

## Desarrollo de un sistema diagnóstico de un ELISA indirecto con la proteína recombinante hemaglutinina neuraminidasa del virus de la Enfermedad del Ojo Azul en cerdos

Julieta Sandra Cuevas Romero<sup>1\*</sup>, José Luis Cerriteño Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, CP 05110. Ciudad de México, México.

Correspondencia: Julieta Sandra Cuevas Romero. Departamento de Epizootiología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad. Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, CP 05110, Cuajimalpa, Ciudad de México. Tel 36 18 08 00 ext. 80322

e-mail: scuevas16@yahoo.com.mx

### Resumen

Durante la última década, el CENID-Salud Animal e Inocuidad del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), se ha enfocado en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para el estudio de diferentes enfermedades de interés pecuario. En el presente trabajo, se desarrolló el método de ELISA indirecto (ELISA-I), utilizando la proteína recombinante HN del *Orthorubulavirus porcino* agente causal de la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) que es una de las cuatro enfermedades virales que más afectan la industria porcina. Este desarrollo se plantea como un procedimiento tamiz automatizado rápido, de bajo costo con lectura objetiva de los resultados e inocuo para la detección de anticuerpos específicos contra el virus de la EOA. Esta herramienta tecnológica permitirá establecer un sistema diagnóstico factible de ser utilizado con un gran número de muestras y poder determinar el status epidemiológico de la EOA en la población porcina del país, así como poder estimar el riesgo potencial que implicaría la movilización de cerdos infectados en el proceso de comercialización a nivel nacional e internacional, situación que a la fecha es desconocida en México único país donde se ha reportado esta enfermedad en cerdos.

**Palabras Claves:** *Orthorubulavirus porcino*, PRV-LPMV, HN, Hemaglutinina neuraminidasa, recombinante.

### Abstract

During the last decade, the CENID- Salud Animal e Inocuidad of INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), has focused on the development of biotechnological tools for the study of different diseases of interest to livestock. In the present work, the indirect ELISA method (iELISA) was developed, using the recombinant protein HN of the *Porcine Orthorubulavirus*, causal agent of Blue Eye Disease (BED), which is one of the four viral diseases that most affect the pig-industry. This development is proposed as a fast, low-cost automated screening procedure with objective reading of the results and innocuous for the detection of specific antibodies against virus. This technological tool will allow establishing a feasible diagnostic system to be used with a large number of samples and to be able to determine the epidemiological status of EOA in the pig population of the country, as well as to be able to estimate the potential risk that the mobilization of infected pigs in the country would imply. A situation that to date is unknown in Mexico, the only country where this disease has been reported in pigs.

**Key Words:** *Porcine Orthorubulavirus*, PRV-LPMV, HN, Hemagglutinin neuraminidase, recombinant.

### Introducción

Durante los últimos años, la Industria Porcina Mexicana se ha visto afectada por cuatro enfermedades virales que impactan negativamente en el costo de producción y en

el margen de utilidad de las empresas dedicadas a la crianza y venta de cerdos, como son la Diarrea Epidémica del Cerdo (DEP), el Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS), Circovirus Porcino Tipo2 (CV) y la Enfermedad del Ojo Azul

(EOA). El impacto económico se asocia a los gastos en medicamentos, mortalidad de lechones y la baja fertilidad, entre otras. En la actualidad, la biología molecular ha permitido el desarrollo de diversos campos de la ciencia, que ha dado oportunidad a un gran número de aplicaciones biotecnológicas en diversos sectores industriales con un crecimiento del 1.5% del 2015 al 2020 (Martin et al 2021). Los reportes más recientes indican que México ocupa el 8º lugar a nivel mundial en producción porcina con 1.600 toneladas de carne, representando un incremento del 4.5% con respecto al mes de abril del 2022 (Shahbandeh, M. 2023). Por su parte, la USDA mostró datos que indican que la producción porcina en México en enero y febrero del 2023 presenta una tendencia en aumento con 1,570 toneladas de carne, siendo mayor con respecto a los años anteriores (USDA 2023).

Por esta razón el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del INIFAP ha desarrollado dentro de sus líneas de investigación el área de Biotecnología en Salud Animal, relacionado al estudio de Enfermedades Virales de interés pecuario que afectan la ganadería nacional. Dentro de estos aspectos en particular se han desarrollado herramientas biotecnológicas para el estudio de la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) considerada una de las cuatro enfermedades de importancia epidemiológica en México. La Enfermedad del Ojo Azul (EOA) fue reconocida desde el inicio de los 80's y continúa siendo un problema para la industria porcina del país. Desde 1997 hasta la fecha, para México la Enfermedad de Ojo Azul representa una limitante para el comercio internacional como es citado en el Reglamento de Importación de Animales y Productos de origen Animal de la Agencia de Servicios de Inspección en Salud Animal y Vegetal USDA (APHIS, 9 CFR cap 1, subcap D 1997, part 94 2005).

La EOA se caracteriza por ocasionar problemas nerviosos, respiratorios y reproductivos. Los signos clínicos varían considerablemente y dependen de la edad del cerdo. Los lechones son los más afectados, quienes presentan encefalitis, neumonía y opacidad de la córnea (Stephano et al., 1988).

El impacto negativo en los parámetros reproductivos y la mortalidad que se presenta durante un brote de esta enfermedad en granja, ocasiona considerables pérdidas económicas, las cuales se asocian a la baja en la fertilidad, incremento en el porcentaje de lechones nacidos muertos (arriba del 19%), presencia de momia (mayor al 36%), la disminución en el número total de lechones nacidos vivos (-4.1) y el incremento en la mortalidad de lechones durante las primeras semanas de vida que puede ser mayor a un 50%. (Escobar et al., 2011, Ramírez-Mendoza et al., 1997).

El *Rubulavirus Porcino*, Virus La Piedad Michoacán México (PRV-LPMV) es el agente causal de la enfermedad de "ojo azul" en cerdos, la cual, sólo ha sido reportada en México, es causada por un paramixovirus, anteriormente denominado *Rubulavirus porcino* y a partir del 2019 *Orthorubulavirus porcino* (PRV) (Rima et al, 2019). El virus ha sido caracterizado a nivel molecular (Berg et al., 1991; 1992; 1997; Linné et al. 1992; Reyes-Leyva et al., 1999; Svenda et al., 1997, Sundkvist et al., 1990; 1992), nivel celular (Hjertner et al., 1997; 1998; Reyes-Leyva et al., 1997; Wiman et al., 1998) y mediante infecciones experimentales (Allan et al., 1996; Hernández-Jauregui et al., 2004; Stephano et al; 1988; Stephano, 1999, Rivera et al., 2013, Cuevas-Romero et al., 2015). El genoma consiste en una cadena sencilla de RNA, de polaridad negativa, de aproximadamente 15 K. Los análisis filogenéticos han demostrado que el virus se relaciona más con el virus de papeas y el de los simios 5 (SV5) (Berg et al., 1991; 1992; 1997; Svenda 1997, Sundkvist et al., 1992). Sin embargo, la identidad para estos virus a nivel de aminoácidos es solo de un 40%. El virus recientemente ha sido clasificado en la subfamilia *Rubulavirinae* como *Porcine orthorubulavirus*-La Piedad Michoacán México virus (PRV-LPMV) (ICTV 2019). Existen más datos en relación al gen de la proteína hemaglutinina neuraminidasa (HN). Desde 1990 hasta la fecha, se tiene reportados aproximadamente 20 secuencias del gen HN de diferentes aislados, por ejemplo: LPMV-CI, LPMV-CII, LPMV-CIII y LPMV-CIV, entre otros. En México no existe alguna norma oficial que permita establecer programas de prevención, diagnóstico y vigilancia epidemiológica de la EOA.

Desde la aparición de la EOA (1981), la prevención y el control en las granjas infectadas se ha basado en estándares de sanidad e higiene (Correa-Girón et al., 2002; Moreno-López et al. 1986). Se reporta una seroprevalencia del *Rubulavirus porcino* (PRV) del 9% al 23.7% en los estados de Jalisco, Michoacán, Estado de México y Guanajuato, por lo que la enfermedad continua endémica principalmente en la región central y occidental de la República Mexicana (Escobar, et al., 2011).

En relación a las posibles técnicas diagnósticas, solo están disponibles las pruebas serológicas de seroneutralización y el clásico aislamiento viral (McNeilly et al., 1997; Nordengrahn et al., 1999). Sin embargo, para varios propósitos de investigación, se ha empleado la tecnología clásica de inhibición de la hemoaglutinación, aunque ésta, no es considerada una técnica oficial para el diagnóstico serológico.

Actualmente no se tiene disponible a nivel comercial una prueba de diagnóstico serológico, segura, fácil, rápida y barata que permita evaluar un gran número de muestras de cerdo y tener un diagnóstico en un corto periodo de tiempo. De tal forma que para México cobra vital importancia el desarrollar sistemas de diagnóstico y/o inmunógenos que permitan proporcionar a la Industria Porcina del país una herramienta preventiva que permita establecer programas preventivos seguro, confiable e inocuo para su aplicación y para su uso sin riesgo de transmisión y diseminación de agentes virales hacia zonas libres del país.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y estandarizar un método de diagnóstico inmunoenzimático de ELISA indirecta (ELISA-I), sensible y específica, basado en la utilización de la proteína recombinante HN del *Rubulavirus porcino*, que es una glicoproteína altamente inmunogénica, donde los anticuerpos específicos que se generan en el hospedero neutralizan el reconocimiento de los receptores a nivel celular.

## Material y Métodos

*Obtención de la Proteína HN recombinante*  
La proteína HN del *Rubulavirus porcino*, que corresponde a la glicoproteína

hemaglutinación-neuraminidasa (HN) del PRV, fue obtenida de un desarrollo previo del CENID-SAI, Laboratorio de Epizootiología. A partir de esta proteína recombinante HN (rHN-PorPV) (No. De acceso: KC928078) (Cuevas-Romero et al., 2016), altamente antigénica se generó un lote de trabajo para el desarrollo de la prueba de ELISA indirecta (ELISA-I). Brevemente, se descongeló de -70°C una alícuota de la clona de la rHN-PorPV, y se utilizó para inocular un precultivo en medio LB con kanamicina (50 µg/ml), el cual se dejó crecer durante 18 horas. Se tomó el precultivo necesario para inocular un matraz con 75 ml de medio LB bajo en sales comenzado a 0.5 DO a 600 nm, se incubó en agitación continua (250 rpm) a 37°C durante 3 horas. Posteriormente la inducción se llevó a cabo cuando el cultivo llegó a una DO 600nm de entre 0.8 y 1.5 y se agregaron 250 µl de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1M y 50 µl de L-Ramosa al 20% y nuevamente el cultivo fue colocado en agitación continua (250 rpm) durante 18 horas a 37°C. Se centrifugó el material (4000 rpm, por 10 min) para trabajar con el paquete celular (pellet), y mediante un proceso de lisis con alta presión (8000 psi) y purificación mediante una columna de afinidad (HisTrap HP His tag protein purification column), se purificó la proteína para su evaluación mediante SDS-PAGE y Western-Blot, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-histidina, específico para reconocer la proteína expresada. La proteína expresada se cuantificó utilizando el método de Bradford.

### *Estandarización de la prueba de ELISA*

Para el desarrollo de la técnica de ELISA-I, se consideraron algunos factores importantes tales como: adsorción y titulación del antígeno, controles de suero positivos (procedentes de animales vacunados), sueros negativos (animales libres), titulación de conjugado, cinética de reacción del substrato, tiempo de incubación, temperatura, pH de las soluciones amortiguadoras, tiempo óptimo de lectura e interpretación de resultados, (Burgess, 1988; De'Ath, G. 1988; Edwards, et al., 1985; McLaren, et al., 1985).

Se estandarizó la prueba de ELISA-I, mediante la evaluación de sueros procedentes de cerdos inmunizados

experimentalmente, y sueros negativos de animales SPF, proporcionados del banco de sueros del proyecto de Rubulavirus porcino del CENID-SAI, Laboratorio de Epizootiología. Los cuales se utilizaron para determinar las concentraciones óptimas para el uso de la proteína recombinante HN, conjugado y sustrato respectivamente.

Se preparó un lote piloto de rHN-PorPV para titulación de antígeno en microplacas de fondo plano con 96 pocillos (NUNC Polysorp Surface) para su evaluación en el desarrollo de la prueba de ELISA-I. Se determinó la concentración óptima de proteína recombinante HN para sensibilizar microplacas, utilizando diluciones dobles a partir de (1:500) 50  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  hasta 400  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  con el modelo denominado "titulación por bloque" es decir; se utilizaron diferentes diluciones de antígeno frente a diferentes diluciones de conjugado a partir de una dilución de 1:5000 hasta 1:20000, fijando la dilución de los sueros controles a 1:200 en toda la placa.

La absorción del antígeno en el fondo de las placas, se realizó mediante el uso de solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6. En todos los ensayos se consideró un volumen de 100  $\mu\text{l}$  para cada pozo, las placas se sellaron con papel parafilm y se colocaron dentro de una cámara húmeda la cual se incubó en refrigeración a 4° C durante toda la noche. El criterio para seleccionar la dilución de antígeno se consideró en donde se obtuviera la mayor diferencia entre el suero control positivo y negativo (mínimo tres desviaciones estándar en la densidad óptica DO), y donde la reacción inespecífica (fondo) fuera menor de 0.05 DO a 450 nm.

La determinación la concentración óptima de Conjugado (anticuerpo monoclonal anti-IgG porcina), desarrollado en cabra (KPL, USA) conjugado con peroxidasa de rábano, se realizó de la siguiente forma: inicialmente para su empleo se reconstituyó el conjugado con 1 ml de una mezcla glicerol-agua 50% (V/V) agitando suavemente, se hicieron alícuotas y se almacenó a -20° C. Posteriormente, la determinación de la dilución óptima del conjugado siguiendo el modelo de "tablero de ajedrez" utilizando diluciones decimales iniciando a partir de una dilución de 1:5000

hasta 1:20000 a una dilución constante de sueros controles (1:200).

Para la determinación del tiempo de lectura del ensayo, se elaboró la curva de cinética de reacción del sustrato ABTS 0.1[2,2'-Azinobis (3-ethylbenztioline-6-Sulfonc Acid)] (ABTS 0.1N), mediante lecturas de la densidad óptica (DO) durante 30' a intervalos de 5' , en el lector de ELISA, Multiscan plus II, esto permitió determinar el tiempo de lectura del ensayo y el punto en el cual es preferible detener químicamente la prueba, donde exista mayor diferencia entre sueros positivos y sueros negativos. Se adaptó un software para lectura y estandarización de los sueros mediante porcentaje de positividad (%PP), se hicieron 10 repeticiones del mismo ensayo para determinar la variación del mismo y establecer las densidades ópticas de los sueros controles.

#### *Sueros controles de la prueba de ELISA*

Se emplearon 30 sueros provenientes de cerdos SPF negativos, libres de la infección del PRV y 30 sueros de cerdos SPF infectados experimentalmente con el PRV para la obtención del Suero control positivo fuerte (C++) anti-PRV, suero control positivo débil (C+) anti-PRV y 30 suero control negativo (C-) respectivamente. Las muestras de suero fueron proporcionadas del banco de sueros del Proyecto de Investigación de la EOA, del CENID-SAI preservadas en congelación - 20°C. La determinación de anticuerpos circulantes, específicos contra el PRV, se realizó mediante la prueba de Seroneutralización en cultivo de tejidos (SN) por el método convencional. Brevemente, para la realización de SN, se trabajaron placas de 96 pozos estériles marca "NUNC" de fondo plano, los sueros se inactivaron a 56 °C durante 30 min. y la infección se realizó con 200 TCID<sub>50</sub>/0.05ml. de PRV, utilizando la línea celular PK15, de acuerdo con la técnica descrita por Mc Neilly y colaboradores (Allan et al. 1996, Dinter Zvonimir, 1989, Mc Neilly et al. 1997).

#### *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Win-Episcopy, (Frankena K & Goelma J O. 1991). Para determinar valores de sensibilidad y especificidad con los sueros controles de referencia (positivos y negativos)

en comparación con los resultados de SN, mediante una tabla de contingencia de 2 x 2 (Tabla 1). Los resultados de ambas pruebas se correlacionaron, considerando el ensayo

de SN como prueba de referencia ("Gold Estándar").

**Tabla 1.** Tabla de contingencia de 2x2 para obtener la sensibilidad y especificidad.

		SN (Prueba de oro)		Total
		SI	NO	
ELISA- Indirecta	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
Total		A+C	B+D	N

A = número de verdaderos positivos  
 B = número de falsos positivos  
 C = número de falsos negativos  
 D = número de verdaderos negativos

Sensibilidad (%) =  $100 \cdot A / (A+C)$   
 Especificidad (%) =  $100 \cdot D / (B+D)$

#### *Determinación del punto de corte o "Cut-off" del ELISA.*

El punto de corte se definió como el nivel de anticuerpos en un suero el cuál discrimina entre animales positivos y negativos (Wardley & Crowther, 1981; Dierksheide, 1987). La determinación del punto de corte es punto central en cualquier ensayo serológico. La implicación de este punto de corte varía de enfermedad a enfermedad o del estado de vacunación del animal. Este puede ser usado para determinar si un animal está potencialmente infectado o no y definir la seroconversión en animales vacunados. El único método válido para determinar un punto de corte diagnóstico es probar muestras de sueros provenientes de animales positivos conocidos y negativos conocidos. Los resultados de los sueros control y los sueros de prueba se expresaron como porcentajes de positividad (%PP) de la lectura de la DO media del C++, a un tiempo de incubación del cromógeno de 20 minutos. El porcentaje de positividad se calculó mediante la siguiente formula:

$$\%PP = \frac{DO \text{ de la muestra de prueba} \times 100}{DO \text{ del control positivo fuerte C++}}$$

#### *Validación de la Prueba de ELISA*

Una vez estandarizada la prueba, se procedió a la validación del inmunoensayo comparando los resultados de un núcleo de sueros

evaluados mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), (prueba rutinaria utilizada en el diagnóstico serológico del PRV) como se mencionó anteriormente, con los resultados de la prueba de ELISA-I, para esto se seleccionó una granja porcina en el estado de Guanajuato con antecedentes clínicos de la infección por el PRV y con perfil serológico conocido mediante la prueba de IH. Se seleccionaron 60 sueros de cerdos serológicamente positivos por la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación con títulos entre 1:160 y 1:320 unidades, esta prueba se basan en las características de hemoaglutinación que presenta la proteína estructural HA del PRV utilizando glóbulos rojos de pollo; brevemente, inicialmente se realizó la titulación del virus a partir de diluciones dobles del antígeno PRV de los sobrenadantes de células PK15, inoculados con la cepa de referencia. El efecto de aglutinación de glóbulos rojos de pollo, se observó a través de un microscopio de luz, donde se estableció un título de trabajo de 1:8 unidades hemoaglutinantes para la prueba de IH (Correa et al. 1988, Dinter Zvonimir, 1989, Mc Neilly et al. 1997). Adicionalmente se incluyeron 30 sueros de cerdos negativos provenientes de una zona libre de la infección por el PRV. La concordancia entre ambas pruebas se determinó mediante la prueba de KAPPA, que expresa la proporción de concordancia de que ambas pruebas

coincidan más allá del azar, cuando KAPPA tiene un valor de 0 indica que no existe concordancia entre las pruebas evaluadas; si se presenta un valor de 1.0, indica una perfecta concordancia (Thorner, et al., 1981; Taylor, 1986; Frankena, 1991).

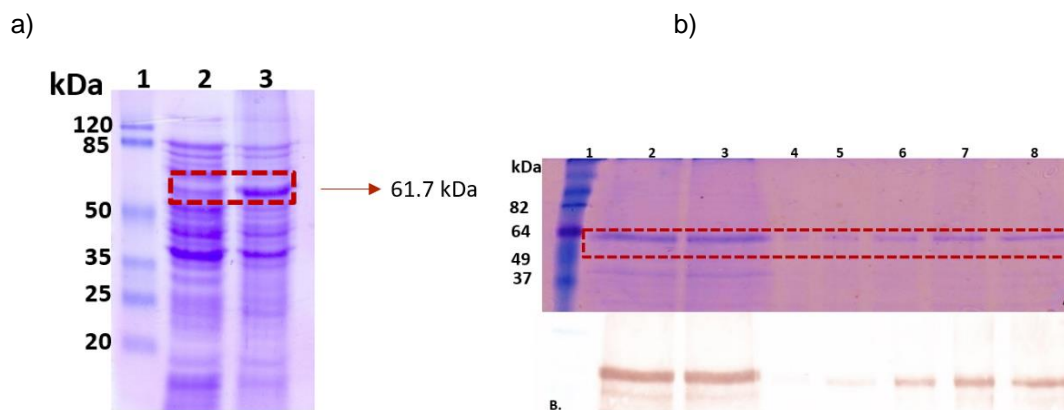
## Resultados

*Cuantificación de la proteína HN recombinante y detección mediante SDS-Page y Western-Blot.*

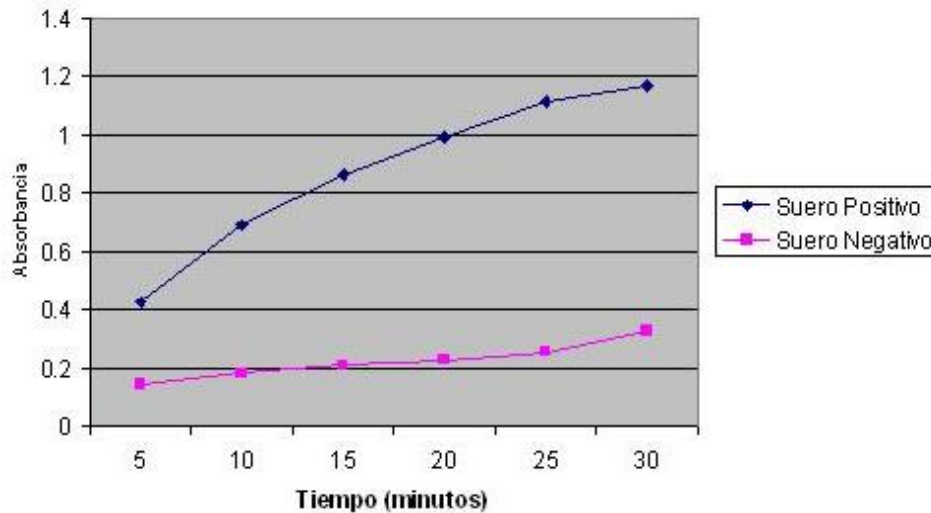
La detección de la proteína HN se observó en 61.7 kDa mediante SDS-PAGE obteniendo un lote de trabajo con una concentración de 70 µg/ml el cual se utilizó para la estandarización de las pruebas de ELISA-I. La prueba de Western-blot fue revelada con el uso de un monoclonal anti-Histidina y un segundo anticuerpo anti-mouse-HRP, marcado con peroxidasa, demostrando con esto la especificidad de la proteína para su uso en la prueba de ELISA-I (Figura 1).

## *Estandarización del ensayo de ELISA-I, con la proteína recombinante HN del PRV*

Se establecieron los tiempos de incubación para la antigenación de placas en 24 h a 4° y de 60 minutos a 37° para los anticuerpos empleados respectivamente. Se determinó la concentración óptima del antígeno (proteína recombinante HN), evaluada mediante el modelo de "titulación por bloque" indicando una concentración de 100 µg /pozo. En la titulación del conjugado (monoclonal anti-IgG porcina) utilizando los sueros controles de referencia se estableció una dilución de 1:10 000, donde se observó la mayor diferencia entre sueros positivos y negativos determinada mediante la curva de cinética de reacción del sustrato (ABTS) registrada durante 30' con intervalos de lecturas cada 5', resultando en un tiempo ideal de lectura para el inmunoensayo a 20' después de iniciada la reacción (Figura 2).



**Figura 1.** a) Expresión de la rHN-PorPV visualizada en SDS-PAGE al 12%. Carril 1. Marcador de peso molecular (Prestained Protein MV Marker (Thermo Scientific, EU Lituania)), Carril 2. Cultivo de *E. coli* BL21 transformada sin expresar, Carril 3. Cultivo de *E. coli* BL21 expresado con IPTG. b) Visualización del proceso de obtención de la rHN-PorPV en SDS-PAGE al 12% y Western Blot (revelado con anti-histidina y anti-ratón) carril 1 se encuentra el Marcador de peso molecular, en los carriles 2 y 3 se presentan los Cuerpos de inclusión-rHN y en los carriles del 4 al 8 se presentan las eluciones de la columna (proteína purificada).



**Figura 2.** Cinética de reacción del sustrato (ABTS) en presencia de sueros de referencia a diferentes tiempos.

A partir de las condiciones de trabajo establecidas, se analizaron un total de 30 sueros de porcinos, clasificados previamente como positivos o negativos por la prueba de seroneutralización (SN) del banco de sueros del CENID-SAI-INIFAP, donde los sueros de referencia positivos evaluados mediante la prueba de SN (“Gold estándar”), mostraron títulos superiores a 1:128, y los sueros negativos no mostraron actividad neutralizante. Los resultados de la prueba de ELISA-I se expresaron mediante el análisis de las lecturas de densidad óptica (DO 414nm), en porcentajes de positividad (%PP), en relación con un control fuerte positivo (C++) de referencia mediante un software para procesamiento de datos, considerando 10 repeticiones para el ensayo. Se determinó la distribución de la frecuencia de los sueros positivos o negativos en los intervalos de densidades ópticas más 1 desviación estándar (DS) con los siguientes resultados; para el suero control fuerte positivo (C++) fue de 0.88 a 1.38, para el suero control débil positivo (C+) de 0.442 a 0.774 con porcentajes de positividad mayores a 25%, y para el suero control negativo (C-) de 0.052 a 0.032 con valores de %PP menores del 5%. (Tabla 2), estableciendo un punto de corte del 20 %PP con respecto al valor de la DO del suero control negativo (+ 3DS) en relación al valor de la DO del suero control fuerte positivo (- 3DS). Se determinó la sensibilidad y especificidad del ensayo, mediante una tabla

de contingencia de 2x2; bajo estas condiciones experimentales se obtuvo una sensibilidad comparada de 100% y una especificidad comparada de 100% en relación con la prueba de SN como prueba de referencia (Tabla 3).

#### *Validación de la Prueba de ELISA-I*

Los resultados en la validación del ensayo con 90 sueros de cerdos naturalmente infectados obtenidos de una granja positiva al PRV, mostraron títulos en la prueba de IH entre 1:16 y 1:128, cuando observamos los datos del % PP de los mismos sueros en la prueba de ELISA-I, a una dilución de 1:16, las densidades ópticas observadas se detectaron con valores superiores al 25% PP indicativo a una alta concentración de material de reacción antígeno-anticuerpo. Los resultados de la comparación del ensayo de ELISA-I contra la prueba de IH, mostraron una concordancia estimada mediante el valor de KAPPA de 0.052 (Tabla 3) indicativo de un moderado nivel de concordancia, esto podría ser explicado por la baja sensibilidad que presenta la prueba de IH (Tabla 4).

# Artículos

**Tabla 2.** Comportamiento del ensayo ELISA-I en 10 repeticiones. Valores de densidad óptica (414 nm) promedio y PRUEBA DE CONCORDANCIA: RESULTADOS

PROPORCIÓN DE OBSERVADOS	0.79
PROPORCIÓN DE ESPERADOS	0.56
POSIBILIDAD DE MÍNIMO ERROR	0.23
MÁXIMA POSIBILIDAD DE CONCORDANCIA	0.44
Kappa=	0.52

RESULTADOS INGRESADOS (A, B, C, D)					
PRUEBA ESTÁNDAR					
PRUEBA	1	2	3	4	TOTAL
1	51	9	0	0	60
2	10	20	0	0	30
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	
TOTAL	61	29	0	0	90

ALTERNA  
desviación estándar (DS).

SUEROS	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
Control Fuerte Positivo C++	1.132	0.248
Control Débil Positivo C+	0.608	0.166
Control Negativo (C-)	0.044	0.012
Control Conjugado (Cc)	0.008	0.007

**Tabla 3.** Sensibilidad y Especificidad\* de ELISA-I (punto de corte al 20%) comparada con la prueba de Seroneutralización (SN) (estándar de oro) determinada en sueros de cerdos SPF infectados experimentalmente con el PRV y negativos respectivamente.

**Tabla 4.** Tabla de concordancia obtenida por el programa EPISCOPE

ELISA	SN (estándar de oro) (punto de corte 20%)		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	30	0	30
Negativos	0	30	30
Total	30	30	60

Sensibilidad comparada 100%; Especificidad comparada 100%

Valor predictivo: para detectar animales positivos 100%; para detectar animales negativos: 100%

\*Esta tabla de contingencia analizada con el programa Episcopo (12).

## Discusión

El primer brote reportado de la enfermedad de ojo azul en cerdos fue en los inicios de 1980. La enfermedad todavía es un problema para la industria porcina en México. Se ha

especulado que la transmisión del virus al cerdo podría ser a través de reservorios silvestres. Como soporte a esta teoría, se ha demostrado recientemente que los murciélagos hematófagos de México poseen anticuerpos dirigidos hacia el PRV (Salas-Rojas et al., 2004).



Por otro lado, no se ha comprobado formalmente que los murciélagos hematófagos sean un reservorio natural del PRV. Sin embargo, considerando que éstos son reservorio para muchos virus con potencial de diseminación a otras especies, es ciertamente posible que también sean reservorios del PRV.

Para tener la capacidad de investigar la diseminación del PRV en la naturaleza y en el cerdo, se ha desarrollado en este estudio la técnica de ELISA-I, a partir de la proteína HN recombinante del virus, que permite evitar el manejo de antígeno vivo y la diseminación del virus en áreas geográficas libres de la enfermedad. Con el fin de tener la capacidad de estudiar la situación epizootológica de la enfermedad en México, así como otros aspectos de circulación del virus en diferentes áreas porcinas del país.

La técnica de ELISA-I tiene muchas ventajas sobre otros métodos diagnósticos. Por ejemplo, la prueba tiene una alta sensibilidad, especificidad y el procedimiento limita una posible contaminación cruzada con otros virus. Para el desarrollo de esta técnica se ha usado el gen HN del PRV debido a que éste es altamente expresado (Hjertner et al., 1998) y también a que su secuencia se encuentra disponible (Berg et al., 1992).

En resumen, el desarrollo del método de ELISA-I basado en la proteína recombinante HN del PRV- LPMV, representa una alternativa idónea para la determinación de animales enfermos o libres de la enfermedad, favoreciendo el comercio a nivel nacional e internacional de productos de origen porcino. Este desarrollo tecnológico puede ser empleado en futuros estudios enfocados en diferentes cuestiones biológicas, así como epidemiológicas para el control de este virus en México.

## Conclusión

La tecnología generada en este proyecto, además de ser factible de ser protegida mediante su registro de patente, resulta una importante alternativa para el diagnóstico de la Enfermedad del Ojo Azul en México, dado que esta enfermedad representa una barrera

arancelaria para la exportación de cerdos y sus derivados, así como para la movilización de animales dentro del comercio nacional e internacional.

Además de proveer un sistema diagnóstico a la industria farmacéutica veterinaria mexicana, con la oportunidad de realizar una producción en extenso que permita una apertura en el diagnóstico y vigilancia epidemiológica de la enfermedad en México.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto SEP-CONACYT-288942 y parcialmente por el proyecto: "Proyectos de apoyo a la Investigación, No. SIGI: 1259436381".

## Referencias

Allan GM, McNeilly F, Walker I, Linne T, Moreno-Lopez J, Hernandez P, Kennedy S, Carroll BP, Herron B, Foster JC, Adair B. (1996) A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest.* 1996 Oct;8(4):405-13.

Berg M, Hjertner B, Moreno-Lopez J, Linne T. (1992) The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited. *J Gen Virol.* 73:1195-200.

Berg, M., Sundqvist, A., Moreno-López, J. and Linné, T., (1991) Identification of the porcine paramyxovirus LPMV matrix protein gene: Comparative sequence analysis with other paramyxovirus. *J.Gen.Virol.* 72. pp.1045-1050.

Berg M, Bergvall AC, Svenda M, Sundqvist A, Moreno-Lopez J, Linne T. (1997) Analysis of the fusion protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: comparative analysis of paramyxovirus F proteins. *Virus Genes.* 14(1):55-61.

Burgess, G. W. (1988) Basic principles in ELISA and variations configuration In: ELISA

Technology in Diagnosis and Research Ed. G. W. Burgess, Queensland, Australia, 27.

Correa, P., Pérez, J., Martínez, A., Coba, A., Córdova, D. 1998. Encuesta Nacional para detectar cerdos seropositivos a Rubulavirus porcino mediante la prueba de inhibición de la Hemaglutinación. Memorias XXXIII Congreso AMVEC. 1998. pp.198-199.

Correa-Girón, P., Martínez, A., Pérez, J., Coba, M. A., Solís, M., Morilla, A., & Zimmerman, J. J. (2002). Vaccination against blue eye disease. Trends in Emerging Viral Infections of Swine, 65-69.

Cuevas-Romero, J. S., Blomström, A. L., & Berg, M. (2015). Molecular and epidemiological studies of Porcine rubulavirus infection—an overview. Infection ecology & epidemiology, 5(1), 29602.

Cuevas-Romero, J.S.; Rivera-Benítez, J.F.; Hernández-Baumgarten, E.; Hernández-Jauregui, P.; Blomström, A-L.; Berg, M.; Baule, C. (2016). Cloning, expression and characterization of potential immunogenic recombinant hemagglutinin-neuraminidase protein of Porcine rubulavirus. Protein Expr Purif. 2016, 128, 1-7. doi: 10.1016/j.pep.2016.08.002. Cuevas-Romero 2016 proteina

De'Ath, G. (1988) ELISA as a Measurement Process: Some statistical Considerations In: ELISA Technology in Diagnosis and Research; Burgess, G. W. (ed.) Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia, 120.

Dinter Zvonimir. in Diagnostic Virology J. Moreno-López ED. (1989) Swedish University of Agricultural Sciences, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden and Swedish International Developing Authority. pp. 30.

Dierksheide, W. C. (1987) Medical Decisions: Interpreting clinical tests; Am. Soc. Mic. News, 53.

Edwards, S., Bushnell S., Jones P. C. and Perry, C. T. (1985) Establishment of statistical base for use of ELISA in diagnostic serology for infectious bovine rhinotracheitis. J. Biol. Standardisation, 13: 243.

Frankena K, Goelma J O. (1991) Programa EPISCOPE. Agricultural University, Dep. of Animal Husbandry, P.O. Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands.

Hernández-Jauregui P, Ramirez Mendoza H, Mercado Garcia C, Moreno-Lopez J, Kennedy S. (2004) Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacán virus) infection in pregnant gilts. J Comp Pathol. 130(1):1-6.

Hernández-Jauregui P, Yacoub A, Kennedy S, Curran B, Tellez C, Svenda M, Ljung L, Moreno-Lopez J.(2001) Uptake of porcine rubulavirus (LPMV) by PK-15 cells. Arch Med Res. 32(5):400-9.

Hjertner B, Linne T, Moreno-Lopez J.(1997) Establishment and characterization of a porcine rubulavirus (LPMV) persistent infection in porcine kidney cells. Acta Vet Scand. 38(3):213-24.

Hjertner B, Wiman AC, Svenda M, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. (1998) Multiple factors including subgenomic RNAs and reduced viral protein expression are associated with a persistent infection by porcine rubulavirus (LPMV). Arch Virol. 143(3):425-39.

Linné T, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B, Moreno-Lopez J. (1992) The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. Vet Microbiol. 33(1-4):263-73.

Martin, D. K., Vicente, O., Beccari, T., Kellermayer, M., Koller, M., Lal, R. & Dundar, M. (2021). A brief overview of global biotechnology. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35(sup1), S5-S14.

McLaren, M. L., Lillywhite, J.E. and Au, A. C. S. (1981) Indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): practical aspects of standardisation and quality control. Med. Lab. Sci. 38: 245.

Mc Neilly, F., Walker, I., Allan, M., Foreste, C., Linné, T., Merza, M., Henandez, J.P., Kennedy, S. and Adai, B. (1997) A comparative study on the use of virus and antibody detection techniques for the diagnosis of La Piedad Michoacan

paramyxovirus (LPMV) infection in pigs. *J. Vy col. Diagn. Invest.* 9: 3-9.

Moreno-López J., Correa, G. P., Martínez, A. and Ericsson, A. (1986) Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of Virology* . 91 pp. 221-231.

Nordengrahs, A., Svenda, M., Morenolópez, J., Bergvall, A., Hernandez-Jáuregui, P., Mc. Neilly, F., Allen G., Merza. M. (1999) Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus. *La Piedad Michoacán virus. J. Vy col. Diagn. Invest.* 11 pp 319-323.

Ramírez-Mendoza, H., Hernández, J.P., Reyes, L.J., Zenteno, E., Moreno, L.J. and Kennedy, S. (1997) Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. *J. Comp. Path. Vol. 117* pp. 237-252.

Rima, B., Balkema-Buschmann, A., Dundon, W. G., Duprex, P., Easton, A., Fouchier, R., ... & Consortium, I. R. (2019). ICTV virus taxonomy profile: Paramyxoviridae. *The Journal of general virology*, 100(12), 1593.

Rivera-Benitez, J. F., Martínez-Bautista, R., Pérez-Torres, A., del Carmen García-Contreras, A., Reyes-Leyva, J., Hernández, J., & Ramírez-Mendoza, H. (2013). Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Veterinary microbiology*, 162(2), 491-498.

Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernandez J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jauregui P, Zenteno E. (1997) NeuAc alpha 2,3gal-glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 118(2):327-32.

Reyes-Leyva 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(9):517-22.

Salas-Rojas M, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz Md Mde L, Schnell GD, Schmid RK, Aguilar-Setien A. (2004)

Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98(10):577-84.

Shahbandeh M. Global pork production 2022 y 2023 by country. Abril 2023. <https://www.statista.com/statistics/273232/net-pork-production-worldwide-by-country/>

Stephano, H.A., Gay, G.M., Ramírez T.C. (1988) Encephalitis, reproductive, failure and corneal opacity (blue eyes) in pigs, associated with a paramyxovirus infection in pigs in Mexico *The Veterinary Record.* 122. 6-10.

Stephano, H.A. (1999) Blue Eye Disease. In: *Diseases of swine*, pp 103-112. 8th Edition. Edited by Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L. & Taylor, D. J. Ames, Iowa Iowa, State University Press.

Sundqvist A, Berg M, Hernández-Jauregui P, Linne T, Moreno-Lopez J. (1990) The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *J Gen Virol.* 71: 609-13.

Sundqvist A, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. (1992) The haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of the porcine paramyxovirus LPMV: comparison with other paramyxoviruses revealed the closest relationship to simian virus 5 and mumps virus. *Arch Virol.* 122(3-4):331-40.

Svenda M, Berg M, Moreno-Lopez J, Linne T. (1997) Analysis of the large (L) protein gene of the porcine rubulavirus LPMV: identification of possible functional domains. *Virus Res.* 48(1):57-70.  
The Code of federal regulations (CFR). Título 9, Cap. 1 Subcap. D. 1997. APHIS. USDA.

Svenda M, Hjertner B, Linne T, 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 Res.* 83(1-2):31-41.

Thorner, R.M., Romoin, Q.R. (1981) Principles and Procedures in the Evaluation of Screening

# Artículos

for Disease. Public Health Monograph. 67. U.S.A.

Tommy-Linné, Berg, M., Bergvall, A.C., Hjetner, B., Moreno-L. (1992) The molecular biology of the porcine paramyxovirus LPMV. *Veterinary Microbiology*, 33 pp 263-273.

Taylor, R.N. (1986) Quality Control in Immunoserology In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*; Rose, N.R., Friedman, H. and Fahey, J. L. (eds). Am. Soc. for Microbiol. Washington, D. C., 951.

USDA, United States Department of Agriculture.  
[https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/ivestock\\_poultry.pdf](https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/ivestock_poultry.pdf)

Wardley, R. C. and Crowther, J. R. (1981) *The ELISA in Veterinary Research and Diagnosis*, Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands.

Wiman AC, Hjertner B, Linne T, Herron B, Allan G, McNeilly F, Adair B, Moreno-Lopez J, Berg M. (1998) Porcine rubulavirus LPMV RNA persists in the central nervous system of pigs after recovery from acute infection. *J Neurovirol.* 5:545-52.

Wright, P.F., Nilsson, E. Van Rooij, E.M.A., Lelenta, M., Jeggo, M.H. (1993) Standardisation and validation of ELISA for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12 (2), 435-450.