



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

GENÉTICA MOLECULAR

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ANTIGÉNICA Y GENÉTICA DEL VIRUS DE SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRSV) EN CEPAS MEXICANAS

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

ANGÉLICA LIZETH TOIBER ESTRELLA

TUTOR PRINCIPAL: ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES. FMVZ-UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
ROSA ELENA SARMIENTO SILVA. FMVZ-UNAM
JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIEN. IMSS**

MÉXICO, D.F., OCTUBRE DEL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

A mi compañero de vida. Por tu paciencia y comprensión. Y a los grandes sacrificios que me inspiraron a ser mejor para ti.

Valentina, Siempre estuviste a mi lado, esta tesis la hicimos juntas.

A mis padres. Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Para mis hermanos. Sé que siempre están al pendiente de mi éxito y en sus pasos me fortalezco.

A todos mis amigos del laboratorio, por compartir tantos momentos a lo largo de este proyecto.

Raskin, Beba, Barush, Francis, Boris y Shakira, ustedes me inspiraron a emprender esta hermosa profesión.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo en la realización de esta tesis.

A PAEP, por ayudar a difundir este proyecto.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales, por su invaluable apoyo y paciencia. Por permitirme formarme como investigadora bajo su liderazgo y orientación.

A la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez, por su eterna comprensión y disponibilidad.

Al Dr. Antonio Morilla, fundamental el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva y al Dr. Álvaro Aguilar Setién, por su colaboración en cada avance obtenido.

Al Dr. Ramiro Ramírez Necochea por el gran apoyo otorgado para culminar esta investigación.

Al Dr. Iván Sánchez Betancourt y a la Dra. Susana Mendoza Elvira, por su tiempo, atención y apoyo.

RESUMEN

Los genes más estudiados para análisis filogenéticos del virus del PRRS son el ORF-5 y el ORF-7. En nuestro laboratorio se clonó y expresó en baculovirus el gen ORF-7 de una cepa local que presenta como distintivo un aminoácido adicional. Este antígeno recombinante se integró en un sistema de diagnóstico ELISA (ELISA UNAM). El objetivo de este trabajo fue analizar la variabilidad antigénica y genética del virus del PRRS en México. Evaluamos la seropositividad al virus de PRRS de 622 muestras con dos sistemas comerciales de ELISA y el sistema ELISA UNAM. Dependiendo de la reactividad a cada sistema ELISA los sueros fueron clasificados en 8 grupos antigénicos. Estos grupos inmunoreactivos pueden explicarse por la presencia de virus con diferentes antigénicidades. El 39% de las muestras fue positivo solamente al ELISA UNAM, encontrando en estas muestras amplificación por PCR del virus de PRRS. La variabilidad genética del PRRSV se estudió amplificando el ORF-5 y el ORF-7 de estas muestras por RT-PCR anidada y por secuenciación de nucleótidos. Este estudio identificó cepas vacunales y variantes vacunales. En las secuencias del ORF-5, identificamos 3 idénticas a la vacuna y 5 variantes vacunales. De 31 secuencias estudiadas de ORF-7, encontramos 15 idénticas a la cepa vacunal y 16 variantes vacunales. Esto sugiere que cepas vacunales están circulando y lo están haciendo desde hace tiempo generando nuevas variantes. Hace falta estudios más sistemáticos en los cuales a partir de estudios genéticos amplios de las cepas circulantes, se aislen cepas representativas de cada variante genética y se obtengan antisueros, los cuales podrán emplearse en estudiar objetivamente el grado de variación antigénica entre las diferentes cepas. Estos estudios podrán definir un sistema serológico de diagnóstico más eficiente y útil para el monitoreo y control de los brotes del virus del PRRS.

Palabras clave: PRRS, variabilidad genética, variabilidad antigénica y secuenciación.

ABSTRACT

The genes more studied for phylogenetic analyses from PRRS virus are ORF-5 and ORF-7. Our laboratory has cloned and expressed the ORF-7 gen from a local variant in baculovirus system. A characteristic feature of the variant is the presence of an additional amino acid. This recombinant antigen was incorporated in an ELISA (ELISA UNAM). The aim was to analyze the antigenic and genetic variability of PRRSV strains circulating in México. We studied the seropositivity to PRRS virus from 622 serums samples with two commercial ELISA kits and the ELISA UNAM. The genetic variability of PRRSV was performed by amplifying the ORF-5 and the ORF-7 of these same samples by nested RT-PCR and nucleotide sequence analyses. The serological reactivity obtained was classified in 8 antigenic groups. This immunoreactivity groups, suggested the presence of viruses with different antigenic determinants. Distinguish, 39% of the samples was only positive for our antigen ELISA UNAM and also amplified PRRSV by PCR. With the obtained sequences of ORF-5, we identified 3 identical sequences to vaccine and 5 vaccinal variants. In the 31 sequences of ORF-7 we observed 15 identical sequences with the vaccine virus and 16 sequences were vaccinal variants. This make believe that vaccinal strain have been evolved and generated new variants. In addition, the vaccine virus has spread to farms where no vaccination is performed. This study shows that the genetic diversity of PRRSV in the country consists of vaccine strains and vaccine variants. Need more systematic studies which made from deep genetic studies of strains circulating, will isolated strains representing each genetic variant and antisera are obtained, which can be used to study objectively the degree of antigenic variation among different strains. These studies may define a more efficient and useful serological diagnostic system for monitoring and controlling outbreaks of PRRS virus.

Keywords: PRRS, genetic variability, antigenic variability and sequencing.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO	1
1.1.1 Organización genómica de PRRSV	2
1.1.2 GENOTIPOS DE PRRSV	3
1.2 LOS GENES ORF-5 Y ORF-7 SON LOS QUE TIENEN MÁS RELEVANCIA EN EL ESTUDIO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.	3
1.2.1 Glicoproteína 5	3
1.2.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE ORF-5	3
1.2.3 NUCLEOCÁPSIDE	6
1.2.4 BIOLOGÍA ESTRUCTURAL DE LA NUCLEOCÁPSIDE	6
1.2.5 DOMINIOS ANTIGÉNICOS DE LA NUCLEOCÁPSIDE	8
1.2.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE ORF-7	12
1.3 DIAGNÓSTICO	15
2 JUSTIFICACIÓN	16
3 HIPOTESIS	16
4 OBJETIVO GENERAL	16
4.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES	16
5 METAS	18
6 MATERIAL Y METODOS	19
6.1 ANTÍGENO RECOMBINANTE ORF-7 ELISA	19
6.2 PRUEBA DE ELISA	19
6.1.1 DESARROLLO DE ELISA UNAM	20
6.1.2 OPTIMIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE REACTIVOS	20
6.1.3 REPETIBILIDAD	21
6.2 MUESTRAS	21
6.3 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ANTIGÉNICA	22
6.4 PURIFICACIÓN DE ARN.....	22

6.5	AMPLIFICACIÓN DE ORF-5 Y ORF-7	23
6.6	ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE ORF-5 Y ORF-7	25
6.6.1	PURIFICACIÓN DE AMPLICONES	25
6.6.2	CLONACIÓN EN PGEM®-T.....	25
6.6.3	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	26
6.6.4	IDENTIFICACIÓN POR PCR DE CLONAS RECOMBINANTES	26
6.6.5	OBTENCIÓN DE ADN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES A PEQUEÑA ESCALA	26
6.7	SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS OBTENIDAS	27
6.7.1	ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS GENÉTICO	27
7	RESULTADOS	29
7.1	DESARROLLO DEL SISTEMA ELISA UNAM	29
7.2	REACTIVIDAD ANTIGÉNICA A LOS SISTEMAS ELISA.....	32
7.3	AMPLIFICACIÓN DE ORF-5 Y ORF-7 POR RT-PCR ANIDADA	34
7.4	ANÁLISIS GENÉTICO DE ORF-5.....	35
7.5	ANÁLISIS GENÉTICO DE ORF-7.....	41
8	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	46
9	REFERENCIAS.....	50

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DEL GENOMA DE PRRV.	2
FIGURA 2. CLASIFICACIÓN Y LA HISTORIA EVOLUTIVA DE TODOS LOS LINAJES DE PRRSV GENOTIPO 2	5
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA NUCLEOCÁPSIDE.	7
FIGURA 4. ESQUELETO PROTEICO DE NUCLEOCÁPSIDE.	9
FIGURA 5. MODELO DE ORGANIZACIÓN DE LA NUCLEOCÁPSIDE EN EL VIRIÓN.	10
FIGURA 6. ILUSTRACIÓN DE CINCO DOMINIOS CON IMPORTANCIA ANTIGÉNICA LOCALIZADOS EN LA PROTEÍNA N.	11
FIGURA 7. SECUENCIAS DE PROTEÍNA ORF-7 DE AMBOS GENOTIPOS.	12
FIGURA 8. DENDOGRAMA RADIAL CON SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA NUCLEOCÁPSIDE DE PRRSV DE AMÉRICA DEL NORTE EN EL GENBANK.	13
FIGURA 9. IDENTIFICACIÓN DE INSERCIÓN DE AMINOÁCIDOS EN CEPAS MEXICANAS.	14
FIGURA 10. IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO RECOMBINANTE ORF-7 (ELISA UNAM) DEL VIRUS PRRS EXPRESADO EN BACULOVIRUS EN CÉLULAS SF9.	15
FIGURA 11. ALINEAMIENTO DE NUCLEÓTIDOS CON PRIMERS.	24
FIGURA 12. REACTIVIDAD DEL ANTÍGENO ORF-7 RECOMBINANTE.	29
FIGURA 13. ESPECIFICIDAD SUERO POSITIVO VS ANTÍGENO ORF-7 UNAM Y PROTEÍNA M. ...	30
FIGURA 14. REPETIBILIDAD Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN ANTÍGENO ELISA UNAM.	31
FIGURA 15. DIAGNÓSTICO DE PRRSV POR 3 SISTEMAS ELISA.	34
FIGURA 16. RT-PCR ANIDADA DE ORF-5 Y ORF-7.	36
FIGURA 17. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS ORF-5.	39
FIGURA 18. DIVERSIDAD GENÉTICA DE ORF-5.	40
FIGURA 19. ALINEAMIENTO DE AMINOÁCIDOS DE NUCLEOCÁPSIDE	42
FIGURA 20. ALINEAMIENTO DE AMINOÁCIDOS DE NUCLEOCÁPSIDE EN LAS VARIANTES Y CEPAS MEXICANAS.	44
FIGURA 21. DIVERSIDAD GENÉTICA DE ORF-7.	45

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. INICIADORES PARA PCR.	24
CUADRO 2. PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTANDAR (DS) DE LA DENSIDAD ÓPTICA (DO) EN ENSAYOS DE LA REACTIVIDAD DEL ANTÍGENO RECOMBINANTE ORF-7	29
CUADRO 3. ANÁLISIS DE REPETIBILIDAD DEL ENSAYO ELISA UNAM.	31
CUADRO 4. NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS EN 31 GRANJAS Y SU GRADO DE REACTIVIDAD CON DIFERENTES SISTEMAS ELISA.	33
CUADRO 5. IDENTIFICACIÓN DE CLONAS DE ORF-5 OBTENIDAS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUERO	37
CUADRO 6. IDENTIFICACIÓN DE CLONAS DE ORF-7 OBTENIDAS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUERO	37
CUADRO 7. SITIOS POLIMÓRFICOS CON REFERENCIA LA CEPA VACUNAL MLV DEL ORF-5.	38
CUADRO 8. SITIOS POLIMÓRFICOS CON REFERENCIA LA CEPA VACUNAL MLV DEL ORF-7.....	42
CUADRO 9. VARIACIÓN DE ORF-5 Y ORF-7 EN LA MISMA MUESTRA	43

ACRÓNIMOS Y SIGLAS UTILIZADAS

ARN. ÁCIDO RIBONUCLEICO.
ELISA. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS
GP-5. GLICOPROTEÍNA-5.
IPMA. ENSAYO DE INMUNOPEROXIDASA EN CAPA.
IFA. INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA
MABS. ANTICUERPOS MONOCLONALES.
MARN. ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO.
MDO. MÁXIMA DENSIDAD ÓPTICA.
MLV. VIRUS VIVO MODIFICADO.
N. NUCLEOCÁPSIDE.
OIE. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS.

OPD. ORTO-FENILEN-DIAMINA

ORF. MARCO ABIERTO DE LECTURA.

PCR. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

RT-PCR. TRANSCRIPCIÓN REVERSA - REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

UTR. REGIÓN NO TRADUCIDA.

ALANINA: ALA (A)

ARGININA: ARG (R)

ASPARGININA: ASN (N)

ÁCIDO ASPÁRTICO: ASP (D)

CISTEÍNA: CYS (C)

GLUTAMINA: GLN (Q)

ÁCIDO GLUTÁMICO: GLU (E)

GLICINA: GLY (G)

HISTIDINA: HIS (H)

ISOLEUCINA: ILE (I)

LEUCINA: LEU (L)

LISINA: LYS (K)

METIONINA: MET (M)

FENILALANINA: PHE (F)

PROLINA: PRO (P)

SERINA: SER (S)

TREONINA: THR (T)

TRIPTÓFANO: TRP (W)

TIROSINA: TYR (Y)

VALINA: VAL (V)

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una de las enfermedades virales más importantes por su impacto económico en la industria porcina (Neuman et. Al 2005). Esta enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo de forma pandémica (Albina, 1997). Este virus puede causar falla reproductiva en cerdas y neumonía a cerdos de todas las edades (Rodriguez *et. al.* 1997, Zimmerman *et. al.* 1997). La alta variabilidad genética que existe en este virus ha causado grandes estragos en la producción porcina como ejemplo el brote atípico de PRRSV que afecto a 2,000,000 de cerdos con alrededor de 400,000 muertes, que ocurrió por la deleción de 30 aminoacidos en la protiena NSP2 (Tian et. al 2007). Otro problema de la alta variabilidad es el bajo nivel de protección que confieren las vacunas contra cepas heterólogas (Okuda *et. al.* 2008; Scotti, *et. al.* 2007). Lo que ha dificultado el control de esta enfermedad debido a la heterogeneidad genética y posiblemente antigénica del virus, consecuentemente no se ha logrado el desarrollo de una vacuna efectiva contra este patógeno (Meng *et. al.*, 1995; Yoon *et. al.* 1997; Meng, 2000; Mengeling *et. al.*, 2003). Actualmente en Estados Unidos causa pérdidas anuales superiores a los \$664 millones de dólares al año (Holkamp *et. al.* 2013). Se ha estimado que la enfermedad en el norte de México podría estar costando entre \$80 y \$120 millones de dólares por año. (Herrera, 2012).

1.1. El Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino

El virus de PRRS esta clasificado dentro del orden Nidovirales junto las familias Coronaviridae, Arterivirus, Roniviridae y Mesoniviridae. Pertenece a la familia *Arteriviridae* donde está incluido el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón (LDV), arteritis viral equina (EAV), y el virus de la enfermedad hemorrágica del simio (SHFV) (Conzelmann, 1993; Cavanagh, 1997). Estos virus se caracterizan por tener alta variabilidad genética y antigénica, infectar macrófagos alveolares porcinos (PAM) e inducir infecciones persistentes e inmunomoduladoras (Stadejek, 2002). En los

macrófagos se encuentran los receptores sialoadhesina porcina (pCD169) y pCD163 que se han descrito por permitir la entrada a PRRSV (Calvert, *et. al.* 2007).

1.1.1. Organización genómica de PRRSV

El genoma de PRRSV es una sola cadena de ARN envuelta con polaridad positiva, mide 15,428 nucleótidos. La organización del genoma comienza en el extremo 5' por la región no traducida (UTR), continúa con 10 marcos de lectura abierta (ORF) traslapados, finalizando la región 3'- UTR y una cola de adeninas (Figura 1). El ORF-1a y ORF-1b localizados en la parte proximal 5' consisten en el 75% del genoma y codifican la polimerasa vírica. La parte proximal 3' codifica para 8 proteínas que son traducidas por 7 mRNAs subgenómicas. Del ORF-2a al ORF-6 codifican proteínas asociadas a membrana (GP-2, E, GP3, GP4, GP5, GP5a y M). Las proteínas de membrana E y M no son glicosiladas. Por último ORF-7 codifica la nucleocápside (N) (Meulenber b, 1995).

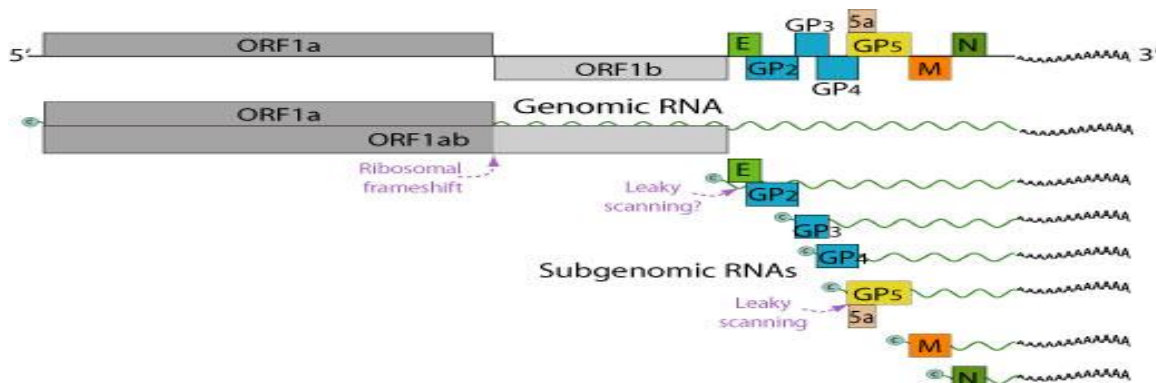


Figura 1. Esquema del genoma de PRRV.

1.1.2. Genotipos de PRRSV

El PRRSV puede clasificarse en dos genotipos con características genéticas y antigénicas distintas. El Genotipo 1 fue aislado en Europa, la cepa de referencia es Lelystad (Wensvoort *et. al.*, 1992). El Genotipo 2 fue aislado en Norte América y la cepa prototipo es VR-2332 (Collins, *et. al.*, 1992). Aunque los signos clínicos son muy similares entre estos virus (Wensvoort, 1992), la similitud genética de ORF-5 que existe entre estos genotipos es de 51% a 59. La relación de similitud entre cepas americanas en este mismo gen es de

88% a 97% (Mateu, *et. al.* 2006). Por el contrario ORF-7, es de los genes mas conservados y se ha encontrado una identidad del 95 al 100% entre cepas americanas. La similitud entre ambos genotipos en ORF-7 es del 57 al 59% (Nelsen, *et. al.* 1999).

1.2. Los genes ORF-5 y ORF-7 son los que tienen más relevancia en el estudio de la variación genética y diagnóstico serológico.

1.2.1 Glicoproteína ORF-5

La proteína con mas variabilidad genética de PRRSV es codificada por ORF-5 presenta 603 pares de bases las cuales son traducidas a 201 aminoácidos (Macías, *et. al.* 2006). Codifica para la glicoproteína principal de la envoltura viral, la cual se encarga de interactuar con el receptor de la célula huésped e inducir apoptosis. Aun no se han aclarado las propiedades inmunogénicas de esta proteína. Sin embargo se encontraron en dos regiones distintas, epítomos inmunodominantes en células T. Las cuales abarcan los residuos 117-131, y 149-163. Estos dos sitios están relativamente conservadas con un máximo de una variación de nucleótido entre ambos genotipos, por lo que se han propuesto para el desarrollo de una vacuna multivalente (Vashisht, *et. al.* 2008). El problema es que los anticuerpos neutralizantes aparecen después que los no neutralizantes, como consecuencia los cerdos infectados no controlan la infección viral en una fase temprana (Lopez y Osorio, 2004).

1.2.2 Análisis filogenéticos basados en el análisis de ORF-5

Por su característica de alta variación genética y su corta longitud es ideal para identificar aislados y establecer relaciones filogenéticas. La extensa diversidad se puede observar en el análisis de esta región en el genotipo americano, utilizando un banco con más de 8,000 secuencias (Figura 2). En ese estudio, estimaron que la tasa promedio de sustitución/sitio/año es de 9.6×10^{-3} (Shi *et. al.*; 2010). La mayoría de las mutaciones que se han reportado se encuentran en el ectodominio de la proteína GP5, la cual se supone es clave para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Lo cual puede alterar las regiones potencialmente inmunogénicas y afectar el reconocimiento de anticuerpos

frente a virus heterólogos (Macías *et. al.* 2006). Por otra parte, los análisis de este gen en México han sido muy escasos, pero se encontró gran variación al comparar la secuencia de nucleótidos de un aislamiento viral con la cepa VR-2332, obteniendo un 82% de similitud (Macías, *et. al.* 2006). En estudios más recientes donde fueron secuenciadas 14 muestras de campo se observó una similitud con un rango de 90% a 99% con respecto a VR-2332 (Burgara, *et. al.* 2012).

En el genotipo 1 se ha encontrado alta variación del gen ORF-5, donde solo el 72% mostró similitud en nucleótidos contra el prototipo Lelystad (Stadejek, 2002). Este gen además ha sido identificado con eventos de recombinación intragénica, teniendo lugar cuando dos cepas parentales co-infectan una célula y ambos generan ARN subgenómico durante la replicación viral. En Europa se han reportado aislamientos de cepas de campo con recombinación en el medio ambiente. Se ha considerado que la recombinación es generalmente al azar, aunque han sido encontrados sitios de recombinación similares a los reportados anteriormente (Dan, *et. al.* 2011).

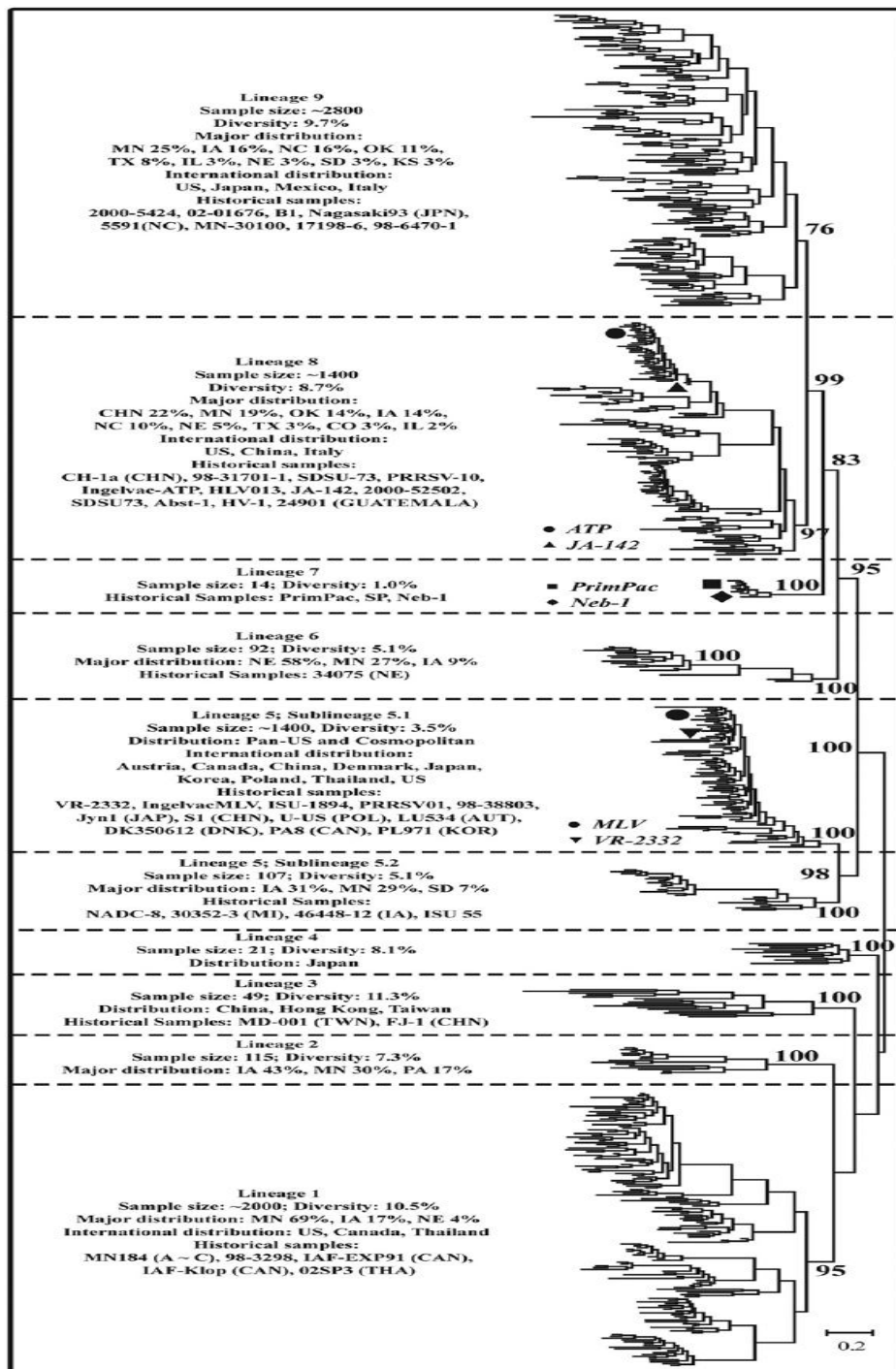


Figura 2. Clasificación y la historia evolutiva de todos los linajes de PRRSV genotipo 2. La información para cada linaje está indicada del lado izquierdo de la filogenia, incluye la diversidad del linaje, su distribución dentro de los Estados Unidos, su distribución internacional, y algunas cepas bien conocidas (Shi, *et. al.*; 2010).

1.2.3 Nucleocápside ORF-7

Los 123 aminoácidos de la proteína N o nucleocápside interactúan con el ARN viral para formar la nucleocápside viral. La proteína N es el producto de ORF-7, la cual es expresada desde el mRNA subgenómico (mRNA₇), y es la proteína más abundante en células infectadas. Comprende el 40 % de proteína del virión, esta proteína es la más inmunogénica (Meulenberg et. al. 1995 a), pero los anticuerpos anti-N no son neutralizantes y no protegen (Murtaugh et. al., 2000). Es la primera proteína para la que se producen anticuerpos, por lo que es candidato para detección serológica (Seuberlich et. al. 2002; Witte et. al. 2000; Magar et. al. 1995; Nelson et. al. 1996; Rodriguez et. al. 1997). La proteína N en forma esférica, posiblemente icosaédrica con un diámetro de 20-30 nm, se encuentra rodeada por una envoltura lipídica que contiene las proteínas de membrana virales (Hao, et. al. 2011).

1.2.4 Biología estructural de la Nucleocápside

La nucleocápside se divide en el dominio amino-terminal (N-terminal), el cual se une al ARN y en el dominio carboxilo-terminal (C-terminal) en forma dimerizada. El extremo N-terminal está integrado en su mayoría por aminoácidos con carga positiva abarca los residuos 1-57, consistente con el papel de unirse al ARN (Yoo et. al., 2003). Es en este dominio donde existe mayor variación entre cepas de PRRSV y otros Arterivirus. La secuencia de los residuos 21 al 33 del dominio N-terminal es altamente hidrofóbica y se ha encontrado por predicciones bioinformáticas que forma el α -hélice o (Figura 3 A). A pesar de lo poco conservado de esta secuencia comparte esta característica con otros Arterivirus. Puede ser que este dominio se involucre en el ensamblaje de una estructura espiral que se enrolla con otras proteínas N (Perera et. al. 2001)

El extremo C-terminal de la proteína comprende una dimerización bien ordenada o dominio "forma-capsides" que forma dímeros en solución (Figura 3A). La estructura cristalizada de este dominio (N Δ 57; residuos 58-123) mostró un dímero muy compacto formando una lamina β de cuatro cadenas anti paralelas que se encuentra flanqueada por

dos α hélices en los dominios N-terminales y C-terminales (Figura 3B). La estructura N representa una nueva clase de dominio viral formador de la cápside, diferente de otros virus envueltos conocidos, pero reminiscente a la proteína de cobertura del bacteriófago MS. Esta estructura es similar a la proteína N de otro Arterivirus comprendiendo los residuos 49 a 110 (N Δ 48) (Doan y Dokland, 2003).

La proteína N se incorpora a los viriones formando dímeros con puentes di-sulfuro, se han identificado cuatro sitios S (Figura 4), consistente a la presencia de dos residuos de cisteína por monómero de N (Doan y Dokland, 2003). Esta dimerización se lleva a cabo en Cys23, dentro de la hélice en N-terminal (Wooton y Yoo 2003). En combinación con la dimerización no covalente al dominio C-terminal en la cual se forman enlaces cruzados para proporcionar un mecanismo de ensamblaje en las partículas virales. Sin embargo, otros miembros de *Arteriviridae* carecen de este residuo de Cys, lo que indica que el enlace di-sulfuro quizá no es requisito para el ensamblaje (Dokland, 2010).

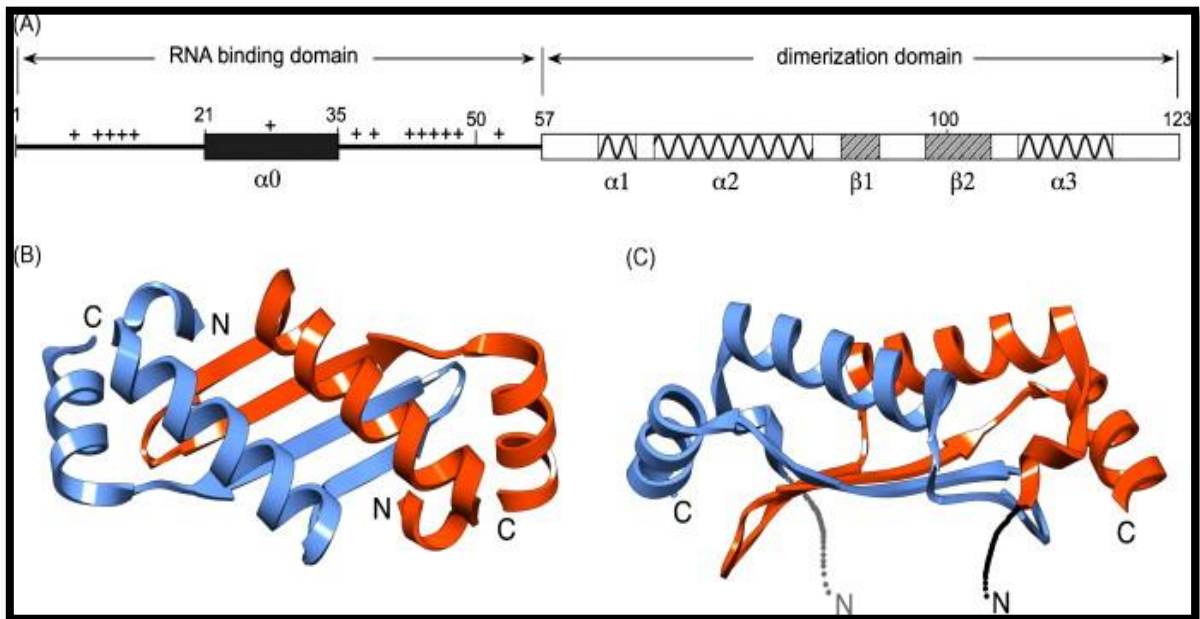


Figura 3. Estructura de la nucleocápside. (A) secuencia de N, mostrando la división entre el dominio de unión al ARN (residuos 1-57) y el dominio de dimerización (residuos 58-123), representados por la construcción N Δ 57. Se muestran los elementos de estructura secundaria, incluyendo la predicción del hélice hidrófobo (α -0) en el dominio de unión al ARN. Los residuos de carga positiva en el dominio de unión al ARN se indican mediante

signos (+). (B y C) los diagramas con laminas del dímero N Δ 57 vista superior (B), las 2 α hélices mirando hacia abajo, y una vista de "lado" (C), las 2 α hélices están orientadas perpendicularmente (Doan y Dokland, 2003).

Se ha encontrado fosforilación en los residuos de Ser tanto en el dominio de unión al ARN como en el dominio formador de cápside. Estos residuos fosforilados de serina se encuentran localizados cerca de la superficie de la proteína, en α 2 (Ser 70, Ser 77, y Ser 78), en el giro β 1 (Ser 93 y Ser 95), y en β 2 (Ser 99), aunque la función de la fosforilación aun no es clara. (Wootton *et al.* 2002). Los contactos de extremo a extremo entre los dímeros de la lámina son acomodados por las interacciones entre los residuos en α 3: Val 112, Ile 115 y Arg 116, y en el bucle de β los residuos Ser 93 y Asp 94. Por otro lado las interacciones laterales entre las láminas, son escasas y se unen principalmente a través de un enlace de hidrógeno entre Ser 70 en α 2 y Glu 103 en β 2 (Doan y Dokland, 2003).

Entre los residuos mas conservados se incluyen a Pro y Gly, ubicados entre las cadenas β y las α hélices, estos aminoácidos podrían ser esenciales para el correcto plegamiento de la proteína. Los residuos conservados en alfa 2 y la lamina β tienden a ser internos y están envueltos en interacciones diméricas. En contraste, estos son menos conservados en la superficie externa del dímero. Existe una parte de residuos conservados, incluyendo varios aminoácidos muy cargados, compuesto por las α 1 y α 3, lo cual sugiere un papel en la formación de interacciones interdímero del revestimiento de la nucleocápside. La interpretación que se ha sugerido a la estructura de la nucleocápside, es que dos capas de N forman dímeros unidos, pasando el ARN por en medio, así interactúa los dominios N-terminal y el ARN (Figura. 5) (Spilman *et al.* 2009)

1.2.5. Dominios antigénicos de la nucleocápside.

El carácter antigénico de la proteína N parece ser muy conservado, ya que se ha encontrado en diferentes estudios con MAbs una alta reactividad antigénica entre aislados de PRRSV norte americanos (Nelson 1996). Esto puede ser debido a sus propiedades antigénicas y la homología entre la secuencias por lo que la proteína N ha

sido un candidato ideal para detectar anticuerpos específicos a PRRSV en suero (Rodríguez *et. al.* 1997). Se han mapeado mediante estudios experimentales con MAb y diferentes construcciones de nucleocápside (Wootton, 1998; Tong, 2005), cinco dominios específicos en regiones únicas y de importancia antigénica en la proteína N (Figura 6). El dominio I, fue identificado por el MAb SDOW17, se localizó en la región N-terminal entre los aminoácidos 30 y 52. Este MAb reconoce ambos genotipos de PRRSV, por lo que podría ser que en esta región se encuentre un epítipo común. Dado el hecho de que SDOW17 reconoce un epítipo conformacional común a ambos genotipos, es probable que este epítipo se encuentre localizado dentro de una región altamente conservada de la proteína N y sea una herramienta valiosa para el diagnóstico. La región central de la proteína entre los residuos 47 al 100 se ha descrito por ser altamente conservada.

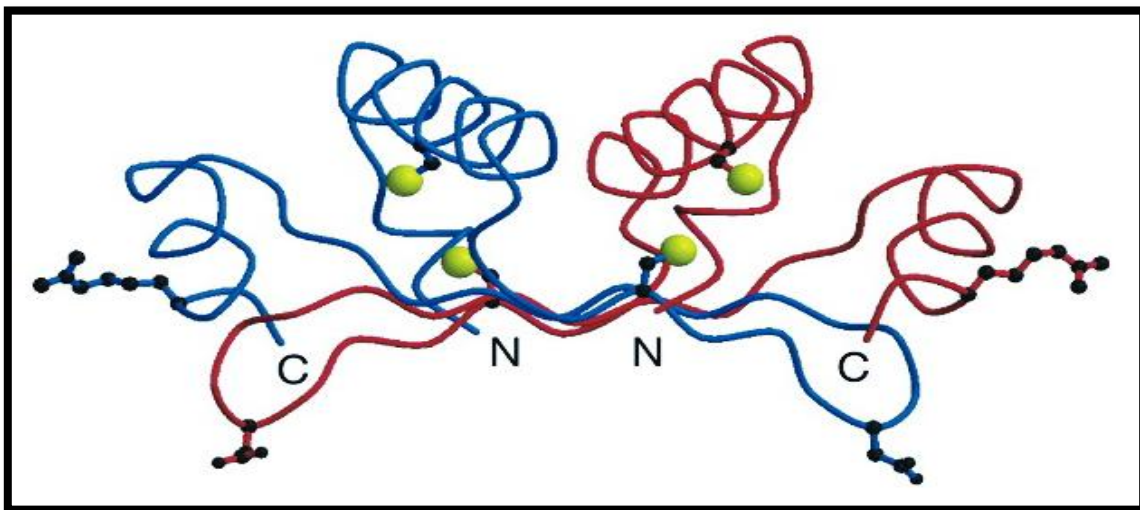


Figura 4. Esqueleto proteico de Nucleocápside. La subunidad α y β están coloreadas en azul y rojo, respectivamente. Los residuos de Cys y sus átomos de Sulfuro se indican en amarillo y pegados están los residuos de Arg 116 y Asp 94 son las esferas negras, las cuales están envueltas en interacciones interdímeras.

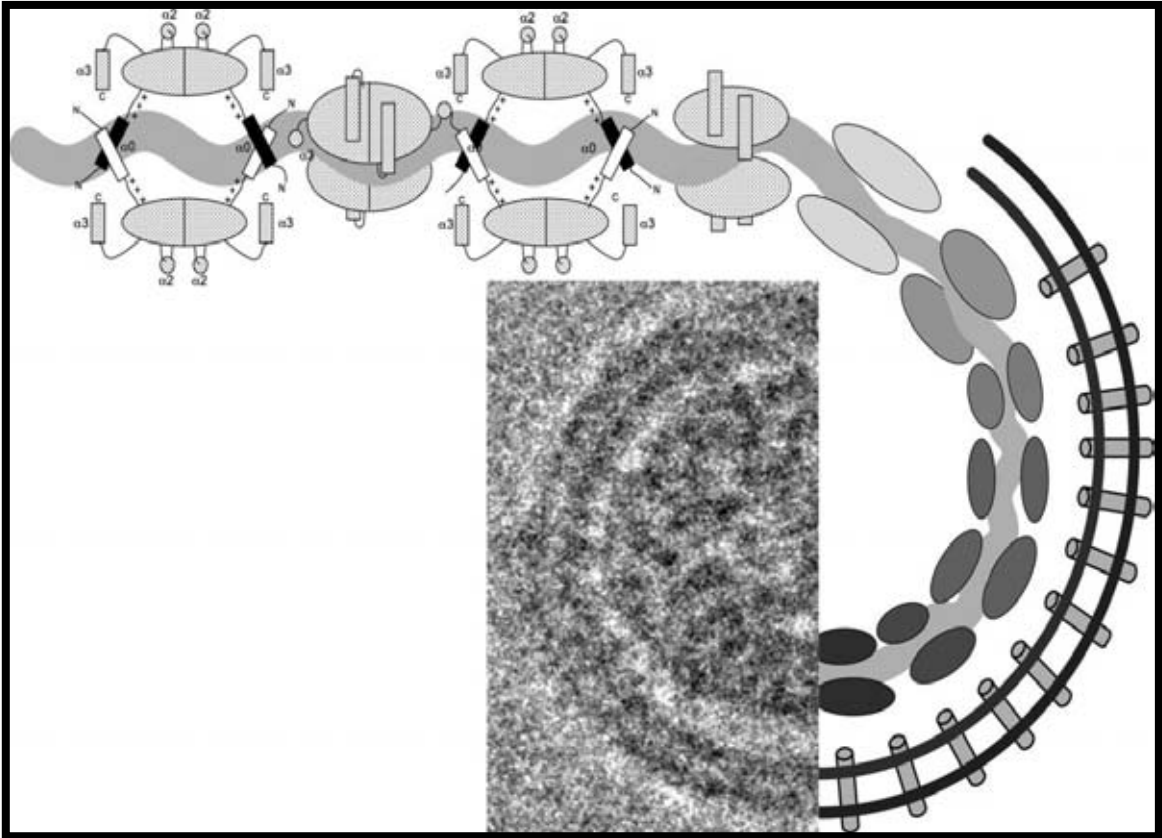


Figura 5. Modelo de organización de la nucleocápside en el virión. Posible modelo para la organización de la nucleocápside en el virión. Las formas ovales punteadas representan los dímeros de la proteína N. Se indican las características estructurales, incluyendo la α_0 , α_2 y α_3 -hélices y los dominios N-terminales con carga positiva. Estos dímeros se organizan de forma helicoidal alrededor de la ARN (curva sinusoidal de gris) a través de interacciones con los dominios de unión de ARN a los N-terminales. Esta lamina N-ARN se pliega en la nucleocápside, dando lugar a la aparición de doble capa del núcleo viral en micrografías de electrónicas. La "vía del tren" representa la envoltura viral con los dominios de las principales proteínas de la envoltura (Dokland 2010).

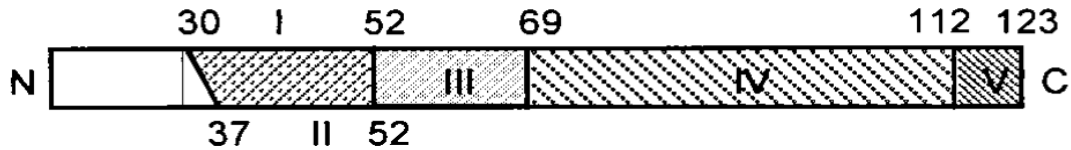


Figura 6. Ilustración de cinco dominios con importancia antigénica en la proteína N. Las áreas sombreadas están flanqueadas por las posiciones de los aminoácidos y representan los dominios localizados por estudios de mapeo (Wootton, 1998).

Mediante predicción de estructuras secundarias se encontró que esta región tiene conformación helicoidal, siendo este loop (bucle) hidrófilo, se considera que un cambio por un aminoácido hidrófobo en esta región pueda interrumpir la formación alfa hélice, influyendo así en la conformación general llegando a ser irreconocible por el MAb SDOW₁₇. El dominio II se ha descrito como un epítipo lineal y está situado entre los aminoácidos 37 y 57 (Wootton, 1998). El dominio III, presenta un epítipo inmunodominante, este dominio está definido por los aminoácidos 52 a 69, se encuentra dentro de una región muy conservada de la proteína N, anteriormente también se había descrito un epítipo lineal entre los aminoácidos 50-66 (Rodríguez 1997). Entre los aminoácidos 40 al 60 están presentes una región hidrofílica de la proteína N, lo que demuestra alta accesibilidad de disolverse, puede ser que su ubicación en la proteína sea visible en la superficie de la cápside externa. El dominio IV, que se extiende desde los aminoácidos 69 a 123 fue definido por el Mab SR₃₀ que al igual que SDOW₁₇ reconoce un epítipo muy conservado en la proteína N y por lo tanto constituye una valiosa herramienta de diagnóstico. El dominio V parece ser que desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la estructura de las proteínas como polimerización y ensamblaje de la nucleocápside (Wootton, 1998).

1.2.6. Análisis filogenéticos de ORF-7

Se han identificado pequeñas variaciones en el tamaño de ORF-7. En el genotipo 1 es de 387 nucleótidos con un producto de 128 aminoácidos, sin embargo en Lituania se ha descrito una variante de 378 nucleótidos con un producto de 125 aminoácidos (Figura 7). El genotipo 2, mide 372 nucleótidos con un producto 123 aminoácidos. Por lo que se ha descrito a la variante lituana como un ancestro común entre las variantes americana y europea de PRRSV (Stadejek, 2002).

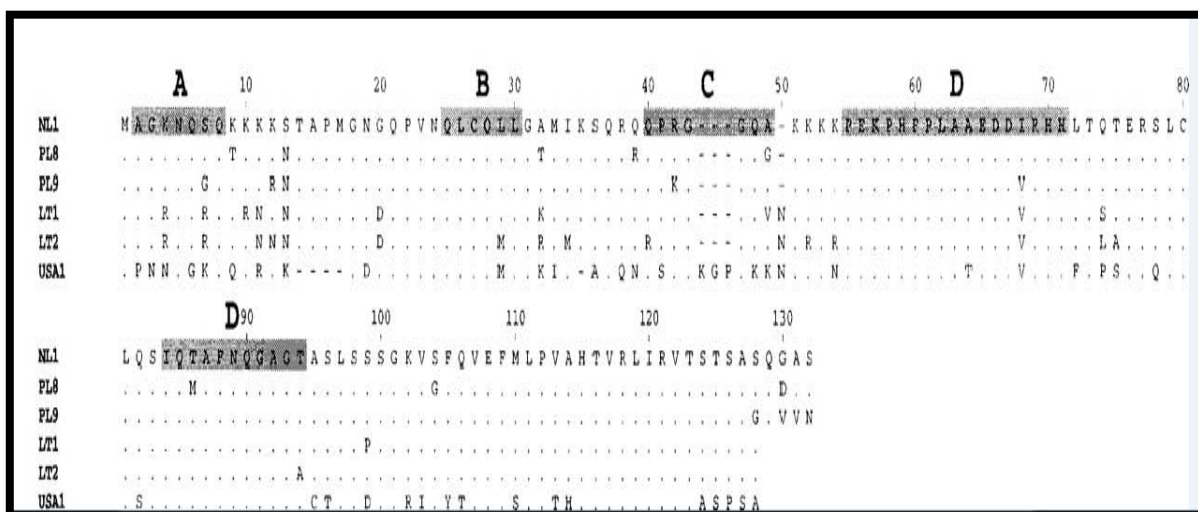


Figura 7. Secuencias de proteína ORF-7 de ambos genotipos. La proteína ORF-7 de genotipo 1, lelystad (NL1) tiene 128 residuos. La proteína ORF-7 genotipo 2 VR2332 (USA1) tiene 123 residuos. Las secuencias de proteínas ORF-7 polaco (PL8 y PL9) son de 128 residuos, como se esperaba para los virus de tipo UE. Sorprendentemente, las secuencias de proteínas de Lituania ORF-7 tenían sólo 124 residuos. Las casillas sombreadas marcados como A, B, C, D corresponden a sitios de unión antigénicos (Stadejek, 2002).

En México la similitud de nucleótidos del gen ORF-7 reportada entre cepas fue de 86% a 100%, aparentemente la diversidad en las cepas mexicanas es extensa y tiene diferenciación local (Figura 8). De forma singular se han encontrado inserciones de diferentes aminoácidos en este gen (Batista, *et. al.* 2004).

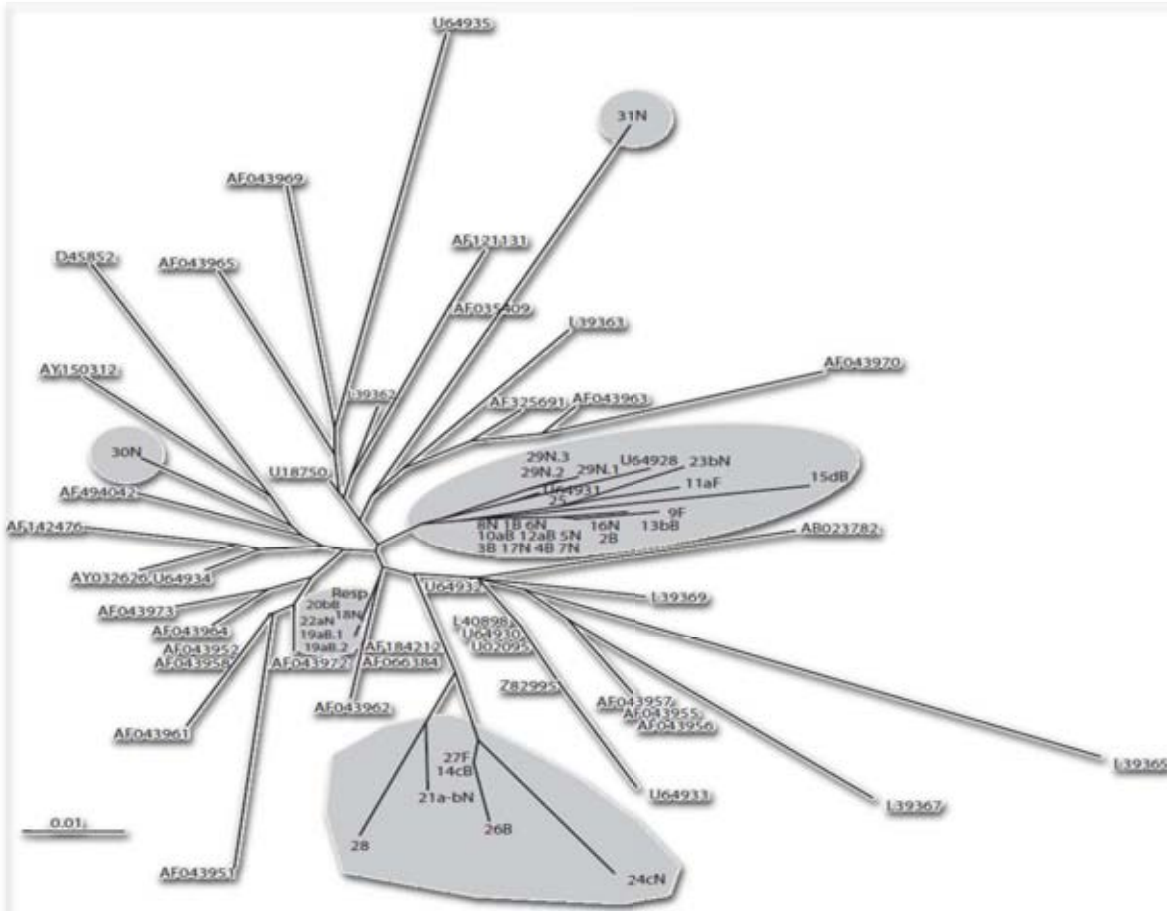


Figura 8. Dendrograma radial con secuencias de aminoácidos de la nucleocápside de PRRSV. Muestra 34 aislamientos de PRRSV de dos regiones geográficas de México. Tres grupos distintos y dos aislamientos individuales están sombreados en gris. El esquema de identificación de la muestra para los aislados mexicanos, numerados del 1 al 31, incluye letras minúsculas (a hasta d) la identificación de fuentes diferentes sitios dentro del mismo sistema de producción, y las letras mayúsculas que identifican animales lactantes (B), destete (N), finalización (F). El resto de denominaciones se refieren a secuencias en GenBank del gen ORF-7 de PRRSV. Resp: identifica la cepa del virus del PRRS en la vacuna RespPRRS MLV (Boehringer Ingelheim Vetmedica, St Joseph, Missouri). (Batista, *et. al.* 2004)

Las cepas locales con inserción de aminoácido miden 375 nucleótidos con un producto de 124 aminoácidos. Estas inserciones se encontraron en la misma región variante de las cepas europeas. El aminoácido se localiza en la posición 14, traduce a glutamina (Q) (Batista, *et. al.* 2004). La otra inserción se encontró en el aminoácido 46 que traduce a prolina (K) (Cruz, C; 2006). Agregandose a estos hallazgos en nuestro laboratorio encontramos una cepa local con estas características, donde la inserción fue Isoleucina en la posición 12 de la nucleocápside (Figura 9). Esta cepa fue clonada y expresada en el sistema baculovirus para ser utilizado como antígeno en prueba de ELISA indirecta (Figura 10).

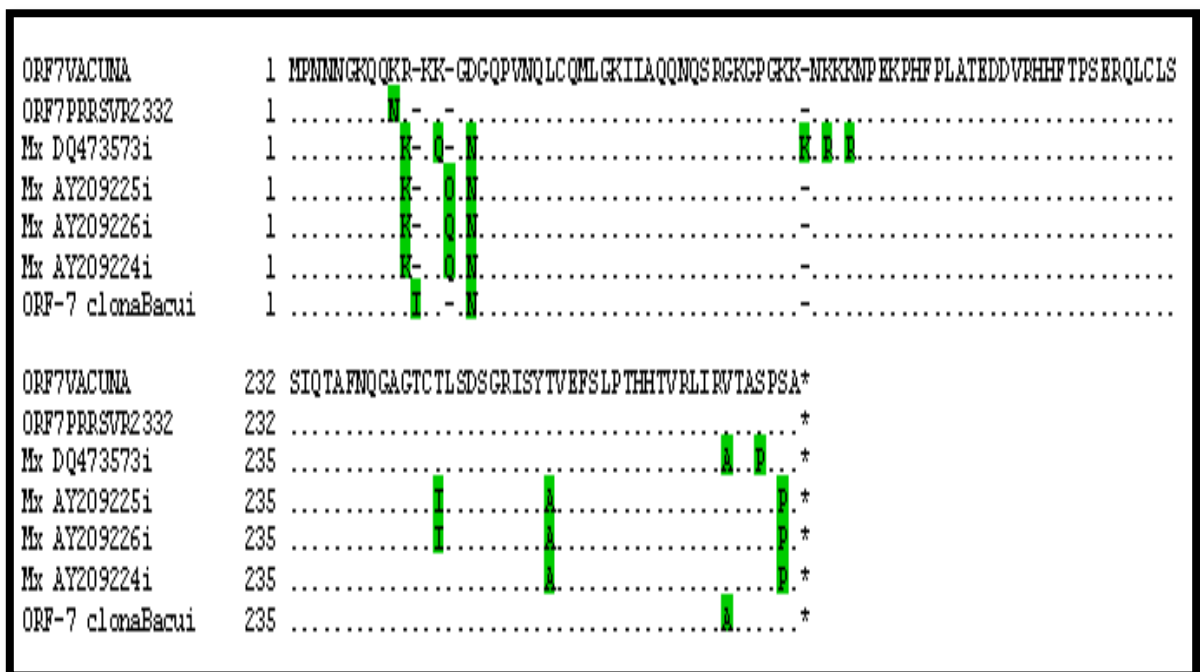


Figura 9. Identificación de inserción de aminoácidos en cepas mexicanas. Las inserciones están resaltadas con círculo rojo. La secuencia ORF-7 clona Bacu, fue expresada en sistema Baculovirus para ELISA UNAM y las otras secuencias con inserción son AY209225, AY209226, AY209227 y DQ473573. En color verde se encuentran resaltadas las diferencias que existen entre las secuencias hacia la cepa vacunal y la cepa prototipo VR2332.

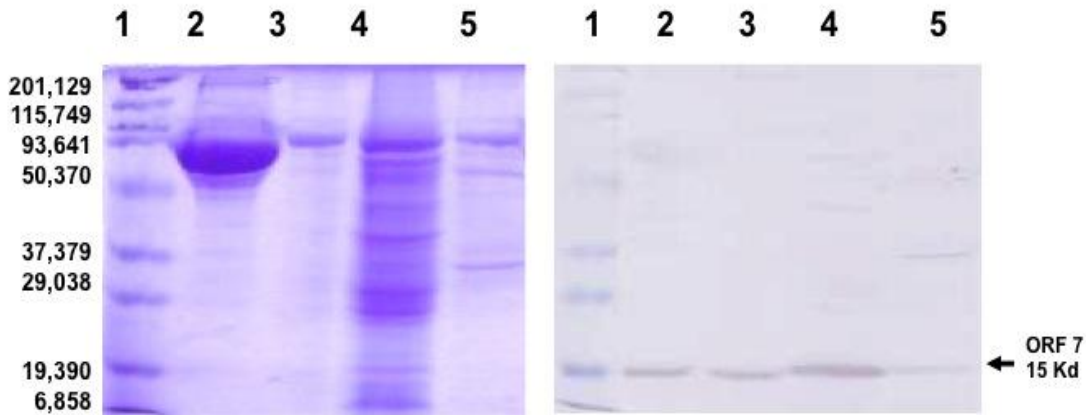


Figura 10. Identificación del antígeno recombinante ORF-7 (ELISA UNAM) del virus PRRS expresado en baculovirus en células SF9. A) Gel de acrilamida 10%, corrida a 100 volts 1.5 hr. B) Western Blot con membrana de PVDF, bloqueado con PBS-Tween20, leche 5%; Dilución del 1er. Ab 1:500; Dilución del 2º Ab 1:3000; Revelado con 4 Opti-CN (Biorad). Identificación de cada pozo: 1. Marcador de PM; 2. ORF -7 c/SFB Pase7; 3. ORF 7 Pase7 s/SFB; 4. ORF-7 Pase7 s/SFB (lisado celular) ; 5. ORF -7 Pase 7 c/SFB (lisado celular).

1.3. Diagnóstico

Para el diagnóstico de PRRSV se utilizan métodos moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que detecta virus en sangre a partir de los 3 días hasta los 30 post-infección. Los métodos serológicos para diagnóstico de PRRSV son: ensayo de inmunoperoxidasa en capa (IPMA), inmunofluorescencia indirecta (IFA) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los anticuerpos analizados con ELISA se detectan del día 14-135 post-infección, a partir de los 4 meses los anticuerpos caen hasta ser indetectables (Batista, *et. al.* 2004a). Esta situación puede complicar el diagnóstico debido a que los cerdos seropositivos pueden ser cerdos que han sido infectados por PRRS (cerdos viremicos con anticuerpos), también existen cerdos con anticuerpos maternos y/o cerdos vacunados que pueden tener presencia de virus y anticuerpos. O cerdos sin virus y con anticuerpos vacúnales (Sierra N, *et. al.* 2000). Existen cerdos sin anticuerpos pero con presencia de virus latente por: brote activo, acarreador asintomático, inseminación

artificial (infección reciente a través del semen) y los cerdos sanos tienen ausencia del virus.

En diferentes estados de México se ha encontrado hasta el 100% de cerdos seropositivos, incluso se ha logrado aislar (Sierra, *et. al.* 2000) y secuenciar el virus (Basto, *et. al.* 2004; Macías *et. al.* 2006). Los sistemas ELISA comerciales más utilizados en México son HIPRA e IDEXX. Este último es empleado en todo el mundo y utiliza como antígeno lisados celulares infectados con PRRSV, este sistema detecta cepas americanas y europeas.

2. JUSTIFICACIÓN

En México, aunque se han identificado variantes genéticas del virus de PRRS, hay pocos estudios sobre el grado de variación genética y si estas variaciones influyen en cambios antigénicos. Se desconoce si las cepas variantes pueden ser detectadas eficientemente por los sistemas comerciales de diagnóstico serológico disponibles en el mercado. Por lo anterior, es fundamental la caracterización genética y antigénica de las cepas circulantes en el país para mejorar el control del virus de PRRS.

3. HIPÓTESIS

La variabilidad genética de las cepas locales del virus de PRRS se acompaña de variación antigénica que afecta el diagnóstico y el control de esta enfermedad.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la variabilidad antigénica y genética del virus de PRRS a partir de sueros procedentes de diferentes granjas del centro del país.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la variabilidad genética y antigénica del virus de PRRS a partir de muestras de suero.

5. METAS

Estandarizar un sistema ELISA (ELISA UNAM) basado en un antígeno ORF-7 recombinante expresado en baculovirus, proveniente de una muestra local.

Evaluar sueros porcinos obtenidos de varias granjas del estado de Morelos en su reactividad antigénica empleando dos sistemas de ELISA comerciales y el sistema ELISA UNAM.

Obtener ARN a partir de los sueros, amplificar por RT-PCR los genes ORF-5 y ORF-7. Clonar los productos de amplificación para secuenciar los genes ORF-5 y ORF-7 para efectuar análisis genético.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Antígeno recombinante ORF-7.

El antígeno ORF-7 recombinante fue obtenido a partir del suero de una muestra de campo. El gen ORF-7 fue amplificado por PCR y clonado en un baculovirus. Se obtuvo la secuencia de nucleótidos identificando que es una variante vacunal que contiene una inserción de isoleucina en la posición 12 del gen. Además, tiene otros 2 cambios de aminoácido ($D^{16} N^{16}$ y $V^{117} A^{117}$) que lo distinguen de la cepa vacunal (ver Figura 9).

El antígeno recombinante fue producido en el Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM. Éste fue crecido en células de insecto Sf9. Este antígeno consiste en un extracto crudo de las células infectadas.

6.2. Prueba de ELISA

Se sensibilizó una placa Maxisorb con el antígeno recombinante de ORF-7, en el buffer de carbonatos 1X [carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6], colocando 100 μ L de esta dilución por pozo. Se incubó a 4°C por toda la noche. Pasado el tiempo de incubación se lavó la placa (300 μ L/pozo) durante 5 minutos en 4 tiempos, con buffer de lavado 1X [Buffer de lavado 10X; cloruro de sodio 1.25 M, 250 mM tris-HCl pH 7.9, Tween-20 1%]. La placa fue bloqueada por 1 hora a 37°C colocando a cada pozo 100 μ L de buffer de bloqueo [Buffer de bloqueo 1X; leche descremada 2%, en Buffer de lavado 1X]. Posteriormente se repite el lavado. La placa se incubó con suero diluido en buffer de bloqueo y se colocó 100 μ L/pozo. Se incubó una hora con el primer anticuerpo y se repitió el paso de lavado. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo (anti-swine IgG) acoplado a peroxidasa y es diluido en buffer de bloqueo, se incubó por 1 hora a 37 °C. Se repitió el paso de lavado. Finalizando con el revelado, se añadió 100 μ L/pozo de solución reveladora [ácido cítrico 0.1 M pH 4.5 y citrato de sodio 0.1 M pH 4.5]. Por placa se agregó 5 ml del ácido cítrico [0.1M] y 5 ml de citrato de sodio [0.1M], se agregan 200 μ L de orto-fenilen-diamina (OPD) [5 μ g] de 20 μ L de peróxido de hidrogeno al 30%, para su posterior lectura se mantiene cubierta de la luz por 5 minutos a temperatura ambiente e

inmediatamente se detiene la reacción con 100 µl a cada pozo de solución de frenado [ácido sulfúrico 2N] y leer a 450 nm en un lector de ELISA.

La calidad del revelado de cada ensayo, se evaluó con curva generada en la prueba de máxima densidad óptica (MDO). Se realizó colocando 100 µl de la solución reveladora en 8 pozos de la placa por duplicado. Posteriormente se agregaron 100 µl de la solución de segundo anticuerpo a una dilución de 1:1500 realizando diluciones dobles seriadas.

6.2.1 Desarrollo de ELISA UNAM

Se llevó a cabo la validación de un sistema de ELISA basado en un antígeno ORF-7 recombinante expresado en baculovirus, siguiendo las recomendaciones de la OIE (Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases). Estas recomendaciones consisten en determinar: Definición del propósito del ensayo, Optimización, Estandarización, Repetibilidad, Sensibilidad analítica, Especificidad analítica, Definición de umbrales, Sensibilidad diagnóstica, Especificidad diagnóstica, Reproducibilidad, Idoneidad para el propósito.

6.2.2 Optimización y estandarización de reactivos.

La reactividad del antígeno ORF-7 recombinante fue titulada por ELISA. Se sensibilizó la placa con diluciones dobles seriadas del antígeno (1:10 a 1:20480).

Como primer anticuerpo se empleó suero hiperinmune de un cerdo vacunado contra el virus de PRRS. La reactividad del antígeno se evaluó con diluciones del suero a 1:10 y 1:100.

Determinamos la cantidad mínima del antígeno que conservó reactividad máxima (dilución 1/40, 0.05 µg/µl). Con la intención de evaluar el grado de variación en la reactividad de esta dilución del antígeno, se hicieron 24 ensayos, empleando para revelarlo diluciones 1:10 y 1:100 del suero control positivo. Se encontró que la dilución del suero 1/100 da valores más repetibles.

6.2.3 Repetibilidad

Establecidas las estandarizaciones de la ELISA UNAM (dilución de antígeno 1/40, 0.05 µg/µl pozo, revelando con dilución del suero 1/100) se evaluó el grado de repetibilidad de la reactividad de 96 muestras de sueros, incluyendo controles positivos y negativos: Como suero negativo se empleó un suero de cerdo negativo a PRRS. Se efectuaron 4 repeticiones para el grupo de 96 muestras. Las densidades ópticas obtenidas se analizaron estadísticamente, obteniendo la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Estas muestras fueron además fueron diagnosticadas como positivas o negativas determinando el valor SP. Este valor se obtiene = $DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo} / DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo}$. El punto de corte se determino considerando el valor S/P. Sí es inferior a 0.40 la muestra se clasifica como negativa. Si el valor S/P es mayor o igual a 0.40 la muestra se clasifica como positiva a la presencia de anticuerpos contra el virus de PRRS.

Se determinó en la repeticiones de cada muestra cuantas veces una muestra fue discordante en relación al resultado promedio. Con estos datos se calculó el porcentaje de discrepancia = $\text{No discrepantes} / \text{No ensayos}$. Igualmente se calculó el porcentaje de repetibilidad = $100 - \text{discrepancia}$.

Se analizó la especificidad analítica evaluando si en ELISA existía reactividad cruzada del suero control positivo con otros antígenos recombinantes, utilizando el antígeno ELISA UNAM y el antígeno recombinante en sistema baculovirus de la proteína M de influenza aviar.

6.3 Muestras

Se analizaron 622 muestras de un banco de sueros, provenientes de 31 granjas localizadas en Morelos (Cuadro 4).

Se generó un suero hiperinmune vacunando un cerdo contra el virus de PRRS para ser empleado como control positivo en la caracterización de antígenos y en los ensayos de ELISA. La reactividad del antígeno se evaluó con diluciones del suero a 1:10 y 1:100.

Se obtuvieron sueros hiperinmunes vs ORF-7 recombinante en conejos inmunizados con el extracto crudo de sobrenadantes de células infectadas con el baculovirus recombinante.

6.4 Análisis de la variabilidad antigénica.

Las muestras de sueros fueron evaluadas por los sistemas de diagnóstico serológico ELISA: ELISA UNAM (EU), IDEXX (C1) e HIPRA (C2), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Dependiendo de la inmunoreactividad de las muestras a los diferentes sistemas de ELISA se definieron 8 diferentes grupos antigénicos (ver cuadro 4).

El suero de conejo vs ORF-7 recombinante se empleó en evaluar la reactividad antigénica de los antígenos de los sistemas de ELISA comerciales en comparación al antígeno recombinante ORF-7 UNAM.

6.5 Purificación de ARN

Se utilizaron 326 muestras del banco de sueros para purificar el ARN. Este se purificó de algunas muestras en pool de 3. Se emplearon 500 µl de suero al cual se le agregó 1000 µl del Reactivo RNeasy (Biotecnologías Moleculares SA de CV). Posteriormente, se adicionaron 200 µl de cloroformo y se centrifugó a 14,000 rpm/ 10 min. Se separó la fase acuosa superior donde se encuentra el ARN. Se precipitó el ARN, agregando 500 µl de alcohol isopropílico, se incubó a -20°C durante 30 minutos. Se continuó centrifugando a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desecha el sobrenadante. El precipitado de ARN se lavó con etanol al 75% en agua dietil pirocarbonatada (DEPC), las muestras fueron

centrifugadas y se desechó el sobrenadante. El ARN se secó a 55°C por 15 min, y fue suspendido en 30 µl de agua DEPC.

6.6 Amplificación de ORF-5 y ORF-7

Para la amplificación de los segmentos genéticos del ORF-5 y el ORF-7 se empleó un sistema anidado de PCR. El cual consiste en dos reacciones de PCR sucesivas, en donde la segunda PCR o anidada amplifica un segmento interno del primer producto de amplificación (Figura 11), lo cual garantiza una mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico. Para esto se emplearon los iniciadores mostrados en el cuadro 1.

Para la síntesis de ADN complementario (cDNA) fueron utilizados los iniciadores reversos ORF5R1a y ORF7ERN [66 pmol], dNTP's [1 mM], enzima transcriptasa reversa [200u/µl], amortiguador de reacción 1x, inhibidor de RNAsa [20u/µl], Agua DEPC cbp 20 µl y 9.5 µl de ARN. Las condiciones de retrotranscripción en el termociclador fueron: 5' a 70°, 37° por 5', 42° durante 1 hora y 70 ° por 10 minutos.

Se utilizó como control positivo el ARN de la vacuna Ingelvac PRRS MLV. La PCR anidada se estandarizó con los primers internos (Cuadro 1). La primer PCR fue realizada empleando cDNA de los genes ORF-5 y ORF-7. Para la amplificación de ambos genes, en la primera reacción de PCR se emplearon los primers externos, usando 5 µl del cDNA. En la 2ª reacción de PCR se tomaron 5 µl de la primera reacción de PCR, empleando los iniciadores internos (ver Cuadro 1). La reacción de amplificación se realizó en 20 µl. Las condiciones de las reacción de PCR fueron las mismas para ambos genes, así como en la 1ª y la 2ª PCR: Iniciadores [0.8 µM], dNTP's [0.2mM], MgCl₂ [1.5 mM], amortiguador de reacción 1x, Taq polimerasa 2 µl]. La amplificación con los diferentes pares de iniciadores se realizó con el protocolo: desnaturalización durante 5' a 94 °C, seguido por 30 ciclos a 94 °C durante 30'', la alineación por gradiente de temperaturas de 42 a 64 °C durante 30'' y extensión a 72 °C durante 30'', con una extensión final de 15' a 72 °C. Los productos de amplificación se corrieron por electroforesis en agarosa al 1% y 3% en buffer TAE junto con el marcador de peso molecular λ y/o el marcador pBR. Los geles de agarosa fueron,

teñidos con bromuro de etidio 100 µg/ml y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Cuadro 1 Iniciadores para PCR.

PRIMER	EXTERNOS (1er PCR)	INTERNOS (2ª PCR)
ORF-5	F1: TTGCT ₅ CATTTCHTGACACC R1a: CCGCGACTCACCTTTAGGGC	F2a: ATGAGGTGGGCAACTGTTTTAGC R2a: CATATATCATCACTGGCGTG
ORF-7	EFN: TACGGTCAACGGCACATTGG ERN: GGTGACTTAGAGGCACAATG	ORF7FBam: Cg G GAT CC G ATG CCA AAT AAC AAC GGC AAG ORF7RBam: Cg G GAT CC G TCA TGC TGA GGG TGA TGC TGC TGT G

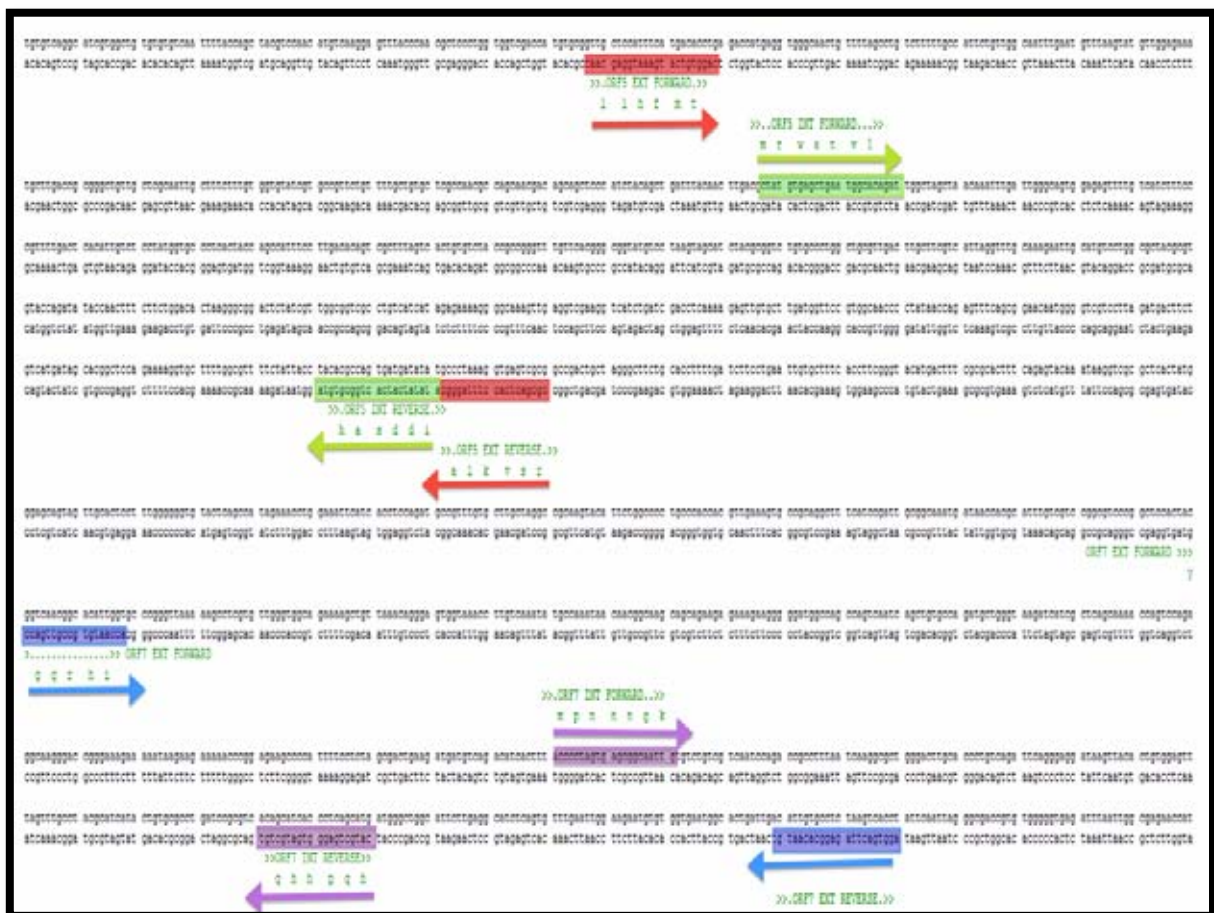


Figura 11. Alineamiento de nucleótidos con primers. ORF-5 externos (rojo), internos (verde) y ORF-7 externos (azul) e internos (morado).

6.7 Análisis de la variabilidad genética de ORF-5 y ORF-7

Se estudiaron 326 muestras problema con diferentes reactividades antigénicas para purificar el ARN. Las muestras que resultaron positivas (7 para ORF-5 y 77 para ORF-7) los amplicones fueron purificados por el método de yoduro de sodio, posteriormente clonados en un vector T comercial. Algunas de las clonas fueron secuenciadas (31 clonas para ORF-7 y 8 para ORF-5). Los electroferogramas de nucleótidos obtenidos fueron comparados con la secuencia de referencia VR2332 y con la vacuna MLV. La variabilidad genética se analizó mediante un BLAST con cepas mexicanas y de otras partes del mundo que habían sido reportadas en Gen Bank, posteriormente se observó a que variedad antigénica correspondía.

6.7.1 Purificación de los amplicones

Las amplificaciones obtenidas por PCR, fueron separados por electroforesis en genes de agarosa al 1% y 3 % para ORF-5 y ORF-7, respectivamente. Las bandas de los amplicones fueron recortadas del gel de agarosa y purificadas por el método de yoduro de sodio (Boyle y Lew, 1995). Los fragmentos recortados de agarosa se pesaron y incubaron a 55°C con 3 volúmenes de NaI 6M. Se adicionaron 20 µl de perlas de sílice y se incubaron 30 minutos a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron y las pastillas se lavaron 2 veces con 500 µl de solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris HCl pH7.5 10mM, EDTA 2.5mM, etanol 50% v/v). La pastilla se secó y resuspendió en 30 µl de H₂O. El ADN se eluyó de las perlas por incubación durante 10 minutos a 55°C. Posteriormente la suspensión es centrifugada para recuperar el ADN. Las muestras de ADN se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se purificaron 7 muestras positivas para ORF-5 y 28 muestras para ORF-7, mientras 9 de ellas se encontraban en pool de 2 sueros.

6.7.2 Clonación en pGEM®-T

El ADN de los fragmentos obtenidos de la purificación se clonó en el vector comercial pGEM®-T. Las reacciones de ligación se hicieron en una relación molar inserto: vector 3:1,

se utilizó 100 ng del ADN del amplicon y 30 ng de ADN del vector, agregando 1 unidad de T₄-ligasa en su amortiguador específico, posteriormente se incubó toda la noche a 4°C.

6.7.3 Transformación de células competentes.

Fueron transformados 25 ng de ADN de la ligación previa en 100 µl de las bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α. Se incubaron por 30 minutos en hielo, posteriormente 1 minuto a 42°C, después se les adicionó 900 µl de medio LB y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. Al término de la incubación, se espatuló 200 µl del cultivo sobre placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina, Xgal (266 µg/ml) e IPTG (266 µg/ml). Estas placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

6.7.4 Identificación por PCR de clonas recombinantes.

Se eligieron colonias blancas al azar, se crecieron en placas de LB-ampicilina y a la par se colocaron en tubos de 200 µl que contenían 50 µl de agua destilada estéril. Las colonias que se encontraban en los tubos fueron lisadas a 94°C por 10 min. Esta suspensión fue utilizada para la PCR con los iniciadores de los plásmidos M13 para pGEM®-T. Aquellas clonas positivas a PCR se crecieron en medio líquido de LB para obtener ADN plasmídico.

6.7.5 Obtención de ADN de plásmidos recombinantes a pequeña escala

Las colonias bacterianas recombinantes se sembraron en 9 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. El cultivo es centrifugado a 3,500 rpm por 6 min. El sobrenadante fue decantado y la pastilla se resuspendió en 600 µl de solución de lisis (8% Sacarosa, 5% Tritón X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8), y fue incubada temperatura ambiente por 10 minutos. Se adicionó lisozima (1.25 µg/µl) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se hirvió en baño de agua por 1 min y se centrifugó 10 minutos a 12,000rpm. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó RNAsa (15µg/ml) y proteinasa K (50 µg/ml). Se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto e incubaron a -20°C por 30 minutos, después se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm. Finalmente se lavó la pastilla con etanol al 70%, y se resuspendió en 100 µl de

agua estéril. Las muestras de ADN se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

6.7.6 Secuenciación de las clonas obtenidas

Se seleccionaron 1 a 2 clonas de cada muestra para realizar las reacciones de secuenciación. Para cada reacción se incluyeron 250-300 ng de ADN plasmídico, se utilizaron los primers de M13 Forward o Reverse a 5 pM, 1 µl de betaína [5M], (Sigma-Aldrich) 1 µl de Big dye y 2 µl de Buffer, estos últimos dos son reactivos del kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied biosystems™). Las condiciones del termociclador fueron: 1 ciclo de 94 °C por 4', seguido de 25 ciclos de 94°C por 10', 58°C por 15' y 50 °C durante 4 minutos.

Los productos de secuenciación fueron filtrados por cromatografía de exclusión molecular con sephadex g50. A cada columna se agregaron 600 µl de sephadex, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugaron las columnas a 3000 g por 3 minutos. Posteriormente la columna se colocó en un tubo limpio de 1.5 ml y se adicionó el contenido de la reacción de secuencia. Se repitió el paso de centrifugación. La muestra es secada al vacío y se mantuvo protegida de la luz. Las muestras fueron enviadas al instituto de Investigaciones Biomédicas –UNAM para su lectura en un secuenciador automatizado.

6.7.7 Ensamblaje de secuencias y análisis genético

Para cada clona secuenciada se generó una secuencia consenso con ambos sentidos del ADN ya sea con el gen ORF-5 u ORF-7 utilizando de referencia la cepa VR-2332. En este análisis se empleó el software Chromas Pro. Se obtuvo la secuencia de 8 clonas para ORF-5 y la lectura de 31 clonas de ORF-7.

Con la secuencia consenso de cada clona fueron analizados los polimorfismos que existían entre ellas y en comparación con la secuencia de la vacuna. Además, con la evaluación de las mutaciones fueron determinadas las variantes que existían. Este análisis

se realizó mediante el alineamiento de nucleótidos y de aminoácidos, empleando el software Clon Manager Professional Suite, Versión 9,0, MEGA 6.0 (Tamura, 2013) y Fig. Tree.

Las variantes que obtuvimos de ambos genes, fueron incluidas en análisis de relaciones genéticas con otras cepas reportadas en estudios previos en: México, Norte America, Corea, China, Taiwan, Polonia y Canadá. Las secuencias de accesos a Genbank que fueron incorporadas para la relación genética en ORF-7: AY209195 a la AY209228, DQ473573, AF043949, AF043950, AF043954, AF043955, AF043957, AF043958, AF043961, AF043963, AF043965, AF043966, AF043967, AF043968, AF043971, AF043973, AF095480, AF095481, AF095482, AF095483, AF095485, AF095487, AF095491, AY209204, AY209212, AY656995, AY656998, DQ379481, EF441768, EF441786, EF441788, EF441789, EF441811, EF441816, EF441831, EF441843, EF441847, EF441861, EF441862, EU152107, FJ800721, FJ800722, FJ800726, FJ800728, FJ800743, FJ897568, FJ897569, GQ184822, GQ389720, GQ389722, GQ389723, GQ389724, GQ389729, GQ389756, GQ389759, HM027591, JN651707, U64931. Para el ORF-5 se utilizaron las secuencias GQ468670-GQ468774, DQ473570, DQ473572, AAQ02932.1 (NADC-8), EU556160.1 (2000-5424), DQ480117.1 (02-01676), AY656989.1 (17198-6), EF442776.1 (17198-6), AY032626.1 (CH-1^a), AY656991.1 (Ingelvac, ATP), PRIME PAC, EU755263.1 (Neb 1), AY641474.1 (U-US), PA 8 y AY881994.1 (FJ-1)

7 RESULTADOS

7.1 Desarrollo del sistema ELISA UNAM

La evaluación con diferentes diluciones del antígeno recombinante y del control positivo (Figura 12), indicó que las DO obtenidas con diluciones del antígeno 1:40 eran apropiadas para los ensayos de ELISA.

Se realizaron 24 repeticiones de ensayos con dilución del primer anticuerpo 1/10 y 1:100, encontrando menor variación en la dilución 1:100 (Cuadro 2).

En el análisis de especificidad analítica, el suero control positivo se enfrentó al antígeno recombinante de Influenza Aviar y no presentó reactividad cruzada (Figura 13).

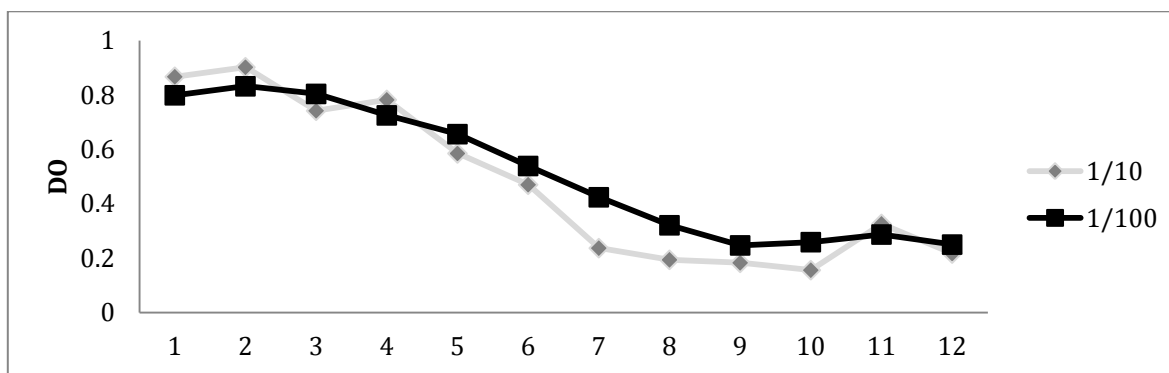


Figura 12. Reactividad del antígeno ORF-7 recombinante. El antígeno recombinante ORF-7 se diluyó de forma doble seriada a partir de 1/10 y el primer anticuerpo a diluciones 1:10, 1:100. El segundo anticuerpo 1:1500 y las placa fueron reveladas con OPD.

Cuadro 2: Promedio y desviación estándar (DS) de la densidad óptica (DO) en 24 ensayos de la reactividad del antígeno recombinante ORF-7 ante un suero control positivo en diluciones 1/10 y 1/100.

	1/10		1/100	
	Promedio DO	DS	Promedio	DS
ELISA UNAM	0.66	0.2	0.62	0.11

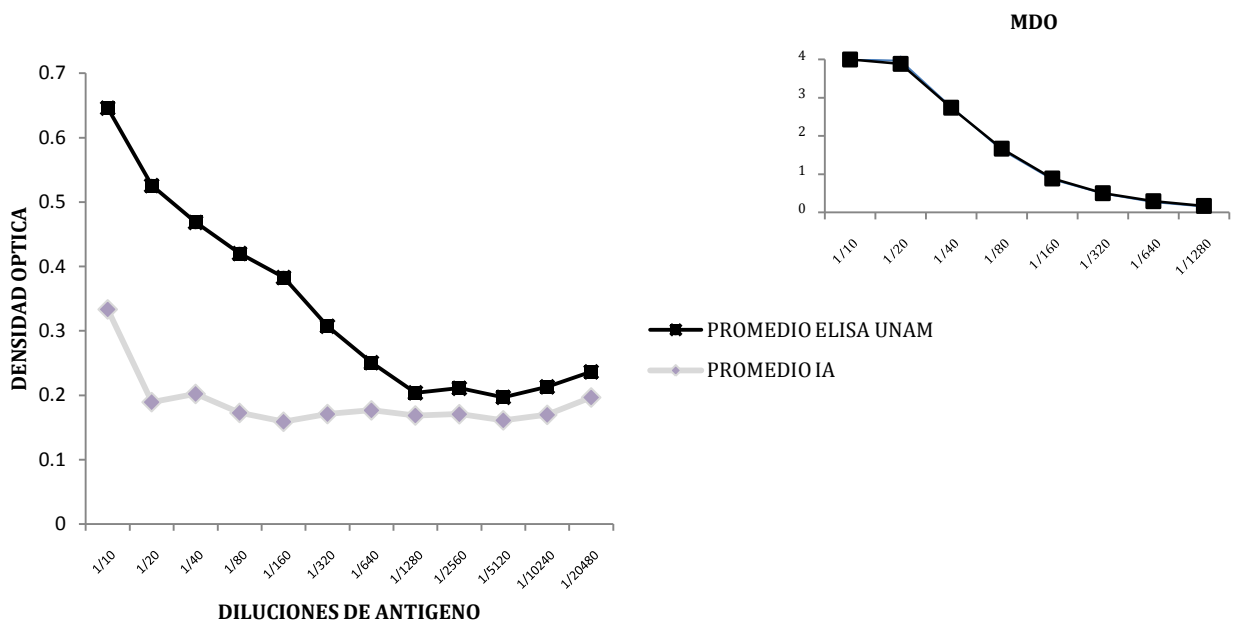


Figura 13. Especificidad suero positivo vs antígeno ORF-7 UNAM y proteína M. Placa sensibilizada con antígenos recombinantes de ELISA UNAM y proteína recombinante M de Influenza Aviar en diluciones dobles seriadas. Dilución 1:100 del control positivo, revelada con OPD.

Los ensayos de repetibilidad se realizaron con las condiciones estandarizadas por cuadruplicado, utilizando un control positivo, uno negativo y 80 muestras de campo. Se determinó la desviación estándar (Figura 14 A) y el coeficiente de variación de las densidades ópticas obtenidas (Figura 14 B). Los coeficientes de variación entre las repeticiones de cada muestra se encontraron por debajo del 30%, y el coeficiente de variación del ensayo fue de 8.31%. Estos resultados están dentro del parámetro de coeficiente de variación menor al 30%, determinado para las pruebas de diagnóstico por la OIE.

A estas muestras se les determinó su nivel de positividad empleando valores SP. En el cuadro 3 se muestra el porcentaje de repetibilidad del ensayo.

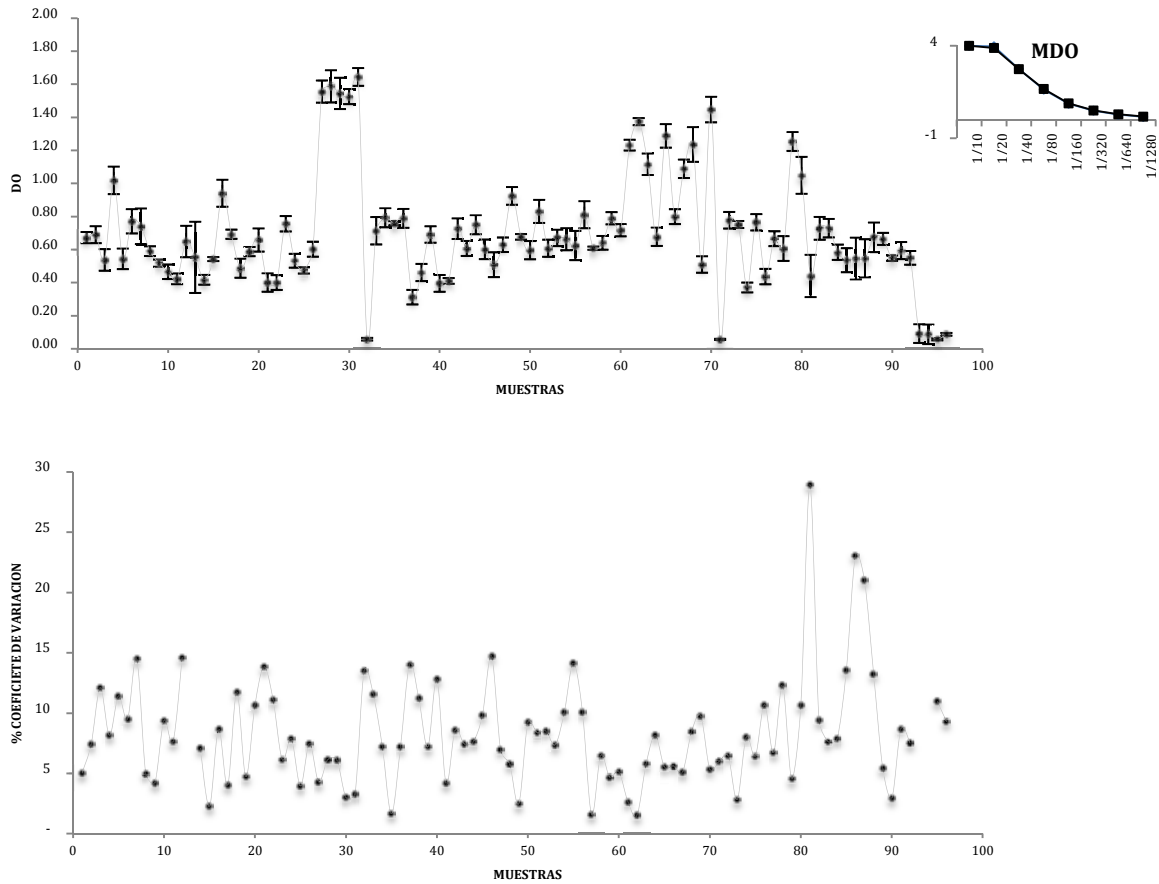


Figura 14. Repetibilidad y coeficiente de variación antígeno ELISA UNAM. A) Promedio de densidades ópticas con desviación estándar utilizando el cuadruplicado de 94 muestras. B) Coeficiente de variación de las densidades ópticas de cada muestra evaluada.

Cuadro 3. Análisis de repetibilidad del ensayo ELISA UNAM

% de Discrepantes	% Repetibilidad
1.1299	98.8701

7.2 Reactividad antigénica a los sistemas ELISA

El empleo de tres ensayos de ELISA reveló en los 622 sueros 8 grupos antigénicos (A-H) definidos por la reactividad positiva (+) o negativa (-) de los sueros hacia los diferentes sistemas ELISA (Cuadro 4). Cada una de las 31 granjas tuvo muestras de al menos uno o más grupos antigénicos.

El Grupo A (+EU, -C₁, -C₂), identificó anticuerpos no detectados por los otros sistemas ELISA, que puede corresponder a una variante antigénica local que se encuentra ampliamente distribuida en la región de estudio ya que reconoció el 38% de las muestras. En el Grupo B (+EU, -C₁, +C₂) se identificó 14% de muestras positivas. El Grupo C (+EU, +C₁, -C₂) identificó 6% de muestras positivas; en el Grupo D (+EU, +C₁, +C₂) se detectó un 27%. El Grupo E (-EU, -C₁, -C₂) identificó 6% de muestras negativas. Siendo un 4% de sueros reactivos en el Grupo F (-EU, -C₁, +C₂). En el Grupo G (-EU, +C₁, -C₂) encontramos al 5% y en el Grupo H (-EU, +C₁, -C₂) solamente 1% de muestras fueron reconocidas. Este último grupo antigénico corresponde a la reactividad detectada por el sistema ELISA comercial más empleado para diagnóstico serológico en el mundo (Cuadro 4).

Encontramos que al ELISA UNAM 84% de los sueros reaccionaron positivos. El sistema HIPRA reconoció 48% de muestras positivas y el sistema IDEXX detectó al 37% de las muestras positivas. Existía un 6% de los sueros que fue negativo en todos los sistemas (Figura 15 A).

Los sueros hiperinmunes de conejo generados vs el antígeno ORF-7 recombinante reaccionaron con título alto por el sistema ELISA UNAM y por el sistema HIPRA, mientras que con IDEXX no hubo reconocimiento antigénico (Figura 15 B), esto nos indica fuertemente que la relación antigénica del ORF-7 recombinante es más cercana con el antígeno empleado en el ELISA HIPRA, mientras que casi no reacciono con el antígeno del sistema IDEXX.

Cuadro 4. Numero de muestras estudiadas en 31 granjas y su grado de reactividad con diferentes sistemas de ELISA.

GRUPO ANTIGENICO	SISTEMAS ELISA			REACTIVIDAD DE LAS GRANJAS																												N	%				
	EU	C1	C2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28			29	30	31	
A	+	-	-	60	22	39	9	3	6	9	15	6	2								15	2	3	10	5	4	3	8	5	3	3	4	4	4	244	39	
B	+	-	+		1	3	6	6	9	6	26		5				3				15	2					2				1	1			86	14	
C	+	+	-											3		10	12		3	6			1								1			1	37	6	
D	+	+	+				3		5	9	4		12	3	3	33	30	18	7	27		4														158	25
E	-	-	-		5			12		8	1										3	2	1				1	2						1	36	6	
F	-	-	+					12							6		3				3															24	4
G	-	+	+						3						23		6																			32	5
H	-	+	-													1	3						1													5	1
N				60	27	42	18	33	23	32	46	6	19	6	32	44	48	27	10	33	36	10	6	10	5	5	5	10	5	3	5	5	5	5	622	100	

En el cuadro 4 se indica el numero de muestran en cada granja que fueron estudiadas en su reactividad a 3 sistemas de ELISA. Aquí mismo se definen grupos antigénicos (columnas izquierdas) en base a la reactividad antigénica positiva o negativa obtenida para cada sistema ELISA o la combinación de estas. En cada columna (1-31) se señalan los sueros positivos para cada grupo antigénico (A-H). El total de muestras por granja se indica en la fila inferior.

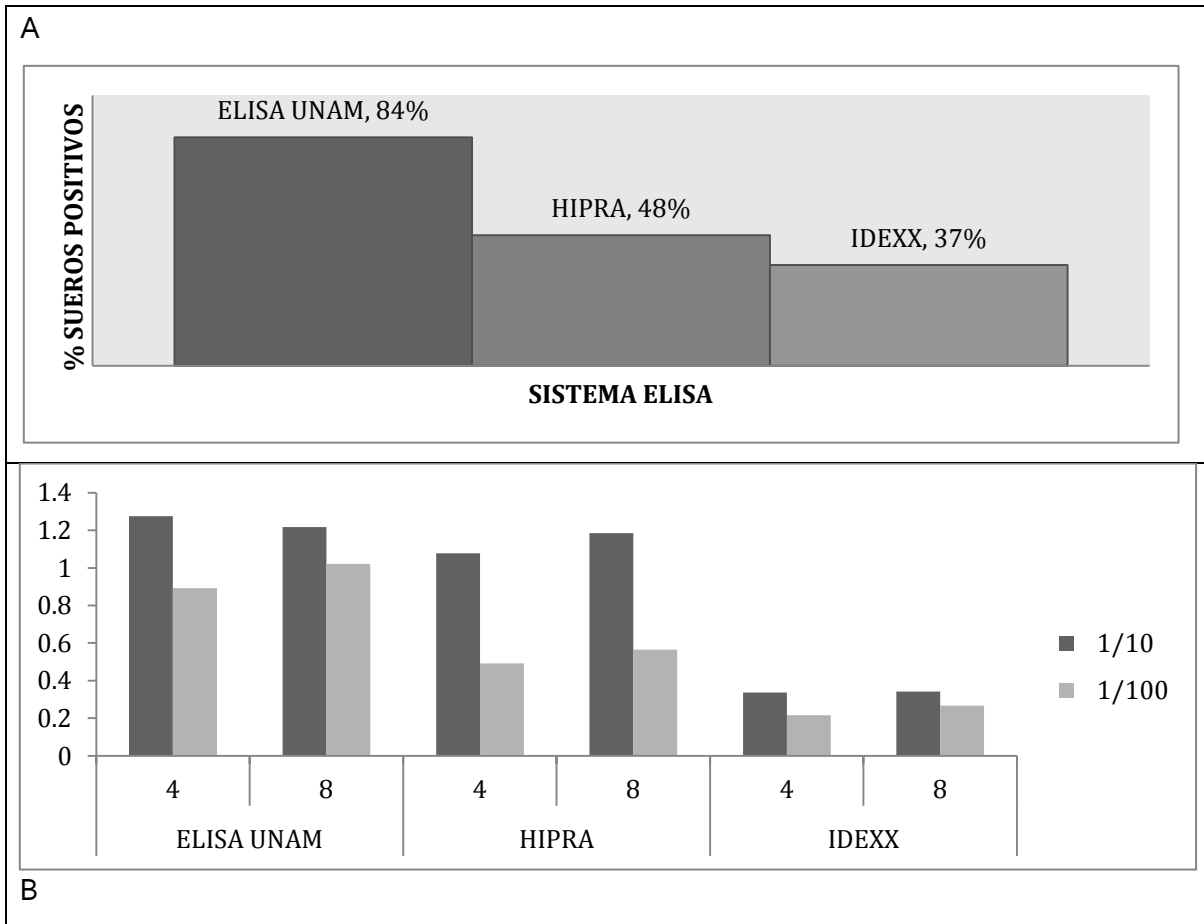


Figura 15. Diagnóstico de PRRSV por 3 sistemas ELISA. A) Proporción de las muestras totales que fueron detectadas como positivas por cada sistema. Con ELISA UNAM fueron reconocidos 84% de los sueros. En el sistema de HIPRA (C₂) reconoció al 48%. Mientras que IDEXX (C₁), encontró 37% de las muestras positivas. El 6% de los sueros fue negativo en todos los sistemas. B) Reactividad de dos sueros hiperinmunes de conejo vs la clona del ORF-7 UNAM en los diferentes sistemas ELISA. Se evaluaron diluciones de los sueros 1/10 y 1/100.

7.1 Amplificación de ORF-5 y ORF-7 por RT-PCR Anidada.

Las condiciones óptimas de amplificación de los fragmentos ORF-5 y ORF-7, se estandarizaron por gradiente de temperaturas, utilizando el ARN de la vacuna Ingelvac PRRS MLV (Figura 16). Fueron analizadas RT-PCR 326 muestras de sueros de campo. Para el fragmento ORF-5 se logró amplificar 7 muestras (Figura 16 D). Las mismas

muestras fueron amplificadas con los primers de ORF-7, resultando positivas 77 muestras (Figura 16). Varias muestras negativas a los sistemas de ELISA comerciales amplificaron el ORF7 del virus del PRRS. (ver cuadro 6)

Los fragmentos amplificados para cada gen fueron purificados por yoduro de sodio y el ADN obtenido se clonó. Se lograron clonar las 7 muestras positivas de ORF-5, posteriormente fueron secuenciadas 8 clonas (ver cuadro 5). Para ORF-7 fueron clonadas 10 muestras individuales y otras 9 en pool de 2. Se secuenciaron al menos 2 clonas por muestra, obtuvimos finalmente 31 clonas secuenciadas.

7.1 Análisis genético de ORF-5.

Las secuencias de nucleótidos que obtuvimos para ORF-5, presentaron similitud del 98 al 100% con la vacuna a nivel de nucleótidos y aminoácidos. Se identificaron 5 variantes genéticas. Identificamos 3 clonas de diferentes muestras resultaron idénticas a la vacuna, y 5 clonas fueron variantes vacunales. El análisis de las secuencias identificó 6 sitios polimórficos, donde 4 sustituciones fueron cambios no sinónimos (Cuadro 7).

Se comparó por medio de una alineamiento la diversidad genética que existe en ORF-5 con nuestras 6 variantes, otras secuencias mexicanas y secuencias pandémicas (Figura 17). Además, se construyó un árbol filogenético donde se pudieron diferenciar 3 linajes que contenían variantes vacunales, secuencias locales mexicanas y secuencias pandémicas (Figura 18).

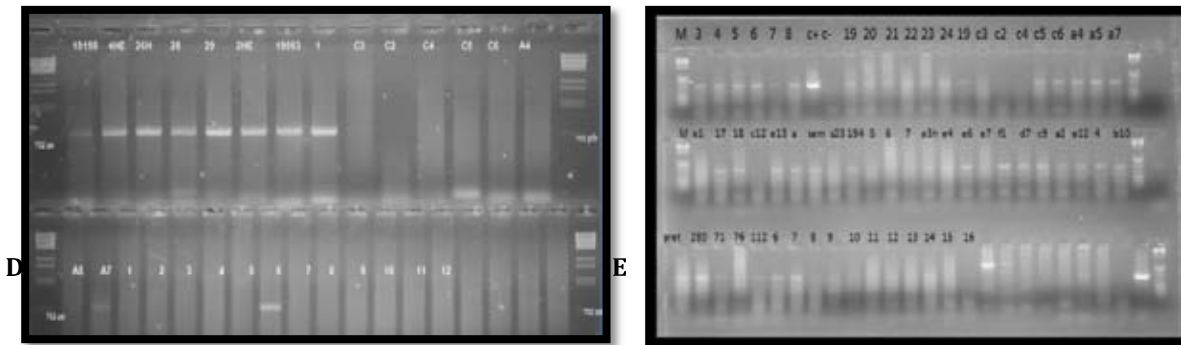
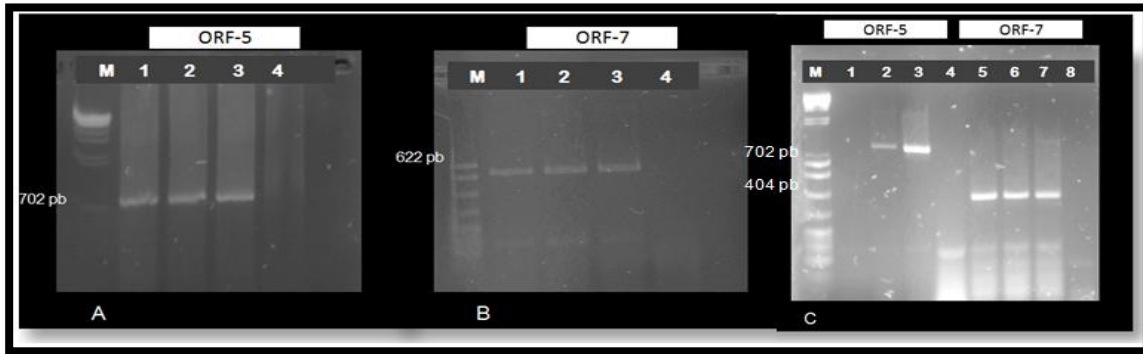


Figura 16. RT-PCR anidada de ORF-5 y ORF-7. (A) Amplificación del fragmento ORF-5 con los primers externos, a temperatura de 52, 56, 60, 68°C. (B) Amplificación del fragmento ORF-7 con los primers externos, a temperatura de 50, 52, 60, 64°C. (C) Amplificaciones con PCR anidada de los fragmentos ORF-5 (der.) y ORF-7 (izq.) a temperatura de 52, 56 y 58°C. (D) Amplificación del gen ORF-5 en muestras de campo. (E) Amplificaciones del gen ORF-7 en muestras de campo.

Cuadro 5. Identificación de clonas de ORF-5 obtenidas a partir de muestras de suero.

Nombre Muestra	Clonas obtenidas	Grupo antigénico	Identidad con vacuna	Variante genética
1-5	1.3-5, 1.10-5, 1.11-5, 1.12-5	B		
2-5	2.2-5 , 2.5-5, 2.6-5, 2.7-5	B	99%	2
3-5	3.1-5	F		
4-5	4.4-5 , 4.2-5	A	99%	3
5-5	5.2-5 , 5.4-5, 5.6-5, 5.9-5	D	100%	1
6-5	6.1-5, 6.2-5 , 6.5-5, 6.6-5	D	100%	1
7-5	7.1-5 , 7.2-5, 7.4-5	D	99%	4
9-5	9.1-5 , 9.2-5 , 9.6-5, 9.8-5	B	100%, 99%	1,5
10-5	10.12-5, 10.16-5, 10.18-5	A	100%	6

En negritas se indica las clonas que fueron secuenciadas.

Cuadro 6. Identificación de clonas de ORF-7 obtenidas a partir de muestras de suero.

Tipo muestra	Nombre	Grupo antigénico	Clonas	Identidad con vacuna	Variantes
Individual	2-7	B	2.2-7	100%	1
Individual	4-7	A	4.10-7	99%	2
Individual	5-7	A	5.1-7	100%	1
Individual	6-7	B	6.1-7	100%	1
Individual	7-7	A	7.1-7 , 7.2-7, 7.3-7	100%	1, 1
Pool de 2	8-7	D	8.1-7, 8.2-7 , 8.5-7, 8.6-7, 8.7-7	100%	1
Pool de 2	10-7	A	10.9-7 , 10.10-7, 10.13-7 , 10.12-7, 10.14-7	99%	3, 10
Pool de 2	11-7	E	11.17-7 , 11.19-7, 11.21-7, 11.24-7 , 11.20-7	99%	4, 1
Pool de 2	12-7	E	12.25-7 , 12.26-7 , 12.28-7, 12.30-7, 12.31-7	99%, 100%	5, 1
Pool de 2	13-7	A	13.33-7 , 13.35-7, 13.36-	99%	6

			7,13.38-7,13.40-7		
Pool de 2	14-7	B	14.41-7,14.42-7,14.43,14.44-7,14.45-7	99%, 99%	7, 6
Pool de 2	15-7	A	15.50-7,15.51-7,15.52-7,15.54-7,15.55-7	100%	11, 1
Pool de 2	16-7	C	16.57-7,16.58-7,16.59-7,16.60-7,16.61-7	100%	12, 1
INDIVIDUAL	17-7	A	17.66-7,17.68-7, 17.69-7,17.70-7,17.71-7	99%100%	8, 1
INDIVIDUAL	18-7	E	18.75-7,18.76-7,18.77-7,18.78-7,18.79-7	99%	1, 9
INDIVIDUAL	19-7	A	19.6-7, 19.7-7,19.8-7,19.9-7,19.10-7	100%	1
Pool de 2	20-7	A	20.11-7,20.12-7,20.13-7,20.14-7,20.15-7,	99%,100%	13, 1
INDIVIDUAL	21-7		20.1-7,20.2-7,20-7.3,20-7.4,20-7.5		1, 14
INDIVIDUAL	22-7		21-7-.7, 21-7.8,21-7.9,21-7.10,21-7.11		15, 16

En negritas se indica las clonas que fueron secuenciadas.

Cuadro 7. Sitios polimórficos con referencia la cepa vacunal MLV del ORF-5					
VARIANTE/GRUPO ANTIGENICO	MUTACIÓN NT	MUTACIÓN AA	AFINIDAD PROTEICA	N	IDENTIDAD CON VACUNA NT/AA
VARIANTE 1 B,D	o	o		3	100%, 100%
VARIANTE 2 B	A ²⁸³ G ²⁸³	T ⁹⁴ A ⁹⁴	BASICO/ALIFATICO	1	99%, 99%
VARIANTE 3 A	C ²⁵² T ²⁵²	o		1	99%, 100%
VARIANTE 4 D	G ⁵¹¹ A ⁵¹¹	G ¹⁷⁰ S ¹⁷⁰	ALIFATICO/HIDROXILO	1	99%, 99%
VARIANTE 5 B	G ⁵¹¹ A ⁵¹¹ T ⁴¹² C ⁵¹¹ T ³⁴⁵ C ³⁴⁵	C ¹³⁷ R ¹³⁷ G ¹⁷⁰ S ¹⁷⁰	HIDROXILO/BASICO ALIFATICO/HIDROXILO	1	99%, 99%
VARIANTE 6 A	T ⁴⁵⁹ C ⁴⁵⁹	o		1	99%, 100%
SITIOS POLIMORFICOS	6	4			

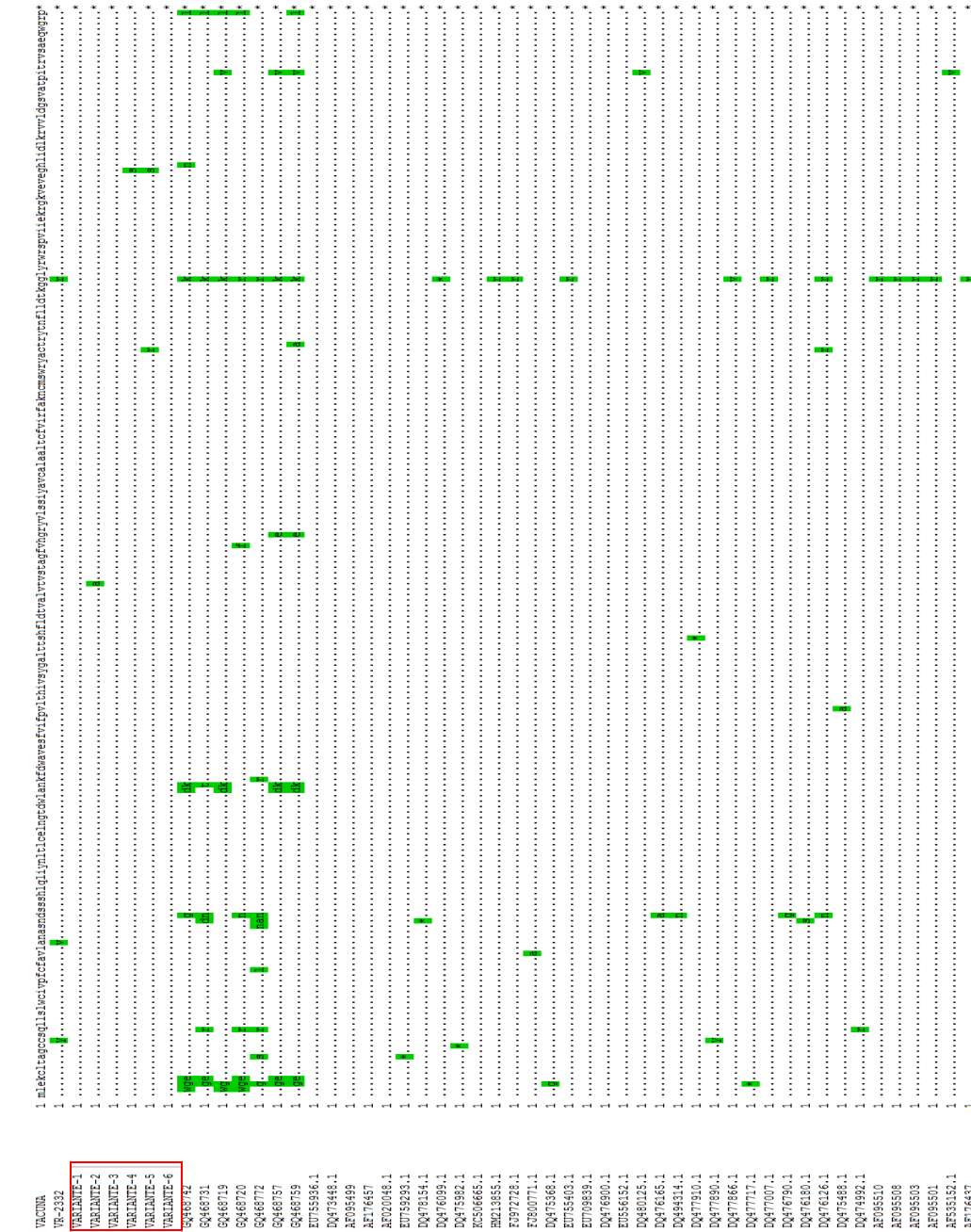


Figura 17. Alineamiento de secuencias ORF-5. Se analizaron las variantes (cuadro rojo), variantes mexicanas y variantes pandémicas con referencia a MLV.

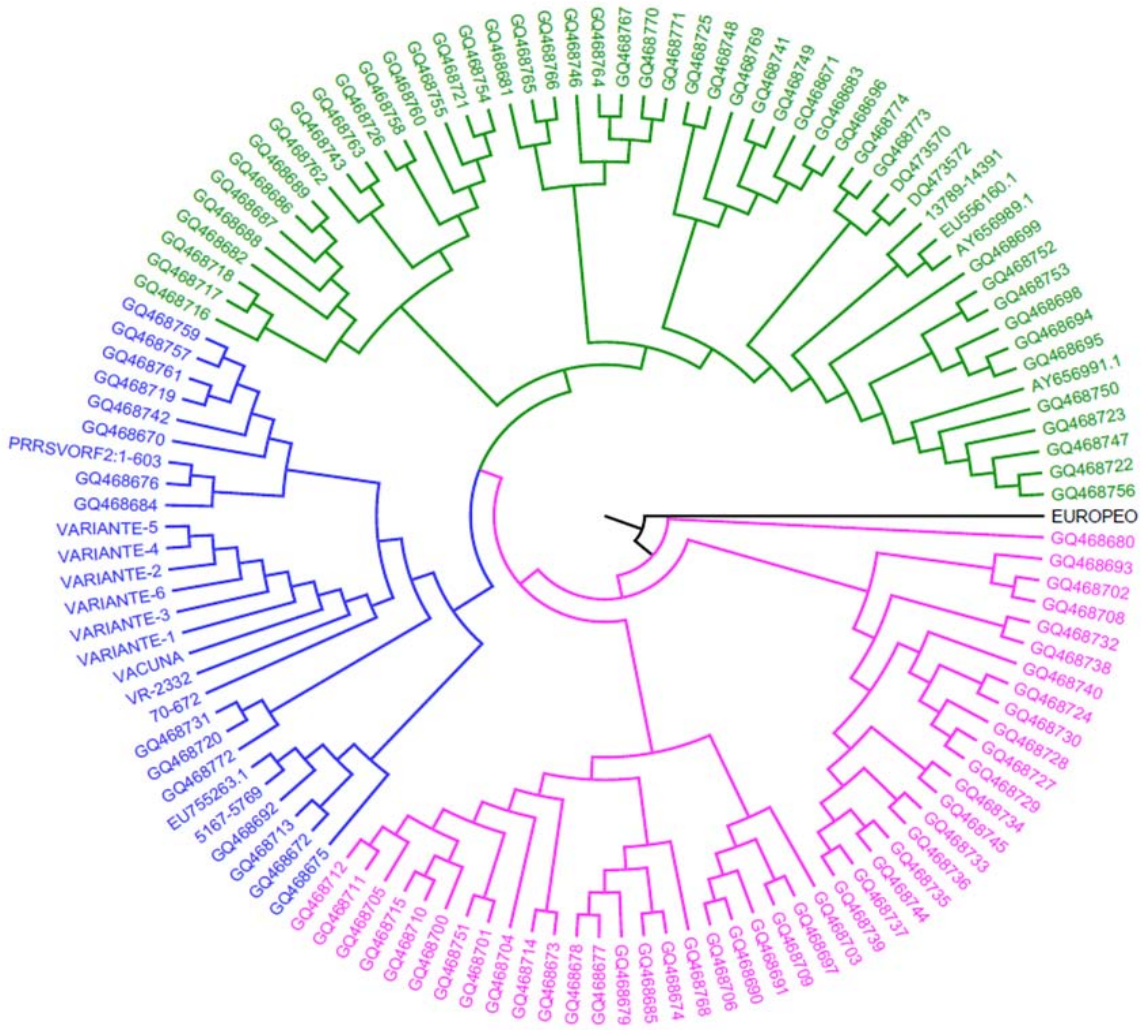


Figura 18. Diversidad genética de ORF-5. Los 3 clados están distinguidos por color, en el clado azul se encuentran las variantes vacunales. En el clado rosa se encuentran las secuencias mexicanas locales y en el clado verde se encuentran las secuencias mexicanas que se relacionan con cepas pandémicas.

7.2 Análisis genético de ORF-7.

Las secuencias de 31 clonas de ORF-7 tuvieron una similitud que variaba de 97% a 100% a nivel de nucleótidos y 98% a 100% a nivel de aminoácidos. En el análisis de los cambios de aminoácidos en relación a la estructura secundaria de la proteína (Figura 19), se pudo observar que las mutaciones se encuentran distribuidos a lo largo de la proteína.

Se identificaron 16 variantes de gen ORF-7. La variante 1, idéntica al virus vacunal, presentó una frecuencia de 15 clonas. Las 15 variantes restantes tuvieron un total de 20 sitios polimórficos (Figura 19), encontramos 15 mutaciones no sinónimas y 5 mutaciones sinónimas (Cuadro 8). Al comparar nuestras variantes con variantes mexicanas previamente descritas es notoria la amplia diversidad genética que circula en nuestro país, sin embargo las variantes que encontramos son vacunales (Figura 20).

En la construcción del árbol filogenético (Figura 21) se incluyeron secuencias reportada en México, encontrando linajes vacunales, linajes con secuencias relacionadas a variantes pandémicas (es decir que se relacionan con secuencias descritas en otras regiones) y secuencias locales mexicanas.

Logramos obtener 3 muestras que fueron secuenciadas en ambos genes ORF-5 y ORF-7. Todas las secuencias de ORF-7 fueron idénticas al virus vacunal, mientras que la secuencia de ORF-5 en todas las muestras fue diferente a la secuencia vacunal por un cambio de nucleótido. Este cambio fue diferente en cada una de las 3 secuencias, siendo 2 no sinónimos y uno sinónimo (Cuadro 7).

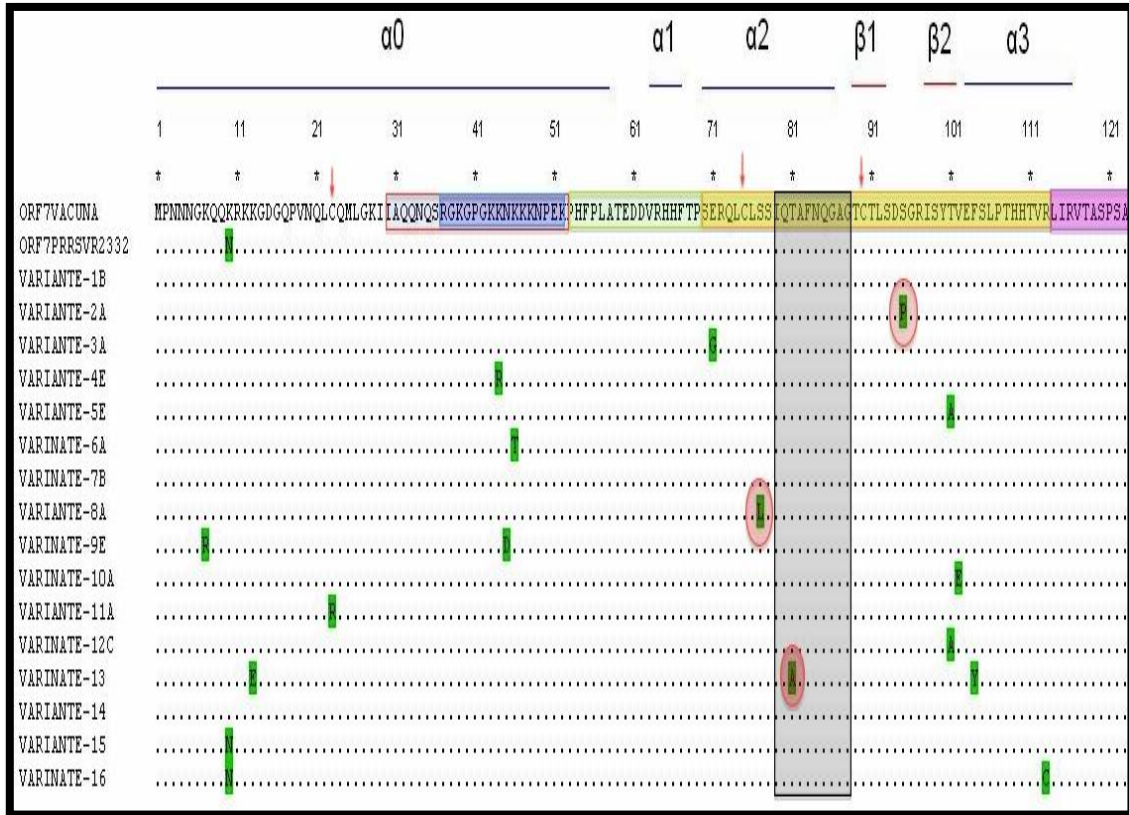


Figura 19. Alineamiento de aminoácidos de nucleocápside. Los elementos de la estructura secundaria se encuentran sobre las secuencias. Se iluminaron los 5 sitios antigénicos que se han descrito por anticuerpos monoclonales y la caja gris está marcando el epítipo IQFTAFNQGA. Las cisteínas de la secuencia están señaladas por flechas rojas. Los cambios en aminoácidos con referencia a la secuencia vacunal se encuentran resaltados en verde. Los aminoácidos en la región central que tuvieron cambio de polaridad se encuentran iluminados en rojo.

Cuadro 8. Sitios polimórficos con referencia la cepa vacunal MLV del ORF-7				
VARIANTE/ GRUPO ANTIGÉNICO	MUTACIÓN NT	MUTACIÓN AA	AFINIDAD	N
VARIANTE 1 A, B, C, D, E	N/a	N/a		15
VARIANTE 2 A	T ²⁸³ C ²⁸³	S ⁹⁴ P ⁹⁴	HIDROXILO/ IMINOACIDO	1
VARIANTE 3 A	A ²¹² G ²¹²	E ⁶⁹ G ⁶⁹	ACIDO/ALIFATICO	1
VARIANTE 4 E	A ¹³¹ G ¹³¹	K ⁴⁴ R ⁴⁴	BASICO/BASICO	1
VARIANTE 5 E	A ³⁰¹ G ³⁰¹	V ¹⁰⁰ A ¹⁰⁰	ALIFATICO/ALIFATICO	1
VARIANTE 6 A, B	A ¹³⁷ C ¹³⁷	K ⁴⁵ T ⁴⁵	BASICO/HIDROXILO	2
VARIANTE 7 B	G ³⁶ A ³⁶			1
VARIANTE 8 A	C ²³⁰ T ²³⁰	S ⁷⁵ L ⁷⁵	HIDROXILO/ALIFATICO	1
VARIANTE 9 E	A ²⁰ G ²⁰ A ¹³³ G ¹³³	K ⁷ R ⁷ N ⁴⁴ D ⁴⁴	BASICO/BASICO ACIDO/ACIDO	1
VARIANTE 10 A	T ³⁰⁵ A ³⁰⁵	V ¹⁰² E ¹⁰²	ALIFATICO/ACIDO	1
VARIANTE 11 A	T ⁶⁷ C ⁶⁷	C ²³ R ²³	AZUFRE/BASICO	1
VARIANTE 12 C	A ³⁰¹ G ³⁰¹ T ³¹² C ³¹²	T ¹⁰¹ A ¹⁰¹	HIDROXILICO/ ALIFATICO	1
VARIANTE 13 A	A ³⁷ G ³⁷ A ²⁴¹ G ²⁴¹ T ³¹¹ A ³¹¹	K ¹³ E ¹³	BASICO/ACIDO	1
VARIANTE 14	C ⁷⁶ A ⁷⁶			1
VARIANTE 15	G ³⁰ T ³⁰ C ³⁴⁵ T ³⁴⁵	K ¹⁰ N ¹⁰	BASICO/ACIDO	1
VARIANTE 16	G ³⁰ T ³⁰ C ³⁴⁵ T ³⁴⁵ C ³³⁷ T ³³⁷	K ¹⁰ N ¹⁰ R ¹¹⁵ C ¹¹⁵	BASICO/ACIDO BASICO/AZUFRE	1
N	20	15		31

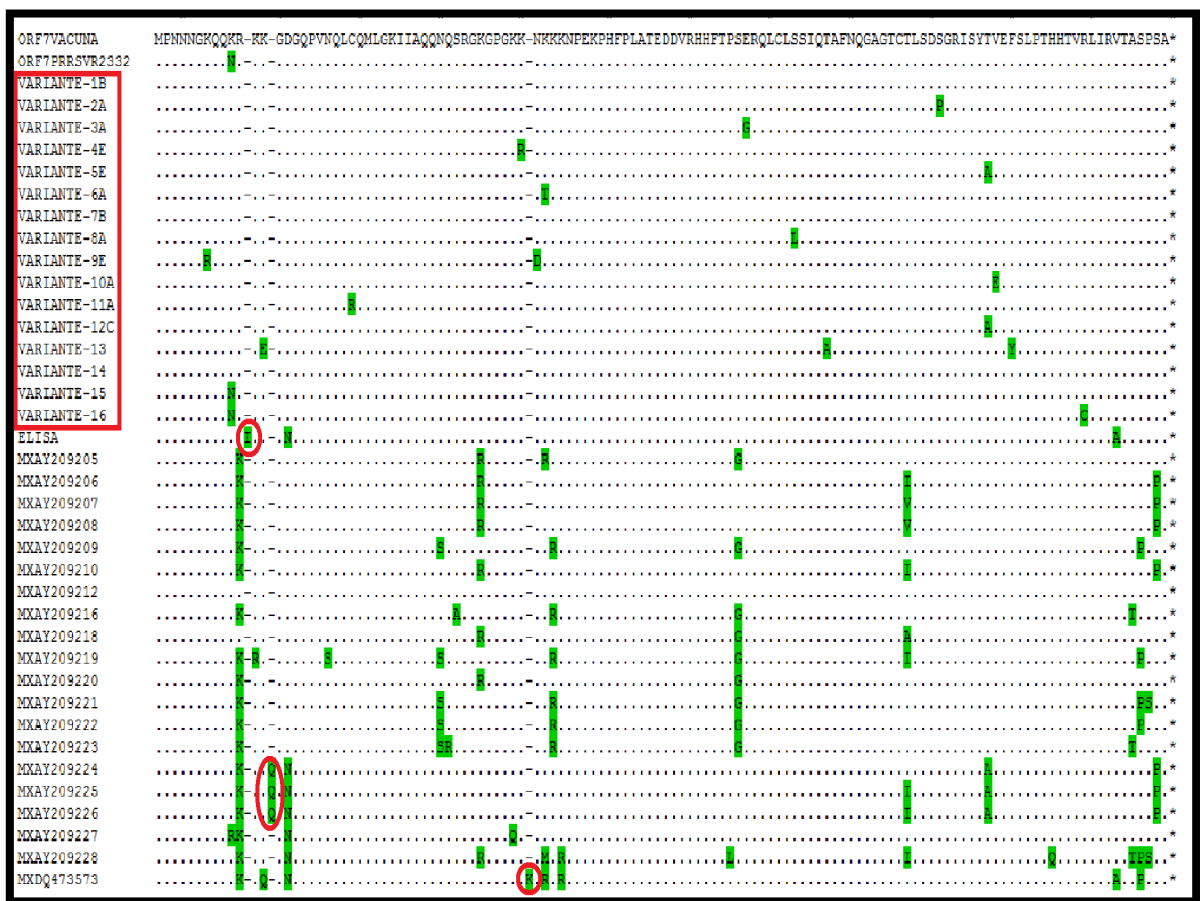


Figura 20. Alineamiento de aminoácidos de nucleocápside en las variantes y cepas mexicanas. Los cambios en aminoácidos con referencia a la secuencia vacunal se encuentran resaltados en verde.

Cuadro 9. Variación de ORF-5 y ORF-7 en la misma muestra

GRUPO ANTIGÉNICO	ORF-5	ORF-7
A	VARIANTE 3 (1 cambio no sinónimo)	VARIANTE 1 (VACUNAL)
D	VARIANTE 4 (1 cambio no sinónimo)	VARIANTE 1 (VACUNAL)
A	VARIANTE 6 (1 cambio sinónimo)	VARIANTE 1 (VACUNAL)

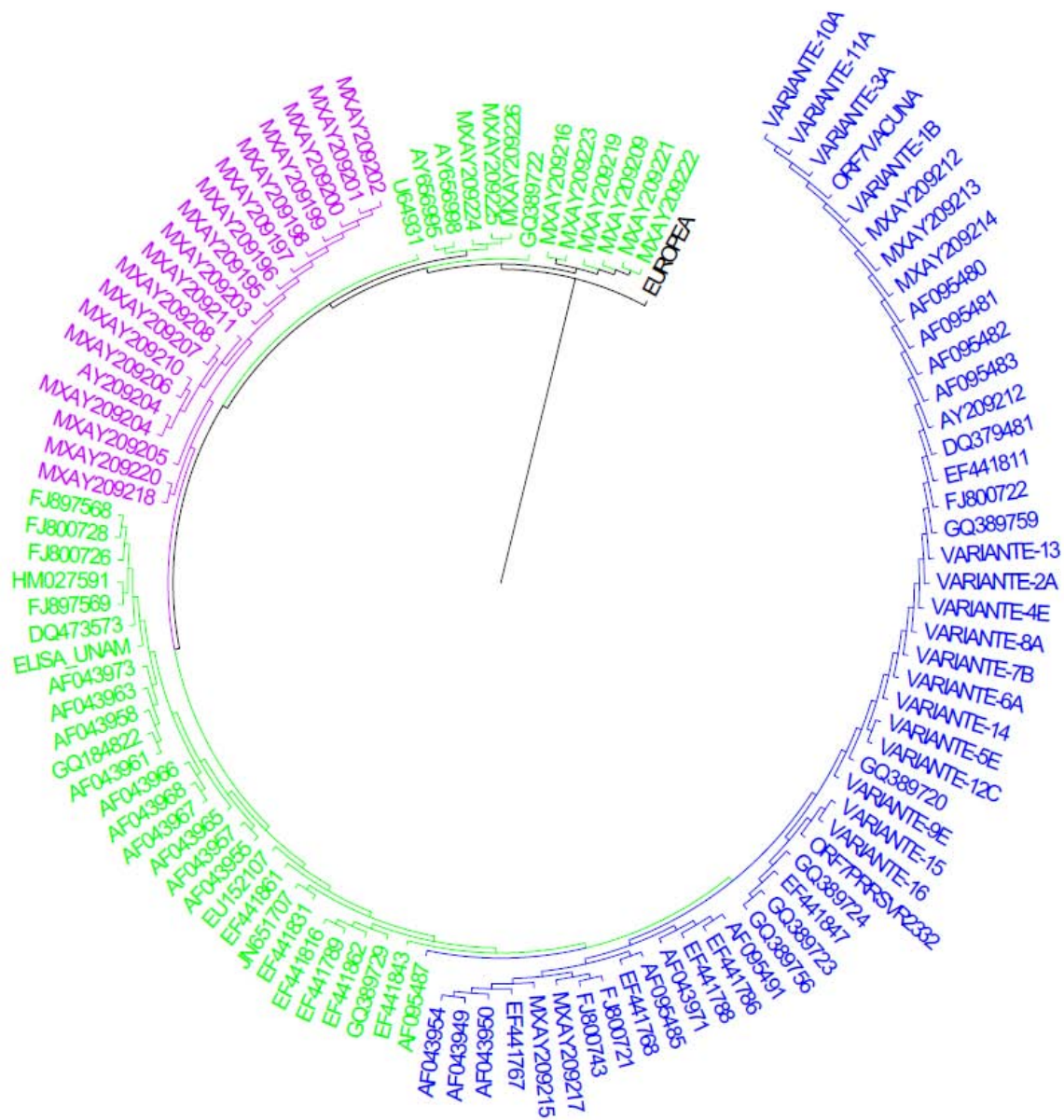


Figura 21. Diversidad genética de ORF-7. Las variantes vacunales se encuentran resaltadas en color azul, las variantes mexicanas locales en color rosa y las variantes pandémicas en color verde.

8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Dependiendo de la inmunoreactividad de muestras de sueros porcinos a tres diferentes sistemas ELISA, en este estudio fueron identificados sueros con reactividad que se clasificaron en diferentes grupos antigénicos.

Este hallazgo es difícil de explicar; una posible explicación es que los virus circulantes presentan variación antigénica y que algunas variantes son solo detectadas por un sistema de ELISA, pero otras variantes antigénicas pueden ser detectadas por uno o varios sistemas.

Para poder explicar esta observación, hace falta estudios más sistemáticos en los cuales a partir de estudios genéticos amplios de las cepas circulantes se aislen cepas representativas de cada variante genética y se obtengan antisueros, los cuales podrán emplearse en estudiar objetivamente el grado de variación antigénica entre las diferentes cepas. Para esto se requerirían ensayos de seroneutralización cruzados y ensayos de inmunización - protección- desafío. Estos estudios podrán definir si existen diferentes serogrupos y ayudarían a definir un sistema antigénico de diagnóstico serológico más eficiente y útil para el monitoreo y control de los brotes del virus del PRRS.

Se observaron muestras en una misma granja que pertenecieron a diferentes grupos antigénicos, esto podría interpretarse como el resultado de infección con distintas cepas a un mismo cerdo (Batista, *et. al.* 2004), esto ha sido igualmente reportado por Wooton en 1998, quién sugiere la existencia de múltiples cepas virales en las poblaciones porcinas.

Encontramos que el 25% de las muestras fueron reconocidas con todos los sistemas ELISA sugiriendo que compartían reactividad antigénica entre ellas. Cabe resaltar que el 39% de las muestras fue negativo hacia los dos sistemas ELISA comerciales, no siendo así para nuestro antígeno recombinante.

La secuenciación de nucleótidos de este antígeno recombinante ORF7, el cual proviene de una muestra local, nos reveló que es una variante de la cepa vacunal con solo 3 cambios de aminoácidos, incluyendo la inserción de un aminoácido. No sabemos si estos cambios afectan de alguna forma su antigenicidad, y si esto mejora de alguna forma la identificación de anticuerpos contra cepas locales presentes en las muestras *estudiadas*.

Algo relevante fue el hallazgo en muestras del grupo antigénico A (negativas para los ELISAs comerciales, positivas al sistema UNAM) de secuencias virales por RT-PCR anidada, lo que confirma la detección de la presencia de individuos infectados por parte de nuestro sistema ELISA-UNAM.

Un experimento que revela diferencias antigénicas entre los sistemas comerciales y el ORF7 recombinante UNAM, es la reactividad del suero de conejos inmunes vs el ORF7 recombinante en los sistemas de ELISA de IDEXX e HIPRA, en donde se encontró baja reactividad con el sistema IDEXX, siendo este último el más utilizado comercialmente. Esta puede ser la razón de que este sistema no detectó como positivas a muestras detectadas por otros sistemas.

En general, la diversidad de virus de PRRS viral es sumamente extensa (ICTV 9th2013) debiéndose en gran parte a las altas tasas de mutación que presentan los virus ARN (10^{-3} a 10^{-5} errores por nucleótido) (Drake 1993; Drake y Holland 1999; Holland y col. 1982; Domingo y col. 2001^a). En particular en el ORF-5 se ha evaluado una tasa de mutación de hasta 9.6×10^{-3} sustitución/sitio/año (Shi *et. al.*; 2010).

Prácticamente la mitad de las secuencias obtenidas por nosotros, tanto de ORF-5 como de ORF-7, fueron idénticas a la vacunal, lo que concuerda con estudios anteriores, donde se han identificado más de 1000 secuencias relacionadas a la cepa vacunal, sugiriendo que podrían ser reaislamientos de la misma vacuna, descendientes de virus vacunal, o virus silvestres altamente relacionados (Shi *et. al.*; 2010).

En México Batista en 2004, en estudios del ORF7 ya había reportado secuencias idénticas al virus vacunal y variantes de este, en cepas de campo. Igualmente, se detectaron variantes con inserciones.

Un buen número de los cambios nucleotídicos detectados, tanto para ORF-5 como ORF-7, fueron cambios no sinónimos. Esto puede indicar que estas variantes están siendo seleccionadas positivamente de alguna forma.

Storgard *et. al* en 1999, encontró en su análisis, reversión de la vacuna en sus muestras de campo. Concordando en su estudio, que en algunas muestras secuenciadas para ambos genes, ORF-5 presentaba mutaciones en comparación con la cepa vacunal, mientras que ORF-7 se mantenía conservado.

Algo notable de este estudio es el hecho de que se registró la presencia de secuencias vacunales circulando del virus de PRRS. Sin embargo no sabemos si los cerdos a partir de los cuales se detectó el virus, fueron cerdos vacunados. Debido a que estos cerdos provenían de explotaciones de traspatio, lo más probable es que no lo hayan sido, debido a que en estas explotaciones no se acostumbra esta práctica. Un número considerable de secuencias del virus de PRRS encontradas por nosotros correspondieron a variantes vacunales en las cuales hay de uno a tres cambios de nucleótidos. Esto nos puede indicar que estas variantes tienen ya un tiempo circulando en las poblaciones porcinas dando oportunidad de que se presenten estos cambios.

No podemos aseverar que las muestras con secuencias vacunales y variantes vacunales encontradas sean revertantes vacunales, ya que carecemos de información clínica complementaria. La problemática con las vacunas comerciales ha sido ampliamente descrita en otros países y se han asociado a múltiples problemas como propagación viral (Cano *et. al.* 2007; Cano *et. al.* 2007; Charerntantanakul *et. al.* 2006; Mengeling *et. al.* 2003), infección persistente (Mengeling *et. al.* 1999), protección incompleta (Nielsen *et. al.* 1997) y reversión a virulencia con presencia de signos clínicos (Botner *et. al.*, 1997; Torrison *et. al.* 1992; Storgard *et. al.*, 1999; Nielsen *et. al.* 2001).

En México han sido aisladas cepas endémicas que contienen diferentes aminoácidos insertado en ORF-7 (Batista, et. al; 2004, Cruz, C; 2006), por lo que pudieran no estar siendo reconocidas por los sistemas ELISA comerciales y si por el sistema ELISA-UNAM, desarrollado en nuestro laboratorio, a partir de una cepa local que contiene una inserción en la posición 12 de dicho gen. Los resultados obtenidos en nuestro estudio, demuestran una extensa diversidad antigénica del virus de PRRS en México, detectándose variantes antigénicas representativas en ocho grupos inmunoreactivos, lo que nos sugiere la necesidad de contar con herramientas de diagnóstico e inmunización compatibles a la diversidad antigénica viral presente.

8. REFERENCIAS

Albina E *Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. Vet Microbiol. 1997; 55: 309–316.*

An TQ, Zhou, J, Qiu HJ, Tong GZ, Wang YF, Liu JX, Yang JY. *Identification of a Novel B Cell Epitope on the Nucleocapsid Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Phage Display. Virus Genes, 2005; 31:1, 81–87, 2*

Basto, G.; Williams, J. J.; Alzina, A y Pech, V. *Determinación del costo de desecho de marranas de auto reemplazo seropositivas a PRRS en una granja del estado de Yucatán. Téc Pecu Méx 2004, 42(2):295-301*

Batista L, Pijoan C, Dee S, Olin M, Molitor T, Joo SH, Xiao Z, Murtaugh MP. *Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2004, 68: 267-273.*

Batista L, Pijoan C, Lwamba H, et al. *Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. J Swine Health Prod. 2004;12(4):170–175.*

Bøtner A, Strandbygaard B, Sørensen KJ, Have P, Madsen KG, Madsen ES, Alexandersen S. *Appearance of ature PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. Vet Rec 1997; 141: 497–499*

Boyle J.S. and Lew A.M. 1995. *An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends in genetics. 11(1):8*

Burgara-Estrella A., Montalvo-Corral M., Bolaños A., Ramírez-Mendoza H., Valenzuela O. and Hernández J. *Naturally Co-Infected Boars with both Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus Type 2. Transboundary and Emerging Diseases. 2012; 59(6):532-8*

Cruz-Cruz, C., Torres-Huerta, A.L., Bautista, A., Hernandez, M. and Tapia-Ramirez, J. *Isolation and characterization of Mexican strains of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus Submitted Genetics and Molecular Biology, Cinvestav. 2006*

Calvert, J.G, Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R; Mannan, R.M.; Ankenbauer, R.G.; Welch, S.K. *CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. J. Virol 2007; 81 (14), 7371-7379.*

Cano, J. P., S. A. Dee, M. P. Murtaugh, C. A. Trincado, and C. B. Pijoan. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 2007. 68:565–571.

Cano, J. P., S. A. Dee, M. P. Murtaugh, and C. Pijoan. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine* 2007a. 25:4382–4391.

Charerntantanakul, W., R. Platt, W. Johnson, M. Roof, E. Vaughn, and J. A. Roth. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; 109:99–115.

Cavanagh, D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol* 1997; 142: 629–633.

Collins, J. E., D. A. Benfield, W. T. Christianson, L. Harris, J. C. Hennings, D. P. Shaw, S. M. Goyal, S. McCullough, R. B. Morrison, H. S. Joo, et al. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 117–126.

Conzelmann, K.K., Visser, N., Van Woensel, P., Thiel, H.J. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 1993; 193: 329–339.

Dan Liu, Rong Zhou, Jialong Zhang, Lei Zhou, Qiuyue Jiang, Xin Guo, Xinna Ge, Hanchun Yang. Recombination analyses between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vivo. *Virus Research* 2011; 155: 473–486

Danny N.P. Doan and Terje Dokland Structure of the Nucleocapsid Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Structure, *Structure.* 2003 Nov;11(11):1445-51.

Hao X, Lu Z, Kuang W, Sun P, Fu Y, Wu L, Zhao Q, Bao H, Fu Y, Cao Y, Li P, Bai X, Li D, Liu Z. Polymorphic genetic characterization of the ORF7 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in China. Hao et al. *Virology Journal* 2011, 8:73

Herrera AM. Impacto económico de la enfermedad de PRRS en granjas porcinas. *Simposio internacional de PRRS. Ciudad de México.* 2012

Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neuman EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, Wang C, Yeske P, Mowrer CL, Haley CA. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production* 2013; 21 (2): 72-84

ICTV9TH EC 45, Edinburgh, July 2013; Email ratification 2014 (MSL #28)

Kapil Vashisht¹, Tony L. Goldberg, Robert J. Husmann, William Schnitzlein, Federico A. Zuckermann Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2008; 26: 4747–4753

Macías, M. J., 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. *Veterinaria México* 2006; 37(2) 197-208.

Magar R, Larochelle R, Dea S, Gagnon CA, Nelson EA, Christopher-Hennings J, y Benfield DA. Antigenic comparison of Canadian and US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocápside protein *Can J Vet Res* 1995; 59: 232-234

Mateu E, Diaz I, Darwich L, Casal J, Martin M, et al. Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res* 2006; 115: 198–206.

Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, Morozov I. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 12):3181–8.

Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol.* 2000; 74(4):309–29.

Mengeling, W. L., A. C. Vorwald, K. M. Lager, D. F. Clouser, and R. D. Wesley. 1999. Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 60:334–340.

Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., and Koehler. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Microbiol.* 2003; 93, 25–38.

Meulenberg, J.J., Petersen-den Besten, A., De Kluiverer, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., and Wenswoort, G. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 1995; 206: 155–163.

Meulenberg, J.J., Bende, R.J., Pol, J.M., Wenswoort, G., and Moormann, R.J. Nucleocapsid protein N of Lelystad virus: expression by recombinant baculovirus, immunological

properties, and suitability for detection of serum antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995a. 2, 652–656.

Murtaugh, M.P., Xiao, Z., Zuckermann, F. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 2002; 15, 533–547.

Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 1999; 73:270–80.

Nelson, E. A., J. K. Nelson, J. Christopher-Hennings, K.-J. Yoon, R. Magar, and D. A. Benfield. 1996. Reactivity of North American PRRSV isolates with a monoclonal antibody panel, p. 88. In *Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy*

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.

Nielsen, T. L., J. Nielsen, P. Have, P. Baekbo, R. Hoff-Jorgensen, and A. Botner. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 1997. 54:101–112.

Nielsen, H. S., M. B. Oleksiewicz, R. Forsberg, T. Stadejek, A. Botner, and T. Storgaard. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J. Gen. Virol.* 2001; 82:1263–1272.

Opriessnig, T., P. G. Halbur, K. J. Yoon, R. M. Pogranichniy, K. M. Harmon, R. Evans, K. F. Key, F. J. Pallares, P. Thomas, and X. J. Meng. 2002. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *J. Virol.* 76:11837–11844.

Okuda, Y., M. Kuroda, M. Ono, S. Chikata, and I. Shibata. 2008. Efficacy of vaccination with porcine reproductive and respiratory syndrome virus following challenges with field isolates in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 70:1017–1025

Perera, R., Owen, K.E., Tellinghuisen, T.L., Gorbalenya, A.E., Kuhn, R.J.,. Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alpha-helix important for core assembly. *J. Virol.* 2001; 75, 1–10.

Rodriguez MJ, Sarraseca J, Garcia J, Sanz A, Plana-Durán J y Casal JI. Epitope mapping of the nucleocapsid protein of European and North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*. 1997; 78: 2269–2278.

Sarah K. Wootton, Eric A. Nelson and Dongwan Yoo. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5 (6):773

Scotti, M., C. Prieto, E. Alvarez, I. Simarro, and J. M. Castro. 2007. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet. Rec.* 161:809–813.

Seuberlich T, Tratschin JD, Thur B, Hofmann MA: Nucleocapsid protein- based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002, 9(6):1183-1191.

Shi M, Lam T Y, Hon CC, Murtaugh MP, Davies PR, Hui R, Li J, Wong LT, Chi-Wai Yip, Jiang W, and Leung FC. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of north american type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of Virology* 2010; 84 (17): 8700–8711

Sierra, N., Ramírez, R. y Mota, D. Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Arch. med. vet.*, 2000. Valdivia v. 32, n. 1.

Spilman, M.S., Welbon, C., Nelson, E., Dokland, T. Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *J. Gen. Virol.* 2009. 90, 527–535.

Stadejek T., Stankevicius A, Storgaard T, Oleksiewicz MB, Belak S, Drew TW y Pejsak Z. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses *Journal of General Virology* 2002; 83: 1861–1873.

Storgaard, T., Oleksiewicz, M., Botner, A., Examination of the selective pressures on a live PRRS vaccine virus. *Arch. Virol.* 1999; 144, 2389–2401.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, and Kumar S MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013 30: 2725-2729.

Terje Dokland. The structural biology of PRRSV. *Virus Research*. 2010; 154: 86–97

Torrison, J. L., M. Knoll, and B. Wiseman. Evidence of pig-to-pig transmission of a modified live vaccine. In *Proceedings of the 27th Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners*, Nashville, TN. American Society of Swine Veterinarians, Perry, IA. 1996. p. 89–91.

Wensvoort, G., C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q* 1991; 13: 121–130.

Wensvoort, G., E. P. de Kluyver, E. A. Luitze, A. den Besten, L. Harris, J. E. Collins, W. T. Christianson, and D. Chladek. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest* 1992. 4: 134–138.

Witte SB, Chard-Bergstrom C, Loughin TA, Kapil S: Development of a recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, 7(4):700-702.

Wootton, S., Yoo, D., 2003. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J. Virol.* 77, 4546–4557.

Wootton SK, Nelson EA, Yoo D. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998 Nov;5(6):773-9.

World organization for animal health (OIE) (2002). *OIE Standard for Management and Technical Requirements for Laboratories Conducting Tests for Infectious Diseases*. In: *OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases*. OIE, Paris, France, 1–31.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.o1.o5_VALIDATION.pdf

Yoo, D., Wootton, S., Li, G., Song, S., Rowland, R.R., Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J. Virol.* 2003; 77, 12173–12183.

Yoon KJ, Wu LL, Zimmerman JJ, Platt KB. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet Microbiol.* 1997; 55(1–4): 277–87.

Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Wills, R.W., Swenson, S.L. *General overview of PRRSV: a perspective from the United States. Vet. Microbiol.* 1997; 55: 187–196.

Tian K, Yu X, Zhao T, Feng Y, Cao Z, Wang C, Hu Y, Chen X, Hu D, Tian X, Liu D, Zhang S, Deng X, Ding Y, Yang L, Zhang Y, Xiao H, Qiao M, Wang B, Hou L, Wang X, Yang X, Kang L,. *Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark. PLoS One.* 2007 Jun 13;2(6):e526.