



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS AL VIRUS DEL SÍNDROME
RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO DEL CERDO (PRRS) CON LA TÉCNICA
DE RT-PCR.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
ALICIA SOTOMAYOR GONZALEZ**

Asesores:

Dr. José Ivan Sánchez Betancourt

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega



México D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Esta tesis es, con todo mi cariño y amor, para mis padres, Aurora González y Fernando Sotomayor por el amor y apoyo incondicional que me han brindado durante la carrera y la vida.

A mi hermano, Fernando Sotomayor, por ser mi compañero y consejero siempre.

Gracias por haber fomentado en mí el anhelo de triunfo en la vida.

Agradecimientos

Mis agradecimientos están dirigidos a todas las personas y entidades que hicieron posible la exitosa realización de esta investigación.

Al Dr. Ivan Sánchez Betancourt, gracias por todo el conocimiento que me ha brindado a lo largo de este proyecto; por sus consejos desde el primer día que lo conocí y en general por haber estado ahí para mí durante estos últimos años siempre dispuesto a ayudarme con una sonrisa. Hoy, más que un asesor, es un amigo.

A la Dra. María Elena Trujillo Ortega, gracias por su constante interés durante el desarrollo del trabajo, su apoyo y sus consejos.

A mis padres, Aurora y Fernando, gracias por la formación que me dieron y por ser siempre mi soporte; gracias a ustedes hoy veo alcanzada mi meta.

A mi hermano, Nitos, gracias por estar todos los días de tu vida a mi lado, por escucharme y por tus chistes. Te quiero.

A mis tíos, gracias por todas las diversas formas en las que ayudaron a que hoy este aquí. Especialmente gracias tía Paty por toda la ayuda que me brindaste durante la carrera con todas esas tareas que requerían de tus conocimientos de arquitectura.

A mis primos, Ana, Cesar, Alex, Ricky y Rodrigo, gracias por todas esas veces que me escucharon y me dieron un consejo, seremos siempre como hermanos.

A mis amigos, los viejos del “green” y los nuevos de la facultad, gracias por su amistad, con todos ustedes he compartido momentos que atesoraré por siempre. En especial, gracias a Vale, Glu, Alexa y Angie por el tiempo que han compartido conmigo y por dejarme ser parte de sus vidas. Las adoro.

A los miembros de mi jurado, gracias por todas las contribuciones que hicieron para mejorar mi trabajo y por tomarse el tiempo para leer esta tesis y discutir conmigo cualquier detalle.

A todos los profesores del DMZC y en especial a las doctoras que me ayudaron a aprender a trabajar en un laboratorio, gracias por todas sus atenciones y todas las enseñanzas que me han dado.

A Paulina y a Rolando, gracias por toda la paciencia que han tenido al enseñarme todo lo necesario para iniciar este trabajo, y en particular, gracias Pau, por todas las muestras que me proporcionaste.

Y gracias a todos aquellos que durante los 6 años que duro este sueño, me ayudaron a convertirlo en una realidad.

Resumen

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) es considerado una de las enfermedades infecciosas más importantes que afectan a la industria porcina en todo el mundo ocasionando grandes pérdidas económicas. Se caracteriza principalmente por falla reproductiva en el último tercio de gestación y enfermedad respiratoria en cerdos de todas las edades. El virus presenta una variabilidad genética que puede llegar a ser hasta del 80% y que dificulta el diagnóstico preciso. En éste estudio se determinó el número de muestras positivas al virus de PRRS por medio de la prueba de RT-PCR utilizando 4 pares de oligonucleótidos específicos diseñados para el linaje americano: ORF5, ORF7 y un PCR anidado de ORF 5 y ORF 5 de linaje europeo. De las 69 muestras procesadas se encontraron 47 positivas (68.12%). De los 14 estados muestreados hubo en todos, al menos una muestra positiva. Con los oligonucleótidos dirigidos a ORF7 se detectaron mas muestras positivas (34 de 69) seguido por el ORF 5 anidado (28 de 69), el ORF 5 de linaje americano solo detecto 5 muestras positiva y no se obtuvo ningún resultado positivo con linaje europeo. Con nuestros resultados podemos concluir que el uso de un solo par de oligonucleótidos hubiera generado resultados falsos negativos. A su vez la obtención de amplicones de diferente tamaño nos demuestra la variación que presenta éste virus y sugiere la presencia de cepas endémicas en nuestro país.

Palabras clave: PRRS, ORF5, ORF7, diseño de oligonucleótidos.

Abstract

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is considered one of the most important infectious diseases affecting the swine industry worldwide, causing large economic losses. It is mainly characterized by reproductive failure in the last third of pregnancy and respiratory disease in pigs of all ages. The virus has a high genetic variation that can be up to 80% causing difficult accurate diagnosis. In this study, the number of positive samples for PRRS virus were determined through RT-PCR using 4 pairs of specific primers designed for the American lineage: ORF5, ORF7 and a nested PCR for ORF 5 and European lineage ORF 5. Of the 69 samples processed, 47 were positive (68.12%). Of the 14 states sampled there were at least one positive sample. Primers targeting the ORF7 detected more positive samples (34 of 69) followed by nested ORF 5 (28 of 69), the American lineage ORF 5 detected only 4 positive samples and none positive results with European ancestry were found. With this results we conclude that the use of a single pair of primers has generated false negative results. At the same time obtaining genomic segments of different sizes, shows the variation that this virus has and suggests the presence of endemic strains in our country.

Key words: PRRS, ORF5, ORF7, primer's design.

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abstract	V
Contenido	VI
INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes	1
Impacto Económico	3
Agente Etiológico	4
Signos Clínicos	11
Patogenia	12
Respuesta Inmune	15
Diagnóstico	18
Control	22
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
Diseño de oligonucleótidos	27
Muestras	28
Extracción de RNA	28

RT-PCR	29
RESULTADOS	31
Muestras Positivas hacia el ORF7	31
Muestras Positivas hacia ORF5 con RT-PCR Anidado	31
Muestras Positivas hacia el virus Americano (ORF5-FA y ORF5-RA)	31
Muestras hacia el virus Europeo	32
Amplicones obtenidos hacia ORF7	32
Amplicones obtenidos hacia ORF5 (RT-PCR Anidada)	32
Amplicones obtenidos hacia ORF5 (cepa americana)	33
Distribución de las variantes encontradas (CUADRO 6)	33
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
CUADROS	
CUADRO 4. Secuencias del Banco Genético (GenBank)	52
CUADRO 5. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LA DETECCIÓN DEL ORF 5.	60
CUADRO 6. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LA DETECCIÓN DEL ORF 7.	60
CUADRO 7. MUESTRAS PROCESADAS	60
CUADRO 8. MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS	64
CUADRO 9. AMPLICONES OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS CON LOS DIFERENTES OLIGONUCLEÓTIDOS.	68
CUADRO 10. RELACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS POR ESTADO DE LA REPÚBLICA MUESTREADO.	69

CUADRO 11. FRECUENCIA DE MUESTRAS POSITIVAS AL VIRUS DE PRRS EN 70
RELACIÓN AL TIPO DE MUESTRA PROCESADA.

FIGURAS

FIGURA 4. ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL ORF 5 DESCARGADAS DEL 71
BANCO GENÉTICO (GENBANK) A LA CEPA DE REFERENCIA AMERICANA VR2332.

FIGURA 5. ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL ORF 5 DESCARGADAS DEL 71
BANCO GENÉTICO (GENBANK) A LA CEPA DE REFERENCIA EUROPEA LELYSTAD.

FIGURA 6. EJEMPLO DE LA ALINEACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ORF5-FL 72
Y ORF5-RL DISEÑADOS PARA LA CEPA EUROPEA CON ALGUNAS SECUENCIAS
SIMILARES A LA CEPA DE REFERENCIA LELYSTAD.

FIGURA 7. ELECCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL VIRUS DE PRRS PARA 72
EL DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.

FIGURA 8. SELECCIÓN DE LOS CRITERIOS DESEADOS PARA EL DISEÑO DE LOS 73
OLIGONUCLEÓTIDOS.

FIGURA 9. SELECCIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO ORF5-FA. CUANDO SE 73
CUMPLEN LOS CRITERIOS DESEADOS, EL COLOR DE LA SELECCIÓN CAMBIA DE
GRIS A VERDE.

FIGURA 10. EJEMPLO DEL ANÁLISIS DE UN PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS. 73

FIGURA 11. POSICIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO ORF5-FA. 74

FIGURA 12. POSICIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO ORF5-RA. 74

FIGURA 13. RESULTADOS GRÁFICOS DEL ANÁLISIS BLAST PARA EL 75
OLIGONUCLEÓTIDO ORF5-FA.

FIGURA 14. DESCRIPCIÓN DE LAS ALINEACIONES PRODUCIDAS COMO

RESULTADO A LA SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO ORF5-FA.	75
FIGURA 15. EJEMPLO DE LA ESPECIFICIDAD MEDIANTE LA ALINEACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS A CEPAS REPORTADAS EN EL BANCO GENÉTICO (GENBANK).	76
FIGURA 16. MUESTRAS 1-7, OLIGONUCLEÓTIDOS ORF5-FA Y RA.	77
FIGURA 17. MUESTRAS 38-46, OLIGONUCLEÓTIDOS ORF7-F Y R	78
FIGURA 18. MUESTRAS 27-37, OLIGONUCLEÓTIDOS ORF5-NF Y NR.	79
FIGURA 19. MUESTRAS 15-26, OLIGONUCLEÓTIDOS ORF5-NF Y NR.	80
FIGURA 20. MUESTRAS 84-92, OLIGONUCLEÓTIDOS ORF5-NF Y NR.	81
FIGURA 21. ESTADOS DE HIDALGO Y GUANAJUATO QUE PRESENTAN LOS MISMOS AMPLICONES DE 700, 620 Y 400 PB PARA EL ORF 5 ANIDADO Y NINGUNO PARA EL ORF 7.	82
FIGURA 22. ESTADOS DE GUANAJUATO Y PUEBLA QUE PRESENTAN LOS MISMOS AMPLICONES PARA LOS TRES PARES DE OLIGONUCLEÓTIDOS: 800, 530, 450 Y 250 PB PARA EL ORF 7, 700, 620 Y 400 PB PARA EL ORF 5 ANIDADO Y 750 Y 650 PB PARA EL ORF 5.	83
FIGURA 23. ESTADOS DE PUEBLA, MORELOS, D. F. Y TLAXCALA QUE PRESENTAN EL MISMO AMPLICÓN DE 280 PB PARA EL PCR ANIDADO DEL ORF 5.	84
FIGURA 24. ESTADOS DE MORELOS, YUCATÁN Y GUANAJUATO, QUE PRESENTAN EL MISMO AMPLICÓN DE 280 PB PARA EL PCR ANIDADO DEL ORF 5 Y DE 380 PB PARA EL ORF 7.	85
FIGURA 25. ESTADOS DE JALISCO, MICHOACÁN, VERACRUZ, EDO. DE MÉXICO Y PUEBLA QUE PRESENTAN EL MISMO AMPLICÓN DE 380 PB PARA EL ORF 7.	86

FIGURA 26. ESTADOS DE MICHOACÁN Y EDO. DE MÉXICO QUE PRESENTAN EL MISMO AMPLICÓN DE 242 PB PARA EL ORF 5 ANIDADO Y DE 380 PB PAR EL ORF

7.

FIGURA 27. ESTADOS DE SONORA Y JALISCO QUE PRESENTAN UN SOLO AMPLICÓN DE 400 PB PARA EL ORF 7.

FIGURA 28. DISTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS PATRONES DE AMPLICONES ENCONTRADOS.

ANEXOS

Anexo 1. TAE	90
Anexo 2. Gel de Agarosa 2%	90
Anexo 3. 6x DNA Loading Dye	90
Anexo 4. pUC Mix Marker, 8	91

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo (PRRS *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) es considerado una de las enfermedades infecciosas más importantes que afectan a la industria porcina en todo el mundo ocasionando grandes pérdidas económicas; y se caracteriza principalmente por falla reproductiva en el último tercio de gestación y enfermedad respiratoria en cerdos de todas las edades.^{1, 2, 3, 4, 5, 6}

En los últimos años se ha confirmado que la heterogeneidad de PRRS es cada vez mayor, lo que produce un impacto en los métodos de diagnóstico y la eficacia para controlar la enfermedad. El uso de técnicas de PCR para la detección del virus de PRRS podría ser útil para asegurar un diagnóstico confiable a pesar de la alta variabilidad del virus.

Antecedentes

El PRRS fue descrito por primera vez en Estados Unidos de América (EUA) en el año 1987^{7, 8, 9} cuando una serie de brotes clínicos de una enfermedad no reconocida previamente, comenzaron a ocasionar grandes pérdidas económicas a los porcicultores. La enfermedad se reporta por primera vez en Carolina del Norte, en donde describían el síndrome con graves pérdidas reproductivas, presencia de neumonía postdestete, reducción del crecimiento, y aumento de la mortalidad. A falta de un agente causal conocido se le asignó el nombre de “enfermedad misteriosa del cerdo” (MSD, *Mystery Swine Disease*) y se comenzaron a proponer posibles agentes que estuvieran ocasionando la enfermedad. Entre éstos se encontraban el virus de la fiebre porcina clásica, el parvovirus porcino, un nuevo aislamiento del virus de Influenza A y el virus de la pseudorabia o enfermedad de Aujeszky. La identificación del agente etiológico fue

un trabajo complicado debido a que varios de éstos agentes y otros más, se aislaban continuamente de los casos de MSD.^{9, 10}

En Europa, brotes clínicos similares a los descritos en EUA se reportaron por primera vez en noviembre de 1990 cerca de Münster, Alemania (OIE, 1992) donde la enfermedad se propagó rápidamente y más de 3,000 brotes fueron documentados en mayo de 1991; sin embargo, no se logró demostrar asociación entre los brotes encontrados en Europa con aquellos encontrados en los Estados Unidos.¹⁰

En los Países Bajos se reportó por primera vez en enero y en Bélgica en marzo de 1991 (OIE, 1992). El primer caso clínico de PRRS en España fue detectado en enero del mismo año asociado a la importación de cerdos vivos. En Gran Bretaña, la enfermedad se presentó en mayo de 1991 a pesar de que se detuvo la importación de cerdos, semen o embriones de países donde se hubiera reportado la enfermedad. En Francia, los primeros brotes aparecieron en Noviembre de 1991 (OIE, 1992), seguido por los brotes en Dinamarca y Polonia en 1992 y la República Checa en 1995.¹⁰

En Asia, los brotes se produjeron en Japón en 1988 y en Taiwán en 1991. Por lo tanto, la pandemia se había extendido a la mayoría de los principales centros productores de cerdo en el mundo en unos pocos años.¹⁰

En México, la enfermedad se describe clínicamente por primera vez a principios de los años 90, coincidiendo con la presentación pandémica de la enfermedad; sin embargo, es posible que fuera introducido a nuestro país desde los años 80 por animales importados. En un estudio realizado en 1997 en varias regiones de México, Diosdado VF *et al.* (2004), demostraron que el 80% de los animales muestreados presentaron anticuerpos contra el virus de PRRS y en 1999 se obtuvo el reconocimiento oficial de la enfermedad por parte de las autoridades sanitarias de nuestro país.^{11, 12}

La causa de la “enfermedad misteriosa del cerdo” se resolvió en 1991 cuando Wensvoort *et al.* descubrieron un virus ARN, envuelto, en Lelystad, Países Bajos en el Central Veterinary Institute (1991) en macrófagos alveolares de cerdo (PAM).¹³ Poco tiempo después, el virus se aisló y caracterizó en los EUA en la línea celular continua CL2621.^{13, 14, 15} El primer virus aislado en los Países Bajos se denominó Lelystad y en los EUA síndrome respiratorio y de infertilidad porcina (SIRS Swine infertility and respiratory syndrome), cepa VR2332.^{9, 10, 11, 16} Los dos aislamientos del virus fueron demostrados al inducir falla reproductiva y signos respiratorios en cerdos en condiciones experimentales. La enfermedad es ahora comúnmente conocida como “síndrome respiratorio y reproductivo porcino” (PRRS) en gran parte del mundo.¹⁰

Impacto Económico

El estado de salud de los cerdos en una granja se relaciona en gran medida con la eficiencia de producción, teniendo un gran impacto económico sobre los productores y la industria.

Un estudio reciente acerca de las operaciones de producción de carne de cerdo realizado por el Sistema Nacional de Monitoreo de Salud Animal de EUA (NAHMS, National Animal Health Monitoring System), concluyó que el virus de PRRS es el segundo causante de problemas de salud en la reproducción, reportándose en el 21.4% de las granjas.¹⁷

El virus de PRRS causa graves pérdidas económicas debido a la falla reproductiva en cerdas adultas y jóvenes, además de dificultad respiratoria en lechones y cerdos de engorda.¹⁸ Las enfermedades respiratorias son la causa más importante de morbilidad y mortalidad en cerdos después del destete.¹⁹

En un estudio realizado en EUA por Neumann *et al.* (2005), se evaluó el impacto económico en piaras de pie de cría y crecimiento que fueron afectadas por el virus de PRRS, medido en la disminución en la salud reproductiva, en el aumento en muertes y la reducción en la tasa de crecimiento y eficiencia. Los resultados demostraron que en total, el impacto económico anual de las pérdidas por PRRS en el cerdo en los EUA se estima en \$66,75 millones de dólares en pie de cría y \$493,57 millones de dólares en las poblaciones de crecimiento y engorda de cerdos.²⁰

Otro estudio realizado por Leaflet (2005) concluyó que el efecto económico de PRRS de la inseminación o monta natural hasta el parto, se calcula en \$74.16 dólares por camada afectada debido a una reducción en el número de partos y de lechones nacidos. El costo de PRRS en el periodo de lactancia se estimó en \$6.01 dólares por animal afectado debido al aumento de la mortalidad de lechones, a la reducción del porcentaje de conversión alimenticia y la reducción de la ganancia diaria de peso; y por último, el efecto en la etapa de crecimiento y finalización se estimó en \$7.67 dólares por animal en las granjas afectadas. Utilizando estos valores junto con la información del NAHMS y el tamaño de la industria porcina en EUA, se estima que el costo anual por la presencia del virus de PRRS en las granjas es de \$560.32 millones de dólares.¹⁷

Agente etiológico.

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) se encuentra clasificado en el orden Nidovirales, familia Arteriviridae, género Arterivirus, dentro de los cuales se encuentran el virus de la arteritis viral equina (EAV), el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón (LDV) y el virus de la enfermedad hemorrágica del simio (SHFV).^{1, 2, 3, 5, 9, 21, 22} Estos virus se caracterizan por tener alta variabilidad

genética y antigénica, infectar macrófagos-monocitos induciendo infecciones persistentes y modular el sistema inmunológico.^{3, 23}

Durante el X Congreso Internacional de Virología (Jerusalén, agosto de 1996), el Comité Internacional de la Taxonomía de Virus (ICTV) aprobó formalmente la familia *Arteriviridae*, uniéndola a la familia *Coronaviridae* (que contiene los géneros Coronavirus y Torovirus) en el orden de los Nidovirales.²⁴

El establecimiento de una familia de arterivirus reconoce las propiedades únicas biológicas y moleculares de sus cuatro miembros presentes. Entre estas propiedades se encuentran la capacidad de inducir una viremia prolongada, infecciones persistentes y replicación en los macrófagos.²⁵

Por otra parte, la afiliación a los coronavirus reconoce una relación ancestral a nivel de organización del genoma y la replicación. Para la replicación de todos los arterivirus, los macrófagos parecen ser la célula blanco, mientras que para el aislamiento en cultivos celulares presentan una especificidad restringida en cuanto a la célula huésped. El virus de PRRS se replica en los macrófagos, en células de riñón de mono verde africano (MA-104) y en sus derivados (CL2621 o MARC 145).^{24, 26}

El virus de PRRS es un virus compuesto de ARN de 13-15kb, de cadena sencilla, de polaridad positiva, es de forma esférica con un diámetro aproximado de 50 a 65 nm, con una envoltura lipídica (Figura 1).⁹

Al ser un virus envuelto su supervivencia fuera del huésped se ve afectada por la temperatura, el pH y la exposición a detergentes. Se sabe que el virus de PRRS puede sobrevivir durante intervalos mayores a 4 meses a temperaturas entre -70 a -20° C, sin embargo, la viabilidad se reduce con el aumento de la temperatura pero se ha llegado a recuperar el virus después de 20 minutos a 56° C, 24 horas a 37° C, y 6 días a 21° C. El virus se mantiene estable en un rango de pH de 6,5 a 7,5, sin embargo, su capacidad

para infectar se reduce a un pH menor a 6,0 o mayor a 7,65. Los detergentes son eficaces para reducir la virulencia del virus y los solventes orgánicos como el cloroformo y el éter son particularmente eficientes para perturbar la envoltura viral e inactivar la replicación.²⁵

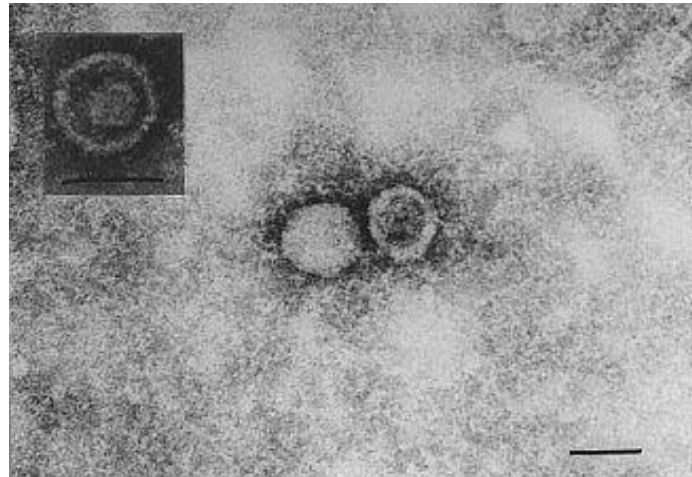


Figura 1. Virus de PRRS por microscopia Electrónica. Barra= 50nm Tomada de: porcilis-prrs.com

El virión del virus del PRRS consiste en una nucleocápside compuesta por una cadena RNA positiva de aproximadamente 15 kb, y la proteína de la nucleocápside, que está rodeada por una envoltura formada por una doble capa lipídica. Ésta envoltura contiene seis proteínas estructurales: una pequeña proteína E de envoltura, la proteína M de membrana, y las proteínas N-glicolisadas: GP2, GP3, GP4 y GP5 (Figura 2).^{26,27}

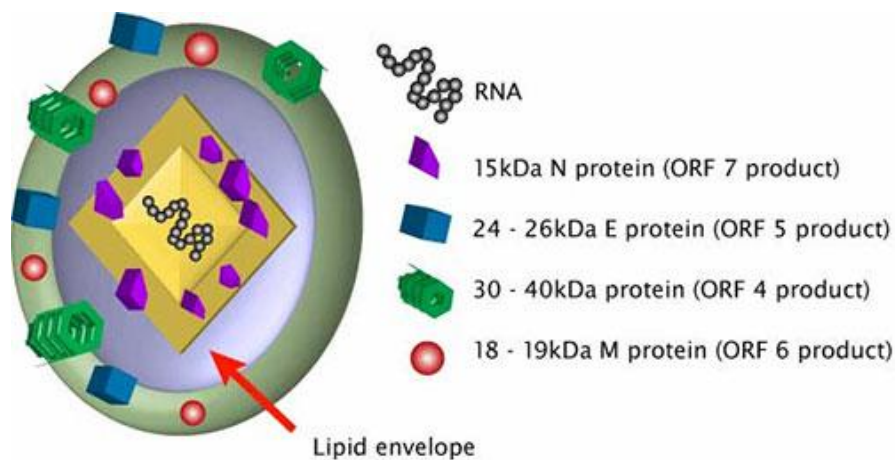


Figura 2. Imagen tomada de: porcilis-prss.com

Las principales proteínas estructurales son la M, la N y la GP5, mientras que la proteína E, GP2, GP3 y GP4 son componentes menores del virión.^{26, 27}

Los arterivirus se caracterizan por presentar mRNAs subgenómicos,²⁸ los cuales son identificados por el producto proteico de su respectivo marco de lectura abierto (en inglés ORF, Open Reading Frame). El virus de PRRS tiene 8 marcos de lectura abiertos. Los sitios de unión entre los ORFs del virus Lelystad oscilan desde 1 pb (entre las ORFs 4 y 5) hasta 253 pb (entre las ORFs 3 y 4). Las cepas de EUA del virus de PRRS tienen una región no codificante de 10 pb que separan los ORFs 4 y 5 (Figura 3).¹³

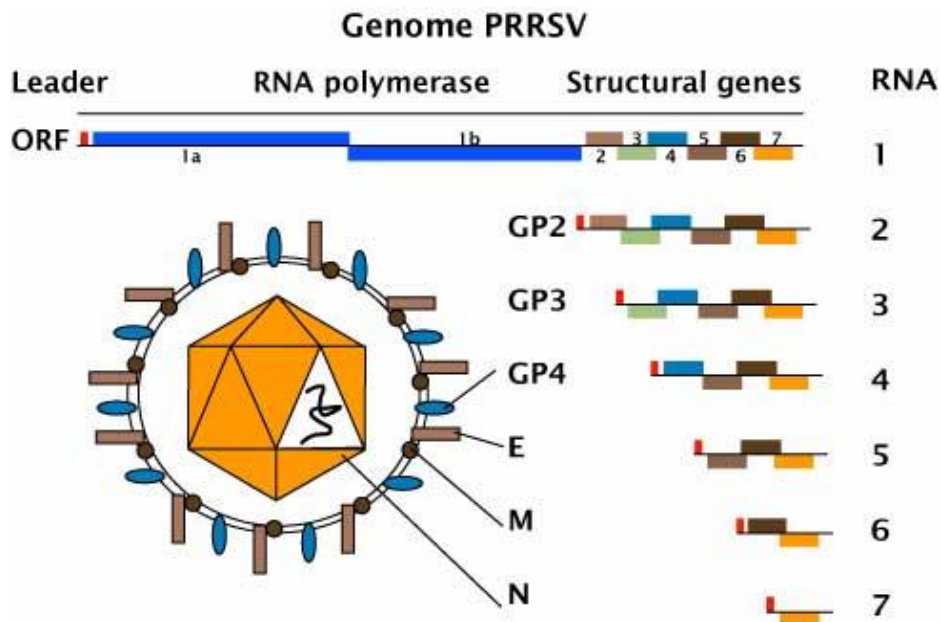


Figura 3. Imagen tomada de: porcilis-prss.com

Los primeros 2 marcos de lectura abiertos (ORF 1a y 1b) ocupan el 80% de genoma, codifican la RNA polimerasa viral y están asociados a proteasas y replicasas involucradas en la replicación y transcripción del ARN viral.^{3, 9, 22, 29} El polipéptido ORF1b codificado es mucho más conservado, tanto en tamaño como en secuencia.²⁴

Los ORFs 2, 3, 4 y 5 codifican para las estructuras proteicas (GP2, GP3, GP4 y GP5 respectivamente), ORF 6 codifica para una proteína matriz de 18 a 19 kd y el ORF 7

codifica para la proteína nucleocápside de 14 a 15 kd.²⁷ Diversos estudios demuestran amplia variabilidad genética del virus de PRRS.³

La GP2 y GP3 son poco antigénicas a comparación con la GP4 y GP5 que se encuentran involucradas en la inducción de anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas GP4 y GP5 son neutralizantes.^{3, 30}

El ORF 5, que codifica para la proteína de la envoltura GP5 es una glicoproteína de aproximadamente 200 aminoácidos con un peso molecular aparente de 25 kDa que se encarga de reconocer el receptor celular de las células blanco e inducir apoptosis.³ Ésta proteína es la más variable del virus de PRRS, con sólo un 51-55% de aminoácidos de identidad de secuencia entre las cepas Europea y Americana, con las mayores diferencias observadas en la N terminal. Esta variabilidad es la característica por la cual se utiliza para identificar aislamientos genéticamente distintos.^{6, 7, 31}

La proteína M es la proteína estructural más conservada de todos los arterivirus; es una proteína no glicosilada de 18 kD ³² que tiene el mismo perfil de hidrofobicidad que la proteína M del virus de la arteritis equina (EAV) y LDV y es posible que participe en la liberación y ensamblaje de nuevas partículas virales.³

La proteína N es la más pequeña e induce una producción elevada de anticuerpos sin actividad protectora evidente; no es N-glicosilada, a pesar de que contiene 1 y 2 posibles sitios de N-glicosilación e interactúa con el ARN viral para el conjunto de partículas infecciosas. Esta proteína se expresa en altos niveles en células infectadas y representa del 20 al 40% de la proteína total que contiene el virión.^{3, 13, 29, 32}

El orden de los genes del virus de PRRS extremo 5' es: la polimerasa viral (ORF 1a/1b)- proteínas asociadas a viriones GP2 (ORF 2)- GP3 (ORF 3)- GP4 (ORF 4)- GP5 (ORF 5)- M (ORF 6)- N (ORF 7) -3', y es el mismo que en EAV, LDV y el virus de la fiebre hemorrágica de los simios (SHFV) (Cuadro 1).¹³

Cuadro 1. Proteínas estructurales conocidas del virus de PRRS.²⁴

Nombre	Gen	Tamaño (aa)	N-glicosilación
GP2	ORF 2	249	+
GP3	ORF 3	265	+
GP4	ORF 4	183	+
GP5	ORF 5	201	+
M	ORF 6	173	-
N	ORF 7	128	-

La reproducción del ARN genómico del arterivirus es un proceso que combina la replicación del genoma y la transcripción del ARNm. El ciclo de replicación de los arterivirus se inicia con la expresión del gen de la replicasa del genoma entrante. Las replicasas ORF1a y ORF1b, que se encuentran en el primer marco de lectura abierto relativo a ORF1a, son expresadas en el ARNm genómico. La traducción del ORF1b requiere un marco de lectura ribosomal antes de que finalice la traducción del ORF1a. En el virus de PRRS, el cambio de sitio específico 5' GUUAAAC 3' es seguido inmediatamente por dos codones de terminación ORF1a. Llama la atención que al final del extremo 5', el codón inicial del ORF1a se encuentra inmediatamente después del final 3' de la secuencia líder común.²⁴

En México, estudios realizados por Lara *et al.* (2001) describieron la secuencia del ORF7 y lo compararon con la cepa de referencia americana VR2332. Los resultados que obtuvieron revelaron una identidad de 94.01%-94.39% con la cepa americana y de 97.38%-99.93% entre los aislamientos. En otro estudio realizado por Batista *et al.* (2004), que analizo también el gen del ORF 7 de muestras provenientes de granjas de

Sonora y Puebla notificaron una mayor diversidad a la encontrada por Lara *et al.* (2001).²³

Los arterivirus se ensamblan por translocación de nucleocápsides preformadas hacia la luz del retículo endoplásmico liso y/o el aparato de Golgi y se liberan por medio de exocitosis. En experimentos de crecimiento de un solo paso, la liberación máxima de partículas de arterivirus se da entre 10 y 20 h después de la infección.¹⁶

El análisis del virus aislado en Europa y en EUA ha llevado a la designación de dos serotipos principales de referencia: el americano y el europeo, y entre ellos la variabilidad genética puede llegar a ser muy alta (incluso en una misma cepa encontramos diferencias significativas).^{16, 33} La variabilidad genética al comparar las secuencias de aminoácidos indica que el virus evoluciona por mutaciones al azar y recombinación génica.²⁵

La diversidad genética en el genotipo europeo es mucho mayor que en el genotipo americano y existe evidencia de la restricción de la reactividad serológica cruzada entre los subtipos genéticos.³⁴

Entre cepas americanas el ORF 5 presenta una identidad de 88 a 97% y entre cepas americanas y europeas la identidad es de 51 a 59%, lo que también demuestra la variabilidad genética entre serotipos americanos y europeas.^{3,6}

En conclusión, las cepas americanas y europeas son tan diferentes en sus características genéticas y antigénicas que podrían pertenecer a dos diferentes sub-poblaciones originarias de un ancestro común del virus. Las dos sub-poblaciones probablemente han evolucionado en diferentes direcciones bajo la influencia local de presión de selección.³⁵

Debido a esto, es necesaria la utilización de técnicas moleculares para mejorar el diagnóstico.³³

Signos clínicos.

El PRRS se caracteriza por presentar un cuadro clínico reproductivo causado principalmente por abortos en el último tercio de gestación, partos prematuros, aumento en el número de momias, mortinatos y mortalidad en la maternidad, así como un menor rendimiento del crecimiento y una elevada mortalidad secundaria a la enfermedad respiratoria.^{25, 36} La infección también se ha asociado con bajas tasas de concepción, elevación en el porcentaje de irregulares, así como retornos al estro y abortos tempranos esporádicamente.³⁷

Particularmente en el tracto respiratorio, el virus del PRRS predispone a los animales a infecciones por otros patógenos. En condiciones experimentales y estudios de campo, se observa que en cuadros clínicos severos con retraso en el crecimiento de los animales, están presentes además del virus del PRRS, agentes como el virus de influenza porcina (IP) y el coronavirus respiratorio porcino (CRP).³⁶

Algunos otros signos que se pueden observar en los cerdos infectados con el virus de PRRS son: fiebre prolongada, hiperapnea, letargia y edema periocular, presentando lesiones macroscópicas inespecíficas como cambios de color del pulmón y aumento de varios nódulos linfáticos superficiales y viscerales.^{38, 39} Histopatológicamente se puede presentar: rinitis, neumonitis, linfadenopatía (necrosis linfoide, degeneración poliquística del tejido linfoide con policariocitos), vasculitis, miocarditis y encefalitis.
38, 39, 40, 41

Sin embargo, la intensidad, la patogenicidad y la virulencia parecen variar entre aislamientos del virus de PRRS, como se ha observado en animales infectados experimentalmente.²⁵

Algunos estudios encontraron que los cerdos infectados experimentalmente con diferentes aislamientos del virus de PRRS en EUA mostraron importantes diferencias en

la presentación clínica de la enfermedad, la temperatura rectal, y lesiones macroscópicas y microscópicas en pulmones. En estos estudios, los animales infectados con cepas ligeramente virulentas presentaron fiebre transitoria, disnea y taquipnea mientras que la infección con los aislamientos altamente virulentos indujeron dificultad para respirar, fiebre, letargo y anorexia.^{25, 42, 43}

El virus de PRRS puede causar trastornos reproductivos en animales susceptibles infectados en el tercer trimestre de gestación. La severidad de lesiones macroscópicas y microscópicas en los fetos depende de las propiedades del virus y la edad del feto. Generalmente se pueden observar hemorragias segmentarias, perivasculares y transmurales, así como múltiples edemas con arteritis necrótica del cordón umbilical y lesiones en el miocardio, pulmones, cerebro e hígado, pero son poco frecuentes.

La detección del virus de PRRS en el tejido fetal se realiza generalmente por RT-PCR, también puede ser utilizada la prueba inmunohistoquímica para la detección del antígeno viral a partir de muestras de timo fetal.⁴⁴

En cuanto a la presencia del virus en los machos, hay estudios que indican que la infección por el virus de PRRS puede causar alteraciones en la calidad seminal. Las alteraciones se han reportado desde dos semanas después de la infección; estos cambios, que incluyen la reducción de la motilidad, aumento en el porcentaje de acrosomas anormales, y aumento de las alteraciones morfológicas (principalmente en la cabeza) dan lugar a una reducción en el número de dosis que se producen.^{29, 37}

Patogenia

En general se cree que el virus inicia una infección en los cerdos al entrar por el epitelio nasal, las amígdalas y los macrófagos pulmonares. El virus inhibe el movimiento ciliar de la tráquea afectando a los macrófagos alveolares; lisa las células dendríticas, se

replica en las células y produce una viremia que posteriormente ocasiona la neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis, linfadenopatía, etc.^{12, 13, 29}

En estudios realizados *in vivo* se ha observado que el virus de PRRS tiene una preferencia por células de la línea de los monocitos o macrófagos, e infecta a subconjuntos específicos de macrófagos diferenciados en los pulmones, los tejidos linfoides y la placenta. Las células precursoras de los macrófagos, como por ejemplo, las células de médula ósea y los monocitos de sangre periférica, son en gran parte refractarias al virus y los macrófagos peritoneales tampoco son susceptibles a la infección por el virus de PRRS.²⁶

Actualmente, el cerdo y el jabalí son los únicos animales que se sabe que experimentan infección natural por el virus de PRRS. La infección natural de jabalíes se comprobó indirectamente por un estudio sero-epidemiológico llevado a cabo en Alemania y se confirmó en Francia.⁴⁵ Sin embargo, no hay ningún informe de la presentación de los signos clínicos de PRRS en jabalíes y no se ha encontrado fundamento de su papel potencial en la transmisión del virus a los cerdos domésticos.³⁵ En estudios realizados por Zimmerman *et al.* (1997) se reportó que pollos y patos silvestres que fueron expuestos al virus de PRRS en el agua potable eliminan el virus en sus heces, lo que sugiere que son susceptibles a la infección por el virus de PRRS.²⁴

La infección por el virus de PRRS produce una viremia que puede ser detectada desde el primer día post-infección hasta un intervalo de tiempo variable después. Por regla general, es posible aislar el virus de 1 a 10 días post-infección.³⁷

La duración de la viremia es similar en las cerdas adultas, jóvenes y en los verracos, pero es generalmente más corta en cerdos jóvenes, en los que la viremia puede durar de 28 a 35 días post-infección. Esta diferencia entre los animales jóvenes y los mayores podrían deberse a la madurez del sistema inmune en adultos, lo que llevaría a la

remoción del virus en períodos más cortos de tiempo. También podría reflejar un mayor número de células susceptibles en los cerdos más jóvenes en comparación a los mayores.³⁷

Factores como la edad del animal pueden influir en la replicación del virus y los signos clínicos.⁴⁶ Los estudios que comparan los efectos de la edad han determinado que los animales más jóvenes (4-8 semanas de edad) infectados con PRRS presentan una viremia más prolongada, así como mayores tasas de excreción y replicación en los macrófagos en comparación con los cerdos mayores (16-24 semanas).²⁵

Bilodeau *et al.* (1994) demostraron en cerdos libres de patógenos específicos (SPF) que al ser introducidos en una granja que había tenido cerdos infectados con el virus de campo de PRRS y que ya no presentaban signos clínicos desde 4 meses antes, los cerdos SPF recién introducidos se infectaron. Este estudio indica que la infección subclínica del virus de PRRS puede persistir en los animales. Wills *et al.* (1997a, b) demostraron que el virus de PRRS puede aislarse en muestras de la orofaringe de hasta 157 días post-infección. Estos estudios demuestran que los cerdos infectados persistentemente con PRRS pueden parecer clínicamente normales, pero pueden transmitir el virus a cerdos susceptibles. Por lo tanto, la persistencia de la infección del virus de PRRS desempeña un papel importante en la supervivencia del virus y su transmisión, y supone un obstáculo importante en los programas de control de PRRS.¹³

La principal vía de transmisión del virus es a través de un estrecho contacto entre cerdos infectados y cerdos susceptibles; contactos que son promovidos por los movimientos intensivos de animales (compra de cerdos destetados y cría de reemplazo); sin embargo también existe la forma indirecta.³⁵

Se ha reportado la presencia del virus de PRRS en una variedad de secreciones y excreciones del cerdo como: los aerosoles y en la sangre, el semen, la saliva, las heces, la leche y el calostro.^{25, 46}

De manera indirecta, el virus puede transmitirse a través de fomites (los más comunes son el overol y las botas), vehículos de transporte e insectos (el mosquito *Aedes vexans* y la mosca *Musca domestica*, no son vectores pero pueden transportarlo en su intestino hasta por 2.4 km).^{25, 29}

La transmisión aérea es una importante vía de propagación. Hay algunos informes de transmisión aérea en distancias de hasta 20 km. Sin embargo, es probablemente que la transmisión por vía aérea sea más importante en distancias cortas menores a 3 km. Le Potier *et al.* (1995) observó que las explotaciones encontradas a una distancia de 500 m se infectaban con mayor facilidad que las granjas con 1 o 2 km de distancia entre ellas.³⁵ También se ha descrito la transmisión vertical durante el segundo y el tercer tercio de la gestación, así como la transmisión a través del semen de verracos infectados experimentalmente, donde se ha encontrado el virus de 43 a 92 días después de la infección.²⁵

Los factores de mayor riesgo como consecuencia de las diversas vías de transmisión del virus de PRRS, han sido identificados: piaras de gran tamaño, granjas que no cuenten con área de cuarentena, granjas en las que se introducen un gran número de animales y el nivel de densidad local de granjas.^{35, 47}

Respuesta Inmune

El virus de PRRS produce una inmunosupresión caracterizada por una baja producción de IFN Tipo 1 y citocinas proinflamatorias que comprometen el inicio de la respuesta inmune adquirida y predisponen a infecciones secundarias.^{29, 48}

La respuesta humoral está dada por Inmunoglobulinas M (IgM) específicas para el virus de PRRS, las cuales aparecen de 5 a 7 días después de la infección, y por los anticuerpos IgG anti-PRRS, que son detectadas de 7 a 10 días después de la infección y disminuyen sus niveles alrededor del día 300 postinfección.²⁹

La proteína N no se considera importante desde el punto de vista inmunoprotector o inmunogénico, ya que los anticuerpos que produce no son neutralizantes, pero su abundante expresión y antigenicidad lo vuelve ideal para pruebas diagnósticas. Por otra parte, la proteína M induce la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de PRRS.²⁹

Los anticuerpos neutralizantes del virus aparecen en el suero aproximadamente tres semanas después de la infección y se mantienen por largos periodos, pero los títulos pueden variar debido a la respuesta individual de cada animal, y los títulos de virus presente.⁴⁹

La respuesta inmunológica celular está mediada por los linfocitos T CD8+ y T CD4+ y “natural killer” (NK). La respuesta celular con los linfocitos T específicos para el virus de PRRS se da 2 a 8 semanas después de la infección y se ha comprobado la respuesta de las células T hacia los productor de los ORFs 2, 4, 5, 6 y 7. La respuesta de linfocitos T ocurre generalmente después de la máxima concentración del virus en suero.²⁹

La proteína M y la proteína GP5 forman heterodímeros unidos con puentes disulfuro: Éstos heterodímeros se incorporan a la partícula viral y son esenciales para la interacción con los receptores celulares para que se de la infección.²⁹

Entre los receptores celulares que se han estudiado se encontró que el complejo formado por la proteína M y la GP5 interactúa con moléculas de sulfato de heparina que se encuentra en la superficie de la célula blanco.²⁶

Sin embargo, la presencia de sulfato de heparina no es indispensable ya que se ha encontrado que en estudios que incuban los macrófagos alveolares con heparina o sulfato de heparina la infección se reduce pero no se bloquea completamente.²⁶

Otro mediador que ha sido estudiado es la sialoadhesina, que es una glicoproteína restrictiva de transmembrana tipo 1 que forma parte de de unas lecitinas de unión de ácido sálico llamadas “siglecs”. La expresión de estas sialoadhesinas permite la unión y la internalización del virión por medio de endocitosis mediada por clatrina.²⁶

Después de que el virus es internalizado entra a la ruta endocítica y para que la infección correcta se lleve a cabo, se requiere la liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula infectada. Para que la liberación del genoma se lleve a cabo es necesario que el pH se encuentre en un rango de 6.0 a 6.5 lo que sugiere que se libera cuando se encuentra en los endosomas tempranos donde se encuentra con CD163, que se vuelve un factor crucial para la liberación del genoma del virus.²⁶

El receptor CD163 es una glicoproteína transmembranal tipo 1 que se expresa principalmente en las células de la línea de monocitos o macrófagos. Su mecanismo exacto de acción en la infección por el virus de PRRS no se conoce pero se sabe que participa como un mediador de la entrada del virus.²⁶

Otros mediadores que podrían estar involucrados en la infección de las células por el virus de PRRS son las proteasas celulares, la vimentina de simio y el CD151.²⁶

El daño celular que causa el virus comienza al inducir apoptosis directa e indirecta en las células que se encuentran próximas a la célula que fue infectada, siendo en su mayoría macrófagos. En estudios realizados en líneas celulares Cos-1 de simio se observó que el producto genómico del ORF 5 causaba apoptosis en estudios *in vitro* lo que sugiere que podría funcionar igual *in vivo*.²⁹

La producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos infectados favorece la atracción de leucocitos, el inicio de la respuesta inmune y disminuye la replicación viral, pero también ocasiona un aumento en la permeabilidad vascular que conlleva a edema pulmonar y constricción bronquial. Las citocinas que se producen son: Interferon gamma (IFN-gamma), factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa), Interleucina-1(IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-12 (IL-12).²⁹

La replicación del virus de PRRS en órganos linfoides se asocia a la activación de células B policlonales que se aprecia generalmente por una hiperplasia linfoide.²⁹

En un estudio realizado por Lemke *et al.* (2004), la inoculación del virus de PRRS en cerdos gnotobióticos provocó una hiperplasia linfoide, niveles elevados de toda clase de inmunoglobulinas, circulación de complejos inmunes y la inducción de anticuerpos contra antígenos de golgi.⁵⁰

Diagnóstico.

Tomando en cuenta los signos clínicos, como la falla reproductiva y problemas respiratorios en cerdos de todas las edades se hace un diagnóstico presuntivo de la presencia del virus en una granja, sin embargo la similitud entre estos signos clínicos con los causados por otros patógenos y la falta de lesiones específicas ocasionadas por el virus, obligan a utilizar pruebas específicas para un diagnóstico definitivo.⁵¹

El diagnóstico del virus de PRRS se basa principalmente en la detección de anticuerpos contra el virus (serología), la Reacción en cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT PCR) o el aislamiento viral.^{51, 52}

La serología ha sido una herramienta útil para determinar la prevalencia de PRRS en piaras infectadas como una base para implementar medidas de control. Las primeras pruebas serológicas fueron realizadas a principios de los años 90 utilizando pruebas de

inmunofluorescencia indirecta. En los siguientes años se detectó que entre el 74% y el 84% de las pjaras fueron seropositivas al virus de PRRS.⁵³

Actualmente se utilizan las técnicas: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFA) y seroneutralización del virus (VSN). Existen varios paquetes comerciales para diagnóstico de PRRS, como uno de ELISA indirecto (Hipra, Girona) y uno de bloqueo (Bio-Vet, Quebec), pero la mayoría de los laboratorios emplean la ELISA PRRS IDEXX, del que existen datos de sensibilidad del 100% y especificidad del 99%, y un valor (S:P) de 0,4 indica que la población es positiva.⁵⁴

En el caso del virus de PRRS, el aislamiento viral es el mejor método para determinar si la infección es ocasionada por éste agente; el virus se puede aislar del pulmón, los ganglios linfáticos, las amígdalas, o mediante cultivo de tejidos.⁵⁴ El virus presenta una especificidad restringida en cuanto a la célula huésped para los cultivos celulares. Para realizar el aislamiento viral, generalmente se utilizan macrófagos alveolares de pulmón (PAM) o células CL2621. Sorprendentemente, ciertas cepas pueden sólo ser obtenidas de las células CL2621 y no se replican en PAM (Bautista *et. al.*, 1993). Las cepas europeas del virus de PRRS tienen que ser adaptadas a las células CL2621 por pases múltiples.²⁴

Por otra parte, una prueba diagnóstica que se base en la detección y el análisis del ADN podrá ofrecer una identificación más precisa del agente.⁵⁵

Las pruebas que actualmente se utilizan para la identificación del virus son la, RT-PCR (por las siglas de transcriptasa reversa, reacción en cadena de la polimerasa), la secuenciación y el análisis del polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP).⁵⁴

En la prueba de RT-PCR el ARN viral se convierte en ADN complementario por la enzima RT y luego es amplificado por la enzima Taq polimerasa. Esta prueba es una técnica rápida, con una elevada especificidad y sensibilidad que resulta de utilidad para la detección del virus en el semen ya que éste es tóxico para los sistemas de cultivo de tejidos.⁵²

La historia sobre la técnica de RT PCR comienza en 1971, con un artículo publicado por Kleppe *et. al.*, en el *Journal of Molecular Biology*, quien describió por primera vez un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN con oligonucleótidos *in vitro*.⁵⁶ Sin embargo no recibió mucha atención, y la invención de la reacción en cadena de la polimerasa en 1983 se atribuye a Kary Mullis, quien ganó el Premio Nobel de química en 1993 por su trabajo en PCR.^{57, 58}

En la revista *Scientific American*, Mullis resumió el procedimiento: "Comenzando con una única molécula del material genético ADN, la PCR puede generar 100 billones de moléculas iguales en una tarde."⁵⁹

La RT-PCR permite una rápida detección y genotipificación del virus, pero la alta variación que presenta el virus de PRRS puede influenciar en los resultados obtenidos, por lo que se deben diseñar cuidadosamente los oligonucleótidos que se van a utilizar y principalmente que se unan a regiones conservadas.⁵²

Algunos oligonucleótidos que se han utilizado en diferentes estudios para la RT PCR se listan en el Cuadro 2 y 3:

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en diferentes estudios para la detección del ORF5.

Oligonucleótido ORF5 F	Oligonucleótido ORF5 R 5'-3'	Posición	Estudio
5'-3'			
TGA TCA CAT TCG GTT GCT	GGG CGT ATA TCA TTA TAG GTG	13320 -14079	Doorsselaere JV, 2011

TGT GAA TTC ATG TTG GGG	CCA CTC GAG CCT TTT GTG GAG CCG	NE	Wu J, 2009 ⁶
AAA TGC TTG ACC	TGC TAT		
CCG TCT GTG ATG AGR TGG	GGA YAC TTT TAG GGC RTA TAT CAT	NE	Kim S-H, 2010 ⁹
GC (cepa europea)	(cepa europea)		

NE: No especificada en la referencia

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados en diferentes estudios para la detección del ORF

7.

Oligonucleótido ORF7 F 5'-3'	Oligonucleótido ORF7 R 5'-3'	Posición	Estudio
TGG CCCC TGCCC AIC ACG	TCG CCC TAA TTG AA TAGG	14328- 14946	Doorselaere JV, 2011 ⁵²
	TGA		
TGG TCC TAA CGG TTC GGA	GTG AGC TGA GTA TTT TGG	NE	Wu J, 2009 ⁶
AGA AAC	GCG TGT		
AGT CCA GAG GCA AGG	TCA ATC AGT GCC ATT CAC	14970-15306	Truyen U, 2006 ⁵¹
GAC CG (cepa americana)	CAC (cepa americana)		
ATG ATA AAG TCC CAG	CTG TAT GAG CAA CCG	14684-14903	Truyen U, 2006 ⁵¹
CGC CAG (cepa europea)	GCA GCA (cepa europea)		
GCC GGG ATC CAT GGC	GCC GGG ATC CTT AAC TTG	NE	Nam E, 2009 ²²
CGG TAA AAA CC	CAC CCT G		
TAC ATT CTG GCC CCT GCC	TTA ATT TCG GTC RCA TGG	NE	Kim S-H, 2010 ⁹
CA (cepa europea)	TTC Cepa europea)		

NE: No especificada en la referencia

Las técnicas de RT-PCR en conjunto con RFLP, pueden indicar cambios en el genoma desde la pérdida de un par de bases hasta cambios en segmentos genómicos mayores.⁵⁴

La técnica de RT-PCR RFLP no solo es de utilidad para la identificación del virus, también se han desarrollado para la tipificación y la identificación entre cepas de campo y cepas provenientes de la vacuna comercial.⁶⁰

La secuenciación del genoma es la herramienta más adecuada para identificar si existen cambios de bases que pudieran estar asociados al cambio de antigenicidad entre cepas virales. Los marcos de lectura abiertos (ORFs) mas estudiados en el virus de PRRS son

el ORF 5 y ORF 7, sin embargo es necesario un par de oligonucleótidos específicos adecuado para poder obtener el amplicón deseado sin omitir las muestras positivas.⁵⁴

Cuando se realiza el diagnóstico con la técnica de RT-PCR es importante considerar que la agrupación de muestras en pools de hasta 10:1 puede proveer resultados comparables a pools de 5:1 en cuanto a nivel de detección y ayuda a reducir los costos de las pruebas.⁶¹

Control

La prevención y el control de la enfermedad se basan en una serie de manejos en combinación con el uso de la vacuna.

La producción de cerdos destetados negativos al virus del PRRS y la eliminación del virus de los animales reproductores han sido métodos utilizados exitosamente para el control del virus en las granjas, así como el cierre del hato, la vacunación masiva y el movimiento de animales sin la infección a áreas limpias.⁶²

Los modelos epidemiológicos pueden ayudar a mejorar el control de patógenos a través de la evaluación de la eficacia de medidas de control en varias escalas. Puesto que los movimientos de animales son una cuestión clave para la propagación de patógenos.⁶³

En los últimos años se ha encontrado evidencia que sugiere que la heterogeneidad del virus de PRRS afecta la eficiencia de la vacunación.^{9, 52} Al parecer, las vacunas solo son eficaces contra el virus cuando éstas y el virus presente en el animal tienen un alto grado de homología. Esta situación ocasiona que sea esencial conocer las cepas del virus que circulan en una granja para escoger la vacuna adecuada para su control.⁵²

Recientemente se han reportado brotes en los EUA de una forma grave de PRRS que se caracteriza por aborto y alta mortalidad en cerdas gestantes. Esta forma de PRRS ha sido nombrada como síndrome de aborto y mortalidad de la cerda, PRRS atípico, PRRS

severo y PRRS agudo. Muchas de las piaras afectadas fueron vacunadas, lo que sugiere que las vacunas actuales para PRRS no confieren el 100% de protección.¹³

A pesar de que no se ha logrado erradicar el virus de PRRS, cabe señalar que el agente causal se identificó hace tan sólo unos 20 años. En comparación, el virus de la pseudorabia (PRV) fue descubierto en cerdos en 1909 logrando casi completamente su erradicación en el año 2005, el virus de la peste porcina clásica (PPC / cólera del cerdo) se reportó por primera vez en 1810 y su erradicación fue casi completada en los EUA. entre 1962 y 1976 y la brucelosis se identificó en 1887 y se esta logrando su erradicación hasta ahora. En estos casos, entre 100 a 200 años pasaron antes de que se lograra la erradicación después de que los agentes causales fueran identificados.⁶⁴

Los esfuerzos coordinados para controlar o eliminar el virus de PRRS se están volviendo más frecuentes en todo el mundo. En los EE.UU., el control del PRRSV fue iniciado por el USDA en el año 2004, a través de las coordinaciones de Programas de Agricultura (CAP1 y CAP2) están diseñado para utilizar "el talento colectivo de los interesados de la comunidad de científicos, médicos veterinarios, productores de carne de cerdo y sus aliados investigadores de la industria para desarrollar estrategias innovadoras que reduzcan impacto de PRRS y conducir a la erradicación del virus." La investigación sobre vacunas que sean efectivas contra una amplia variedad de cepas del virus de PRRS y que puedan ser diferenciadas de las cepas de campo debe continuar.⁶⁴

Las actuales estrategias para el control de PRRS no son completamente efectivas, por lo que las pérdidas asociadas al virus continuarán en el futuro. Se debe continuar con la investigación utilizando los avances tecnológicos (vacunas y pruebas diagnósticas) para mejorar nuestra comprensión de las características ecológicas y epidemiológicas del virus de PRRS con el fin de prevenir los efectos clínicos.²⁰

JUSTIFICACIÓN

La variabilidad del virus ha impedido un diagnóstico preciso de la enfermedad y esto ha generado complicaciones en las estrategias de control implementadas en diferentes granjas de nuestro país y de otras partes del mundo. En éste estudio se determinó el número de muestras positivas al virus de PRRS por medio de la prueba de RT-PCR usando oligonucleótidos específicos diseñados para el ORF 5 y el ORF 7, que nos permiten tener una herramienta confiable para el diagnóstico evitando obtener resultados falsos negativos.

HIPÓTESIS

Con la técnica de RT-PCR usando diferentes pares de oligonucleótidos diseñados de acuerdo a las variantes genéticas que presentan los virus reportados alrededor de todo el mundo se pueden identificar muestras positivas con linaje americano, europeo o cepas vacunales. A su vez los oligonucleótidos diseñados evitarán dar resultados falsos negativos y nos permitirán detectar la distribución de las cepas en las diferentes zonas porcícolas de nuestro país.

OBJETIVOS

- 1.-Diseñar oligonucleótidos específicos para la detección del *arterivirus porcino* con linaje europeo o americano, dirigidos al marco de lectura abierto 5 (ORF5).
- 2.-Diseñar un par de oligonucleótidos dirigidos al marco de lectura abierto 7 (ORF 7).
- 3.-Detectar muestras positivas al virus de PRRS de tejidos provenientes de diferentes estados de la República Mexicana.
- 4.- Identificar en un mapa geográfico la distribución de las variantes encontradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Diseño de Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados en el programa ClonManager Versión 7.0, una vez realizado la alineación de más de 170 secuencias de linaje americano reportadas en diferentes partes del mundo, así como más de 50 secuencias de linaje europeo (Figura 4). Cada uno de los oligonucleótidos fue evaluado en el programa PRIMER usando los criterios de evaluación siguientes: (Figura 7-12)

- Que no formen dímeros
- Que no formen estructuras secundarias
- Que no contengan más de tres bases iguales consecutivas
- Que presenten un porcentaje de GC entre el 45 y 60%
- Que la temperatura de alineación sea igual para ambos oligonucleótidos
- Que no sean complementarios

Los oligonucleótidos internos diseñados para el ORF 5 de la cepa americana en PCR anidado no cumplen el criterio de no contener menos de tres bases iguales consecutivas.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante el análisis y alineamiento de las siguientes secuencias (Cuadro 4).

Una vez diseñados los oligonucleótidos y cumplidos todos los criterios planteados, se usó el programa Basic Local Alignment Sequence Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para validar su especificidad única hacia secuencias de PRRS, así como la especificidad del linaje origen (Figura 13-15).

Una vez realizado el análisis en la comparación con las secuencias en el Banco Genético Mundial (GeneBank) por medio del BLAST, se obtuvieron los oligonucleótidos utilizados (Cuadro 5 y 6).

Muestras

Las muestras procesadas fueron obtenidas en rastros y en diferentes granjas de varios estados de la República Mexicana, las cuales se describen en la Cuadro 7.

Los animales a partir de los cuales se obtuvieron las muestras, fueron aquellos que previo al sacrificio presentaban sinología respiratoria y posterior al sacrificio presentaban lesiones visibles en pulmón. La mayoría de las muestras están conformadas por varios tejidos de diferentes animales formando lo que se conoce como “pool”, pero todos están formados por muestras de una misma granja.

Estas muestras fueron sometidas al proceso de extracción de RNA descrito a continuación.

Extracción de RNA.

El procedimiento de extracción de RNA se llevó a cabo por el método de trizol descrito (Gibco Life Technologies 1996).

La muestra de tejido se pulveriza con nitrógeno líquido en un mortero estéril y se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 ml, a la cual se le adicionan 700 µl de Trizol, se mezcla perfectamente hasta diluir la muestra y se deja incubar por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se adicionan 200 µl de cloroformo puro, se agita en vortex durante 15 segundos y se deja incubar a 4°C durante 10 minutos para después ser centrifugado a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante, se deposita en otro tubo eppendorf de 1.5 ml y se le adiciona 1 volumen de isopropanol para ser incubado por 15 min a

4°C. Se centrifuga a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C y una vez separado el RNA se lava la pastilla (RNA) con 200 µl de etanol al 70%, mediante una centrifugación a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. Una vez seca, la pastilla de RNA se resuspende en 20 µl de H₂O DEPC (0.1%).

RT-PCR

La técnica de PCR se realizó con el kit RT-PCR One Step Invitrogen® utilizando los siguientes iniciadores y temperaturas de amplificación para cada uno de los marcos de lectura abierto.

La reacción de secuencia se optimizó a 10 µl, manteniendo el equilibrio entre los reactivos incluidos en la mezcla, quedando de la siguiente manera:

1. Agua libre de RNAsas.....3.3 µl
2. 5x buffer.....2 µl
3. Q buffer.....2 µl
4. DNTPs.....0.4 µl
5. Oligonucleotidos (F+R).....0.4 µl
6. Mix de Enzimas.....0.4 µl
7. Muestra (extracción de RNA)....1.5 µl

Las temperaturas utilizadas para la amplificación de los oligonucleótidos dirigidos al ORF5 (Cuadro 5) son:

- Un ciclo de 50 °C durante 30 minutos
- Un ciclo de 95° por 15 minutos
- 40 ciclos:
 - 94 °C durante 30 segundos

- 54 °C durante 60 segundos
- 72 °C durante 60 segundos
- Un ciclo de 72 °C durante 10 minutos
- Se mantiene a 4° indefinidamente

Las temperaturas utilizadas para la amplificación con los oligonucleótidos para el ORF7

(Cuadro 6) son:

- Un ciclo de desnaturalización a 50 °C durante 30 minutos
- Un ciclo de 95° por 15 minutos
- 40 ciclos:
 - 94 °C durante 30 segundos
 - 58 °C durante 60 segundos
 - 72 °C durante 60 segundos
- Un ciclo de 72 °C durante 10 minutos
- Se mantiene a 4° indefinidamente

Una vez obtenido el producto de PCR para identificar las muestras positivas se colocan 5 µl de éste, con 2 µl de buffer de muestra en un gel de agarosa al 2% y se corre a 90 volts en cámara de electroforesis horizontal durante 60 minutos. Posteriormente el gel se tiñe con bromuro de etidio y se visualiza en un transiluminador de Bio Imaging Systems por medio de un “Sistema de tratamiento de imágenes Gel Logic 112” de Kodak identificando los amplicones esperados con ayuda de los marcadores de peso molecular pUC Mix 8®.

RESULTADOS

De las 69 muestras obtenidas para su procesamiento se encontraron 47 positivas (68.12%); Todos los Estados de donde se obtuvieron muestras tuvieron resultados positivos, independientemente de los oligonucleótidos utilizados (Cuadro 8).

Muestras Positivas hacia el ORF7

Los oligonucleótidos ORF7-F y ORF7-R detectaron a 34 de 69 muestras como positivas, incluyendo las muestras 2, 4, 5, 7, 21, 25, 26, 27, 28, 30, 37, 39, 40, 41, 42, 44, 46, 51, 56, 62, 69, 77, 78, 84, 85, 87, 88, 95, 96, 98, 101, 104, 108 y 112 correspondientes a los estados de Hidalgo, Guanajuato, Puebla, Morelos, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Veracruz, Oaxaca, Yucatán y Sonora.

Muestras Positivas hacia ORF5 con RT-PCR Anidado

Los oligonucleótidos utilizados para la detección del ORF5 anidado detectaron a 28 de 69 muestras como positivas, incluyendo las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 16, 17, 18, 21, 26, 27, 28, 30, 34, 36, 51, 56, 68, 69, 84, 85, 86, 93, 94 y 96 correspondientes a los estados de Hidalgo, Guanajuato, Puebla, Veracruz, Morelos, Jalisco, Estado de México, Yucatán, Guerrero, Distrito Federal y Tlaxcala.

Muestras Positivas hacia el virus Americano (ORF5-FA y ORF5-RA)

De manera independiente los oligonucleótidos ORF5-FA y ORF5-RA detectaron a 4 de 69 muestras como positivas, incluyendo las muestras 2, 4, 5 y 7 correspondientes a los estados de Hidalgo, Guanajuato y Puebla (Figura 16).

Muestras hacia el virus Europeo

Los oligonucleótidos ORF5-FL y ORF5-RL no produjeron ningún resultado positivo por lo que no se encontró presencia de virus con linaje europeo.

Amplicones obtenidos hacia ORF7

En el Cuadro 9 se observa que los oligonucleótidos diseñados fueron capaces de discernir entre muestras positivas a los virus vacunales o virus de campo, ya que, tomando los oligonucleótidos para ORF 7, las muestras 21, 25, 26, 27, 28, 30, 37, 39, 40, 41, 42, 51, 56, 62, 95, 96, 98, 101 y 104 presentan un amplicón de 380 pares de bases (pb) que corresponde al amplicón del virus vacunal que utilizamos como control, mientras que las muestras 2, 4, 5, 7, 44, 46, 77, 78, 84, 85, 87, 88, 108 y 112 muestran un amplicón de tamaño distinto lo que sugiere que la cepa de campo es diferente a la vacunal. La figura 17 muestra un ejemplo de estos resultados al demostrar la variación entre la cepa vacunal y las muestras 44 y 46, mientras que en la Figura 18 se observan muestras con el mismo tamaño de amplicón que la vacuna.

Amplicones obtenidos hacia ORF5 (RT-PCR Anidada)

En el caso de los oligonucleótidos para la PCR anidada, se obtiene un amplicón para la vacuna de 380 pb y se encuentran diferentes tamaños de amplicones en las muestras de campo, por ejemplo, en la Figura 19 se observa de forma clara que el amplicón que se forma a partir de la vacuna no es el mismo que el de las muestras: las muestras 16, 18 y 21 tienen un solo amplicón de 280 pb, y las muestras 17 y 26 presentan dos amplicones de 450 y 242 respectivamente. La Figura 20 muestra otro ejemplo de ésta diferencia presente entre las muestras de campo y la vacuna, donde las muestras 84, 85 y 86 presentan tres patrones distintos de amplicones, siendo la 86 la única similar a la vacuna. Sin embargo, el amplicón que más se presenta en el total de las muestras

positivas con este par de oligonucleótidos es de 280 pb, se encuentra en las muestras: 8, 9, 16, 17, 18, 21, 26, 56, 93, 94 y 96; y se puede observar en la Figura 19.

Amplicones obtenidos hacia ORF5 (cepa americana)

Los oligonucleótidos diseñados para detectar el ORF 5 de la cepa Americana, sin el PCR anidado, solo detectaron cuatro muestras positivas, las cuales tienen un solo amplicón de 650 pb, el cual difiere del amplicón que presenta la vacuna que tiene un peso molecular de 750 pb que se muestra en la Figura 16.

Los oligonucleótidos también tienen la capacidad de diferenciar entre virus con linaje americano o europeo, sin embargo en este estudio no se observa la presencia de cepas con linaje europeo, ya que ninguna de las muestras positivas presentó un amplicón de 607 pares de bases esperadas con estos oligonucleótidos.

Distribución de las variantes encontradas (Cuadro 9 y Figura 28)

Tomando en cuenta los tres oligonucleótidos que nos dieron muestras positivas y que evalúan los 2 ORFs (5 y 7) tenemos que la muestra 1 y 3 correspondiente a los estados de Hidalgo y Guanajuato del año 2011 presentan los mismos amplicones para el oligonucleótido anidado siendo 3 de 700, 620 y 400 pares de bases y no presentaron ningún amplicón para el ORF 7 (Figura 21).

Las muestras 4, 5 y 7 provenientes de los estados de Guanajuato y Puebla presentan entre ellas los mismos amplicones que son: para el oligonucleótido ORF 7: 800, 530, 450 y 250, para el oligonucleótido anidado: 700, 620 y 400 y para el americano: 650 y 750 (Figura 22).

Es importante señalar que presentan los mismos amplicones si solo tomáramos en cuenta los oligonucleótidos anidados de las muestras 1, 2 y 3 (de los estados de Hidalgo y Guanajuato)

Las muestras 8 y 9 provenientes del estado de Veracruz y las muestras 16, 18, 93 y 94 provenientes de los estados de Puebla, Morelos, D.F. y Tlaxcala respectivamente presentan un solo amplicón para el oligonucleótido anidado de 280 pb (Figura 23), mientras que la muestra 17 del estado de Puebla presentó dos amplicones para el oligonucleótido anidado de 280 y 450 pb.

Las muestras 21, 56 y 96 provenientes de los estados de Morelos, Yucatán y Guanajuato respectivamente, presentan el mismo amplicón de 280 pb para el oligonucleótido anidado, pero presentan también un amplicón de 380 pb para el ORF 7 (Figura 24).

Las muestras 25 y 37 de estado de Jalisco, 39 y 40 de Michoacán, 41, 42 y 88 de Veracruz, 87 del Estado de México, 95 de Puebla y 98, 101 y 104 de Hidalgo presentaron un solo amplicón para el ORF 7 con un peso molecular de 380 pb (Figura 25).

Las muestras 27 y 30 provenientes de los estados de Michoacán y el Estado de México presentan el mismo amplicón de 380 pb para el ORF 7 y un amplicón de 242 pb para el oligonucleótido anidado (Figura 26).

La muestra 108 del estado de Sonora y la muestra 112 del estado de Jalisco presentan un solo amplicón de 400 pb para el oligonucleótido ORF7 (Figura 27).

Se encontraron muestras del mismo estado que coinciden parcialmente entre ellas como son a muestra 84, 85 y 86 del estado de México las cuales presentan amplicones de 350 y 250 pb pero la muestra 84 y 85 presentan un amplicón extra de 489 y 400 pb respectivamente para el oligonucleótido americano y para el caso del oligonucleótido

ORF 7 la muestra 84 presenta un amplicón de 380 pb y la muestra 85 presenta dos amplicones uno de 380 y otro de 400.

Las muestras 68, 69, 77, 78, 84, 85 y 86, que fueron también positivas a al menos un par de oligonucleótidos pero no corresponden a un patrón de presentación como los descritos anteriormente, lo cual sugiere que son virus diferentes que se han encontrado en este estudio como casos aislados.

La relación de muestras procesadas por estado de la República se observan en el cuadro 10. El estado de donde se obtuvieron más muestras fue Veracruz, en el cual se presentó una frecuencia de muestras positivas del 58.33%, seguido con 9 muestras obtenidas del estado de México con 71.77% de muestras positivas. De los estados de Jalisco y Puebla se obtuvieron 8 muestras de cada uno de ellos y se encontró el 62% y 50% de muestras positivas, respectivamente. De las 7 muestras procedentes del estado de Hidalgo 6 de ellas fueron positivas (85.71%), de las 6 muestras del estado de Guanajuato el 100% fueron positivas. Se analizaron 6 muestras del estado de Sonora y 3 de ellas resultaron positivas (50%). En Michoacán 2 de las 3 muestras procesadas fueron positivas (66.6%). Las dos muestras obtenidas de cerdos del Estado de Morelos fueron positivas (100%). De las 2 muestras obtenidas de cada uno de los siguientes estados, D.F., Guerrero y Tlaxcala, 1 de ellas fue positiva. De la muestra de Yucatán, así como de Oaxaca ambas resultaron positivas.

En el cuadro 11 se describe el tipo de muestra procesada y su porcentaje de frecuencia, observando que de las 41 muestras procesadas provenientes de pulmones, 23 de ellas fueron positivas al virus PRRS (57%), de los tejidos pulmonares macerados con linfonodos el 75% fue positivo (12 de 15 muestras). El 100% de las muestras de hisopo nasal fueron positivos (9 de 9) y de las 2 muestras procesadas de tejido traqueal 1 de

ellas fue positiva. Se trabajó una muestra de cornete nasal así como una muestra de semen las cuales salieron positivas.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha confirmado que la heterogeneidad de PRRS es cada vez mayor, donde algunos estudios muestran que la variación nucleotídica en el ORF5 entre cepas del virus de PRRS puede ser de 50-60% entre la misma cepa y de hasta 80% entre cepa americana y europea; con mayores diferencias antigénicas observadas en el extremo 5', lo cual sugiere que los oligonucleótidos diseñados en esta región pueden generar resultados falsos negativos.^{6, 7, 23, 25, 31}

El ORF 7 es el segundo gen más conservado con una identidad del 95 al 100% entre la misma cepa y variaciones de hasta 74% entre la cepa americana y europea.^{23, 25}

Debido a esto, el diagnóstico correcto del virus de PRRS se ha vuelto un reto y a pesar de que rutinariamente se utilizan distintos métodos de RT PCR para su diagnóstico los resultados aun no son completamente confiables. En un estudio realizado por Truyen *et al.* (2006) en el que evaluaron 16 laboratorios que realizan la técnica de PCR para el diagnóstico del virus de PRRS, encontraron que la precisión en el diagnóstico es variable entre laboratorios, siendo el error más común el diagnóstico de falsos negativos; Genzow *et al.* (2011) coinciden con estos hallazgos.^{51, 65} Sin embargo, no hay reportes de la evaluación de estos métodos con un uso complementario de oligonucleótidos que pueda proveer un diagnóstico más preciso.

El presente estudio se basa en el correcto diseño de oligonucleótidos específicos para las cepas americana y europea del virus de PRRS y para los dos ORFs comúnmente estudiados (ORF5 y ORF7)⁸ para detectar muestras positivas al virus de PRRS provenientes de diferentes estados de la República Mexicana.

Como se observa en los resultados del Cuadro 8, la RT PCR dirigida al ORF7 fue la que obtuvo mayor cantidad de muestras positivas, lo que sugiere que el diagnóstico de laboratorio para el virus de PRRS debería estar enfocado a la detección del ORF7 en

lugar del ORF5 que presenta variabilidad para dar resultados confiables. En los estudios realizados por Kim S-H, (2010)⁹ y Nam E, (2009)²² se utiliza previamente una RT PCR con oligonucleótidos diseñados para el ORF 7 para detectar de entre todas las muestras aquellas que son positivas y que van a ser utilizadas en el estudio. Aunado a ello, se ha reportado que la variación genética que presenta el virus de PRRS entre la cepa europea y la cepa americana, e incluso dentro de ellas mismas, ha generado que el diagnóstico correcto del virus sea un reto.^{22, 51}

En el Cuadro 8 se observa que algunas muestras positivas con los oligonucleótidos diseñados para ORF7 no amplifican con los oligonucleótidos diseñados para ORF5, lo cual confirma que la alta variación genética presente en el ORF 5 afecta los resultados del diagnóstico, como podemos ver en las figuras 17 y 18 donde se observan 3 patrones diferentes de amplificación utilizando el mismo par de oligonucleótidos para el ORF7. Utilizando éstos oligonucleótidos, el tamaño de amplicón que más se obtuvo fue igual al que presenta la vacuna, sin embargo, hay muestras que presentan amplicones con diferentes pesos moleculares (Figura 17) lo cual sugiere posibles variaciones genéticas. Entre los resultados obtenidos se encuentran tres tamaños de amplicones que son los más comunes (380 pb, 330 pb y 400 pb) indicando la presencia de tres variantes genéticas virales. Bonilauri *et al.* (2007) reportaron que a pesar de la poca diversidad en secuencias del ORF 7, utilizaron exitosamente la secuenciación para diferenciar cepas entre tres granjas y concluyen que la identificación del ORF7 podría funcionar como una herramienta para monitorear la posible distribución regional de distintas cepas.⁶⁶

También se observa en la Cuadro 8 el caso contrario; es decir, que no todas las muestras detectadas con los oligonucleótidos diseñados para la RT PCR anidada del ORF5 fueron amplificadas con los oligonucleótidos diseñados para ORF7 lo cual indica que el gen

ORF7 de esas muestras puede ser diferente a las que fueron detectadas por ambos oligonucleótidos.

En estudios realizados acerca de la variabilidad del virus de PRRS, se ha hecho aparente que la diversidad genética del virus puede existir entre granjas del mismo sistema de producción, en la misma granja e incluso en el mismo individuo;^{31, 67, 68} sin embargo, esta variabilidad no está necesariamente relacionada con proximidad geográfica, procedencia de la muestra (semén, pie de cría) o presentación clínica.⁶⁷

La variación del virus de PRRS se debe a múltiples razones, entre ellas la delección de bases o la recombinación viral que a su vez lleva a cambios en los aminoácidos. Wu *et al.* (2009) encontraron variaciones en la secuencia de Nsp2 al estudiar varios aislamientos de virus emergentes en China y asume que la delección de éstos aminoácidos en dos distintas posiciones está relacionado con la alta patogenicidad de las cepas encontradas en éste país; por su parte, Seong-Hee *et al.* (2010) encontraron en aislamientos virales de Korea del Sur una delección de 19 aminoácidos en la Nsp2, la cual también relacionan con cambios en la patogenicidad. En ambos estudios se habla de mutaciones en el cambio de bases con su consecuente cambio de aminoácidos en el ORF5, posiblemente ocasionado por recombinaciones genéticas.^{6, 9, 69} En el caso de éste estudio, se infiere que la variación en el tamaño de amplicones está dada por la variabilidad del virus ocasionada en su mayor parte por delecciones.

El nivel de variabilidad o diversidad del virus de PRRS puede afectar los métodos diagnósticos disponibles actualmente y la eficacia de las vacunas contra el virus como lo menciona Stankencius *et al.* en el 2006.⁷⁰

Los resultados del presente estudio muestran que los oligonucleótidos diseñados utilizados de forma complementaria pueden otorgar un diagnóstico específico y que en México la circulación de diferentes cepas también se está evidenciando aún sin llegar a

estudios de secuenciación, como lo reportados por Lara *et al.* (2001) y Batista *et al.* (2004).²³

En cuanto a la presencia de virus europeo en nuestro país, nuestro estudio no detectó ninguna muestra positiva, sin embargo, no se contaba con un control positivo con el cual comprobar la eficiencia de los oligonucleótidos o del protocolo de PCR, aunque se hicieron pruebas en gradientes de temperatura con estos oligonucleótidos. En un estudio realizado en la universidad estatal de Dakota del Sur por Ropp *et al.* (2004), se demostró la presencia de la cepa europea en EUA al comparar las cepas aisladas con la cepa Lelystad presentando un 95 a 96% de identidad y solo un 70% de identidad con la cepa americana VR2332.⁶⁹ Para llegar a un resultado más concluyente se sugieren estudios posteriores en los cuales se pueda contar con algún control positivo.

Los resultados obtenidos con este estudio confirman la presencia del virus de PRRS en las zonas muestreadas y sin duda el uso de estos oligonucleótidos específicos de forma conjunta permiten identificar a todas las muestras verdaderamente positivas, a los virus vacunales circulantes, así como a otros virus que están circulando y que no están relacionados a virus vacunales o a cepas americanas ni europeas; quizá sean nuevos virus que han evolucionado y que presentan mutaciones específicas que impide que sean reconocidos por oligonucleótidos específicos diseñados hacia linajes americanos o europeos, por lo que es necesario secuenciar para profundizar en el conocimiento de la cepa del virus de PRRS que se encuentra en el país y que permitan el diseño de vacunas que nos ayuden a implementar medidas adecuadas de control en nuestros sistemas de producción.

CONCLUSIONES

El uso de la técnica de RT-PCR sirvió para determinar las muestras positivas al virus de PRRS sin importar el tipo de muestra.

Con nuestros resultados podemos concluir que el uso de un solo par de oligonucleótidos hubiera generado resultados falsos negativos. A su vez la obtención de amplicones de diferente tamaño nos demuestra la variación que presenta el virus de PRRS en nuestro país.

La profundización en el análisis de los virus identificados mediante la secuenciación es indispensable para conocer los sitios del genoma que presentan variación nucleotídica, que a su vez están generando cambios de aminoácidos de las proteínas de superficie que estén involucrados en la generación de cepas de alta, mediana o baja patogenicidad, ya que se ha encontrado virus circulante en poblaciones porcinas a una alta concentración (1×10^6) sin evidencia clínica de ello.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhoua Y-J, Yua H, Tianb Z-J, Li G-X, Haob X-F, Yana L-P. Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008. *Vir Res* 2009; 144:136–144.
2. Kim AHS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, and Frey ML. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 1993; 133:477-483.
3. Macías MJ, Yépiz-Plascencia G, Osorio F, Pinelli-Saavedra A, Reyes-Leyva J, Hernandez J. Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México. *Vet Méx* 2006; 37 (2): 197-208.
4. Tong-Qing A, Zhi-Jun T, Yun-Xia H, Yan X, Yi-Feng J, Peng J-M, *et al.* Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus attachment is mediated by the N-terminal domain of the sialoadhesin receptor, *Vet Micro* 2010; 143:371-378.
5. Yufeng L, Xinglong W, Ping J, Wen C, Xianwei W. Genetic analysis of two porcine reproductive and respiratory síndrome viruses with different virulence isolated in China. *Arch Virol* 2008; 153:1877-1884.
6. Wu J, Li J, Tian F, Ren S, Yu M, Chen J, *et al.* Genetic variation and pathogenicity of highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in Chin.; *Arch Virol* 2009; 154:1580-1597.
7. Rossow KD. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet Pathol* 1998 35: 1.

8. Greiser-Wilke I, Fiebig K, Drexler C, Beilage Grosse E. Genetic Diversity of Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig-dense region of North-Western Germany. *Vet Micro* 2010; 143:213-223.
9. Seong-Hee K, In-Soon R, Eun-Jin C, Changhee L, Chang-Hee L, Kyoung-Hyun L, *et al.* A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea. *Vet Micro* 2010; 143:394-400.
10. Zimmerman J. Historical Overview of PRRS Virus. *The PRRS Compendium* (second ed.) 2003; 1-6.
11. Lager WL, Vorwald KM, AC. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7:3-16.
12. Diosdado VF, González-Vega D, Moles-Cervantes LP, Morilla GA, Asociación entre anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico y respiratorio porcino y anticuerpos contra otros patógenos. *Vet Mex* 2004; 35 (2): 147-152.
13. Meng. XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Micro* 2000; 74:309-329.
14. Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robinson D, *et al.* Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR2332). *J Vet Diagn Invest* 1992; 4:127-133.
15. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, *et al.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4:117-126.
16. Takuya I, Masumi T, Takashi N, Yasuo M, Takeo S. Analysis of Open Reading Frame 5 in Japanese Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus

- Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism. *J. Vet. Med. Sci* 2001; 63 (11):1203-1207.
17. Leaflet AS. The Impact of PRRS on the Pig Cost of Production. Iowa State University Animal Industry Report 2005.
 18. Strutzberg-Minder K, Beyerbach M, Tschentscher A, Boehmer J. Analysis of ELISA and PCR testing for PRRS in German pig herds. Lothar Kreienbrock2 Matthias Homuth. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010. Pag. 481
 19. Evans CM, Medley GF Green LE. The impact of respiratory disease on production in the pig industry in Great Britain. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010; p. 152
 20. Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, *et al.* Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227(3):385-92.
 21. Cavanagh D Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 1997; 142(3):629-33.
 22. Eeuri N, Choi-kyu P, Seong-Hee K, Yi-Seok J, Sang-Geon Y, Lee C. Complete genomic characterization of a European Type 1 porcine reproductive and respiratory síndrome virus isolate in Korea. *Arch Virol* 2009; 154:629-638.
 23. Macías MJ, Yépiz-Plascencia G, Osorio F, Pinelli-Saavedra A, Reyes-Leyva J, Hernández J. Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México. *Vet Méx* 2006; 37 (2).

24. Snijder EJ, Meulenber JM. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 1998; 79:961–979.
25. Cho JG, Dee SA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Swine Disease Eradication Center. University of Minnesota College of Veterinary Medicine.
26. Van Breedman W, Delputte PL, Van Gorp H, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol* 2010; 91:1659-1667.
27. Cheon DS, Chae C. Restriction fragment length polymorphism analysis of open reading frame 5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in Korea. *Arch Virol* 2000; 145:1481–1488.
28. Valenzuela J, García M, Bojorquez J. Uso de Vacuna Viva Modificada del Síndrome Reproductivo Y Respiratorio del Cerdo con Ventana Sanitaria de Destetes para la Mejora de Parámetros Productivos en Granja Porcina de Flujo Continuo. Memorias del XLVI Congreso Nacional de AMVEC, A.C., 2009 Julio 22-25 Puerto Vallarta, Jalisco. 158.
29. Straw B, Zimmermann JJ, D’Allaire S, Taylor DJ. Diseases of Swine. Novena edición. Iowa (USA). Blackwell Publishing 2006; pag. 387-417
30. Pitzadeh B, Dea S, 1997, Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78: 1867-1873.
31. Scott A. Dee, Montserrat Torremorell, Kurt Rossow, Carrie Mahlum, Satoshi Otake, Kay Faaberg. Identification of genetically diverse sequences (ORF 5) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a swine herd. *Can J Vet Res* 2001; 65:254-260.

32. Meulenbergh JJ, Petersen den Besten A, de Kluyver E, Moormann RJ, Schaaper WM, Wensvoort G. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 1995; 206:155–163.
33. García AR, Prieto RV, Zunzunegui KD. Aplicación De La Rt-Pcr En Tiempo Real Para El Diagnóstico De Prrs. ISSN: 1988-2688 RCCV Vol. 1 (2). 2007. Disponible en: <http://revistas.ucm.es/vet/19882688/articulos/RCCV0707230646A.PDF>
34. Stadejek T, Skrzypiec E, Chabros K, Pejsak Z, Podgorska K. Comparison of four ELISAs for detection of antibodies against different genetic subtypes of European genotype PRRSV. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010. pag 145.
35. Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. *Veterinary Microbiology* 1997; 55:309-316.
36. Diosdado VF, Morilla GA, González VD, Moles CLP. Asociación entre anticuerpos contra el virus del Síndrome disgenésico y respiratorio porcino y anticuerpos contra otros patógenos. *Veterinaria México* 35 (2) 2004. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2004/vm042f.pdf>
37. Prieto C, Castro JM. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. 2004.
38. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Shaw DP, Goyal SM , *et al.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1992; 4:117- 126.

39. Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol* 1995; 32:361-373.
40. Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW, Murtaugh MP, Morrison RB, Benfield DA, *et al.* Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diag Invest* 1994; 6:3-12.
41. Halbur PG, Miller LD, Paul PS, Meng XJ, Huffman EL, Andrews JJ. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet Pathol* 1995; 32:200-204.
42. Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng X-J, *et al.* Comparison of the Pathogenicity of Two US Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates with that of the Lelystad Virus. *Vet Pathol* 1995; 32:648.
43. Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng X-J, *et al.* Comparison of the Antigen Distribution of Two US Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates with that of the Lelystad Virus. *Vet Pathol* 1996; 33:159.
44. Novosel D, Stadejek T, Chrabos K, Lipej K, Roic B, Jungic A. Histopathological findings in fetuses positive on porcine reproductive and respiratory syndrome by PCR or immunohistochemistry. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010. pag 202
45. Oslage U, Dahle J, Muller T, Kramer M, Beier D, Liess B, Prevalence of antibodies against hog cholera, Aujeszky's disease and "porcine reproductory

- and respiratory syndrome” in feral swine in the federal states Sachsen-Anhalt and Brandenburg. *Disch Tierarztl Wochenschr* 1994; 101:33-38.
46. Cho JG, Dee SA, Deen J, Trincado C, Fano E, Jiang Y, *et al.* The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity on the shedding of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols from experimentally infected pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 2006; 70: 297-301.
47. Edwards S, Robertson IB, Wilesmith JW, Ryan JB, Kilner CG, Paton DJ, *et al.* PRRS (“blue-eared pig disease”) in Great Britain. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 1992; 4:32-36.
48. Gomez-Laguna J, Rodriguez-Gomez IM, Barranco I, Pallares FJ, Salguero FJ, Bernabe A, Carrasco L. IL-10 and TGF β expression in the lung and tonsil of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010* pag. 147.
49. Loemba HD, Mounts S, Mardassi H, Archambault D, Dea S. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 1996; 141:751-761.
50. Lemke C, Haynes J, Spaete R, Adolphson D, Vorwald A, Lager K, *et al.* Lymphoid hyperplasia resulting in immune dysregulation is caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in neonatal pigs. *J Immunol* 2004; 172:1916-1925.
51. Truyen U, Wilhelm S, Genzow M, Schagemann G. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): A Ring Test Performed in Germany to Assess RT-PCR Detection Methods. *J Vet Med* 2006; B 53:68-74.

52. Doorselaere JV, Geldhof M, Nauwynck HJ, Delputte P. Characterization of a circulating PRRSV strain by means of random PCR cloning and full genome sequencing. *Virol J* 2010; 8:160.
53. Morilla A, González-Vega D, Diosdado F, Estrada E. Seroepidemiology Of Prrs In México. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases – Rome June 29th – July 2nd, 2003. Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/3906498/International-Symposium-on-Emerging-and-Re-emerging-Pig-Diseases-RomeMengeling>
54. Done S. Diagnóstico del PRRS (28-12-2004). Veterinary Laboratories Agency. Reino Unido.
55. La biotecnología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y el desarrollo de vacunas. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004; I.1.8:75-98.
56. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 1971; 56:41-361.
57. Mullis K. *Dancing Naked in the Mind Field*. New York: Pantheon Books. 1998.
58. Rabinow P. *Making PCR: A Story of Biotechnology*. Chicago: University of Chicago Press. 1996.
59. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *S Ame* 1990; 262 (4):56-61,64-5.
60. Hugh YC, Alexander H, Carman S, Lloyd D, Josephson G, Maxie MG, Restriction fragment length polymorphism of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses recovered from Ontario farms, 1998–2000. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14: 343–347.

61. Polson D, Hartsook G, Carmichael B. A comparison of individual versus pooled sample testing on pool-level and case-level PRRS virus PCR detection sensitivity and specificity. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010. Pag 206
62. Polson D, Carmichael B, Torremorell M, Hartsook G. Use of stillborn (precolostral) piglets as a sample source to assess viral circulation in PRRSV positive sow herds. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010. Pag. 204
63. Belloc C, Lurette A, Keeling M. Modelling PRRSV control within a pyramidal network of pig movements. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010. Pag 266
64. Hennings J. Progress in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): What we know about PRRSV, from basic to applied science – A historical perspective. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21, 2010:13.
65. Genzow MC, Truyen U, Wilhelm S, Schagemann G. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) a ring test performed in Germany to assess RT-PCR Detection Methods. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark 2006; 2:1.
66. Bonilauri P, Mazzoni C, Merialdi G, Barbieri I, Fallacara F, Dottori M. Use of ORF7 sequencing for differencing PRRSV strains from neighboring farms located in pig dense area in Italy. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark 2006; 2:12.
67. Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Martaugh MJ. Genetic diversity and possible avenues of dissemination of Porcine Reproductive and Respiratory

- syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *J Swine Health Prod* 2004a; 12(4):170-175.
68. Chang C-C, Yoon K-J, Zimmerman JJ, Harmon KM, Dixon PM, Dvarak CM, *et al.* Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J Virol* 2002; 76:4750-4763.
69. Ropp SL, Wees CE, Fang Y, Nelson EA, Rossow KD, Bien M, *et al.* Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol* 2004; 78:3684-3703.
70. Stankencius AP, Cepulis R, Stadejek T. Genetic Diversity of the Belarusian PRRSv in ORF 5. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark 2006; 2:9.

CUADROS

Cuadro 4. Secuencias obtenidas del Banco Genético Mundial (GenBank) utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos con el programa ClonManager Versión 7.0.

No	Cepa	Año	País	No. De Acceso	Especificidad
1	ATCCVR-2332	2000	EUA	U87392 AF030244 U00153	Genoma completo, Cepa Americana
2	LEYPOLYENV	2000	Países Bajos	M96262	Genoma completo, Cepa Europea
3	VR-2332	2003	EUA	AY256686	ORF 7
4	Ibaraki08-6	2010	Japón	AB546114	ORF 5
5	Shizuoka08-1	2010	Japón	AB546118	ORF 5
6	Osaka08-1	2010	Japón	AB546120	ORF 5
7	Osaka08-2	2010	Japón	AB546121	ORF 5
8	Kochi08-1	2010	Japón	AB546123	ORF 5
9	Jpn5-37	2010	Japón	AB546125	ORF 5
10	Vac envelope glycoprotein gene	1998	Dinamarca	AF095499	ORF 5
11	17738B	1998	Dinamarca	AF095501	ORF 5
12	17876	1998	Dinamarca	AF095505	ORF 5
13	18253	1998	Dinamarca	AF095511	ORF 5
14	18683	1998	Dinamarca	AF095513	ORF 5
15	19020	1998	Dinamarca	AF095515	ORF 5
16	19259	1998	Dinamarca	AF095516	ORF 5
17	23317	1998	Dinamarca	AF095518	ORF 5
18	17739	1998	Dinamarca	AF095519	ORF 5
19	PRRSV01	1999	EUA	AF176424	ORF 5

20	PRRSV04	1999	EUA	AF176427	ORF 5
21	PRRSV07	1999	EUA	AF176430	ORF 5
22	PRRSV13	1999	EUA	AF176435	ORF 5
23	PRRSV20	1999	EUA	AF176442	ORF 5
24	PRRSV21	1999	EUA	AF176443	ORF 5
25	PRRSV28	1999	EUA	AF176450	ORF 5
26	PRRSV30	1999	EUA	AF176452	ORF 5
27	PRRSV35	1999	EUA	AF176457	ORF 5
28	PRRSV40	1999	EUA	AF176462	ORF 5
29	PRRSV45	1999	EUA	AF176467	ORF 5
30	PRRSV50	1999	EUA	AF176472	ORF 5
31	PRRSV55	1999	EUA	AF176476	ORF 5
32	PRRSV57	1999	EUA	AF176477	ORF 5
33	V-546	2000	República Checa	AF253535	ORF 5
34	V-503	2000	República Checa	AF253537	ORF 5
35	HZ-X/2003	2004	China	AY450301	ORF 5
36		2003	China	AY513611	ORF 5
37	SE53	2004	Austria	AY615787	ORF 5
38	LU528	2004	Austria	AY615790	ORF 5
39	SE553	2004	Austria	AY615793	ORF 5
40	LU534	2004	Austria	AY615794	ORF 5
41	SE524	2004	Austria	AY615796	ORF 5
42	B13	2004	China	AY633973	ORF 5
43	YA	2004	China	AY633974	ORF 5
44	17198-6	2004	EUA	AY656989	ORF 5
45	MN-184	2004	EUA	AY656992	ORF 5
46	SDSU73	2004	EUA	AY656993	ORF 5
47		2004	Italia	AY730551	ORF 5

48	GP5	2004	China	AY737282	ORF 5
49	IT2	2004	Italia	AY739958	ORF 5
50	IT3	2004	Italia	AY739959	ORF 5
51	IT4	2004	Italia	AY739960	ORF 5
52	IT5	2004	Italia	AY739961	ORF 5
53	IT6	2004	Italia	AY739962	ORF 5
54	IT7	2004	Italia	AY739963	ORF 5
55	IT8	2004	Italia	AY739964	ORF 5
56	IT9	2004	Italia	AY739965	ORF 5
57	IT10	2004	Italia	AY739966	ORF 5
58	IT11	2004	Italia	AY739967	ORF 5
59	IT12	2004	Italia	AY739968	ORF 5
60	IT13	2004	Italia	AY739969	ORF5
61	IT15	2004	Italia	AY739971	ORF 5
62	IT16	2004	Italia	AY739972	ORF 5
63	IT17	2004	Italia	AY739973	ORF 5
64	IT18	2004	Italia	AY739974	ORF 5
65	IT19	2004	Italia	AY739975	ORF 5
66	IT20	2004	Italia	AY739976	ORF 5
67	IT21	2004	Italia	AY739977	ORF 5
68	IT22	2004	Italia	AY739978	ORF 5
69	IT23	2004	Italia	AY739979	ORF 5
70	IT24	2004	Italia	AY739980	ORF 5
71	IT25	2004	Italia	AY739981	ORF 5
72	IT26	2004	Italia	AY739982	ORF 5
73	IT27	2004	Italia	AY739983	ORF 5
74	IT28	2004	Italia	AY739984	ORF 5
75	IT29	2004	Italia	AY739985	ORF 5
76	IT30	2004	Italia	AY739986	ORF 5
77	IT31	2004	Italia	AY739987	ORF 5

78	IT32	2004	Italia	AY739988	ORF 5
79	IT33	2004	Italia	AY739989	ORF 5
80	IT34	2004	Italia	AY739990	ORF 5
81	IT35	2004	Italia	AY739991	ORF 5
82	IT36	2004	Italia	AY739992	ORF 5
83	IT37	2004	Italia	AY739993	ORF 5
84	IT38	2004	Italia	AY739994	ORF 5
85	IT39	2004	Italia	AY739995	ORF 5
86	IT40	2004	Italia	AY739996	ORF 5
87	IT41	2004	Italia	AY739997	ORF 5
88	IT42	2004	Italia	AY739998	ORF 5
89	IT43	2004	Italia	AY739999	ORF 5
90	IT44	2004	Italia	AY740000	ORF 5
91	IT45	2004	Italia	AY740001	ORF 5
92	IT46	2004	Italia	AY740002	ORF 5
93	IT47	2004	Italia	AY740003	ORF 5
94	IT48	2004	Italia	AY740004	ORF 5
95	IT49	2004	Italia	AY740005	ORF 5
96	IT50	2004	Italia	AY740006	ORF 5
97	IT51	2004	Italia	AY740007	ORF 5
98	IT52	2004	Italia	AY740008	ORF 5
99	IT53	2004	Italia	AY740009	ORF 5
100	IT54	2004	Italia	AY740010	ORF 5
101	IT55	2004	Italia	AY740011	ORF 5
102	IT56	2004	Italia	AY740012	ORF 5
103		2004	Italia	AY743931	ORF 5
104	IT62	2004	Italia	AY743932	ORF 5
105	IT57	2004	Italia	AY743933	ORF 5
106	IT58	2004	Italia	AY743934	ORF 5
107	IT59	2004	Italia	AY743935	ORF 5

108	IT60	2004	Italia	AY743936	ORF 5
109	IT61	2004	Italia	AY743937	ORF 5
110	SD1	2004	China	AY747596	ORF 5
111	IT63	2004	Italia	AY749417	ORF 5
112		2005	Austria	AY875860	ORF 5
113	PRRSV0001531	2006	EUA	DQ475981	ORF 5
114	PRRSV0003284	2006	EUA	DQ477385	ORF 5
115	PRRSV0004577	2006	EUA	DQ494272	ORF 5
116	PRRSV0004590	2006	EUA	DQ494283	ORF 5
117	PRRSV0004598	2006	EUA	DQ494291	ORF 5
118	PRRSV0004611	2006	EUA	DQ494303	ORF 5
119	PRRSV0004616	2006	EUA	DQ494308	ORF 5
120	PRRSV0004621	2006	EUA	DQ494313	ORF 5
121	PRRSV0004624	2006	EUA	DQ494316	ORF 5
122	HU27	2007	Hungria	EF406342	ORF 5
123	HU34	2007	Hungria	EF406349	ORF 5
124		2007	China	EU075303	ORF 5
125	Rongchang-1	2007	China	EU200954	ORF 5
126	AH-1	2007	China	EU213092	ORF 5
127	AHCFSH	2007	China	EU213093	ORF 5
128	AHCFZC	2007	China	EU213094	ORF 5
129	HB1	2007	China	EU213111	ORF 5
130	HB2	2007	China	EU213112	ORF 5
131	HB3	2007	China	EU213113	ORF 5
132	HEN46	2007	China	EU213114	ORF 5
133	HLJDF	2007	China	EU213115	ORF 5
134	HLJMZ1	2007	China	EU213116	ORF 5
135	TY2	2007	Taiwan	EU273668	ORF 5
136	YL6	2007	Taiwan	EU273698	ORF 5
137	PT2	2007	Taiwan	EU273705	ORF 5

138	NXZHN	2008	China	EU600288	ORF 5
140	BD-8	2008	China	EU660958	ORF 5
141	PRRSV2000000532	2008	EUA	EU759691	ORF 5
142	PRRSV2000000547	2008	EUA	EU759706	ORF 5
143	H-01-1g	2009	Alemania	FJ705376	ORF 5
144	H-01-2b	2009	Alemania	FJ705378	ORF 5
145	H-02-2a	2009	Alemania	FJ705382	ORF 5
146	H-03-1b	2009	Alemania	FJ705384	ORF 5
147	H-03-1g	2009	Alemania	FJ705386	ORF 5
148	CBN-1	2009	China	FJ919330	ORF 5
149	4051-3-V-2008	2009	Korea del Sur	FJ972735	ORF 5
150	E1173-2003	2009	Korea del Sur	FJ972753	ORF 5
151	IV1158-2003	2009	Korea del Sur	FJ972756	ORF 5
152	A1940-2008	2009	Korea del Sur	FJ972766	ORF 5
153	TaiHu08	2009	China	GQ243425	ORF 5
154	07-1786_HNGP	2009	Republica de Korea	GQ375437	ORF 5
155	07-1686_SJ	2009	Republica de Korea	GQ375452	ORF 5
156	07-676_MWC	2009	Republica de Korea	GQ375455	ORF 5
157	DSC100	2009	Korea del Sur	GQ847587	ORF 5
158	D82-1	2009	Korea del Sur	GQ847596	ORF 5
159	V1347	2009	Korea del Sur	GQ847597	ORF 5
160	BCL-PS	2009	Vietnam	GU187014	ORF 5
161	SD0612	2009	China	GU233504	ORF 5
162	SD1	2009	China	GU327369	ORF 5
163	DLS-1	2009	China	GU977228	ORF 5
164	ZP-2	2010	China	GU977233	ORF 5
165	GDNX	2010	China	GU980165	ORF 5

166	GDBL4	2010	China	GU980170	ORF 5
167	GDB17	2010	China	GU980185	ORF 5
168	GDB19	2010	China	GU980186	ORF 5
169	08-296_JW	2010	Korea	HM130677	ORF 5
170	WFYZ	2010	China	HM854222	ORF 5
171	5172HCM	2010	Vietnam	HQ700879	ORF 5
172	5251HCM	2010	Vietnam	HQ700881	ORF 5
173	5402BD	2010	Vietnam	HQ700886	ORF 5
174	5445HCM	2010	Vietnam	HQ700887	ORF 5
175		1998	EUA	AF054970	ORF 7
176	Netherlands 3.2	2000	Paises Bajos	AF297101	ORF 7
177	France 50-18	2000	Paises Bajos	AF297102	ORF 7
178	Denmark 49	2000	Paises Bajos	AF297103	ORF 7
179	Hungary ABV 32-13	2000	Paises Bajos	AF297104	ORF 7
180	5d	2003	EUA	AY209199	ORF 7
181	20bP	2003	EUA	AY209215	ORF 7
182	21-abD	2003	EUA	AY209216	ORF 7
183	28	2003	EUA	AY209223	ORF 7
184	29D3	2003	EUA	AY209226	ORF 7
185	31D	2003	EUA	AY209228	ORF 7
186	17198-6	2004	EUA	AY656994	ORF 7
187		2004	EUA	AY656996	ORF 7
188	SDSU73	2004	EUA	AY656998	ORF 7
189	MN-03-10_EU	2004	EUA	AY749390	ORF 7
190	MN-04-06_EU	2004	EUA	AY749394	ORF 7
191	MN-04-09_EU	2004	EUA	AY749398	ORF 7
192	SDPRRS 03-17	2004	EUA	AY749408	ORF 7
193	SDPRRS 04-48	2004	EUA	AY749412	ORF 7
194	IT43	2004	Italia	AY749418	ORF 7
195	IT1	2004	Italia	AY749419	ORF 7

196	IT39	2004	Italia	AY749420	ORF 7
197	IT22	2004	Italia	AY749421	ORF 7
198	IT25	2004	Italia	AY749422	ORF 7
199	IT50	2004	Italia	AY749423	ORF 7
200	IT27	2004	Italia	AY749424	ORF 7
201	IT35	2004	Italia	AY749425	ORF 7
202	IT41	2004	Italia	AY749426	ORF 7
203	IT61	2004	Italia	AY749427	ORF 7
204	IT13	2004	Italia	AY749428	ORF 7
205	CU11	2006	Tailandia	EF153281	ORF 7
206	CU15	2006	Tailandia	EF153285	ORF 7
207	CU23	2006	Tailandia	EF153287	ORF 7
208		2007	China	EF434505	ORF 7
209	PRRSV-FJ0604	2007	China	EF552431	ORF 7
210	LS-4	2007	China	EU017514	ORF 7
211	HQ-5	2008	China	EU177112	ORF 7
212	BD-8	2008	China	EU660960	ORF 7
213	HUN-06	2010	Hungria	GU930366	ORF 7
214	GER2	2010	Hungria	GU930375	ORF 7
215	GER7	2010	Hungria	GU930379	ORF 7
216	SRB4	2010	Hungria	GU930381	ORF 7
217	HP	2010	Hungria	GU930383	ORF 7
218	08-296_JW	2010	Korea	HM130678	ORF 7
219	07HBEZ	2010	China	HM595639	ORF 7
220	SI-Stub5/2009	2010	Eslovenia	HQ213910	ORF 7
221	SI-Stra8t/2010	2010	Eslovenia	HQ213911	ORF 7
222	SI-9PI/2009	2010	Eslovenia	HQ213917	ORF 7
223	SI-586/2010	2010	Eslovenia	HQ213918	ORF 7
224	SI-4142/2010	2010	Eslovenia	HQ213933	ORF 7
225	Ox1	2007	Reino Unido	L77927	ORF 7

Cuadro 5. Oligonucleótidos diseñados para la detección del ORF 5.

OLIGONUCLEÓTIDO	ESPECIFICIDAD	SECUENCIA 5' – 3'	AMPLICÓN (pb)	POSICIÓN
ORF5-FA	AMERICANO	CAG CCA ATG TGA CAG ATG	562	13485
ORF5-RA	AMERICANO	AAG CGA CTG TGT CAA GGA	562	14047
ORF5-FL	EUROPEO	GAT CAC ATT CGG TTG CTG	607	13405
ORF5-RL	EUROPEO	TTG ATG GTG ACG AGG TTG	607	14012
ORF5 NF	NESTED PCR	ATG TTG GAG AAA TGC TTG AC	640	13788
ORF5 NR	NESTED PCR	TAA TAG AAA ACG CCA AAA GC	640	14428

Cuadro 6. Oligonucleótidos diseñados para la detección del ORF 7.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5' – 3'	AMPLICÓN (pb)	POSICIÓN
ORF7-F	GCC AGC CAG TCA ATC	378	14927
ORF7-R	AGT GAG GTG GTG CCG	378	15305

Cuadro 7. Muestras Procesadas

Id	Muestra	Procedencia (estado, municipio)	Fecha de Muestreo o llegada al DMZC
1	pulmón y linfonodo	Hidalgo, Dolores	18-Abr-11
2	pulmón y linfonodo	Hidalgo, Dolores	18-Abr-11
3	pulmón	Guanajuato, Pénjamo	20-Abr-11
4	pulmón	Guanajuato, Pénjamo	20-Abr-11
5	cornetes nasales	Guanajuato, Pénjamo	20-Abr-11
6	2 hisopos nasales	Sonora	25-Abr-11
7	2 pulmones, 1 linfonodo	Puebla	25-Abr-11
8	3 pulmones	Veracruz	25-Abr-11

9	2 pulmones	Veracruz	25-Abr-11
10	2 pulmones, 1 linfonodo	Veracruz	25-Abr-11
11	2 pulmones	Veracruz	25-Abr-11
12	2 pulmones	Puebla	25-Abr-11
13	3 pulmones; 1 linfonodo	Veracruz	25-Abr-11
14	2 pulmones	Puebla	25-Abr-11
15	2 pulmones, 1 linfonodo	Veracruz	25-Abr-11
16	2 pulmones	Puebla	25-Abr-11
17	1 pulmón	Puebla	25-Abr-11
18	1 pulmón	Morelos	27-Abr-11
19	1 pulmón	Morelos	27-Abr-11
20	1 pulmón	Morelos	27-Abr-11
21	1 semen	Morelos	27-Abr-11
22	6 pulmones	Estado de México, Teotihuacán	09-Sep-09
23	3 pulmones, 1 tráquea	Tamaulipas	23-Sep-09
24	4 pulmones	Veracruz	Oct-09
25	1 pulmón, 1 tonsila	Jalisco	19-Jul-09
26	1 pulmón, 1 tonsila	Jalisco	19-Jul-09
27	1 pulmón, 1 tonsila	Michoacán	21-Jul-09
28	1 pulmón, 1 tonsila	Guanajuato	03-Ago-09
29	80 pulmones	Puebla	21-Ene-10
30	60 pulmones	Estado de México	21-Ene-10
31	5 pulmones	Estado de México, Xonacatlán	09-Sep-09
32	3 pulmones	Tamaulipas	21-Sep-09
33	3 pulmones	Tamaulipas	22-Sep-09
34	5 pulmones	Veracruz	22-Sep-09
35	2 pulmones, 2 tráqueas	Veracruz	22-Sep-09
36	1 pulmón, 1 tonsila	Guanajuato	14-Jul-09
37	1 pulmón, 1 tonsila	Jalisco	19-Jul-09
38	1 pulmón, 1 tonsila	Michoacán	20-Jul-09

39	1 pulmón, 1 tonsila	Michoacán	21-Jul-09
40	13 pulmones	Veracruz	04-Nov-09
41	23 pulmones, 23 tráqueas	Veracruz	05-Nov-09
42	20 pulmones	Veracruz	10-Nov-09
43	5 pulmones, 5 tráquea, 5 tonsilas	Estado de México	10-Nov-09
44	3 pulmones, 3 tonsilas	Oaxaca	Dic-09
45	6 pulmones	Estado de México	01-Mar-10
46	63 pulmones	Jalisco	14-Ene-10
47	100 pulmones	Jalisco	21-Ene-10
48	80 pulmones	Veracruz	21-Ene-10
49	80 pulmones	Veracruz	21-Ene-10
50	80 pulmones	Querétaro	21-Ene-10
51	30 pulmones	Estado de México	21-Ene-10
52	50 pulmones	Querétaro	02-Feb-10
53	125 pulmones	Guanajuato	02-Feb-10
54	34 pulmones	Veracruz	02-Feb-10
55	10 pulmones	Michoacán	02-Feb-10
56	140 pulmones, 140 linfonodos	Yucatán	19-Feb-10
57	3 pulmones	Hidalgo	01-Jun-10
58	1 semen	Estado de México	Jun-10
59	1 semen	Estado de México	Jun-10
60	2 pulmones	Estado México, Xonacatlán	Sep-10
61	2 pulmones, 2 tonsilas	Estado México, Xonacatlán	Sep-10
62	10 hisopos nasales	Estado de México	Sep-10
63	15 pulmones	Distrito Federal	Nov-10
64	1 pulmón, 1 tráquea	Guerrero	Oct-10
65	15 pulmones	Tlaxcala	Nov-10
66	10 pulmones	Puebla	Nov-10
67	20 sueros	Sonora	Oct-10
68	3 pulmones	Guerrero	Nov-10

69	3 pulmones	Hidalgo, Ixmiquilpan	27-Ene-11
70	3 cordones umbilicales	Morelos, Ixtlilco el Grande	27-Ene-11
71	1 pulmón	Estado México, Xonacatlán	07-Oct-10
72	1 pulmón	Estado México, Xonacatlán	07-Oct-10
73	1 pulmón	Estado México, Xonacatlán	07-Oct-10
74	1 pulmón	Estado México, Xonacatlán	07-Oct-10
75	1 pulmón	Estado México, Xonacatlán	07-Oct-10
76	1 pulmón	Estado México, Xonacatlán	07-Oct-10
77	1 hisopo nasal	Sonora, Hermosillo	31-May-11
78	1 hisopo nasal	Sonora, Hermosillo	31-May-11
79	1 hisopo nasal	Sonora, Hermosillo	31-May-11
80	1 hisopo nasal	Sonora, Hermosillo	31-May-11
81	1 hisopo nasal	Sonora, Hermosillo	31-May-11
82	1 pulmón	Sonora, Hermosillo	31-May-11
83	1 pulmón	Sonora, Hermosillo	31-May-11
84	1 hisopo nasal	Estado de México, Texcoco	01-Jun-11
85	1 hisopo nasal	Estado de México, Texcoco	01-Jun-11
86	1 hisopo nasal	Estado de México, Texcoco	01-Jun-11
87	1 pulmón	Estado de México, Texcoco	01-Jun-11
88	1 pulmón	Veracruz	01-Jun-11
89	1 pulmón	Veracruz	01-Jun-11
90	1 pulmón	Veracruz	01-Jun-11
91	1 pulmón	Veracruz	01-Jun-11
92	1 pulmón	Hidalgo, Ixmiquilpan	02-Jun-11
93	pulmón	DF, Tlahuac	19-Ene-11
94	pulmón	Tlaxcala	19-Ene-11
95	pulmón	Puebla	19-Ene-11
96	4 pulmones	Guanajuato, Pénjamo	17-Jun-11
97	4 pulmones	Guanajuato, Pénjamo	17-Jun-11
98	1 hisopo nasal	Hidalgo, Tepeji del Rio	17-Jun-11

99	1 hisopo nasal	Hidalgo, Tepeji del Rio	17-Jun-11
100	1 hisopo nasal	Hidalgo, Tepeji del Rio	17-Jun-11
101	1 hisopo nasal	Hidalgo, Tepeji del Rio	17-Jun-11
102	1 hisopo nasal	Hidalgo, Tepeji del Rio	17-Jun-11
103	1 hisopo nasal	Hidalgo, Tepeji del Rio	17-Jun-11
104	1 pulmón	Hidalgo, Tepeji del Rio	17-Jun-11
105	1 pulmón	Hidalgo, Tepeji del Rio	17-Jun-11
106	1 pulmón	Sonora, Cd Obregón	22-Jun-11
107	1 pulmón	Sonora, Cd Obregón	22-Jun-11
108	2 hisopos nasales	Sonora, Cd Obregón	22-Jun-11
109	2 hisopos nasales	Sonora, Cd Obregón	22-Jun-11
110	2 hisopos nasales	Sonora, Cd Obregón	22-Jun-11
111	pulmón	Jalisco, Tlaquepaque	01-Jul-11
112	pulmón	Jalisco, Tlaquepaque	01-Jul-11
113	4 pulmones	Jalisco, Tepatitlán	01-Jul-11
114	2 pulmones	Jalisco, Lagos de Moreno	01-Jul-11

Cuadro 8. Muestras Positivas y Negativas

Id	Procedencia (estado, municipio)	Oligonucleótidos	Oligonucleótidos	Oligonucleótido	Oligonucleótidos
		ORF 7	ANIDADO	ORF 5 Americano	ORF 5 Europeo
1	Hidalgo, Dolores	-	+	-	-
2	Hidalgo, Dolores	+	+	+	-
3	Guanajuato, Pénjamo	-	+	-	-
4	Guanajuato, Pénjamo	+	+	+	-
5	Guanajuato, Pénjamo	+	+	+	-
7	Puebla	+	+	+	-
8	Veracruz	-	+	-	-
9	Veracruz	-	+	-	-

10	Veracruz	-	-	-	-
11	Veracruz	-	-	-	-
12	Puebla	-	-	-	-
13	Veracruz	-	-	-	-
14	Puebla	-	-	-	-
15	Veracruz	-	-	-	-
16	Puebla	-	+	-	-
17	Puebla	-	+	-	-
18	Morelos	-	+	-	-
21	Morelos	+	+	-	-
25	Jalisco	+	-	-	-
26	Jalisco	+	+	-	-
27	Michoacán	+	+	-	-
28	Guanajuato	+	+	-	-
29	Puebla	-	-	-	-
30	Estado de México	+	+	-	-
34	Veracruz	-	+	-	-
36	Guanajuato	-	+	-	-
37	Jalisco	+	-	-	-
38	Michoacán	-	-	-	-
39	Michoacán	+	-	-	-
40	Veracruz	+	-	-	-
41	Veracruz	+	-	-	-
42	Veracruz	+	-	-	-
44	Oaxaca	+	-	-	-
46	Jalisco	+	-	-	-
51	Estado de México	+	+	-	-
56	Yucatán	+	+	-	-

60	Estado México, Xonacatlán	-	-	-	-
62	Estado de México	+	-	-	-
63	Distrito Federal	-	-	-	-
64	Guerrero	-	-	-	-
65	Tlaxcala	-	-	-	-
66	Puebla	-	-	-	-
68	Guerrero	-	+	-	-
69	Hidalgo, Ixmiquilpan	+	+	-	-
71	Estado México, Xonacatlán	-	-	-	-
77	Sonora, Hermosillo	+	-	-	-
78	Sonora, Hermosillo	+	-	-	-
83	Sonora, Hermosillo	-	-	-	-
84	Estado de México, Texcoco	+	+	-	-
85	Estado de México, Texcoco	+	+	-	-
86	Estado de México, Texcoco	-	+	-	-
87	Estado de México, Texcoco	+	-	-	-
88	Veracruz	+	-	-	-
90	Veracruz	-	-	-	-
92	Hidalgo, Ixmiquilpan	-	-	-	-
93	DF, Tlahuac	-	+	-	-
94	Tlaxcala	-	+	-	-
95	Puebla	+	-	-	-

96	Guanajuato, Pénjamo	+	+	-	-
98	Hidalgo, Tepeji del Rio	+	-	-	-
101	Hidalgo, Tepeji del Rio	+	-	-	-
104	Hidalgo, Tepeji del Rio	+	-	-	-
106	Sonora, Cd Obregón	-	-	-	-
107	Sonora, Cd Obregón	-	-	-	-
108	Sonora, Cd Obregón	+	-	-	-
111	Jalisco, Tlaquepaque	-	-	-	-
112	Jalisco, Tlaquepaque	+	-	-	-
113	Jalisco, Tepatitlán	-	-	-	-
114	Jalisco, Lagos de Moreno	-	-	-	-

Cuadro 9. Amplicones obtenidos de las muestras con los diferentes oligonucleótidos.

Muestra	Estado	Municipio	Año	ORF 7				VAC	ANIDADADO			VAC	AMERICANO			VAC	EUROPEO			VAC
1	Hidalgo	Dolores	2011					380	700	620	400	380					750			
2	Hidalgo	Dolores	2011				250	380	700	620	400	380			650	750				
3	Guanajuato	Penjamo	2011					380	700	620	400	380				750				
4	Guanajuato	Penjamo	2011	800	530	450	250	380	700	620	400	380			650	750				
5	Guanajuato	Penjamo	2011	800	530	450	250	380	700	620	400	380			650	750				
7	Puebla		2011	800	530	450	250	380	700	620	400	380			650	750				
8	Veracruz		2011					380				280	380			750				
9	Veracruz		2011					380				280	380			750				
16	Puebla		2011					380				280	380			750				
17	Puebla		2011					380		450	280	380			750					
18	Morelos		2011					380				280	380			750				
21	Morelos		2011				380	380				280	380			750				
25	Jalisco		2009					380	380				380			750				
26	Jalisco		2009			400	380	380		242	280	380			750					
27	Michoacán		2009				380	380			242	380			750					
28	Guanajuato		2009				380	380			400	380			750					
30	Estado de México		2009				380	380			242	380			750					
34	Veracruz		2009					380				400	380			750				
36	Guanajuato		2009					380				330	380			750				
37	Jalisco		2009					380	380				380			750				
39	Michoacán		2009					380	380				380			750				
40	Michoacán		2009					380	380				380			750				
41	Veracruz		2009					380	380				380			750				
42	Veracruz		2009					380	380				380			750				
44	Oaxaca		2009			700	600	380					380			750				
46	Jalisco		2010					440	380				380			750				
51	Estado de México		2010					380	380		400	330	380			750				
56	Yucatán		2010					380	380			280	380			750				
62	Estado México		2010			600	380	380					380			750				
68	Guerrero		2010					380				350	380			750				
69	Hidalgo		2011	680	380	330	190	380				350	380			750				
77	Sonora	Hermosillo	2011				330	280	380				380			750				
78	Sonora	Hermosillo	2011				730	330	380				380			750				
84	Estado de México	Texcoco	2011				330	380	489	380	250	380			750					
85	Estado de México	Texcoco	2011			400	330	380	400	380	250	380			750					
86	Estado de México	Texcoco	2011					380		380	250	380			750					
87	Estado de México	Texcoco	2011					330	380				380			750				
88	veracruz		2011					330	380				380			750				
93	DF	Tlahuac	2011					380				280	380			750				
94	Tlaxcala		2011					380				280	380			750				
95	Puebla		2011					380	380				380			750				
96	Guanajuato	Penjamo	2011					380	380			280	380			750				
98	Hidalgo	Tepeji del Rio	2011					380	380				380			750				
101	Hidalgo	Tepeji del Rio	2011					380	380				380			750				
104	Hidalgo	Tepeji del Rio	2011					380	380				380			750				
108	Sonora	Cd. Obregon	2011					400	380				380			750				
112	Jalisco	Tlaquepaque	2011					400	380				380			750				

Cuadro 10. Relación de muestras positivas por Estado de la República muestreado.

Estado	No. Muestras Procesadas	No. De Muestras Positivas	% Frecuencia
Veracruz	12	7	58.33
Estado de México	9	7	77.77
Jalisco	8	5	62.5
Puebla	8	4	50
Hidalgo	7	6	85.71
Guanajuato	6	6	100
Sonora	6	3	50
Michoacán	3	2	66.66
Morelos	2	2	100
Distrito Federal	2	1	50
Guerrero	2	1	50
Tlaxcala	2	1	50
Yucatán	1	1	100
Oaxaca	1	1	100

Cuadro 11. Frecuencia de muestras positivas al virus de PRRS en relación al tipo de muestra procesada.

Tipo de Muestra	No. Muestras Procesadas*	No. de Muestras Positivas	Frecuencia (%)
Pulmón	40	23	57.5
Pulmón y Linfonodo	16	12	75
Hisopo Nasal	9	9	100
Pulmón y Tráquea	2	1	50
Cornete Nasal	1	1	100
Semen	1	1	100

* La mayoría de las muestras procesadas estaban conformadas a su vez por varias muestras formando lo que se conoce como “pool”, considerando que son muestras de la misma granja.

FIGURAS

Figura 4. Alineación de las secuencias del ORF 5 descargadas del banco genético (GenBank) a la cepa de referencia Americana VR2332.

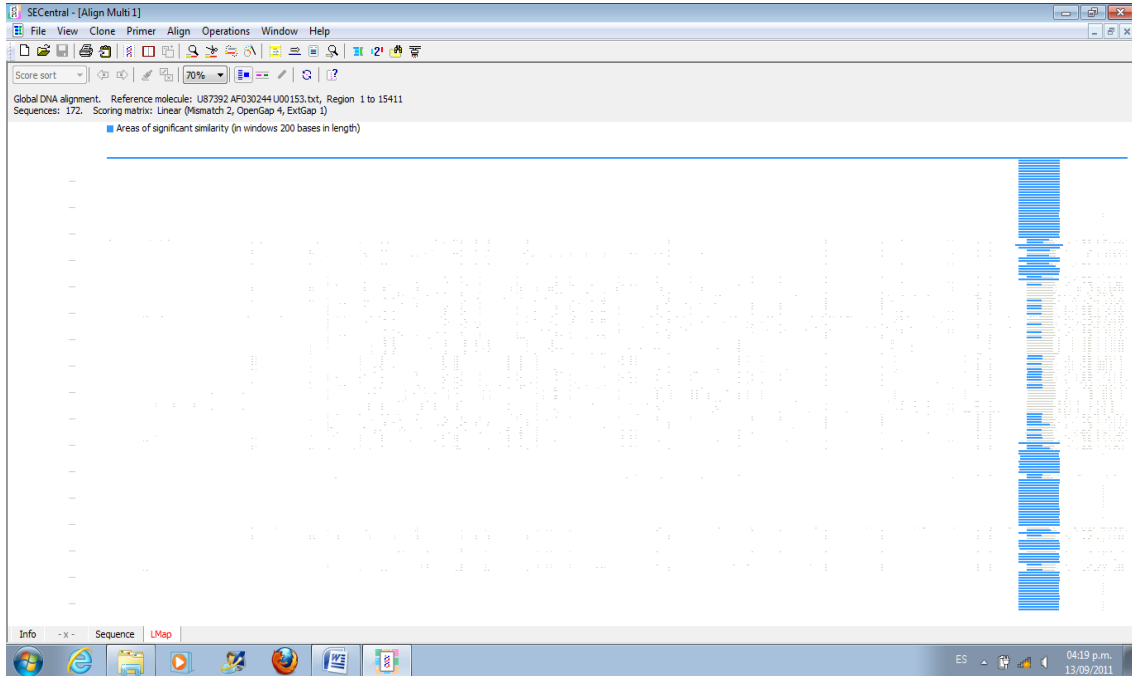


Figura 5. Alineación de las secuencias del ORF 5 descargadas del banco genético (GenBank) a la cepa de referencia Europea Lelystad.

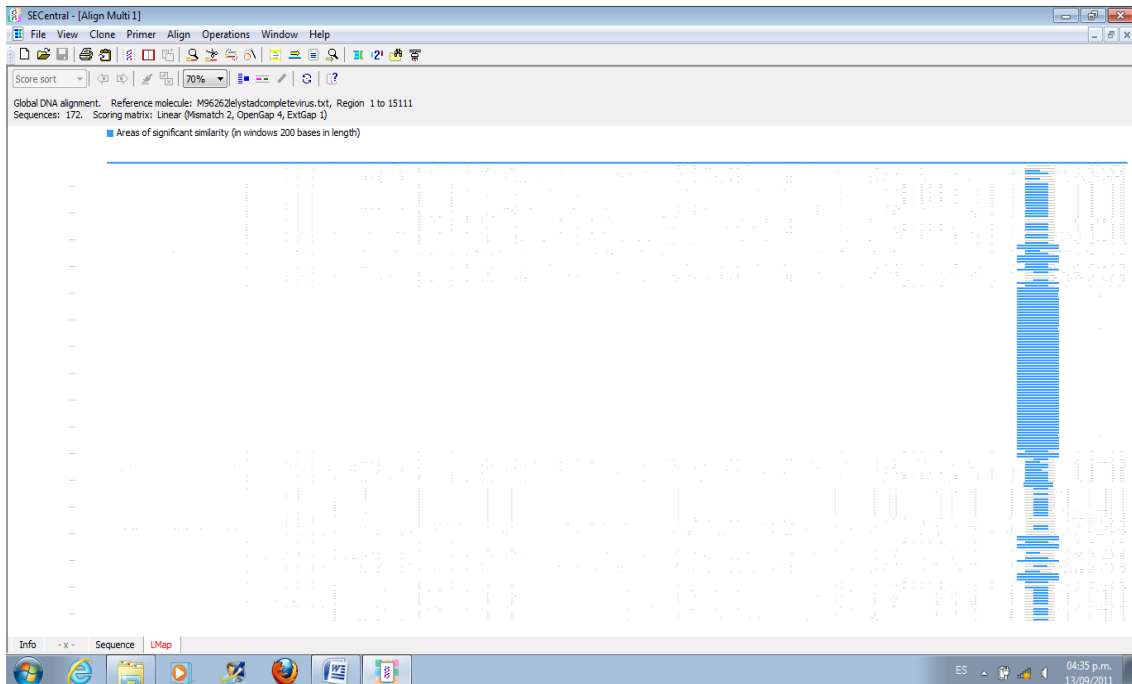


Figura 6. Ejemplo de la alineación de los oligonucleótidos ORF5-FL y ORF5-RL diseñados para la cepa Europea con algunas secuencias similares a la cepa de referencia Lelystad.

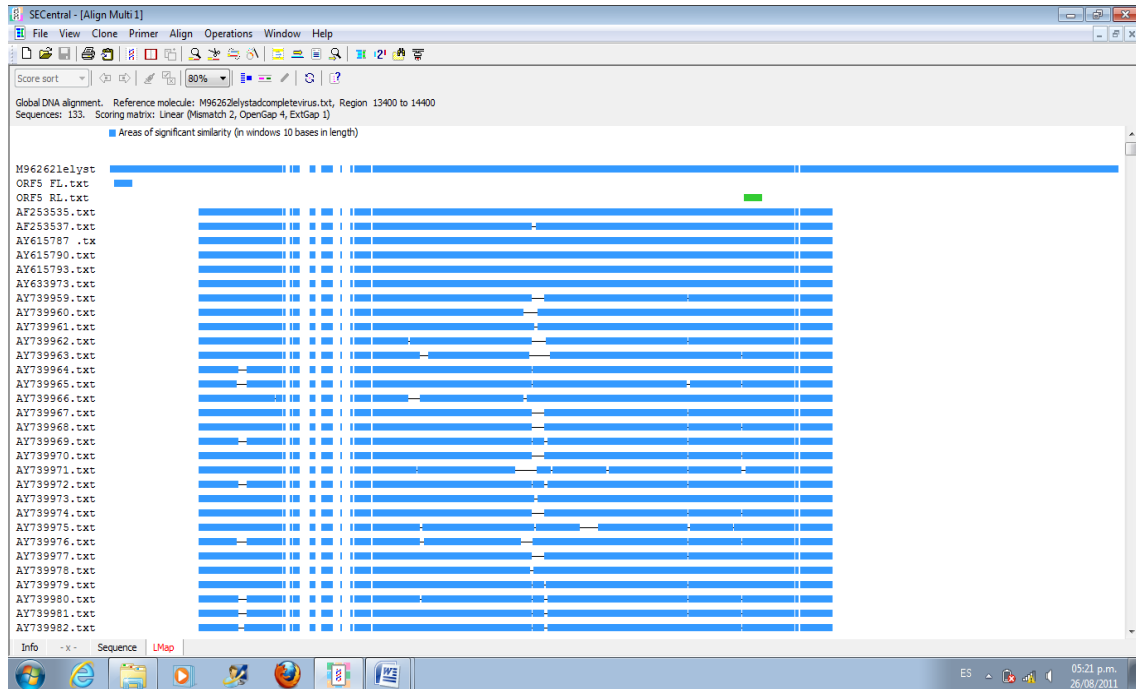


Figura 7. Elección de la secuencia completa del virus de PRRS para el diseño de los oligonucleótidos.

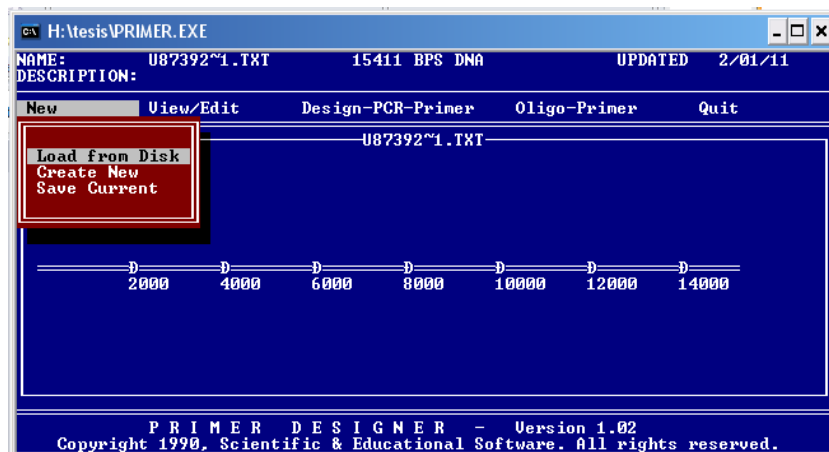


Figura 8. Selección de los criterios deseados para el diseño de los oligonucleótidos.

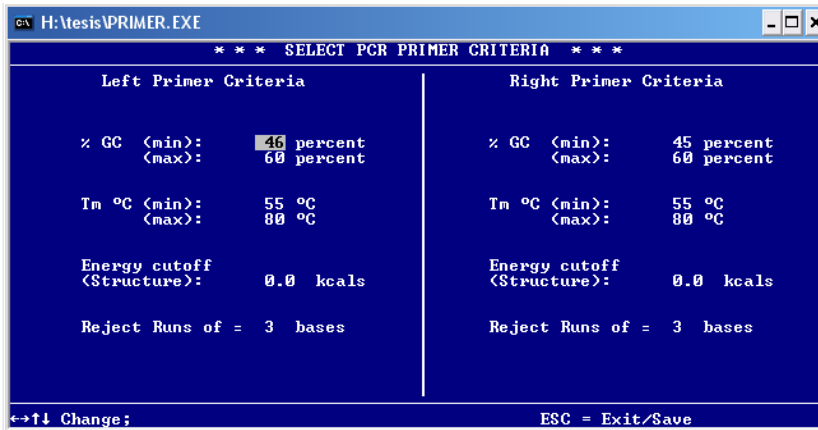


Figura 9. Selección del oligonucleótido ORF5-FA. Cuando se cumplen los criterios deseados, el color de la selección cambia de gris a verde.

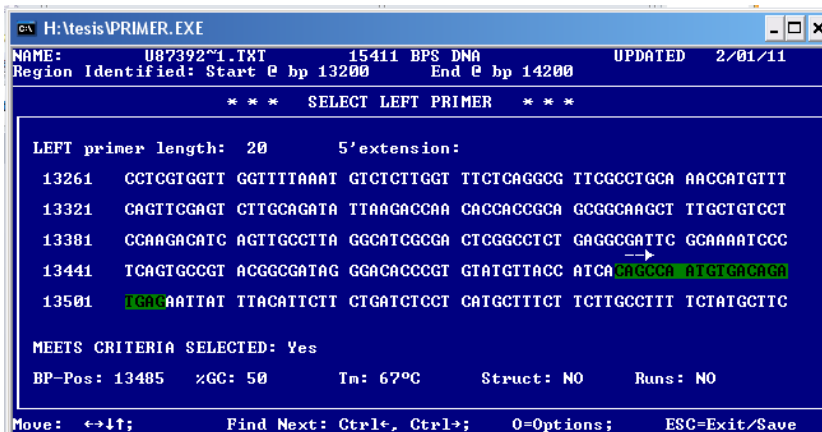


Figura 10. Ejemplo del análisis de un par de oligonucleótidos.

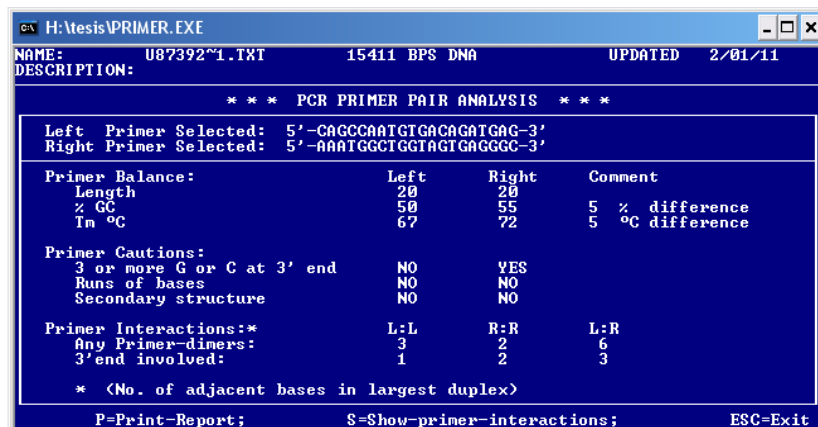


Figura 11. Posición del oligonucleótido ORF5-FA

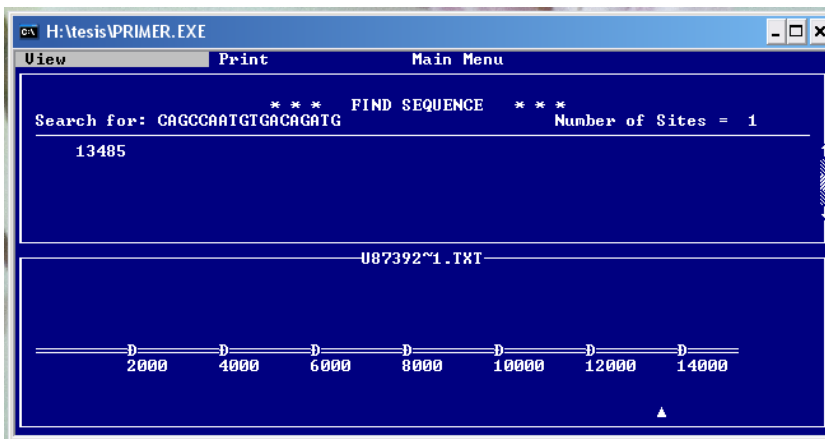


Figura 12. Posición del oligonucleótido ORF5-RA. Junto con la imagen 8, nos da el tamaño de amplicón esperado que en el caso de éste par de oligonucleótidos es de 562 pb.

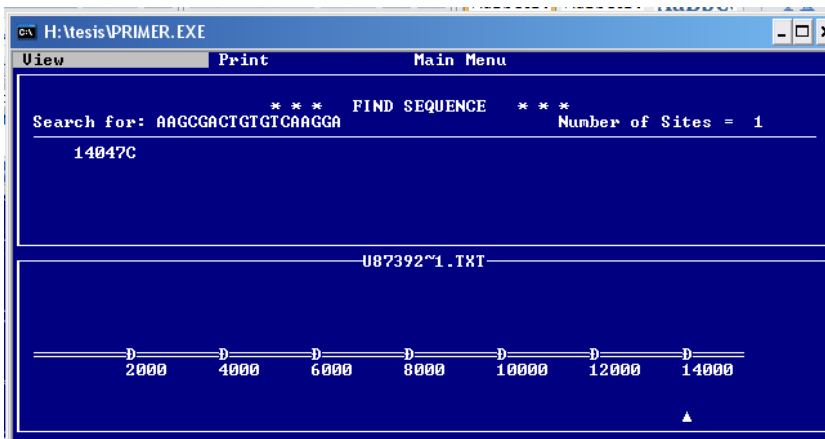


Figura 13. Resultados gráficos del análisis BLAST para el oligonucleótido ORF5-FA.

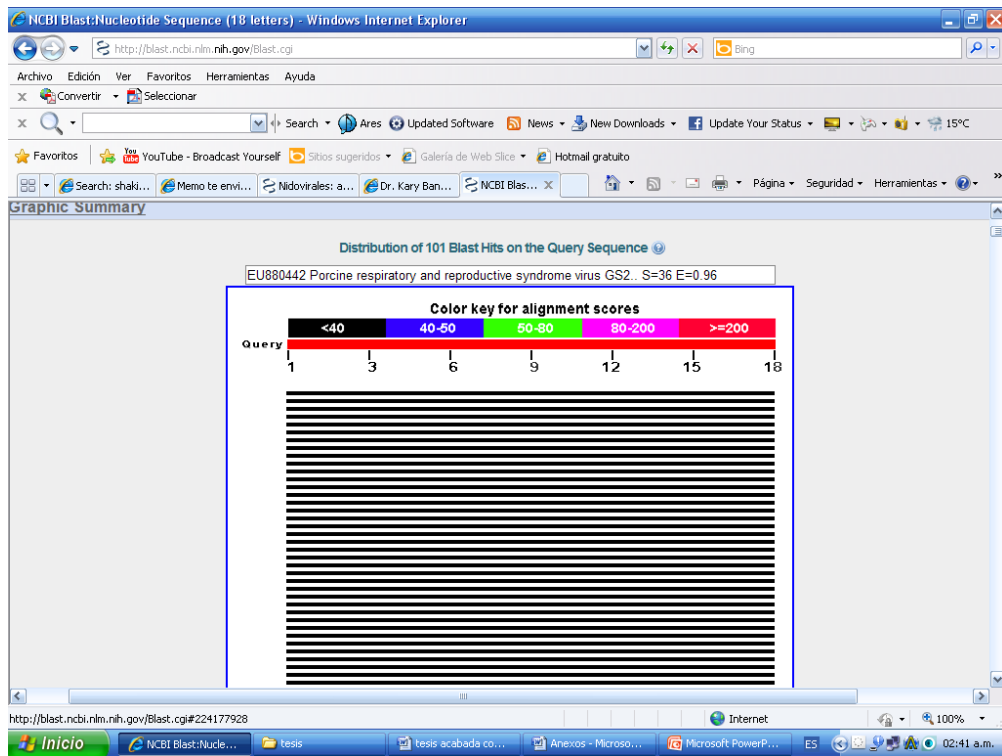


Figura 14. Descripción de las alineaciones producidas como resultado a la secuencia del oligonucleótido ORF5-FA.

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (20 letters) - Windows Internet Explorer

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene, GEO, Gene, Structure, Map Viewer, PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HM114312.1	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain FJ0701	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
F3629371.1	Synthetic construct clone pMLV/MN184-3'UTR, complete sequence	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
F3629370.1	Synthetic construct clone pMLV/MN184ORF7-3'UTR, complete seq	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
F3624376.1	Mutant Porcine reproductive and respiratory syndrome virus clone V	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
G0914987.1	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain SD1-101	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
F3624377.1	Mutant Porcine reproductive and respiratory syndrome virus clone p'	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
F3629392.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain Clone20	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU880443.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus GS2004, comp	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU880442.2	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus GS2003, comp	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU880441.2	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus GS2002, comp	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
F1175689.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
F1175688.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
F1175687.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756708.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756701.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756698.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756696.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756685.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756684.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756682.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756672.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756670.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756666.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756664.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756662.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756631.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756634.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756632.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	
EU756629.1	Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate PRRSV1	40.1	40.1	100%	0.061	100%	

Internet

03:18 a.m.

Figura 15. Ejemplo de la especificidad mediante la alineación de los oligonucleótidos a cepas reportadas en el banco genético (GenBank).

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (20 letters) - Windows Internet Explorer

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Archivo Edición Ver Favoritos Herramientas Ayuda

Convertir Seleccionar

Search Ares Updated Software News New Downloads Update Your Status 14°C

Favoritos YouTube - Broadcast Yourself SÍBIOS sugeridos Galería de Web:Slide Hotmail gratuito

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (20 letters)

Select All Get selected sequences Distance tree of results

> [gb|NM114912.1](#) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain FJ0701
glycosylated membrane protein 2a, glycosylated membrane protein 2b, glycosylated membrane protein 3, glycosylated membrane protein 4, glycosylated membrane protein 5, matrix protein, and nucleocapsid protein genes, complete cds
Length=9189
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.061
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1 TAATAGAAAACCCAAAAGC 20
IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
Sbjct 2375 TAATAGAAAACCCAAAAGC 2386

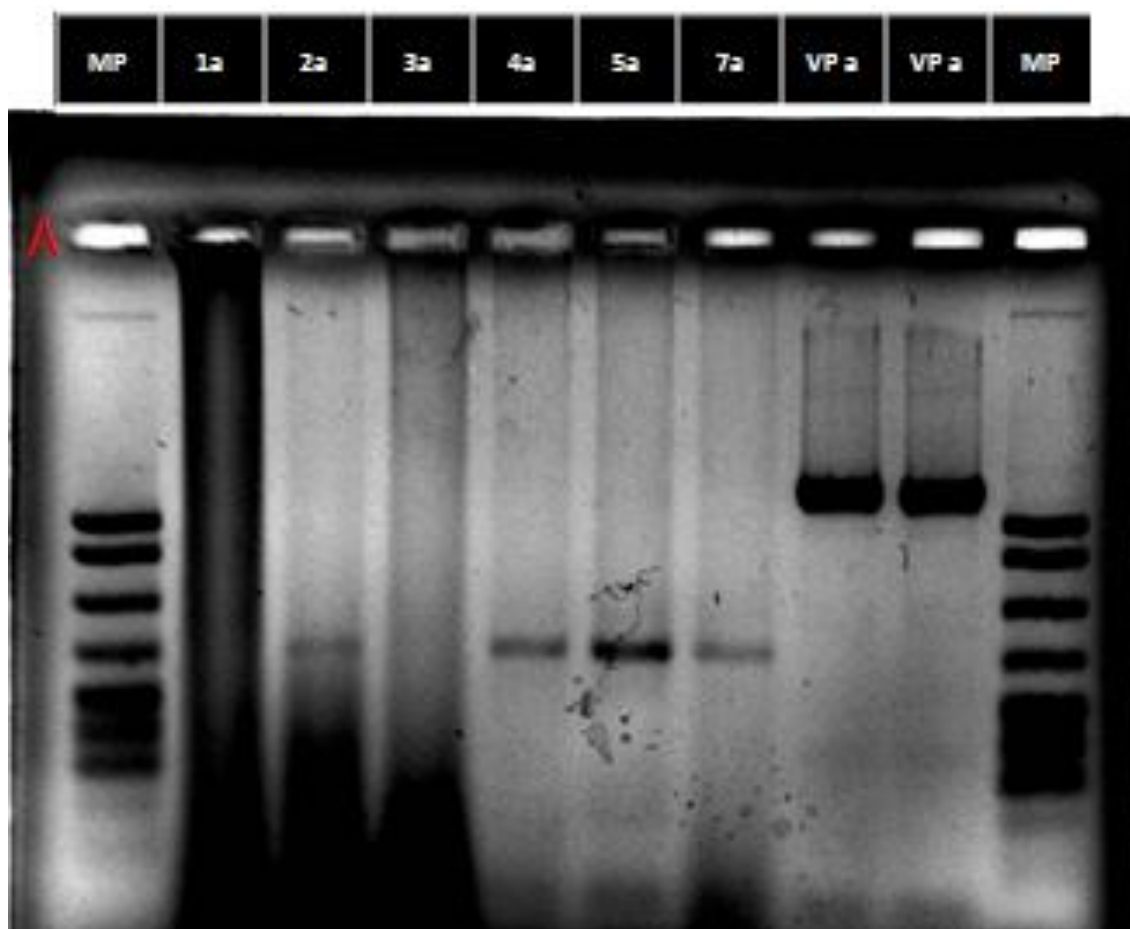
> [gb|FJ629971.1](#) Synthetic construct clone pMLV/MN184-3'UTR, complete sequence
Length=15412
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.061
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1 TAATAGAAAACCCAAAAGC 20
IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
Sbjct 14448 TAATAGAAAACCCAAAAGC 14429

> [gb|FJ629970.1](#) Synthetic construct clone pMLV/MN184ORF7-3'UTR, complete sequence
Length=15412
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.061
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1 TAATAGAAAACCCAAAAGC 20
IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
Sbjct 14448 TAATAGAAAACCCAAAAGC 14429

Internet 75%

Inicio NCBI Blast:Nucle... tesis tesis acabada co... Anexos - Microso... Microsoft PowerP... ES 03:18 a.m.

Figura 16: muestras 1-7, oligonucleótidos ORF5-FA y RA.

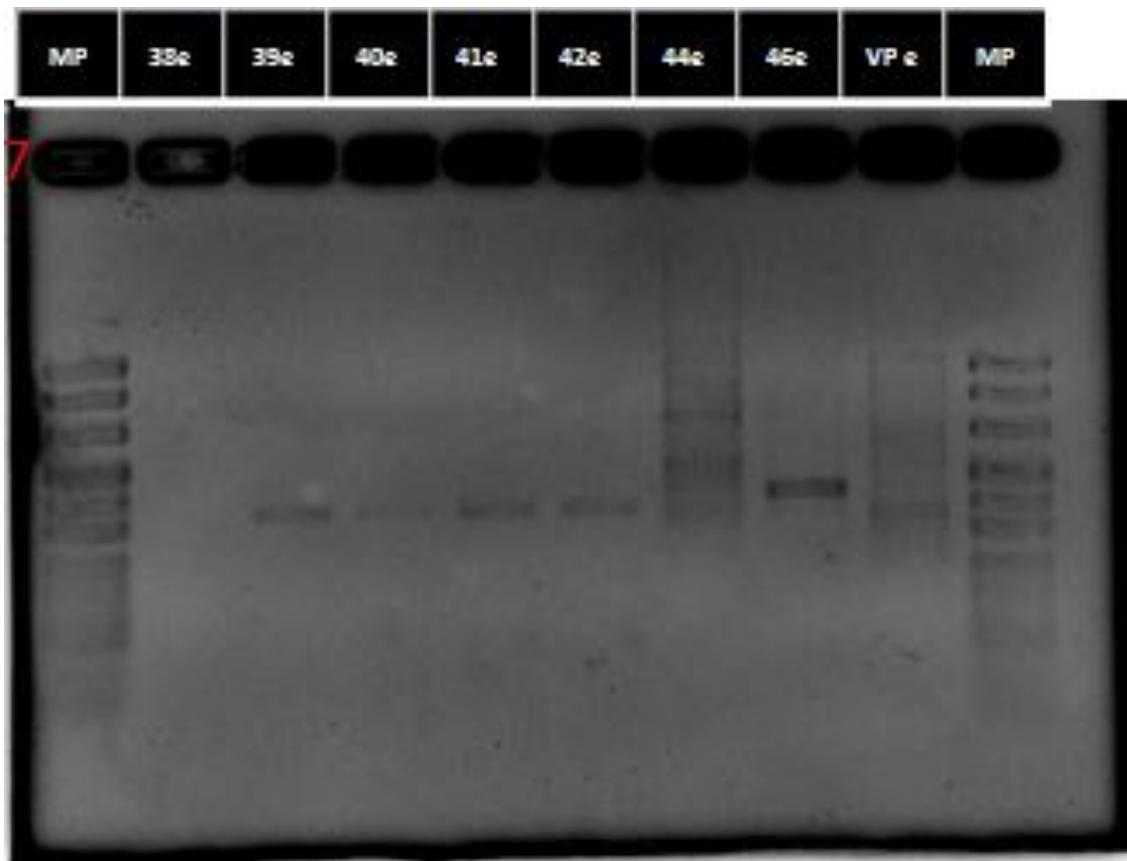


MP: marcador de peso molecular

a: corrida a

VP: control positivo

Figura 17. Muestras 38-46, oligonucleótidos ORF7-F y R.

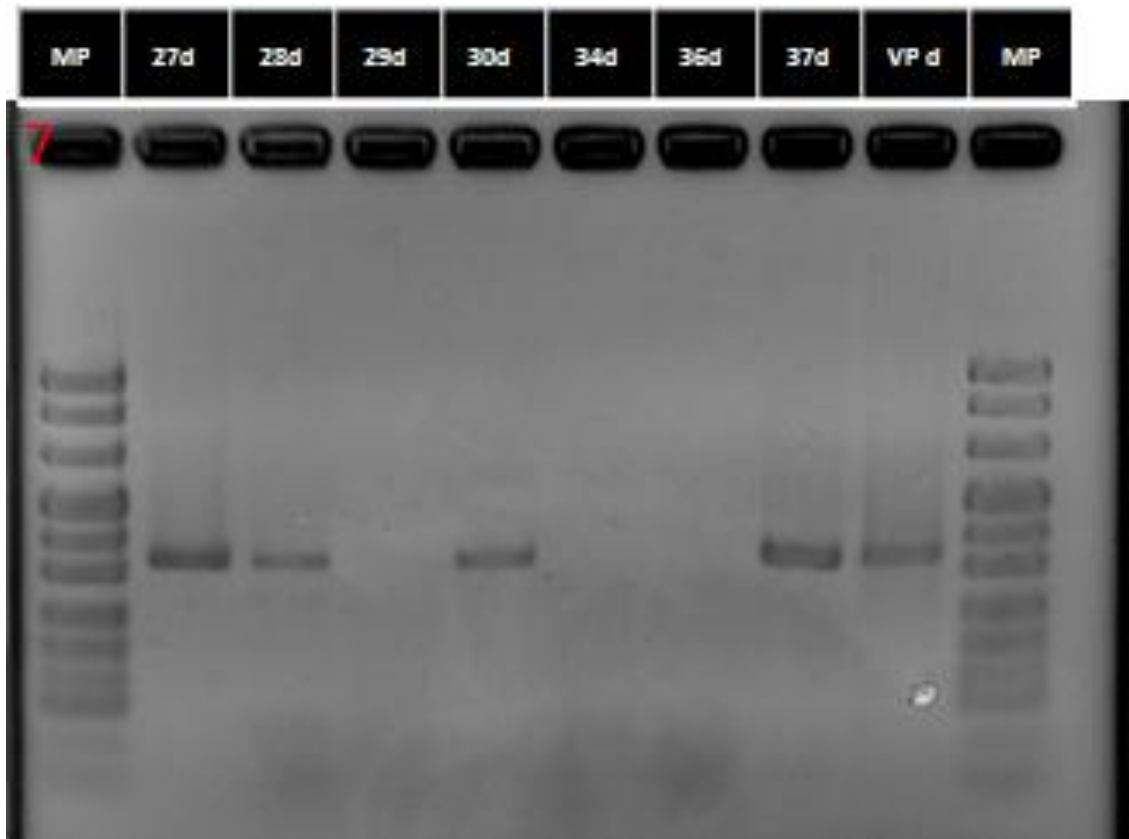


MP: marcador de peso molecular

e: corrida e

VP: control positivo

Figura 18. Muestras 27-37, oligonucleótidos ORF5-NF y NR.

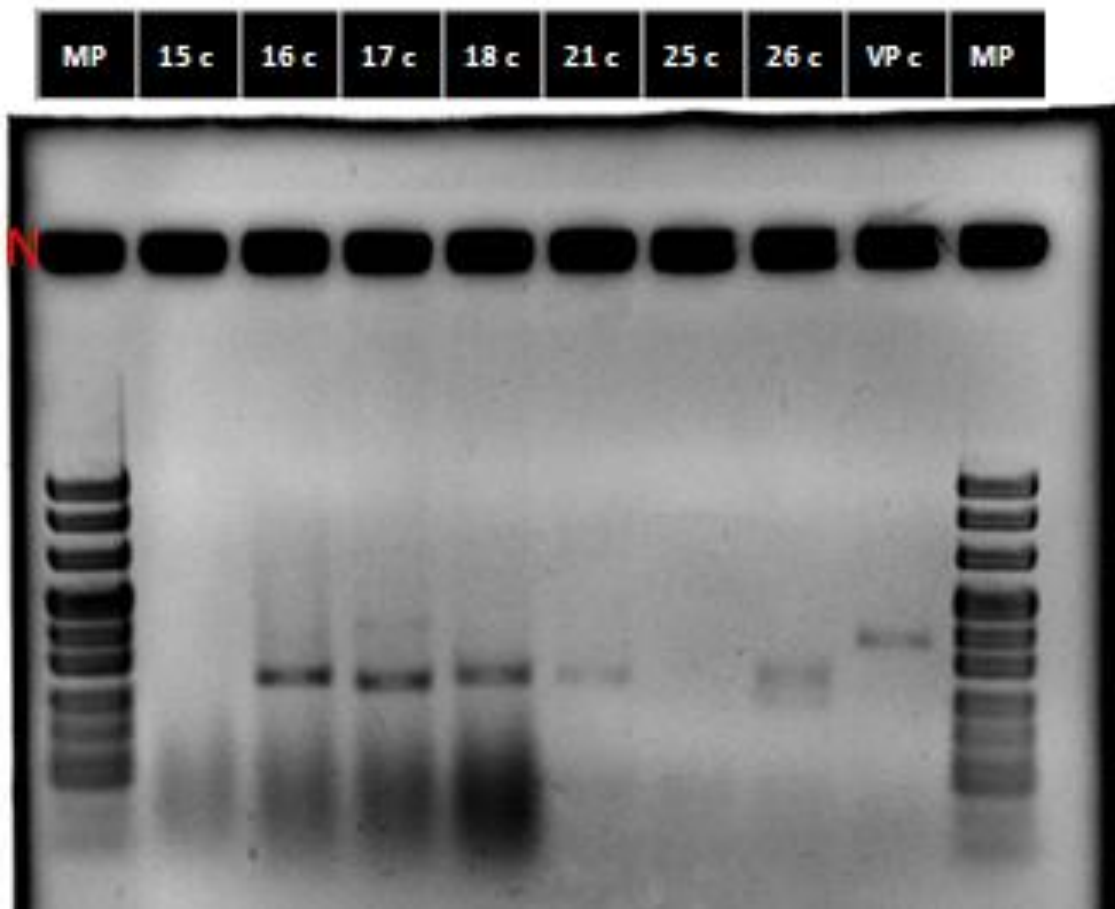


MP: marcador de peso molecular

d: corrida d

VP: control positivo

Figura 19. Muestras 15-26, oligonucleótidos ORF5-NF y NR.

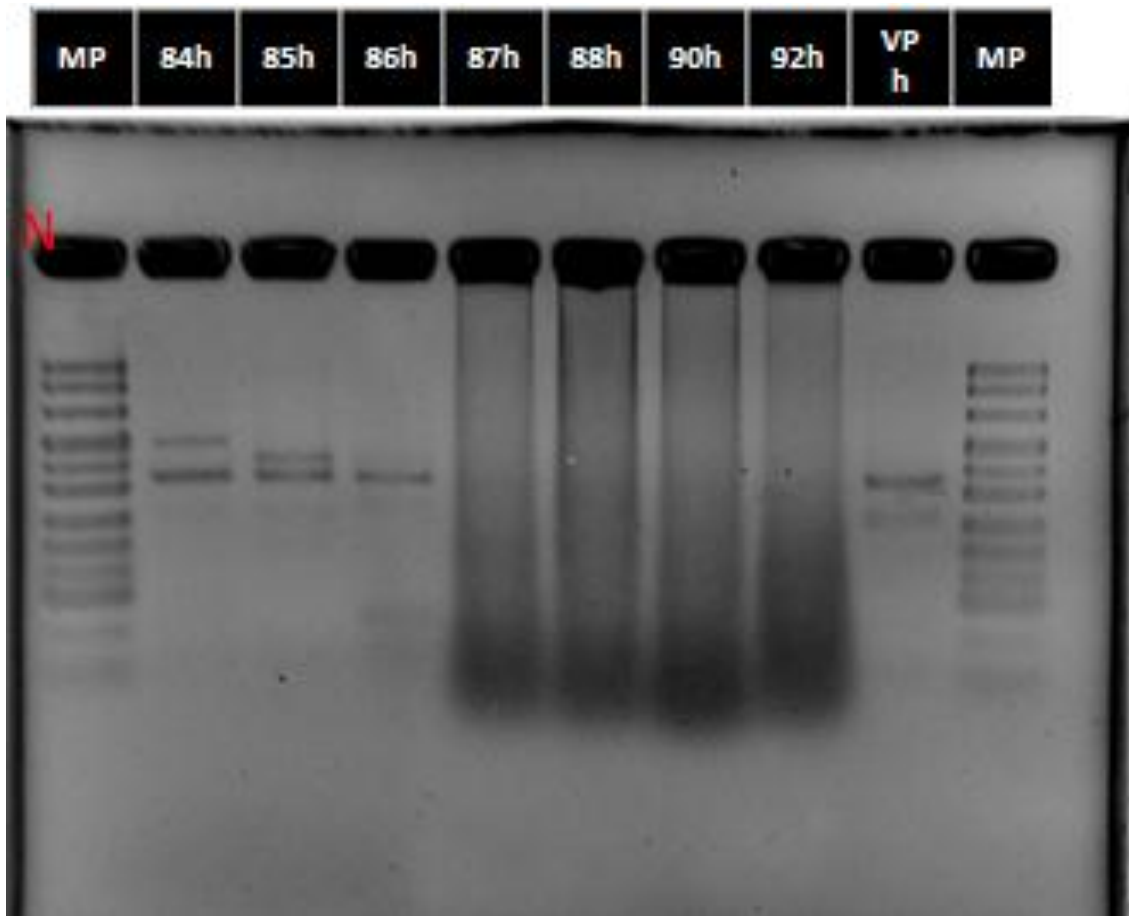


MP: marcador de peso molecular

c: corrida c

VP: control positivo

Figura 20. Muestras 84-92, oligonucleótidos ORF5-NF y NR.



MP: marcador de peso molecular

h: corrida h

VP: control positivo

Figura 21. Estados de Hidalgo y Guanajuato que presentan los mismos amplicones de 700, 620 y 400 pb para el ORF5 anidado y ninguno para el ORF7.



Figura 22. Estados de Guanajuato y Puebla que presentan los mismos amplicones para los tres pares de oligonucleótidos: 800, 530, 450 y 250 pb para el ORF7, 700, 620 y 400 pb para el ORF5 anidado y 750 y 650 pb para el ORF5.

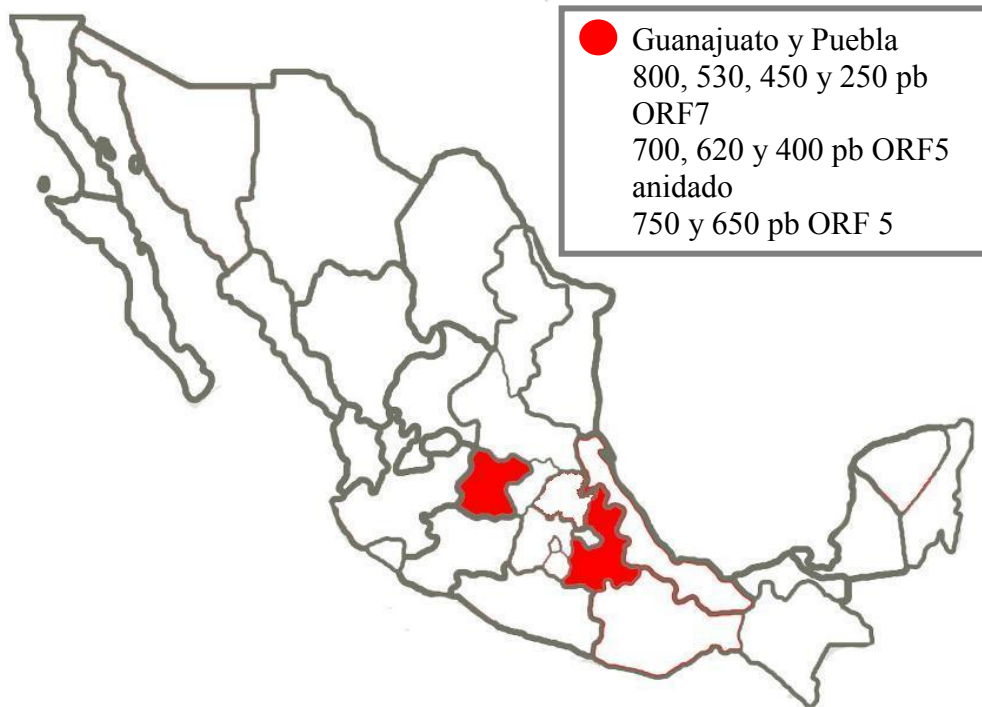


Figura 23. Estados de Veracruz, Puebla, Morelos, D. F. y Tlaxcala que presentan el mismo amplicón de 280 pb para el PCR anidado del ORF5.

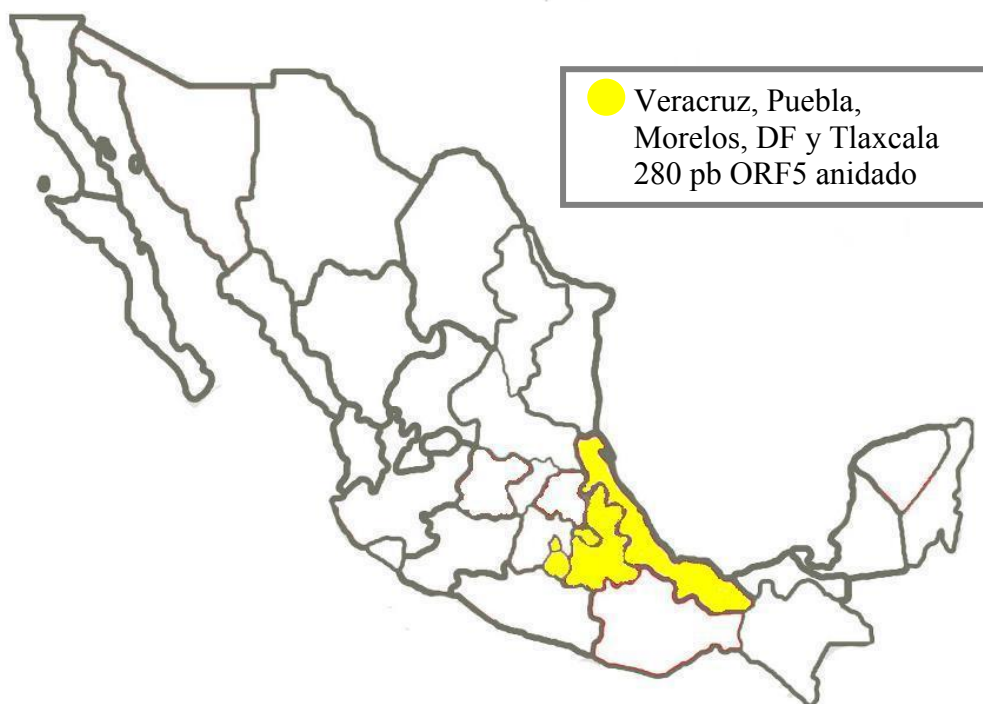


Figura 24. Estados de Morelos, Yucatán y Guanajuato, que presentan el mismo amplicón de 280 pb para el PCR anidado del ORF5 y de 380 pb para el ORF7.



Figura 25. Estados de Jalisco, Michoacán, Veracruz, Edo. de México y Puebla que presentan el mismo amplicón de 380 pb para el ORF7.



Figura 26. Estados de Michoacán y Edo. de México que presentan el mismo amplicón de 242 pb para el ORF 5 anidado y de 380 pb par el ORF 7.

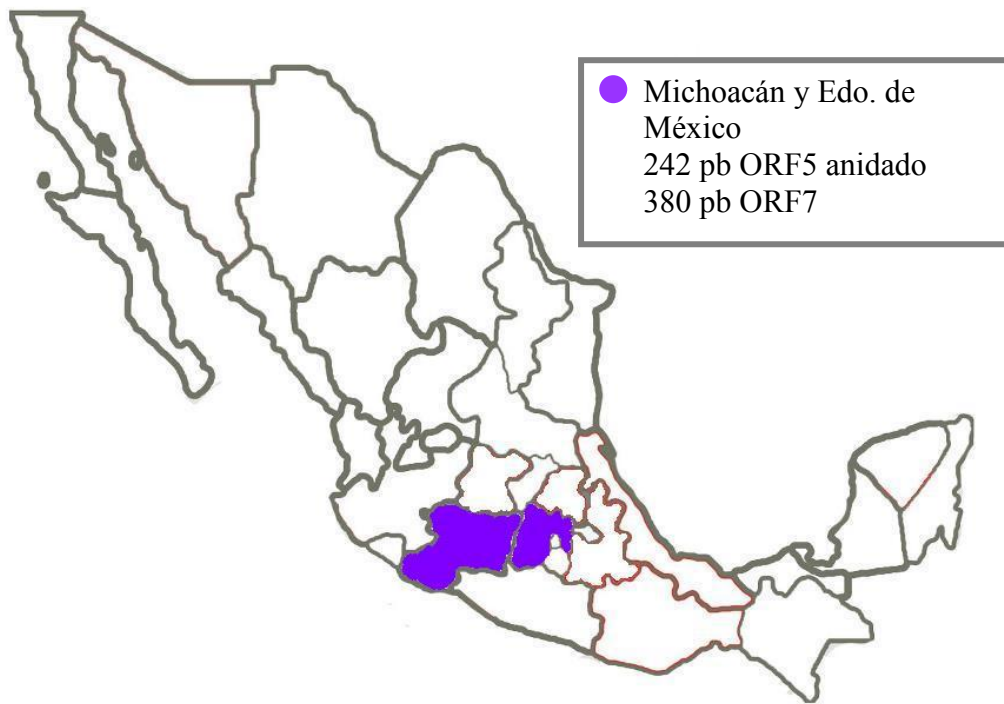


Figura 27. Estados de Sonora y Jalisco que presentan un solo amplicón de 400 pb para el ORF 7.

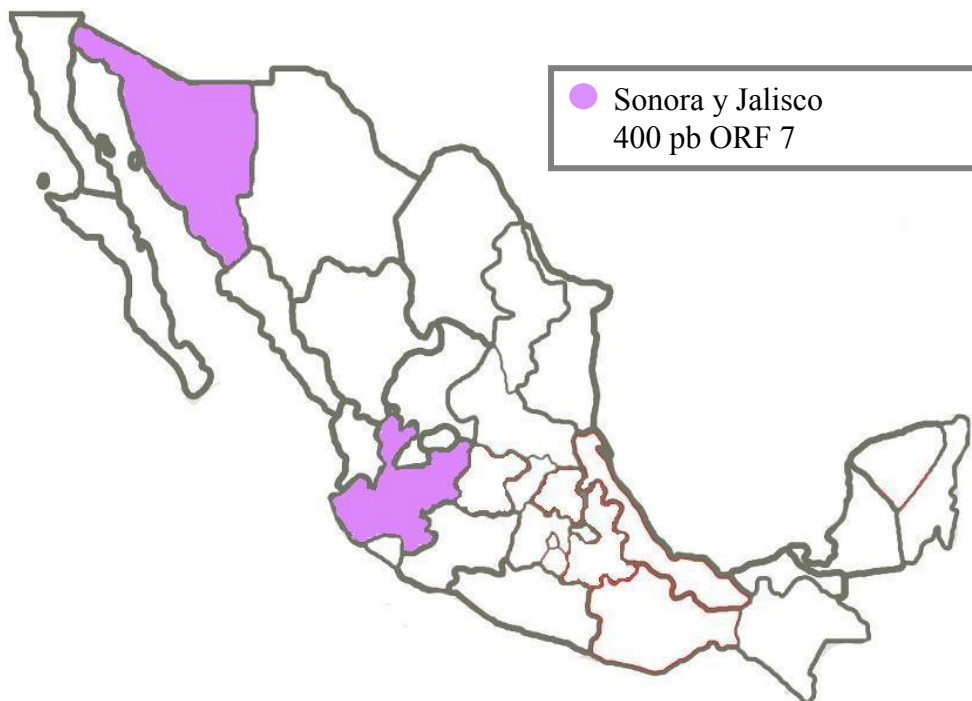
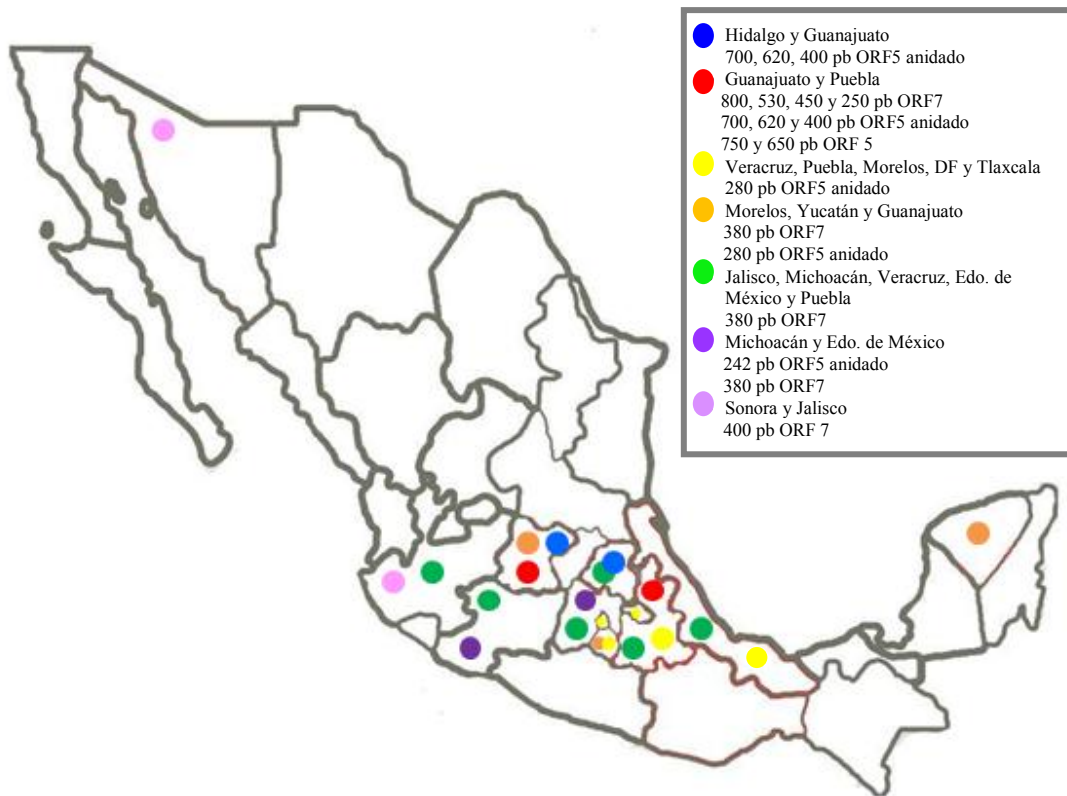


Figura 28. Distribución de los distintos patrones de amplicones encontrados.



ANEXOS

1. TAE 1x

Composición 1x (50x TAE BUFFER TRIS-ACETATE-EDTA, Thermo scientific):

- 40 mM Tris,
- 20 mM ácido acético,
- 1 mM EDTA,
- pH of 50X TAE: 8.4

Preparación:

- 1 l de agua destilada
- 20 ml de 50x TAE
 - 50x TAE Electroporesis Buffer for agarose and PPA gel electrophoresis of nucleic acids for preparation of agarose and PPA gels. 1 l, # B49. Fermentas Life Sciences.

2. Gel de agarosa 2%

- 100 ml de TAE 1x
- 2.0 g de TopVision™ Agarose. 500g #R0492. Fermentas Life Sciences.

3. 6x DNA Loading Dye

Se utiliza para preparar los marcadores de ADN y muestras de la carga en geles de agarosa o poliacrilamida. Contiene dos diferentes tintes (azul de bromofenol y xileno FF cyanol) para el seguimiento visual de la migración del ADN durante la electroforesis. La presencia de glicerol se asegura de que el ADN en la muestra y el marcador de peso molecular formen una capa en el fondo del pozo. El EDTA incluido en la solución une los iones metálicos divalentes e inhibe las nucleasas que dependen del metal.

Composición:

- 10 mM Tris-HCl (pH 7.6),
- 0.03% azul de bromofenol,
- 0.03% xylene cyanol FF,
- 60% glicerol,
- 60 mM EDTA

Características:

- Dos colores de seguimiento de la migración del ADN durante la electroforesis.



- No enmascara el ADN durante la exposición al gel a la luz UV.

4. pUC Mix Marker, 8

El marcador pUC mix se recomienda para el dimensionamiento y la cuantificación aproximada de pequeños fragmentos de ADN lineal de doble cadena en agarosa y geles de poliacrilamida no desnaturalizados.

