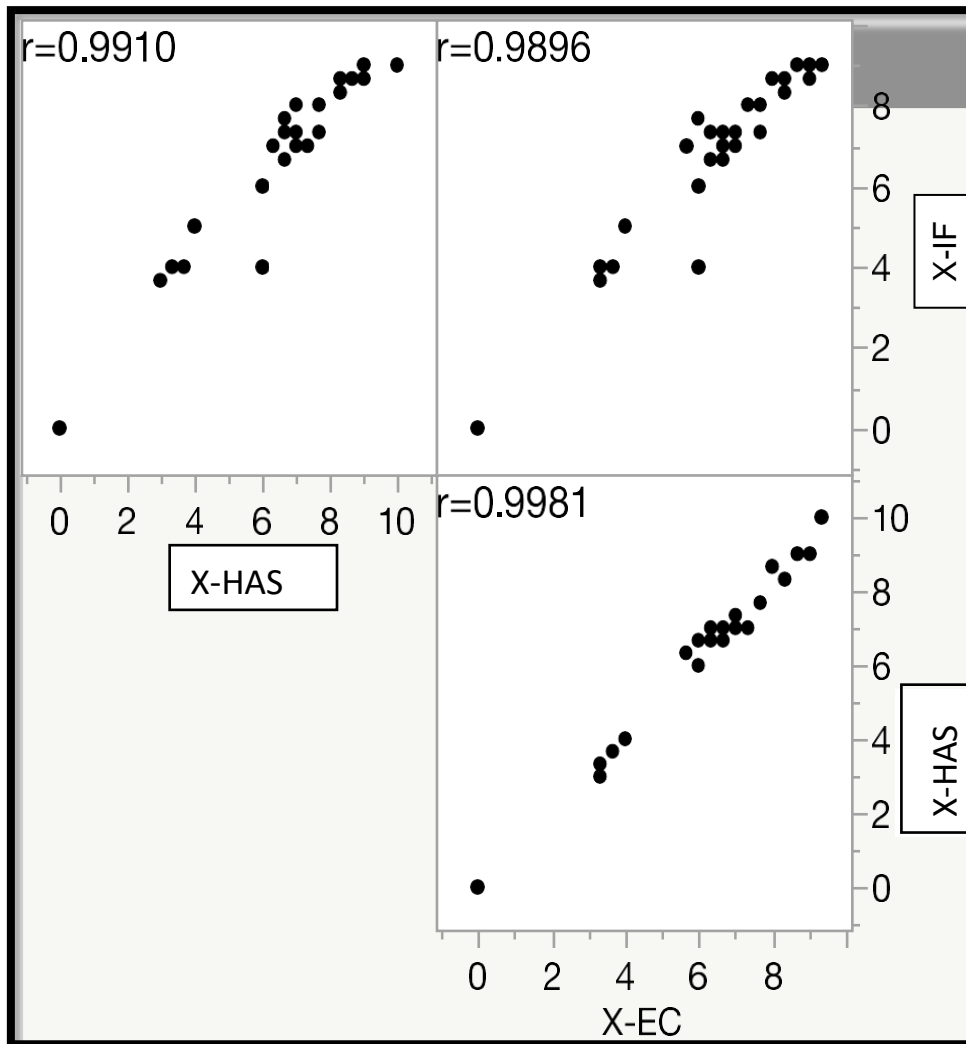
Suero	Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 3		
	IF	HA	EC	IF	HA	EC	IF	HA	EC
1	8	8	8	16	8	16	16	8	8
2	16	8	8	16	16	16	16	8	8
3	256	512	512	512	512	512	512	512	512
4	512	1024	512	512	1024	1024	512	1024	512
5	256	128	256	512	512	512	256	512	256
6	16	8	8	16	16	16	16	16	16
7	32	16	8	32	16	32	32	16	16
8	64	64	64	64	64	64	64	64	64
9	128	128	64	128	128	128	128	128	128
10	128	128	64	128	128	256	128	128	128
11	512	512	512	512	512	512	512	512	512
12	512	512	512	512	512	512	512	512	256
13	256	256	256	512	512	512	512	256	256
14	128	64	64	256	128	128	128	128	128
15	64	64	64	128	128	128	128	128	128
16	0	64	64	64	64	64	64	64	64
17	128	128	128	128	128	128	128	256	128
18	128	128	64	128	128	128	256	128	256
19	128	128	64	128	64	64	64	128	128
20	64	128	128	256	256	256	256	256	256
21	256	256	128	512	512	512	512	512	256
22	128	64	64	256	128	64	256	128	64
23	256	128	128	256	256	256	256	256	256
24	128	128	64	128	64	32	128	64	64
25	128	128	32	256	128	128	128	128	128
26	256	128	128	256	128	256	256	128	128
27	128	128	128	128	128	128	256	128	128

**Cuadro 3.** Medias aritméticas para la suero neutralización con inmunofluorescencia (IF), suero neutralización con sobrenadantes (HAS) y suero neutralización a través de efecto citopático (EC) n=44 incluyendo testigos negativos.

<b>Pruebas</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>%Positivos</b>	<b>%Negativos</b>
IF	4.3	3.7	0.0	9.0	62.2	37.8
HAS	4.2	3.7	0.0	10.0	62.2	37.8
EC	4.1	3.6	0.0	9.3	62.2	37.8



Al calcular los valores de media de cada una de las variables, fue posible medir si existía una relación positiva o negativa entre ellas a través del cálculo de la correlación. También se determinó si esta relación era significativa o no. En la figura 3 se observa que existe una correlación positiva entre las pruebas y que esta relación es significativa de acuerdo al valor de P ( $<.0001$ ).



**Figura 12.** Grafica de dispersión que muestra la correlación entre las variables suero neutralización con sobrenadantes (HAS)-suero neutralización con inmunofluorescencia (IF), suero neutralización a través de efecto citopático (EC)- suero neutralización con inmunofluorescencia (IF) y suero neutralización a través de efecto citopático (EC)- suero neutralización con sobrenadantes (HAS).

### **Coefficiente Kappa**

Para evaluar la concordancia entre las diferentes pruebas diagnósticas se calculó el coeficiente Kappa. Los coeficientes Kappa de las pruebas fueron de uno en todos los casos, lo que indica que los resultados de diagnóstico son consistentes entre las tres pruebas.

## 8. DISCUSIÓN

La comparación entre técnicas diagnósticas de laboratorio que requieren de distinto material y grado de preparación del personal que lo ejecuta, brinda información útil para decidir si es una prueba que se puede aplicar directamente en campo por los médicos de una granja o si se requiere tomar muestras y enviarlas a un laboratorio especializado. Von Lode, (2005) menciona que existen dos corrientes en el diagnóstico clínico, las pruebas rápidas y la otra corriente sería el uso de pruebas inmunológicas más elaboradas. La prueba serológica que más se utiliza para la detección de anticuerpos contra el *Orthorubulavirus porcino* es la inhibición de la hemaglutinación, A pesar de esto, en la actualidad, las autoridades de salud animal en México no tienen establecida una prueba diagnóstica oficial para la enfermedad del ojo azul en cerdos para la identificación del virus ni de los anticuerpos generados por los animales; así como tampoco hay para otras enfermedades endémicas.

(Vannier *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2022) mencionan que para lograr controlar o erradicar una enfermedad se requiere que existan buenas vacunas y un buen diagnóstico serológico. El diagnóstico serológico nos permite visualizar el estatus de una enfermedad dentro de la producción pecuaria, también nos permite dar seguimiento a las medidas de control y manejo orientadas a controlar la enfermedad. Sumado a esto permite evaluar la respuesta que genera una vacuna en los animales.

En México para evaluar la enfermedad del ojo azul existen pocos laboratorios que ofrezcan pruebas serológicas. La prueba que ofrecen estos laboratorios es la inhibición de la hemaglutinación.

En un trabajo de investigación en donde se buscó conocer la prevalencia del *Orthorubulavirus porcino* en diferentes estados de La República Mexicana se utilizó la de inhibición de la hemaglutinación. La prueba se hizo con eritrocitos de cobayo y a 37<sup>0</sup>C. México tiene 32 Estados, en este trabajo de investigación se obtuvieron muestras de sueros de cerdos de 27 Estados de la República Mexicana. El resultado que se obtuvo fue que 13

estados tenían animales con anticuerpos contra el *Orthorubulavirus porcino* (Fuentes *et al*,1992). Debido a la condición geográfica y las características de la producción porcina varios de estos Estados que resultaron positivos, siempre han estado libres de la enfermedad, sin embargo, la serología indicaba que existían animales con anticuerpos contra esta enfermedad. Esto se debió a la falta de estandarización de las técnicas de hemaglutinación e inhibición de hemaglutinación provocando así que se generaran resultados falsos positivos.

En la enfermedad del ojo azul en cerdos para la prueba de hemaglutinación o la inhibición de la hemaglutinación, no se tiene estandarizado que especie de eritrocito a utilizar, tampoco está estandarizado el tiempo de lectura, la concentración de eritrocitos, la temperatura para realizar la prueba y el tipo de placa para ser utilizada. Debido a esto en la actualidad la prueba de inhibición de la hemaglutinación para el *Orthorubulavirus porcino* tiene poca credibilidad para el diagnóstico debido a que los laboratorios utilizan de manera indistinta los eritrocitos de ave, bovino o cobayo. En la investigación realizada por Albarrán *et al*, 2021 observó que al modificar cada uno de estas variables se modifican los resultados.

Estos autores llegaron a la conclusión de que no se pueden utilizar los eritrocitos de las diferentes especies animales de forma indistinta, debido a que los resultados son diferentes al modificar los eritrocitos de la especie animal, la concentración de eritrocitos, la temperatura, el tipo de placa y el tiempo de lectura.

Algo similar podría estar sucediendo con la prueba de suero neutralización, ya que en México existen laboratorios que ofrecen esta prueba de suero neutralización para el diagnóstico del *Orthorubulavirus porcino*, sin embargo, ellos no están obligados a compartir los parámetros que utilizan en el desarrollo de esta prueba.

El objetivo del presente trabajo fue comparar la prueba de suero neutralización a través de inmunofluorescencia, suero neutralización con hemoaglutinación a partir de sobrenadantes y suero neutralización con lectura del efecto citopático, específicamente se analizó el grado de concordancia entre pruebas para evaluar la exactitud de estas.

Se tomó como estándar a la prueba de suero neutralización con lectura del efecto citopático y se compararon suero neutralización a través de inmunofluorescencia, suero neutralización con hemoaglutinación a partir de sobrenadantes. Para realizar la prueba de hemoaglutinación a partir de sobrenadantes se tomaron los sobrenadantes a las 72 horas. A pesar de que el título viral en el sobrenadante del cultivo se midió por 120 horas, este alcanzó el mayor aumento tres días después de la infección de los monoestratos celulares, esta información coincide con lo reportado por Hirose *et al.*, en el 2021 en un estudio realizado con el Coronavirus humano (HCoV), que es otro virus ARN.

Al estudiar la concordancia entre las pruebas de suero neutralización a través de inmunofluorescencia, hemaglutinación a partir de sobrenadantes y efecto citopático se puede concluir que es indistinto el método diagnóstico que se elija porque todas son altamente concordantes, mostrando una correlación entre ellas superior a 0.9. Por lo anterior, si el laboratorio cuenta con recursos humanos capacitados para el manejo de las tres técnicas se puede elegir cualquiera de estas pruebas para evaluar anticuerpos contra el *Orthorubulavirus porcino* cuando se sospeche de la presencia de este en la granja, de lo contrario se recomienda que se haga la lectura de la suero neutralización con efecto citopático o suero neutralización con hemaglutinación a partir de sobrenadantes, ya que no implica un procesamiento posterior ni se requiere de un microscopio especial para su observación.

La metodología y los resultados que se obtuvieron en esta investigación pueden ser ofrecidos a las autoridades sanitarias para proponer el control y la erradicación de la enfermedad de ojo azul en México.

## Lista de abreviaturas y siglas

° C	Grados centígrados
μl	Microlitros
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CD2+	Molécula de adhesión celular cuyos ligandos son CD58 (en no roedores) y CD48 (en roedores)
CD4	Receptor específico de moléculas de tipo II del complejo mayor de histocompatibilidad, clave en el proceso de reconocimiento de antígeno por linfocitos T cooperadores
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Linfocitos dobles positivos en el cerdo que participan en la respuesta celular de memoria.
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	Linfocitos que participan en el control de la Infección.
CD8	Receptor específico de moléculas de tipo I del complejo mayor de histocompatibilidad. Se expresa en linfocitos T citotóxicos
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DICC50%	Dosis infectantes en cultivo celular al 50%

DMEM	Medio minimo esencial de Dulbecco
F	Proteína de fusión
GenBank	Base de datos de secuencias genéticas
HN	Proteína hemaglutinina-neuraminidasa
HI	Inhibición de la hemoaglutinación
kg	Kilogramo
L	Proteína de alto peso molecular
LPMV	Virus La Piedad Michoacán
M	Proteína de matriz
N	Nucleoproteína
nm	Nanómetros
P	Fosfoproteína
PAC	Producción animal cerdos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de hidrogeniones
SFB	Suero fetal bovino
SCP	Plexo coroideo ovino
SNC	Sistema nervioso central
SOA	Síndrome de ojo azul





## 9. REFERENCIAS

Albarrán-Rodríguez, R. R., Castillo-Juarez, H., Rivera-Benítez, F., Campos-Montes, G. R., Espinosa, B., Madrigal-Valencia, T. L., Salazar-Jimenez, E. N., & Ramírez-Mendoza, H. (2022). Assessment of the hemagglutinating activity of the Porcine orthorubulavirus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 80(February 2021). <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101736>

Allan, G. M., McNeilly, F., Walker, I., Linne, T., Moreno-Lopez, J., Hernandez, P., Kennedy, S., Carroll, B. P., Herron, B., Foster, J. C., & Adair, B. (1996). A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: Immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(4), 405–413. <https://doi.org/10.1177/104063879600800401>

Berg, M., Bergvall, A. C., Svenda, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J., & Linné, T. (1997). Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: Comparative analysis of paramyxovirus F proteins. *Virus Genes*, 14(1), 55–61. <https://doi.org/10.1023/A:1007987407250>

Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-Lopez, J., & Linne, T. (1991). Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: Comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *Journal of General Virology*, 72(5), 1045–1050. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-5-1045>

Con, E., Rubulavirus, E. L., Leyva, J. R., Santos, G., Hernández, J., Espinosa, B., Borraz, T., Ramírez, H., & Vallejo, V. (2002). *Mecanismos Moleculares De La Patogenia Viral*: XXVI, 1–29.

Cox, R. M., & Plemper, R. K. (2017). Structure and organization of paramyxovirus particles. *Current Opinion in Virology*, 24, 105–114.

<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.05.004>

Cuevas-Romero, J. S., Blomström, A.-L., & Berg, M. (2015). Molecular and epidemiological studies of Porcine rubulavirus infection – an overview . *Infection Ecology & Epidemiology*, 5(1), 29602. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.29602>

Cuevas-Romero, S., Rivera-Benítez, J. F., Blomström, A. L., Ramliden, M., Hernández-Baumgarten, E., Hernández-Jáuregui, P., Ramírez-Mendoza, H., & Berg, M. (2016). Molecular characterisation of Porcine rubulavirus (PorPV) isolates from different outbreaks in Mexico. *Virus Genes*, 52(1), 81–90. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1281-y>

Chang, A., & Dutch, R. E. (2012). Paramyxovirus fusion and entry: Multiple Paths to a common end. *Viruses*, 4(4), 613–636. <https://doi.org/10.3390/v4040613>

Cox, R. M., & Plemper, R. K. (2017). Structure and organization of paramyxovirus particles. *Current Opinion in Virology*, 24, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.05.004>

Dowlatshahi, S., Shabani, E., & Abdekhodaie, M. J. (2021). Serological assays and host antibody detection in coronavirus-related disease diagnosis. *Archives of Virology*, 166(3), 715–731. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04874-2>

Ernesto, E., Soto, B., Espinoza, A., & Ernesto, F. (2010). Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008 Swine production dynamics in Mexico ( 1980 –2008 ). *World*, 1(3), 251–268.

Fuentes-Rangel M, Carreón-López R, Ramírez-Mendoza H, Trujillo-Ortega ME, De Fraire, I. (1992). Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo

azul en cerdos de la República Mexicana. In *Veterinaria México* (Vol. 23, Issue 1, pp. 37–39).

Hernández-López J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez-Mendoza H, Hernández-Jauregui P, Zenteno, E. (1998). Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64(4), 367–381. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00169-X)

Hernández-Jáuregui, P., Yacoub, A., Kennedy, S., Curran, B., Téllez, C., Svenda, M., Ljung, L., & Moreno-López, J. (2001). Uptake of Porcine Rubulavirus (LPMV) by PK-15 Cells. *Archives of Medical Research*, 32(5), 400–409. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00314-9)

Herrera, J., Gómez-Núñez, L., Lara-Romero, R., Diosdado, F., Martínez-Lara, A., Jasso, M., Ramírez-Mendoza, H., Pérez-Torres, A., & Rivera-Benítez, J. F. (2017). Acute neurologic disease in Porcine rubulavirus experimentally infected piglets. *Virus Research*, 230, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.010>

Hidalgo-Lara, D. R., De la Luz-Armendáriz, J., Rivera-Benítez, J. F., Gomez-Núñez, L., Salazar-Jiménez, E. N., Madrigal-Valencia, T. L., & Ramírez-Mendoza, H. (2021). Comparison of hemagglutination inhibition tests, immunoperoxidase monolayer assays, and serum neutralizing tests in detecting antibodies against blue eye disease in pigs. *Journal of Immunological Methods*, 496(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113088>.

Hirose R, Watanabe N, Bandou R, Yoshida T, Daidoji T, Naito Y, Itoh Y, Nakaya T. 2021. A cytopathic effect-based tissue culture method for HCoV-OC43 titration using TMPRSS2-expressing VeroE6 cells. *mSphere* 6: e00159-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00159-21>.

Julio Reyes Leyva, Gerardo Santos, Jesús Hernández, Blanca Espinosa, María del Tránsito Borraz, Humberto Ramírez, Verónica Vallejo, y Edgar Zenteno (2002), Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el rubulavirus porcino, Mensaje bioquímico, Vol. XXVI.

Killian, M. (2020). *HA influenza.pdf* (pp. 2–9). <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8>

Kirkland D.P, Stephano A, Weingartl H (2012) cap. 41 Paramyxoviruses In: Disease of swine 10th ed, John Wiley & Sons, p573.

Kirkland PD, Stephano A. Paramyxoviruses: rubulavirus, Menangle, and Nipah virus infections. In: Straw B, Zimmerman J, D’Allaire S, Taylor D, eds. Diseases of swine. 9th ed. Ames, IA: Blackwell; 2006, pp. 455–67.

Von Lode, P. (2005). Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clinical Biochemistry*, 38(7), 591–606. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.03.008>

Linné, T., Berg, M., Bergvall, A. C., Hjertner, B., & Moreno-López, J. (1992). The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*, 33(1–4), 263–273. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90054-W](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90054-W)

Mendoza-Magaña, M. L., Ramírez-Herrera, M. A., Dueñas-Jiménez, J. M., & Dueñas-Jiménez, S. H. (2001). Pig paramyxovirus of the blue eye disease binding to a 116 kda glycoprotein expressed in pig neuronal membranes. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(7), 489–499. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00462.x>

McNeilly, F., Walker, I., Allan, G. M., Foster, J. C., Linne, T., Merza, M., Hernandez, P., Kennedy, S., & Adair, B. (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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(1), 3–9. <https://doi.org/10.1177/104063879700900102>

Moreno-López, J., Correa-Girón, P., Martínez, A., & Ericsson, A. (1986). Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of Virology*, 91(3–4), 221–231. <https://doi.org/10.1007/BF01314282>

Nagai, Y. (1999). Paramyxovirus replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding. *Reviews in Medical Virology*, 9(2), 83–99. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1654\(199904/06\)9:2<83::AID-RMV244>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1654(199904/06)9:2<83::AID-RMV244>3.0.CO;2-5)

Reyes-Leyva, J., Hernández-Jáuregui, P., Montaña, L. F., & Zenteno, E. (1993). The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl ( $\alpha$  2,3) lactose-containing structures. *Archives of Virology*, 133(1–2), 195–200. <https://doi.org/10.1007/BF01309755>

Rivera-Benitez, J. F., Cuevas-Romero, S., Pérez-Torres, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., & Ramírez-Mendoza, H. (2013). Respiratory disease in growing pigs after Porcine rubulavirus experimental infection. *Virus Research*, 176(1–2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.017>

Rivera-Benitez, J. F., De la Luz-Armendáriz, J., Saavedra-Montañez, M., Jasso-Escutia, M. Á., Sánchez-Betancourt, I., Pérez-Torres, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., Martínez-Lara, A., & Ramírez-Mendoza, H. (2016). Co-infection of classic swine H1N1 influenza virus in pigs persistently infected with porcine rubulavirus. *Veterinary Microbiology*, 184,

31–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.005>

Rivera-Benitez, J. F., Martínez-Bautista, R., Pérez-Torres, A., García-Contreras, A. del C., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., & Ramírez-Mendoza, H. (2013). Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Veterinary Microbiology*, 162(2– 4). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.037>

Rodríguez-Ropón, A., Hernández-Jauregui, P., Sánchez-Torres, L., Favila-Castillo, L., Estrada-Parra, S., Moreno-López, J., & Kennedy, S. (2003). Apoptosis in Lymph Nodes and Changes in Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Pigs Infected with Porcine Rubulavirus. *Journal of Comparative Pathology*, 128(1), 1–8. <https://doi.org/10.1053/JCPA.2002.0598>

Sánchez-Betancourt, J. I., Santos-López, G., Alonso, R., Doperto, J. M., Ramírez-Mendoza, H., Mendoza, S., Hernández, J., Reyes-Leyva, J., & Trujillo, M. E. (2008). Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Research in Veterinary Science*, 85(2), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.10.007>

Santos-Lopez, G., Hernandez, J., Borraz-Argüello, Ramirez-Mendoza, H., Vallejo, V., & Reyes-Leyva, J. (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del Rubulavirus porcino. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36(2), 119–136. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2004000200003>

Svenda, M., Berg, M., Moreno-López, J., & Linné, T. (1997). Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: Identification of possible functional domains. *Virus Research*, 48(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(96\)01426-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(96)01426-8)

Solís, M., Ramírez-Mendoza, H., Mercado, C., Espinosa, S., Vallejo, V., Reyes-Leyva, J.,

& Hernández, J. (2007). Semen alterations in porcine rubulavirus-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. *Research in Veterinary Science*, 83(3), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.01.018>

Stephano HA, Gay GM, (1983) El síndrome del ojo azul en cerdos en granjas engordadoras, *Memorias del XX Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdos (AMVEC)* (pp. 71–74).

Stephano HA, Fuentes RM, Hernández JP, Herradora LM, Carreón, R. (1988). Encefalitis y opacidad de la cornea en cerdos destetados, inoculados experimentalmente con paramyxovirus de ojo azul. In *Memorias del XXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialista en Cerdos (AMVEC)* (pp. 90–92).

Stephano A (2002). Cap. 3.1 Blue Eye Disease: Clinical Signs and Lesions In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University Press, Iowa City. pp. 47-50 Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, 33(1), 159. <https://doi.org/10.2307/2529310>

Stephano A (2002). Cap. 3.1 Blue Eye Disease: Clinical Signs and Lesions In: Trends in Emerging Viral Infections of Swine. Iowa State University Press, Iowa City. pp. 47-50.

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. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 126(3), 415–424. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00213-3)

Vannier, P., Vedeau, F., & Allemeersch, C. (1997). Eradication and control programmes against Aujeszky's disease (pseudorabies) in France. *Veterinary Microbiology*, 55(1–4),



167–173. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01298-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01298-9)

Zheng, H. H., Fu, P. F., Chen, H. Y., & Wang, Z. Y. (2022). Pseudorabies Virus: From Pathogenesis to Prevention Strategies. *Viruses*, *14*(8). <https://doi.org/10.3390/v14081638>

