

Detección de viremia en la infección experimental por *Rubulavirus porcino*

Detection of viremia in the *Porcine rubulavirus* experimental infection

J. REYES-LEYVA,^{1*} M.V.Z., M. en C. Bioméd., Dr. en C. Bioméd.; O. GARCÍA-MORALES,¹ Q.F.B.;
G. SANTOS-LÓPEZ,¹ Q.F.B., M. en C. Microbiol.; V. VALLEJO,¹ Biol., M. en C. Bioméd., Ph.D.;
H. RAMÍREZ-MENDOZA,² M.V.Z., M. en Prod. Animal, Dr. en C. Vet.;
J. HERNÁNDEZ,³ M.V.Z., M. en C. Fisiol., Dr. en C. Vet.

¹Lab. de Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, HGZ N° 5, Km 4.5 Carretera Atlixco-Metepec, CP 74360, Metepec, Puebla, México. Tel./Fax: 52+ 24 44 44 01 22

Correo E.: jreyesleyva@correo.unam.mx.

²Dept. de Producción Animal Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

³Dept. de Nutrición y Salud Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México.

SUMMARY

The *Porcine rubulavirus* (PoRV) is the causal agent of Blue Eye Disease, an endemic disease in Mexico known since 1980, which is characterised by a progressive fatal meningo-encephalitis in piglets and reproductive failure in adults pigs, accompanied with respiratory symptoms and corneal opacity. PoRV mainly replicates in the respiratory and central nervous system, however, it is also detected in other organs such as testis, epididymis, prostate, ovaries, spleen, liver, thymus and lymphatic nodes. These findings suggest the existence of a viremic phase that leads to a systemic virus spread. In this paper we study the viremia in experimentally PoRV-infected post-pubertal pigs. Virus antigen was detected on the surface of erythrocytes from 4 to 12 days post-infection (p.i.) and was identified inside of leukocytes from 12 days until the end of experiment (20 days p.i.); which suggest that these cells are used as virus spread elements. The PoRV-specific antibodies were detected since the first week p.i., but the highest titers were reached at 16 days pi, which coincided with the disappearance of free virus in the blood. No abnormalities were presented in hematological parameters of infected pigs.

Palabras claves: *Rubulavirus porcino*, infección experimental, viremia, virus LPM, síndrome de ojo azul.

Key words: *Porcine rubulavirus*, experimental infection, LPMV, viremia, blue eye disease.

INTRODUCCIÓN

El *Rubulavirus porcino* (RVP) es un virus emergente detectado en 1980 en granjas de La Piedad Michoacán (LPM), México. Este virus es el agente etiológico de la enfermedad del ojo azul, infección caracterizada por alteraciones neurológicas, respiratorias y reproductivas acompañadas de opacidad de la córnea en cerdos de diferentes edades (Stephano y col., 1988;

Moreno-López y col., 1986). La infección por RVP se difundió rápidamente abarcando en pocos años 16 estados de la República Mexicana, la mayoría de ellos localizados en la zona central del país. Hasta el momento México es el único país en que se ha reconocido la enfermedad del ojo azul (Stephano, 1993). Debido a su similitud estructural, funcional y genética con los virus de la parotiditis humana (VPH), parainfluenza humana 2 y 4 y parainfluenza símico 5 (Moreno-López y col., 1986), este virus fue clasificado como la especie porcina del género *Rubulavirus*, subfamilia *Paramyxovirinae*, familia

Aceptado: 30.03.2004.

Proyecto financiado por CONACYT México (3228PB9607).

Paramyxoviridae, orden *Mononegavirales* (Rima y col., 1995).

El genoma del virus está formado por una sola molécula de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa, la cual se divide en seis genes organizados en la siguiente manera: 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (Linné y col., 1992). La nucleocápside es de forma helicoidal y se constituye por la unión íntima de la nucleoproteína (NP) con el ARN, al cual también se asocian las proteínas L y P que forman un complejo con actividad de polimerasa de ARN. La nucleocápside se encuentra rodeada por una membrana lipoproteica de origen celular que presenta hacia el interior del virión la proteína de matriz (M) y hacia el exterior las glicoproteínas de fusión (F) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN). La glicoproteína F es responsable de la fusión de las membranas celular y viral, la lisis de eritrocitos y la formación de sincicios en cultivos celulares; mientras que la glicoproteína HN reconoce al receptor celular y posee la capacidad de hidrolizar ácidos siálicos celulares (actividad neuraminidasa) (Lamb y Kolakofsky, 1996). La función de la glicoproteína HN es crucial porque constituye el primer paso en la introducción del virus a la célula. En el RVP este proceso involucra el reconocimiento de moléculas de ácido siálico unido por enlace glicosídico $\alpha 2.3$ a galactosa, las cuales se localizan en las porciones terminales de glicolípidos y glicoproteínas de membranas celulares (Reyes-Leyva y col., 1993; 1997; 1999). La expresión de estas moléculas en el sistema nervioso central es abundante en animales recién nacidos y sufre modificaciones durante el proceso de maduración de los cerdos (Vallejo y col., 2000), lo que constituye un factor determinante de la susceptibilidad de este tejido a la infección por el RVP en cerdos lactantes y de resistencia en cerdos adultos (Reyes-Leyva y col., 2002). Además, la proteína HN es el antígeno inmunodominante en infecciones experimentales en cerdos adultos (Hernández y col., 1998).

Las características de la infección con el RVP varían de acuerdo con la edad de los cerdos, en animales neonatos y lactantes menores de 3

semanas de edad la infección afecta principalmente al sistema nervioso central, la cual resulta fatal en el 90% de los casos. Los animales de mayor edad son más resistentes a la infección, la cual se localiza principalmente en el aparato respiratorio y sólo provoca retraso en el crecimiento. En los cerdos machos adultos la infección afecta básicamente al epidídimo, testículos y próstata produciendo infertilidad. Cuando las hembras se infectan durante la gestación se observa aumento de abortos, fetos momificados y reducción del número de animales nacidos vivos (Stephano, 1993).

El RVP tiene afinidad por tejido nervioso de cerdos neonatos y lactantes, por células germinativas testiculares y de los conductos epididimarios en individuos pospúberes, por tejido glandular como las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, ovarios e hígado, y por órganos linfoides y hematopoyéticos (Stephano, 1993; Allan y col., 1996; Ramírez-Mendoza y col., 1997).

En cerdos infectados por vía intranasal se ha observado que el virus avanza progresivamente de la mucosa nasal al sistema nervioso central, a través del nervio olfatorio y trigémino, y hacia los pulmones por vía aérea (Allan y col., 1996; Ramírez-Herrera y col., 1997). Sin embargo, el aislamiento del virus en órganos tan alejados del sitio de entrada sugiere que las vías sanguínea y linfática también están implicadas en la diseminación viral en el organismo. Los miembros de la familia *Paramyxoviridae* se caracterizan por producir estados de viremia. En el caso del virus de la parotiditis humana se ha observado una viremia transitoria a partir de la primera semana posinfección (Wolinsky, 1996). En la infección producida por el virus del sarampión se ha demostrado que los macrófagos son la primera población sanguínea en infectarse y debido a la expresión de moléculas de adhesión, que promueven su extravasación, se favorece la diseminación del virus en los tejidos (McKendall y col., 1981).

El objetivo de este trabajo fue reconocer la fase virémica de la infección por Rubulavirus porcino e identificar el tipo de células involucradas en su diseminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus y antígeno viral. Se utilizó la cepa PAC3 (Jalisco/1992) del RVP, por su capacidad para producir infección en cerdos mayores de un mes de edad y por su diseminación sistémica (Ramírez-Mendoza y col., 1997). El virus fue replicado en cultivos de la línea celular PK-15 (riñón de cerdo), mantenidos en medio mínimo esencial (MEM) y suplementado con 5% de suero fetal bovino. Los sobrenadantes de las células infectadas se clarificaron por centrifugación a 3000xg durante 40 minutos.

Titulación Viral. La capacidad infectante del virus se determinó en dosis infectantes en cultivo celular al 50% (DICC₅₀), de acuerdo con el método de Kärber (revisado en Blake y O'Connell 1993).

Animales de experimentación. Se emplearon 8 cerdos de 3 meses de edad, híbridos York-Landrace, provenientes de una granja libre de la enfermedad del ojo azul. Los animales se evaluaron clínicamente y se comprobó la ausencia de anticuerpos contra el RVP mediante una prueba inmunoenzimática indirecta. Se separaron en dos grupos de 4; los miembros del primer grupo se inocularon con 10⁵ DICC₅₀ del RVP por vía intranasal, y a los otros 4 se les empleó como testigos no infectados; ambos grupos permanecieron en cuartos de aislamiento separados, se les proporcionó agua y alimento a libre demanda.

Muestras sanguíneas. Se tomaron muestras de sangre de la vena cava superior antes y durante la infección con intervalos de 4 días. Se empleó sangre con EDTA para realizar los frotis que fueron utilizados en la detección de antígeno viral y para realizar los estudios de biometría hemática. Sangre sin anticoagulante se utilizó para obtener el suero y determinar el título de anticuerpos mediante ensayos inmunoenzimáticos.

Inmunofluorescencia. Los frotis sanguíneos se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se fijaron con ácido acético al 5%

en metanol. Se agregó IgG de conejo específica contra el RVP (cepa PAC-3) en dilución 1:500 y se incubó 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda; se lavó con tampón de fosfatos (PBS) conteniendo 0.3% del detergente Tween-20. Como segundo anticuerpo se agregó una dilución 1:1000 de inmunoglobulinas de carnero, específicas contra IgG de conejo, conjugadas con isotiocianato de fluoresceína. Las muestras se incubaron en cámara húmeda 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con PBS-Tween-20 por 15 minutos. Se montó la preparación con glicerol-PBS 1:1 y se observó con microscopio de fluorescencia.

Ensayo inmunoenzimático. Para la identificación de anticuerpos antivirales se utilizó una prueba de ELISA indirecto. Se colocaron 50 µl de antígeno viral total (2 µg/pozo) diluido en amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.6 en cada pozo de una placa de 96 pozos con fondo plano y se dejó adsorber toda la noche a 4°C; después de desechar el exceso de antígeno, se bloqueó con leche descremada al 0.3% en PBS por 1 hora a 37°C. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente con diluciones seriadas de los sueros de cada cerdo y se lavó tres veces con PBS-Tween-20. Se añadió una dilución 1:5000 de anticuerpos de cabra conjugados a peroxidasa específicos contra IgG de cerdo, se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente con PBS-Tween-20. Como sustrato se utilizó H₂O₂/orto-fenildiamina y después de 10 minutos se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2.5 N. La absorbancia se determinó a 492 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Coligan y col., 1994).

Estudios hematológicos. La concentración de hemoglobina (HB) se determinó por el método de cianometahemoglobina leída a 540 nm. El hematocrito (HTO) fue determinado por el método de microhematocrito. La cuenta de eritrocitos se realizó en pipeta empleando el diluyente de Gower (Na₂SO₄ 12.5 g, CH₃COOH 33.3 ml y agua destilada 200 ml). La concentración media de hemoglobina corpuscular se calculó con la siguiente fórmula:

CMHC= HB/HTO. El volumen corpuscular medio se calculó de acuerdo con la fórmula $VCM = HTO \times 1000 / N^{\circ}$ de glóbulos rojos. La hemoglobina corpuscular media se calculó mediante la fórmula $HCM = HB / N^{\circ}$ de glóbulos rojos. El número de leucocitos totales se determinó en pipeta empleando la solución de Turk (CH_3COOH 2 ml, solución acuosa de violeta de genciana al 2% 1 ml, agua destilada 100 ml). La cuenta diferencial de leucocitos se realizó por el método de May-Grünwald-Giemsa (Nelson y Henry, 1995).

RESULTADOS

Signos clínicos. Todos los animales inoculados con el virus mostraron signos pasajeros de afección respiratoria, aumento de la secreción nasal, ojos llorosos, estornudos esporádicos, los cuales se presentaron entre las 24 y 48 horas p.i. Dos de los cerdos inoculados (cerdos 1 y 3) mostraron hipersensibilidad al

sonido y al tacto entre los días 9 y 15 p.i. y uno de ellos (cerdo 1) mostró también alta agresividad durante esos días. Ningún otro signo fue observado en los animales infectados durante el tiempo que duró el experimento. Los animales testigos no mostraron signos de enfermedad.

Detección de antígeno viral. En todos los cerdos infectados se identificó al antígeno viral a partir del día 4 p.i. La marca fluorescente se observó en la superficie externa de eritrocitos y fue de alta intensidad, tanto que parecía ser fluorescencia inespecífica, pero la comparación con los controles negativos mostró que se trataba de una reacción antígeno-anticuerpo específica. Algunas veces los eritrocitos positivos al antígeno se observaron como grupos o grumos celulares con morfología alterada (figura 1B). La marca inmunofluorescente asociada a eritrocitos mostró una disminución notable en el transcurso del experimento (cuadro 1), interpretándose como totalmente negativa el día 16 p.i. En dos

CUADRO 1. Detección de antígeno viral en células sanguíneas. La reacción de inmunofluorescencia se realizó sobre frotis sanguíneos utilizando anticuerpos policlonales contra el *Rubulavirus* porcino conjugados con isotiocinato de fluoresceína; los valores corresponden al porcentaje de células positivas observadas en diez campos visuales de 3 frotis de la misma muestra. (-) negativo. T* Los cuatro cerdos testigos fueron negativos a IF durante todo el experimento.

Viral antigen detection in blood cells. Immunofluorescence reactions were performed on blood slides using FITC-conjugated anti-porcine *rubulavirus* policlonal antibodies. Values correspond to the percentage of positive immunofluorescent cells in ten visual fields of three blood slides of the same sample. (-) negative. T* The four non-infected control pigs were negative all the experiment.

		Porcentaje de inmunofluorescencia Días post-inoculación					
Cerdo		0	4	8	12	16	20
Eritrocitos	1	-	>30	10-30	<10	-	-
	2	-	<10	<10	-	-	-
	3	-	>30	<10	<10	-	-
	4	-	-	-	<10	-	-
	T*	-	-	-	-	-	-
Leucocitos	1	-	-	-	<10	10-30	10-30
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	<10	<10	<10
	4	-	-	-	-	-	-
	T*	-	-	-	-	-	-

de los animales infectados también se identificó al antígeno viral en el citoplasma de leucocitos (figura 1C), esto comenzó a observarse en unas cuantas células el día 12 p.i., como una marca de baja intensidad, pero en los días posteriores aumentó el número de leucocitos positivos y la intensidad de la marca fluorescente (cuadro 1). Ninguno de los cerdos testigos mostró reacción positiva a la inmunofluorescencia durante todo el experimento (figura 1-A).

Respuesta inmune humoral. La identificación de anticuerpos antivirales se realizó por el método de ELISA indirecto. Todos los animales (infectados y testigos) mostraron valores negativos antes de iniciar el experimento. Los cerdos infectados mostraron valores positivos a partir del día 4 p.i., los cuales aumentaron paulatinamente durante el tiempo que duró el experimento (figura 2). Esto no sucedió con los valores de absorbancia de los cerdos del grupo testigo que permanecieron negativos todo ese tiempo.

Estudios hematológicos. Esta serie de ensayos permite detectar posibles alteraciones sanguíneas relacionadas con la infección viral, en cuanto al número, morfología y tipo de las células sanguíneas durante el estado de viremia. Los valores obtenidos en los cerdos infectados experimentalmente se compararon con los valores citados por la bibliografía (Shalm y col., 1975) y con los valores promedio de los cerdos utilizados como testigos negativos. En general, los parámetros de la BH no se vieron alterados durante la infección por RVP o por su asociación con las células sanguíneas durante la viremia (cuadro 2).

DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos la presencia de antígeno viral en la circulación sanguínea de cerdos infectados con RVP. El éxito de nuestro estudio comparado con el de otras investigaciones, en las que se intentó, pero no se logró, detectar al antígeno viral en sangre

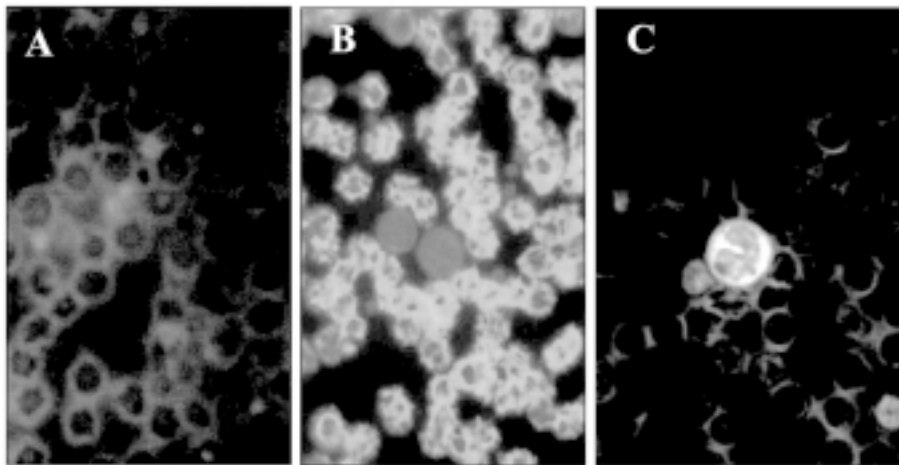


FIGURA 1. Inmunofluorescencia en frotis sanguíneos. A. Reacción negativa en un cerdo testigo no infectado. B. Reacción positiva intensa en un cerdo infectado con 10^5 DICC₅₀ del *Rubulavirus* porcino, a los 4 días p.i. Note la alteración morfológica de los eritrocitos y falta de reacción en los leucocitos. C. Reacción positiva intracelular en leucocitos a los 12 días p.i.

Blood slide immunofluorescence. A. Negative reaction in an uninfected control pig. B. Intense positive reaction in a pig infected with 10^5 TCID₅₀ of porcine *rubulavirus*, at 4 days p.i. Note morphological alteration of erythrocytes and lack of reaction on leukocytes. C. Intracellular positive reaction in leukocytes at 12 days p.i.

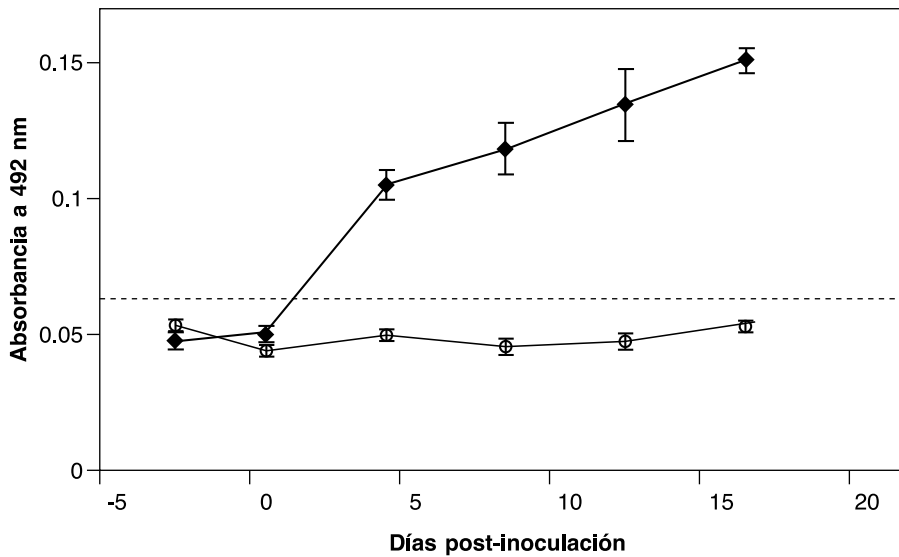


FIGURA 2. Respuesta inmune humoral. Titulación de los anticuerpos séricos contra el rubulavirus porcino mediante ELISA indirecto. La línea de corte (punteada) se estableció mediante el promedio de la absorbancia de los sueros testigos negativos más dos veces su desviación estándar.

Humoral immune response. Titration of serum antibodies against porcine rubulavirus in infected pigs by indirect ELISA. The cut off (dotted line) was calculated by the mean of the absorbance values corresponding to sera from uninfected control pigs plus two-fold their standard deviation.

CUADRO 2. Biometría hemática de cerdos infectados con Rubulavirus porcino. Hematic parameters of porcine Rubulavirus-infected pigs.

FÓRMULA ROJA							
	Eritrocitos (10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	VCM (μm ³)	HCM (pg)	CMHC (g/dl)	
Valores de referencia	5-8	10-16	32-50	50-68	17-23	30-34	
Cerdos testigos negativos	5.54±0.18	10.1±0.59	32.21±1.9	58.54±3.42	18.1±0.78	31±0.98	
Cerdos infectados	5.54±0.35	10.1±0.59	32.5±2.4	58.6±1.8	18.2±1	31.1±1.1	
FÓRMULA BLANCA							
	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Neutrófilos segmentados (%)	Neutrófilos en banda (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)
Valores de referencia	11-22	28-47	0-4	1-11	0-2	2-10	39-62
Cerdos testigos negativos	13.1±0.99	30±10.5	3.5±2.9	1±1	0.5±0.3	29±7.9	31±10.2
Cerdos infectados	12.9±2.4	32.5±10.7	1.56±0.44	0.8±0.79	0.6±0.38	27.2±8.9	29.8±11.2

Los valores de referencia se tomaron de Nelson y Henry, 1995. VCM.- volumen corpuscular medio. HCM.- contenido de hemoglobina corpuscular. CMHC.- concentración media de hemoglobina corpuscular.

Reference values were taken from Nelson and Henry, 1995. VCM.- mean corpuscular volume. HCM.- mean corpuscular hemoglobin. CMHC.- mean corpuscular hemoglobin concentration.

(McNeilly y col., 1997), probablemente se debe al método de fijación de los frotis sanguíneos con ácido acético al 5% en metanol, solución que mostró una notable diferencia con otras soluciones fijadoras en su capacidad para conservar las células sanguíneas y en su nivel de reacción inespecífica. Nuestros resultados indican que hay dos fases de diseminación hematológica. Una fase primaria que se produce entre los días 4 y 12 después de la inoculación, durante la cual, el virus se asocia a la superficie externa de eritrocitos, posiblemente por uniones específicas ligando-receptor mediadas por ácido siálico (Reyes-Leyva y col., 1997; 1999); y una segunda fase, posiblemente posterior a la replicación del virus en órganos linfoides, en que los leucocitos infectados sirven de vehículo de diseminación viral en órganos alejados del sitio inicial de replicación, como son los del aparato reproductor. Esto último concuerda con la identificación de antígeno viral en células mononucleares infiltradas en el tejido intersticial del epidídimo y testículos de cerdos infectados (Ramírez-Mendoza y col., 1997).

En un estudio previo demostramos que el RVP puede ser recuperado de cultivos de células blancas mononucleares obtenidas de sangre periférica de cerdos infectados (Hernández y col., 1998). La susceptibilidad de estas células a la infección por RVP ha sido demostrada por la expresión en su superficie del receptor viral que contiene sialil ($\alpha 2,3$) galactosa (Hernández y col., 2002). La identificación de antígeno en el interior de células mononucleares sugiere que la infección viral podría afectar la función de estas células e inducir la desregulación de la respuesta inmunitaria de los animales infectados. Al respecto, se ha identificado una alteración en la relación de linfocitos CD4:CD8 y un desbalance a favor del fenotipo TH2, con incremento de IL-10 y baja de IFN γ , en la respuesta inmune antiviral durante otras infecciones experimentales con RVP (Hernández y col., 2001 y 2002).

Nuestros datos sugieren que el virus deja de circular libremente en la sangre a partir del momento en que la producción de anticuerpos muestra un nivel elevado; esto ocurre en la segunda semana de infección en este y otros

estudios (Hernández y col., 1998). Esto puede deberse a que gran parte de los anticuerpos que se producen en respuesta a la infección viral están dirigidos contra la proteína de superficie HN, ya que su actividad es altamente neutralizadora (Hernández y col., 1998).

CONCLUSIONES

Se identificó la fase de viremia en cerdos infectados mediante ensayos de inmunofluorescencia en frotis sanguíneos. El antígeno viral se detectó en eritrocitos y leucocitos. Los anticuerpos formados contra el RVP fueron detectables a partir de la primera semana p.i., el aumento de anticuerpos coincide con la disminución del virus libre en sangre. La infección con rubulavirus porcino no produjo alteraciones en los diferentes parámetros de la biometría hemática analizados en este experimento.

RESUMEN

El rubulavirus porcino (RVP) es causante de la enfermedad del ojo azul, que se manifiesta como una meningoencefalitis progresiva fatal en cerdos lactantes y con alteraciones reproductivas en cerdos adultos. El RVP es detectado principalmente en sistema nervioso central, sin embargo, también se ha logrado aislar de otros órganos como bronquios, pulmones, testículos, epidídimo, próstata, ovarios, páncreas, hígado, bazo, timo y nódulos linfáticos. Estos datos sugieren que existe una fase de viremia que permite la diseminación viral del sitio de inoculación hacia otros órganos. En este trabajo presentamos evidencia del estado de viremia así como el análisis de diversos parámetros sanguíneos en cerdos pospúberes infectados experimentalmente con el RVP. El virus se identificó asociado a eritrocitos del día 4 al 12 post-inoculación (p.i.) y asociado a leucocitos del día 12 al 20 p.i., lo que sugiere que utiliza estas células como medio de diseminación sistémica. La producción de anticuerpos se identificó desde la primera semana p.i., pero los títulos más elevados se encontraron el día 16 p.i., lo que

coincidió con la eliminación del virus libre en sangre. Ninguno de los animales infectados mostró anomalías en la biometría hemática durante la fase de viremia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Q.F.B. Gabriela Aguirre Saldívar y a la Q.F.B. María Eugenia Sánchez Parés por su excelente apoyo técnico.

REFERENCIAS

- ALLAN, G. M., F. MCNEILLY, I. WALKER, T. LINNE, J. MORENO-LOPEZ, P. HERNANDEZ, S. KENNEDY, B. P. CARROLL, B. HERRON, J.C. FOSTER, B. ADAIR. 1996. A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:405-413.
- BLAKE, K., S. O'CONNELL. 1993. Virus culture. En: DR Harper (ed) *Virology, Lab Fax*. Bios Scientific Publishers. E.U.A. pp. 81-122.
- COLIGAN, J. E., A. M. KRUISBEEK, D. H. MARGULIES, E. M. SHEVACH & W. STROBER. 1994. *Current Protocols in Immunology*. Greene Publishing & Willey Interscience, E.U.A.
- HERNANDEZ, J., J. REYES-LEYVA, R. ZENTENO, H. RAMÍREZ, P. HERNÁNDEZ-JÁUREGUI, E. ZENTENO. 1998. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64:367-381.
- HERNANDEZ, J., Y. GARFIAS, A. NIETO, C. MERCADO, L. F. MONTANO, E. ZENTENO. 2001. Comparative evaluation of the CD4+CD8+ and CD4+CD8- lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79:249-259.
- HERNANDEZ, J., Y. GARFIAS, J. REYES-LEYVA, R. CHAVEZ, R. LASCURAIN, J. VARGAS, E. ZENTENO. 2002. Peanut and *Amaranthus leucocarpus* lectins discriminate between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84:71-82.
- LAMB, R. A., D. KOLAKOFSKY. 1996. *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley y col. (ed.) *Fields Virology*. 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers, E.U.A.
- LINNÉ, T., M. BERG, A.-C. BERGVALL, B. HJERTNER, J. MORENO-LÓPEZ. 1992. The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Vet. Microbiol.* 33: 263-273.
- MCNEILLY, F., I. WALKER, G. M. ALLAN, J. C. FOSTER, T. LINNE, M. MERZA, P. HERNANDEZ, S. KENNEDY, B. ADAIR. 1997. A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:3-9.
- MCKENDALL, R. R., D. R. CARRIGAN, K. P. JOHNSON. 1981. Lymphoid cell infection by measles virus in newborn hamsters. Role for monocytes in virus spread to distant sites. *J. Neuroimmunol.* 1:261-274.
- MORENO-LÓPEZ, J., P. CORREA-GIRÓN, A. MARTÍNEZ, A. ERICSSON. 1986. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in México. *Arch. Virol.* 91:221-231.
- NELSON, D. A., J. B. HENRY. 1995. Hematología y coagulación, en: J.B. Henry (ed.) *Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio*, 9^a Ed. Ediciones Científicas y Técnicas, México.
- RAMÍREZ-HERRERA, M. A., M. L. MENDOZA-MAGAÑA, S. H. DUEÑAS. 1997. Experimental infection of swine and cat central nervous systems by the pig paramyxovirus of the blue eye disease. *J. Vet. Med.* B44: 461-476.
- RAMÍREZ-MENDOZA, H., P. HERNÁNDEZ-JÁUREGUI, J. REYES-LEYVA, E. ZENTENO, J. MORENO-LÓPEZ, S. KENNEDY. 1997. Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine rubulavirus. *J. Comp. Path.* 117: 237-252.
- REYES-LEYVA, J. B. ESPINOSA, J. HERNÁNDEZ, R. ZENTENO, V. VALLEJO, P. HERNÁNDEZ-JÁUREGUI, E. ZENTENO. 1997. Neu α 2,3-Gal glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 327-332.
- REYES-LEYVA, J., B. ESPINOSA, G. SANTOS, R. ZENTENO, J. HERNÁNDEZ, V. VALLEJO, E. ZENTENO. 1999. Purification and characterization of the Hemagglutinin-neuraminidase of *Porcine Rubulavirus* LPMV. *Glycoconj. J.* 16:517-522.
- REYES-LEYVA, J., P. HERNÁNDEZ-JÁUREGUI, L.F. MONTAÑO, E. ZENTENO. 1993. The porcine paramyxovirus LPM specifically recognizes sialyl(α 2,3) lactose-containing structures. *Arch. Virol.* 133: 195-200.

- REYES LEYVA, J., G. SANTOS, J. HERNÁNDEZ, B. ESPINOSA, M.T. BORRAZ, H. RAMÍREZ, V. VALLEJO, E. ZENTENO. 2002. Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudios con el *Rubulavirus porcino*. En: Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México.
- RIMA, B., D. J. ALEXANDER, M. A. BILLETER, P. L. COLLINS, D. W. KINGSBURY, M. A. LIPKIND, Y. NAGAI, C. ÖRVELL, C. R. PRINGLE, V. TER MULLEN. 1995. Family *Paramyxoviridae*. In: F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Matelli, M.A. Mayo, M.D. Summers (ed.) *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Viena, Nueva York: Springer-Verlag.
- SHALM, W. O, JAIN, B. V., E. J. CARROL. 1975. *Veterinary hematology*. 3.ed. Lea & Febiger, Philadelphia, E.U.A.
- STEPHANO, H.A. 1993. Blue eye disease. In: W.L. Mengelin (ed.) *Diseases of swine*. Sixth ed. Ames, Iowa State University Press, US.
- STEPHANO, H.A., G.M. GAY, T.C. RAMÍREZ. 1988. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Vet. Rec.* 122:6-10.
- VALLEJO V., J. REYES-LEYVA, J. HERNÁNDEZ, H. RAMÍREZ, P. DELANNOY, E. ZENTENO. 2000. Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 126: 415-424.
- WOLINSKY, J.S. 1996. Mumps virus. In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley y col. (ed.) *Fields Virology* Third ed. Lippincott-Raven Publishers, E.U.A.

