



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVOLUCIÓN GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DE DIFERENTES CEPAS DE *RUBULAVIRUS PORCINO*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

CHÁVEZ FLORES MARÍA CONCEPCIÓN

DIRECTORES DE TESIS

MC. NÚÑEZ CARRERA MARÍA GUADALUPE
Dr. RIVERA BENÍTEZ JOSÉ FRANCISCO

ASESORES

Dra. DE LA LUZ ARMENDÁRIZ JAZMÍN
MC. GÓMEZ NÚÑEZ LUIS

Tecamachalco, Pue., Abril de 2023

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado”.

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Francisco Rivera Benítez, por darme la oportunidad de laborar en el área de virología, su dirección y confianza en el desarrollo de este estudio.

A la Dra. Jazmín de La Luz Armendáriz, por la confianza brindada, enseñanza, dedicación, por todo el apoyo y conocimiento aportados, por darme la oportunidad de desarrollarme personal y profesionalmente, y por todas sus aportaciones en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Catalina Tufiño Loza, por ese temple con el que transmite sus conocimientos, por su confianza e influencia en mi desarrollo personal y profesional, por el asesoramiento en la estadística empleada en este estudio.

Al Dr. Luis Gómez Núñez, por su experiencia y conocimientos compartidos, y por sus valiosos comentarios para el desarrollo de este estudio.

A la Dra. María Guadalupe Núñez Carrera por darme la oportunidad de laborar en el área de laboratorio, su dirección y confianza para terminar este estudio.

A la Dra. Rosa del Carmen Xicohténcatl Palacios y a la Dra. Fabiola Rodríguez, por adentrarme a la práctica en el área de biología molecular y por su confianza en mí desarrollo profesional.

Al Dr. José Manuel Saavedra Montañez, por compartir conocimientos en el cálculo del índice de antigenicidad empleado en esta tesis.

A los MVZ José y Guadalupe, por sus consejos que me ayudaron a seguir un camino correcto y lleno de mucho aprendizaje.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de virología, a Ricardo, María José y Manuel, por su amistad, sus enseñanzas y gran apoyo en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por los conocimientos y competencias brindadas en la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). La fuente de financiamiento fue obtenida mediante los proyectos: SEP-CONACYT CB-2016-01- 284863 (vigencia 2018-2021) “Mecanismos de persistencia del *Rubulavirus porcino* en cerdos: influencia del hospedero y del agente etiológico” y PAPIIT-IT201918 “Estandarización de técnicas de diagnóstico para el control y erradicación de *Rubulavirus porcino* en México”.

DEDICATORIAS

A mis padres. Catalina y Antonio, por su comprensión, apoyo incondicional, confianza y por guiarme con principios y con el ejemplo de luchar por lo que se quiere. Por su dedicación porque sin ellos el camino hubiera sido difícil.

A mis hermanos. Lupita, Norma, Fabián e Isabel y Antonio, por su invaluable amistad, sus consejos y actos que me han forjado a ser mejor persona, por su apoyo cuando más lo he necesitado, por ser guías y ejemplo a seguir porque día a día han luchado por ser mejores y no se han rendido. A mi hermanita Lupita por siempre estar presente en mí y apoyarme en todo.

A mis sobrinos. Que me han hecho tener una buena perspectiva de las cosas cotidianas, que me han hecho comprender diversas situaciones. Además, han brindado mucha alegría a mi vida.

A mi familia. Cada integrante ha sembrado en mí una ilusión, un ejemplo, una fortaleza, un sueño. A ti José, por tus consejos que me ayudaron a seguir un camino correcto y lleno de mucho aprendizaje.

A mi esposo. Por su cariño, comprensión, confianza, apoyo constante, dedicación, palabras de aliento, motivación e impulso para seguir adelante. Por mostrarme su gran amor. Te Amo Ricardo.

A mis maestros. Al Dr. Francisco, la Dra. Jazmín, al Dr. Luis, a la Dra. Cati y a la Dra. Lupita por su invaluable amistad, por esa misión y compromiso de formar recursos humanos servidores de la sociedad. Por la ética profesional con la que se dirigen y dirigen a los demás. Por ese compromiso de contribuir a la ciencia y hacer aplicable el conocimiento que ellos generan.

A mis amigas y amigos que estuvieron presentes en ese proceso de formación, que compartieron conmigo cada aprendizaje y cada experiencia que nos hicieron concretar nuestros estudios universitarios.

A todos los animales que han contribuido en mi desarrollo profesional, sin ellos muchas misiones no se habrían concretado.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	II
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	III
DEDICATORIAS	IV
INDICE	V
INDICE DE FIGURAS Y CUADROS	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Importancia económica	3
1.3 Agente etiológico.....	4
1.4 Patogenia.....	7
1.5 Signos clínicos	7
1.6 Tropismo celular.....	8
1.7 Respuesta Inmune	8
1.8 Aislamiento viral	8
1.9 Diagnóstico serológico	9
1.10 Detección molecular y viral	9
1.11 Prevención y control.....	10
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5 OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos Específicos.....	14
6. MATERIAL Y METODOS	15
6.1 Lotes virales	15
6.2 Caracterización antigénica y análisis estadístico	16
6.2.1 Sueros hiperinmunes	16
6.2.2 Tratamiento de los sueros hiperinmunes	16

6.2.3 Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA)	16
6.2.4 Análisis estadístico	17
6.2.5 Índice de antigenicidad	17
6.3 Amplificación del gen HN de RvPo	18
6.4 Caracterización genética y análisis filogenéticos	20
7. RESULTADOS	21
7.1 Lotes virales	21
7.2 Caracterización antigénica	23
7.2.1 Inhibición de la hemoaglutinación	23
7.2.2 Análisis estadístico	26
7.2.3 Determinación del Índice de antigenicidad	28
7.3 Amplificación del gen HN de RvPo	30
7.4 Caracterización genética y análisis filogenético	31
8. DISCUSION	33
9. CONCLUSIÓN	37
10. ANEXO	38
11. BIBLIOGRAFÍA	40

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Árbol filogenético de diferentes aislamientos del gen L de la subfamilia Rubulavirinae (Tomado de: Rima et al., 2019).....	4
Figura 2. Organización del genoma de RvPo (Tomado de: Rima <i>et al.</i> , 2019).....	6
Figura 3. Constantes del termociclador para la amplificación del gen completo HN. a. retro transcripción, b. desnaturalización inicial, c. desnaturalización, d. alineamiento, e. extensión y f. extensión final.....	18
Cuadro 1. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores empleados para la amplificación del gen HN de RvPo.	19
Figura 4. Replicación Viral de 12 cepas de RvPo en células VERO y BGMK.	22
Cuadro 2. Títulos de inhibición de la hemoaglutinación de cepas de RvPo. Se muestran valores del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las lecturas correspondientes a las cepas virales y sueros hiperinmunes.	25
Cuadro 3. Índice Kappa (k) en cepas de RvPo. Se muestran valores de Kappa entre los usuarios (U) y las cepas empleadas en la prueba de IHA.	27
Cuadro 4. Índice de antigenicidad de RvPo. Los valores de 1 indican homología, los valores de .5-.9 y de 1.1-1.5 indican relación antigénica y los valores menores a.5 y mayores a 1.5 indican que no hay relación antigénica.....	29
Figura 5. Corrimiento electroforético en gel de agarosa del producto de reacción de la prueba de RT-PCR en punto final del gen HN del RvPo.....	30
Figura 6. Árbol filogenético del gen HN de las 12 cepas estudiadas del RvPo. La inferencia filogenética se realizó empleando el método Maximum Likelihood con 1000 repeticiones.....	32

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BGMK	Buffalo Green Monkey kidney/ células de riñón de mono verde
C	Cerdo
cbp	Cuanto baste para
CM	Cambio de morfología
CO₂	Dióxido de carbono
DM	Desprendimiento de monoestrato
Dpi	Días post infección
ECP	Efecto citopático
EDOMEX	Estado de México
EOA	Enfermedad de ojo azul
F	Proteína de fusión
GET	Gastroenteritis transmisible
HN	Hemaglutinina neuraminidasa
hpi	Horas pos infección
IA	Índice de antigenicidad
IFA	Inmunofluorescencia
IHA	Inhibición de la hemoaglutinación
K2P	Kimura con dos parámetros
L	Proteína de largo peso molecular
LPMV/VLPM	Virus de La Piedad, Michoacán
M	Mortalidad
MEM	Medio mínimo esencial
Mich	Michoacán
MLE	maximum likelihood

NA	Neuraminidasa
NeuAca2, 3Gal	Ácido N-acetilneuramínico, unido por enlace glicosídico alfa 2-3 galactosa
NP	Nucleoproteína
P	Fosfoproteína
PAC	Producción animal cerdos
Pb	Pares de bases
Pi	Postinfección
PK-15	Porcine kidney/ Riñón de porcino
PM	Proteína de matriz
PPMV	Paramixovirus porcino
PVP	Parvovirus
Qro	Querétaro
RA	Relación antigénica
RC	Redondeamiento celular
RT-PCRpf	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en punto final
RT-PCRtr	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real
RvPo/ RVP	<i>Rubulavirus porcino</i>
SC	Sincitios
SH	Sueros hiperinmunes
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
UHA	Unidades hemoaglutinantes
V	Vacuolización
VERO	Riñón de mono verde africano

RESUMEN

El *Rubulavirus porcino* (RvPo) es el agente causal de la enfermedad del ojo azul (EOA) en cerdos, la cual provoca cuadros clínicos nerviosos y respiratorios en lechones y falla reproductiva en animales adultos. La circulación de este virus ha sido reportada únicamente en México, principalmente en los estados de Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Estado de México y Querétaro. El RvPo causa un impacto negativo en la economía, producción y salud en los sistemas porcícolas a nivel nacional. Se ha descrito y reconocido la circulación del RvPo en los sistemas de producción porcina previamente vacunados, lo que sugiere, la presencia de cepas virales con capacidad genética y antigénica diferente a las cepas vacunales, por lo tanto, es necesario establecer estudios sobre la evolución genética y antigénica del RvPo que afecta la porcicultura mexicana. El objetivo de este estudio fue evaluar la evolución genética y antigénica de diferentes cepas de RvPo que circulan en los sistemas de producción porcina en México y que han sido previamente caracterizadas. Para ello, se obtuvieron lotes virales de diferentes cepas históricas de RvPo en líneas celulares VERO y BGMK susceptibles a la infección por este virus. La replicación fue evaluada con base en la presencia de efecto citopático en los monoestratos celulares y posteriormente, por la prueba de hemoaglutinación. La caracterización antigénica de las cepas virales, se llevó a cabo mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con cuatro repeticiones intra e inter-ensayo utilizando sueros hiperinmunes de referencia elaborados a partir de cada cepa. El índice de antigenicidad se estableció mediante el uso de la fórmula de Archetti y Horsfall. Para la caracterización genética se realizó la extracción del ARN viral para amplificar el gen HN de cada cepa de RvPo, mediante la prueba de RT-PCRpf. Los productos de la prueba fueron purificados y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa bioinformático MEGA 10. En los alineamientos múltiples, fueron consideradas como referencia, las cepas del RvPo del banco mundial de genes (GenBank) para detectar las modificaciones genéticas de las cepas que circulan en México. En los resultados de este estudio se determinó que la cepa PAC3 /Jal /1992 mostró un índice antigénico de 0.76 a 1.15, estos valores indican que existe una alta relación antigénica con el resto de las cepas

evaluadas. En el análisis filogenético se observó que las cepas analizadas en este estudio muestran una homología genética de 99.98% y 99.99% respecto a las secuencias de las cepas reportadas en el Banco Mundial de genes (Gen Bank). En conclusión, se identificó que PAC3 es una de las cepas que muestran un alto potencial para ser considerada como referencia en el establecimiento de pruebas de diagnóstico serológico. El diagnóstico y la caracterización del agente etiológico son herramientas útiles en la prevención y el control del RvPo en sistemas de producción porcina en México.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La enfermedad del ojo azul (EOA) es causada por el *Rubulavirus porcino* (RvPo), la cual provoca cuadros clínicos nerviosos y respiratorios en lechones y falla reproductiva en animales adultos. La EOA fue identificada por primera vez en 1980, en La Piedad, Michoacán, Jalisco y Guanajuato. El aislamiento del virus se realizó a partir de muestras de cerebro de cerdos neonatos con signos nerviosos, neumonía y opacidad corneal, el cual fue denominado como *Paramyxovirus* del síndrome del ojo azul y virus de la Piedad Michoacán VLPM (Stephano *et al.*, 1988). Este virus es conocido como *Rubulavirus porcino* (RvPo), la nomenclatura más reciente propuesta es *Orthorubulavirus porcino* (Rima *et al.*, 2019), es considerado endémico en la región centro y del Bajío de México (Fuentes *et al.*, 1992; Escobar *et al.*, 2012). En los primeros brotes, el VLPM-1984, se identificó por ocasionar opacidad corneal, signo característico de la infección y por el cual se le asignó el nombre a la enfermedad (enfermedad del ojo azul). Estudios genómicos del *Rubulavirus porcino* mencionan que tiene un ancestro común a los paramixovirus de otras especies animales (Berg *et al.*, 1997; Svenda *et al.*, 1997, 2002).

1.2 Importancia económica

La importancia de la EOA radica en las pérdidas económicas que esta genera, tales como disminución de la fertilidad, aumento en el número de lechones nacidos muertos (19%) y momificaciones (30%). También, se ha descrito aumento en la mortalidad de lechones durante las primeras semanas después del nacimiento y retraso en el crecimiento. En machos adultos la principal repercusión se encuentra asociada a la eliminación de sementales de alto valor genético (Kirkland *et al.*, 2006). En 1992 se calculó que la EOA, Rinitis Atrófica (RA), Aujeszky, Parvovirus Porcino (PVP) y Gastroenteritis Transmisible (GET) representaron pérdidas económicas de 62.2 millones de pesos anuales (Fuentes *et al.*, 1992).

1.3 Agente etiológico

El virus de EOA o RvPo, se clasifica en el orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Rubulavirinae*, género *Orthorubulavirus*, especie *Orthorubulavirus porcino* (Rima *et al.*, 2019), (Figura 1). Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos, 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 hemoaglutinantes, hemolítica, de neuraminidasa y formadora de sincitios (Moreno *et al.*, 1986; Reyes *et al.*, 1999).

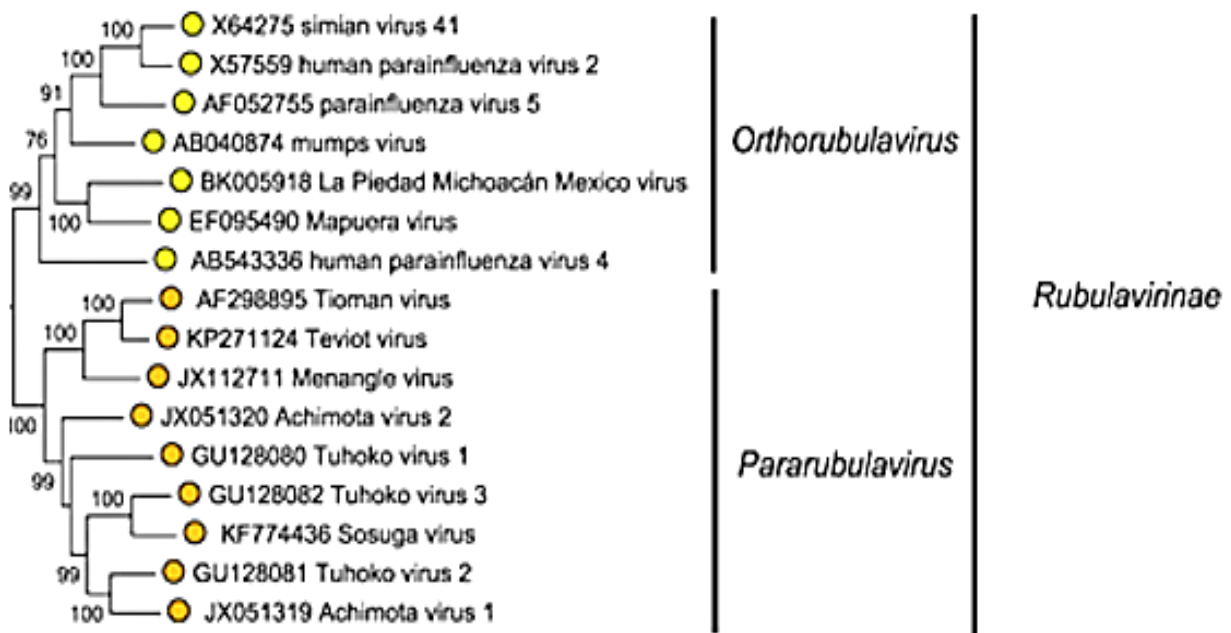


Figura 1. Árbol filogenético de diferentes aislamientos del gen L de la subfamilia Rubulavirinae (Tomado de: Rima *et al.*, 2019).

El genoma viral está conformado por una cadena de ARN en sentido negativo con una longitud de 15,180 nucleótidos, que consiste en seis genes de acuerdo a sus proteínas: la nucleoproteína (NP), la proteína de alto peso molecular (L), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (PM), la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina neuraminidasa (HN). La HN es una proteína multifuncional que presenta actividad hemaglutinante, neuraminidasa y promotora de fusión de las membranas viral y celular (Figura 2), (Sundqvist *et al.*, 1991). Su fracción glicosídica está constituida por manosa, galactosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina en proporciones de 3:3:2:1 respectivamente, así como trazas de ácido N-acetilneuramínico (Moreno *et al.*, 1986, Reyes *et al.*, 1999). Lo que muestra la proporción y los constituyentes típicos de una proteína N-glicosilada, coincidiendo con las predicciones de composición peptídica y de N- glicosilación basadas en la secuencia genética (Zenteno *et al.*, 1998).

La glicoproteína HN tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de una gran variedad de especies animales, incluyendo cerdo, carnero, vaca, perro, conejo, ratón, rata, hámster, cobayo, pollo y humano tipos A, B, y O (Reyes *et al.*, 1993, Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997). Esto se debe al reconocimiento específico de ácido siálico expresados en las superficies de estos eritrocitos. Al respecto, se ha demostrado, que la proteína HN posee mayor afinidad por residuos de ácido N-acetilneuramínico unidos por enlace glicosídico alfa 2-3 galactosa (NeuAca2, 3Gal), los cuales inhiben su actividad hemaglutinante (Reyes *et al.*, 1999). La proteína HN también posee actividad de neuraminidasa o sialidasa que le permite hidrolizar los residuos de ácido siálico de los receptores celulares; esta actividad se realiza de forma más eficiente a un pH de 3.3 y es estable en un rango de temperatura de 30-55°C (Santos *et al.*, 2017).

La glicoproteína F es conservada entre los miembros de la familia Paramyxoviridae y otras familias de virus ARN de cadena negativa. Esta proteína tiene un dominio altamente hidrofóbico que participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo que permite que el virus se introduzca al citoplasma y que se difunda de célula a célula sin exponerse al medio extracelular, esta característica origina la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios) apreciables en tejidos y en cultivos celulares infectados por paramixovirus (Morrison *et al.*, 1991).

La proteína de Matriz (PM) se localiza en la parte interna de la envoltura viral, está constituida por 369 aminoácidos (Berg M. *et al*, 1991), gran parte de los cuales son de carácter básico. Debido a su carga positiva tiene gran afinidad por la NP, característica importante que le permite intervenir en el ensamble de la partícula viral con un reducido gasto energético, interactuando con las nucleocápsides en las zonas de la membrana celular donde se expresan las glicoproteínas virales (Sanderson *et al.*, 1993).

La nucleoproteína (NP) forma parte integral de la nucleocápside y rodea al ARN genómico. Proporciona una conformación adecuada a la cadena de ARN genómico durante su transcripción y replicación. A la nucleocápside se asocian aproximadamente cincuenta complejos con actividad de polimerasa que se encargan de la transcripción y replicación del genoma viral. Cada complejo está formado por tres unidades de la proteína P y una de la proteína L, aunque también se puede presentar el mismo número de complejos de proteína P sin la proteína L (Kolakofsky *et al.*, 1998). La proteína L es la más grande del virión y es el componente catalítico de la ARN polimerasa (Svenda *et al.*, 1997).



Figura 2. Organización del genoma de RvPo (Tomado de: Rima *et al.*, 2019).

1.4 Patogenia

La principal forma de transmisión del RvPo es horizontal por inhalación de partículas presentes en aerosoles, vertical por vía intrauterina. Experimentalmente se han evaluado diferentes vías de inoculación como intracerebral, intratraqueal, intranasal, intraocular e intramuscular, logrando replicar la infección y los signos clínicos característicos de la enfermedad. El RvPo, ingresa a la mucosa nasal y tonsilas donde se lleva a cabo la replicación local y posteriormente es diseminado a diferentes órganos por varias vías, la principal, es por medio de los nervios olfatorio y trigémino hacia el sistema nervioso central (SNC), por vía aérea es diseminado hacia los pulmones, por último, se ha descrito que los eritrocitos y leucocitos juegan un papel fundamental en la diseminación por vía sistémica (Kirkland *et al.*, 2006). El RvPo es excretado principalmente por fluidos nasales, orales, orina, semen y heces (Stephano *et al.*, 1999).

1.5 Signos clínicos

El periodo de incubación es de 3-7 Dpi, los signos clínicos varían de acuerdo con la edad de los animales. En cerdos lactantes las manifestaciones nerviosas se presentan en forma progresiva, aguda y generalmente son fatales (Stephano *et al.*, 1988). La enfermedad es caracterizada por excitación, temblor, hipersalivación, incoordinación, ataxia, opistótonos y depresión (Herrera *et al.*, 2017). En los cerdos de 3 a 4 meses de edad, las manifestaciones neurológicas son escasas y la tasa de mortalidad es baja (Herrera *et al.*, 2017). En cerdos adultos, las lesiones se limitan al aparato reproductor, en las hembras se presentan abortos, mortinatos y baja fertilidad; y en machos se observa epididimitis, orquitis, atrofia testicular y decremento en la fertilidad (Stephano *et al.*, 1999; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997). La opacidad corneal se presenta del 1 a 10% de los animales infectados de cualquier edad (Stephano *et al.*, 1988). Se ha demostrado que; al existir una co-infección de RvPo con otros virus respiratorios como el virus de Influenza H1N1, PRRS, puede agudizar los signos clínicos en tracto respiratorio (Rivera *et al.*, 2016).

1.6 Tropismo celular

El tropismo celular del virus se encuentra determinado por la presencia del oligosacárido NeuAca2, 3Gal en los tejidos, lo cual explica la asociación de signos clínicos con la edad de los porcinos ya que diferentes autores describen que en el caso de los cerdos neonatos presentan una mayor proporción de este oligosacárido en SNC y en cerdos adultos se presenta una mayor distribución en el sistema reproductor (Reyes-Leyva *et al.*, 1997, 2002, Mendoza *et al.*, 2007).

1.7 Respuesta Inmune

La respuesta inmune celular ha mostrado que las células mononucleares en cerdos infectados, proliferan mediante el estímulo antigénico con el RvPo *in vitro*. Esta proliferación se presenta a partir de la segunda semana post infección (Pi) y se mantiene durante siete semanas, alcanzando el punto máximo a la cuarta semana pi (Hernández *et al.*, 1998). Las células que proliferan en la sangre como respuesta a la infección persistente por RvPo son los linfocitos T (Hernández *et al.*, 2001, 2004, Reyes *et al.*, 2004, Rodríguez *et al.*, 2003). Con relación a la respuesta inmune humoral, se ha demostrado la producción de anticuerpos en cerdos infectados naturalmente, los cuales pueden permanecer por lo menos durante año y medio en los animales que sobreviven (Stephano *et al.*, 1999).

1.8 Aislamiento viral

El aislamiento de RvPo se ha realizado en cultivos primarios de células de cornete nasal, testículo, tiroides, fibroblastos de embrión de pollo, piel, paladar, así como líneas celulares de riñón de gato (CK), riñón de hámster (BHK21), Riñón de mono verde (VERO) y riñón porcino (PK-15) (Borraz *et al.*, 2008, Cuevas *et al.*, 2013, Rivera *et al.*, 2013, Sánchez *et al.*, 2008, Solís *et al.*, 2007). El principal efecto citopático (ECP) en cultivos celulares es la formación de sincitios (células gigantes multinucleadas), algunos autores han descrito otros, tales como; redondeamiento celular, lisis, vacuolización, desprendimiento del monoestrato, entre otros (Reyes-Leyva *et al.*, 1999).

1.9 Diagnóstico serológico

La presencia de anticuerpos se identifica por ensayos de neutralización viral y la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA), a partir de la primera y segunda semana pi, respectivamente. Los anticuerpos contra la proteína HN se han detectado por inmunotransferencia a los 15 Dpi, mientras que para las proteínas NP y PM del RvPo han sido identificadas a la cuarta y quinta semana Pi, respectivamente (Hernández *et al.*, 2001).

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación se basa en la unión de la proteína HN del RvPo con anticuerpos de muestras de suero sanguíneo de animales susceptibles a la infección por este virus (Ramírez *et al.*, 1997).

La seroneutralización es una prueba en la que se evidencia la reacción antígeno-anticuerpo y detecta la capacidad neutralizante de los anticuerpos presentes en el suero de animales infectados con RvPo (Hernández *et al.*, 1992).

1.10 Detección molecular y viral

La detección molecular se realiza por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real (RT-PCRtr) basada en la detección de los genes que codifican a la nucleoproteína y la proteína P (Rivera *et al.*, 2014; Cuevas *et al.*, 2009, 2014). Esta es una prueba cuantitativa, en donde se determina la carga viral en muestras de animales infectados.

Por otra parte, se ha descrito la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en punto final (RT-PCR pf) empleando principalmente la detección del gen de HN de RvPo. Esta prueba es de tipo cualitativa, en donde se observa amplificación de un fragmento de ADN.

Por otra parte, se ha descrito la presencia del virus en cerebro, pulmón, sangre, bazo, hígado, riñón, nódulos linfáticos retrofaríngeos, orina y cornetes nasales. En hembras se ha detectado en ovario, placenta y útero, en machos se ha detectado en semen y testículos (Dominiek *et al.*, 2016). El RvPo también ha sido identificado por medio de inmunofluorescencia directa en eritrocitos de 4-12 días pi y en leucocitos de 12-20 Dpi (Reyes *et al.*, 2004).

1.11 Prevención y control

La bioseguridad es fundamental para evitar la introducción de agentes virales a un sistema de producción. Como medidas básicas se utiliza tapete sanitario, una barda perimetral, áreas de carga separadas, regaderas, control de fauna nociva, personal para cada área de producción, control de movilización de visitantes y vehículos.

Como medidas de prevención, el monitoreo serológico y molecular es recomendable en los sistemas de producción, principalmente en animales de reemplazo y de nuevo ingreso a la granja. Cuando la infección está presente en el sistema de producción debe implementarse prácticas de limpieza y desinfección de las áreas, basadas en el sistema todo dentro todo fuera y fomentar el control por medio de programas de vacunación. (Sánchez *et al.*, 2008).

Existen vacunas comerciales elaboradas con virus inactivado, empleadas en distintas etapas productivas, en lechones, animales en crecimiento, reemplazos, sementales, hembras en gestación y en lactancia. Durante años se han realizado experimentos en busca de un inmunógeno eficaz para la prevención del RvPo. La vacuna de paramixovirus de ojo azul cepa 1987 (POA-87) inactivado, fue propuesta por Fuentes *et al.*, en 1994, en la que se comprobó el 71% de inmunidad pasiva en lechones y que el 100% de lechones de hembras no vacunadas murieron al ser desafiados (Fuentes *et al.*, 1994).

También, se han reportado vacunas generadas con la implementación de técnicas moleculares, Zenteno *et al.*, en 1997 identificaron los epítomos específicos de la proteína HN del RvPo, los cuales se incorporaron a la proteína OmpC de *Salmonella typhi* y expresados en bacterias del género *Escherichia coli*. Este antígeno recombinante generó anticuerpos en ratones y conejos, capaces de reconocer y bloquear la actividad de la proteína HN.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El *Rubulavirus porcino* causa un impacto negativo en la economía, producción y salud de los sistemas de producción porcina de México. Se han descrito seroprevalencias de 9 a 36% en diferentes estados, lo cual es asociado a los cambios antigénicos y genéticos de las cepas de reciente circulación, lo que predispone a que los cerdos, a pesar de estar vacunados, desarrollen los signos clínicos de la enfermedad de ojo azul.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, se ha reconocido la presencia del RvPo en sistemas de producción con registros de vacunación, lo cual hace necesario establecer estudios sobre las características genéticas y antigénicas de las cepas del virus que circulan en la porcicultura mexicana.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de RvPo que circulan de forma natural en México presentan regiones genéticas conservadas que generan homología antigénica entre ellas a través del tiempo.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar genética y antigénicamente las cepas de *Rubulavirus porcino*.

5.2 Objetivos Específicos

- Replicar cepas virales históricas del RvPo en líneas celulares.
- Realizar la caracterización antigénica por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.
- Determinar el índice de antigenicidad entre las diferentes cepas evaluadas.
- Realizar diagnóstico molecular y amplificar gen HN empleando la prueba de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en punto final.
- Realizar estudios de caracterización genética y análisis filogenéticos.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Lotes virales

La obtención del lote viral consistió en la replicación de diferentes cepas de RvPo PPMV/Mich/1980, LPMV/Mich/1984, PAC1/Mich/1990, PAC2/Jal/1990, PAC3/Jal/1992, PAC4/Mich/1993, PAC5/EDOMEX/1995, LPMV/Mich/1/2000, PAC6/Jal/2001, LPMV/Mich/1/2013, LPMV/Mich/147/2013, LPMV/Qro/93/2013 en líneas celulares de riñón de mono verde VERO y BGMK en botellas de 25 cm², las cuales fueron infectadas en monoestratos confluentes al 80%. El inóculo de infección se preparó realizando una dilución 1:10 de cada cepa en medio mínimo esencial (MEM), el cual se confrontó al monoestrato celular durante 30 minutos a 36°C, posteriormente se adicionó MEM con suero fetal bovino (SFB) al 5% y las botellas de cultivo fueron mantenidas en un ambiente controlado a 37°C, atmósfera de CO₂ al 5% y observadas en el microscopio óptico cada 12 horas. A las 72 horas post infección (hpi), se evaluó la replicación viral mediante la observación de efecto citopático, se tomaron alícuotas de sobrenadante, a los cuales se les realizó la prueba de hemoaglutinación (HA) y la detección de ARN viral por RT-PCR punto final. Una vez identificado un título hemoaglutinante mayor a 8 unidades hemoaglutinantes se procedió a obtener lotes virales, los cuales fueron conservados en ultra congelación hasta su utilización.

6.2 Caracterización antigénica y análisis estadístico

6.2.1 Sueros hiperinmunes

Los sueros hiperinmunes fueron obtenidos del banco de sueros del laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Sanidad Animal e Inocuidad (CENID-SAI) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se emplearon 24 sueros hiperinmunes en contra de las cepas PPMV/Mich/1980, LPMV/Mich/1984, PAC1/Mich/1990, PAC3/Jal/1992, PAC4/Mich/1993, PAC5/EDOMEX/1995, LPMV/Mich/1/2000, PAC6/Jal/2001, LPMV/Mich/1/2013, LPMV/Mich/147/2013, LPMV/Qro/93/2013, cepa vacunal A y B como testigos positivos y cinco sueros como testigos negativos.

6.2.2 Tratamiento de los sueros hiperinmunes

Para inactivar factores inespecíficos de la hemaglutinación de los sueros hiperinmunes, se realizó un proceso térmico y químico en cada suero que consistió en realizar alícuotas de 5 ml de cada suero, las cuales fueron sometidas a una temperatura de 56°C durante 30 minutos, concluido este tiempo, a cada tubo se le agregaron 10 ml de glóbulos rojos de ave al 10% y 10 ml de caolín al 10%, se homogenizaron y todos los tubos fueron incubados a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos, obteniendo el sobrenadante, que consiste en los sueros inactivados y adsorbidos, diluidos 1:5 y fueron almacenados a -70°C hasta su empleo.

6.2.3 Prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA)

La caracterización antigénica se llevó a cabo por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) empleando los lotes virales obtenidos y los 24 sueros hiperinmunes previamente tratados. La prueba de IHA se realizó en placas de 96 pozos con fondo en "U", en las cuales se hicieron diluciones dobles seriadas del suero comenzando 1:10 y finalizando en la dilución 1: 20,480, después se agregaron 50 µl por pozo del lote viral conteniendo ocho unidades hemoaglutinantes, se incubó durante

30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó glóbulos rojos de pollo al 0.5% de los cuales se depositó un volumen de 50 μ l por pozo, se incubó durante 30 minutos. Para finalizar, se llevó a cabo la lectura de las placas, en las cuales se consideró como suero positivo a la presencia de anticuerpos específicos en contra del RvPo en todos aquellos pozos en donde se observa sedimentación de glóbulos rojos y los negativos fueron aquellos pozos en los que se observa hemoaglutinación. En el caso de los sueros positivos se indicó la última dilución en la que se observó la sedimentación.

6.2.4 Análisis estadístico

Con la finalidad de darle validez estadística a la prueba, se realizaron cuatro pruebas inter-ensayo y cuatro repeticiones intra-ensayo, además las lecturas se realizaron por cuatro observadores con diferente grado de experiencia. Posteriormente, se obtuvo el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e índice kappa de las lecturas de estas repeticiones.

6.2.5 Índice de antigenicidad

Para llevar a cabo el estudio de índice de antigenicidad se emplearon los resultados obtenidos de la prueba de IHA con las cepas virales y los sueros hiperinmunes correspondientes a estas cepas. Para este análisis se empleó la fórmula de Archetti y Horsfall (Archetti y Horsfall, 1950), para establecer la relación antigénica entre las diferentes cepas. En esta fórmula se compararon las cepas homólogas y heterólogas a un suero hiperinmune (SH), en la que, se divide el promedio de la cepa heteróloga 2 entre el promedio del título de la cepa homóloga 1 (R1). Posteriormente se dividió el promedio de la cepa heteróloga 1 entre el promedio de la cepa homóloga 2 (R2), seguido de la multiplicación de R1 por R2 y por último se obtuvo la raíz cuadrada del resultado anterior. En las cepas virales con las que se contó con dos sueros hiperinmunes, se promedió el resultado obtenido. La interpretación del resultado se basa en que, valores de 1 indican homología, los valores de 1.1-1.5 y de 0.5-0.9 indican relación antigénica y los valores menores a 0.5 y mayores a 1.5 indican que no existe relación antigénica.

6.3 Amplificación del gen HN de RvPo

Se amplificó el gen HN de RvPo en las 12 cepas utilizadas en este estudio empleando iniciadores previamente diseñados por Gómez-Núñez L *et al* (en prensa), lo cuales se muestran en el Cuadro 1. Se emplearon los lotes virales para hacer extracción de ARN utilizando el paquete comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52906), siguiendo las instrucciones del fabricante, posteriormente se empleó la prueba de RT-PCRpf la cual consistió en someter el ARN en diferentes temperaturas y tiempos. El primer paso de retro transcripción a 50°C por 30 minutos, seguido de una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, posteriormente durante 40 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 62°C por 30 segundos, extensión 72°C por 2 minutos) y por último la extensión final a 72°C por 10 minutos (Figura 3). Se utilizó el paquete comercial QIAGEN® OneStep RT-PCR kit (Cat.No. 210212). Los productos de RT-PCRpf fueron visualizados por medio de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. Todos aquellos productos que resultaron positivos fueron purificados con el paquete comercial QIAquick® Gel Extracción Kit (50) Cat. No. 28704 y secuenciados por secuenciación capilar de Sanger.

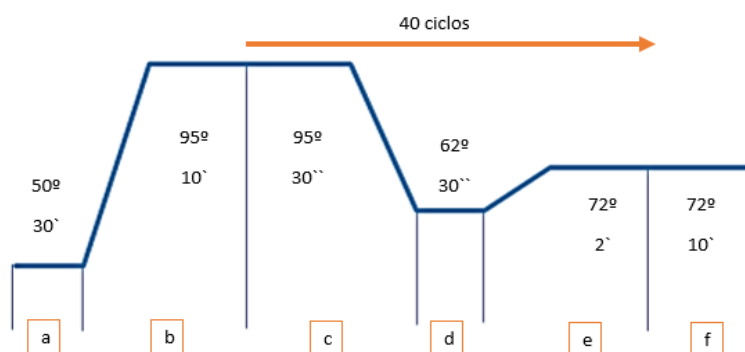


Figura 3. Constantes del termociclador para la amplificación del gen completo HN. **a.** retro transcripción, **b.** desnaturalización inicial, **c.** desnaturalización, **d.** alineamiento, **e.** extensión y **f.** extensión final.

Cuadro 1. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores empleados para la amplificación del gen HN de RvPo.

INICIADOR	SECUENCIA	PRODUCTO (PB)	TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO
DELANTERO	5'- CGA ATA GAA TGG TAA TGA TGG GAA GTA - 3'	535	62°
REVERSO	3'-TCT CGT AAG GGT ACA TCA ATC TGA AAT TCA-5'		
DELANTERO	5'-GCA ATG TCT CAA TTA GGG ACT GAT -3'	537	62°
REVERSO	3'-AGC AAA TGA TGG TAT CCG AG TACA TCC-5'		
DELANTERO	5'-TAA CGC ATG CTG GAC AGT GA-3'	613	62°
REVERSO	5'-CCC CCA CAA CTC TTG ACT CTT-3'		
DELANTERO	5'-CTA CTC AAT GAT CCA CGA TAR ATG AGT GGT-3'	882	62°
REVERSO	3'-CCA CCA AGA ACTA CT GCG TT ATA AT-5'		

6.4 Caracterización genética y análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa bioinformático MEGA versión 10, se realizaron alineamientos múltiples considerando las cepas reportadas previamente en la base de datos del banco mundial de genes (GenBank) (www.ncbi.nlm.nih.gov), posteriormente se identificaron regiones conservadas y variables al comparar diferentes cepas de RvPo. También, se realizaron análisis filogenéticos mediante el método de Máxima verosimilitud (MLE, por sus siglas en inglés: *maximum likelihood estimation*), el cual infiere con base a la existencia de transiciones y transversiones entre bases nitrogenadas. Las distancias genéticas fueron estimadas con el modelo Kimura-2-parámetros (K2P). Los valores más bajos indican que la variación se atribuye a pocos nucleótidos que varían de manera más frecuente, por el contrario; los valores altos indican tasas de sustitución distribuidas de manera uniforme. En cuanto a la fiabilidad del árbol filogenético fue evaluada con 1000 repeticiones.

7. RESULTADOS

7.1 Lotes virales

Durante la replicación de las cepas virales, en las células testigo no se observó efecto citopático (ECP), ya que estas, conservaron su integridad durante el tiempo de infección. El ECP que se observó en el monoestrato de las células infectadas se incluyen sincitios (SC), redondeamiento de células (RC), desprendimiento de monoestrato (DM), mortalidad (M), cambio de morfología (CM) y vacuolización (V).

Las cepas PAC1/Mich /1990, PAC2 /Jal /1990 y PAC3 /Jal /1992 obtuvieron un título hemoaglutinante de 1:64, este fue el mayor título por hemoaglutinación (HA) observado. Por el contrario, en las cepas PAC4 /Mich /1993, PAC5/EDOMEX /1995 y PAC6 /Jal /2001 se detectaron títulos de 1:8.

En la Figura 4. Se muestran los resultados obtenidos del efecto citopático y título hemoaglutinante de las 12 cepas de RvPo, analizadas en este estudio.

Cepa	Efecto citopático				ECP	Título HA
	TESTIGO	24hrs	48hrs	72hrs		
PAC1/Mich /1990					CM, DM, SC, M, V	1:64
PAC2 /Jal /1990					M, V, SC, RC, DM, CM,	1:64
PAC3 /Jal /1992					M, DM, SC, RC, CM	1:64
PAC4//Mich /1993					M, CM, DM, RC, SC	1:8
PAC5/EDO MEX /1995					DM, CM, M, SC	1:8
PAC6 /Jal /2001					RC, DM, M, SC, CM	1:8
PPMV /Mich /1980					M, V, SC, RC, DM,CM	1:32
LPMV/Mich /147/2013					M, SC, RC, CM, DM	1:32
LPMV /Mich /1984					M, SC,V, CM,DM	1:16
LPMV/Mich /1 /2013					M,SC, DM, CM, RC	1:32
LPMV/Mich /1/2000					M, CM, SC, RC	1:16
LPMV /Qro /93/2013					M, CM, DM, RC	1:32

Figura 4. Replicación Viral de 12 cepas de RvPo en células VERO y BGMK.

7.2 Caracterización antigénica

7.2.1 Inhibición de la hemoaglutinación

En la IHA se obtuvieron diferentes títulos de anticuerpos para cada cepa viral en relación a los sueros hiperinmunes (SH) de cepas homólogas y heterólogas, de los cuales se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Para la interpretación del coeficiente de variación, los valores más cercanos a “0” indican poca variabilidad entre los títulos de anticuerpos medidos por IHA, por el contrario, valores próximos a “1” muestran mayor dispersión de estos títulos. El punto de corte para determinar que los sueros hiperinmunes son positivos, fueron los que obtuvieron un valor similar o mayor a 1:10, los títulos por debajo de este valor se consideraron negativos.

Los sueros testigos negativos (n=5) fueron específicos para la mayoría de las cepas, sin embargo; se identificó un reconocimiento inespecífico variable en las cepas PAC5/EDOMEX/1995, LPMV/Mich/1984, LPMV/Mich/1/2000 y LPMV/Qro/93/2013.

El suero hiperinmune de la cepa vacunal A no presentó anticuerpos específicos en contra de ninguna cepa viral. Por el contrario, el SH de la cepa vacunal B fue positivo al confrontarse con todas las cepas virales empleadas. En este suero hiperinmune el mayor título de anticuerpos fue en promedio de 1:466 para la cepa viral PPMV/Mich/1980 y el menor fue de 1:25 para la cepa LPMV /Mich/1 /2013.

Los SH que fueron específicos y que obtuvieron mayor título de anticuerpos por IHA al confrontarse con las cepas homologas y heterólogas fueron los correspondientes a las cepas PAC1/Mich/1990, PAC2/Jal/1990, PAC3/Jal/1992, PAC6/Jal/2001 y LPMV/Mich/147/2013 con un promedio en el título de anticuerpos de 1:220, 1: 134, 1:122, 1:166, 1:281 y valores en el coeficiente de variación (CV) de: 0.71, 0:64, 0.56, 0.74 y 0.67, respectivamente.

Lo anterior, indicó que PAC3/Jal/1992 es una cepa específica, que mostró antigenicidad cruzada con los SH de las cepas evaluadas debido a que se registraron títulos altos por IHA al confrontarse con SH homólogos, estos títulos son de 1:90 y 1:155. Además, al confrontar esta cepa viral con los SH de las cepas heterólogas, el mayor título de anticuerpos fue de 1:284 para la cepa LPMV/Mich/1984, mientras que; el título de anticuerpos más bajo se presentó en el SH correspondiente a la cepa PAC4/Mich/1993 con un título de 1:37. Además la cepa PAC3/Jal/1992 tuvo un título de anticuerpos promedio de 1:122 y un coeficiente de variación de 0.56, lo que indicó poca variabilidad entre los títulos de anticuerpos obtenidos en cada SH evaluado, de esta forma se identificó que esta cepa tiene un reconocimiento homogéneo frente a anticuerpos generados con cepas heterólogas.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de IHA.

Cuadro 2. Títulos de inhibición de la hemoaglutinación de cepas de RvPo. Se muestran valores del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las lecturas correspondientes a las cepas virales y sueros hiperinmunes.

SH	CEPA											
	PAC1 /Mich /1990	PAC2 /Jal /1990	PAC3 /Jal /1992	PAC4 /Mich /1993	PAC5 /EDOMEX /1995	PAC6 /Jal /2001	PPMV /Mich /1980	LPMV /Mich /147/2013	LPMV /Mich /1984	LPMV /Mich/1 /2013	LPMV /Mich /1/2000	LPMV /Qro /93/2013
PPMV /Mich/1980	149	85	67	61	93	100	81	129	71	20	85	75
PPMV /Mich/1980	121	63	64	51	85	73	69	88	43	14	53	54
LPMV /Mich/1984	670	370	284	361	410	540	515	695	270	73	268	300
PAC1 /Mich/1990	84	50	41	52	55	48	57	61	31	13	30	29
PAC1 /Mich/1990	224	118	96	108	131	143	122	230	89	28	93	104
PAC3 /Jal/1992	179	82	90	93	101	115	80	165	68	21	63	80
PAC3 /Jal/1992	295	213	155	140	194	235	170	355	104	28	135	123
PAC4 /Mich1993	73	37	37	34	75	51	43	70	38	13	51	48
PAC4 /Mich1993	116	77	83	83	145	88	83	153	54	16	50	59
PAC5 /EDOMEX/1995	513	248	188	247	333	335	288	560	216	51	179	200
PAC5 /EDOMEX/1995	205	134	120	124	220	125	155	250	85	33	58	95
PAC6 /Jal/2001	308	198	224	175	158	186	190	330	90	21	110	160
PAC6 /Jal/2001	269	190	150	229	205	206	204	518	125	36	135	155
LPMV/Mich /1/2013	99	62	63	44	108	61	64	126	55	30	56	68
LPMV/Mich /1/2013	75	48	58	39	58	56	56	185	33	16	61	41
LPMV/Mich /147/2013	200	123	146	138	145	160	135	230	115	29	106	113
LPMV/Qro /93/2013	210	143	173	169	168	250	163	460	133	41	178	168
VACUNAL B	166	166	164	140	160	220	466	460	115	25	143	125
PROMEDIO	220	134	122	127	158	166	163	281	96	28	103	111
DESVIACION ESTANDAR	155,47	86,12	68,08	86,29	92,50	123,52	135,49	187,85	62,82	15,19	61,21	67,53
COEFICIENTE DE VARIACION	0,71	0,64	0,56	0,68	0,59	0,74	0,83	0,67	0,65	0,54	0,59	0,61
VACUNAL A	0	3	0	0	3	0	0	2	1	0	0	7
VACUNAL B	166	166	164	140	160	220	466	460	115	25	143	125
PROMEDIO	83	85	82	70	82	110	233	231	58	13	72	66
DESVIACION ESTANDAR	117	115	116	99	111	156	330	324	81	18	101	83
COEFICIENTE DE VARIACION	1,41	1,36	1,41	1,41	1,36	1,41	1,41	1,40	1,39	1,41	1,41	1,26
NEGATIVO 1	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	1
NEGATIVO 2	0	2	0	0	19	0	0	5	11	1	16	18
NEGATIVO 3	0	1	0	0	19	0	0	3	8	0	9	9
NEGATIVO 4	0	0	0	1	24	0	0	4	14	1	16	17
NEGATIVO 5	0	0	0	0	6	0	0	0	2	0	4	1
PROMEDIO	0	1	0	0	17	0	0	2	7	0	9	9
DESVIACION ESTANDAR	0	1	0	0	7	0	0	2	6	1	7	8
COEFICIENTE DE VARIACION	0	1,49	0	2,24	0,39	0	0	0,96	0,85	1,37	0,79	0,90

7.2.2 Análisis estadístico

El estudio estadístico realizado fue el análisis Kappa, el cual es una medida que se basa en comparar la concordancia que existe entre un conjunto de datos. Esta se interpreta al estimar el grado de concordancia con los valores: <0 =No acuerdo, 0.0-0.2=Insignificante, 0.2-0.4=Bajo, 0.4-0.6=Moderado, 0.6-0.8=Bueno y 0.8-1.0=Muy bueno (López *et al.*, 2010). Los usuarios (U) que participaron en las lecturas de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación mostraron diferentes grados de experiencia. Estos son: bajo para el U4, medio para los U2 y U3, y alta para el U1. El grado de acuerdo entre los usuarios U2-U3 fue moderado y entre los usuarios U1-U2, U1-U3, U1-U4, U2-U4, U4-U3 fue bueno. En las repeticiones intraprueba e interprueba se observó un grado de acuerdo bueno entre los usuarios. Esto indica la repetibilidad y reproducibilidad de la prueba de IHA empleada. Al obtener el promedio de K para cada cepa se observó que PAC3/Jal/1992, PPMV/Mich/1980, LPMV/Mich/147/2013 y LPMV/Qro/93/2013 presentaron un grado de acuerdo bueno. La cepa LPMV/Mich/147/2013 mostró el promedio más alto, sin embargo, mostró diferente grado de concordancia entre los lectores, por lo que esta cepa no se considera como cepa de elección para el diagnóstico serológico por medio de la prueba de IHA, ya que puede implicar dificultad en su interpretación. Por el contrario, la cepa PAC3 mostró un grado de concordancia moderado entre los lectores U2-U3, un grado bueno entre los lectores U1-U2, U1-U3, U1-U4 y U2-U4 y un grado muy bueno para los lectores U3-U4, con valores de kappa constantes. Esto indica que realizar la prueba de IHA con esta cepa viral es confiable y de fácil interpretación. Por el contrario, el grado de concordancia de la cepa PAC4 fue moderado y de la cepa PAC 5 fue bajo. Estos grados de acuerdo sugieren que el empleo de esta cepa viral en la prueba de IHA ocasiona que los usuarios Kappa tengan interpretaciones no homogéneas, por lo que no se recomienda su uso (cuadro 3).

Cuadro 3. Índice Kappa (k) en cepas de RvPo. Se muestran valores de Kappa entre los usuarios (U) y las cepas empleadas en la prueba de IHA.

USUARIOS KAPPA							
	U1-U2	U1-U3	U1-U4	U2-U3	U2-U4	U4-U3	
k entre usuarios	0,668	0,613	0,731	0,485	0,644	0,664	Promedio de cepas
Cepa							
PAC1/Mich/1990	0,637	0,553	0,709	0,411	0,571	0,731	0,602
PAC2/Jal/1990	0,696	0,609	0,781	0,541	0,679	0,644	0,658
PAC3/Jal/1992	0,674	0,725	0,777	0,490	0,603	0,802	0,679
PAC4/Mich/1993	0,507	0,712	0,651	0,318	0,518	0,637	0,557
PAC5/EDOMEX/1995	0,230	0,288	0,351	0,133	0,342	0,421	0,294
PAC6/Jal/2001	0,655	0,676	0,817	0,488	0,618	0,620	0,646
PPMV/Mich/1980	0,671	0,693	0,779	0,515	0,689	0,729	0,679
LPMV/Mich/147/2013	0,725	0,704	0,783	0,546	0,756	0,648	0,694
LPMV/Mich/1984	0,815	0,516	0,847	0,527	0,746	0,543	0,666
LPMV/Mich/1/2013	0,718	0,542	0,748	0,581	0,763	0,670	0,670
LPMV/Mich/1/2000	0,769	0,549	0,706	0,534	0,654	0,672	0,647
LPMV/Qro/93/2013	0,784	0,631	0,700	0,583	0,652	0,723	0,679

7.2.3 Determinación del Índice de antigenicidad

Todas las cepas virales son homólogas antigénicamente al SH propio. Los resultados indican que los SH y las cepas virales empleadas en este estudio guardan relación antigénica (RA) debido a que ningún valor fue menor a 0.5 ni mayor a 1.5. Se observaron cepas con valores de RA cercanos a la homología como; la cepa PAC1 con un valor de RA de 0.98 respecto al SH de PAC4, de 0.97 con el SH de la cepa LPMV84 y Mich 147. La cepa PPMV mostró valores de RA de 0.96 respecto al SH de la cepa PAC6. Se destacó que el índice de antigenicidad de la cepa PAC3 mostró valores de relación antigénica entre 0.76 en relación al SH Gto-005 y de 1.15 con el SH de la cepa PAC6, esto indica que existe relación antigénica (RA) con el resto de los SH empleados correspondientes a las otras cepas analizadas, lo cual sustenta la elección de esta cepa como referente en el diagnóstico serológico por IHA. Además, esta cepa es antigénicamente homóloga al SH de PAC4. Los resultados del índice de antigenicidad se muestran en Cuadro 4.

Cuadro 4. Índice de antigenicidad de RvPo. Los valores de 1 indican homología, los valores de .5-.9 y de 1.1-1.5 indican relación antigénica y los valores menores a.5 y mayores a 1.5 indican que no hay relación antigénica.

SH	CEPA									
	PAC1 /Mich /1990	PAC3 /Jal /1992	PAC4 /Mich /1993	PAC5 /EDOMEX /1995	PAC6 /Jal /2001	PPMV /Mich /1980	LPMV /Mich /147/2013	LPMV /Mich /1984	LPMV /Mich/1 /2013	LPMV /Qro /93/2013
PAC1/Mich /1990	1,00	0,94	0,98	0,87	0,94	1,05	0,87	0,97	0,74	0,71
PAC3 /Jal /1992	0,94	1,00	1,00	0,81	1,15	0,93	1,14	0,87	0,76	0,93
PAC4/Mich /1993	0,98	1,00	1,00	1,11	1,14	0,92	1,08	1,08	0,73	1,02
PAC5/EDOMEX /1995	0,87	0,81	1,11	1,00	0,84	0,96	0,94	0,88	0,74	0,72
PAC6 /Jal /2001	0,94	1,15	1,14	0,84	1,00	1,07	1,22	1,04	0,62	1,09
PPMV/Mich /1980	1,05	0,93	0,92	0,96	1,07	1,00	0,92	1,19	0,79	0,91
LPMV /Mich /147/2013	0,87	1,14	1,08	0,94	1,22	0,92	1,00	1,13	0,97	1,16
LPMV /Mich /1984	0,97	0,87	1,08	0,88	1,04	1,19	1,13	1,00	0,73	0,94
LPMV/Mich/1 /2013	0,74	0,76	0,73	0,74	0,62	0,79	0,97	0,73	1,00	0,77
LPMV /Qro /93/2013	0,71	0,93	1,02	0,72	1,09	0,91	1,16	0,94	0,77	1,00

7.3 Amplificación del gen HN de RvPo

Se obtuvo la amplificación del gen HN completo, a partir de los lotes virales empleados, mediante RT-PCRpf. En la Figura 5 se muestra la amplificación correspondientes a los cuatro fragmentos del gen HN.

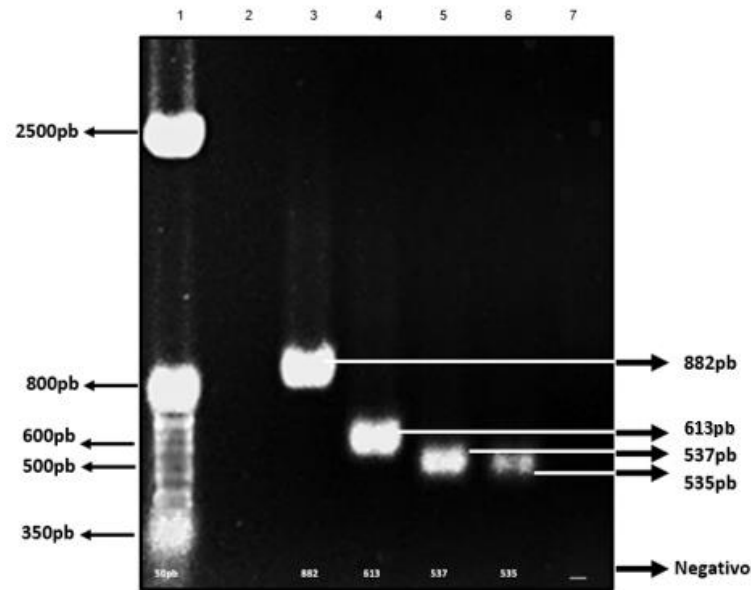


Figura 5. Corrimiento electroforético en gel de agarosa del producto de reacción de la prueba de RT-PCR en punto final del gen HN del RvPo.

7.4 Caracterización genética y análisis filogenético

En el análisis filogenético se identificó que las cepas, PAC3/Jal/1992, PAC4/Mich/1993 y LPMV/Mich/1/2000 son homólogas genéticamente a la cepa PAC4 (EF413174.1) aislada en Michoacán en 1993 (clados en color amarillo). Otro grupo es conformado por las cepas LPMV/Mich/1984 y LPMV/Qro/93/2013, donde se identificó que estas cepas son homólogas genéticamente a la cepa LPMV (S77541.1), aislada en Michoacán en 1992 (clados en color morado). Las cepas PAC1/Mich/1990, PAC2/Jal/1990, PPMV/Mich/1980, LPMV/Mich/147/2013, PAC5/EDOMEX/1985, PAC6/Jal/2001 y LPMV/Mich/1/2013 son semejantes a las cepas PAC1 (KP22977.2.1) aislada en México en 1990, PAC2 (EF413172.1) aislada en Michoacán en 1992, PAC3 (EF413173.1) aislada en Michoacán en 1992 y PAC6 (EF413175) aislada en Jalisco en 2001 (clados en color verde). En la Figura 6 se muestra el árbol filogenético de las 12 cepas de RvPo empleadas en este estudio y cepas que se encuentran reportadas en el Gen Bank.

8. DISCUSION

En 1992, Fuentes y en 2012, Escobar determinaron la circulación de diferentes cepas de *Rubulavirus porcino* en México, las cuales presentan características antigénicas que difieren. Con los resultados obtenidos se determina que las cepas de RvPo que circulan y han circulado en México presentan una homología genética del 99.98% al 99.99 %, valores de relación antigénica entre 0.62-1.22 y algunas cepas son antigénicamente homólogas.

Reyes en 2002, y Sánchez en 2012, propusieron que las similitudes entre la respuesta de anticuerpos encontradas para cada una de las cepas virales sugieren un alto reconocimiento de las cepas virales hacia los sueros hiperinmunes. Al contrario, la falta de este reconocimiento es el resultado de los cambios de aminoácidos en las regiones antigénicas. En los resultados obtenidos se indica que los sueros hiperinmunes correspondientes a las cepas evaluadas, presentan relación antigénica y homología con las diferentes cepas virales empleadas.

En 2012, Sánchez, demostró que existe antigenicidad cruzada entre las cepas PAC4/1993 y LPMV/1984. Esto datos son semejantes a los obtenidos en este estudio, donde las cepas PAC1 /Mich/1990, PAC3/Jal/1992, PAC4/Mich/1993, PAC6/Jal/2001, PPMV/Mich/1980, LPMV/Mich/1984 y LPMV/Mich/147/2013, pertenecientes a los distintos genogrupos presentan altos valores de relación antigénica. Este autor también estableció que las cepas PAC3 y PAC4 presentan un valor de relación antigénica de 0.7. En el presente estudio se identificó que las cepas PAC3/Jal/1992 y PAC4/Mich/1993 son antigénicamente homólogas.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, se identificó que las cepas empleadas muestran relación antigénica (RA) con los SH a los que se confrontaron. Las cepas con relación antigénica más cercanas a la homología son las cepas: PAC1/Mich/1990 con un valor de relación antigénica de 0.98 respecto al SH de la cepa PAC4 /Mich/1993, la cepa PPMV/Mich/1980 mostro valores de RA de 0.96 respecto al SH de la cepa PAC6/Jal/2001, la RA entre la cepa LPMV/Mich/1984 con el SH

correspondiente a la cepa PAC1/Mich/1990 fue de 0.97, mismo que fue observado entre la cepa LPMV/Mich/1/2013 y el SH de LPMV/Mich/147/2013.

Por lo tanto, en este estudio se propone a la cepa PAC3 /Jal /1992 como una cepa de referencia para el diagnóstico de RvPo por medio de la IHA debido a su alta capacidad para reconocer anticuerpos dirigidos a cepas de reciente circulación y cepas vacunales de RvPo, estos datos son semejantes a los obtenidos por Hidalgo, en 2017.

Reyes en 2002 y Santos en 2017, reportan que la secuencia de la cepa PAC1 es homóloga genéticamente a las secuencias LPMV1984, Mx/2/Michoacán/2009, Mx/1/Jalisco/2007 y PAC4 1993. A diferencia, en este estudio se identificó que la cepa PAC1/Mich/1990 es heteróloga genéticamente de la cepa LPMV/Mich/1984 y homóloga a las cepas PAC2/Jal/1990, LPMV/Mich/147/2013, PAC5/EDOMEX/1995, PPMV/Mich/1980, PAC6/Jal/2001 y LPMV/Mich/1 /2013. Con esto se encontró que la mayoría de las cepas empleadas presentan homología genética a pesar de ser aisladas en diferentes estados de México y en diferentes años.

En 1997, Ramírez, Reyes en 2002 y Sánchez en 2008 determinaron que las cepas PAC2 1990 y PAC3 1992 son homólogas genéticamente. Así mismo, en el presente estudio se identificó que las cepas PAC2 (EF413172.1), PAC3 (EF413173.1) y LPMV Mich/1/2013 son antigénicamente homólogas, sin embargo; en este estudio se identificó que las cepas PAC2/Jal/1990 y PAC3/Jal/1992 son heterólogas genéticamente a las cepas previamente reportadas. También, se identificó que las cepas PAC4/Mich/1993 y LPMV/Mich/1984 son heterólogas genéticamente.

En 2008 Sánchez, menciona que las cepas PAC6 2001, PAC7 2002, y PAC9 2003 son homólogas genéticamente. Durante el estudio se identificó que la cepa PAC6/Jal/2001, la cual fue aislada en Jalisco en 2001, es homóloga genéticamente a las cepas reportadas en GenBank PAC6 (EF413175.1), PAC8 (EF413177.1) y PAC9 (EF413178.1).

En 2017, García informó que el análisis filogenético del gen HN mostró que las cepas caracterizadas entre los años 2008-2015 son homólogas genéticamente. De igual forma, en 2015, Cuevas R. mencionó que los aislamientos de 2015 son homólogos a

cepas del período 2008-2013 y muestran una sustitución en común del aminoácido Treonina en el codón 382 por el aminoácido Alanina (T382A). En el análisis filogenético de este estudio se observó que hay cepas presentes entre el periodo 2008-2013 que son heterólogas genéticamente, las cuales son: LPMV/Qro/93/2013, LPMV/Mich/147/2013, y LPMV/Mich/1/2013. A diferencia de, Herrera J, en 2017 identificó que el aislamiento de la cepa LPMV-84 presenta una sustitución en el aminoácido Arginina en el codón 27Q, Mich-147/2013 muestra una sustitución en el aminoácido S103A y la cepa Qro-93/2013 muestra una sustitución en el aminoácido F156L (esta sustitución también fue presentada en las otras dos cepas) en relación con la cepa original de LPMV, por lo que estos aislamientos tienen relación genética.

En 2012, Escobar empleó aislamientos de las cepas PAC4, PAC6 y PAC9 para realizar el diagnóstico serológico por medio de la prueba de IHA, en donde observó seroprevalencias distintas para cada cepa. En 2015, Salgado obtuvo diferencias en el número de sueros positivos en la prueba de IHA debido a que empleó diferentes aislamientos virales para el diagnóstico serológico, en el primer aislamiento tuvo 56 muestras positivas, en el segundo 41, en el tercero 39 y en el último 12. Estos autores han dirigido el diagnóstico serológico con la prueba de IHA empleando distintas cepas de RvPo y distintos tratamientos en los sueros empleados, lo cual dificulta que la prueba de IHA no sea estándar en los laboratorios de diagnóstico, por lo que hay diferencias en los resultados. Por esta razón, es necesario conocer las diferentes cepas que actualmente circulan en el país.

En este estudio se registró que la cepa PAC3 /Jal /1992 es útil para reconocer anticuerpos dirigidos a cepas vacunales y a cepas de reciente circulación, lo cual evidencia que esta cepa es apta para realizar el diagnóstico serológico. Estos datos son semejantes a los obtenidos por Hidalgo en 2017, en donde se describió un protocolo que brinda especificaciones para elaborar pruebas serológicas como la IHA empleada en este estudio.

Algunos autores reportan haber usado la cepa PAC3/Jal/1992 en sus investigaciones, lo que sugiere que esta cepa es considerada como un virus de referencia. Por ejemplo, Solís en 2007, empleó la cepa PAC3 para infección en cerdos porque causa problemas

respiratorios y reproductivos en diferentes etapas de producción, la infección se realizó con 1×10^{-6} TCDI₅₀/ml, la cual fue identificada en cultivo celular en el primero y segundo pase por ECP, HA, IFA, los títulos observados por HA fueron de 1:32, 1:64 y 1:132. En este estudio la cepa PAC3 /Jal /1992 fue replicada y mostró títulos por hemaglutinación de 1:64 UHA.

Rivera en 2013, empleó la cepa PAC3 porque causa fallas reproductivas, daño testicular y del epidídimo en cerdos, y en otro estudio por el mismo autor, esta cepa también fue empleada, para evaluar la persistencia del RvPo en infecciones experimentales en cerdos y porque causa enfermedad respiratoria en cerdos en crecimiento.

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, se identificó que 12 cepas de RvPo que circulan en México presentan características antigénicas y genéticas que difieren. A esto se le atribuye, en algunos casos, que la respuesta de anticuerpos de los cerdos infectados o inmunizados con diferentes cepas de este virus no reconozca a las cepas de reciente circulación y por lo tanto, surjan signos clínicos asociados a la infección por RvPo. Sin embargo, con los resultados presentados, se proponen cepas de RvPo, como PAC3 /Jal /1992, la cual tiene el potencial para ser considerada como cepa de referencia, debido a que se identificó que los sueros hiperinmunes de las diferentes cepas empleadas, reconocieron de forma específica a la cepa mencionada. Con estos resultados se pretende aportar información que sea útil en el desarrollo de vacunas y de pruebas de diagnóstico serológico, que nos permitan llevar a cabo la prevención, control y erradicación del RvPo en sistemas de producción porcina en México.

10. ANEXO

MEDIOS Y SOLUCIONES

Solución de Alsever

- Glucosa $C_6H_{12}O_6$ 20.5g
- Citrato de sodio $Na_3C_6H_5O_7$ 8g.
- Cloruro de sodio Na Cl 4.2g.
- Ácido cítrico $HH_2 PO_4$ 0.55g.

Cbp 1 litro de agua destilada

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

- Hidrógeno fosfato de sodio $Na_2 HPO_4$ 1.44g
- $HH_2 PO_4$ 0.24g
- Cloruro de sodio Na Cl 8.00g
- Cloruro de potasio KCL 0.20g

Cbp 1 litro de agua destilada.

Caolín

- 4.2mg de caolín

Cbp 10ml de PBS.

Medio mínimo esencial (MEM)

- MEM 15.6g

Cbp 1 litro de agua destilada

TRIPSINA

- Na Cl 8g.
- K CL 0.4g.
- Na HCo3 0.58g.
- EDTA 0.2g.
- Tripsina 0.5g.

Cbp 1 litro de agua destilada

TAE

- Trisma base 240g
- EDTA 37.2g
- Ácido acético 60ml

Cbp 1 litro de agua destilada

11. BIBLIOGRAFÍA

- Archetti I. y Horsfall F.L.1950. Persistent Antigenic Variation Of Influenza A Viruses After Incomplete Neutralization In Ovo With Heterologous Immune Serum. *Journal of experimental medicine*, 92(5): 441-462
- Berg, M.; Sundqvist A.; Jorge, M.L.; y Linn, T.1991. Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: comparative sequence analysis with other paramyxoviruses. *Journal of General Virology*, 72, 1045-1050
- Berg, M.; Bergvall, A.; Svenda, M.; Sundqvist, A.; Moreno, L.; Linne, T. 1997. Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of paramyxoviruses F proteins. *Virus Genes*. 14: 55-61.
- Borraz, A.M.T.; Santos, L.G.; Vallejo, R.V.; Herrera, C.I.; y Reyes L.J.2008. Caracterización biológica de tres aislamientos naturales del *Rubulavirus porcino* (México). *Rev. Biol. Trop.* (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 56 (2): 487-499
- Cuevas, R. S.; Blomström, L. A.; Alvarado, A.; Hernandez, J. P.; Rivera, B. F.; Ramírez, M. H.; y Berg, M. 2013. Development of a real-time RT-PCR method for detection of porcine rubulavirus (PoRV-LPMV). *Journal of Virological Methods* 189: 1-6
- Cuevas, R. S.; Hernández, B. E.; Kennedy, S.; Hernández, J. P.; y Moreno, L. J. 2014. Long-term RNA persistence of Porcine rubulavirus (PorPV-LPMV) after an outbreak of a natural infection: The detection of viral mRNA in sentinel pigs suggests viral transmission. *Virus Research* 188: 155-161
- Cuevas, S. J.; Rodriguez, R. A.; Kennedy, S.; Moreno, L. J.; Berg, M.; y Hernández, J. P. 2009. Investigation of T-cell responses and viral mRNA persistence in lymph nodes of pigs infected with porcine rubulavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127: 148-152
- Dominiek, M.; Van, S. A.; Appeltant, R.; Arsenakis, I.; y Nauwynck, H. 2016. Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology* 85: 27-38
- Escobar, L.C, Rivera, B.J.F.; Castillo, J.H.; H. Ramírez, M. H.; Trujillo, O.M.H.; y Sánchez B J. I.2012. Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in Sera of Field Swine and their Seroprevalence. UNAM. Mexico. *Transboundary and Emerging Diseases* 59 416–420

- Fuentes, M.R.; Gay M.J.G.; Herradora, M.A.L.; y Rentana, A.R. 1994. Evaluación de una vacuna experimental contra ojo azul en cerdos mediante las pruebas de inmunogenicidad inocuidad, potencia y medición de la inmunidad pasiva en lechones. *Vet. Méx.* 25, 243-246.
- Fuentes, M.R.; Carreón R.N.; Ramírez, M. H.; Trujillo, E.T.; y Fraire I. B. 1992. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del ojo azul en cerdos de la República Mexicana. *Vet. Mex.* 23: 37.
- Garcia, B.A.A.; Del Valle, A.; Montan, J.A.; Hirose, O.; Barro, B.L.; Juana, S.T.; y Torres, F.J. 2017. Full-genome sequencing and phylogenetic analysis of four neurovirulent Mexican isolates of porcine rubulavirus. *Arch. Virol.* (2017) 162:1765–1768 DOI 10.1007/s00705-017-3267-7
- Hernández, J.; Reyes, L.; Ramírez, H.; Valenzuela, O.; y Zenteno, E. 2004. Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el *rubulavirus porcino*. *Veterinaria México* 35: 65-74
- Hernandez, J.; Sundqvist, A.; Fuentes, M.; Diaz, A.; Reyes, L.; Hernandez, E.; y Moreno, L. 1992. Correlación entre las pruebas de virus, neutralización, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA en sueros vacunales y de brote para anticuerpos contra el paramixovirus del Síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Vet. Mex.* 23: 217-222.
- Hernández, J.; Ramírez, M. H.; Mercado, G. C.; Moreno, L. J.; y Kennedy S. 2004. Experimental Porcine Rubulavirus (La Piedad-Michoacán virus) Infection in Pregnant Gilts. *Journal of Comparative Pathology* 130:1-6
- Hernández, J.; Yacoub, A.; Kennedy, S.; Curran, B.; Téllez, C.; Svenda, M.; Ljung, L.; y Moreno, L. J. 2001. Uptake of Porcine Rubulavirus (LPMV) by PK-15 Cells. *Archives of Medical Research* 32: 400-409
- Hernández, J.; Garfias, Y.; Nieto, A.; Mercado, C.; Montañón, L. F.; y Zenteno, E. 2001. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79:249:259

- Hernández, J.; Reyes L. J.; Zenteno, R.; Ramírez, H.; Hernández, J. P.; y Zenteno, E. 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64: 367-381
- Herrera, J.; Gómez, N. L.; Lara, R. R.; Diosdado, F.; Martínez, L.A.; Jassob, M.; Ramírez, M. H.; Torres, P. A.; y Rivera, B.J.F. 2017. Acute neurologic disease in porcine rubulavirus experimentally infected piglets. *Virus Research* 230: 50-58
- Hidalgo, L. D. R. 2017. Evaluación de pruebas serológicas para el diagnóstico de *Rubulavirus* porcino. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Historia de la taxonomía de ICTV: *Ortorubulavirus porcino*. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201901636.
- Kirkland P. D.; Stephano A.; y Weingarti, M. H. 2006. Paramyxovirus 572-586. *Diseases of swine*. 9ª Ed. Blackwell. Iowa, USA
- Kolakofsky, D.; Pelet T.; Garcin D.; Hausmann S.; Curran J.; Roux L. 1998. Paramyxovirus RNA synthesis and requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J. Virol.* 72: 891-899.
- López, U.G; y Fernández, P. 2010. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España)6: 169-171.
- Mendoza, L. M.; Godoy, M. D. V.; Guerrero, C. H.; Rodríguez, P. A.; Dueñas, J. J. M.; Dueñas, J. S. H.; y Ramírez, H. M. A. 2007. Blue eye disease porcine rubulavirus (PoRv) infects pig neurons and glial cells using sialo-glycoprotein as receptor. *The Veterinary Journal* 173: 428-436
- Moreno, L. J.; Correa, G. P.; Martínez, A.; y Ericsson, A. 1986. Characterization of a Paramyxovirus Isolated from the Brain of a Piglet in Mexico. *Archives of Virology* 91:221-231
- Morrison, T.G.; Portner A. 1991. Structure, function and intracellular processing of glycoproteins of *Paramyxoviridae*, *The Paramyxoviruses*. Plenum Press, E.U.A. 347-382. En: D.W. Kingsbury
- Ramírez, M. H.; Hernández, J. P.; Reyes, L.; Zenteno, E.; Moreno, L.J.; Kennedy, S. 1997. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *Journal of Comparative Pathology* 117:237-252

- Reyes L.; Hernandez J.; Montaña L.F.; Zenteno E. 1993. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl (a2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* 133: 195-200.
- Reyes L.J.; Espinosa B.; Santos G.; Zenteno R.; Hernandez J.; Vallejo V.; Zenteno E. 1999. Purification and characterization of the Hemagglutinin-neuraminidase of Porcine Rubulavirus LPMV. *Glycoconj. J.* 16: 517-522.
- Reyes L.J.; Santos, J. G.; Hernández, Espinosa, B.; Borraz, M.T.; Ramírez, H.; Vallejo, V.; y Zenteno, E. 2002. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudios con el *Rubulavirus porcino*. Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México.
- Reyes, L. J.; Espinosa, B.; Hernández, J.; Zenteno, R.; Vallejo, V.; Hernández, P. y Zenteno, R.; 1997. NeuAc α 2, 3Gal-Glycoconjugate Expression Determines Cell Susceptibility to the Porcine Rubulavirus LPMV. *General Papers* 118: 327-332
- Reyes, L. J.; García, M. O.; Santos, L. G.; Vallejo, V.; Ramírez, M. H.; y Hernández, J. 2004. Detección de Viremia en la infección experimental por *Rubulavirus porcino*. *Archivos Medicina Veterinaria*
- Rima, B. k.; Anne Balkema-Buschmann, William G. Dundon, Paul Duprex, Andrew Easton, Ron Fouchier, Gael Kurath, Robert Lamb, Benhur Lee, Paul Rota, Linfa Wang, and ICTV Report Consortium, 2019, ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae, *Journal of General Virology*, 100:1593–1594
- Rivera B.J.F.; De la Luz A.J.; Saavedra M.M.; Jasso E.M.A.; Ramirez M.H.; Martinez L.A.; Sanchez B.J.I.; Perez T. A.; Reyes L.J, Hernandez J. 2016. Co-infection of classic swine H1N1 influenza virus in pigs persistently infected with porcine rubulavirus. *Veterinary Microbiology* 184:31–39
- Rivera, B. J. F.; Cuevas, R. S.; Pérez, T. A.; Reyes, L. J.; Hernández, J.; y Ramírez, M. H. 2013. Respiratory disease in growing pigs after porcine rubulavirus experimental infection. *Virus Research* 176:137-143
- Rivera, B. J. F.; García, C. A. C.; Reyes, L. J.; Hernández, J.; Sánchez, B. J. I.; Ramírez, M. H.; 2013. Efficacy of quantitative RT-PCR for detection of the

nucleoprotein gene from different porcine rubulavirus strains. *Archives of Virology* 158: 1849-1856

- Rivera, B. J. F; Martínez, B. R.; Pérez, T. A.; García, C. A. C.; Reyes, L. J.; Hernández, J.; y Ramírez, M. H. 2013. Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Veterinary Microbiology* 162: 491-498
- Rodríguez, R.; Hernández, J. P.; Sánchez, T. L.; Favila, C. L.; Estrada, P. S.; Moreno, L. J.; y 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: 1-8
- Salgado García, Elena. (2015). "Determinación de la presencia de anticuerpos contra el rubulavirus porcino en muestras serológicas de Jalisco mediante el uso de diferentes aislados virales". (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/366307>
- Sánchez, B. J. I.; Trujillo, M. E.; Mendoza, S. E.; Reyes, L. J.; Alonso, R. A. 2012. Genetic and antigenic changes in porcine rubulavirus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76: 33-37
- Sánchez, B. J. I.; Santos, L. G.; Alonso, R.; Doporto, J. M.; Ramírez, M. H.; Mendoza, J. S.; Reyes, L. J.; y 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: 359-367
- Sanderson, C.M., H.H. Wu, D.P. Nayak. 1993. Sendai virus M protein binds independently to either the F or the HN glycoprotein in vivo. *Journal of Virology*. 68: 69-76
- Santos L. G.; Borraz, A. M. T.; Márquez, D. L; Flores, A. J.C.; Ramírez, M. H.; Priem, B.; Fort, S.; Vallejo, R. V.; Reyes, L. J.; y Herrera, C. I. 2017. Neuraminidase activity of blue eye disease porcine rubulavirus: Specificity, affinity and inhibition studies. *Research in Veterinary Science* 114: 218-224
- Solis, M.; Ramírez, M. H.; Mercado, S. C.; Espinosa, S.; Vallejo, V.; Reyes, L. J.; y 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: 403-409

- Stephano, H. A.; Gay, G. 1984. Experimental studies of a new viral syndrome in pigs called “blue eye” characterized by encephalitis and corneal opacity. *Proceedings of the international Pig Veterinary society congress*
- Stephano, H.A. 1999. Blue eye disease. *Diseases of swine*. 8th ed. Ames, Iowa. Iowa State University Press. Pp 103-112.
- Stephano, H.A.; Gay, G. M.; y Ramírez, T. 1988. Encephalomyelitis reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 2:6-10
- Sundqvist, A.; Berg M.; Hernandez J.; Linne T.; Moreno L. 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.
- Svenda, M.; Berg, M.; Moreno, L. J.; Linné, T. 1997. Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Research* 48: 57-70
- Svenda, M.; Hjertner, B.; Linné, T.; y Berg, M. 2002. Both the P and V proteins of the porcine rubulavirus LPMV interact with the NP protein via their respective C-terminal unique parts. *Virus Research* 83: 31-41
- Zenteno C.; Hernández J.; Espinosa B.; y Reyes J. 1998. Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Archives of Virology* 143: 333–352
- Zenteno R. 1997. Purificación y predicción de determinantes antigénicos y de estructura secundaria en la hemagglutinina-neuraminidasa del paramixovirus porcino de La Piedad Michoacán. México (Distrito Federal) México: Universidad Nacional Autónoma de México.