

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

---

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**INFORME DE SERVICIO SOCIAL  
(POR INVESTIGACIÓN)**

**Desarrollo y estandarización de la prueba de ELISA  
con la proteína recombinante NP (nucleoproteína)  
para diagnóstico de la enfermedad de Ojo Azul  
(*Orthorubulavirus porcino*)**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

**Nadia Berenice Miranda Solis  
(matrícula 2173062203)**

ASESORES



**EXTERNA**

**Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero**  
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias



**INTERNA**

**Dra. María Teresa Núñez Cardona**  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

**México, Ciudad de México. Fecha: 27 de febrero de 2023**

## Resumen

La Enfermedad del ojo azul (EOA) es difícil de diagnosticar debido a la variedad de signos que se presentan. En México los procedimientos de diagnóstico están limitados a la presencia de anticuerpos y al aislamiento del virus en cultivo celular. Debido a que el *Orthorubulavirus porcino* ocasiona mortalidades de casi el 100 % y causa pérdidas económicas, es importante desarrollar métodos de diagnóstico precisos y rápidos que permitan su detección, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un método inmunoenzimático de ELISA-indirecto utilizando un antígeno recombinante (NP) para su aplicación en el diagnóstico de la EOA. Para determinar las condiciones óptimas de antígenado, se tomaron en cuenta dos concentraciones del antígeno: 75 ng y 100 ng. Se colocaron diluciones del conjugado a partir de 1:5 000, 1:7 500, 1:10 000, 1:12 000, 1:15 000 y 1:20 000. Para determinar el tiempo de lectura del ensayo se elaboró una curva de cinética de reacción del sustrato a partir de lecturas de la densidad óptica durante 10 min. Se utilizaron sueros de referencia como control positivo y negativo, sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas y de cerdos sanos SPF, a partir de estos sueros se logró determinar el punto de corte el cual fue de 25 %PP y se observó la presencia de anticuerpos del día 0, 2, 4, 8, 10, 18 y 28 post-inoculación. Se obtuvo una especificidad y sensibilidad del 100 %. Los resultados mostraron la eficiencia del antígeno recombinante NP para el diagnóstico de la EOA.

**Palabras clave:** *Orthorubulavirus porcino*, Enfermedad del ojo azul, Nucleoproteína, anticuerpos.

# Índice

<b>Introducción</b> .....	4
<b>Revisión de Literatura</b> .....	5
Antecedentes.....	5
Ciclo del virus.....	8
Signos clínicos por la presencia de <i>O. porcino</i> .....	9
Transmisión .....	10
Respuesta inmune .....	11
Diagnóstico y Control .....	11
<b>Objetivo General</b> .....	12
Objetivos particulares.....	12
<b>Metodología</b> .....	13
Sueros de Referencia.....	13
Obtención del antígeno recombinante.....	13
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas .....	14
Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA-I .....	14
Aplicación de la técnica de ELISA-I .....	15
Validación del ELISA-I: Sensibilidad, especificidad y punto de corte .....	16
<b>Resultados</b> .....	17
Obtención del antígeno.....	17
Aplicación de la técnica de ELISA-I .....	19
Validación del ELISA-I: Sensibilidad, especificidad y punto de corte .....	21
<b>Discusión</b> .....	22
<b>Conclusiones</b> .....	24
<b>Referencias</b> .....	24
<b>Anexo</b> .....	29
Condiciones del ELISA-I .....	29
Preparación de reactivos para ELISA-I.....	29

## Introducción

La Enfermedad del Ojo Azul (EOA) se considera endémica de México (Martínez *et al.*, 2016), es ocasionada por el agente etiológico *Orthorubulavirus porcino*, anteriormente conocido como *Rubulavirus porcino*, pertenece a la familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxovirinae y Género *Orthorubulavirus* (Rima *et al.*, 2019). Los primeros brotes de la enfermedad se identificaron en 1980, en la región denominada La Piedad, Michoacán, en donde se detectaron cerdos de 4 y 10 días de edad con encefalitis, con morbilidad del 20 % y mortalidad del 90 % (Martínez *et al.*, 2016).

*O. porcino* afecta a cerdos, provocando trastornos nerviosos, respiratorios y reproductivos los que ocasiona una alta tasa de mortalidad. Los signos de la enfermedad dependen de la etapa del ciclo de vida de los cerdos, pueden presentar encefalitis, neumonía, opacidad corneal uni o bilateral, fiebre, temblores musculares, conjuntivitis, ataxia, anorexia, tos, abortos, presencia de mortinatos, reducción de fertilidad, orquitis, epididimitis, atrofia testicular, decremento en motilidad y viabilidad de espermatozoides. La opacidad corneal es uno de los signos más característicos de la EOA y se ha presentado en, aproximadamente, el 10 % de lechones (Hernández *et al.*, 2004; IICAB, 2006; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; SHIC, 2021).

Los *Orthorubulavirus* son partículas de forma esférica, contienen genoma viral monocatenario y proteínas asociadas, además de una envoltura externa de lipoproteínas la cual contiene espículas virales; su genoma está constituido por una molécula de ácido ribonucleico lineal (ARN) (Hernández *et al.*, 2004; Hjertner, 1997) y conformado por seis proteínas: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína de gran peso molecular (L), proteína de matriz (M), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y proteína de fusión (F) (Hjertner, 1997).

La nucleoproteína es la proteína viral más abundante, forma parte de la nucleocápside y está asociada con el ARN genómico ya que rodea su contorno helicoidal, se encarga de darle protección y estabilidad para una conformación adecuada de la cadena de ARN genómico en su transcripción y replicación; además tiene una afinidad alta, por lo que el genoma de los virus de ARN negativo nunca se encuentra desnudo (Hjertner, 1997; Santos-López *et al.*, 2004).

Se han realizado numerosas investigaciones enfocadas al estudio de *O. porcino*, algunas abarcan, de manera general, la EOA dentro de ellas están las publicadas por Borraz-Argüello *et al.* (2008), Vásquez (2013) y Martínez *et al.* (2016). Por otra parte, otras investigaciones, han descrito las estructuras de sus proteínas como las realizadas por Santos-López *et al.* (2004) y Sundqvist *et al.* (1990). La caracterización molecular de *O. porcino* fue presentada por Berg *et al.* (1992) y Sánchez-Betancourt *et al.* (2007); mientras que Reyes-Leyva *et al.*

(2004) detectaron la viremia y realizaron un ensayo inmunoenzimático ELISA para la detección de anticuerpos; también, Lara-Romero *et al.* (2022) caracterizaron la proteína NP y determinaron que presenta propiedades antigénicas.

Existen diversas pruebas serológicas que son empleadas para el diagnóstico de múltiples enfermedades, como las pruebas de inhibición de la hemaglutinación, inmunofluorescencia indirecta, neutralización de virus y el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas, sin embargo, el diagnóstico de la EOA es complicado, debido a la variedad de signos que la caracterizan. Una de las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de esta enfermedad es la inhibición de la hemaglutinación (Nordengrahn *et al.*, 2002), sin embargo, en México el diagnóstico es limitado debido a la escasa aplicación de técnicas que faciliten su detección.

El *O. porcino* afecta principalmente a cerdos lactantes ocasionando mortalidades de casi el 100 % lo que se ve reflejado, principalmente, en pérdidas económicas (Martínez *et al.*, 2016), por ello es importante desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y precisos que permitan su detección y de esta manera disminuir la diseminación del virus, por lo que, el objetivo del presente trabajo de investigación fue Desarrollar y estandarizar un método inmunoenzimático de ELISA-indirecto utilizando la proteína recombinante NP para su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de ojo azul (EOA).

## **Revisión de Literatura**

### **Antecedentes**

A inicios de 1980 se identificó la Enfermedad del Ojo Azul (EOA) causada por el *Orthorubulavirus porcino*, también llamado virus La Piedad Michoacán (LPMV) debido a que se registró por primera vez en esta región, se observó la presencia encefalitis en cerdos de 4 y 10 días de edad, con morbilidad del 20 % y mortalidad del 90 % (Martínez *et al.*, 2016).

La EOA se caracteriza por provocar trastornos en el sistema nervioso y opacidad corneal (OC); se ha detectado de 1 a 4 % de OC en cerdos de tres semanas de edad, en cerdas gestantes en las que afecta su reproducción; durante la década de los 80, algunos investigadores reportaron el surgimiento del Síndrome del Ojo Azul por la presencia de opacidad corneal, hepatitis, morbilidad y mortalidad en cerdos de edades diferentes (Moreno-López *et al.*, 1986).

A partir de que se identificó la EOA en Michoacán, en 1980, se diseminó en granjas de 16 estados del centro y noroeste de la República Mexicana. En 1982 se extendió a Guanajuato, Jalisco y Estado de México; para 1983 se observaron nuevos brotes en Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Distrito Federal (actualmente Ciudad de México), Tlaxcala, Querétaro y Tabasco, y en 1984 se reportaron casos en Tamaulipas por lo que se determinó que se habían

presentado un total de 500 brotes en México (figura 1) (Martínez *et al.*, 2016; Santos-López *et al.*, 2004).



Figura 1. Distribución de la EOA. El círculo indica la zona del bajío, considerada endémica de esta enfermedad.

### Agente etiológico

El virus que provoca la EOA pertenece al Orden Mononegavirales, Familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxovirinae, Género *Orthorubulavirus*, Especie *Orthorubulavirus porcino* (Rima *et al.*, 2019), presenta viriones pleomórficos esféricos que están formados por una nucleocápside helicoidal, protegida por una envoltura lipoproteica (Santos-López *et al.*, 2004).

A partir de las manifestaciones clínicas que se presenten y la edad de los cerdos, se definen tres grupos virales, uno se caracteriza porque los lechones presentan alteraciones nerviosas. En el segundo grupo hay una alta mortalidad y daño neurológico en lechones, además de los problemas reproductivos que presentan los verracos. En el tercer grupo se diferencian afectaciones reproductivas en adultos y neurológicas en lechones (Martínez *et al.*, 2016).

Los *Orthorubulavirus* son partículas envueltas de forma esférica, contienen genoma viral monocatenario y proteínas asociadas, además de una envoltura externa de lipoproteínas la cual contiene espículas virales. Su genoma está constituido por una molécula de ácido ribonucleico lineal (ARN) el cual tiene polaridad negativa, a partir de esta molécula se sintetiza una cadena de ARN de sentido positivo la cual funciona como molde para la replicación (figura 2) (Hernández *et al.*, 2004; Hjertner, 1997).



Figura 2. Microscopía electrónica del *Ortorubulavirus porcino* (Martínez *et al.*, 2016).

El *O. porcino* está constituido por seis proteínas: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína de gran peso molecular (L), proteína de matriz (M), hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y proteína de fusión (F). La organización del genoma es la siguiente 3' NP-P-M-FHN-L 5' y cada gen codifica una proteína exceptuando el gen F el cual codifica el polipéptido F<sub>0</sub> que es dividido por una proteasa celular en las proteínas F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, y el gen P que codifica proteínas P, I, V y C (Berg *et al.*, 1992; Hjertner, 1997) (figura 3).

La proteína viral más abundante en *O. porcino* es la nucleoproteína (NP) la cual forma parte de la nucleocápside y está asociada al ARN genómico ya que rodea su contorno helicoidal, se encarga de darle protección y estabilidad para una conformación adecuada de la cadena de ARN genómico en su transcripción y replicación; además tiene una afinidad alta por lo que el genoma de los virus de ARN negativo nunca se encuentra desnudo (Hjertner, 1997; Santos-López *et al.*, 2004).

La proteína M interactúa con la envoltura y con la nucleocápside formando un puente, por lo que es importante para el mantenimiento de la estructura del virión. Interviene en el ensamble de la partícula viral interactuando con las nucleocápsides en las zonas de la membrana celular donde se expresan las glicoproteínas virales, debido a que cuenta con carga neta positiva lo que le permite tener afinidad por la NP (Santos-López *et al.*, 2004).

La proteína HN cuenta con actividad hemaglutinante la cual le permite reconocer al receptor en la membrana de la célula hospedera; por otra parte, su actividad neuraminidasa le permite hidrolizar residuos de ácido siálico de los receptores celulares para evitar la autoagregación. Además, coopera con la proteína F para la fusión de las membranas celular y viral, este paso es importante para el ingreso del genoma viral en la célula (Borraz-Argüello *et al.*, 2008).

La proteína L es el componente catalítico del ARN polimerasa y es considerada como la menos abundante. La fosfoproteína (P) presenta un alto nivel de fosforilación y forma el complejo polimerasa con la proteína L. Tanto la proteína L como la P, están asociadas a la nucleocápside. Por otro lado, la proteína F es una glicoproteína transmembranal que permite al virus introducirse en el citoplasma y difundirse a todas las células sin exponerse al medio

celular, esto debido a que cuenta con un dominio hidrofóbico que participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral (Galván-Morales *et al.*, 2013; Santos-López *et al.*, 2004).

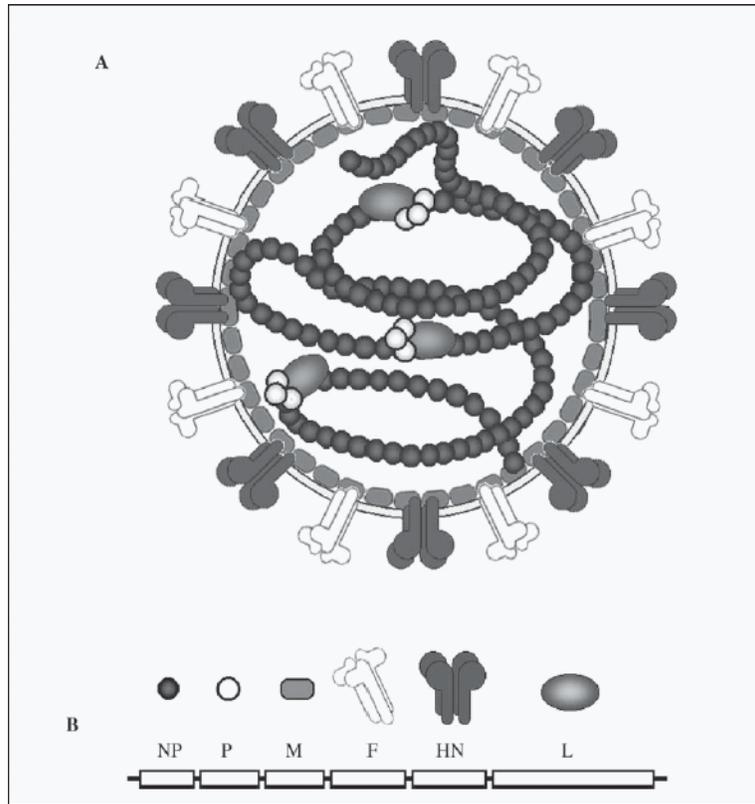


Figura 3. Estructura del *Orthorubulavirus porcino* y sus proteínas constituyentes (Santos-López *et al.*, 2004).

En la superficie de la membrana viral se encuentran las glicoproteínas transmembranales HN y F, en la parte interna de la misma se halla la proteína de M. Íntimamente ligada a la cadena de ARN, se encuentran las nucleoproteínas (NP) que conforman la nucleocápside helicoidal y las proteínas P y L que forman el complejo con actividad polimerasa del virus (Santos-López *et al.*, 2004).

### Ciclo del virus

En el ciclo del *O. porcino* se observan diferentes fases señaladas como: reconocimiento, adsorción, fusión de membranas, penetración a la célula, desnudamiento, transcripción, replicación del genoma, ensamble y liberación de viriones. Este ciclo inicia con el reconocimiento del receptor celular que ocurre gracias a la proteína HN, en seguida se da un cambio conformacional en una proteína que activa a la proteína F, llevando a cabo la fusión de las membranas celular y viral, a través de la exposición de su dominio hidrofóbico, lo que

ocasiona que en el citoplasma se libere el ARN viral. A partir de la liberación del genoma se presenta la síntesis de ARN antigenómico que origina genomas nuevos, y se inicia la producción de ARN mensajero que codifica para las proteínas virales. En la parte interna de la membrana celular se acumula la proteína M y en el genoma sintetizado se acoplan las proteínas NP, P y L; en el retículo endoplasmático de las células se sintetizan las proteínas HN y F las cuales son expresadas en la membrana citoplasmática. La afinidad que tienen las proteínas del genoma con la proteína M y esta con las proteínas HN y F, promueven la formación de la partícula viral, la cual se libera por exocitosis. La infección por el virus se propaga a otras células gracias a la presencia de las proteínas HN y F, en la membrana celular (Cerriteño, 2016; Sánchez *et al.*, 2020; Santos-López *et al.*, 2004) (figura 4).

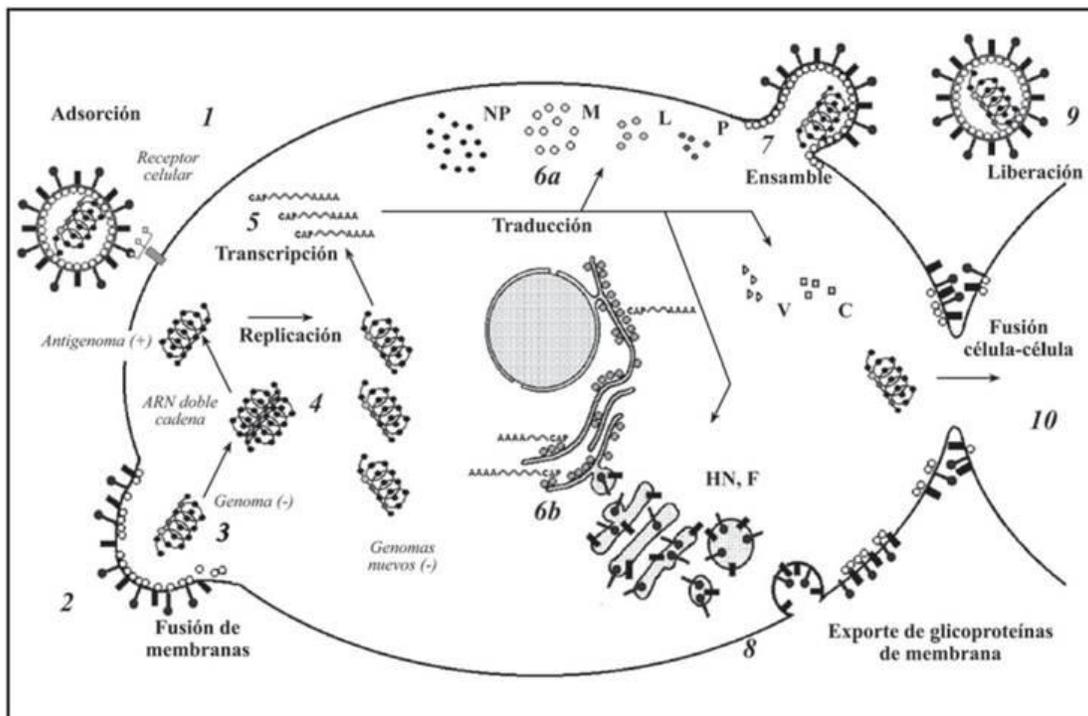


Figura 4. Ciclo viral de los *Orthorubulavirus* (Santos-López *et al.*, 2004).

### Signos clínicos por la presencia de *O. porcino*

Los signos clínicos debidos a la presencia de *Orthorubulavirus* dependen de la etapa del ciclo de vida de los cerdos, por ejemplo, los lactantes (2 a 21 días de vida) presentan encefalitis, neumonía y opacidad corneal (OC). Al inicio de la infección los lechones muestran fiebre, temblores musculares, postura anormal y se encuentran hiperexcitables. Se ha observado que alrededor del 10 % desarrolla opacidad corneal uni o bilateral (figura 5); en ocasiones pueden morir dentro de las 48 horas de la aparición de signos clínicos o dentro de 4-6 días. En el caso de cerdos destetados (más de 30 días de vida) muestran anorexia, fiebre, tos, opacidad

corneal uni o bilateral, conjuntivitis, ataxia y marcha en círculos (IICAB, 2006; Rosales y Correa, 1989).

Por otra parte, los cerdos adultos presentan fallas reproductivas, en las hembras hay mortinatos, fetos momificados, abortos, reducción en tasa de partos y fertilidad; el porcentaje de partos que usualmente es de 90 % puede descender al 69 %, en el momento del brote vírico; en verracos, se desarrolla orquitis y epididimitis, seguidas de atrofia testicular, decremento en motilidad y viabilidad de sus espermatozoides, además de mortalidad. Tanto hembras como verracos pueden desarrollar anorexia (IICAB, 2006; Rosales y Correa, 1989; Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997; SHIC, 2021).



Figura 5. Cerdo con presencia de opacidad corneal.

## Transmisión

El *O. porcino* se transmite por vías respiratorias a través de la nasofaringe, se replica en el epitelio respiratorio, glándulas salivales y en los ganglios linfáticos del cuello, permitiendo que la viremia tenga una distribución sistemática (Santos-López *et al.*, 2004). La infección se puede extender hacia los pulmones, linfonodos, linfa y sangre; además, el virus puede ser inoculado a través de la ruta traqueal o causar infección congénita atravesando la barrera placentaria, en lechones el virus puede llegar al tejido nervioso ya que son ricos en ácido siálico el cual es el receptor específico de la proteína HN del virus (Martínez *et al.*, 2016).

Al inicio de la infección el virus se multiplica en la mucosa nasofaríngea y el tejido linfático asociado, para posteriormente propagarse por vía aérea a pulmones y por la sanguínea a todo el organismo. En cuanto al ingreso en el sistema nervioso central, ocurre a través de las terminaciones del nervio olfatorio, se dirige al hipocampo, tallo cerebral y cerebelo para su replicación; la transmisión del virus, de cerdas a lechones, ocurre en el útero (Castro, 2020; Hernández-Jáuregui *et al.*, 2004).

Por otra parte, el contagio puede ocurrir cuando se introducen animales infectados en una granja con cerdos sanos o cuando el personal no lleva a cabo las medidas adecuadas de sanidad se corren riesgos de transmisión por contagio (ISUST, 2019; Olvera, 2016).

## Respuesta inmune

La producción de interferón- $\alpha$  por las células infectadas, da inicio a la respuesta inmune contra el virus, ya que aumenta el potencial lítico de las células natural killers (NK) y la expresión del Complejo de Histocompatibilidad Tipo I (MCH-I), favoreciendo la acción de los linfocitos T citotóxicos CD8, los cuales son importantes en la eliminación de las infecciones virales. La actividad citotóxica de las células NK, linfocitos CD8 y CD4, en las células infectadas, promueve la liberación de antígenos virales endógenos, los cuales pueden ser fagocitados, procesados y presentados como antígenos exógenos por el MCH-II. Este proceso induce la proliferación de linfocitos cooperadores CD4+, quienes responden con la producción de citosinas como la IL-2 e interferón-  $\gamma$  por parte de los linfocitos Th1 o IL-4 e IL-10 a partir de los linfocitos Th2 (Abbas, 2004). En las infecciones víricas, la inmunidad adaptativa va a depender de los anticuerpos que bloquean la unión del virus a la célula hospedera, así como su entrada a esta (Olvera, 2016).

## Diagnóstico y Control

Debido a la variedad de signos que se presentan durante la infección del virus es difícil diagnosticar la EOA. Existen diversas pruebas serológicas para detectar esta enfermedad, la inhibición de la hemaglutinación es una de las más utilizadas, se cuenta, además, con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (Lara-Romero, 2013).

Las medidas de bioseguridad juegan un papel importante en la prevención de la EOA, la eficacia de estos procedimientos es monitoreada por pruebas serológicas, las vacunas son consideradas como otra alternativa para prevenir la infección por este virus por ello, se realizan estudios dirigidos al desarrollo de vacunas nuevas en donde se evalúa la antigenicidad, la respuesta serológica en lechones y su respuesta inmune, procedentes de madres inmunizadas con un antígeno recombinante (Correa *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2001; Cuevas-Romero *et al.*, 2011).

La producción de proteínas recombinantes ha tenido un gran impacto en la biotecnología, se producen en varios sistemas biológicos, como bacterias, levaduras y células eucariontes. Presentan características estructurales y funcionales similares a las proteínas naturales y regularmente se producen eficientemente; son ampliamente utilizadas en la investigación, en la industria alimentaria y farmacéutica, siendo esta la más beneficiada (Guevara-Hernández *et al.*, 2013).

Las vacunas recombinantes son importantes para el control y prevención de ciertas enfermedades, se producen a partir del aislamiento y de la transferencia de secuencias específicas de ADN de un organismo a otro, con la finalidad de generar inmunógenos que imiten la infección natural. Las vacunas recombinantes cuentan con ventajas como son: la eliminación de los genes responsables de la virulencia ya que solo contienen los genes que estimulan la inmunidad y su producción es de bajo costo, sin embargo, una desventaja es que pueden presentar baja inmunogenicidad, por ello se han buscado alternativas como es la adición de proteínas acarreadoras y/o adyuvantes (Alvarado *et al.*, 2006).

Los adyuvantes se pueden clasificar como particulados (sales de aluminio o calcio, emulsiones aceite-agua, liposomas, proteosomas, virosomas) y no particulados (Muramil dipéptido, copolímeros, saponinas, citocinas, polímeros de carbohidrato) y puede decirse que son de los más estudiados. Se ha demostrado que las vacunas que contienen adyuvantes inmunoestimuladores inducen una fuerte respuesta inmune humoral o celular específica de antígeno y se suelen utilizar combinados. Uno de los adyuvantes no particulados más utilizado en la medicina veterinaria son las saponinas, las cuales generan una estimulación alta de los linfocitos Th1 y Th2, y respuesta moderada de los linfocitos T citotóxicos. El ácido glicirricínico es utilizado como una saponina debido a que cuenta con propiedades antiinflamatorias y antivirales (Alvarado *et al.*, 2006; Pompei *et al.*, 1979; Sun *et al.*, 2009).

## **Objetivo General**

Desarrollar y estandarizar un método inmunoenzimático de ELISA-indirecto utilizando la proteína recombinante NP para su aplicación en el diagnóstico de la Enfermedad de Ojo Azul.

### **Objetivos particulares**

- Estandarización del ensayo ELISA-Indirecto mediante la detección de IgG como indicador de infección en sueros de referencia positivo (control positivo fuerte C++ y control positivo débil C+) y negativo de porcinos (control negativo C-).
- Validación del ELISA-indirecto con la utilización de sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas con la vacuna recombinante NP de la EOA y cerdos sanos SPF (libres de patógenos específicos), para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

## Metodología

Todos los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Epizootiología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI, INIFAP).

### Sueros de Referencia

Para la estandarización de la prueba se realizaron siete repeticiones de los sueros de referencia, se utilizó un suero hiperinmune control positivo de un pool de cerdos infectados experimentalmente con el virus de la EOA (C++, C+) y el suero control negativo procedente de un pool de sueros de cerdos SPF libres del virus de la EOA (C-). Para determinar el punto de corte se utilizaron 181 sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas, todos los sueros fueron proporcionados por el Laboratorio de Epizootiología.

### Obtención del antígeno recombinante

El lote de proteína, utilizado como antígeno recombinante (rNP), fue proporcionado por el equipo del Laboratorio de Epizootiología. Se resuspendieron cinco tubos de proteína liofilizada en 1,0 ml de agua destilada para su cuantificación por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar; se elaboró una curva patrón realizando diluciones (tabla 1). El reactivo de Bradford se colocó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 min. En celdillas se añadieron 150  $\mu$ l de reactivo Bradford y 150  $\mu$ l de muestra de cada tubo. Para la cuantificación de la proteína se realizó una dilución 1:4 (50  $\mu$ l de proteína y 150  $\mu$ l de agua destilada), en una celdilla se agregaron 150  $\mu$ l de reactivo Bradford y 150  $\mu$ l de la dilución realizada con la proteína. Se esperó durante 5 min para posteriormente realizar las lecturas en el espectrofotómetro, programándolo para Bradford (595 nm) (cada muestra se realizó por duplicado). Los resultados obtenidos se graficaron, se elaboró una regresión lineal y se interpoló la absorbancia de la muestra para determinar la concentración de la proteína.

Tabla 1. Curva patrón para la técnica de cuantificación por colorimetría Bradford

<b>Tubo</b>	<b>Estándar (BSA)</b>	<b>Agua destilada</b>
1	40 $\mu$ l	760 $\mu$ l
2	20 $\mu$ l	780 $\mu$ l
3	10 $\mu$ l	990 $\mu$ l
4	500 $\mu$ l del tubo 3	500 $\mu$ l
5	500 $\mu$ l del tubo 0	500 $\mu$ l
Blanco	0 $\mu$ l	150 $\mu$ l

Para corroborar la presencia de la proteína se realizaron dos geles en SDS-PAGE, se cargaron con 20 µl de la proteína NP por pozo (3 960 ng). Con uno de los geles se realizó una tinción de coomassie y con el otro se hizo una transferencia semiseca en membrana de celulosa (Western Blot) a 24 volts por 55 min la membrana fue bloqueada con 20 ml de solución de bloqueo (leche al 5% y PBS-Tween 20 al 0.1%) durante una hora a 60 rpm. Posteriormente se colocó el primer anticuerpo “anti-his” durante dos horas a 60 rpm. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 cada uno de 15 min. seguido de esto se añadió el segundo anticuerpo “anti-ratón” durante dos horas a 60 rpm, nuevamente se realizaron tres lavados y se procedió a revelar la membrana, para ello, se colocaron 0.0125 g de DAB (Diaminobencidina) en 20 ml de PBS y 100 µl de peróxido de hidrógeno, después de que la membrana fue revelada, se colocó en agua destilada y se secó en papel.

## Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una técnica sensible basada en un anticuerpo marcado con una enzima que es capaz de detectar y cuantificar proteínas inmovilizadas en una superficie sólida. Se puede clasificar como ELISA directo, indirecto, sándwich y competitivo. En el ELISA indirecto (ELISA-I) el anticuerpo específico del antígeno primario es reconocido por un anticuerpo conjugado secundario. El revelado de la reacción se realiza utilizando conjugados de anticuerpos marcados con peroxidasa. Este tipo de ELISA es útil para la detección de anticuerpos, el mapeo de epítomos y la cuantificación de proteínas (Lara-Romero, 2013; Lin, 2015).

## Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA-I

La estandarización del ELISA-I se realizó considerando parámetros como la concentración del antígeno, dilución del conjugado, sueros de referencia positivos y negativos, cinética de la reacción del sustrato, periodo de incubación, temperatura, tiempo óptimo de lectura e interpretación de resultados. Para determinar las condiciones óptimas de antígenado, se consideraron dos concentraciones de antígeno 75 ng y 100 ng. Se colocaron diluciones del conjugado a partir de 1:5 000, 1:7 500, 1:10 000, 1:12 000, 1:15 000 y 1:20 000. Los sueros de referencia se trabajaron en una dilución 1:500 para el positivo fuerte (C++), 1:1000 para el positivo débil (C+) y 1:200 para el negativo (C-). Para determinar el tiempo de lectura del ensayo se elaboró una curva de cinética de reacción del sustrato TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) a partir de lecturas de la densidad óptica (OD) en un espectrofotómetro para microplacas (BDSL Inmunoskan PLUS) con filtro de interferencia de 650 nm.

## Aplicación de la técnica de ELISA-I

A partir de que establecieron las condiciones óptimas para la prueba de ELISA fue posible su aplicación en sueros de referencia, sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas y sueros de cerdos sanos SPF para la detección de anti-IgG contra la proteína recombinante NP del *O. porcino* (figura 6).

- Las placas se antigenaron con 75 ng y se incubaron a 4°C durante toda la noche.
- Al día siguiente se eliminó el antígeno, posteriormente se adicionaron 100 µl de la solución de bloqueo y se incubaron a 37 °C durante una hora
- Pasado el tiempo se realizaron tres lavados con 200 µl PBS-Tween 20 al 0.01%. Se agregaron 100 µl por pozo de los sueros positivo fuerte (++), débil (+), negativo (-) y un blanco (B); y se incubaron a 37 °C por una hora. Los sueros de lechones provenientes de madres inmunizadas y de cerdos sanos SPF se trabajaron en una dilución 1:200.
- Cuando terminó el período de incubación se realizaron tres lavados de la misma manera que en el paso anterior y se colocaron 100 µl del conjugado.
- Finalmente, se lavaron nuevamente las placas e inmediatamente se depositaron 75 µl de la solución de cromógeno TMB, las placas se incubaron 5 min a temperatura ambiente cubriéndolas de la luz. La reacción se detuvo con 75 µl de ácido sulfúrico 2 M, los sueros positivos pasaron de una coloración azul a color amarillo y para cada placa se tomó la lectura con filtro de interferencia de 450 nm en el espectrofotómetro.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(++)	(++)	(1)	(1)	(2)	(2)	(3)	(3)	(4)	(4)	(5)	(5)
B	(++)	(++)	(6)	(6)	(7)	(7)	(8)	(8)	(9)	(9)	(10)	(10)
C	(+)	(+)	(11)	(11)	(12)	(12)	(13)	(13)	(14)	(14)	(15)	(15)
D	(+)	(+)	(16)	(16)	(17)	(17)	(18)	(18)	(19)	(19)	(20)	(20)
E	(-)	(-)	(21)	(21)	(22)	(22)	(23)	(23)	(24)	(24)	(25)	(25)
F	(-)	(-)	(26)	(26)	(27)	(27)	(28)	(28)	(29)	(29)	(30)	(30)
G	(B)	(B)	(31)	(31)	(32)	(32)	(33)	(33)	(34)	(34)	(35)	(35)
H	(B)	(B)	(36)	(36)	(37)	(37)	(38)	(38)	(39)	(39)	(40)	(40)

Figura 6. Distribución de sueros de referencia, sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas y sueros de cerdos sanos SPF en las placas. Control positivo fuerte (C++), Control positivo débil (C+), Negativo (C-) y Blanco (B).

## Validación del ELISA-I: Sensibilidad, especificidad y punto de corte

Para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba se realizó una tabla de contingencia de 2x2 (Frankena y Goelema, 1991) (tabla 2) utilizando los sueros de referencia positivo (C++, C+) y negativo (C-) de porcinos.

Tabla 2. Tabla de contingencia 2x2. A = Número de verdaderos positivos, B = Número de falsos positivos, C = Número de falsos negativos y D = Número de verdaderos negativos.

ELISA	Animales enfermos experimentalmente infectados		
	SI	NO	TOTAL
+	A	B	A+B
-	C	D	C+D
TOTAL	A+C	B+D	

Sensibilidad (%) =  $100 * A / (A+C)$  Especificidad:  $100 * D / (B+D)$

El punto de corte se considera como el nivel de anticuerpos en un suero el cual permite diferenciar entre animales identificados como positivos y negativos (Cuevas *et al.*, 2013). Para su determinación se tomaron en cuenta las densidades ópticas de los sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas y sueros de cerdos sanos SPF. Así mismo, se calculó el porcentaje de positividad (%PP) con la siguiente fórmula:

$$\%PP = \frac{OD \text{ de la muestra}}{OD \text{ C} + +} * 100$$

## Resultados

### Obtención del antígeno

En la figura 7, se observa la presencia de la proteína cuantificada en tinción de coomassie y Western Blot, se obtuvo un total de 430.79  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína. A partir de esta concentración se realizaron los cálculos correspondientes para proceder al antígenado de las placas de ELISA.

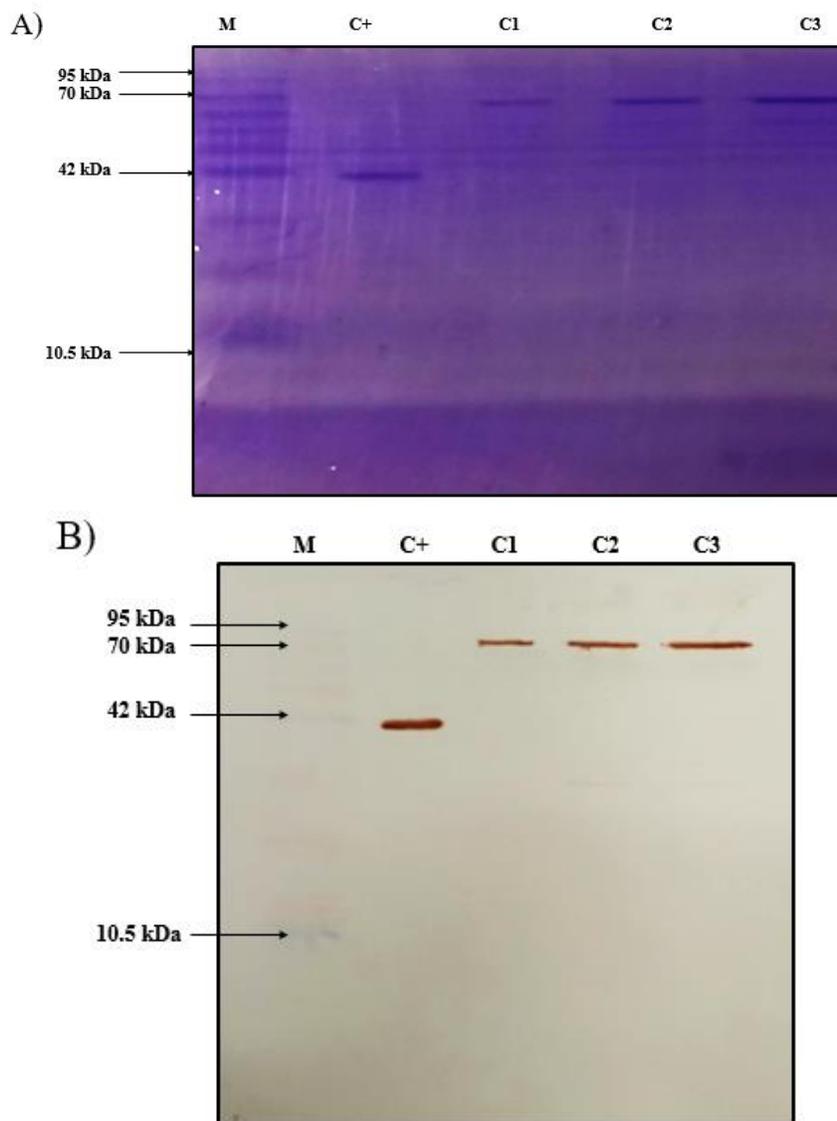


Figura 7. A) Tinción de coomassie y B) Western Blot de la proteína NP cuantificada. M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C1, C2 y C3 proteína con 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  y 15  $\mu\text{l}$  respectivamente.

## Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA-I

Mediante el uso de dos concentraciones de antígeno frente a diferentes diluciones de conjugado se estableció la cantidad necesaria de antígeno, la cual fue de 75 ng para cada placa. La concentración del conjugado anti-IgG de cerdo conjugado con peroxidasa que permitió la mayor diferencia entre los controles de suero fue la dilución 1: 15 000 (figura 8). El tiempo óptimo de incubación del substrato (TMB) fue determinado a partir de la elaboración de una curva para la cinética de reacción, realizando diferentes lecturas de la absorbancia durante un período de 10 min a intervalos de 2 min. Se observó la mayor diferencia en las unidades de densidad óptica (OD) entre los sueros control positivo y negativo a los 5 min, después iniciada la reacción (figura 9).

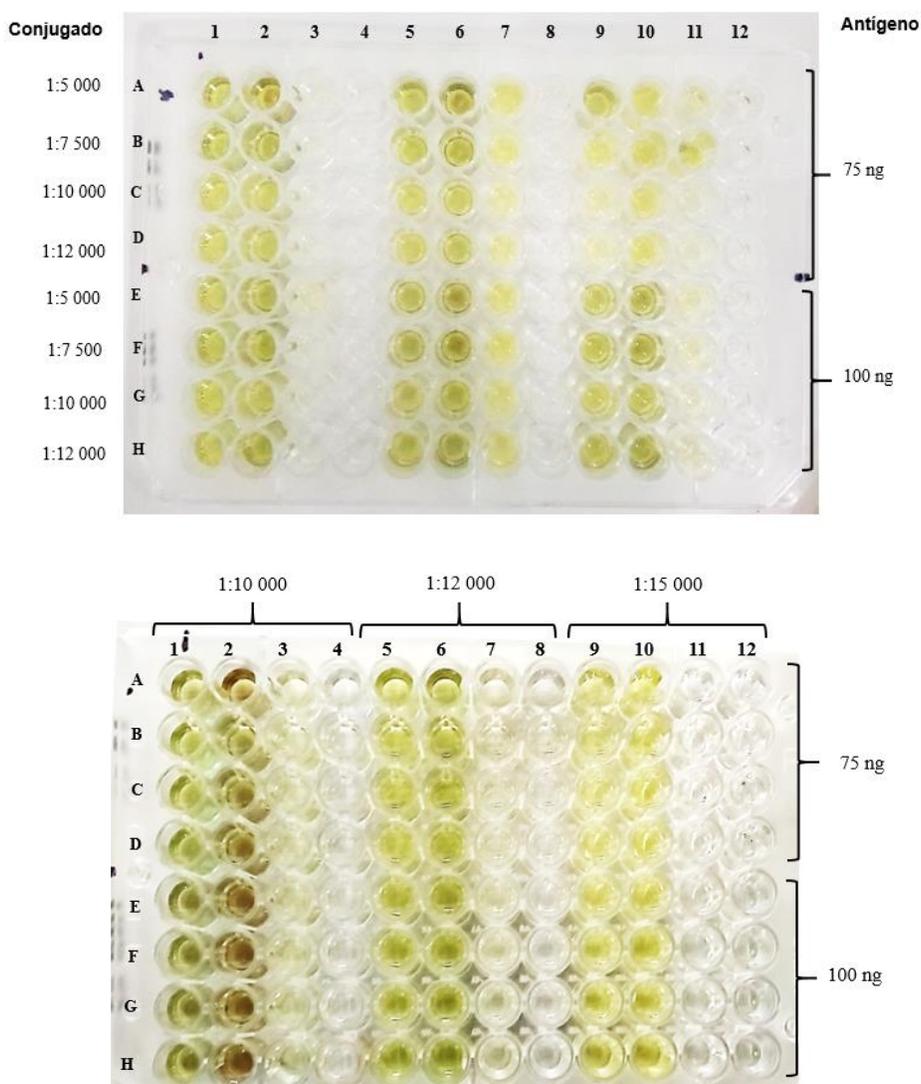


Figura 8. Resultados de la titulación de conjugado y antígeno, con la reacción detenida con  $H_2SO_4$ .

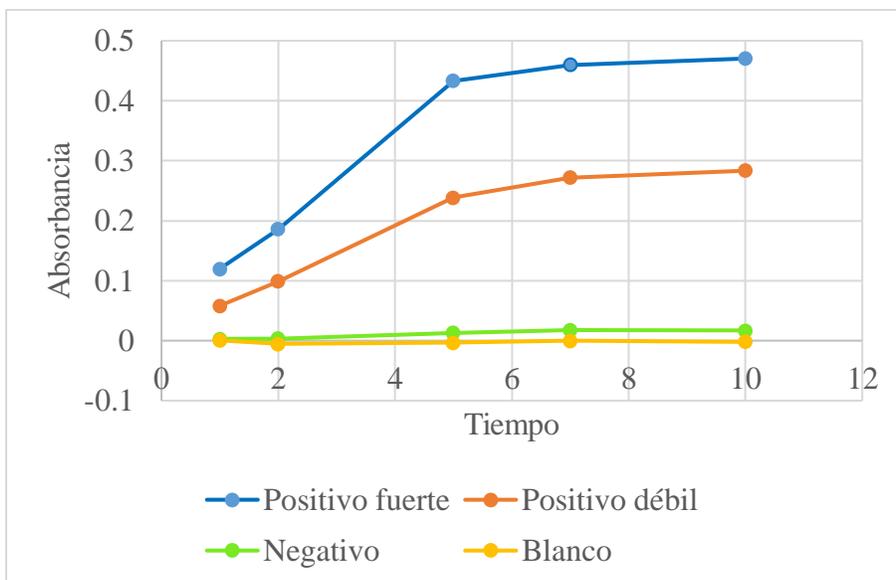


Figura 9. Cinética de reacción del sustrato (TMB)

### Aplicación de la técnica de ELISA-I

Una vez establecidas las condiciones para el desarrollo de la prueba de la ELISA-I se evaluaron 181 sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas con antígenos recombinantes y cerdos sanos SPF. Se seleccionaron sueros de los siguientes días post-inoculación (PI): 0, 2, 4, 8, 10, 18 y 28. Se obtuvo un total de 104 sueros positivos y 77 negativos. A partir de las lecturas de las densidades ópticas obtenidas se observó la presencia de anticuerpos contra el virus y el porcentaje de positividad (%PP) de las muestras (figura 10, figura 11 y figura 12).

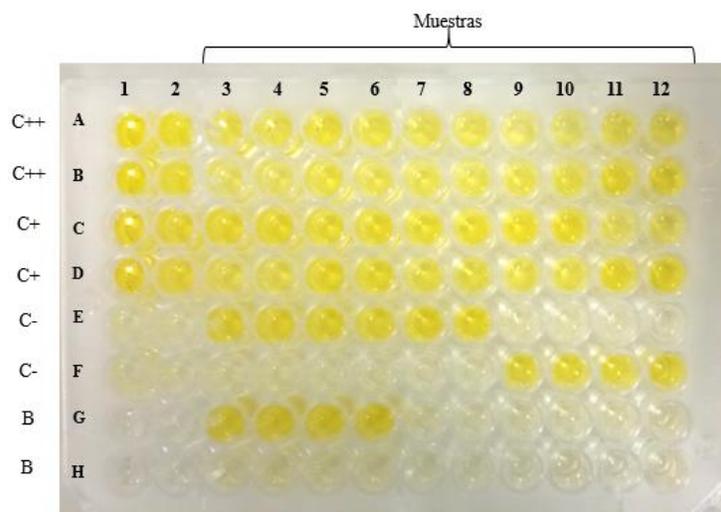


Figura 10. Placa de ELISA con muestras de sueros de referencia, de lechones procedentes de madres inmunizadas y de cerdos sanos SPF, con la reacción detenida con  $H_2SO_4$ .

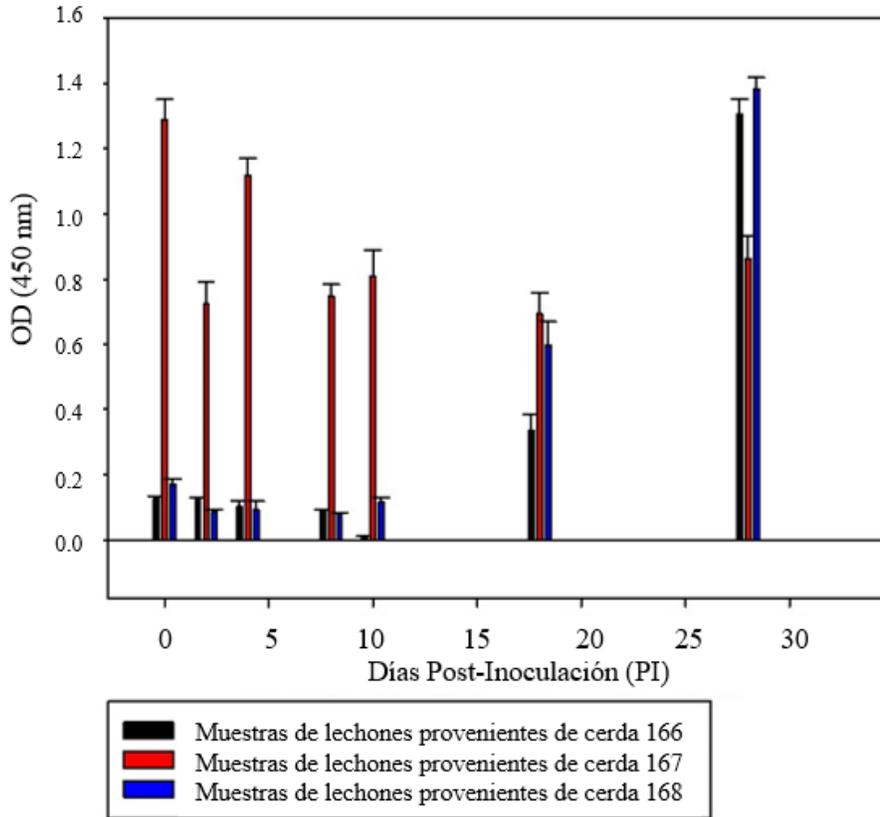


Figura 11. Presencia de anticuerpos contra EOA de cerdos inmunizados con antígenos recombinantes.

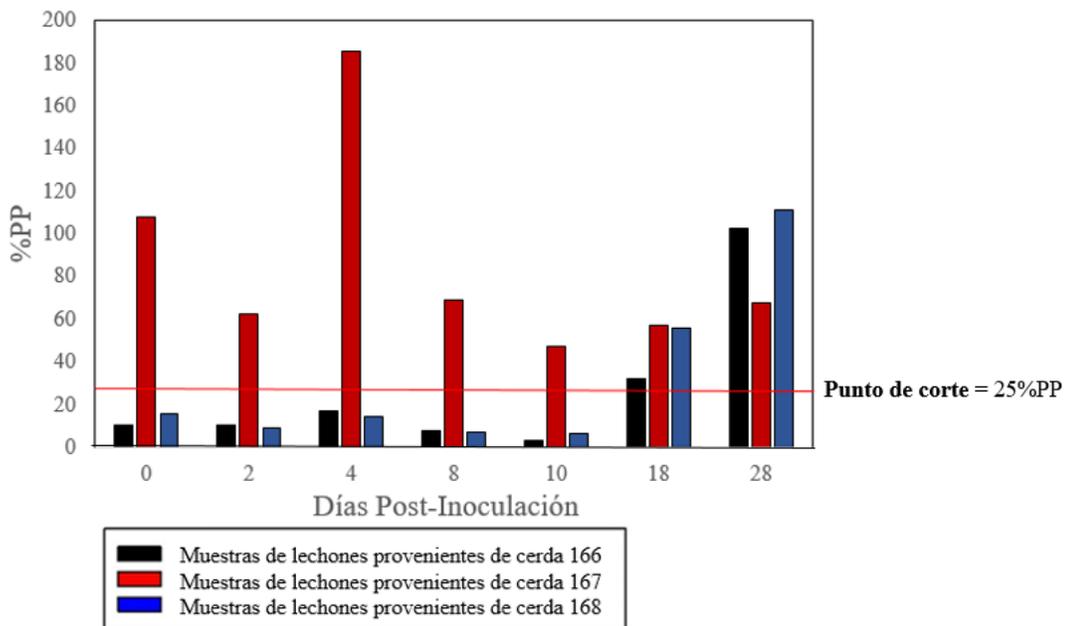


Figura 12. Porcentaje de positividad de cerdos inmunizados con antígenos recombinantes.

## Validación del ELISA-I: Sensibilidad, especificidad y punto de corte

Para la validación de la prueba se tomó en cuenta la sensibilidad y especificidad, utilizando los resultados obtenidos de las densidades ópticas de los sueros procedentes de lechones de madres inmunizadas y cerdos sanos SPF. De los 181 sueros evaluados se obtuvo un total de 104 sueros negativos y 77 positivos obteniendo una especificidad y sensibilidad del 100% (tabla 3).

Para determinar el punto de corte se realizaron siete repeticiones del ensayo utilizando los sueros de referencia (C++, C+ y C-). Los valores de las OD (450 nm) se establecieron por el promedio de los datos observados en las repeticiones del ensayo para el suero control fuerte positivo (C++) de 0.7 a 1.6, para el suero control débil positivo (C+) de 0.3 a 0.7, y para el control negativo (C-) de 0 a 0.01 (tabla 4).

Se estableció el punto de corte a partir de las OD de los sueros de referencia, sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas y sueros de cerdos sanos SPF, considerando  $\pm 2$  DS del promedio se determinó que el punto de corte sería al 25 % del porcentaje de positividad (tabla 4, tabla 5 y figura 13) y con valores de 0.2 de OD.

Tabla 3. Especificidad y sensibilidad de la prueba de ELISA-I

ELISA	Animales enfermos infectados experimentalmente		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	77	0	77
Negativos	0	104	104
Total	77	104	181

Tabla 4. Repeticiones del ensayo de ELISA-I para los sueros de referencia.

Sueros	Promedio n=7	Desviación estándar	$\pm 2$ DS	%PP
Control fuerte positivo	1.0205	0.2887	0.5774	100%
Control débil positivo	0.4890	0.1664	0.3328	47.91%
Control negativo	0.0126	0.0082	0.0164	1.23%
Blanco	0.0024	0.0024	0.0048	-

Tabla 5. Validación del ensayo de ELISA-I para los sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas y de cerdos sanos SPF.

Sueros	Promedio	Desviación estándar	$\pm 2$ DS	%PP
Positivos	0.9643 N=77	0.3955	0.7910	
Negativos	0.0982 N=104	0.0788	0.1576	25%

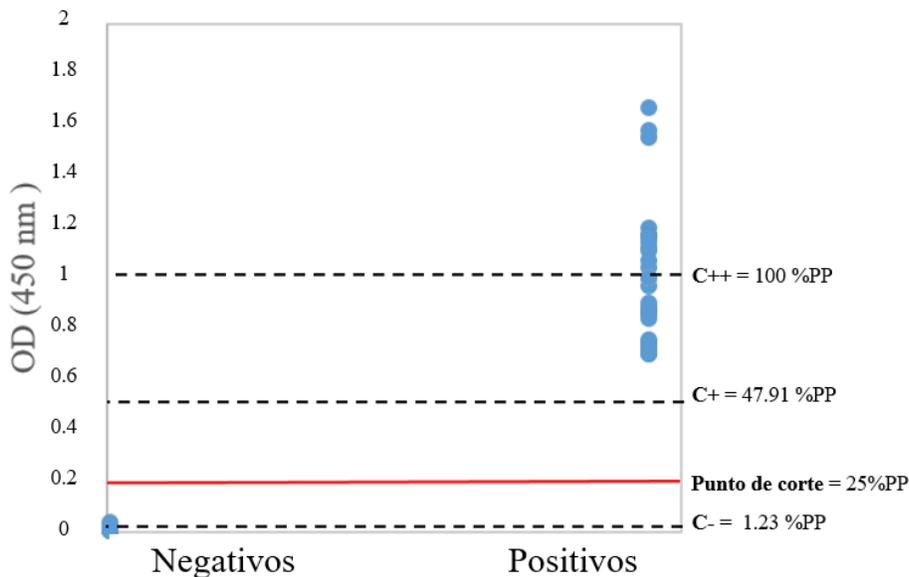


Figura 13. Dispersión de las densidades ópticas de los sueros de referencia. Se indican los porcentajes de positividad (%PP).

## Discusión

La estandarización del ELISA-I permitió establecer las condiciones óptimas de la prueba. De acuerdo con Cuevas *et al.* (2013) es importante desarrollar métodos de diagnóstico para la identificación de zonas libres e infectadas por *O. porcino*, por lo que el ELISA-I desarrollado en este trabajo se puede considerar como una alternativa para el diagnóstico serológico del virus, principalmente en el área porcícola.

La nucleoproteína es una de las proteínas más abundantes del virus, en un estudio realizado por Lara-Romero *et al.* (2022) se llevaron a cabo ensayos con ratones en donde se demostró su antigenicidad, se elaboró un ELISA indirecto en el que se observó que la proteína generaba anticuerpos específicos, la NP mostró la capacidad de inducir una respuesta inmune desde el día 7 al 28, postinmunización. Así mismo, se demostró que tiene propiedades antigénicas y es adecuada para utilizarse en la prueba de ELISA, es por ello que en este trabajo se utilizó como antígeno.

Para determinar que la dilución de conjugado y la concentración del antígeno eran correctas se tomaron en cuenta las densidades ópticas (650 nm) obtenidas cuando se colocó el sustrato y se verificó que fueran consideradas como valores de confianza, esto de acuerdo con la ley de Lamber-Beer, en donde se estipula que las absorbancias son proporcionales a los cambios de concentración, básicamente la ley explica que los valores de uno se consideran óptimos,

y valores más altos ocasionan una desviación negativa la cual no es deseable; ya que conducen a un error relativo en concentraciones mayores (Dymovich *et al.*, 2005).

Los resultados de la curva de cinética de reacción permitieron establecer que el tiempo óptimo para detener la reacción es de 5 min, ya que, de acuerdo con Cuevas *et al.* (2013) y Medina (2006) el tiempo se determina cuando se observa una mayor diferencia entre los sueros positivos y negativos.

El punto de corte establecido a partir de las repeticiones de los sueros de referencia (n=7) se estimó dos veces la desviación estándar de los sueros controles negativos (0.03 OD), donde el criterio para clasificar los resultados positivos o negativos se estableció en relación al porcentaje de positividad (PP) calculado en relación a la densidad óptica del suero control positivo, que se utilizó en todos los ensayos posteriores. Así mismo, cuando se trabajaron sueros de animales experimentales para la validación del ensayo se consideró que el punto de corte se tomaría a partir de 0.2 OD correspondiente a del 25% de PP con respecto al control positivo. Cuevas *et al.* (2013) mencionan que en los ensayos serológicos es importante determinar el punto de corte, por lo que para establecerlo se necesitan de muestras de sueros que provengan de animales diagnosticados positivos y negativos conocidos.

Por otra parte, esta prueba permitió medir la presencia de anticuerpos en diferentes días post-inoculación (PI) teniendo en cuenta cómo se genera una respuesta inmune pasiva ante una mayor presencia de anticuerpos y una respuesta neutralizante contra el virus cuando la presencia es baja. Se observó que los lechones procedentes de la cerda inmunizada con proteína HN-NP presentaron una mayor OD en el día 0 PI, esto nos indicaría que la inmunización con las proteínas generaría anticuerpos los cuales serían ingeridos vía calostro, generando una respuesta inmune pasiva, lo cual se reflejó en una mayor cantidad de anticuerpos. Así mismo, se puede observar que la producción de anticuerpos va disminuyendo debido a una respuesta neutralizante contra el virus durante procesos de infección, ya que, de acuerdo con Olvera (2016) los anticuerpos pueden reconocer al virus de forma libre, así como células infectadas. Sin embargo, en el día 4 PI observó una mayor de presencia de anticuerpos lo cual se debe a que se presentó un mayor porcentaje de positividad en relación con los controles utilizados. En el caso de los lechones procedentes de cerdas vacunadas con HN + PBS y HN + liposomas (LP) y ácido gliciricínico (GA) la producción de anticuerpos fue incrementando posteriormente a la inmunización hasta el día 28, esto concuerda con los trabajos de Hernández (1998) y Zenteno (1998). Por otra, parte es importante mencionar que existe una diferencia entre ambos grupos de lechones ya que a pesar de que es mínima se observa que los lechones procedentes de la cerda inmunizada con el adyuvante presentaron una mayor producción de anticuerpos, esto debido a que estos inducen una mayor respuesta inmune (Alvarado *et al.*, 2006).

## Conclusiones

Con la estandarización del ELISA-I se establecieron las condiciones adecuadas para la prueba; la concentración óptima de antígeno fue de 75 ng y la dilución del conjugado de 1:15 000, En el caso de los sueros de lechones procedentes de madres inmunizadas y cerdos sanos SPF fue de 1:200, para los sueros de referencia positivos 1:500 (C++) y 1:1000 (C+). Así mismo, se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba la cual fue del 100 %.

Las condiciones establecidas en esta investigación brindan la oportunidad de que esta prueba (ELISA-I) con el uso del antígeno recombinante (NP) sea utilizada para el diagnóstico de la EOA. Sin embargo, es importante realizar una prueba de concordancia para que la prueba sea precisa.

Por otra parte, el uso de sueros provenientes de lechones de madres inmunizadas permitió observar la eficiencia del antígeno recombinante NP en cerdas gestantes inmunizadas y en lechones provenientes de ellas, ya que fue posible determinar que la proteína recombinante produce altos niveles de anticuerpos. Así mismo, se observó que la incorporación de otro antígeno recombinante (rHN) y un adyuvante genera una mayor producción de anticuerpos, los cuales fueron transmitidos eficientemente y detectados en muestras de los lechones.

## Referencias

1. Alvarado, A., Tenorio, V.R., Aguilar, Á., Sandoval, Á.H. (2006). Promesas y limitaciones de las vacunas génicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(2):26-37.
2. Berg, M., Hjertner, B., Moreno-López, J., Linné, T. (1992). The *p* gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides *p*, *v* and *c*: the *p* protein mrna is edited. *Journal of General Virology*, 73(5):1195-1200.
3. Borraz-Argüello, D.T., Santos-López, G., Vallejo-Ruiz, V., Herrera-Camacho, I., Reyes-Leyva, J. (2008). Caracterización biológica de tres aislamientos naturales del *Rubulavirus porcino* (México). *Revista de Biología Tropical*, 56(2):487-499.
4. Castro-Roca, C.A. (2020). Enfermedades virales exóticas, emergentes y reemergentes en porcinos (Revisión bibliográfica). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 216 pp.
5. Cerriteño, J.L. (2016). Producción de una forma enzimática activa e inmunogénica del ectodominio de la Hemaglutinina Neuraminidasa (sHN) del *Rubulavirus porcino* en la levadura *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 139 p.

6. Correa, G.P., Martínez, L.A., Solís, H.M., Pérez, S.J., Coba, M.A., Aguirre, F., Aguilar, O.P. (2001). Antigenicidad de diferentes dosis de la vacuna del INIFAP vs la enfermedad del ojo azul (EOA) en condiciones de campo: I) en lechones. En: Memorias de la AMVEC, Querétaro, Querétaro, México. XXXVI Congreso Nacional Querétaro Julio 25-29 de 2001.
7. Cuevas-Romero, R.S., Blomström, A.L., Alvarado, A., Hernández-Jauregui, P., Rivera-Benítez, F., Ramírez-Mendoza, H., Berg, M. (2013). Development of a real-time RT-PCR method for detection of *porcine Rubulavirus* (PoRV-LPMV). *Journal of Virological Methods*, 189(1):1-6.
8. Cuevas-Romero, R.S., Ramírez, C., Alvarado, I., Baule, C., Berg, M., Ramírez, H., Rivera, F., Vega, M.A. (2011). Detección de anticuerpos contra la enfermedad del ojo azul en cerdos lactantes procedentes de cerdas vacunadas con un antígeno recombinante del *Rubulavirus porcino*. En memorias de la AMVEC, Puerto Vallarta, Jalisco, México. Congreso Nacional Puerto Vallarta 2011.
9. Duymovich, C., Acheme, R., Sesini, S., Mazziotta, D. (2005). Espectrofotómetros y Fotocolorímetros: Guía práctica de actualización. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(4):529-539.
10. Frankena, K., Goelema, J.O. (1991). EPISCOPE. Agricultural University, Department of Animal Husbandry.
11. Galván-Morales, M.Á., Sarmiento-Silva, R.E., Manjarrez-Zavala, M.E. (2013). Modulación de la síntesis de interferones en la infección por Paramixovirus. *Neumología y Cirugía de Torax*, 72(3): 241-255.
12. Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A.A., Jiménez-Gutiérrez, L.R., Sotelo-Mundo, R. R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biotecnia*, 15(3):8-17.
13. Hernández-Jáuregui, P., Mendoza, H.R., García, C.M., Moreno-López, J., Kennedy, S. (2004). Experimental porcine rubulavirus (La Piedad-Michoacán virus) infection in pregnant gilts. *Journal of Comparative Pathology*, 130(1): 1-6.
14. Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Ramírez, H., Valenzuela, O., Zenteno, E. (2004). Características de la respuesta inmune de cerdos infectados con el *Rubulavirus porcino*. *Veterinaria México*, 35(1):65-74.

15. Hernández, J., Reyes-Leyva, J., Zenteno, R., Ramírez, H., Hernández-Jauregui, P., Zenteno, E. (1998). Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64(4): 367-381.
16. Hjertner, B. (1997). Molecular and biological aspects of *porcine Rubulavirus* (LPMV) lytic and persistent infections. Tesis Doctoral. Department of Veterinary Microbiology Uppsala. Swedish University of Agricultural Sciences. Suecia. 43 p.
17. Institute for International Cooperation in Animal Biologics (IICAB) (2006). Enfermedad del ojo azul. The Center for Food Security y Public Health. College of Veterinary Medicine Iowa State University. Recuperado el 25 de febrero de 2021. Disponible en: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ojo-azul.pdf>
18. Iowa State University of Science and Technology (ISUST) (2019). Blue eye disease. Consultado el 25 de noviembre de 2022. Disponible en: <https://vetmed.iastate.edu/vdpam/FSVD/swine/index-diseases/blue-eye-disease>
19. Lara-Romero, R. (2013). Detección de cerdos persistentemente infectados por la Enfermedad de Ojo Azul (*Rubulavirus porcino*) mediante la prueba de PCR en tiempo real en leucocitos de sangre periférica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 54 pp.
20. Lara-Romero, R., Cerriteño-Sánchez, J. L., Mendoza-Elvira, S., García-Cambrón, J. B., Castañeda-Montes, M. A., Pérez-Aguilar, J. M., Cuevas-Romero, J. S. (2022). Development of Novel Recombinant Antigens of Nucleoprotein and Matrix Proteins of Porcine orthorubulavirus: Antigenicity and Structural Prediction. *Viruses*, 14(9): 1946.
21. Lin, AV. (2015). ELISA Indirecto. Robert Hnasko (ed.), *ELISA: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Vol. 1318. Springer Science+Business Media. New York.
22. Martínez, A.C., Diosdado, F., Rivera, F., Gómez, L., Valera, E.O., Martínez, D.M., Santiago, J.R., Correa, E. (2016). Enfermedad del ojo azul de los porcinos. INIFAP. SAGARPA. Folleto técnico N°1. 23 p. Ciudad de México.
23. Martínez, L.A., Solís, H.M., Pérez, S.J., Coba, M.A., Aguilar, O.P., Correa, G.P., Aguirre, F., Córdova, L.D. (2001). Control de brotes de la enfermedad del ojo azul (EOA) utilizando la vacuna-EOA del INIFAP. En: memorias de la AMVEC, Querétaro, Querétaro, México. XXXVI Congreso Nacional Querétaro, Julio 25-29 de 2001.

24. Medina, G.E. (2006) Desarrollo y estandarización de la prueba de ELISA para el Diagnóstico del Virus del Oeste del Nilo (VON). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 75 pp.
25. Moreno-López, J., Correa-Girón, P., Martínez, A., Ericsson, A. (1986). Characterization of a *Paramyxovirus* isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Archives of Virology*, 91(3): 221-231.
26. Nordengrahn, A., Svenda, M., Moreno-López, J., Bergvall, A., Hernández, P., McNeilly, F., Allan, G., Merza, M. (1999). Development of a blocking ELISA for screening antibodies to porcine rubulavirus, La Piedad Michoacán Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(4): 319-323.
27. Olvera, A.D. (2016). Detección de anticuerpos contra el Rubulavirus porcino de ojo azul a partir de muestras serológicas del estado de Michoacán, mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación utilizando diferentes antígenos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 51 pp.
28. Pompei, R., Flore, O., Marccialis, M.A., Pani, A., Loddo, B. (1979). Glycyrrhizin acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature*; 281: 689-690.
29. Ramírez-Mendoza, H., Hernández-Jauregui, P., Reyes-Leyva, J., Zenteno, E., Moreno-López, J., Kennedy, S. (1997). Lesions in the reproductive tract of boars experimentally infected with porcine Rubulavirus. *Journal of Comparative Pathology*, 117(3):237–252.
30. Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., Vallejo, V., Ramírez-Mendoza, H., Hernández, J. (2004). Detección de viremia en la infección experimental por *Rubulavirus porcino*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36(1):39-47.
31. Rima, B., Balkema-Buschmann, A., Dundon, W.G., Duprex, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R., Lee, B., Rota, P., Wang, L. (2019) ICTV virus taxonomy profile: Paramyxoviridae. *Journal of General Virology*, 100(12):1593-1594.
32. Rosales, F., Correa, P. (1989). El síndrome del ojo azul. *Técnica pecuaria México*, 27 (3): 101-116.
33. Sánchez-Betancourt, J.I., Santos-López, G., Alonso, R., Dopporto, J.M., Ramírez-Mendoza, H., Mendoza, S., Reyes-Leyva, J., Trujillo, M.E. (2008). Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of *porcine Rubulavirus* isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. *Research in Veterinary Science*, 85(2): 359-367.

34. Sánchez, J.I., Trujillo, M.E., Mendoza, S., Reyes, J. (2020). Biología molecular del *Rubulavirus porcino*: enfermedad del ojo azul. BMeditores. Consultado el 27 de febrero de 2022. Disponible en: <https://bmeditores.mx/porcicultura/biologia-molecular-del-rubulavirus-porcino-enfermedad-del-ojo-azul/>
35. Santos-López, G., Hernández, J., Borraz-Argüello, M. T., Ramírez-Mendoza, H., Vallejo, V., Reyes-Leyva, J. (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus porcino*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36(2):119-136.
36. Sundqvist, A., Berg, M., Hernández-Jáuregui, P., Linné, T., Moreno-López, J. (1990). The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV). *Journal of General Virology*, 71: 609-613.
37. Sun, H.X., Xie, Y., Ye, Y.P. (2009). ISCOM e ISCOMATRIX™. *Vacuna*, 27 (33):4388-4401.
38. Swine Health Information Center (SHIC) (2021). porcine Rubulavirus (Blue Eye). Recuperado el 25 de febrero de 2021. Disponible en: <https://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2021/05/SHIC-Porcine-Rubulavirus-Fact-Sheet-12May2021.pdf>
39. Vásquez, R. (2013). Síndrome del ojo azul. Monografía de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro Unidad laguna. División regional de ciencia animal. Consultado el: 25 de febrero de 2022. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7370/RAN-ULFO%20VAZQUEZ%20CRUZ.pdf?sequence=1>
40. Zenteno-Cuevas, R., Hernández, J., Espinosa, B., Reyes, J., Zenteno, E. (1998). Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Archives of Virology*, 143(2): 333-352.

## Anexo

### Condiciones del ELISA-I

	Condiciones del ensayo		
	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	N° de lavados
<b>Antígeno (rNP)</b>	Entre 12- 15 hrs	4 °C	
<b>Sueros problema</b>	1 hr	37 °C	3
<b>Conjugado (Anti-IgG de cerdo)</b>	1 hr	37 °C	3
Sustrato (TMB)	5 min	Temperatura ambiente	Ninguno
Solución de paro	Ninguno	Temperatura ambiente	Ninguno

### Preparación de reactivos para ELISA-I

- Buffer de carbonatos: en un matraz, se disolvió una tableta de carbonato/bicarbonato en 100 ml de agua destilada filtrada por 0.45 µm. Antígeno: En un tubo de 50 ml se colocaron 9 982 µl de buffer de carbonatos y se agregaron 17.4 µl de la proteína NP cuantificada.
- Buffer de lavado (PBS-Tween 20): en un matraz se agregaron 20 ml de buffer de lavado 10x y se aforó a 200 ml con agua destilada filtrada por 0.45 µm.
- Solución de bloqueo: en un tubo de 50 ml se agregó 1, 0 g de leche semidescremada deslactosada (marca “Svelty”) y se disolvió en 20 ml de PBS-Tween 20.
- Conjugado, solución para preparar sueros: En un tubo de 50 ml, se añadieron 1.5 g de leche semidescremada deslactosada (marca “Svelty”) y se disolvió en 30 ml de PBS.
- Ácido sulfúrico 2M: En un matraz aforado de un litro, se adicionan lentamente 105 ml de ácido sulfúrico concentrado, a 895 ml de agua destilada previamente pasada por un filtro de 0.45 µm y se mantiene a temperatura ambiente.