



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud
Animal**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Enfermedades Virales de los Cerdos**

**“IDENTIFICACIÓN DE VARIACIONES GENÉTICAS DE AISLADOS DEL ARTERIVIRUS
PORCINO (PRRS) Y SU RELACIÓN ANTIGÉNICA”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y LA PRODUCCIÓN ANIMAL

P R E S E N T A

ALICIA SOTOMAYOR GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Iván Sánchez Betancourt
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTORAL

Dra. María Elena Trujillo Ortega
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Dra. Edda Sciutto Conde
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico con todo mi corazón a mis padres, Aurora González y Fernando Sotomayor por su apoyo incondicional durante esta etapa y toda la vida. Por enseñarme a soñar y a seguir mis sueños con amor, pasión y compromiso. Los amo.

A mi hermano, Fernando Sotomayor por compartir cada día de su vida conmigo fomentando en mi la alegría a partir de las situaciones más simples.

“One day Alice came to a fork in the road and saw a Cheshire cat in a tree. ‘Which road do I take?’ she asked. ‘Where do you want to go?’ was his response. ‘I don’t know,’ Alice answered. ‘Then,’ said the cat, ‘it doesn’t matter.’”

— Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

Agradecimientos

Mis agradecimientos están dirigidos a todas las personas y entidades que hicieron posible la realización de este proyecto. Al Consejo nacional de ciencia y tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado, a la Dirección General de Epidemiología y Análisis de Riesgo (SENASICA), al DMZC de la FMVZ por ser mi segunda casa, al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al “Rowland Lab” en “Kansas State University” por recibirme con los brazos abiertos.

A mis tutores. Al Dr. Ivan Sánchez Betancourt por introducirme al maravilloso mundo de la investigación y de los virus. Siempre estaré agradecida por ser un “Cheshire cat” para mí. A la Dra. María Elena Trujillo Ortega por todas las oportunidades que me ha permitido vivir y todo su apoyo. A la Dra. Edda Schiutto Conde por su constante interés y su confianza en mí.

A mi jurado: Dra. Susana Mendoza, MC. Atalo Martínez, Dra. Gladis Fragosó y Dra. Rosa Elena Sarmiento por mejorar con cada una de sus atenciones la presentación de éste trabajo. Especialmente, gracias Dra. Rosa Elena por el apoyo que me brindó durante este año, gracias a su ayuda pude ver concluido éste proyecto y por ofrecerme nuevos sueños.

Al MC Víctor Quintero y al MVZ Juvencio García por su colaboración con las muestras; a Bob Rowland, Maureen Kerrigan, Becky Eaves y Ben Tribble por recibirme en Manhattan como a una amiga; y a Brenda Scienz, Hugo Anaya, Jacquelyn Cervantes y René Segura por su ayuda.

A mi familia: mi abuela, mis tíos y mis primos, gracias por todas las diversas formas en las que me ayudaron a concluir esta meta. Especialmente a mi tía Licha y mi tío Augusto que me brindaron múltiples consejos durante esta etapa y con quien comparto el gusto por la investigación y la docencia.

A mis amigos: los del “green”, los del departamento de cerdos y los de “viro” gracias por su amistad. En especial, gracias a Glu por ser mi mejor “amigui”; a Juan, Juanito, Rol, Alexa y Mau por el tiempo que han compartido conmigo y por dejarme ser parte de sus vidas.

Gracias a Tere López por ayudarme desinteresadamente y volverse mi apoyo durante este año. Los quiero.

Finalmente, al Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Adyuvantes, Métodos Diagnósticos del IIB.

Este proyecto fue financiado por el programa de apoyo PAPIIT IN 223514.

RESUMEN

El Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) es una de las enfermedades infecciosas más importante que afecta a la industria porcina a nivel mundial. Se ha encontrado variación (15%) entre las cepas que afecta la respuesta inmune humoral. También hay evidencia de la restricción de la reactividad serológica cruzada entre cepas. La hipótesis señala que la variación genética del arterivirus porcino (PRRS) ha dado lugar a nuevas cepas virales generando variantes antigénicas endémicas en México que complican el diagnóstico y control. Nuestro objetivo fue encontrar una cepa que puede garantizar una protección heteróloga mediante el aislamiento de cepas presentes en algunas de las regiones de producción porcina de México. Se produjo suero hiperinmune para cada cepa, se realizaron ensayos de seroneutralización cruzada para identificar su relación antigénica y finalmente se obtuvo la secuencia de los genes ORF 5 y ORF 7 para encontrar mutaciones que pueden estar relacionados con la antigenicidad. De las 126 muestras analizadas, el 57.93% fueron positivas; a partir del cual se aislaron 6 virus, los cuales se utilizaron para la prueba de neutralización cruzada. (G2, G3, G6, AV4, AV16, VR2332). Se encontró que el virus G3 presenta la mayor relación antigénica contra las otras cepas con un valor de 0.7-1.0 contra todas las cepas. El análisis de la secuencia revela varias mutaciones no sinónimas que podrían estar relacionadas con la antigenicidad y la presentación clínica. En conclusión, la identificación de cepas endémicas con similitud antigénica es indispensable para el desarrollo de vacunas eficientes en nuestro país que mejoren el control de las cepas circulantes.

Palabras clave: PRRS, Arterivirus, variabilidad genética, variabilidad antigénica, ORF 5, ORF 7, México.

ABSTRACT

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is one of the most important infectious diseases affecting the swine industry worldwide. High strain variation (15%) has been found affecting the humoral immune response. There is also evidence of the restriction of the serological cross-reactivity between strains. The hypothesis indicates that genetic variation of the porcine arterivirus (PRRS) has given rise to new viral strains causing endemic antigenic variants in Mexico that complicate diagnosis and control. The aim of this study was to find a strain that can produce an heterologous protection by isolating strains present in some regions of swine production in Mexico. Hyperimmune serum was produced for each strain, serum neutralization assays to identify antigenic cross connection was performed and finally the ORF5 and ORF7 gene sequence was obtained for mutations that may be related to antigenicity. Of the 126 samples analyzed, 57.93% were positive; 6 from which virus was isolated, and used for cross-neutralization test. (G2, G3, G6, AV4, AV16, VR2332). We found that the G3 strain has the highest antigenic relationship against the other strains at a value of 0.7-1.0 against all strains. The sequence analysis reveals several nonsynonymous mutations that could be related to the antigenicity and clinical presentation. In conclusion, the identification of endemic strains with antigenic similarity is essential for the development of efficient vaccines in our country to improve the control of the circulating strains.

Keywords: PRRS, Arterivirus, genetic variability, antigenic variability, ORF 5, ORF 7, Mexico.

CONTENIDO

Dedicatorias.....	II
Agradecimientos.....	III
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Índice.....	VII
Lista de Cuadros.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XVI
Introducción.....	1
Revisión de Literatura.....	2
Antecedentes.....	2
Impacto económico.....	4
Agente etiológico.....	5
Signos Clínicos.....	9
Patogenia.....	12
Respuesta Inmune.....	20
Diagnóstico.....	24
Control.....	30
Justificación.....	37
Hipótesis.....	38

Objetivos.....	39
Material y Métodos.....	40
Muestras.....	40
Extracción de RNA.....	40
RT-PCR.....	41
Gel de Electroforesis.....	43
Cultivo Celular.....	43
Aislamiento Viral.....	45
Sueros Hiperinmunes.....	45
LOWRY.....	46
ELISA.....	47
Seroneutralización.....	48
Relación Antigénica.....	51
Inmunofluorescencia.....	51
Secuenciación.....	52
Análisis Filogenético.....	53
Resultados.....	54
RT- PCR.....	54
Aislamiento viral.....	59
LOWRY.....	64
ELISA.....	66

Seroneutralización.....	67
Inmunofluorescencia.....	69
Secuenciación.....	75
Análisis Filogenético.....	83
Discusión y Conclusiones.....	87
Referencias Bibliográficas.....	94
Anexos.....	109

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados para los ORFs 5 y 7 del virus de PRRS.....	41
Cuadro 2. Preparación de estándares de proteína para la técnica de Lowry.....	45
Cuadro 3. Resultados positivos para PRRS utilizando cada oligonucleótido en un total de 126 muestras.....	54
Cuadro 4. Muestras procesadas con ambos pares de oligonucleótidos (ORF 5 y ORF 7).....	55
Cuadro 5. Aislamientos virales utilizados para la seroneutralización.....	59
Cuadro 6. Títulos de Seroneutralización obtenidos. El valor representa la ultima dilución observada sin presencia de efecto citopático (ECP).....	67
Cuadro 7. Relaciones antigénicas entre los aislados del virus de PRRS y la cepa vacunal.....	69
Cuadro 8. Mutaciones encontradas en la secuencia de nucleótidos de la glicoproteína 5 (GP5).....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquematización del virus de PRRS incluyendo todas las proteínas estructurales.....	6
Figura 2. Representación esquemática del genoma del virus de PRRS diferenciando los 9 ORFs.....	7
Figura 3. Esquematización de las glicoproteínas expresadas en las células blanco relacionadas a la adhesión e internalización del virus: heparan sulfato, Sialoadhesina y CD 163.....	13
Figura 4. Descripción esquemática de la adhesión del virus por medio del ligando GP5/M a los receptores de las células blanco (1-3), la internalización del virus por medio de endosomas (4) y su liberación dentro de la célula (5).....	14
Figura 5. Esquematización de la endocitosis mediada por clatrina.....	15
Figura 6. Respuesta de anticuerpos a las principales proteínas estructurales y no estructurales. Se midió la respuesta humoral por medio de ELISA en 10 cerdos en contra de la proteína N (Círculos), la NSP2 (Triangulos) y el dímero GP5-M .Se muestra el promedio de los valores S/P.....	23
Figura 7. Representación esquemática de la IFA directa e indirecta.....	26
Figura 8. Los oligonucleótidos diseñados para este estudio no muestran reacción cruzada utilizando los controles. (1) Oligonucleótidos para ORF 5 control negativo. (2) Oligonucleótidos para ORF 5 cepa americana con muestra de control americano.....	42
Figura 9. Esquematización del procedimiento de Seroneutralización.....	49
Figura 10. Porcentaje de positividad de acuerdo al tipo de muestra que fue utilizada.....	55
Figura 11. Gel de electroforesis al 2%. Se observan muestras de campo (1, 3 y 4) y los controles positivos (2 y 5). La muestra 1 presenta un amplicón ligeramente menos pesado que el amplicón del control.....	56

Figura 12. Gel de electroforesis al 2%. Las muestras señalizadas como 3 y 4 presentan un doble bandeo con un aproximado de 50 bases de diferencia. La muestra señalizada como 5 presenta una banda de menor tamaño en comparación con el control positivo (C+)58

Figura 13. (A) Células MA-104 Infeccionadas con el virus de PRRS aislamiento A16 a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia; a las 96 h PI se observó desprendimiento de células del monoestrato, islotes de células muertas suspendidas y células alargadas. (B) Monoestrato de Células MA-104 control sin infectar a las 96 h, muestra escasas células muertas. (C) Células MARC-145 Infeccionadas con el virus de PRRS aislamiento A16 a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia; a las 96 h PI se observaron células en proceso de muerte, células redondeadas y desprendidas . (D) Monoestrato de Células MARC-145 control sin infectar a las 96 h. Microscopía óptica 10X.....60

Figura 14. Monoestrato de células MARC-145 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia que muestra el efecto citopático de diferentes cepas en células MARC-145 tratadas en las mismas condiciones de crecimiento. A) Aislado G2 a 96 h de infección; se observa un “listón de células” (flecha), efecto citopático característico del virus en estas células. B) Aislado A16 pase 3 a 96 h de infección, se observa formación de vacuolas c) Aislado G2 dilución 1:8 a 96 h de infección d) Monoestrato de células MARC-145 control sin infectar. Microscopía óptica 10X.61

Figura 15. Monoestrato de células MA-104 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia. A) Células MA-104 control sin infectar. B) Células MA-104 infectadas con el aislamiento G2, se observaron células alargadas y células desprendidas. C) Células MA-104 infectadas con el aislamiento G3, se observan células desprendidas y en proceso de muerte, así como alargamiento de células. D) Células MA-104 infectadas con el aislamiento A16, se observa moderado desprendimiento celular y pérdida del monoestrato. E) Células MA-104 infectadas con el aislamiento VR2332, se observa poco efecto citopático en general. Microscopía óptica 10X.....62

Figura 16. Monoestrato de células MARC-145 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia con los diferentes aislados; los cuales muestran diversos grados de

efecto citopático. A) Células MARC-145 control sin infectar; se observa moderado desprendimiento celular. B) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G2, se observan células alargadas y pérdida del monoestrato. C) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3, se observan “listones” de células alargadas con pérdida del monoestrato y células muertas en suspensión. D) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G6, se observan células en proceso de muerte, redondeadas y desprendidas. E) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento A4, se observa pérdida del monoestrato y ligero desprendimiento celular. F) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento A16 que muestra evidente alargamiento celular con formación de “listones” de células. G) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento VR2332, se observa moderado efecto citopático con pocas células alargadas y en suspensión. Microscopía óptica 10X.....63

Figura 17. Monoestrato de células MARC-145 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90%; los cuales muestran diversos grados de efecto citopático de acuerdo al número de pase del aislamiento. a) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3 pase 1 B) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3 pase 2 C) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3 pase 3 d) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3 pase 4. Microscopía óptica 10X.....64

Figura 18. Monoestrato de células MARC-145 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90%. A y B) Imágenes del efecto citopático ocasionado por el aislamiento G3. Se observa amplia destrucción celular con alargamiento de las células formando “redes”; dejando espacios sin células y zonas de células flotantes (muertas). C) Células MARC-145 control sin infectar. Microscopía óptica 20X.....65

Figura 19. Conteo de proteínas por la técnica de Lowry. Se utilizó el A4 5°P con una concentración de 1.1 mg/ml y el SNcel con una concentración de 2.3 mg/ml.....66

Figura 20. Estandarización de la prueba ELISA para la detección de los anticuerpos creados en conejo contra las diferentes cepas del virus de PRRS. Los estándares utilizados se encuentran dentro del cuadro rojo y fueron descritos en material y métodos. A9 y 10 Blanco, B9 y 10 Negativo, C9 y 10 suero de A4-1, D9 y 10 suero de

A4-2, E9 y 10 suero de G6-1, F9 y 10 suero de G6-2, G9 y 10 suero de A16-1, H9 y 10 suero de A16-2, A11 y 12 suero de G2-1, B11 y 12 suero de G2-2, C11 y 12 suero de G3-1, D11 y 12 suero de G3-2, E, F, G y H 11 y 12 sueros negativos.....67

Figura 21. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislado A4. A, B) Cepa A4 contra suero del aislado A4 dilución 1:32. C, D) Aislado A4 control positivo. E y F) Aislado A4 contra suero G3 dilución 1:4. Microscopía óptica 20X.....70

Figura 22. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento A16. A, B) Aislado A16 contra suero A16 dilución 1:32. C, D) Aislado A16 contra suero G6 control positivo del virus. E,F) Aislado A16 contra suero VR2332 dilución 1:16. Microscopía óptica 20X.....71

Figura 23. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento G2. A, B). Aislado G2 contra suero A16 dilución 1:64. C, D) Aislado G2 contra suero A4 dilución 1:64. E,F) Aislado G2 contra suero G6 dilución 1:8. Microscopía óptica 20X.....72

Figura 24. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento G3. A, B) Aislado G3 contra suero G3 dilución 1:16. C, D) Células Control sin infectar. E, F) Aislado G3 contra suero control negativo. Microscopía óptica 20X.....73

Figura 25. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento G6. A, B) Aislado G6 control positivo. C, D). Aislado G6 contra suero G2 dilución 1:512. E, F) Células Control sin infectar. Microscopía óptica 20X.....74

Figura 26. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento VR2332. A, B) Aislado VR2332 control positivo. C, D). Aislado VR2332 control negativo. Microscopía óptica 20X.....75

Figura 27. Alineación de las secuencias obtenidas de VR2332, A4, A16 y G2 con la cepa de referencia VR2332 (EF536003). Se observan las mutaciones encontradas en donde se presenta ausencia de color.....	77
Figura 28. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la glicoproteína 5 (GP5) a la cepa de referencia Americana EF536003. Se observan mutaciones no sinónimas en las zonas con falta de coloración.....	79
Figura 29. Alineación de las secuencias obtenidas de la nucleocápside: 347_75, A4, A16, CSI, G2, G3, G6 y Vr2332 identificada como N C+, con la cepa de referencia VR2332 (EF536003). Se observan las mutaciones encontradas en donde se presenta ausencia de color.....	81
Figura 30. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la nucleocápside (ORF7) a la cepa de referencia Americana EF536003. Se observan mutaciones no sinónimas en las zonas con falta de coloración.....	82
Figura 31. Árbol filogenético de la Glicoproteína 5 del virus de PRRS. Las muestras de éste estudio se encuentran identificadas con un triangulo rojo y la cepa control con un círculo rojo	84
Figura 32. Análisis Filogenético de las secuencias obtenidas de ORF 7 del virus de PRRS. Las muestras de éste estudio se encuentran identificadas con un triangulo rojo y la cepa control con un círculo rojo.....	86

ABREVIATURAS

ADE por sus siglas en inglés Antibody Dependent Enhancement; incremento de la infección dependiente de anticuerpos

APHIS Animal and Plant Health and Inspection Service

BSA albúmina de suero bovino

CEIEPAA Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano

CICUAE Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación

cm centímetro

CRP coronavirus respiratorio porcino

CSFV virus de la peste porcina clásica

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMZC Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos

DNA ácido desoxirribonucleico

E proteína de envoltura

EAV arteritis viral equina

ECP efecto citopático

EE.UU. Estados Unidos de América

ELISA del inglés enzyme-linked immunosorbent assay; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FITC isotiocianato de fluoresceína

FMVZ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

GP glicoproteína

h hora

IFA del inglés immunofluorescence assay; inmunofluorescencia

IFN Interferon tipo

Ig inmunoglobulina

IL Interleucina

IP influenza porcina

IRF3 factor regulador de IFN 3

JEV virus de la encefalitis japonesa

kb kilobases

kDa Kilodaltons

KV por sus siglas en inglés killed virus; vacunas de virus muerto

LDV deshidrogenasa láctica del ratón	PBS del inglés Phosphate Buffered Saline, solución salina amortiguada por fosfatos
m minuto	
M proteína de membrana	PCV2 circovirus porcino tipo 2
μl microlitro	PCVAD enfermedad asociada a circovirus porcino
ml mililitro	PI post infección
MLV por sus siglas en inglés modified live virus; vacunas de virus vivos modificados	pp poliproteína
μg microgramo	PPV1 parvovirus porcino tipo 1
mg miligramo	PRRS del inglés Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; síndrome respiratorio y reproductivo porcino
MSD del inglés Mystery Swine Disease; enfermedad misteriosa del cerdo	PRV virus de la pseudorrabia
N nucleocápside	RFLP análisis del polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción
NCBI National Center National Center for Biotechnology Information	RIA del inglés radio immunoassay; radioinmunoensayo
NK del inglés natural killer; células asesinas naturales	RNA ácido ribonucleico
nm nanomentros	RNA-seq secuenciación de siguiente generación
NSP proteína no estructural	RPC complejo respiratorio porcino
ORF del inglés Open Reading Frame; marco de lectura abierto	rpm revoluciones por minuto
pb pares de bases	RT-PCR reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

s segundo

SFB suero fetal bovino

SENASICA Servicio Nacional de Sanidad,
Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

SIRS síndrome respiratorio y de
infertilidad porcino

SHFV virus de la enfermedad
hemorrágica del simio

TLR del inglés toll like receptors;
receptores tipo Toll

TRITC tetrametil isotiocianato de
rodamina

TNF-alfa factor de Necrosis Tumoral
alfa

UI unidades internacionales

UNAM Universidad Nacional Autónoma
de México

USDA United States Department of
Agriculture

VR2332 Cepa de referencia del virus de
PRRS tipo 2

VSN seroneutralización del virus

INTRODUCCIÓN

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es considerado una de las enfermedades infecciosas más importantes que afectan a la industria porcina a nivel mundial debido a las grandes pérdidas económicas que ocasiona y a su distribución prácticamente mundial. Este síndrome se caracteriza principalmente por fallos en la reproducción en el último tercio de la gestación y enfermedad respiratoria en cerdos de todas edades (Kim *et al.* 1993; Macias *et al.* 2006; Zhoua *et al.* 2009; Karniychuk *et al.* 2011; Prather *et al.* 2013).

Desde la caracterización del virus en 1992 se evidenció la presencia de dos genotipos principales con una identidad de solo 70% entre ellos. Franzo y colaboradores reportan que la tasa de sustitución de nucleótidos del virus de PRRS se estima entre 4.7×10^{-2} y 1.55×10^{-3} (Murtaugh *et al.* 2010; Franzo *et al.* 2014). En la actualidad hay una gran cantidad de estudios que muestran que la diferencia entre las cepas del virus puede afectar la respuesta inmune en cerdos, así mismo, que la alta tasa de mutación del arterivirus porcino provoca variaciones en la antigenicidad así como en la virulencia (Chang *et al.* 2002; Kim *et al.* 2007; Darwich *et al.* 2010). A pesar de esto, se sabe poco sobre las variantes que se encuentran en México.

Desde que la variabilidad del virus del PRRS fue demostrada, hay evidencia de la restricción de la actividad serológica heteróloga entre subtipos o cepas, lo que afecta negativamente la respuesta inmunológica frente a la infección y también podría estar relacionado con la atenuación y virulencia de algunas cepas. (Luque 2006; Stadejek *et al.* 2010) Con esta información se establece la hipótesis la cual supone que la variación genética del arterivirus porcino (PRRS) ha dado lugar a nuevas cepas virales que son variantes antigénicas endémicas en México, y estos pueden complicar el diagnóstico y control. Por lo tanto, para encontrar una cepa que pueda conferir protección heteróloga, como un primer paso hacia la creación de una nueva vacuna, se realizó una búsqueda de

cepas presentes en algunas de las regiones de producción de cerdo en México y se evaluó su relación genética y antigénica a través de la secuenciación y ensayos de seroneutralización.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes

El PRRS fue descrito por primera vez en los Estados Unidos (EE.UU.) en 1987 durante una serie de brotes clínicos (Rossow 1998; Greiser-Wilke *et al.* 2010) reportados en Carolina del Norte, en donde describían el síndrome con graves pérdidas reproductivas, neumonía posdestete, reducción del crecimiento, y aumento de la mortalidad (Kim *et al.*, 2010). Tres años después la enfermedad apareció en Alemania, dispersándose rápidamente por todas las zonas productoras de Europa (Karniychuk *et al.*, 2013).

A falta de un agente causal conocido se le asignó el nombre de “enfermedad misteriosa del cerdo” (MSD, del inglés Mystery Swine Disease) y propusieron posibles agentes que estuvieran ocasionando la enfermedad. Entre éstos se encontraban el virus de la fiebre porcina clásica, el parvovirus porcino, el virus de Influenza A y el virus de la pseudorabia o enfermedad de Aujeszky. La identificación del agente etiológico fue un trabajo complicado debido a que varios de éstos agentes y otros más, se aislaban continuamente de los casos de MSD (Zimmerman 2003; Kim *et al.* 2010).

En 1991, Wensvoort y sus colegas del Instituto Veterinario Central en Lelystad, Países Bajos, descubrieron un virus RNA envuelto y poco después, otro virus similar fue aislado y caracterizado en EE. UU. (Benfield *et al.* 1992; Collins *et al.* 1992; Meng 2000). El Ph. D. Eric Nelson de la Universidad Estatal de Dakota del Sur menciona que cuando empezó a trabajar con la enfermedad a principios de 1991, no estaban seguros de que fuera causada por un virus, y se basaron en métodos clásicos antiguos, así como en la reproducción de la

enfermedad en cerdos gnotobióticos usando homogeneizados de tejidos filtrados con el fin de identificar el agente causal. Finalmente, el virus fue aislado y adaptado al cultivo celular; de ésta manera, a finales de 1991 lograron la caracterización básica del virus y así producir los primeros anticuerpos monoclonales para poder contar con algunos reactivos de diagnóstico básicos (Comunicación personal Ph. D. Eric Nelson). El primer virus aislado en los Países Bajos fue nombrado "Lelystad", y en los EE.UU. "síndrome respiratorio y de infertilidad porcino" (SIRS), cepa VR2332 (Benfield *et al.* 1992; Lager y Vorwald 1995; Takuya *et al.* 2001; Zimmerman 2003; Kim *et al.* 2010). En 1992, participantes del Simposio Internacional sobre SIRS llevado a cabo en Minneapolis EE. UU. acordaron nombrar al agente causal "síndrome respiratorio y reproductivo porcino" (PRRS) y actualmente se conoce con éste nombre a nivel mundial (Zimmerman 2003, Karniychuk *et al.* 2013).

En México, la enfermedad se describió clínicamente por primera vez a principios de los años 90, coincidiendo con la presentación pandémica de la enfermedad; sin embargo, es posible que fuera introducido a nuestro país desde los años 80 por animales importados (Diosdado *et al.*, 2004).

En 1994 la importación de cerdos de EE. UU. hacia nuestro país fue cerrada con el fin de evitar la entrada de la enfermedad. Entre 1991 y 1993 las cabezas de ganado importadas desde este país fueron en promedio 127 000, mientras que en el año 2005 los animales importados fueron solamente 4 900, ya que solo podían ser introducidos aquellos animales procedentes de producciones con un certificado otorgado por un veterinario perteneciente a la "Animal and Plant Health and Inspection Service (APHIS)" que indicara que toda la piara era negativa. Sin embargo, en 1996 se volvió a abrir el comercio, aunque se redujo la cantidad de animales continuando en el intento de evitar la entrada del virus aunque resulto imposible (Petry *et al.*, 1999).

En Mexico, Milián y colaboradores (1994) reportan por primera vez la enfermedad en granjas con registros de importaciones de cerdos reproductivos. El estudio lo realizaron en el INIFAP utilizando una prueba de inmunofluorescencia indirecta desarrollada en el laboratorio de referencia de Ames, Iowa; con la cual detectaron una prevalencia de 8.1% en cerdos de todas las etapas productivas. (Milián *et al.*, 1994) Posteriormente, en un estudio realizado en 1997 en varias regiones de México, Diosdado y colaboradores (2004) demostraron que el 80% de los animales muestreados presentaron anticuerpos contra el virus de PRRS y en 1999 se obtuvo el reconocimiento oficial de la enfermedad por parte de las autoridades sanitarias de nuestro país (Meng 2000; Diosdado *et al.* 2004).

Impacto económico

El virus de PRRS causa graves pérdidas económicas debido a la falla reproductiva en cerdas adultas y jóvenes, se ha reportado que las enfermedades respiratorias son la causa más importante de morbilidad y mortalidad en cerdos después del destete (Strutzberg-Minder *et al.* 2010; Evans *et al.* 2010).

En el estudio realizado por Neumann y colaboradores (2005) en EE. UU. se evaluó el impacto económico en piaras de pie de cría y crecimiento que fueron afectadas por el virus de PRRS, al medir la disminución en la salud reproductiva, en el aumento en muertes y la reducción en la tasa de crecimiento y eficiencia. Los resultados demostraron que el impacto económico anual de las pérdidas ocasionadas por PRRS se estimaron en \$66.75 millones de dólares en pie de cría y \$493.57 millones de dólares en las poblaciones de crecimiento y engorda de cerdos (Neumann *et al.*, 2005).

En un estudio más reciente publicado por Holtkamp y colaboradores en el año 2011, se concluyó que el efecto económico de PRRS desde inseminación o monta natural hasta el parto, se calcula en \$74.16 dólares por camada afectada debido a una reducción en el

número de partos y lechones nacidos. El costo de PRRS en el periodo de lactancia se estimó en \$6.01 dólares por animal afectado debido al aumento de la mortalidad de lechones, a la reducción del porcentaje de conversión alimenticia y la reducción de la ganancia diaria de peso; y por último, el efecto en la etapa de crecimiento y finalización se estimó en \$7.67 dólares por animal en las granjas afectadas. Concluyeron que el impacto en la industria porcina de los EE. UU. es de \$674 millones de dólares. (Holtkamp *et al.*, 2011)

El estudio publicado mas reciente acerca del impacto económico de la enfermedad, realizado por Nieuwenhuis y colaboradores (2012) en Holanda, reporta la estimación de una pérdida de 6 084 euros a 134 292 euros por granja al año. En el estudio mencionado se evaluaron nueve granjas de pie de cría infectadas por el virus de PRRS. Las pérdidas económicas varían debido a la reducción de cerdos vendidos por hembra, lo cual ocasiona una pérdida aproximada de 126 euros por cerda (Nieuwenhuis *et al.*, 2012).

Agente etiológico

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) se encuentra clasificado en el orden Nidovirales, familia Arteriviridae, género Arterivirus, dentro de los cuales se encuentran el virus de la arteritis viral equina (EAV), el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón (LDV) y el virus de la enfermedad hemorrágica del simio (SHFV) (Cavanagh 1997; Yufeng *et al.* 2008; Zhoua *et al.* 2009; Rowland 2010). Estos virus presentan cuatro características peculiares: alta variabilidad genética y antigénica, capacidad de infectar macrófagos-monocitos induciendo infecciones persistentes, y modulación del sistema inmunológico (Macías *et al.* 2006; Cho *et al.* 2006; Rowland 2010). Como grupo, los arterivirus representan los extremos absolutos en la patogénesis de mamíferos. Por ejemplo, SHFV es casi 100% fatal en monos asiáticos, mientras que el LDV alcanza

rápidamente altos niveles en la sangre, sin signos clínicos aparentes en ratones (Chand *et al.*, 2012).

El virus de PRRS está formado por una cadena de RNA de aproximadamente 15 kb de longitud; es de sentido positivo y forma esférica con un diámetro de aproximadamente 50 a 65 nm y se encuentra envuelto por una capa lipídica (Kim *et al.*, 2010). El virión del virus del PRRS consiste en una nucleocápside (N) compuesta por la cadena de RNA y la proteína de la nucleocápside, que está rodeada por una envoltura formada por una doble capa lipídica. Ésta envoltura contiene seis proteínas estructurales: una pequeña proteína E de envoltura, la proteína M de membrana, y las proteínas N-glicosiladas: GP2, GP3, GP4 y GP5 (Figura 1) (Macías *et al.* 2006; Van Breedam *et al.* 2010). El gran número de proteínas de la envoltura es característico de los nidovirus y se ha demostrado que todas las proteínas estructurales son esenciales para la infectividad (Dokland 2010).

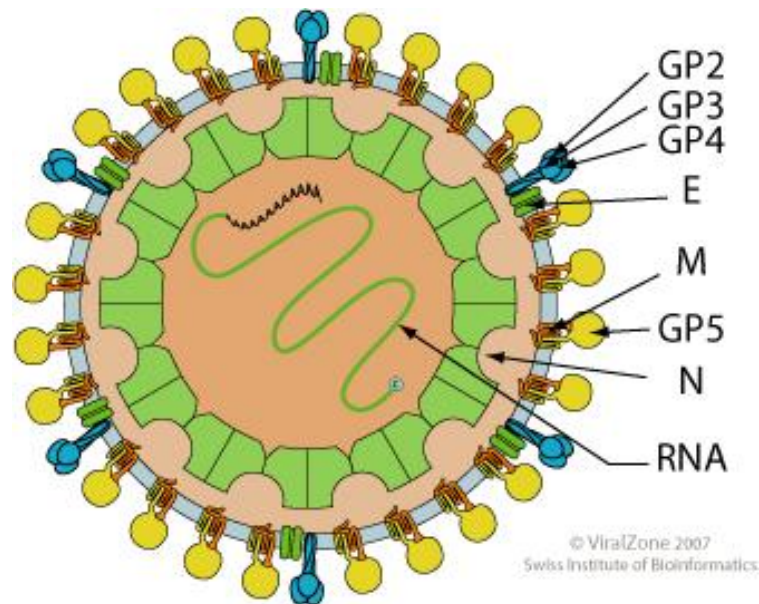


Figura 1. Esquemática del virus de PRRS incluyendo todas las proteínas estructurales (<http://viralzone.expasy.org>).

El genoma del virus de PRRS presenta 10 ORFs: los primeros dos (ORF 1a y 1b) ocupan el 80% del genoma; codifican para la RNA polimerasa viral y se asocian con proteasas y replicasas implicadas en la replicación y la transcripción del RNA viral (Macías *et al.* 2006; Straw *et al.* 2006; Eeuri *et al.* 2009; Kim *et al.* 2010). Los ORFs 2 , 3 , 4 , 5 y 5a codifican para la proteínas estructurales GP2, GP3, GP4 y GP5 respectivamente. ORF 6 codifica una proteína de la matriz (M). ORF 7 codifica para la proteína de la nucleocápside (N) (Cheon y Chae, 2000). ORF2b está incluido completamente dentro de ORF2 y codifica para una pequeña proteína de envoltura (E) no glicosilada (Dokland 2010). La figura dos muestra esquemáticamente la posición de los ORFs.

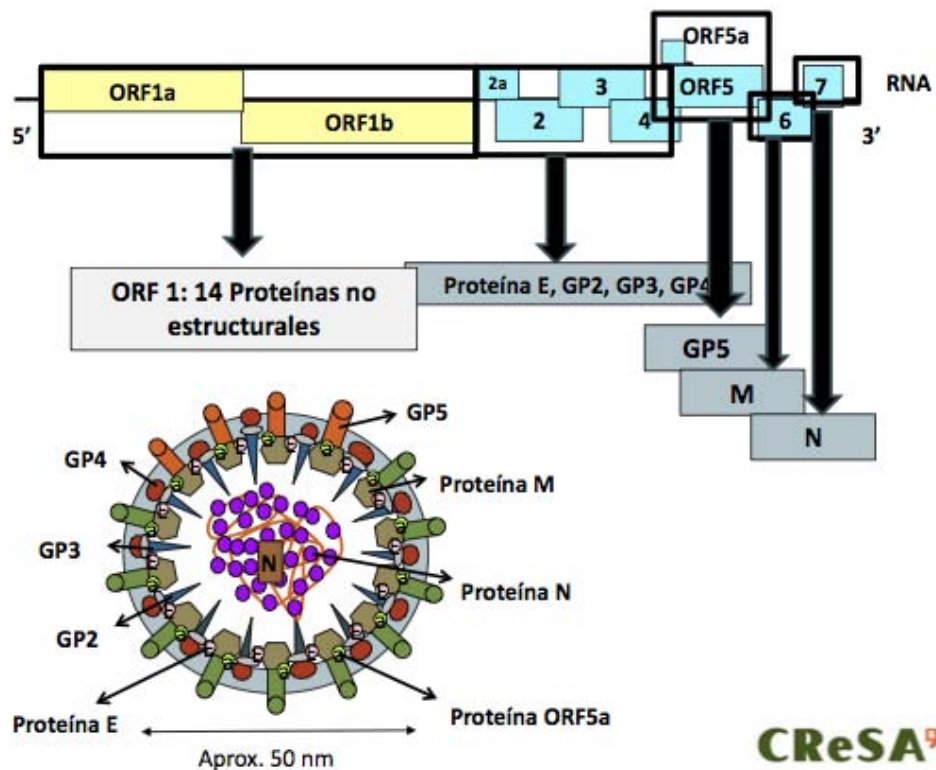


Figura 2. Representación esquemática del genoma del virus de PRRS diferenciando los 9 ORFs (Imagen tomada de: <http://chil.org/blogs/liveblogsepor/383/by-tag/feria-industrial>).

El ORF 5 y el ORF 7 se encuentran entre los más estudiados (Greiser-Wilke *et al.*, 2010). El ORF 5, que codifica para la proteína de la envoltura GP5 es una glicoproteína de

aproximadamente 200 aminoácidos con un peso molecular aparente de 25 kDa que se encarga de reconocer el receptor celular de las células blanco e inducir apoptosis (Macías *et al.*, 2006). Esta proteína es la más variable del virus de PRRS, característica por la cual se utiliza para genotipificar aislamientos genéticamente distintos. El ORF 7, que codifica para la proteína N es el más pequeño, induce una elevada producción de anticuerpos sin actividad protectora aparente e interactúa con el RNA viral formando la nucleocápside, participan en el ensamblaje y liberación de partículas infecciosas completas. Esta proteína se expresa en altos niveles en células infectadas y representa del 20 al 40% de la proteína total que contiene el virión (Meulenber *et al.* 1995; Meng 2000; Macías *et al.* 2006; Straw *et al.* 2006).

El análisis comparativo de secuencias de nucleótidos de los virus aislados en Europa y en los EE.UU. ha dado lugar a la designación de dos genotipos de referencia: el europeo o tipo 1 y el americano o tipo 2. A pesar de que ambas cepas aparecieron casi simultáneamente y producen signos clínicos similares, solo comparten una identidad de alrededor del 70% a nivel de nucleótidos. Aun entre subtipos del mismo genotipo la variabilidad genética puede ser muy elevada, con aparición periódica de nuevos fenotipos más graves de la enfermedad (Takuya *et al.* 2001; Flores-Mendoza y Hernández 2010; Murtaugh y Genzow 2011; Chand *et al.* 2012). Franzo y colaboradores reportan que el aumento progresivo de la variabilidad genética ha llevado a una diversidad de nucleótidos dentro del mismo genotipo (Europeo y Americano) que se ha estimado en alrededor de 15% y 12.5%, respectivamente. Se ha sugerido que esta tasa de variabilidad se debe principalmente a la evolución del virus ocasionada por la infidelidad de la RNA polimerasa, sin embargo, diversos estudios han demostrado que la recombinación se lleva a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a la capacidad de dos virus o mas de infectar una misma célula, generando diversidad genética. La tasa de sustitución de nucleótidos del virus de PRRS se ha estimado entre 4.7×10^{-2} y 1.55×10^{-3} (Murtaugh *et al.* 2010; Franzo *et al.* 2014).

Entre las cepas americanas, ORF 5 muestra una similitud del 88 al 97%, sin embargo, entre las cepas americanas y europeas la identidad es sólo del 51 al 59% (Macías *et al.* 2006; Wu *et al.* 2009). La distancia genética que se ha calculado para ORF5 se ha reportado hasta 30% en el genotipo I y 21% en el genotipo II (Murtaugh *et al.*, 2010). El ORF 5 es el gen más variable y se utiliza comúnmente para identificar aislamientos genéticamente diferentes; aunque publicaciones más recientes han demostrado una zona altamente variable en la NSP2 en las posiciones de aminoácidos 324 a 814 presentando solamente 40% de similitud de aminoácidos entre los dos genotipos, lo que la convertiría en el gen con la mayor variabilidad (Rossow 1998; Dee *et al.* 2001; Wu *et al.* 2009). En contraste, la proteína viral N codificada por el ORF 7, es la segunda más conservada, con una identidad de secuencia del 95 al 100% en la misma cepa y variaciones de hasta 74% entre la cepa americana y la cepa europea. A pesar de ser un gen conservado se ha establecido que existe una variación considerable en la proteína N, que se puede utilizar para establecer cepas (Macías *et al.* 2006; Cho *et al.* 2006).

Esta variabilidad del virus ocasiona que la virulencia difiera sustancialmente entre los aislados de muy leve a extremadamente alta, lo cual se ha comprobado al secuenciar aislamientos de alta y mediana patogenicidad que han aparecido en China (Du 2012). Como Chang y colaboradores mencionan desde el año 2002 “la diversidad genética se refleja en la diversidad inmunogénica entre los aislados del virus de PRRS” y juega un papel importante en la virulencia, escape antigénico y débil respuesta inmunológica, y el fracaso en el diagnóstico (Chang *et al.* 2002; Darwich *et al.* 2010; Flores-Mendoza y Hernández 2010; Franzo *et al.* 2014).

Signos clínicos

El síndrome respiratorio y reproductivo (PRRS), como su nombre lo indica, se caracteriza por presentar un cuadro clínico reproductivo en las cerdas gestantes y enfermedad

respiratoria que afecta principalmente a animales de crecimiento y finalización (Benfield *et al.* 1999; Diosdado *et al.* 2004; Rowland 2010; Gómez-Laguna *et al.* 2013).

El efecto de la infección sobre el cuadro reproductivo se presenta en distintas formas dependiendo de la etapa de gestación en que la cerda fue infectada. En la gestación temprana el virus puede causar la muerte del embrión, sin embargo, la manifestación clínica del virus de PRRS se produce principalmente en la gestación tardía y se caracteriza por abortos, partos prematuros, muerte fetal (aumento en el número de momias que se observan de diferente tamaño, lo que indica que la infección se dio de manera progresiva) y el nacimiento de lechones débiles con infección congénita resultan en elevada mortalidad antes del destete. La infección también se ha asociado con bajas tasas de concepción, elevación en el porcentaje de irregulares, así como retornos al estro y esporádicamente abortos tempranos (Prieto y Castro 2004; Ladinig *et al.* 2014; Karniychuk *et al.* 2014).

Algunos otros signos que se pueden observar en los cerdos infectados son: decoloración roja o azul de las orejas y la vulva, fiebre prolongada, hiperapnea, letargia y edema periorcular, presentando lesiones macroscópicas inespecíficas como cambios de color del pulmón y aumento de tamaño de varios nódulos linfáticos superficiales y viscerales (Collins *et al.* 1992, Rossow *et al.* 1995, Karniychuk *et al.* 2014). Histopatológicamente se puede presentar: rinitis, neumonía intersticial, linfadenopatía (necrosis linfoide, degeneración poliquística del tejido linfoide con policariocitos), miometritis, endometritis, placentitis y separaciones microscópicas en la unidad materno-fetal, vasculitis, miocarditis y encefalitis (Rossow *et al.* 1994; Halbur *et al.* 1994a; Rossow *et al.* 1995; Prather *et al.* 2013; Karniychuk *et al.* 2013).

Además, dentro de un sistema de producción, la infección por PRRSV se mantiene predominantemente como una infección subclínica, participando como un cofactor en varios síndromes de enfermedades polimicrobianas, tales como el complejo respiratorio

porcino (RPC) y la enfermedad asociada a circovirus porcino (PCVAD) lo que incluirá la presentación de diversas presentaciones clínicas (Chand *et al.*, 2012).

Los trastornos reproductivos ocasionados por el virus en cerdas susceptibles infectadas en el tercer trimestre de gestación ocurren cuando la infección se lleva a cabo en el día 90 de gestación, después de una la replicación viral en la cerda, el virus atraviesa la placenta e infecta al feto, ya que el sistema inmunológico del feto se desarrolló a partir del día 70 de gestación. El virus puede atacar células B y T competentes de la madre y llevar a cabo la infección (Rowland, 2010). La severidad de lesiones macroscópicas y microscópicas en los fetos depende de las propiedades del virus y la edad del feto. Generalmente se pueden observar hemorragias segmentarias, perivasculares y transmurales, así como múltiples edemas con arteritis necrótica del cordón umbilical y lesiones en el miocardio, pulmones, cerebro e hígado, pero son poco frecuentes (Ladinig *et al.*, 2014).

Los lechones que sobreviven la infección en útero son los que presentan el cuadro respiratorio más severo alcanzando mortalidades de hasta 100% (Rowland, 2010). Particularmente en el tracto respiratorio, el virus de PRRS predispone a los animales a infecciones por otros patógenos. En condiciones experimentales y estudios de campo, se observa que en cuadros clínicos severos con retraso en el crecimiento de los animales, están presentes además del virus de PRRS, agentes como el virus de influenza porcina (IP) y el coronavirus respiratorio porcino (CRP) (Diosdado *et al.*, 2004).

Sin embargo, la intensidad, la patogenicidad y la virulencia parecen variar entre aislamientos del virus de PRRS, como se ha observado en animales infectados experimentalmente. Algunos estudios encontraron que los cerdos infectados experimentalmente con diferentes aislamientos del virus de PRRS en EE. UU. mostraron importantes diferencias en la presentación clínica de la enfermedad, la temperatura rectal, lesiones macroscópicas y microscópicas en pulmones. En estos estudios, los animales infectados con cepas ligeramente virulentas presentaron fiebre transitoria,

disnea y taquipnea mientras que la infección con los aislamientos altamente virulentos indujeron dificultad para respirar, fiebre, letargo y anorexia (Halbur *et al.* 1995; Halbur *et al.* 1996; Cho y Dee 2006).

En cuanto a la presencia del virus en los machos, hay estudios que indican que la infección por el virus de PRRS puede causar alteraciones en la calidad seminal. Las alteraciones se han reportado desde dos semanas después de la infección; estos cambios, que incluyen la reducción de la motilidad, aumento en el porcentaje de acrosomas anormales, y aumento de las alteraciones morfológicas (principalmente en la cabeza) dan lugar a una reducción en el número de dosis que se producen (Prieto y Castro 2005; Straw *et al.* 2006).

Patogenia

De forma general, se cree que el virus de PRRS inicia una infección en los cerdos al entrar por el epitelio nasal, las amígdalas y los macrófagos pulmonares. El virus inhibe el movimiento ciliar de la tráquea afectando a los macrófagos alveolares; lisa las células dendríticas, se replica en las células y produce viremia, pero de forma específica el proceso de infección conlleva diversas fases que combinan la replicación del genoma y la transcripción de los RNAm subgenómicos (Meng 2000; Diosdado *et al.* 2004; Straw *et al.* 2006; Darwich *et al.* 2010).

La infección comienza con la llegada del virus a las células blanco. Se ha observado que el virus de PRRS tiene preferencia por células de la línea de los macrófagos o monocitos, e infecta a subconjuntos específicos de macrófagos diferenciados en los pulmones, los tejidos linfoides y la placenta. Las células precursoras de los macrófagos, como por ejemplo las células de médula ósea y los monocitos de sangre periférica son refractarias al virus así como los macrófagos peritoneales (Van Breedam *et al.*, 2010).

El ciclo de replicación de los arterivirus comienza con la adhesión del virus por medio de diversas glicoproteínas que funcionan como receptores expresados en la superficie de las células blanco, como son el heparan sulfato, la sialoadhesina y el CD163 (Figura 3) (Van Gorpe *et al.* 2009; Van Breedam *et al.* 2010; Prather *et al.* 2013). GP5 y M forman un heterodímero unido por medio de puentes disulfuro el cual es esencial para la interacción con los receptores celulares para que se de la infección. Van Breedam y colaboradores mencionan que este complejo formado por la proteína M y la GP5 interactúa con moléculas de sulfato de heparina que se encuentra en la superficie de la célula blanco (Van Breedam *et al.*, 2010).

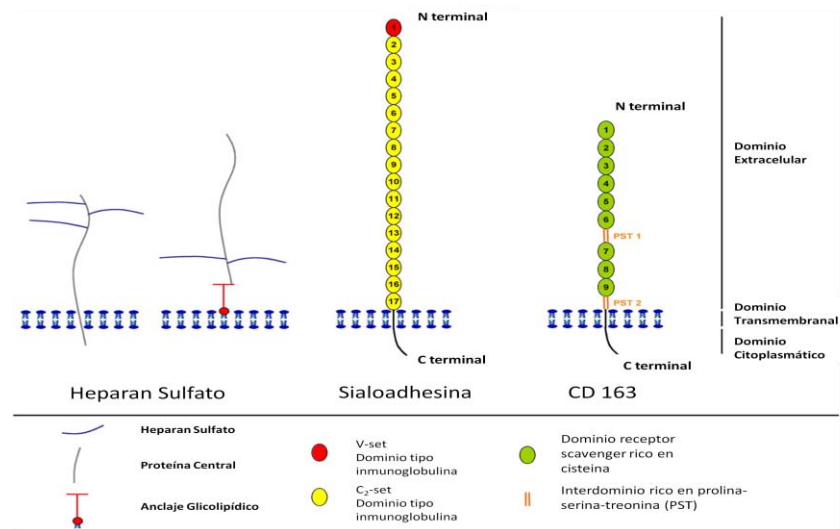


Figura 3. Esquematización de las glicoproteínas expresadas en las células blanco relacionadas a la adhesión e internalización del virus: heparan sulfato, Sialoadhesina y CD 163 (Van Breedam *et al.*, 2010).

El heparan sulfato se encuentra presente en la superficie de células de mamífero como parte de las proteínas O-glicosiladas denominadas proteoglicanos, las cuales forman cadenas próximas a la superficie celular o en proteínas de matriz extracelulares donde se unen a una variedad de ligandos de proteínas y regulan una gran variedad de actividades biológicas, incluyendo los procesos de desarrollo, angiogénesis, coagulación de la sangre,

metástasis tumoral e infecciones virales. Sin embargo, la presencia del heparan sulfato no es indispensable ya que se ha encontrado que en estudios que incuban los macrófagos alveolares con heparina o heparan sulfato la infección se reduce pero no se bloquea completamente (Straw *et al.* 2006; Van Breedam *et al.* 2010).

El otro mediador que ha sido estudiado es la sialoadhesina, que es una glicoproteína transmembranal tipo 1 que forma parte de unas lecitinas de unión de ácido sálico llamadas “siglecs” que tienen como función relacionar células, así como participar en diversos aspectos de la inmunidad adaptativa como procesamiento y presentación de antígeno a células T. La expresión de estas sialoadhesinas permite la unión y la internalización del virión por medio de endocitosis mediada por clatrina (Figura 4) (Van Breedam *et al.*, 2010).

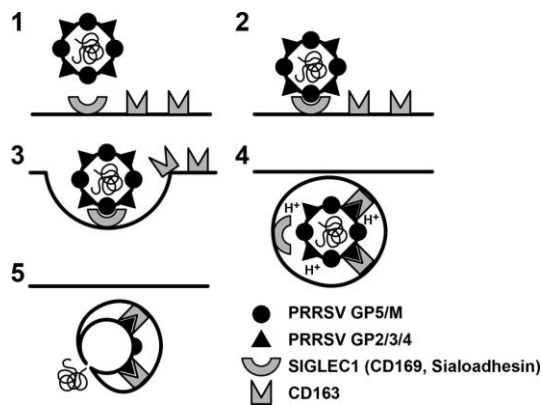


Figura 4. Descripción esquemática de la adhesión del virus por medio del ligando GP5/M a los receptores de las células blanco (1-3), la internalización del virus por medio de endosomas (4) y su liberación dentro de la célula (5) (Prather *et al.* 2013).

Después de que el virus es internalizado entra a la ruta endocítica y para que la infección correcta se lleve a cabo, se requiere la liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula infectada. Para que la liberación del genoma se lleve a cabo es necesario que el pH

se encuentre en un rango de 6.0 a 6.5 lo que sugiere que se libera cuando se encuentra en los endosomas tempranos donde se encuentra con CD163, que se vuelve un factor crucial para la liberación del genoma del virus (Van Breedman 2010). Con respecto a la endocitosis, de los métodos descritos el mayormente aceptado es el mediado por la clatrina, el cual incluye el ligando entre las proteínas M y GP5 (Figura 5) así como la formación de endosomas (Van Gorpe *et al.*, 2009).

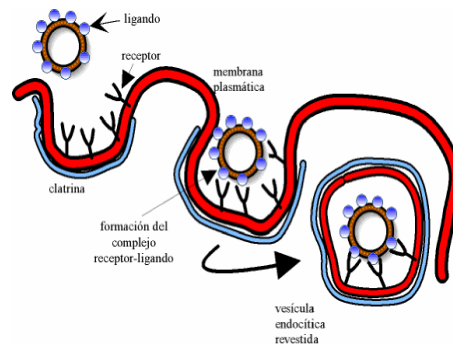


Figura 5. Esquemmatización de la endocitosis mediada por clatrina (Van Gorpe *et al.*, 2009).

Ya formado el endosoma, el proceso continua con la etapa de desnudamiento, la cual incluye la participación del receptor CD163 así como varias proteasas celulares que han sido implicados en el proceso de pérdida de la envoltura, como la serina, las proteasas aspárticas (Misinzo *et al.* 2008; Darwich *et al.* 2010), el CD151 y la catepsina E, enzima de la cual se ha comprobado que muestra una actividad óptima a pH bajo, requisito para la acidificación endosómica y la infección productiva por el virus de PRRS. (Sastradipura *et al.* 1998; Misinzo *et al.* 2008).

El receptor CD163 es una glicoproteína transmembranal tipo 1 que se expresa principalmente en las células de la línea de monocitos o macrófagos y es conocida por su función de buscador de hemoglobina; así mismo une e internaliza complejos de haptoglobina-hemoglobina protegiendo a los tejidos de daño oxidativo mediado por la hemoglobina libre. Su mecanismo exacto de acción en la infección por el virus de PRRS no

se conoce pero se sabe que participa como un mediador de la entrada del virus (Van Breedam *et al.*, 2010).

Tanto las proteínas celulares como las virales son necesarias para escapar de la vía endocítica. En el caso del virus de PRRS sólo la proteína E de la envoltura ha sido asociada al desnudamiento del virus y la liberación de su genoma. Ésta forma poros que causan cambios conformacionales con la exposición a pH bajo, lo que permite la entrada de iones para el virión y finalmente ayuda a la liberación del genoma viral en el citoplasma por medio de la fusión con la membrana del endosoma. (Van Gorp *et al.* 2009; Prather *et al.* 2013).

El daño celular que causa el virus comienza al inducir apoptosis directa e indirecta en las células que se encuentran próximas a la célula que fue infectada, siendo en su mayoría macrófagos. El principal objetivo de la generación de apoptosis es liberar los viriones de la célula para poder continuar la infección. En estudios realizados en líneas celulares Cos-1 de simio se observó que el producto genómico del ORF 5 causaba apoptosis en estudios *in vitro* lo que sugiere que tenga una función similar *in vivo* (Straw *et al.*, 2006).

Cuando el virus ya fue internalizado comienza la expresión del gen de la replicasa del genoma entrante. Los primeros dos tercios del genoma viral están ocupados por la superposición de los marcos de lectura abiertos 1a (ORF 1a) y 1b, que generan las proteínas de la replicasa viral. La poliproteína 1a (pp1a) está codificada por ORF1a, su síntesis se produce a través de un desplazamiento ribosomal del marco en la unión ORF 1a-1b. ORF1b se expresa a través de un cambio de marco ribosomal, que conduce a la formación de una gran poliproteína pp1ab. Las poliproteínas pp1a y pp1ab son procesadas por proteasas virales para liberar 14 proteínas no estructurales, que incluyen cuatro proteasas (NSP1, NSP1, NSP2 y NSP4), la RNA polimerasa dependiente de RNA (NSP9), una helicasa (NSP10) y una endonucleasa (NSP11). Estas proteínas son responsables de la formación de complejos de replicación unidos a la membrana, llamados vesículas de doble

membrana inducidas por el virus, que son sitios para llevar a cabo la síntesis completa del RNA (Han *et al.* 2007; Dokland 2010).

Ya comenzada la fase de replicación, la fase aguda de la viremia dura aproximadamente 28 días comenzando a las 8 horas post infección (PI), en los que la replicación se lleva a cabo principalmente en los macrófagos alveolares. La presentación clínica de enfermedad en esta fase, tal como dificultad respiratoria es una consecuencia del daño ocasionado en el epitelio ciliado pseudoestratificado del tracto respiratorio afectando el sistema de transporte mucociliar y evitando la eliminación de microorganismos (Chand *et al.* 2012; Gomez-Luna *et al.* 2013). Al infectar los macrófagos alveolares, el virus afecta su función, incluyendo la fagocitosis, la presentación de antígeno y la producción de citoquinas inflamatorias. Así mismo, produce necrosis y apoptosis de macrófagos alveolares y linfocitos comprometiendo la respuesta inmune del hospedador (Gómez-Laguna *et al.*, 2013).

Por otra parte, la afectación reproductiva por la infección aun no es completamente comprendida. Ladinig y colaboradores (2014) mencionan que aunque los fetos son susceptibles a la infección por el virus de PRRS en cualquier etapa de la gestación, la infección transplacentaria se produce principalmente en la gestación tardía (Ladinig *et al.*, 2014). La muerte de los embriones antes de la implantación generalmente resulta en la reabsorción de éstos y el retorno regular al estro. Cuando la mayoría de los productos fueron afectados entre los 14 y los 35 días de gestación antes de la formación del esqueleto también sucede la reabsorción en cuyo caso las cerdas tendrán un estro irregular si todos los productos mueren durante ese período o tendrán una pequeña camada cuando sólo una proporción de los embriones mueren. En el caso del aborto, éste puede ocurrir a partir de los 14 días de gestación, aunque generalmente tiene lugar a partir de 25 días de gestación hasta 109, ya que posterior a esta fecha los lechones tienen la posibilidad de sobrevivir. Las cerdas que abortan regresan al estro dentro de 5 a 10 días o presentan anestro prolongado (Karniychuk *et al.*, 2013).

Se ha sugerido que la muerte fetal no es un resultado directo de la replicación del virus en los tejidos fetales ya que las lesiones microscópicas que se observan en los fetos infectados no son graves. Se atribuye principalmente al número de macrófagos positivos a sialoadhesina y CD163 en el endometrio y la placenta, así como a la replicación del virus en sitios de implantación fetal, lo que provoca la apoptosis de las células infectadas y ocasionando muerte fetal. Sin embargo, los mecanismos exactos por los que el virus de PRRS se transmite de la madre a sus fetos aún no se han determinado (Karniychuk *et al.* 2011; Ladinig *et al.* 2014).

Una vez que el feto ha sido infectado se puede detectar el virus sistémicamente en varios tejidos incluyendo pulmón, hígado, bazo, corazón y riñón; pero se encuentra más consistentemente en los tejidos linfáticos con el timo fetal, las amígdalas y los linfonodos siendo el sitio principal de la replicación del virus (Karniychuk *et al.* 2011; Karniychuk *et al.* 2013; Ladinig *et al.* 2014). Ladinig y colaboradores (2014) concluyen en su estudio que los efectos clínicos sobre el cuadro reproductivo son variables, dependiendo de la cepa viral y que un signo característico de la infección es la presentación de heces en el meconio. Así mismo, reportan que la infección por virus de PRRS tiene un efecto en el peso de los lechones nacidos vivos con una disminución del 17% y aunque aun no es completamente claro el mecanismo de muerte fetal, existe una relación entre la carga viral del endometrio de la madre y la carga viral del timo fetal (Ladinig *et al.*, 2014).

Posterior a la eliminación del virus en la sangre, la viremia reaparecerá de manera periódica en los linfonodos como principal sitio de replicación, aunque también se ha reportado en amígdalas, placas de Peyer, timo, bazo y riñones. Wills y colaboradores (1997 a, b) demostraron que el virus puede aislarse en hasta 157 días PI (Wills *et al.*, 1997 a, b). Esta persistencia se debe principalmente a cuatro factores: una estructura compleja del virion con una superficie altamente glicosada, la modulación de la respuesta inmune dirigiéndola hacia proteínas que no se encuentran en la superficie del virus, “drift”

genético y antigénico y el bloqueo en la producción de interferon (Prieto y Castro 2004; Darwich *et al.* 2010; Chand *et al.* 2012).

Una fracción de los animales dentro de una piara afectada puede escapar de la infección inicial y permanecer como animales susceptibles que serán infectados posteriormente ayudando al virus a persistir dentro de la piara. Bilodeau y colaboradores (1994) demostraron que al introducir cerdos libres de patógenos específicos en una granja con cerdos previamente infectados con 4 meses sin presentación clínica de la enfermedad los cerdos SPF recién introducidos se infectaron. Este estudio corrobora la persistencia de la infección subclínica del virus, afortunadamente estudios recientes demuestran que la replicación viral disminuye hasta que se elimina por completo al virus. La razón aun es desconocida, sin embargo se cree que se debe a la disminución de células permisibles aunado a la baja respuesta inmunitaria. Como mencionan Chand y colaboradores (2012) “ya que la vida promedio de un cerdo es de aproximadamente 180 días, la infección con el virus de PRRS es –de por vida- para la mayoría de ellos” (Chand *et al.*, 2012).

En cuanto a la transmisión del virus, la principal vía es a través de un estrecho contacto entre cerdos infectados y cerdos susceptibles; contactos que son promovidos por los movimientos intensivos de animales (compra de cerdos destetados y cría de reemplazo) así como la transmisión de forma vertical entre la madre y el feto. Se ha reportado la presencia del virus de PRRS en una variedad de secreciones y excreciones del cerdo como los aerosoles, sangre, semen, saliva, heces, leche y calostro (Albina 1997; Cho *et al.* 2006). La duración de virus eliminado en el semen de verracos infectados experimentalmente varía de dos a 92 días después de la infección. Es probable que el virus llegue a los tejidos del tracto reproductivo del macho y al semen por la migración de macrófagos infectados. Cuando la transmisión es por medio del semen, la infección se inicia en el endometrio y ganglios linfáticos regionales y sale por vía hematológica o linfática hacia el organismo de la cerda (Karniychuk *et al.*, 2013).

De manera indirecta, el virus puede transmitirse a través de fomites (los más comunes son el overol y las botas), vehículos de transporte e insectos (el mosquito *Aedes vexans* y la mosca *Musca domestica*, no son vectores pero pueden transportarlo en su intestino hasta por 2.4 km (Straw *et al.* 2006; Cho *et al.* 2006).

Actualmente, el cerdo y el jabalí son los únicos animales que se sabe que experimentan infección natural por el virus de PRRS. Sin embargo, no hay ningún informe de la presentación de los signos clínicos de PRRS en jabalíes y no se ha encontrado fundamento de su papel potencial en la transmisión del virus a los cerdos domésticos (Albina 1997). En estudios realizados se reportó que pollos y patos silvestres, que fueron expuestos al virus de PRRS en el agua potable, eliminan el virus en sus heces, lo que sugiere que son susceptibles a la infección por el virus de PRRS (Snijder y Meulenberg 1998).

Respuesta inmune

Los primeros estudios inmunológicos de la interacción del virus de PRRS con los cerdos dieron la percepción de que el virus evade la respuesta inmunológica innata y adaptativa dando lugar a infecciones persistentes; y que su variación genética contribuye a la poca eficacia de la vacuna. Sin embargo, en la actualidad, estudios recientes han demostrado que esta situación no es del todo verdadera (Murtaugh y Genzow, 2011).

La resistencia inicial frente al virus de PRRS depende principalmente de la respuesta antiviral de las células infectadas con la presentación de la respuesta innata en los primeros días de infección antes de que se lleve a cabo el desarrollo de la respuesta adaptativa (Flores-Mendoza, 2010). Lo primero que se debe tomar en cuenta es que el virus de PRRS infecta macrófagos y células dendríticas, cuyas capacidades para secretar citoquinas inflamatorias e inmunomoduladoras y presentar antígenos a los linfocitos T,

son esenciales para la inducción efectiva de respuesta inmune adaptativa (Murtaugh y Genzow, 2011).

La respuesta innata está dada por las células del linaje de los leucocitos, como los macrófagos y las células asesinas naturales (NK, del inglés “natural killer”) y sus receptores tipo Toll (TLR, del inglés “toll like receptors”), así como los factores químicos que producen (Darwich *et al.*, 2010).

Al inicio de la respuesta inmune la producción de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos infectados favorece la atracción de leucocitos y disminuye la replicación viral, pero también ocasiona un aumento en la permeabilidad vascular que conlleva a edema pulmonar y constricción bronquial. Las citoquinas que se producen son: Interferon tipo 1 (IFN tipo 1), factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa), Interleucina-1(IL-1), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-12 (IL-12). En lo que respecta a las citoquinas que promueven la inflamación, las que se producen de forma regular durante una infección viral son el IFN- α , TNF- α e IL-1 β , sin embargo el virus de PRRS inhibe la expresión de RNA mensajero de estas citoquinas (Straw *et al.* 2006; Flores-Mendoza y Hernández 2010).

El IFN tipo I (alfa/beta) tiene la función de inducir la síntesis de una gran cantidad de proteínas antivirales que inhiben la replicación viral así como la inhibición de proteínas virales. Sin embargo, el virus de PRRS logra inhibir la expresión del IFN tipo I tanto *in vivo* como *in vitro* bloqueando la activación de factores transcripcionales ocasionando una baja producción de IFN Tipo 1 y de citoquinas proinflamatorias que comprometen el inicio de la respuesta inmune adquirida y predisponen a infecciones secundarias. Estudios recientes han demostrado que las NSP del virus: NSP1a, NSP1b, NSP2, NSP4 y NSP11 tienen una fuerte actividad inhibitoria en la producción de IFN, y se ha comprobado que la NSP1a inhibe el factor regulador de IFN 3 (IRF3) por medio de la activación del promotor de IFN-alfa y NSP1b inhibe IRF3 por medio de la fosforilación y translocación del RNA de doble

cadena. Por otra parte NSP1a y b inhiben la vía de señalización del IFN, lo que resulta en la inhibición de su síntesis y señalización (Straw *et al.* 2006; Darwich *et al.* 2010; Flores-Mendoza y Hernández 2010; Gómez-Laguna *et al.* 2010; Murtaugh y Genzow 2011). Diferentes cepas o aislamientos de campo varían en la capacidad para suprimir o mejorar la producción de interferón, alterando la respuesta inmune del huésped (Darwich *et al.* 2010; Murtaugh y Genzow 2011).

Los receptores tipo Toll (TLR) son los receptores de reconocimiento de patrones dirigido contra moléculas asociadas a patógenos que se han conservado evolutivamente. Varios TLRs incluyendo TLR3, TLR7/8 y TLR9 se encuentran involucrados en respuestas antivirales mediante la activación de la producción de citoquinas tales como interferones de tipo I (IFN).

Diversos estudios han comprobado que la participación del TLR3 durante la infección del virus de PRRS podría ayudar a controlar la infección, mientras que el TLR4 parece no tener ningún efecto en el virus. Por otra parte, se ha observado que el virus de PRRS interfiere en la expresión del TLR7 y TLR9 (Darwich *et al.*, 2010).

En cuanto a la respuesta humoral, después de la infección, la primera respuesta de anticuerpos detectable es contra la proteína N, sin embargo, no se considera importante desde el punto de vista inmunoprotector ya que los anticuerpos que produce no son neutralizantes, pero su abundante expresión y antigenicidad la vuelve ideal para pruebas diagnósticas. Estos anticuerpos podrían favorecer la diseminación del virus en los macrófagos, a través del incremento de la infección dependiente de anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés Antibody Dependent Enhancement) (Straw *et al.* 2006; Flores Mendoza y Hernández 2010; Chand *et al.* 2012).

Por el contrario, la respuesta de anticuerpos contra el principal componente de la superficie, el heterodímero GP5-M, es débil y retrasada, incluso puede no detectarse. El anticuerpo neutralizante, que también aparece de forma débil y tardía, sigue un patrón

similar. Curiosamente las proteínas no estructurales (NSP), tales como NSP2 producen una respuesta humoral fuerte, sin embargo NSP2 no es un componente del virión y es encontrado sólo durante la etapa de replicación. Esta es la principal razón por la que la respuesta de anticuerpos durante la infección se dirige principalmente contra las proteínas virales no asociadas a la neutralización del virus (Chand *et al.*, 2012).

La respuesta humoral está dada por Inmunoglobulinas M (IgM) específicas contra el virus de PRRS, las cuales aparecen de 5 a 7 días después de la infección, y por los anticuerpos IgG anti-PRRS, que son detectadas de 7 a 10 días después de la infección y disminuyen sus niveles alrededor del día 300 postinfección (Straw 2006; Flores Mendoza 2010). Sin embargo, Gómez-Laguna y colaboradores reportan que los anticuerpos neutralizantes aparecen en el suero aproximadamente tres semanas después de la infección y se mantienen por largos periodos, pero los títulos pueden variar debido a la respuesta individual de cada animal y a la cepa (Gómez-Laguna *et al.*, 2010). Chand y colaboradores presentan la Figura 6 en su artículo de revisión, el cual explica claramente la respuesta humoral que se logra ante la infección con el virus de PRRS (Chand *et al.*, 2012).

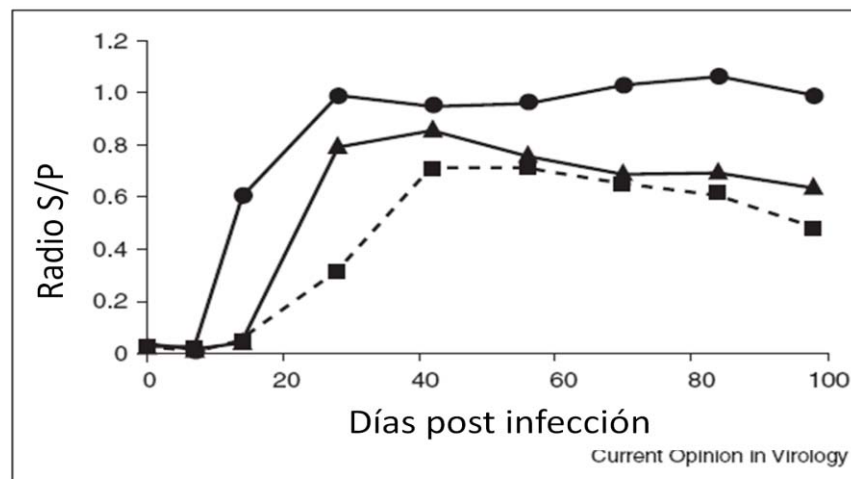


Figura 6. Respuesta de anticuerpos a las principales proteínas estructurales y no estructurales. Se midió la respuesta humoral por medio de ELISA en 10 cerdos en contra

de la proteína N (Círculos), la NSP2 (Triángulos) y el dímero GP5-M. Se muestra el promedio de los valores S/P (Tomada de Chand *et al.*, 2012).

Hasta el momento varios estudios muestran que la diferencia entre las cepas del virus puede afectar la cinética de la respuesta inmune humoral en cerdos infectados y que las mutaciones y deleciones en algunas regiones genómicas proporcionan propiedades inmuno-reguladoras a algunas cepas virales afectando la antigenicidad (Kim *et al.* 2007; Darwich *et al.* 2010). A pesar de ello, poco se sabe acerca de las variantes que se encuentran en México.

La respuesta celular está mediada por los linfocitos T CD8+ y T CD4+ de memoria, CD4+ cooperadoras y “natural killer” (NK). La respuesta celular con los linfocitos T específicos para el virus de PRRS se da de dos a ocho semanas después de la infección y se ha comprobado la respuesta de las células T hacia los productos de los ORFs 2, 4, 5, 6 y 7. La respuesta de linfocitos T ocurre generalmente después de la máxima concentración del virus en suero (Straw *et al.* 2006; Flores-Mendoza y Hernández 2010). El papel de la inmunidad celular en contra del virus de PRRS no se conoce por completo; por ejemplo, la replicación del virus de PRRS en órganos linfoides se asocia a la activación de células B policlonales produciendo hiperplasia linfoide (Lemke *et al.*, 2004). Es importante profundizar en el estudio de la respuesta celular ya que juega un papel relevante en la eliminación del virus debido a que la respuesta humoral no es capaz de eliminarlo completamente.

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se realiza tomando en cuenta los signos clínicos, como la falla reproductiva y los problemas respiratorios en cerdos de todas las edades, sin embargo la similitud entre estos signos clínicos con los causados por otros

patógenos y la falta de lesiones específicas ocasionadas por el virus, obligan a utilizar pruebas específicas para un diagnóstico definitivo (Truyen *et al.*, 2006).

El diagnóstico efectivo del virus de PRRS se basa principalmente en la detección de anticuerpos contra el virus (serología), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el aislamiento viral (Truyen *et al.* 2006; Doorselaere *et al.* 2010).

La serología ha sido una herramienta útil para determinar la prevalencia de PRRS en piaras infectadas como una base para implementar medidas de control. Actualmente se utilizan las técnicas: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”), inmunofluorescencia (IFA del inglés “immunofluorescence assay”) y seroneutralización del virus (VSN del inglés virus “seroneutralization”) como parte de las pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra el virus. Las primeras pruebas serológicas fueron realizadas a principios de los años 90 utilizando pruebas de inmunofluorescencia indirecta. En esos años se detectó que entre el 74% y el 84% de las piaras fueron seropositivas al virus de PRRS (Morilla *et al.*, 2003).

A partir del descubrimiento de la técnica de ELISA, se han hecho variaciones que llevan a diferentes tipos dependiendo lo que se requiera detectar, sin embargo, el principio es el mismo. Actualmente existen varios paquetes comerciales de ELISA para el diagnóstico de PRRS, como uno de ELISA indirecto (Hipra, Girona) y uno de bloqueo (Bio-Vet, Quebec), pero la mayoría de los laboratorios en México y a nivel internacional emplean la ELISA PRRS IDEXX, de la cual existen datos de sensibilidad del 100% y especificidad del 99%, donde un valor S/P de 0.4 indica que la población es positiva (Done, 2004).

La técnica de inmunofluorescencia (IFA) fue desarrollada por Coons y Kaplan, y más tarde por Mary Osborne y desde entonces ha sido ampliamente utilizado tanto en la investigación como en el diagnóstico clínico. Las aplicaciones incluyen la evaluación de células en suspensión o adheridas, perlas y microarreglos para la detección específica de proteínas. La técnica consiste en conjugar los anticuerpos químicamente a colorantes

fluorescente (isotiocianato de fluoresceína FITC, o tetrametil isotiocianato de rodamina TRITC). Estos anticuerpos marcados se unen (directa o indirectamente) al antígeno de interés que permite la detección de antígeno a través de técnicas de fluorescencia, la cual se puede cuantificar usando un citómetro de flujo, escáner matriz o microscopía confocal (Figura 7) (IHC Staining Methods, Fifth Edition).

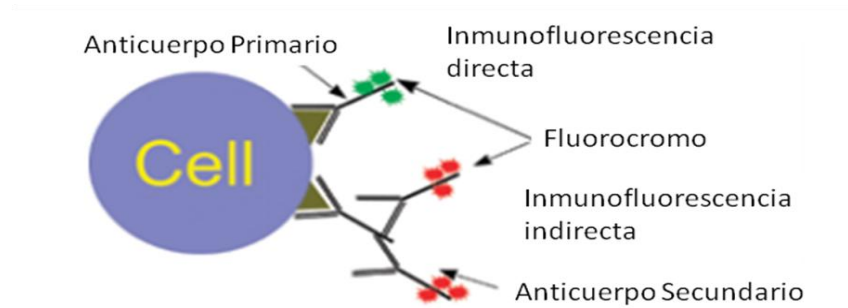


Figura 7. Representación esquemática de la IFA directa e indirecta (IHC Staining Methods, Fifth Edition).

La prueba de seroneutralización viral se define como la pérdida de la capacidad infectante del virus por la reacción de un anticuerpo, en otras palabras, se puede valorar la capacidad que tienen los anticuerpos presentes en un suero problema para neutralizar la actividad biológica de un antígeno. El procedimiento consiste en mezclar diluciones apropiadas de suero y virus, conociendo la concentración de uno de los dos e incubarlas en ciertas condiciones en un sistema susceptible donde el virus no neutralizado pueda producir un efecto reconocible como muerte, lesiones específicas, hemoaglutinación, efecto citopático, etc., detectándose entonces infectividad o neutralización. Debe definirse el punto final de infectividad, que consiste en la más alta dilución de suero o virus que protege o infecta una unidad de sistema susceptible (www.veterinaria.org). Esta prueba tiene como desventajas ser laboriosa, requerir cultivos celulares, esterilidad, además de necesitar mucho tiempo para su realización. Sin embargo, son altamente específicas y sensibles y se consideran las pruebas de referencia para cualquier valoración serológica. Raymond R. Rowland (2013) reporta el uso de la técnica de seroneutralización con el

objetivo de encontrar cerdos que produzcan anticuerpos neutralizantes capaces de responder a diferentes cepas del virus de PRRS. En ese estudio, 1200 muestras de suero de cerdos infectados experimentalmente se enfrentaron contra cuatro diferentes aislamientos virales y encontró que de manera general hay una correlación inversa entre la carga viral y el título homólogo de seroneutralización. En el estudio los sueros se clasifican en cuatro grupos dependiendo la respuesta a seroneutralización (Grupo 1 no se encontró seroneutralización; Grupo 2 respuesta homóloga sólo contra la cepa aislada utilizada para la infección; Grupo 3 respuesta heteróloga con reactividad frente a 1 o 2 cepas adicionales; y Grupo 4 con amplia respuesta de seroneutralización contra los cuatro aislamientos). Así mismo encontró que algunas muestras del Grupo 4 tenían la capacidad de neutralizar hasta 11 cepas diferentes. Además, los cerdos que produjeron sueros pertenecientes a ese grupo exhibieron un menor nivel de viremia, que persistió durante un período prolongado de tiempo, en comparación con los cerdos que producen sólo respuesta homóloga. (Rowland, 2013) Las variantes virales que se observan mediante el estudio son relevantes para la generación de vacunas basadas en el estudio de cepas capaces de producir anticuerpos neutralizantes que funcionen de forma heteróloga.

El aislamiento viral es la prueba de “oro” en el estudio de los agentes virales, es el mejor método para determinar si la infección es ocasionada por un agente determinado; el virus se puede aislar del pulmón, los ganglios linfáticos, las amígdalas, el suero o mediante cultivo de otros tejidos. (Done, 2004) Para la replicación de todos los arterivirus se observa especificidad restringida en cuanto a la célula huésped en los cultivos celulares. Para realizar el aislamiento viral, generalmente se utilizan macrófagos alveolares de pulmón (PAM), células de riñón de mono verde africano (MA-104) y sus derivados (CL2621 o MARC-145). Las cepas europeas del virus de PRRS tienen que ser adaptadas a las células CL2621 por pases múltiples (Snijder y Meulenberg 1998; Van Breedam *et al.* 2010; Darwich *et al.* 2010). La desventaja de esta técnica es que requiere mucho tiempo así como conocimiento y práctica en la técnica y no siempre se obtiene el resultado deseado

hasta después de varios pases en los que el virus debe adaptarse a las células (Wu *et al.*, 2014).

Por otra parte, una prueba diagnóstica que se base en la detección y el análisis del ADN podrá ofrecer una identificación más precisa del agente. (Manual OIE 2004) Las pruebas moleculares que actualmente se utilizan para la identificación del virus son la RT-PCR (por las siglas de transcriptasa reversa, reacción en cadena de la polimerasa), la PCR Tiempo Real (Real Time PCR), la secuenciación unida al análisis filogenético y el análisis del polimorfismo de longitud en fragmentos de restricción (RFLP). (Done 2004)

La técnica de PCR fue descrita por primera vez en 1971 por Kleppe y colaboradores, quienes describieron por primera vez un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de DNA con oligonucleótidos *in vitro*. (Kleppe *et al.*, 1971) Sin embargo, no recibió mucha atención y la invención se atribuye a Kary Mullis en 1983, quien ganó el Premio Nobel de química en 1993 por su trabajo en PCR. En la revista Scientific American, Mullis resumió el procedimiento: "Comenzando con una única molécula del material genético DNA, la PCR puede generar 100 billones de moléculas iguales en una tarde" (Mullis 1990; Rabinow 1996). En la prueba de RT-PCR el RNA viral se convierte en DNA complementario y luego es amplificado por la enzima Taq polimerasa. Esta prueba es una técnica rápida, con una elevada especificidad y sensibilidad que resulta de utilidad para la genotipificación y la detección del virus en el caso de muestras como semen ya que éste es tóxico para los sistemas de cultivo de tejidos. Sin embargo, la alta variación que presenta el virus de PRRS puede influenciar en los resultados obtenidos, por lo que se deben diseñar cuidadosamente los oligonucleótidos que se van a utilizar y dirigirlos a regiones conservadas (Doorselaere *et al.*, 2010). Cuando se realiza el diagnóstico con la técnica de RT-PCR es importante considerar que la agrupación de muestras en pools de hasta 10:1 puede proveer resultados comparables a pools de 5:1 en cuanto a nivel de detección y ayuda a reducir los costos de las pruebas (Polson *et al.*, 2010 a).

Las técnicas de RT-PCR en conjunto con RFLP, pueden indicar cambios en el genoma desde la pérdida de un par de bases hasta cambios en segmentos genómicos mayores (Done, 2004). La técnica de RT-PCR RFLP no solo es de utilidad para la identificación del virus, también se han desarrollado para la tipificación y la identificación entre cepas de campo y cepas provenientes de la vacuna comercial, y hasta hace unos años era la manera más utilizada para identificar las cepas del virus de PRRS (Hugh *et al.*, 2002).

La PCR Tiempo Real se caracteriza por detectar la hibridación con sondas fluorescentes después de la finalización de la reacción y tiene como ventaja reducir significativamente el tiempo de diagnóstico, así como mejorar la especificidad (Wu *et al.* 2014). Otra ventaja de la PCR Tiempo Real es que puede optimizarse para diferentes virus que puedan estar relacionados en un cuadro clínico y la prueba se nombra “múltiplex”. Wu y colaboradores (2014) diseñaron recientemente una prueba multiplex capaz de detectar de forma rápida y específica a cinco agentes distintos que pueden estar relacionados en la presentación de un cuadro clínico: circovirus porcino tipo 2 (PCV2), virus de PRRS tipo 2, virus de la pseudorrabia (PRV), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), parvovirus porcino tipo 1 (PPV1) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV). Los autores mencionan que ésta prueba es una herramienta de diagnóstico sensible para la detección de múltiples patógenos virales en cerdos y será útil para el diagnóstico, estudios epidemiológicos y de patogénesis, así como interacciones del virus con el hospedador y en coinfecciones (Wu *et al.*, 2014). La mayor desventaja que presenta es el costo, ya que requiere equipo específico capaz de detectar las sondas fluorescentes.

Por último, la secuenciación del genoma es la herramienta más adecuada para identificar si existen cambios de bases en la secuencia que pudieran estar asociados al cambio de antigenicidad entre cepas virales. Los marcos de lectura abiertos (ORFs) más estudiados en el virus de PRRS son el ORF 5 y ORF 7, sin embargo gracias al avance en la tecnología actualmente se cuenta con un gran banco de secuencias que incluyen secuencias del genoma viral completo (Done, 2004).

Como ya se revisó, las herramientas de diagnóstico para el virus de PRRS así como sus metodologías y aplicaciones continuaran evolucionando. En el año 2014 en el “North American PRRS Symposium”, la Universidad de Iowa reportó que el número de ensayos de PCR para el diagnóstico el virus de PRRS llevados a cabo de forma anual se ha incrementado en más del 300 por ciento desde 2009 hasta 2013, mientras las pruebas serológicas se han mantenido relativamente sin cambios. En el trabajo mencionan que el diagnóstico hacia el virus de PRRS cada vez se utiliza más como medicina preventiva y herramienta de monitoreo para determinar el estado de cerdos destetados, reemplazos de verracos y cerdas reproductoras y diagnóstico de sementales. Otro dato importante que mencionan es que el porcentaje de muestras positivas al virus de PRRS ha disminuido de 27% a 16% por medio del diagnóstico por PCR y de 37% a 18% por la técnica de ELISA en un periodo de 5 años. (Main *et al.*, 2013) Debemos seguir impulsando el diagnóstico del virus con nuevas tecnologías que reduzcan los costos y favorezcan el monitoreo del virus de PRRS para conocer el estatus de la enfermedad en nuestro país.

Control

Cuando los primeros brotes se observaron en EE.UU., diversas medidas de control se intentaron antes de que la vacuna estuviera disponible, pero ninguna fue particularmente eficaz. El Dr. Eric Nelson menciona que la mejor opción en ese momento era probablemente el aislamiento de las granjas y la buena bioseguridad; sin embargo, la exposición de las cerdas jóvenes al virus, así como aquellas que se encontraban en el primer tercio de gestación, reducían al menos los abortos asociados con la enfermedad en el final de la gestación (Comunicación personal Ph. D. Eric Nelson).

Actualmente, la prevención y el control de la enfermedad se basan en una serie de manejos en combinación con el uso de la vacuna, entre ellos se encuentran: la producción de cerdos destetados negativos al virus del PRRS y la eliminación del virus de los animales

reproductores, que han sido métodos utilizados exitosamente para el control del virus en las granjas, así como el cierre del hato, la vacunación masiva y el movimiento de animales sin la infección a áreas limpias (Polson *et al.*, 2010 b). En EE.UU. un grupo de veterinarios sugiere que se debe tener claro el objetivo, ya sea la erradicación o el control de la enfermedad en una granja y establecen que en ambos casos se debe enfocar en un modelo de cierre de granja con exposición de animales, con especial consideración el uso de vacunación de animales con vacunas distintas (Johnson y Cano, 2013).

Sin embargo, se encuentran dos problemas principales en el control de la enfermedad: la baja protección heteróloga que confieren las vacunas comerciales y la persistencia del virus en cerdos con presentación subclínica, la cual desempeña un papel importante en la supervivencia del virus y su transmisión, y supone un obstáculo importante en los programas de control de PRRS (Meng 2000).

Hay dos tipos de vacunas disponibles contra el virus de PRRS: las vacunas de virus vivos modificados (MLV por sus siglas en inglés “modified live virus”, también llamadas vacunas atenuadas) y vacunas de virus muerto (KV por sus siglas en inglés “killed virus”, también llamadas vacunas inactivadas). Las vacunas atenuadas son generadas por pases de cepas virales virulentas en cultivo celular hasta que aparezca un fenotipo atenuado del virus. Las vacunas inactivadas son generadas por inactivación química o física de la cepa virulenta del virus. Para el caso del virus de PRRS, ambos tipos de vacunas se desarrollan para los genotipos 1 y 2 (Karniychuk y Nauwynck, 2013). El desarrollo de vacunas y su aplicación se basa en principios inmunológicos de inmunidad innata y adaptativa enfocadas a estimular la producción de los interferones antivirales y las citoquinas movilizando las células presentadoras de antígeno y activando las células B y los linfocitos T (Murtaugh y Genzow, 2011).

De manera comercial, las vacunas inactivadas están autorizadas para su uso en las cerdas reproductoras ya que deben proporcionar protección sin causar efectos nocivos sobre la

reproducción. Sin embargo, las vacunas inactivadas no inducen anticuerpos neutralizantes contra el virus y no pueden prevenir la infección con cepas de campo, incluso utilizando cepas homólogas. En contraste, las vacunas atenuadas son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes del virus y prevenir su replicación en células blanco, la viremia y los signos clínicos, pero este resultado solo se observa si se utilizan cepas homólogas. Por otra parte, brotes del síndrome agudo, caracterizado por el aborto y la alta mortalidad en cerdas gestantes, se han descrito después de la vacunación con las vacunas de tipo MLV para el subgenotipo americano, se ha aislado la cepa vacunal de casos clínicos en campo y presenta la tendencia a transmitirse a poblaciones no vacunadas. Se menciona que esto se puede deber a que durante la transmisión entre cerdos, el virus de la vacuna puede revertir genéticamente (Karniychuk y Nauwynck, 2013). En el caso particular del virus de PRRS, la vacunación puede utilizarse por diferentes motivos: ante un nuevo brote, para reforzar la inmunidad de la piara que ya ha sido vacunada, para aclimatar a las cerdas de reemplazo y para inmunizar a los lechones.

Aunado a estos problemas y como se menciona con anterioridad, estudios realizados en los últimos años han mostrado evidencia que sugiere que la heterogeneidad del virus de PRRS afecta la eficiencia de la vacunación (Doorselaere *et al.* 2010; Kim *et al.* 2010). Datos experimentales demuestran que las vacunas solo son eficaces contra el virus cuando éstas y el virus presente en el animal tienen un alto grado de homología. Esta situación señala lo esencial de conocer las cepas del virus que circulan en una granja para escoger la vacuna adecuada para su control. La aparición de nuevos brotes en piaras que utilizan la vacuna comercial, son una prueba de la baja protección que confieren las vacunas en contra de cepas heterólogas (Meng 2000; Lunney y Chen 2010; Doorselaere *et al.* 2010; Karniychuk y Nauwynck 2013).

Como alternativas para el control del virus utilizando vacunas de nueva generación, se han investigado varios sistemas de expresión de antígenos para el virus de PRRS incluyendo bacterias, baculovirus, vacunas de DNA, adenovirus en busca de mejorar la respuesta

inmune y utilizarse como vacunas. Los genes que normalmente se utilizan en estos nuevos vectores son el M, el GP5 y el heterodímero que forman, así como las combinaciones de las glicoproteínas que participan en la producción de anticuerpos neutralizantes, GP3–GP5, GP4–GP5 y GP3–GP4–GP5. Además de los vectores usados para la expresión de las proteínas del virus de PRRS, recientemente se han utilizado las vacunas de DNA, las cuales están compuestas de un plásmido de DNA que codifica para alguna proteína o segmento génico de interés y la gran ventaja es que no son infecciosas, aunado a que son de fácil producción, bajo costo, estables al calor, etc. Las vacunas de DNA han demostrado inducir anticuerpos séricos y una fuerte respuesta de células T cooperadoras y citotóxicas contra varios antígenos. Para el caso de virus de PRRS, segmentos de todas las proteínas han sido probados. Los mejores resultados se han obtenido con NSP2 y GP4. Recientemente surgió una nueva estrategia en el desarrollo de vacunas, basada en la manipulación del genoma viral para introducir modificaciones específicas para crear virus mutantes genéticamente modificados: clonas infecciosas. El desarrollo de éstas se describe como la formación de DNA complementario a partir del virus, bajo el control de un promotor. Actualmente se han hecho evaluaciones con el ligando GP5-M y se han creado virus quiméricos entre cepas de referencia y cepas de campo altamente patogénicas con la NSP1 obteniendo resultados prometedores (Flores-Méndez y Hernandez, 2010).

Sin embargo, encontrar la vacuna ideal aun será un reto para los investigadores. El Ph. D. Murtaugh menciona que se deben tomar en cuenta tres limitaciones clave que incluyen el poco conocimiento que se tiene acerca de los objetivos virales que generan inmunidad protectora, lo cual ha impedido que la investigación se centre en las estructuras y las proteínas virales e interfiere en el diseño de nuevas vacunas; la incapacidad para establecer claras correlaciones inmunológicas de protección que requieren mejores modelos de infección en animales para la evaluación de la protección frente a una exposición; y por último y como ha sido mencionado, la gran diversidad genética del virus exige que los experimentos de exposición se interpreten cuidadosamente, ya que no es

posible predecir cómo la protección inmunológica contra un aislado se traducirá en la inmunidad de protección cruzada en términos generales (Murtaugh, 2013).

El otro principal problema a nivel poblacional para el éxito en el control y eliminación de la enfermedad es la persistencia del virus durante la vida del cerdo, cuya base incluye la evasión de la respuesta inmune innata y adaptativa (Chand *et al.* 2012). A pesar de que podría no considerarse una medida de control, reportes de campo indican que tras inducir la falla reproductiva en una cerda por medio de la infección con el virus de PRRS, las cerdas desarrollan una inmunidad protectora. Estas observaciones se basan en el hecho de que las cerdas afectadas tienen una camada normal después en su siguiente parto a pesar de la aparente circulación del virus dentro de la piara. Por lo tanto, se podría aprovechar la persistencia del virus en los animales para mantener la enfermedad controlada y evitar rebrotes. Sin embargo esta situación se complica ya que, como se mencionó anteriormente, no todos los cerdos se infectan en el mismo momento durante un brote, siempre habrá cerdos centinelas que propiciarán estos rebrotes dentro de las granjas; así mismo puede entrar a la piara una variante viral diferente que cause un nuevo brote. (Karniychuk y Nauwynck 2013).

Los modelos epidemiológicos pueden ayudar a mejorar el control de patógenos a través de la evaluación de la eficacia de medidas de control en varias escalas ya que los movimientos de animales son una cuestión clave para la propagación de patógenos (Bellok *et al.* 2010).

Recientemente, con la ayuda de nueva tecnología las tendencias de investigación se han dirigido hacia encontrar los genes relacionados con la resistencia a enfermedades. En la actualidad el genoma de cerdo casi se ha completado (98%) lo cual ha permitido que el uso de nuevas tecnologías como mapeo general del genoma utilizando chips de SNPs, microarreglos, y secuenciación de siguiente generación (RNA-seq) para la expresión de genes, ahora se puede determinar qué genes o regiones genómicas están relacionados a

la salud de los cerdos, a la respuesta a las vacunas o la resistencia específica a agentes infecciosos. Los resultados de estos estudios deben proporcionar a los productores un conjunto de marcadores de DNA y biomarcadores de proteínas para identificar cerdos que requieren menos tratamientos terapéuticos y que exhiben mejor resistencia contra patógenos específicos (Lunney y Chen, 2010).

A pesar de que no se ha logrado erradicar el virus de PRRS, cabe señalar que el agente causal se identificó hace tan sólo 20 años. En comparación, el virus de la pseudorabia (PRV) fue descubierto en cerdos en 1909 logrando casi completamente su erradicación en el año 2005, el virus de la fiebre porcina clásica (FPC/cólera del cerdo) se reportó por primera vez en 1810 y su erradicación fue casi completada en los EE. UU. entre 1962 y 1976 y la brucelosis se identificó en 1887 y se está logrando su erradicación hasta ahora. En estos casos, entre 100 a 200 años pasaron antes de que se lograra la erradicación después de que los agentes causales fueran identificados (Genzow *et al.*, 2006).

Los esfuerzos coordinados para controlar o eliminar el virus de PRRS se están volviendo más frecuentes en todo el mundo. En los EE.UU., el control del virus de PRRS comenzó en el año 2004 por la USDA, a través de las coordinaciones de Programas de Agricultura diseñado para utilizar "el talento colectivo de los interesados de la comunidad de científicos, médicos veterinarios, productores de carne de cerdo y sus aliados investigadores de la industria para desarrollar estrategias innovadoras que reduzcan impacto de PRRS y conducir a la erradicación del virus." Uno de sus principales objetivos es la investigación sobre vacunas que sean efectivas contra una amplia variedad de cepas del virus de PRRS así como el desarrollo de técnicas que puedan diferenciar las vacunas de las cepas de campo (Genzow *et al.*, 2006).

En México, el programa para el control y la erradicación del virus de PRRS comenzó en el año 2012 con el apoyo del Gobierno federal a través del SENASICA. Gracias a su apoyo se ha destinado un presupuesto de aproximadamente \$ 4.5 millones de pesos para la

vigilancia epidemiológica, el diagnóstico y la capacitación de los profesionales vinculados con la producción porcícola nacional. El programa inició en los estados de Sonora y Yucatán donde se han muestreado aproximadamente 250 granjas para determinar la prevalencia de la enfermedad en México. Así mismo, se creó un manual para la toma y envío de las muestras, una guía rápida para el diagnóstico de la enfermedad y el desarrollo de las pruebas diagnósticas ELISA y PCR en colaboración con el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la FMVZ UNAM (Heneidi, 2014).

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

JUSTIFICACIÓN

Impacto económico....Diversos estudios muestran que la variación entre las cepas del virus puede afectar la cinética de la respuesta inmune humoral en cerdos infectados y provocar un cambio en la antigenicidad del virus. A pesar de ello, poco se sabe acerca de las variantes que se encuentran en México.

HIPÓTESIS

La variación genética del arterivirus porcino (PRRS) ha dado lugar a nuevas cepas virales que son variantes antigénicas endémicas en México, las cuales pueden complicar el diagnóstico y control.

OBJETIVOS

General

Buscar cepas presentes en regiones de producción porcina de México evaluar su relación antigénica.

Particulares

- 1.- Detectar el virus de PRRS en muestras provenientes de regiones productoras de cerdos de la República Mexicana.
- 2.- Identificar la variabilidad de los aislamientos por medio de secuenciación.
- 3.- Identificar la relación antigénica que presentan los aislamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

El muestreo se llevó a cabo durante los años 2012 y 2013 en diferentes áreas de México en las que el virus de PRRS es prevalente, los estados de donde se obtuvieron muestras son: Sonora, Coahuila, Jalisco, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, Tlaxcala, Veracruz y Morelos. Se colectaron muestras para determinar la presencia de virus en: sistema respiratorio superior (hisopo nasal), pulmón (de cerdos muertos) y suero de animales con signos clínicos sugestivos de enfermedad reproductiva o respiratoria. Las muestras se clasificaron de acuerdo al estado de procedencia (Anexo 1) y se procesaron en el Laboratorio de Diagnóstico e Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC) en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En total, 141 muestras fueron obtenidas, a partir de las cuales se realizaron “pools” de hasta 5 muestras dejando un total de 126 muestras procesadas (Anexo 2).

Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó siguiendo dos métodos dependiendo del tipo de muestra: para todo tipo de tejidos y órganos se utilizó la técnica de fenol cloroformo, descrita por Gibco Life Technologies (1996); para muestras líquidas (sueros e hisopos) se utilizó el kit QIAmp MinElute Virus Spin Kit (Quiagen Cat. 57704), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Extracción con fenol cloroformo: se colocó 300 µl de la muestra en un tubo eppendorf de 1.5 ml (Axygen Microtubes 1.5 ml MCT-15-C), se adicionó 700 µl de fenol cloroformo (BioTecMol RNA GT Cat. RP-200, Lot PO113) y se homogenizó. Se incubó 15 minutos a 4 °C. Se agregaron 200 µl de cloroformo (J T Baker 9180-02) y se agitó en vortex (Zx³ VELP

Scientífica P20240136) durante 15 s. Se dejó incubar a 4 °C por 15 m. Posteriormente se centrifugó a 12 000 g durante 15 m a 4 °C, se tomó la porción acuosa que permanece en la parte superior y se colocó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregó la misma cantidad de isopropanol al 100% (Alcohol Isopropílico, Meyer Cat. 0405) en una proporción 1:1 y se dejó incubar a 4 °C durante 12 h o durante la noche para favorecer la precipitación del RNA. Se centrifugó a 12 000 g (Centrífuga Biofuge Pico Heraeus) durante 10 m a 4 °C. Se decantó y lavó la pastilla con 200 µl de etanol al 70% (J T Baker Alcohol etílico Desnaturalizado 40 B Cat. 9014-02). Se centrifugó a 12 000 g a 4 °C por 10 m. Finalmente se decantó y se dejó secar completamente la pastilla por evaporación y se resuspendió en 30 µl H₂O DEPC y almacenar a -20 °C hasta su uso.

Extracción con el kit QIAmp: Se colocaron 500 µl de muestra en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 300 µl de buffer de lisis y se mezcló en vortex. Se agregaron 300 µl de etanol al 70% y se pasó todo a una columna. Se ensambló en colector y se centrifugó a 10 000 g durante 15 s. (Termo Scientific Heraeus Fresco 17 Centrifuge No. 41461689). Se desechó el colector y se ensambló en uno nuevo; se agregaron 700 µl de solución RW1 a la columna y se centrifugó a 10 000 g por 15 s. Se cambió el colector y se agregaron 500 de solución RPE, se centrifugó a 10 000 g por 15 s. Se desechó el colector y se ensambló uno nuevo, se le agregaron 500 µl de solución RPE a la columna y se centrifugó 2 m a 10 000 g. Se tiró el colector y se verificó que la columna estuviera seca. Se ensambló en tubo eppendorf de 1.5 ml y se le agregaron 25 µl de agua libre de RNAsas y se centrifugó a 10 000 g durante 1 m. Finalmente se repitió el último paso, se desechó columna y se guardó el eppendorf con la extracción a -20 °C hasta su uso.

RT-PCR

Se diseñaron distintos oligonucleótidos específicos en ClonManager versión 7.0 (Anexo 3) y se evaluó cada uno de ellos en el programa PRIMER. La especificidad de la prueba se

verificó por medio del programa BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para asegurar que los oligonucleótidos solo se alinean a secuencias de virus de PRRS (Anexo 4). La tabla 1 muestra las características de los oligonucleótidos diseñados.

Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados para los ORFs 5 y 7 del virus de PRRS.

ORF	Posición	Temperatura de alineación	Secuencia	No bases	Tamaño
7F	14684	60	TAG GCC GCA AGT ACA TTC	18	688
7R	15372	60	CAA TCA GTG CCA TTC ACC	18	
5F	13711	56	GAC ACC TGA GAC CAT GAG	18	
5R	14466	56	ATC ATC ACT GGC GTG TAG	18	

La reacción de PCR se realizó con el kit OneStep RT-PCR de QIAGEN® (Qiagen OneStep RT-PCR Kit Cat. 210212), siguiendo las instrucciones del fabricante, optimizando los reactivos a un volumen final de 15 µl: 3 µl de buffer 5x, 0.6 µl de Dntps, 0.6 µl de oligonucleótido forward, 0.6 µl de oligonucleótido reverse, 0.6 µl de enzima Taq, 0.3 µl de inhibidor (Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor Cat. E00381), 6.3 µl de H₂O libre de RNAsas y finalmente 3 µl de extracción de RNA de la muestra.

Las temperaturas utilizadas para la PCR son: un ciclo de 50 °C durante 30 m, un ciclo de 95 °C durante 15 m, 40 ciclos de: 94 °C durante 30 s, 54-58 °C durante 60 s (dependiendo de los oligonucleótidos, ORF 5 y ORF 7 respectivamente), 72 °C durante 60 s y un ciclo final de 72 °C durante 10 m dejando la muestra a 4 °C indefinidamente.

Los amplicones obtenidos por RT-PCR como controles positivos, utilizando la vacuna para la cepa Americana, muestran un único amplicón del tamaño esperado para la ORF 5 (562 pb). Para ORF 7, el tamaño del amplicón obtenido es de 370 pb (Figura 8).

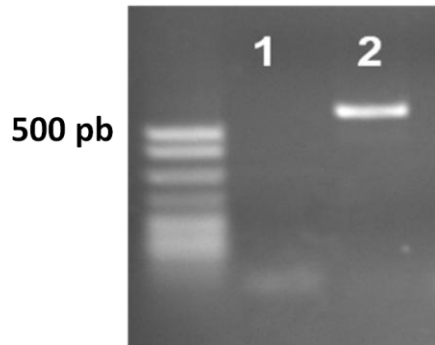


Figura 8. Los oligonucleótidos diseñados para este estudio no muestran reacción cruzada utilizando los controles. (1) Oligonucleótidos para ORF 5 control negativo. (2) Oligonucleótidos para ORF 5 cepa americana con muestra de control americano.

Gel de Electroforesis

Una vez obtenido el producto de la RT-PCR, se colocaron 5 μ l del producto con 2 μ l de buffer de muestra (Thermo Scientific 6x DNA Loading Dye 1 mL Cat. RO611) en un gel de agarosa (Bioline agarose Cat. AG 5-112 D) al 2% (40 ml de TAE 1X y .8 g de agarosa) y se corrieron a 90 voltios (Fuente de poder Bio Rad Power Pac Basic) en una cámara de electroforesis horizontal (Galileo Bioscience 80-0708) por 50 m. Se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Cat. E1510) y se visualizaron en un transiluminador Bio Imaging Systems utilizando un sistema de imágenes "Kodak Gel Lógic 112". Para identificar los amplicones esperados se utilizó el marcador de peso molecular "markers pUC Mix 8[®]". Se utilizó la vacuna PRRS MLV Igelvac[®] como control positivo de las cepas americanas.

Cultivo Celular

El primer aislamiento viral, así como los primeros pases se realizaron en células MA-104 procedentes del DMZC. Las células MA-104 son células adherentes provenientes del epitelio de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). (www.atcc.com) Posteriormente el MC. Atalo Martínez Lara, del INIFAP, realizó la donación de células MARC-145, las cuales son subclonas de las células MA-104 (Cafruny 2006; Provost 2012), para la realización del presente proyecto.

Se descongeló la línea celular a 4 °C y se centrifugó a 1500 G por 5 m en una microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415 R). Posteriormente se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco DMEM 1X Cat. 11995-065) con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco FSB Cat. 16000-044) y adicionado con 1000 UI de Penicilina/Estreptomicina (Life Technologies Cat. 15140-122); dentro de un gabinete de bioseguridad nivel II (Nuair: UN-425400) y se colocó en una botella de 25 cm² (Sarstedt Cat. 83.1810) con 4 ml de medio de crecimiento a temperatura ambiente. Se colocó en una incubadora de CO₂ (NUAIRE US Autoflow automatic CO₂ incubator: UN-4750) con una atmósfera de CO₂ al 5%, a una temperatura de 37 °C y se incubó 72 h hasta obtener una monocapa confluyente del 80 al 100%. Se decantó el medio y se agregó 0.5 ml PBS para retirar células muertas y detritus celular, se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 m, se decantó la solución, se adicionó 0.5 ml de tripsina (Life Technologies TrypLE™ Express Enzyme (1X), phenol red Cat.12605036) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de promover el desprendimiento de la monocapa. Finalmente se le agregó 3 ml de medio de crecimiento y se mezcló vigorosamente con la pipeta serológica para separar por completo las células y se dejó un ml en la botella original y se colocó un ml en dos botellas nuevas de 25 cm². Esas botellas a su vez se incubaron 72 h en el medio de mantenimiento DMEM al 10% de SFB, y se pasaron de la misma manera en botellas de 75 cm² o 175 cm² (Starstedt T75 y T175 Cat. 83.1811, 83.1812) con un volumen final de de 15 ml y 25 ml por botella respectivamente

para obtener un “stock de células” que fueron utilizadas para la propagación de los virus. (Payment y Trudel, 1993) Se mantuvieron a -70 °C en crioviales, en medio de congelación preparado con DMSO al 10% (Dimethyl sulfoxide ATCC Cat. No. 4-X-5) en SFB.

Aislamiento Viral

Para el aislamiento inicial se llevó a cabo la maceración de muestras positivas conservadas en congelación mediante la colocación de una parte de la muestra con nueve partes de medio libre de suero en una licuadora estéril. Posteriormente se centrifugó a 1500 g para separar el sobrenadante, el cual se filtró a través de prefiltros (Millipex GP Cat. SLGPO33RB) de membrana de 1.2, 0.8, 0.65, 0.45 y 0.22 micras. Previamente se prepararon botellas de cultivo 25 cm² con células MA-104 para el inóculo así como un control de células. Se decantó el medio filtrado sobre las células con un crecimiento en monocapa de 24 horas. El inóculo fue depositado en cantidad suficiente para cubrir la monocapa de células y se dejó incubar 1 h. Después de este tiempo, se decantó y se agregó medio sin SFB. La botella fue identificada con el número de muestra y la fecha de la infección. Se dejó incubar 72 h o hasta observar efecto citopático. Posteriormente se congeló a -20 durante 2 h para promover el rompimiento celular y la liberación del virus. Se descongeló y se colocó en un tubo de 15 ml (Starstedt Cat. 62.554.502); se centrifugó a 1500 G durante 5 m a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante en alícuotas de 1 ml en crioviales que se conservaron a -70 °C.

En total se seleccionaron 6 aislamientos virales: G2, G3, G6, A4, A16 y VR2332. Con estos aislamientos virales se realizaron los sueros hiperinmunes.

Sueros Hiperinmunes

La aprobación ética fue concedida por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación (CICUAE) siguiendo las leyes federales: Normas Oficiales Mexicanas NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Para la producción de sueros hiperinmunes, los primeros aislamientos virales se colocaron en una caja de petri durante 30 m a 5-10 cm de distancia de la luz UV para inactivarlos. (Zhoua *et al.* 2009) Posteriormente se cuantificaron las proteínas por el método "Lowry", y se estandarizaron los inóculos a 1 mg de proteína/ml utilizando PBS estéril.

Se inocularon dos conejos (procedentes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano CEIEPAA, Tequisquiapan, Querétaro) con cada aislamiento en una proporción 1:1 con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Cat. F 5506) y se repitió el proceso de inoculación cada 15 días durante ocho semanas. Posterior a la última inoculación se tomó una muestra de suero y se realizó una prueba de ELISA para comprobar la presencia de anticuerpos. Finalmente se realizó la eutanasia de los animales al finalizar el sangrado en blanco por medio de punción intracardiaca obteniendo aproximadamente 50 ml de suero por conejo (Kim *et al.*, 1993).

LOWRY (determinación de concentraciones proteicas por el método de hidrólisis ácida)

Los reactivos que se utilizaron fueron: reactivo de formación de complejo (preparado inmediatamente antes de usarse, mezclando las soluciones A, B y C en proporción 100:1:1 respectivamente), solución A: 2% Na₂CO₃ (JT Baker Carbonato de Sodio, DILUT-IT® 0.1N, Cat. 497-19-8) en agua destilada, solución B: 1% de sulfato de cobre (JT Baker Cat. 7758-98-7) en agua destilada, solución C: 2% Tartrato de Sodio y Potasio (JT Baker Cat. 3262-50) en agua destilada, solución de hidróxido de sodio 2N (JT Baker PI563302), reactivo de Folín 21N (HYCEL Cat. 41-2790-500). Así mismo se prepararon los estándares utilizando una solución madre de proteína estándar (fracción V de albúmina de suero bovino)

conteniendo 4 mg/ml de proteína en agua destilada, almacenada a -20°C y se prepararon diluyendo la solución madre con agua destilada tal como se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Preparación de estándares de proteína para la técnica de Lowry.

Solución madre (µl)	0	1.25	2.50	6.25	12.50	25.00	62.50	125.0	250.0
Agua (µl)	500	499	498	494	488	475	438	475	250
Concentración de proteína (µg/ml)	0	10	20	50	100	200	500	1000	2000

El procedimiento se inició adicionando 0.1 ml de sol de hidróxido de sodio 2N a 0.1 ml de muestra o solución estándar. Se calentó a 100 °C durante 10 m a baño maría (Lumistel^{MR} IHE-IOL) para hidrolizar la muestra. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se le agregó 1 ml del reactivo de formación de complejo recién preparado y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se le adicionó 0.1 ml de reactivo de Fólín, se agitó en vortex y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 m. Se leyó la absorbancia a 550 nm en un lector de ELISA (Biotek Epoch SN242118). A partir de los resultados se trazó una curva estándar de absorbancia como función de concentración inicial de proteína y se usó para determinar el contenido de proteína (µg) en la muestra.

ELISA

Se realizó una estandarización de la prueba ELISA utilizando como antígeno el sobrenadante del aislamiento viral de la cepa A4 y el sobrenadante de células MA104. Para sensibilizar la placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Thermo Scientific Cat. 439454) el aislamiento A4 y el sobrenadante de células MA104 se centrifugaron a 3

500 G (Thero Scientific Sorvall ST40R) durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se sensibilizó la placa con 1 µg de ambos sobrenadantes (media placa para cada uno: A4 y Sobrenadante de células) por pozo, diluido en buffer de carbonatos para ELISA (MICO₃, pH 9.6 Anexo 5) en un volumen total de 100 µl por pozo y se dejó incubar durante la noche a 4 °C. Se realizó un lavado de las placas, el cual consiste en tres lavados con 215 µl de PBS-Tween (Anexos 6 y 7) en un lavador de placas Biotek ELx405 y se bloqueó con 200 µl de PBS-albúmina (PBS-BSA 1%) (Anexo 8) una hora a 37 °C (Sheldon Manufacturing INC, General Purpose Incubator). Se realizó un segundo lavado, se colocan por duplicado 100 µl del suero sospechoso a una dilución 1:100 en PBS-BSA 1% y se dejó incubar 1 hora a 37 °C. Se agregaron 100 µl de conjugado (Anticuerpo goat anti-rabbit IgG HtL 8HRP Zymed, Invitrogen Cat. AZ4537) a una concentración 1:10 000 en PBS-BSA 1% y se incubó una hora a 37 °C. Se lavó y se agregó el sustrato (TMB Sigma Cat. T0440), el cual se dejó 2 minutos y se detuvo la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico (J.T. Baker Cat. PI564102). Finalmente se determinaron los valores de densidad óptica en un lector de ELISA (Biotek Epoch SN242118).

Seroneutralización

Para realizar la seroneutralización, los virus fueron nuevamente aislados a partir del aislamiento antes mencionado, llevando a cabo el siguiente procedimiento: primera inoculación en placas de 24 pozos previamente preparadas con monocapa de células MA-104 con 24 h de crecimiento confluentes al 80% realizando diluciones seriales 1:10 en inoculaciones dobles. Iniciando con 200 µl de aislamiento viral en 1.800 ml de DMEM 2% SFB adicionado con 1000 UI de Penicilina/Estreptomina. Se incubó a 37°C por cuatro días en una atmosfera con 5% de CO₂. Se evaluó la presencia de efecto citopático y se congelaron a -20 °C por dos horas, se descongelaron y se guardó el sobrenadante, el cual

se centrifugó a 1500 G durante 5 m a temperatura ambiente y se separó en alícuotas de un ml. El botón celular se utilizó para realizar PCR para confirmar la presencia del virus.

Posteriormente se realizó un primer pase en una segunda placa de 24 pozos con monocapa confluyente al 80% de células MA-104 a partir de la alícuota correspondiente a la dilución 1:10 de la placa anterior, siguiendo el mismo protocolo de infección. Se realizó el segundo pase a botella de 25 cm² previamente preparada con monocapa confluyente al 80% de células MARC-145 (obtenidas hasta esta etapa) siguiendo el mismo protocolo de infección. Para la propagación del virus se realizaron varios pases en botellas de 75 cm² con medio de mantenimiento al 2% SFB adicionado con 1000 UI de Penicilina/Estreptomicina y se dejaron incubar 72 h o hasta observar presencia de efecto citopático. Se repitió éste proceso varias veces hasta obtener un título viral adecuado.

A partir de estos sobrenadantes se realiza la titulación viral en placas de 96 pozos (Starstedt 96 well Tissue cultura plate flat bottom lid, 83.1835) preparados previamente con monocapa confluyente al 80% de células MARC-145. Por cuadruplicado se realizan las diluciones seriales (décuples) en medio de mantenimiento con 2% de SFB iniciando con 1:10 hasta 10 diluciones dejando dos filas como control de células. Las placas se incubaron hasta la observación de efecto citopático a las 72 horas y se calculó el título con la fórmula de Spearman Karber y se expreso en TCID₅₀. (TCID₅₀ calculator© Marco Binder, Dept. Infectious Diseases, Molecular Virology, Heidelberg University)

Se centrifugó el suero hiperinmune a 1.500 G durante 10 m (Eppendorf Centrifuge 5416) y se inactivó a 56° C durante 30 minutos en un baño de María (Lumistel^{MR} IHE-IOL). Se colocan en una placa de 96 pozos 150 µl de medio de mantenimiento (DMEM 2% SFB 1000 UI penicilina/estreptomicina) en la segunda fila, y 100 µl en el resto de la placa; la primera fila se utilizó como control positivo del virus. A la segunda fila se le agregan 50 µl del suero hiperinmune. Se mezcla y se realizan diluciones dobles seriales (iniciando con una dilución 1:4) pasando 100 µl a la siguiente fila y así sucesivamente hasta llegar a la

decima fila. Se agregan 100 μ l del virus a una concentración ajustada a 2000 TCID₅₀/ml (dosis infectiva de cultivo celular 50%) diluyendo el virus inicial en DMEM SFB 2%. Se incubó 2 horas a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂ y se transfirió todo el contenido de la placa (200 μ l/pozo) a una placa de cultivo de 96 pozos previamente preparada con monocapa confluyente al 80% de células MARC 145. Se incubó por 96 horas y se examinó la presencia de efecto citopático (ECP) en un microscopio invertido (Nikon TMS 301118). La Figura 9 esquematiza el procedimiento.

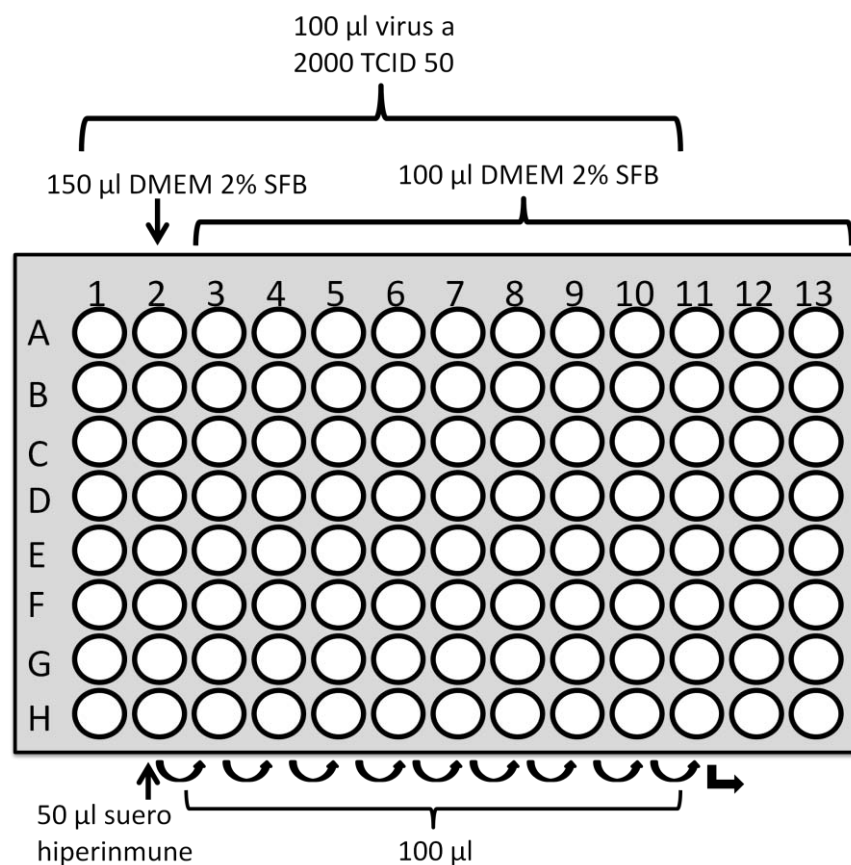


Figura 9. Esquematización del procedimiento de Seroneutralización.

La seroneutralización se realizó de manera homóloga y cruzada entre todos los aislamientos virales.

Relación Antigénica

Los valores de relación antigénica (R) se calcularon para cada par de cepas del virus de PRRS de acuerdo con Archetti y Horsfall (1950) (Archetti y Horsfall, 1950). Los títulos de cada suero fueron usados para establecer los valores de r1 y r2.

Donde:

$r_1 = \text{título heterólogo \#2} / \text{título homólogo \#1}$.

$r_2 = \text{título heterólogo \#1} / \text{título homólogo \#2}$.

$R = \sqrt{r_1 \times r_2}$

Debido a que la relación R es la media geométrica de la dos relaciones obtenidas con los virus heterólogos y los sueros homólogos (r1 y r2), produce un valor que iguala las diferencias encontradas hacia ambos lados; por lo tanto es innecesario asumir que las diferencias antigénica deben ser recíprocas. Como es evidente, un título homólogo es aquel que por definición presenta una relación de uno en todos los casos. Un valor de 1 indica que están relacionados antigénicamente mientras más se alejen de este valor, menor será su relación antigénica (Archetti y Horsfall 1950).

Inmunofluorescencia (IFA)

Para comprobar la infección de las células así como el efecto de neutralización, se utilizó un anticuerpo comercial marcado con fluoresceína de Rural Technologies (SDOW-F Cat. 1009282), dirigido hacia la proteína N del virus de PRRS.

El procedimiento que se utilizó es el siguiente: se lavó la placa de 98 pozos tres veces con 100 µl de PBS estéril, se fijó con 50 µl de acetona al 80% (Sigma-Aldrich Cat. 650501). Se realizó un bloqueo con 200 µl de PBS-BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se

decantó y se agregaron 30 μ l del anticuerpo fluorescente en una dilución 1:10 en PBS SFB 5%. Se dejó incubar 1 h a 37 °C y finalmente se decantó y se lavó tres veces con 100 μ l de PBS a 4 °C dejando 50 μ l para observar la placa en el microscopio.

Se utilizó un microscopio Life Technologies EVOS FL (Cat.11212-1626-043) para la evaluación de la IFA.

Secuenciación

Se realizó la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa utilizando el kit comercial QIAquick gel extraction kit (Qiagen Cat. 28706). Se cortó el fragmento amplificado a partir del gel de agarosa con una navaja de bisturí, se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 μ l y se pesó en un balanza analítica (OHAUS Explorer E16120). Se calculó el volumen a adicionar de Buffer QG: (100 mg \sim 100 μ l), se adicionó 3 volúmenes de Buffer QG, se incubó a 50°C por 10 m en baño de María hasta que se disolvió completamente. Posteriormente se adicionó 500 μ l de isopropanol y se mezcló por pipeteo. La mezcla se colocó en una columna QIAquick spin, ensamblada en un tubo colector de 2 ml, se centrifugó 1 m a 8000 g, se decantó el sobrenadante y se repitió el proceso hasta terminar la mezcla, se adicionó 500 μ l de Buffer QG y se centrifugó 1 m a 8000 g, se desechó el tubo colector con el sobrenadante y se ensambló en un tubo nuevo, se adicionó 750 μ l de Buffer PE y se centrifugó 1 m a 8000 g, se volvió a centrifugar por 1 m a 13,000 g y remover los residuos del buffer de lavado. Se desechó el tubo colector y se ensambló la columna en un tubo limpio de 1.5 ml, se eluyó el DNA adicionando 20 μ l de agua de grado molecular, en dos repeticiones de 10 μ l centrifugadas a 8000 g por 1 m. Por último, se evaluó la integridad del fragmento purificado por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Se visualizaron mediante luz ultravioleta antes de enviar el producto purificado al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM donde se secuenció.

Análisis filogenético

Las secuencias resultantes se compararon con otras secuencias en el GenBank para la reconstrucción filogenética. Las secuencias de referencia fueron la cepa Americana VR2332 (virus completo GenBank número de acceso EF536003.1 VR2332) y la cepa de referencia europea Lelystad (virus completo GenBank número de acceso Lelystad M96262.2). La inclusión de las secuencias virales registradas en México y en otras partes del mundo puede ayudar a determinar si estos aislamientos porcinos comparten un origen ancestral común con virus de otros países.

El análisis de alineación de cada gen se realizó en el programa ClonManager Suite 7 con el algoritmo global de DNA y después de localizar el codón de inicio se convirtieron a aminoácidos para evaluar los cambios que pudieran ser ocasionados por las mutaciones.

En el caso de los árboles filogenéticos, las secuencias de cada gen se alinearon progresivamente online con el uso de MAFFT V.7 (programa de alineamiento múltiple para secuencias de aminoácidos o nucleótidos) (Kazutaka et al., 2002).

Para dilucidar las relaciones filogenéticas entre los genomas virales secuenciados, se utilizó el análisis JModelTest (Posadas D., 2008) junto con el criterio de máxima verosimilitud (ML). El algoritmo se aplicó a cada conjunto de secuencias para determinar el mejor modelo de sustitución, junto con una prueba filogenética bootstrap de 1000 repeticiones para proporcionar apoyo estadístico en cada rama generada. Solo los valores de bootstrap mayores o iguales a 0.80 (80%) se consideraron relevantes.

RESULTADOS

RT- PCR

De las 126 muestras procesadas, 73 fueron detectadas positivas por la técnica de RT-PCR con al menos uno de los oligonucleótidos utilizados, lo que corresponde al 57.93%. Es decir hay 16 muestras positivas a ORF5, que no corresponden a las 57 reportadas como positivas hacia ORF7. Los resultados detallados se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Resultados positivos para PRRS utilizando cada oligonucleótido en un total de 126 muestras.

	ORF 5	Porcentaje	ORF 7	Porcentaje
Muestras procesadas	83	100%	126	100%
Positivas	31	32.20%	57	45.24%
Negativas	52	53.20%	69	54.76%

Sin embargo, debido a que el ORF 7 es una región conservada y en estudios anteriores ha demostrado mayor sensibilidad para detectar muestras positivas (Sotomayor 2011 Tesis), no todas las muestras fueron corridas con ambos pares de oligonucleótidos. El cuadro 4 muestra los resultados de las 83 muestras que fueron corridas con ambos oligonucleótidos, sin embargo, se debe tomar en cuenta que no todas las muestras que fueron positivas con ORF 5 fueron positivas con ORF 7 y viceversa. Los resultados individuales por muestra se pueden observar en el Anexo 2.

Cuadro 4. Muestras procesadas con ambos pares de oligonucleótidos (ORF 5 y ORF 7).

	No. de muestras	Porcentaje
Muestras Procesadas	83	100%
Ambas positivas	15	18.07%
Positiva solo ORF 5	16	19.28%
Positiva solo ORF 7	26	31.33%
Ambas negativas	26	31.33%

De acuerdo al tipo de muestra utilizada podemos observar que se encuentra mayor positividad al virus de PRRS en muestras de suero en comparación con muestras de hisopo Nasal (Anexo 2). Las muestras de pulmón muestran un 100% de muestras positivas, sin embargo es un número muy bajo de muestras totales procesadas. (Figura 10)

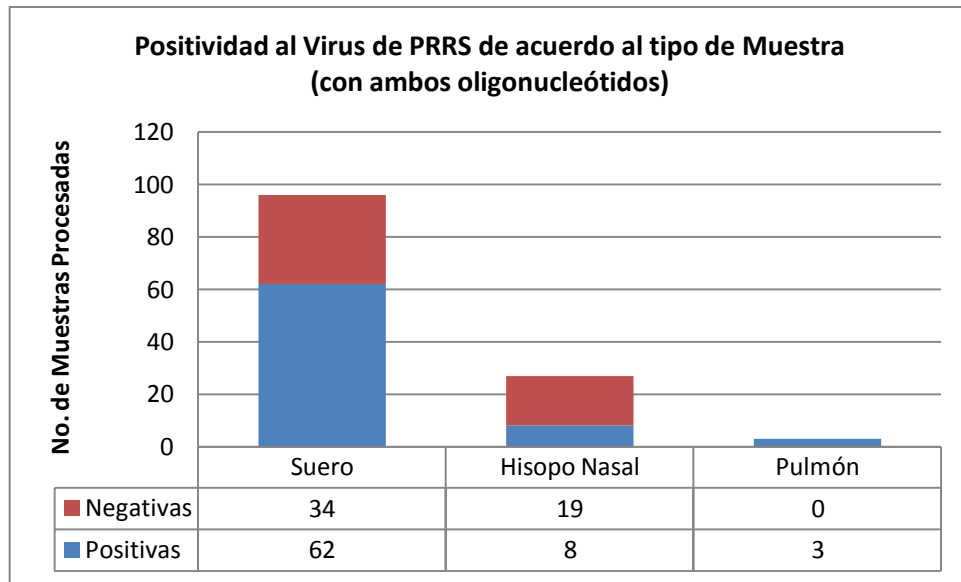


Figura 10. Porcentaje de positividad de acuerdo al tipo de muestra que fue utilizada y procesada con ambos oligonucleótidos.

Al llevar a cabo la investigación, se hizo un hallazgo incidental; algunas muestras presentaron un amplicón que diferían en tamaño al del control positivo (Figura 11) y en algunas otras se observó más de una banda (Figura 12), a pesar de que el control positivo muestra solo una.

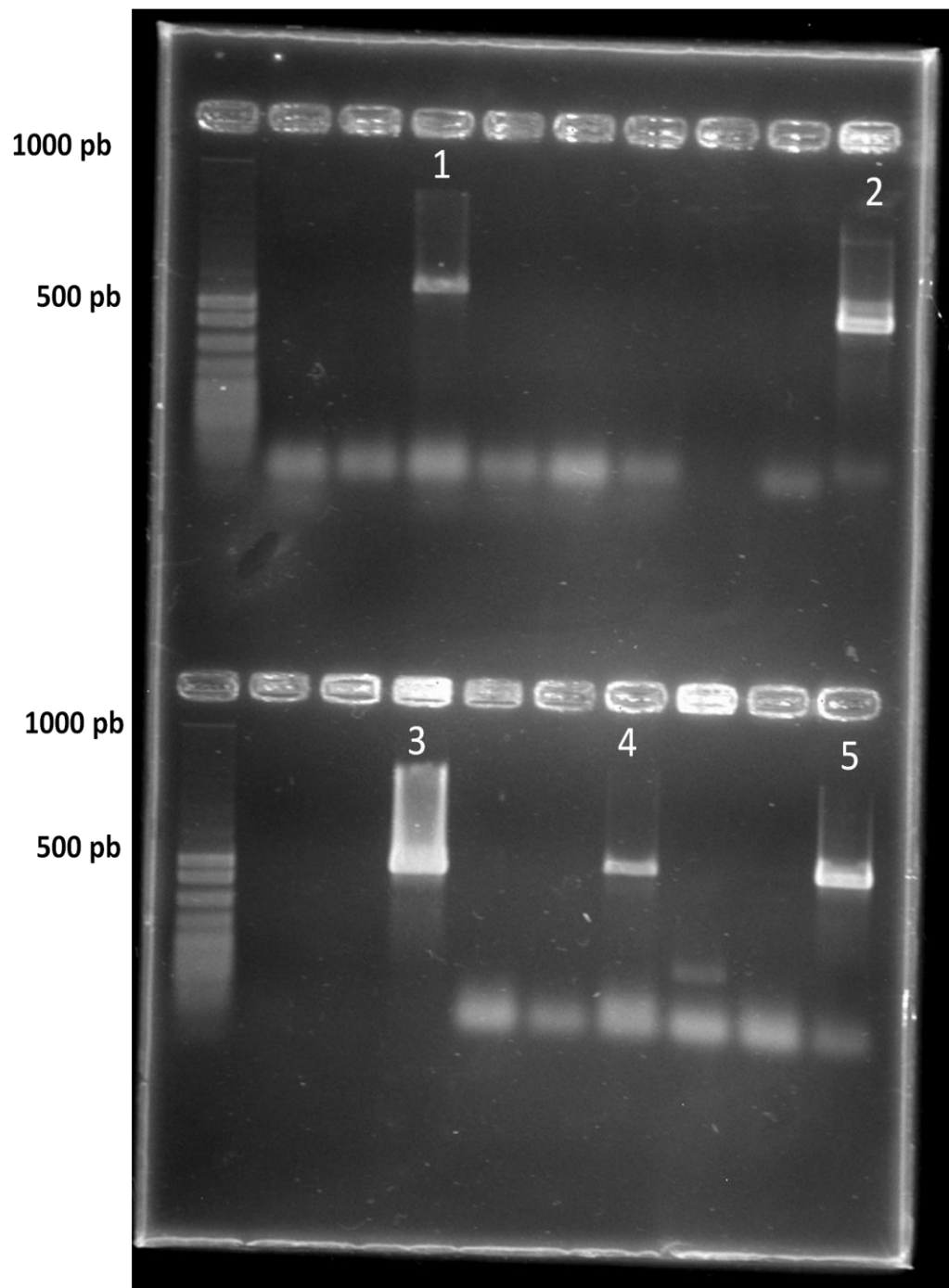


Figura 11. Gel de electroforesis al 2%. Se observan muestras de campo (1, 3 y 4) y los controles positivos (2 y 5). La muestra 1 presenta un amplicón ligeramente menos pesado que el amplicón del control.

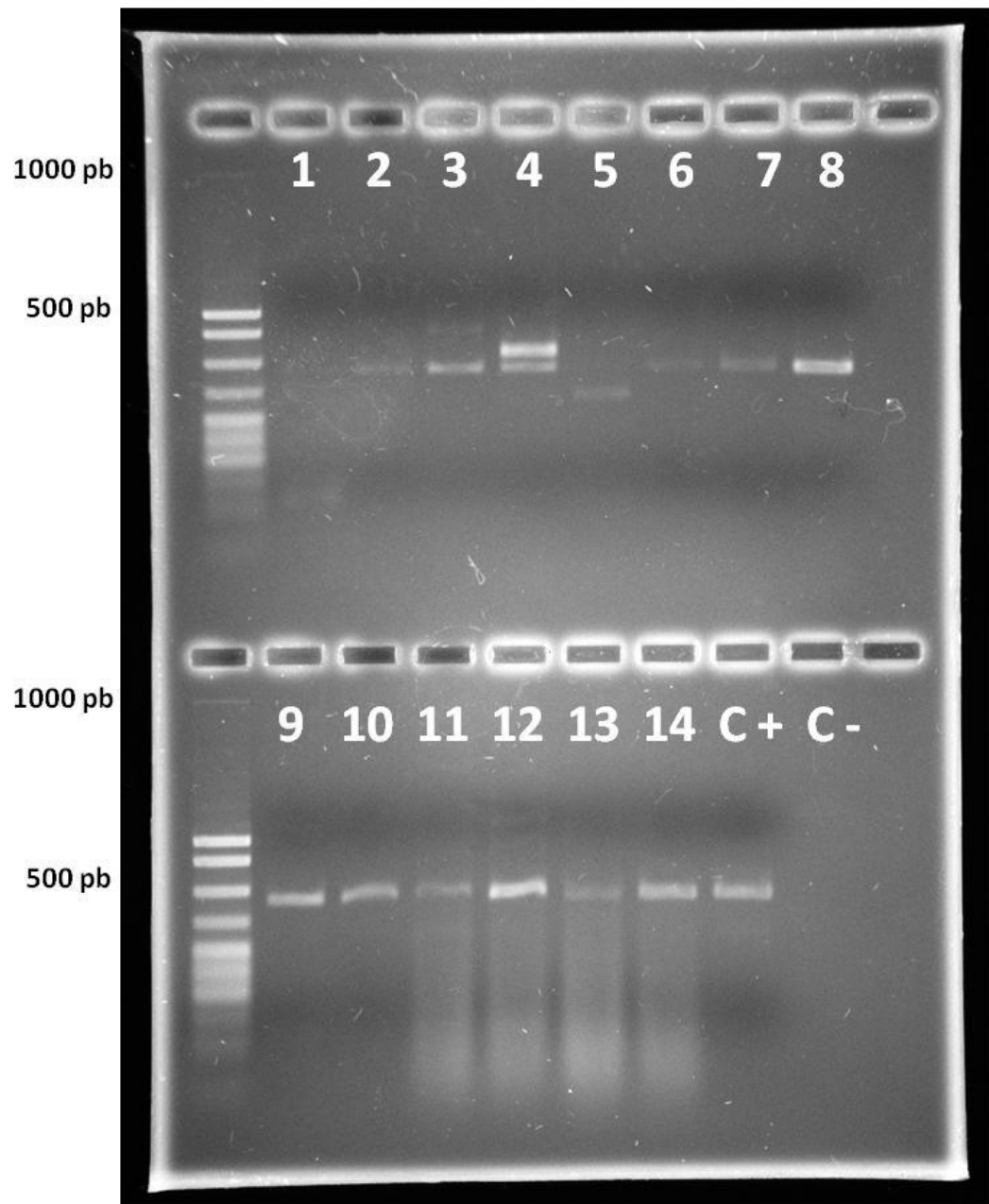


Figura 12. Gel de electroforesis al 2%. Las muestras señaladas como 3 y 4 presentan un doble bandeo con un aproximado de 50 bases de diferencia. La muestra señalada como 5 presenta una banda de menor tamaño en comparación con el control positivo (C+)

Aislamiento Viral

Con algunas de las muestras antes mencionadas se realizó el aislamiento viral con éxito en ambas líneas celulares comprobado por PCR de algunos países, obteniendo cinco aislados a partir de muestras de campo y uno vacunal (VR2332) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Aislamientos virales utilizados para la seroneutralización.

Aislamiento Viral	Procedencia	Oligonucleótidos Utilizados	Amplicones
G2	Guanajuato	ORF 7	2
G3	Michoacán	ORF 7	1
G6	Sonora	ORF 7	1
A4	Guanajuato	ORF 5 y ORF 7	4 (ORF 7) y 3 (ORF 5)
A16	Puebla	ORF 5 y ORF 7	1
VR2332	-	ORF 5 y ORF 7	1

A pesar de que el aislamiento se logró en ambas líneas celulares, el efecto citopático se observó de forma más clara en las células MARC 145. En la Figura 13 se observa el efecto citopático en ambas líneas celulares en comparación con los controles negativos tratados en las mismas condiciones de crecimiento.

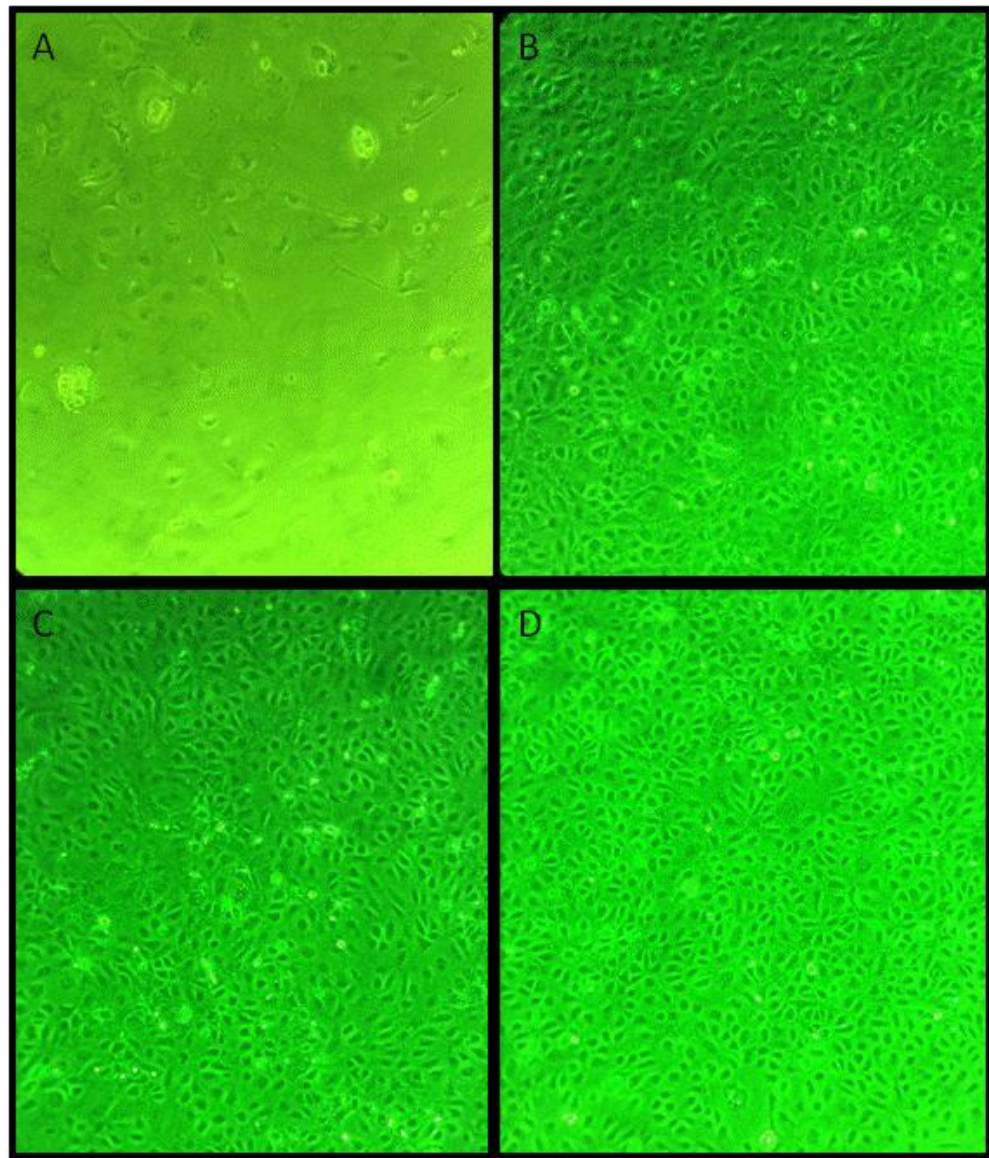


Figura 13. (A) Células MA-104 Infechadas con el virus de PRRS aislamiento A16 a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia; a las 96 h PI se observó desprendimiento de células del monoestrato, islotes de células muertas suspendidas y células alargadas. (B) Monoestrato de Células MA-104 control sin infectar a las 96 h, muestra escasas células muertas. (C) Células MARC-145 Infechadas con el virus de PRRS aislamiento A16 a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia; a las 96 h PI se observaron células en proceso

de muerte, células redondeadas y desprendidas. (D) Monoestrato de Células MARC-145 control sin infectar a las 96 h. Microscopía óptica 10X.

El efecto citopático característico que ocasiona el virus es un alargamiento de las células afectando generalmente a células aledañas por lo que se observa un “listón” de células alargadas. Sin embargo, se observa otro tipo de daño celular como formación de vacuolas, desprendimiento celular con células flotando y zonas de pérdida de la monocapa. La Figura 14 está conformada por imágenes del daño celular ocasionado por distintas cepas y el control negativo de células MARC145.

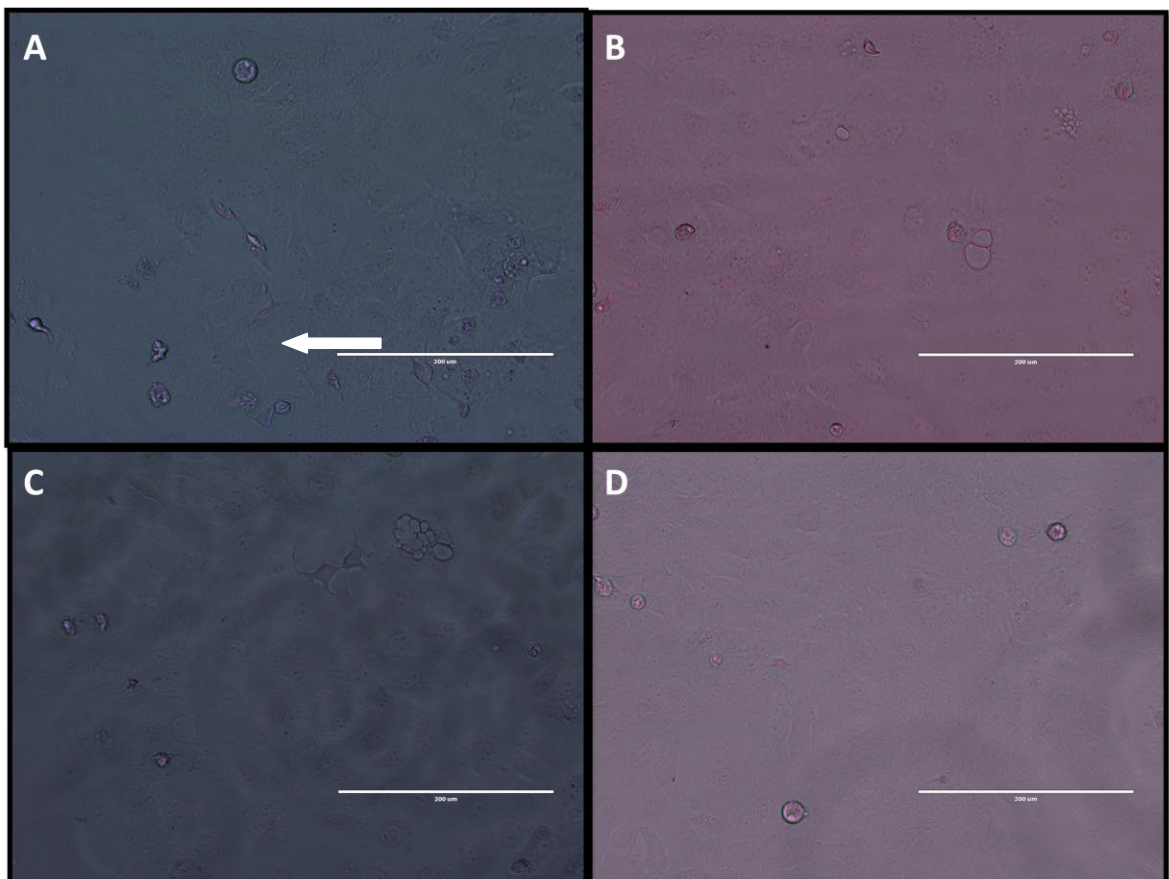


Figura 14. Monoestrato de células MARC-145 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia que muestra el efecto citopático de diferentes cepas en células MARC-145 tratadas en las mismas condiciones de crecimiento. A) Aislado G2 a 96 h de infección; se observa un “listón de células” (flecha), efecto citopático característico del virus en estas células. B) Aislado A16 pase 3 a 96 h de infección, se observa formación de vacuolas c) Aislado G2 dilución 1:8 a 96 h de infección d) Monoestrato de células MARC-145 control sin infectar. Microscopía óptica 10X.

Todos los aislamientos virales mostraron efecto citopático a las 96 horas de infección en ambas líneas celulares como lo muestran las Figuras 15 y 16.

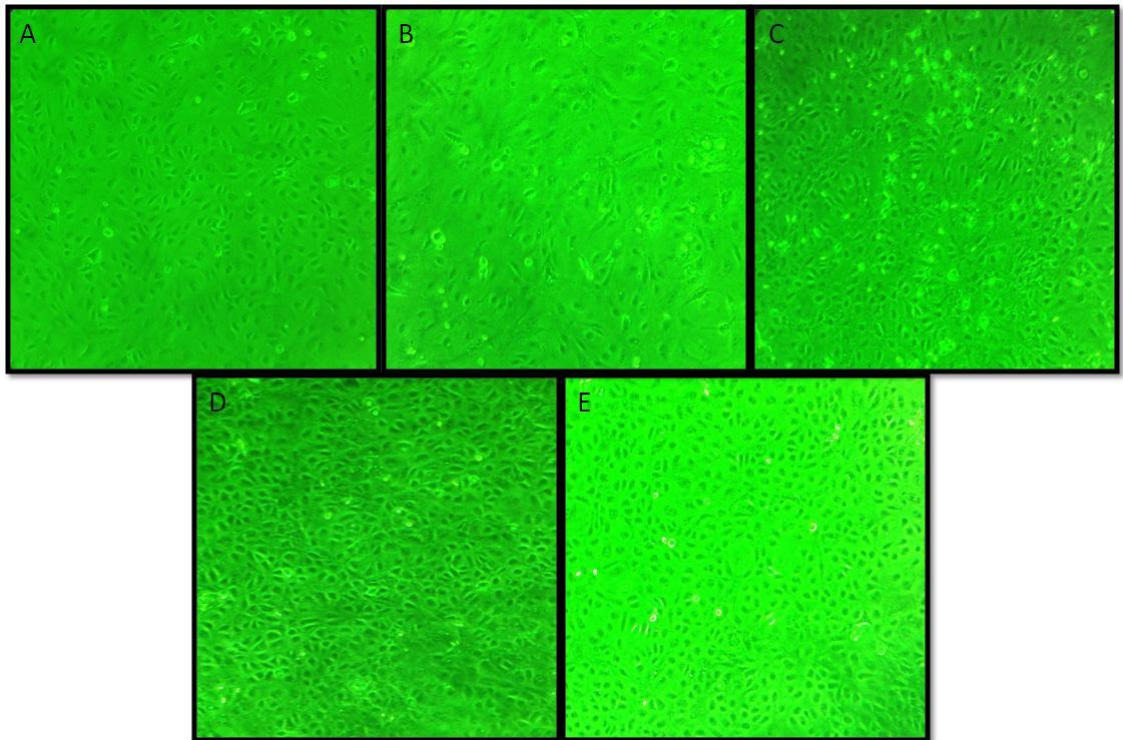


Figura 15. Monoestrato de células MA-104 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia. A) Células MA-104 control sin infectar. B) Células MA-104 infectadas con el aislamiento G2, se observaron células alargadas y células desprendidas. C) Células MA-

104 infectadas con el aislamiento G3, se observan células desprendidas y en proceso de muerte, así como alargamiento de células. D) Células MA-104 infectadas con el aislamiento A16, se observa moderado desprendimiento celular y pérdida del monoestrato. E) Células MA-104 infectadas con el aislamiento VR2332, se observa poco efecto citopático en general. Microscopía óptica 10X.

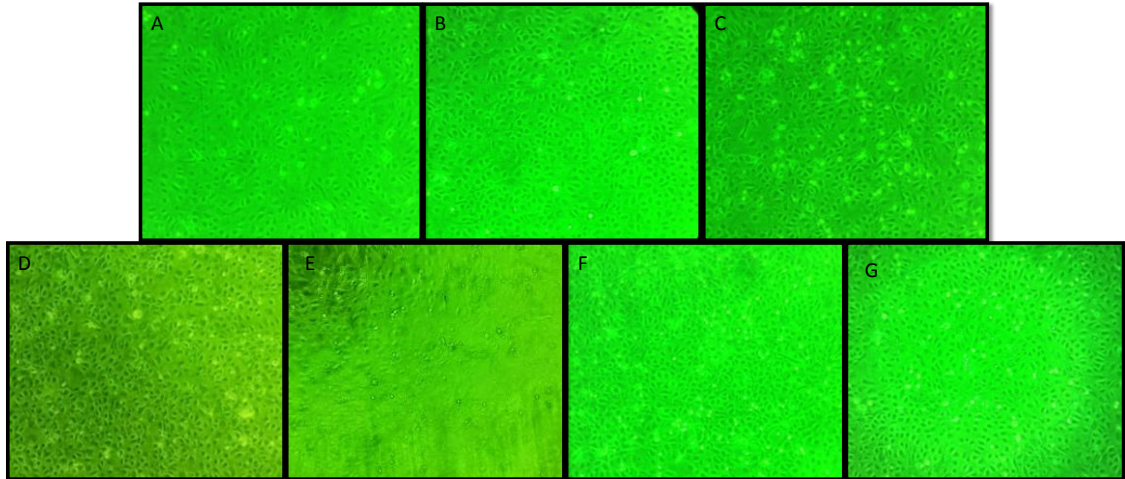


Figura 16. Monoestrato de células MARC-145 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia con los diferentes aislados; los cuales muestran diversos grados de efecto citopático. A) Células MARC-145 control sin infectar; se observa moderado desprendimiento celular. B) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G2, se observan células alargadas y pérdida del monoestrato. C) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3, se observan “listones” de células alargadas con pérdida del monoestrato y células muertas en suspensión. D) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G6, se observan células en proceso de muerte, redondeadas y desprendidas. E) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento A4, se observa pérdida del monoestrato y ligero desprendimiento celular. F) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento A16 que muestra evidente alargamiento celular con formación de “listones” de células. G) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento VR2332, se observa

moderado efecto citopático con pocas células alargadas y en suspensión. Microscopía óptica 10X.

Al realizar los cultivos celulares el efecto se observó en todos los pases, en algunos casos el efecto se exacerbó, mientras que en otros se mantuvo. En ninguno de los casos se vio reducido conforme los pases aumentaban. La figura 17 muestra un ejemplo de la presentación del efecto citopático en la cepa G3, que fue la que mostró mayor efecto en células MARC145.

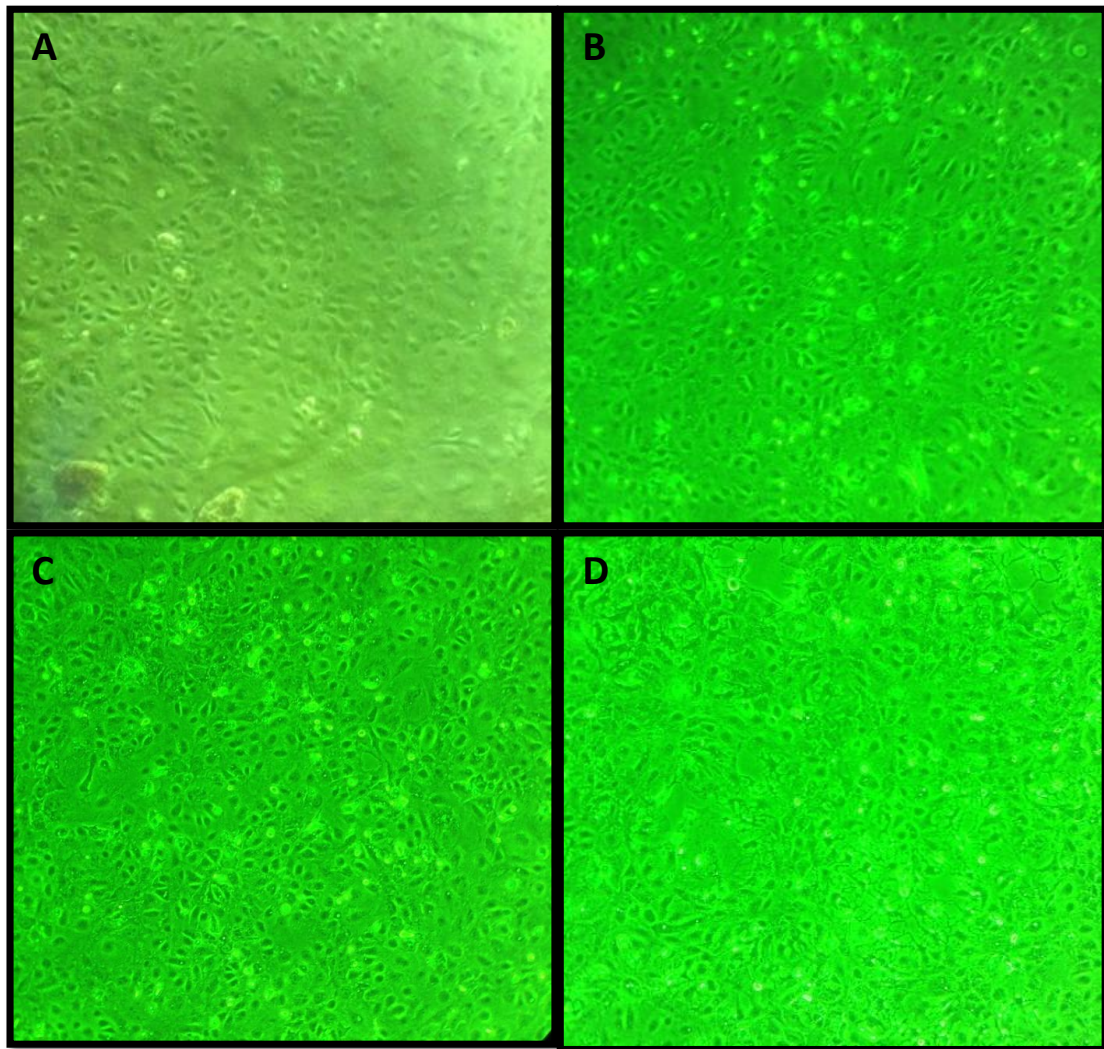


Figura 17. Monoestrato de células MARC-145 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia; los cuales muestran diversos grados de efecto citopático de acuerdo al número de pase del aislamiento. a) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3 pase 1 B) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3 pase 2 C) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3 pase 3 d) Células MARC-145 infectadas con el aislamiento G3 pase 4. Microscopía óptica 10X.

Como se mencionó anteriormente, la cepa G3 presentó un efecto citopático muy marcado, provocando una casi completa destrucción celular, el cual se puede observar en la Figura 18 de microscopía óptica 20x.

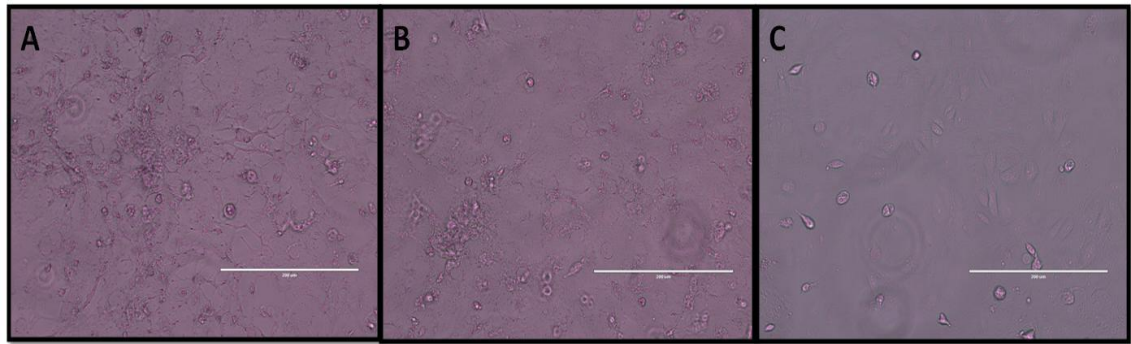


Figura 18. Monoestrato de células MARC-145 infectadas a los 3 días de edad con el 80-90% de confluencia. A y B) Imágenes del efecto citopático ocasionado por el aislamiento G3. Se observa amplia destrucción celular con alargamiento de las células formando “redes”; dejando espacios sin células y zonas de células flotantes (muertas). C) Células MARC-145 control sin infectar. Microscopía óptica 20X.

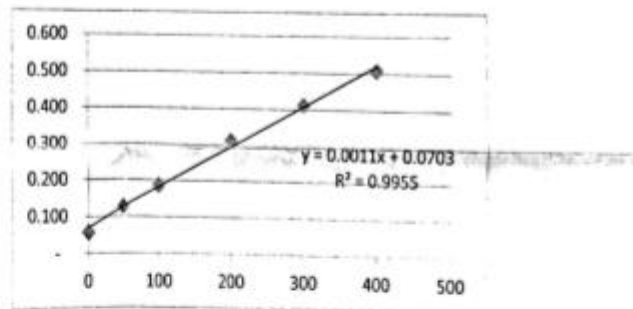
LOWRY

El aislamiento viral A4 se utilizó como antígeno para el desarrollo de la técnica de ELISA, así como el sobrenadante de células. Para el proceso fue necesaria la obtención de la

cantidad de proteínas presentes en ambos sobrenadantes. La Figura 19 muestra los resultados de la medición por densidad óptica así como la regresión lineal que provee el programa, la cual proporciona la cantidad de proteína presente en las muestras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.059	0.056	0.031	0.349	0.35	0.04	0.04	0.053	0.043	0.04	0.035	0.035
B	0.135	0.119	0.038	0.206	0.198	0.036	0.038	0.038	0.042	0.04	0.042	0.041
C	0.2	0.173	0.034	0.307	0.279	0.041	0.05	0.043	0.036	0.04	0.039	0.038
D	0.317	0.31	0.043	0.199	0.19	0.052	0.046	0.037	0.037	0.04	0.042	0.056
E	0.437	0.389	0.043	0.542	0.485	0.037	0.042	0.045	0.039	0.04	0.034	0.044
F	0.504	0.512	0.054	0.343	0.311	0.053	0.053	0.045	0.035	0.05	0.035	0.053
G	0.435	0.296	0.039	0.045	0.04	0.036	0.057	0.046	0.05	0.04	0.037	0.033
H	0.667	0.573	0.067	0.04	0.041	0.046	0.039	0.05	0.056	0.05	0.044	0.038

		DO	[µg/mL]
0.059	0.056	0.058	0
0.135	0.119	0.127	50
0.2	0.173	0.187	100
0.317	0.31	0.314	200
0.437	0.389	0.413	300
0.504	0.512	0.508	400
0.435			500
0.667	0.573		



	DO		[µg/mL]	*dil	[mg/mL]	
A4 3°P1:5	0.349	0.35	0.35	253.8	1269.1	
A4 1:10	0.206	0.198	0.202	119.7	1197.3	1.2
A4 5°P 1:5	0.307	0.279	0.293	202.5	1012.3	
A4 1:10	0.199	0.19	0.195	112.9	1129.1	1.1
SNcel 1:5	0.542	0.485	0.514	402.9	2014.5	
SNcel 1:10	0.343	0.311	0.327	233.4	2333.6	2.3

Figura 19. Conteo de proteínas por la técnica de Lowry. Se utilizó el A4 5°P con una concentración de 1.1 mg/ml y el SNcel con una concentración de 2.3 mg/ml.

ELISA

La detección de los anticuerpos contra el virus de PRRS se estandarizó y los resultados se muestran en la Figura 20.

A4 conejo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.023	-0.022	1.538	1.607	-0.024	-0.012	1.357	1.51	-0.028	-0.026	1.228	1.331	Blank Read 2 450
B	0.081	0.107	1.365	1.189	0.037	0.045	0.761	0.885	0.021	0.034	0.751	0.984	Blank Read 2 450
C	1.607	1.603	1.671	1.511	1.238	1.149	1.434	1.149	0.835	0.982	0.857	0.962	Blank Read 2 450
D	1.164	1.494	1.038	1.287	0.91	1	0.899	0.793	0.512	0.673	0.535	0.77	Blank Read 2 450
E	1.647	2.006	0.303	0.243	1.19	1.325	0.162	0.135	1.17	0.791	0.065	0.093	Blank Read 2 450
F	1.742	1.667	0.442	0.372	0.902	0.982	0.192	0.178	1.089	0.7	0.045	0.07	Blank Read 2 450
G	2.091	2.136	0.288	0.257	1.212	1.33	0.148	0.138	1.017	0.998	0.019	0.052	Blank Read 2 450
H	1.684	1.835	0.262	0.23	1.472	1.691	0.118	0.144	0.9	0.83	0.034	0.049	Blank Read 2 450

SN cel conejo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.048	0.061	2.156	1.999	0.048	0.061	1.993	1.948	0.06	0.064	1.8	2.17	Read 2 450
B	0.144	0.14	1.974	1.651	0.116	0.099	1.373	1.353	0.11	0.122	1.216	1.747	Read 2 450
C	2.358	2.225	2.311	1.997	1.563	1.535	1.622	1.729	1.681	1.839	1.74	1.98	Read 2 450
D	1.923	1.947	1.85	1.775	1.186	1.354	1.467	1.636	1.28	1.33	1.35	1.682	Read 2 450
E	2.392	2.201	0.233	0.194	1.753	1.522	0.168	0.173	1.381	1.661	0.16	0.217	Read 2 450
F	2.183	2.088	0.265	0.361	1.467	1.186	0.206	0.213	1.244	1.528	0.138	0.22	Read 2 450
G	2.48	2.211	0.203	0.203	1.789	1.548	0.122	0.131	1.749	1.674	0.099	0.137	Read 2 450
H	2	2.083	0.222	0.205	1.488	1.443	0.178	0.196	1.856	1.956	0.135	0.159	Read 2 450

Figura 20. Estandarización de la prueba ELISA para la detección de los anticuerpos creados en conejo contra las diferentes cepas del virus de PRRS. Los estándares utilizados se encuentran dentro del cuadro rojo y fueron descritos en material y métodos. A9 y 10 Blanco, B9 y 10 Negativo, C9 y 10 suero de A4-1, D9 y 10 suero de A4-2, E9 y 10 suero de G6-1, F9 y 10 suero de G6-2, G9 y 10 suero de A16-1, H9 y 10 suero de A16-2, A11 y 12 suero de G2-1, B11 y 12 suero de G2-2, C11 y 12 suero de G3-1, D11 y 12 suero de G3-2, E, F, G y H 11 y 12 sueros negativos.

Seroneutralización

Los títulos obtenidos de la seroneutralización entre los diferentes aislados virales (Cuadro 6) se confrontaron para estudiar la posible respuesta cruzada entre las cepas.

Cuadro 6. Títulos de Seroneutralización obtenidos. El valor representa el inverso de la última dilución observada sin presencia de efecto citopático (ECP).

Virus	G2	G3	G6	A4	A16	VR2332
-------	----	----	----	----	-----	--------

Suero

G2	32	4	8	4	4	4
G3	4	4	4	4	4	4
G6	64	4	4	4	4	4
A4	4	4	64	4	4	4
A16	8	4	16	4	4	32
VR2332	4	4	4	4	4	16

Al transformar los títulos de neutralización a índice de relación antigénica por medio del método descrito por Archetti y colaboradores (1950) los resultados muestran una relación entre el aislamiento G3 y los aislamientos G6, A4 y A16, así como el aislamiento A4 contra el aislamiento A16, con un valor de 1, lo que significa que estas cepas están relacionadas antigénicamente. Por otra parte, el resto de las cepas muestran diferencias antigénicas a diferentes grados. Tomando en cuenta que el valor 1 representa la mayor relación antigénica, los valores más alejados de éste valor representan las cepas que tienen la menor relación antigénica. De acuerdo a esto, el aislamiento G2 es la que presenta menor relación con todos las demás, siendo la más baja contra la cepa vacunal con un valor de .1767, seguido por la relación con los aislamientos G3, A4 y G6 con un valor de .3535 para todos. El siguiente aislado con menor relación es el A16 contra el aislado VR2332, presentando un valor de 1.4142; y posteriormente los aislados G2 contra G6 y G6 contra A16, presentando en ambos casos un valor de relación antigénica de 2. Finalmente la menor relación antigénica se presenta entre los aislados G6 y A4 con un índice de relación antigénica de 4. En el caso contrario, el aislado G3 es la que presenta mayor relación

antigénica entre todos los aislados, obteniendo valor de 1 para todos excepto la cepa de referencia. Los resultados se observan detalladamente en el Cuadro 6.

Cuadro 7. Relaciones antigénicas entre los aislados del virus de PRRS y la cepa de referencia.

Virus	G2	G3	G6	A4	A16	VR2332
Suero						
G2	1	0.3535	2	0.3535	0.3535	0.1767
G3		1	1	1	1	0.7071
G6			1	4	2	0.7071
A4				1	1	0.7071
A16					1	1.4142
VR2332						1

Inmunofluorescencia

Todas las seroneutralizaciones fueron evaluadas por medio de inmunofluorescencia para confirmar la presencia del virus en los cultivos celulares. Especialmente en esos casos en que el efecto citopático no era muy evidente. Las figuras 21 a 26 son ejemplos de los ensayos de inmunofluorescencia en células infectadas y en las pruebas de seroneutralización.

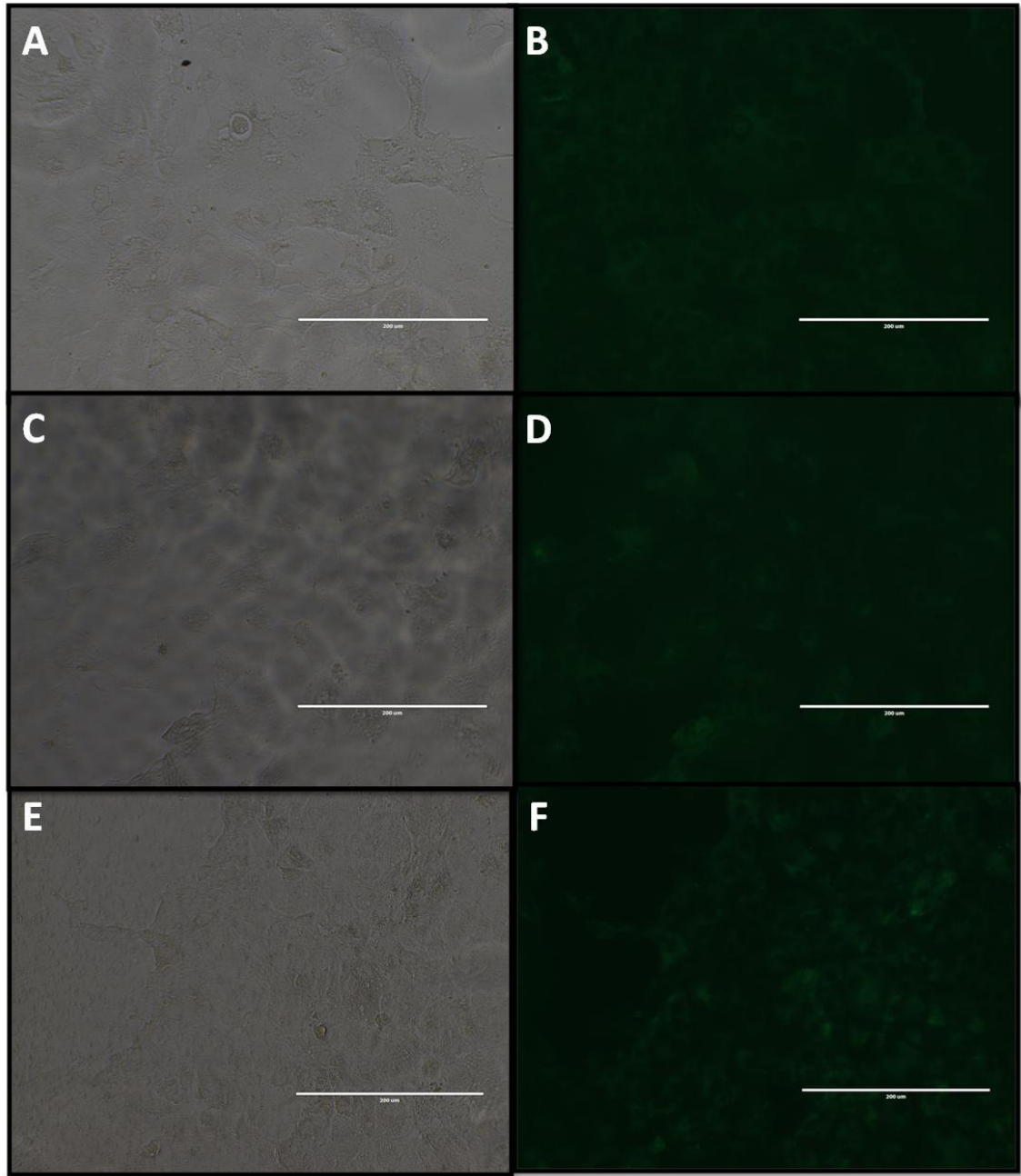


Figura 21. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislado A4. A, B) Cepa A4 contra suero del aislado A4 dilución 1:32. C, D) Aislado A4 control positivo. E y F) Aislado A4 contra suero G3 dilución 1:4. Microscopía óptica 20X

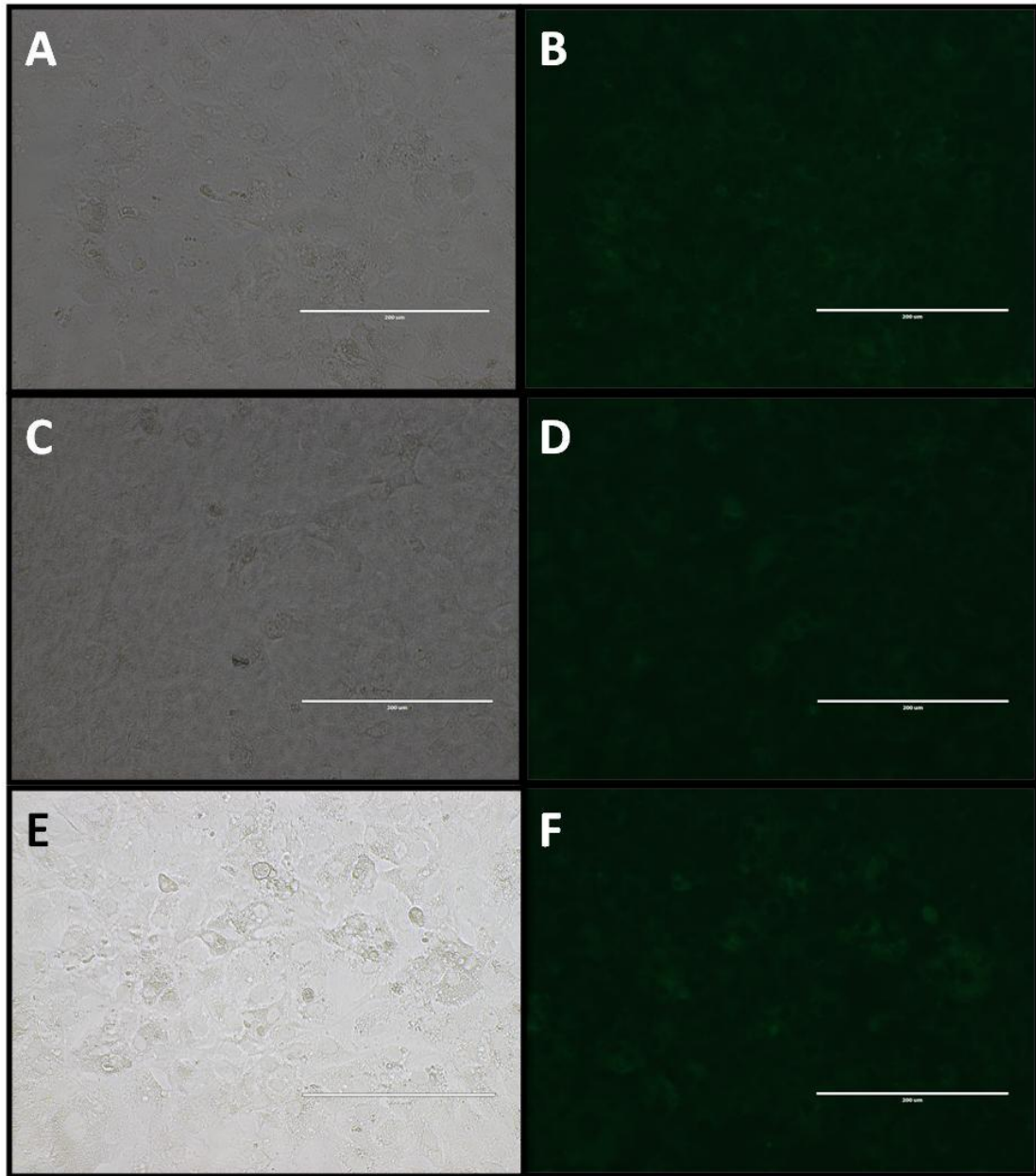


Figura 22. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento A16. A, B) Aislado A16 contra suero A16 dilución 1:32. C, D) Aislado A16 contra suero G6 control positivo del virus. E,F) Aislado A16 contra suero VR2332 dilución 1:16. Microscopía óptica 20X.

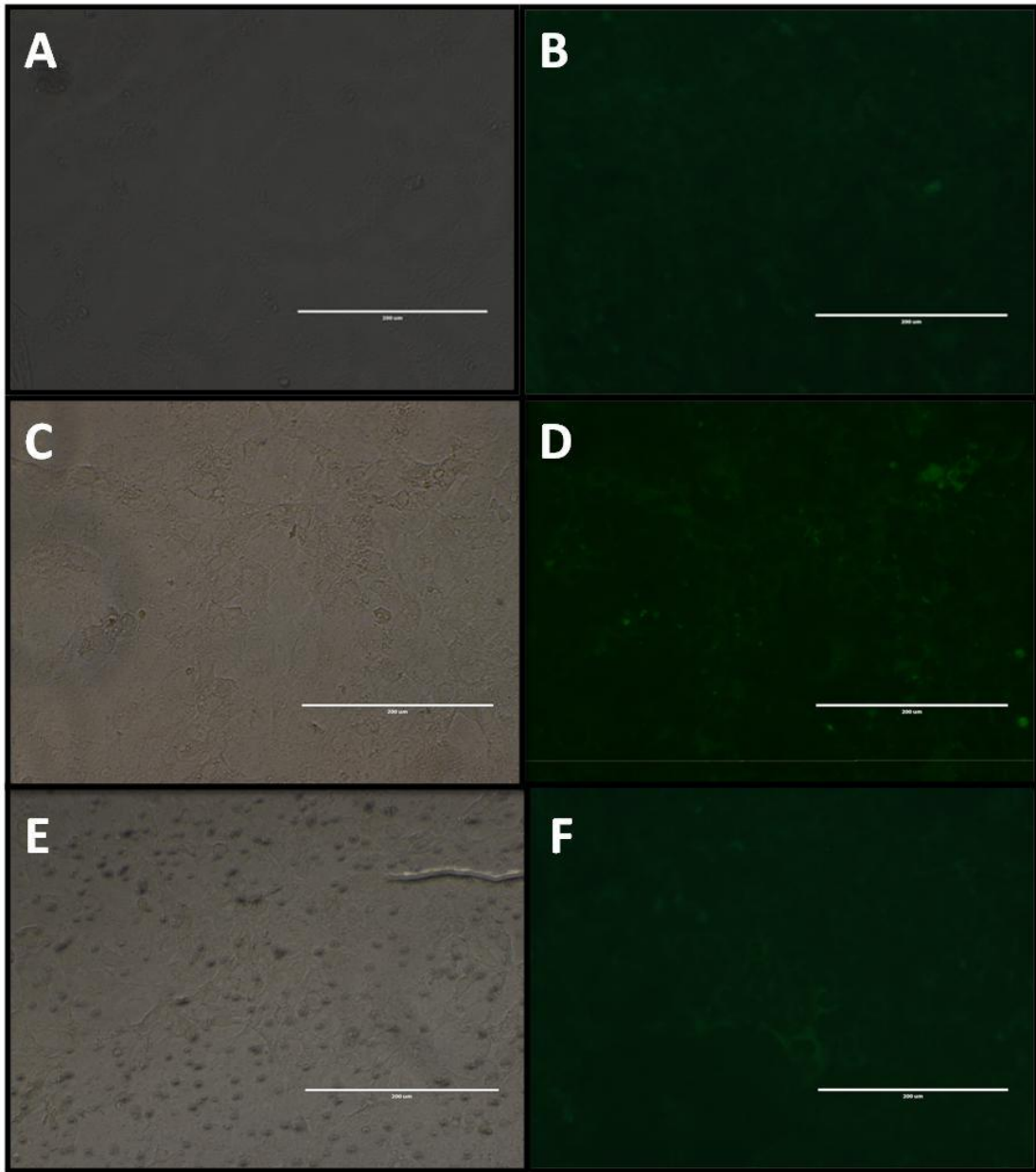


Figura 23. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento G2. A, B). Aislado G2 contra suero A16 dilución 1:64. C, D) Aislado G2 contra suero A4 dilución 1:64. E,F) Aislado G2 contra suero G6 dilución 1:8. Microscopía óptica 20X.

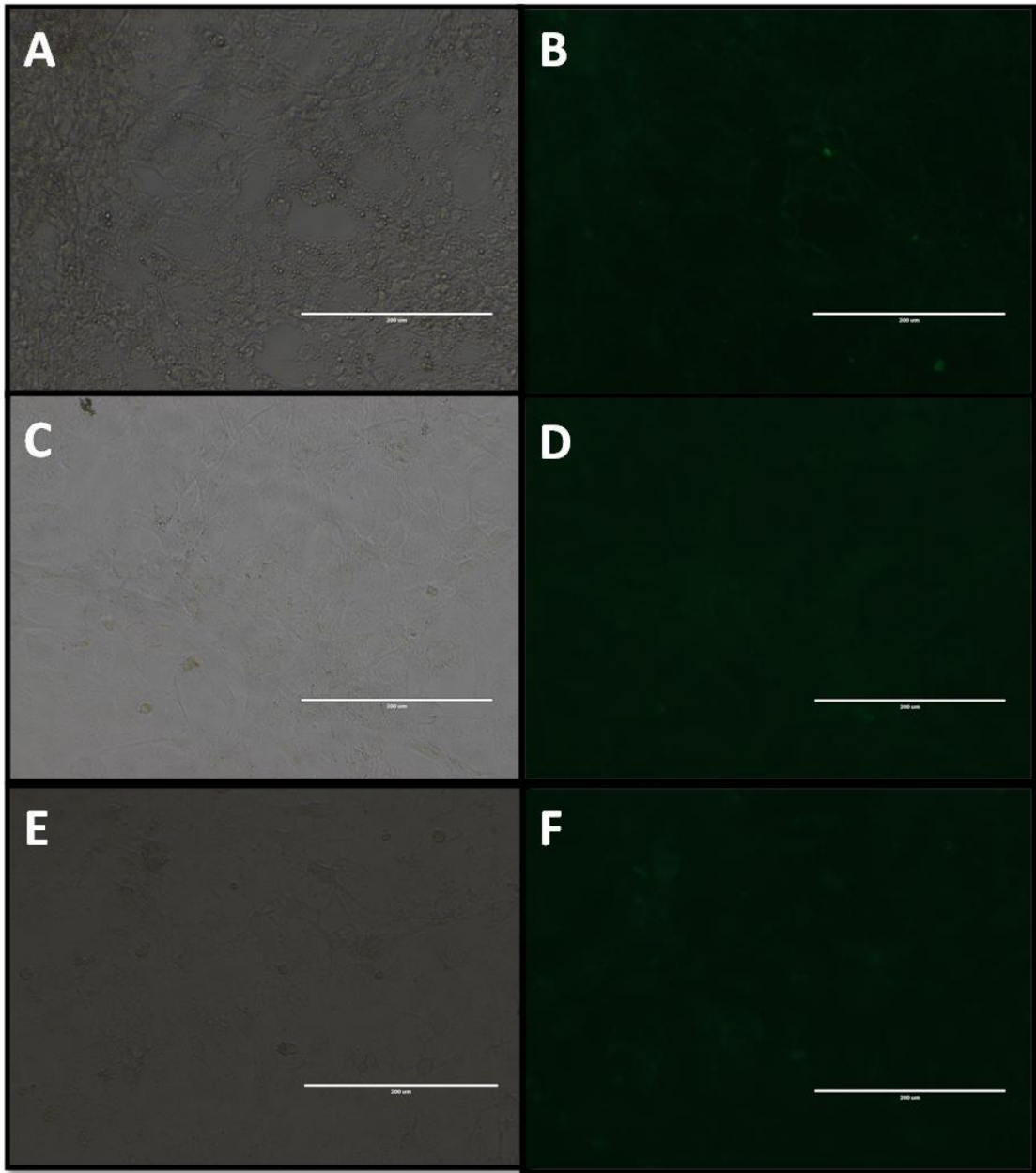


Figura 24. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento G3. A, B) Aislado G3 contra suero G3 dilución 1:16. C, D) Células Control sin infectar. E, F) Aislado G3 contra suero control negativo. Microscopía óptica 20X.

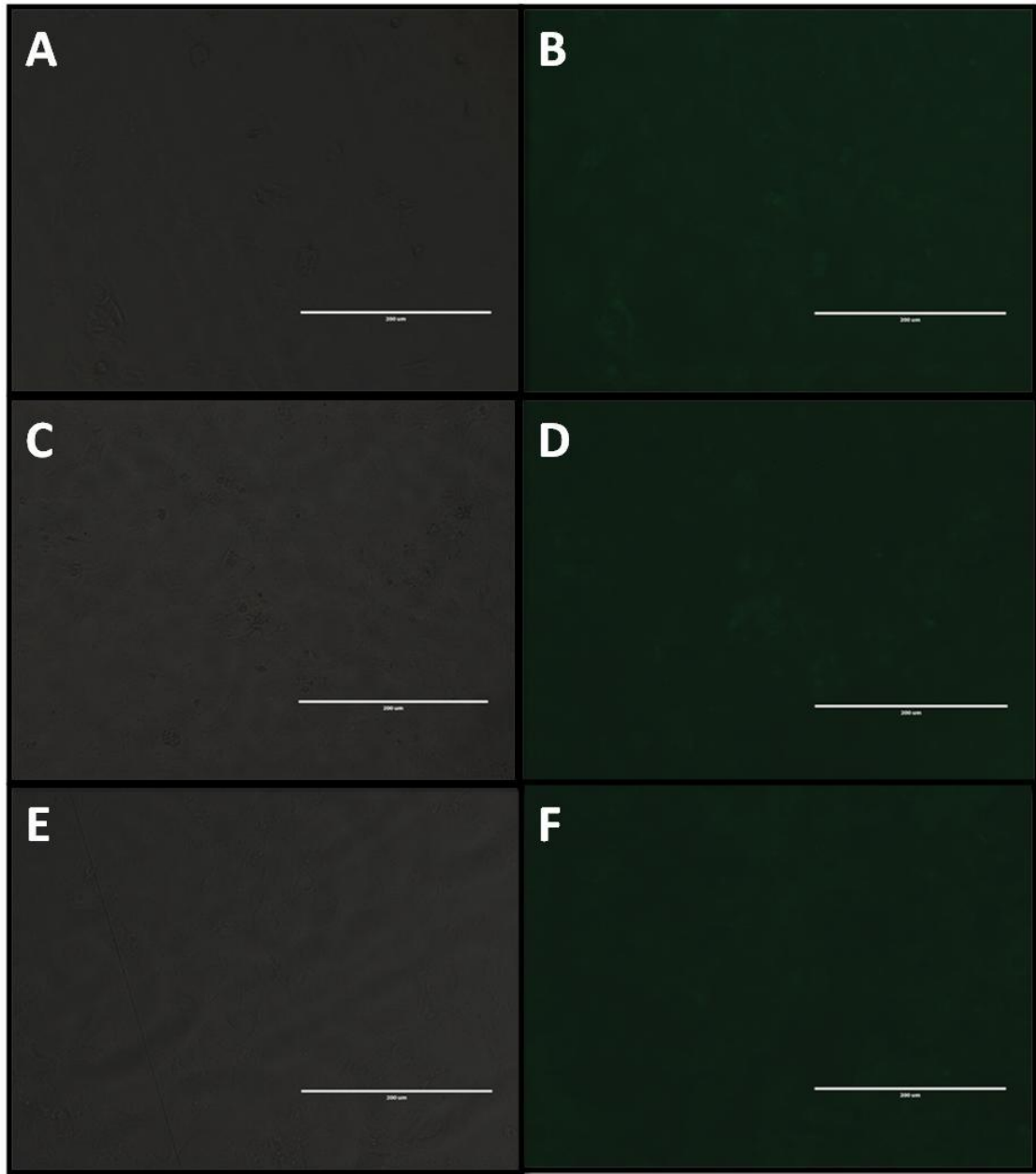


Figura 25. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento G6. A, B) Aislado G6 control positivo. C, D). Aislado G6 contra suero G2 dilución 1:512. E, F) Células Control sin infectar. Microscopía óptica 20X.

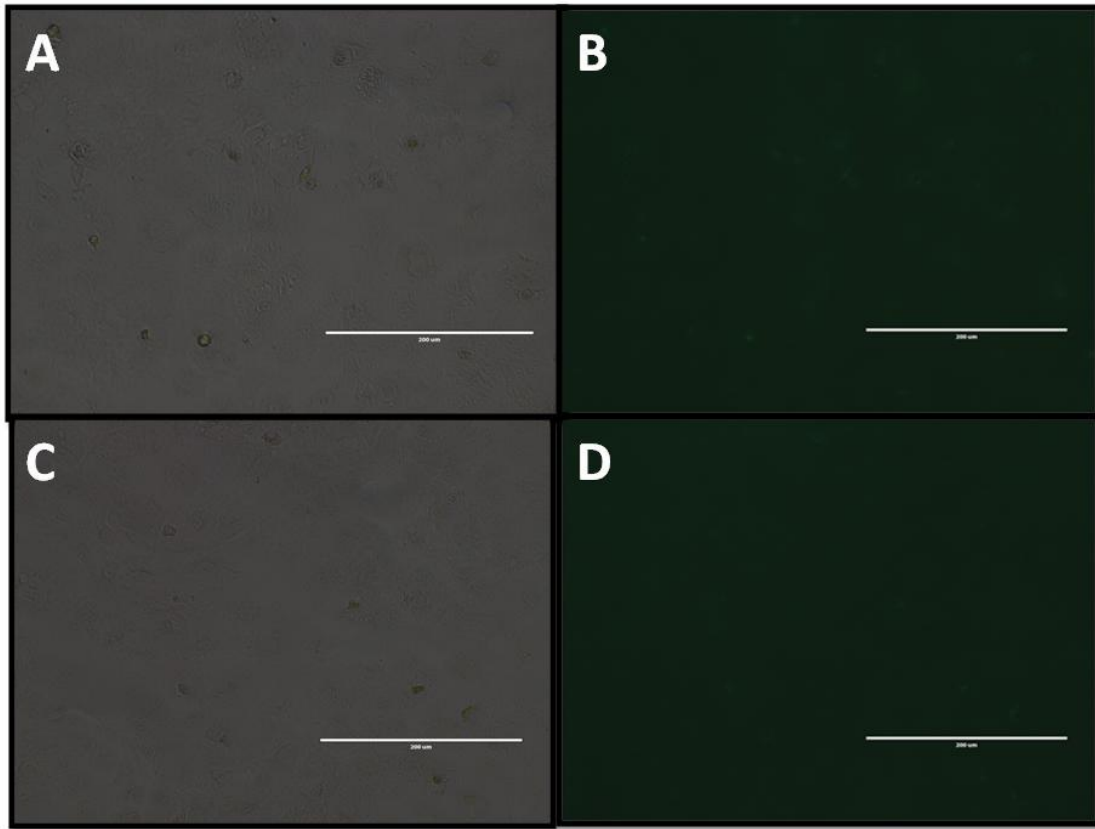


Figura 26. Seroneutralización cruzada y ensayo de inmunofluorescencia en células MARC-145 infectadas con el virus de PRRS aislamiento VR2332. A, B) Aislado VR2332 control positivo. C, D). Aislado VR2332 control negativo. Microscopía óptica 20X.

Secuenciación

El análisis de las secuencias obtenidas tanto de la Glicoproteína 5 (ORF5) como de la nucleocápside (ORF7) mostró algunas variaciones de éstas con respecto a la cepa de referencia. En el caso del ORF 5, las cepas muestran una similitud de entre 98% y 99% a la cepa de referencia (Anexo 10), mientras que en el caso de ORF 7 las secuencias de nucleótidos presentan una similitud de 99%, excepto las cepas A4 y A16, las cuales

presentan una similitud del 72% debido solamente a que son fragmentos más cortos por la calidad de la secuenciación (Anexo 11).

Las mutaciones encontradas en la secuencia de nucleótidos de GP5 son únicamente sustituciones (Figura 27). Los resultados detallados se observan en el Cuadro 7. Se encontraron cuatro sustituciones que presentan todas las secuencias de los aislados en comparación con la cepa de referencia en las posiciones 13 649, 13 703, 13 869 y 14 068 de adenina por guanina, timina por citocina, timina por citocina y adenina por guanine, respectivamente. La cepa A16 es la que presentó mayor número de sustituciones con un total de 9 en distintas posiciones.

Cuadro 8. Mutaciones encontradas en la secuencia de nucleótidos de la glicoproteína 5 (GP5)

Posición	Cepa	Nucleótido	Cepa	Nucleótido diferente
13649	Referencia	adenina	VR2332, A16, G2	A4, guanina
13703	Referencia	timina	VR2332, A16, G2	A4, citocina
13785	Referencia, VR2332, G2	adenina	A4, A16	guanina
13869	Referencia	timina	VR2332, A16, G2	A4, citocina
14068	Referencia	adenina	VR2332, A16, G2	A4, guanina
14124	Referencia, VR2332, G2	citocina	A4, A16	guanina
14132	Referencia, VR2332, G2	adenina	A4, A16	guanina
14134	Referencia, VR2332, G2	citocina	A16	guanina

Al observar la alineación de las secuencias de aminoácidos a partir de las secuencias de nucleótidos de GP5, se observaron cuatro mutaciones no sinónimas (Figura 28). Tres de ellas presentan todas las cepas obtenidas en este estudio en comparación a la cepa de referencia en la posición 13 648 de una tirosina (y) por una cisteína (c), en la posición 13 702 de una valina (v) por una alanina (a), y en la posición 14 068 de una arginina (r) por una serina (s). La cuarta mutación involucra dos aminoácidos y se presenta en la cepa A16, en comparación con todas las demás cepas incluyendo la de referencia, en la posición 14

131 presentando una histidina (h) y una leucina (l) en lugar de una arginina (r) y una valina (v).

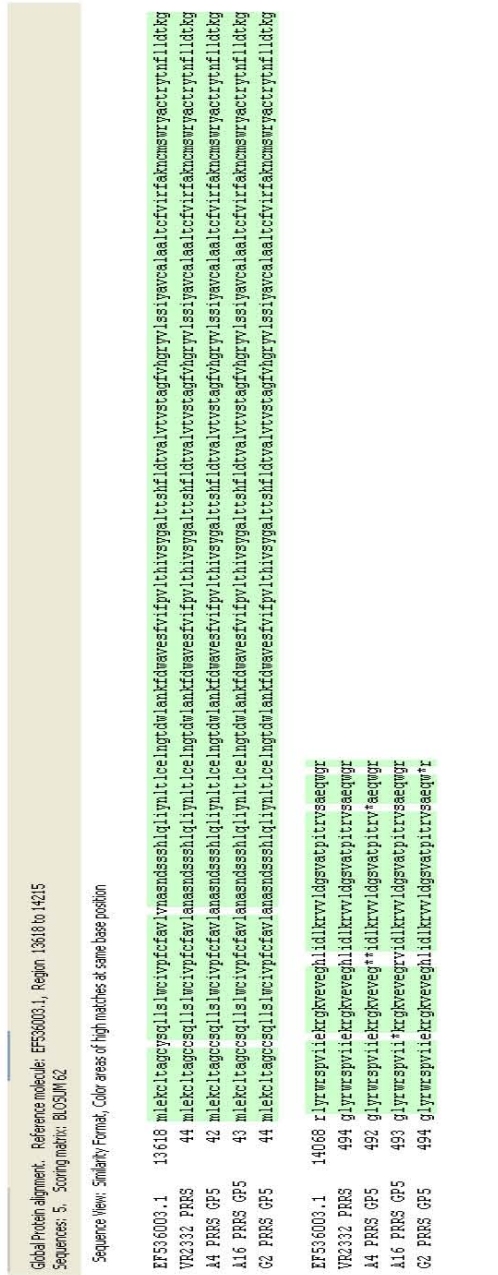


Figura 28. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la glicoproteína 5 (GP5) a la cepa de referencia Americana EF536003.1. Se observan mutaciones no sinónimas en las zonas con falta de coloración.

Las secuencias obtenidas de la nucleocápside, correspondientes al ORF 7 muestran, al igual que las de ORF 5, solamente sustituciones. Las mutaciones observadas se presentan en todas las cepas obtenidas en éste estudio en comparación con la cepa de referencia. Éstas se encuentran en la posición 14 748 con un cambio de una timina por una guanina y en la posición 15 063 de una timina por una citocina (Figura 29). Estos cambios dieron lugar a una mutación no sinónima al hacer la conversión a aminoácidos en la posición 14 746 de una asparagina (n) por una lisina (k) (Figura 30).

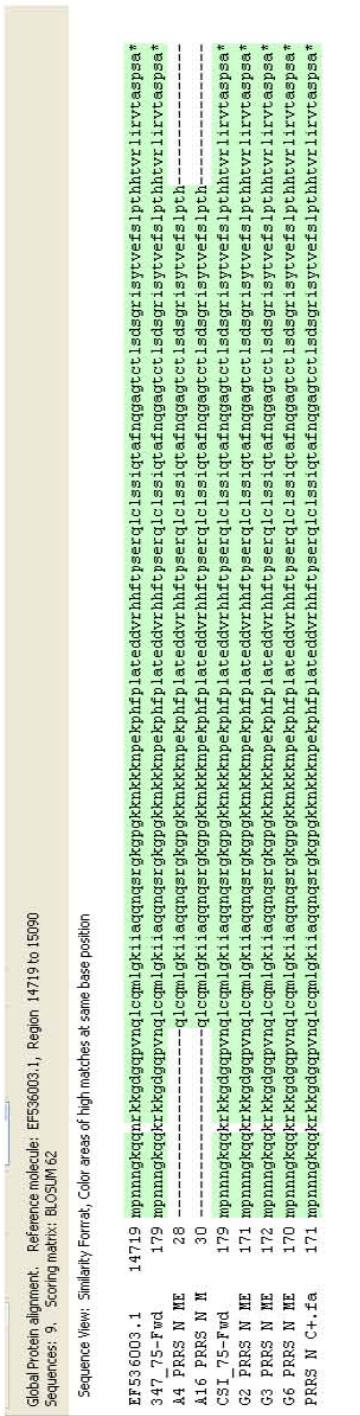


Figura 30. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la nucleocápside (ORF7) a la cepa de referencia Americana EF536003. Se observan mutaciones no sinónimas en las zonas con falta de coloración.

Análisis Filogenético

El análisis filogenético se realizó a partir de las secuencias obtenidas para observar grupos y su relación. La formación de “clusters” o grupos con ramas totalmente separadas que contienen la cepa de referencia VR2332 mostró la evolución local del virus en México.

El árbol filogenético de la GP5 (Figura 31) muestran la separación principal de dos clados donde se ubican las cepas americanas en la rama superior y las cepas europeas en la rama inferior con secuencias de Austria, Italia, Polonia y República Checa en conjunto con la cepa de referencia Lelystad a partir del año 2000 hasta el 2014. En el clado de cepas americanas se observan tres ramas principales; La inferior incluye solo muestras de EE. UU. Del año 2006. La rama central presenta mayor variabilidad e incluye cepas de EE UU, México, China y Vietnam a partir del año 2006 hasta el 2014. Finalmente la primera rama contiene los aislamientos obtenidos en este estudio así como la cepa de referencia de origen americano (VR2332). Esta rama incluye principalmente secuencias de EE UU desde el año 2002 hasta el año 2011, aunque también incluye una secuencia de Vietnam y una de Dinamarca. Los resultados confirman que las cepas encontradas en nuestro país pertenecen al tipo II y no se encuentran relacionadas con cepas Europeas.

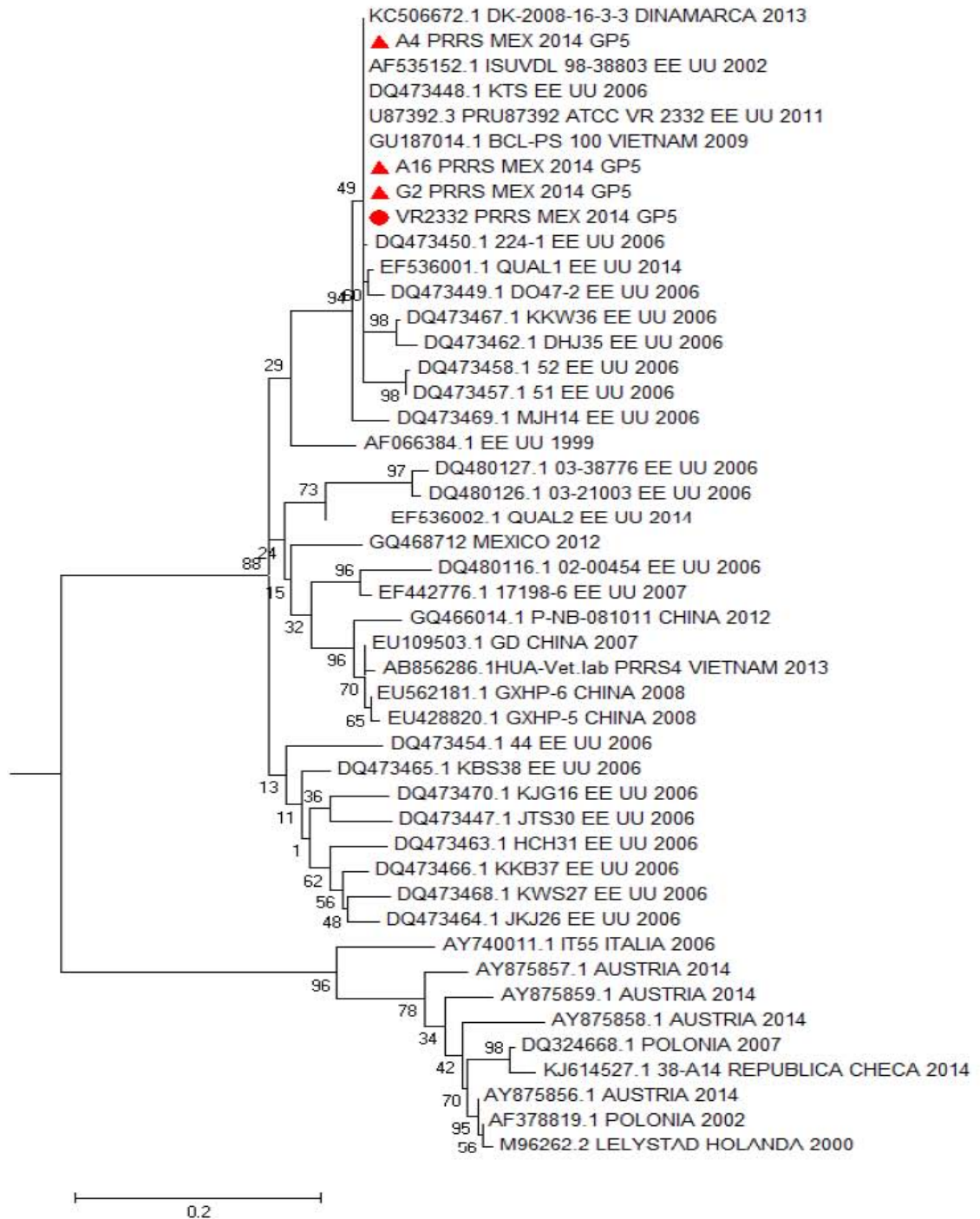


Figura 31. Árbol filogenético de la Glicoproteína 5 del virus de PRRS. Las muestras de éste estudio se encuentran identificadas con un triangulo rojo y la cepa control con un círculo rojo.

En cuanto al árbol filogenético de secuencias de ORF 7 (Figura 32); se observó de nuevo la separación de dos clados principales. El inferior agrupa a las cepas europeas con secuencias de Polonia, República de Corea y la cepa de referencia Europea (Lelystad). El clado superior también se divide en dos ramas principales que muestran gran variabilidad dentro de ellas. La inferior incluye secuencias de Canadá, India, EE. UU., Vietnam y China, así como una secuencia de México del 2007. La rama superior también se divide en diversas sub ramas y en una de ellas encontramos las secuencias de los aislados obtenidos en este estudio (triángulo rojo) y dos muestras de campo (CSI y 357). Este grupo incluye secuencias de España, EE. UU, Dinamarca y Tailandia; y la cepa de referencia americana (VR2332). Es importante mencionar que las cepas A4 y A16 forman una pequeña rama dentro de la misma, separándose ligeramente del grupo.

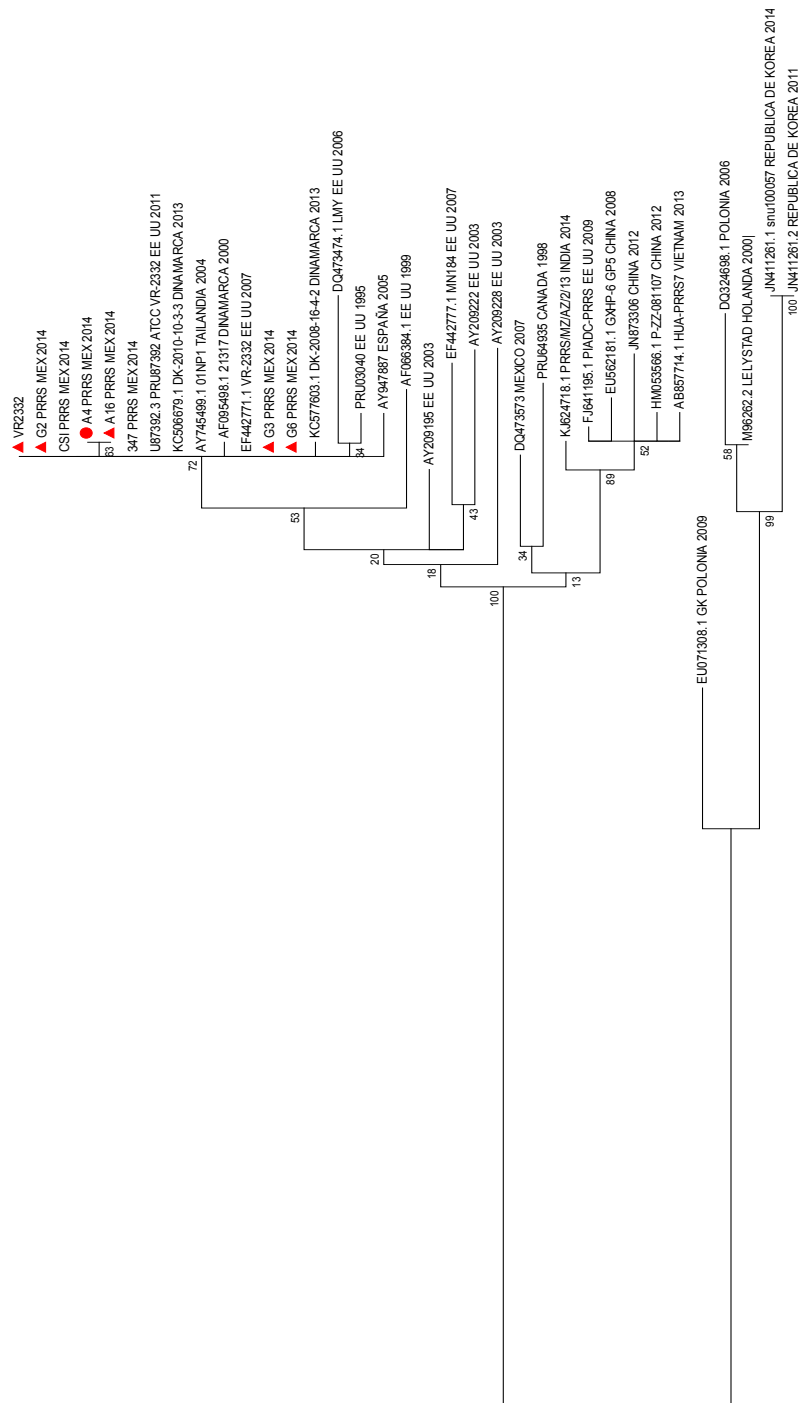


Figura 32. Análisis Filogenético de las secuencias obtenidas de ORF 7 del virus de PRRS. Las muestras de éste estudio se encuentran identificadas con un triangulo rojo y la cepa control con un círculo rojo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con este trabajo de aislamiento virales en diferentes regiones de México y la secuenciación de las mismas se demostró que las cepas circulantes del arterivirus porcino presentan mutaciones que se reflejan en falta de antigenicidad cruzada. Las mutaciones encontradas en muestras del bajío y de Sonora así como la falta de antigenicidad cruzada resultan en que los kits de diagnóstico actuales no presentan sensibilidad suficiente para detectar las cepas de campo y que la vacuna no confiere protección para el virus presente en México en las zonas estudiadas.

Los valores de relación antigénica obtenidos a partir de las seroneutralizaciones cruzadas entre cepas mostraron que el virus G3 presenta la mayor reactividad cruzada con las demás cepas, presentando un valor de 1 con las cepas de campo y un valor de 0.70 con la cepa vacunal (Cuadro 6). Con estos resultados se puede inferir que en México sí existen variantes antigénicas entre los virus que circulan en la población porcina, y será necesario encontrar una cepa que pueda ser utilizada en un futuro como “semilla” para una nueva vacuna. Se sabe que la vacunación con cepas heterólogas no confiere una protección completa (Doorselaere *et al.* 2010; Kim *et al.* 2010), sin embargo, promover la vacunación con cepas que actualmente circulen en el país podría ayudar a prevenir brotes agudos de la enfermedad así como disminuir las pérdidas económicas. Es importante volver a mencionar que la cepa G3 fue la que mayor efecto citopático ocasionaba en las células, produciendo total destrucción de las mismas (Figura 18). Sería interesante llevar a cabo pruebas *in vivo* para fortalecer estos resultados y observar la presentación clínica de la enfermedad, ya que según los datos recabados la presentación clínica en la granja donde se obtuvo la muestra era principalmente respiratoria con un severo caso de neumonía ocasionando cianosis en orejas, y una presentación reproductiva con 5% de abortos y una mortalidad en destetes del 25 al 30%.

Por otra parte, el virus G2 es el que presenta una menor reactividad al tener el valor más bajo de seroneutralización (Cuadro 6). Con éstos resultados podemos observar que los extremos en cuanto a relación antigénica se encuentran en las cepas G2 y G3 que provienen del mismo estado, lo cual podría indicar la gran cantidad de variantes que pueden estar circulando en una zona, sobre todo al tomar en cuenta que es una zona de alta densidad de producción de cerdos. (ww.siap.com.mx)

Con los resultados obtenidos se puede observar que los aislados son diferentes entre ellos y valores menores a 0.5 entre aislados podrían permitirnos hablar de cepas diferentes (Wadey y Faragher; 1981).

Es un resultado interesante que la cepa de referencia no presenta relación antigénica completa con ninguna de las cepas de campo, los valores indican que no se encuentran tan alejados antigénicamente; sin embargo, tampoco están completamente relacionadas (1.1767 contra G2, .7071 contra G3, G6 y A4; y 1.4142 contra A16) . Este resultado es importante para considerar el uso de la vacuna comercial en las granjas, ya que la vacuna está basada en ésta cepa y podría no solo conferir una baja protección, sino producir infecciones múltiples dentro de una misma población y promover la continua mutación viral.

El presente estudio estuvo enfocado en 2 genes codificados por el ORF 5 y el ORF 7. El ORF 5 codifica para la proteína GP5, la cual es la principal proteína de la envoltura y es una glicoproteína de aproximadamente 200 aminoácidos. Contiene de dos a cuatro sitios de glicosilación, una péptido señal de 31 aminoácidos y 6 determinantes antigénicas que inducen anticuerpos neutralizantes. La presencia de un gran epítipo de neutralización en el ectodominio N-terminal involucra a GP5 en el reconocimiento del receptor. El gen de ORF5 ha sido considerado uno de los ORF menos conservados del virus, con una variabilidad de secuencia de hasta 17%, que conducen a un alto grado de polimorfismo genético incluso dentro del mismo genotipo. (Yin *et al.* 2012) El ORF 7, que codifica para

la proteína de la nucleocápside (N) es el más pequeño e induce una producción elevada de anticuerpos sin actividad protectora evidente. Adicionalmente, la proteína N no es N-glicosilada, a pesar de que contiene 1 o 2 posibles sitios de N-glicosilación y su función es interactuar con el RNA viral para la formación de nuevas partículas infecciosas. Esta proteína se expresa en altos niveles en células infectadas y representa del 20 al 40% de la proteína total que contiene el virión. (Meng 2000, Straw *et al.* 2006, Meulenberg *et al.* 2005) La elección de este ORF para el diagnóstico se debe a que es el segundo gen más conservado con una similitud del 95 al 100% entre la misma cepa y de hasta 74% entre la cepa americana y europea lo que a su vez permite ser utilizado en estudios para determinar linajes de cepas. (Macías *et al.* 2006, Cho *et al.* 2006)

Las mutaciones observadas al realizar el análisis de las secuencias son diversas. Las más relevantes fueron aquellas que produjeron cambios en la secuencia de aminoácidos. Entre ellas en ORF 5 encontramos que tres que presentan todas las cepas obtenidas en comparación a la cepa de referencia (VR2332 EF536003) en la posición 13 648 de una tirosina (Y) por una cisteína (C), en la posición 13 702 de una valina (V) por una alanina (A), y en la posición 14 068 de una arginina (R) por una serina (S). La cuarta mutación que encontramos es la más relevante ya que involucra dos aminoácidos y se presenta en la cepa A16, en comparación con todas las demás cepas incluyendo la de referencia, en la posición 14 131 presentando una histidina (H) y una leucina (L) donde las demás cepas presentan un arginina (R) y una valina (V). Estos cambios en la secuencia de aminoácidos podrían estar relacionados a la respuesta antigénica de esas cepas. Ostrowski y colaboradores (2002) reportan la presencia de dos epítopes importantes en la GP5; el A se encuentra en los residuos 27 a 30 con una secuencia de A/(V)LVN y el B se encuentra en la posición 37 a 45 con una secuencia HFQSIYN o HLQIYN dependiendo de la cepa. Así mismo mencionan que el epítotope A ha evolucionado como un epítotope señuelo que es altamente inmunogénico pero produce anticuerpos no neutralizantes y es hipervariable; mientras que el epítotope B se encuentra en una región más conservada y parece participar en la formación de anticuerpos neutralizantes en la infección tardía. (Ostrowski *et al.*, 2002) Las

secuencias reportadas en este estudio coinciden con esta información al encontrarse una sustitución en el epítotope A en la posición 29 de una A por una V.

Se sabe que la GP5 es muy polimórfica al estar bajo una presión permanente de selección debido a su posición expuesta en el exterior del virión. Esta es la razón por la que GP5 es altamente informativa acerca de la evolución y el origen de las cepas del PRRSV diferentes, además de ser la principal candidata para el desarrollo de vacunas subunitarias. (Zaulet et al. 2012, Yin *et al.* 2012, Brar *et al.* 2011) Por otra parte, la GP5 del virus de PRRS se asocia con la neutralización del virus. El virus de PRRS tipo 2 o Americano contienen en su GP5 tres epítotope de células B y dos epítotope de células T, y al menos dos de estos son neutralizantes. El principal epítotope neutralizante (PEN) en ambos genotipos del virus se encuentra en el centro del ectodominio GP5, previamente identificado como S37H(F/L)QLIYN o S37H(F/L)QLIYN LTLCELNG. El PEN juega un papel importante en neutralización viral y los residuos H38L39/F39 de este dominio son considerados los aminoácidos críticos de la neutralización (histidina, leucina y fenilalanina respectivamente). (Ostrowski *et al.* 2002, Plagemann 2004) Las mutaciones encontradas en el ORF5 podrían probablemente estar relacionadas a la producción de una respuesta inmunológica deficiente (Yin *et al.* 2012).

En cuanto a la proteína N, los aislados tienen algunas sustituciones de aminoácidos en comparación con el virus americano de referencia: éstas se encuentran en la posición 14 748 con un cambio de una timina por una guanina y en la posición 15 063 de una timina por una citocina ocasionando solo un cambio en la secuencia de aminoácidos en la posición 14 476 de una una asparagina (n) por una lisina (k). La proteína de la nucleocápside (N) está codificada por el gen de ORF7; la región N-terminal de la proteína interactúa con el ARN genómico viral y la C-terminal tiene la función de mantener la estructura terciaria de la proteína N. Las secuencias de aminoácidos obtenidas de las 6 diferentes cepas alineadas con el programa Clone Manager revelan que no presenta regiones hipervariables como se esperaba debido al hecho de ser una proteína

conservada; estos resultados coinciden con estudios realizados por Zaulet y colaboradores (2012) (Zaulet *et al.*, 2012). En México, estudios realizados por Lara-Puente y colaboradores (2001) describieron la secuencia del ORF 7 y lo compararon con la cepa de referencia americana VR2332. Los resultados que obtuvieron revelaron una identidad de 94.01% a 94.39% con la cepa americana y de 97.38% a 99.93% entre los aislamientos (Lara-Puente *et al.*, 2001). En otro estudio realizado por Batista y colaboradores (2004), se analizó el ORF 7 de muestras de granjas de Sonora y Puebla reportaron una diversidad mayor a la encontrada por Lara-Puente y colaboradores (2001) (Batista *et al.*, 2004a). A pesar de que el ORF 7 no participa en la producción de anticuerpos neutralizantes, las diferencias genéticas en este gen se asocian con la variabilidad antigénica mostrada en los ensayos de seroneutralización. Sería de interés asociar la secuencia del ORF 7 con los ORFs que participan en la producción de anticuerpos neutralizantes.

El análisis de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de GP5 y ORF7 de cepas aisladas del virus de PRRS en México reveló la prevalencia de dos subgenotipos o cepas presentes en el país. Otra evidencia que demuestra la variación entre las cepas de campo se observó en el análisis filogenético a partir de las secuencias obtenidas, el cual muestra la formación de “clusters” alejados genéticamente. La distancia genética observada en ORF 7 confirma la formación de cepas por regiones mostrando mayor similitud entre la muestra obtenida de Guanajuato (A4) con la de Puebla (A16); mientras que la G2 (Guanajuato), G3 (Michoacán) y G6 (Sonora) se acercan más a las de referencia (VR2332). En biología, la filogenética es el estudio de la relación evolutiva entre grupos de organismos que es obtenida a partir de datos de secuenciación molecular. La construcción del árbol filogenético confirma que las muestras obtenidas pertenecen al tipo II del virus de PRRS, demostrando mayor similitud con otros subtipos virales pertenecientes a este subtipo. Estudios realizados por Lara-Puente y colaboradores (2012) establecen que los virus mexicanos parecen estar relacionados regionalmente, sin embargo, nuestros resultados demuestran que aun dentro de un mismo estado se pueden encontrar diferentes variantes (Lara-Puente *et al.*, 2012).

Al realizar la técnica de RT-PCR para determinar el número de muestras positivas se hizo un hallazgo incidental, donde encontramos una variación en los tamaños de los amplicones obtenidos, así como presencia de varios amplicones en una misma muestra. Este hallazgo fue el que nos llevó a elegir las muestras que servirían para la seroneutralización. Es importante mencionar que en las ocasiones en las que se presentó más de una banda, el control positivo siempre presentó solo una. Esto es relevante para descartar el bandeo inespecífico que puede ocurrir con temperaturas inadecuadas en la RT-PCR. Shi y colaboradores (2010) aseguran que el polimorfismo de tamaño encontrado en el ORF 7 es un indicador estable e independiente que puede funcionar para identificar subtipos, mientras que Jackova y colaboradores (2012) mencionan que la variación que presenta no podría utilizarse para identificar subtipos. (Shi *et al.* 2010, Jackova *et al.* 2012) Sin embargo, ellos trabajan con un cambio de tamaño de unas cuantas bases, mientras que los resultados que se obtuvieron muestran tamaños de amplicones con variaciones hasta de 70 pb aproximadamente. Por otro lado, las muestras que presentan más de un amplicon, podrían indicar que se encuentra más de una cepa en una misma granja o hasta en un mismo animal. En estudios realizados acerca de la variabilidad del virus de PRRS, se ha hecho aparente que la diversidad genética del virus puede existir entre granjas del mismo sistema de producción, en la misma granja e incluso en el mismo individuo. (Chang *et al.* 2002, Meng 2000, Straw *et al.* 2006)

Con los resultados obtenidos de secuenciación, podemos afirmar que no se encontró presencia de la cepa europea en nuestro país. Este resultado sugiere que no ha sido introducida a nuestro país, sin embargo, en EE. UU se reporta su presencia desde el año 1999 y varios estudios a lo largo de los años han comprobado su presencia. (Chand *et al.* 2012) Además, si tomamos en cuenta la situación comercial, en la que la confederación de porcicultores mexicanos reporta una importación de 15,177 animales vivos para reproducción en agosto del 2012, de los cuales 13 467 provienen de Estados Unidos y el resto de otros países que no especifican, hace pensar que difícilmente no ha sido

introducido a nuestro país. (www.porcimex.org) Es necesario seguir realizando diagnóstico específico y sensible que corrobore este resultado.

El número de muestras que resultaron positivas con la técnica RT-PCR y los oligonucleótidos diseñados muestran una presencia de positividad del 57.93% del virus en México, resultados similares a estudios realizados anteriormente como el de Salinas Melendez (2008) en el que reportan en Nuevo León una prevalencia de hasta 56% en el área de finalización en 5 granjas. (Salinas-Melendez *et al.*, 2008) Cabe mencionar que el 76% de las muestras procesadas corresponden a sueros y se debe tomar en cuenta que no es la muestra ideal para encontrar al virus en cerdos infectados. (Zaulet *et al.*, 2012)

Finalmente podemos concluir que la identificación de cepas endémicas con similitud antigénica es indispensable para el desarrollo de vacunas eficientes en nuestro país que mejoren el control de las cepas virales de PRRS y los estudios de monitoreo animal. Se debe continuar investigando con el uso de nuevas tecnologías que permitan determinar variaciones genéticas en el genoma completo del virus, lo cual es importante para la demostración de los epítopes que participan en la respuesta inmune protectora. Así mismo, estos resultados se deben complementar con experimentaciones *in vivo* acerca de la respuesta en el cerdo a las diferentes cepas estudiadas para obtener mejores datos acerca de la capacidad protectora de las mismas.

Como el Ph. D. Eric Nelson menciona: “el virus de PRRS seguirá siendo extremadamente difícil de controlar plenamente debido a la gran variabilidad genética y antigénica. Seguirá adaptándose y cambiando para encontrar formas de evitar las defensas inmunitarias del cerdo. Por ahora ha hecho un muy buen trabajo de evadir la respuesta inmunitaria protectora a través de blindaje de epítopes críticos por medio de glicanos y distraer el sistema inmune con zonas superficiales variables.” (Comunicación Personal Ph. D. Eric Nelson)

REFERENCIAS

- Albina E. (1997). Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. *Vet Micro.* 55 (309). p. 316.
- Archetti I, Horsfall F. (1950). Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization *in ovo* with heterologous immune serum. *J Exp Med.* 92 (5). p. 441.
- Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MJ. (2004a). Genetic diversity and possible avenues of dissemination of Porcine Reproductive and Respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *J Swine Health Prod.* 12 (4). p. 170-175.
- Belloc C, Lurette A, Keeling M. (2010). Modelling PRRSV control within a pyramidal network of pig movements. *Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada.* July 18-21. p. 266
- Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robinson D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR2332). *J Vet Diagn Invest.* 4 (127). p. 133.
- Benfield DA, Collins JE, Dee SA, Halbur P, Joo HS, Lager KM, Mengeling WL, Murtaugh MP, Rossow KD, Stevenson GW, Zimmerman JJ. (1999). *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus.* Diseases of **swine**. 8th edition. Iowa State University Press. p.201-232.
- Brar MS, Shi M, Ge L, Carman S, Murtaugh MP and Leung FC. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ontario, Canada 1999 to 2010:

genetic diversity and restriction fragment length polymorphisms. *J Gen Virol.* 92. .p. 1391–1397

- Cavanagh D (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol.* 142(3). p. 629-33.
- Chang CC, Yoon KJ, Zimmerman JJ, Harmon KM, Dixon PM, Dvarak CM, Murtaugh MP. (2002). Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J Virol.* 76 (4750). p.4763.
- Chand R, Tribble BR, Rowland RRR. (2012). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opin Virol.* 2 (3). p. 256–263.
- Cheon DS, Chae C. (2000). Restriction fragment length polymorphism analysis of open reading frame 5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in Korea. *Arch Virol.* 145 (1481). p. 1488.
- Cho JG, Dee SA, Deen J, Trincado C, Fano E, Jiang Y, Faaberg K, Murtaugh MP, Guedes A, Collins JE, Joo HS. (2006). The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity on the shedding of Porcine reproductive and respiratory síndrome virus in aerosols from experimentally infected pigs. *Can J Vet Res.* 70 (297). p. 301.
- Cho JG, Dee SA. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 66 (3). p. 655–662
- Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCullough S, Morrison RB, Joo HS, G David, Chladek D. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest*; 4. p.117-126.

- Darwich L, Díaz I, Mateu E. (2010). Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Vir Res* 154. 123–132. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.017. [Revisado el 20-08-14].
- Dee Scott A, Montserrat Torremorell, Kurt Rossow, Carrie Mahlum, Satoshi Otake, Kay Faaberg. (2001). Identification of genetically diverse sequences (ORF 5) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a swine herd. *Can J Vet Res*; 65:254-260.
- Díaz-Luque I. (2006). Caracterización de la respuesta inmune en lechones durante la infección y tras la vacunación con el virus del PRRS. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Diosdado VF, González-Vega D, Moles-Cervantes LP, Morilla GA. (2004). Asociación entre anticuerpos contra el virus del síndrome disgenésico y respiratorio porcino y anticuerpos contra otros patógenos. *Vet Mex.* 35 (2). p. 147-152.
- Done S. Diagnóstico del PRRS. (2004). Veterinary Laboratories Agency. Reino Unido.
- Doorselaere JV, Geldhof M, Nauwynck HJ, Delputte P. (2010). Characterization of a circulating PRRSV strain by means of random PCR cloning and full genome sequencing. *Virology* 8 (160).
- Du Y, Lu Y, Qi J, Wu J, Wang G, and Wang J. (2012). Complete Genome Sequence of a Moderately Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Variant Strain. *J Virol.* 86(24). p. 13883–13884. Disponible en: doi: 10.1128/JVI.02731-12 [Revisado el 23-09-14]

- Eeuri N, Choi-kyu P, Kim K, Yi-Seok J, Sang-Geon Y, Lee C. (2009). Complete genomic characterization of a European Type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate in Korea. *Arch Virol.* 154. p. 629-638.
- Evans CM, Medley GF, Green LE. (2010). The impact of respiratory disease on production in the pig industry in Great Britain. *Proceedings of the 21st IPVS Congress*, Vancouver, Canada, July 18-21. p. 152
- Flores–Mendoza L, Hernández J. (2010). Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Vet Méx.* 41 (2).
- Franzo G, Cecchinato M, Martini M, Ceglie L, Gigli A, Drigo M. (2014). Observation of high recombination occurrence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in field condition. *Virus Res.* Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.08.005> [Revisado el 12-08-14]
- Yin G, Gao L, Shu X, Yang G, Guo S, Li W. (2012). Genetic Diversity of the ORF5 Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates in Southwest China from 2007 to 2009. *Plos One.* 7 (3). p. 33756.
- Genzow MC, Truyen U, Wilhelm S, Schagemann G. (2006). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) a ring test performed in Germany to assess RT-PCR Detection Methods. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*, Copenhagen, Denmark; 2 (1).
- Gomez-Laguna J, Rodriguez-Gomez IM, Barranco I, Pallares FJ, Salguero FJ, Bernabe A, Carrasco L. (2010). IL-10 and TGF β expression in the lung and tonsil of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Proceedings of the 21st IPVS Congress*. Vancouver, Canada, July 18-21. p. 147.

- Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Pallarés FJ, Carrasco L. (2013). Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *The Vet J.* 195. p. 148–155.
- Greiser-Wilke I, Fiebig K, Drexler C, Beilage Grosse E. (2010) Genetic Diversity of Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig-dense region of North-Western Germany. *Vet Micro.* 143. p. 213-223.
- Halbur PG, Miller LD, Paul PS, Meng XJ, Huffman EL, Andrews JJ. (1995a). Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old calostrum-deprived pigs. *Vet Pathol.* 32. p.200-204.
- Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng X-J, Lum MA, Andrews JJ, Rathje JA. (1995b). Comparison of the Pathogenicity of Two US Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates with that of the Lelystad Virus. *Vet Pathol.* 32. p.648.
- Halbur PG, Paul PS, Frey ML, Landgraf J, Eernisse K, Meng XJ, Andrews JJ, Lum MA, Rathje JA. (1996). Comparison of the Antigen Distribution of Two US Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates with that of the Lelystad Virus. *Vet Pathol*; 33. p. 159.
- Han J, Liu G, Wang Y, Faaberg KS. (2007). Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture. *J Virol.* 81(18). p. 9878-90.
- Heneidi A. (2014). *Perspectivas Sanitarias de PRRS*. Reunion AMVEC. www.amvec.com/pdfs/assad_prrs.pdf. [Revisado el 23-09-14].

- Holtkamp D, Kliebenstein J, Johnson C, Mabry J, Neumann E, Bush E, Seitzinger A and Green A. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production* 21(2). p. 72-84.
- <http://viralzone.expasy.org>. [Revisado el 25-09-14].
- Hugh YC, Alexander H, Carman S, Lloyd D, Josephson G, Maxie MG. (2002). Restriction fragment length polymorphism of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses recovered from Ontario farms, 1998–2000. *J Vet Diagn Invest.* 14. p. 343–347.
- Jackova A, Vlasakova M, Leskova V, Vilcek S. (2012). Identification of a new unusual length polymorphism of the nucleocapsid protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes.* 45 (3). p. 590-592.
- Johnson C, Cano J.P. (2013). *PRRS control and eradication options for breed to wean farms*. North American PRRS Symposium Proceedings, Chicago, Illinois. p 26.
- Karniychuk UU, Saha D, Geldhof M, Vanhee M, Cornillie P, Van den Broeck W, Nauwynck HJ. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb Path.* 51. p. 194-202.
- Karniychuk UU and Nauwynck HJ. (2013). Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res.* 44. p.95.
- Kim AHS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, and Frey ML. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol.* 133. p. 477-483.

- Kim SH, Roh IS, Choi EJ, Lee C, Lee CH, Lee KH, Lee KK, Song YK, Lee OS, Park CK. (2010). A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea. *Vet Micro.* 143. p. 394-400.
- Kim WI, Lee DS, Johnson W, Roof M, Cha SH, Yoon KJ. (2007). Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. *Vet Micro.* 123(1-3). p.1-14.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 56 (41). p.361.
- La biotecnología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y el desarrollo de vacunas. (2004). Manual de la OIE sobre animales terrestres. I.1.8. p. 75-98.
- Ladinig A, Wilkinson J, Ashley C, Detmer SE, Lunney JK, Plastow G, Harding JC. (2014) Variation in fetal outcome, viral load and ORF5 sequence mutations in a large scale study of phenotypic responses to late gestation exposure to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One.* 9(4). Available on doi: 10.1371/journal.pone.0096104. [Accessed 23-07-14]
- Lager WL, Vorwald KM, AC. (1995). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 7 (3). p. 16.
- Lara-Puente J, Echeveste-García de Alba R, Quezada Monroy F, Cortés-Fernandez R, Castro-Peralta F, Lozano-Duberland B, Sarfati-Mizrahi D, Soto Priante E. (2012). Genotipificación y Evolución del virus de PRRS en México. Memorias del XLVII Congreso Nacional AMVEC, Guadalajara, Jalisco, 18 al 21 de Julio. p. 173.

- Lequin RM. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51 (12). p. 2415-2418. doi: 10.1373/clinchem.2005.051532. Revisado el 25 de agosto del 2014.
- Lemke C, Haynes J, Spaete R, Adolphson D, Vorwald A, Lager K, *et al.* (2004). Lymphoid hyperplasia resulting in immune dysregulation is caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in neonatal pigs. *J Immunol.* 172. p.1916-1925.
- Lunney JK, Chen H. (2010). Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Vir Res.* 154. p. 161–169
- Macías MJ, Yépiz-Plascencia G, Osorio F, Pinelli-Saavedra A, Reyes-Leyva J, Hernández J. (2006). Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México. *Vet Méx.* 37 (2). p. 197-208.
- Main R, Harmon K, Gauger P, Johnson J, Pillatzki A, Yoon KJ, Murtaugh MP (2013). *New findings in anti-PRRS immunity.* North American PRRS Symposium Proceedings. Chicago, Illinois. p. 29.
- Meng. XJ. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Micro.* 74. p.309-329.
- Meulenbergh JJ, Petersen den Besten A, de Kluyver E, Moormann RJ, Schaaper WM, Wensvoort G. (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology.* 206. p. 155–163.

- Milián F, Cantó GJ, Weimersheimer J, Coba MA, Anaya AM, Correa P. (1994). Estudio Seroepidemiológico para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus del síndrome disgénico del cerdo en México. *Tec. Pecu. Mex.* 32 (3). p. 139-144.
- Misinzo GM, Delputte PL, Nauwynck HJ. (2008). Involvement of proteases in porcine reproductive and respiratory syndrome virus uncoating upon internalization in primary macrophages. *Vet. Res.* 39. p.55 Disponible en DOI: 10.1051/vetres:2008031. [Revisado el 18-02-13].
- Mullis K. (1998). *Dancing Naked in the Mind Field*. New York: Pantheon Books.
- Mullis K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *S Ame.* 262 (4). p. 56-61, 64-5.
- Morilla A, González-Vega D, Diosdado F, Estrada E. (2003). *Seroepidemiology Of Prrs In México. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases Proceedings Rome*, Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/3906498/International-Symposium-on-Emerging-and-Re-emerging-Pig-Diseases-RomeMengeling> [Revisado el 27-08-13]
- Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TT, Leung FC. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154(1-2). p. 18-30. Disponible en: doi: 10.1016/j.virusres.2010.08.015. [Revisado el 25-09-14]
- Murtaugh MP, Genzow M. (2011). Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine.* 29. p. 8192– 8204.

- Novosel D, Stadejek T, Chrabos K, Lipej K, Roic B, Jungic A. (2010). Histopathological findings in fetuses positive on porcine reproductive and respiratory syndrome by PCR or immunohistochemistry. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada – July 18-21. p. 202.
- Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 227(3). p. 385-92.
- Nieuwenhuis N, Duinhof TF, Van NeS A. (2012) Economic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Veterinary Record.* 170. p.225.
- Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, and Lopez OJ. (2002). Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain *Virology Papers.* 76(9). p. 4241–4250. Disponible en: <http://digitalcommons.unl.edu/virolopub/72>. [Revisado el 24-09-14].
- Petry M, Paarlberg PL, Lee JG. (1999). PRRS and the North American Swine Trade: A Trade Barrier Analysis. *J Agri App Econ.* 31(3). p. 425–436.
- Plagemann PGW. (2006). Neutralizing Antibody Formation in Swine Infected with Seven Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus as Measured by Indirect ELISA with Peptides Containing the GP5 Neutralization Epitope. *Vir Immuno.* 19(2). p. 285–293
- Polson D, Hartsook G, Carmichael B. (2010a). A comparison of individual versus pooled sample testing on pool-level and case-level PRRS virus PCR detection

sensitivity and specificity. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. p 206

- Polson D, Carmichael B, Torremorell M, Hartsook G. (2010b). *Use of stillborn (pre-colostrals) piglets as a sample source to assess viral circulation in PRRSV positive sow herds*. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. p. 204
- Prather RS, Rowland RRR, E Catherine, Tribble B, Kerrigan M, Bawa B, Teson JM, Mao J, Lee K, Samuel MS, Whitworth Kristin M, Murphy CN, Egen T, Green JA. (2013). An Intact Sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) Is Not Required for Attachment/Internalization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Virol.* 87(17) p. 9538. Disponible en DOI: 10.1128/JVI.00177-13. [Revisado el 15-08-14].
- Prieto C, Castro JM. (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63(1). p. 1–16.
- Rabinow P. (1996). *Making PCR: A Story of Biotechnology*. Chicago: University of Chicago Press.
- Robinson J. Paul, Sturgis Jennifer, L. Kumar George. *IHC Staining Methods, Fifth Edition Chapter 10, Immunofluorescence* 61-65.
- Rossow KD. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet Pathol.* 35 (1).
- Rossow KD, Collins JE, Goyal SM, Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA. (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 32. p. 361-373.
- Rossow KD, Bautista EM, Goyal SM, Molitor TW, Murtaugh MP, Morrison RB, Benfield DA, *et al.* (1994) Experimental porcine reproductive and respiratory

syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J Vet Diag Invest.* 6. p.3-12.

- Rowland RRR. (2013). Not all PRRSV antibodies are created equal. North American PRRS Symposium Chicago, Illinois. p. 30
- Rowland RRR. (2010). The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. *Vir Res.* 154. p. 114–122. doi:10.1016/j.virusres.2010.09.001. [Revisado el 15-08-14].
- Salinas Meléndez JA, Lara Arias J, Flores Andrade H, Ávalos Ramírez R, Zárate Ramos JJ, Riojas Valdés V, Segura Correa JC. (2008). Presencia de animales seropositivos al síndrome reproductivo y respiratorio porcino en Nuevo León. *Vet Méx.* 39(2).
- Sastradipura DF, Nakanishi H, Tsukuba T, Nishishita K, Sakai H, Kato Y, Gotow T, Uchiyama Y, Yamamoto K. (1998). Identification of cellular compartments involved in processing of cathepsin E in primary cultures of rat microglia. *J Neurochem.* 70(5). p. 2045-56.
- Shia M, Lama TTY, Hona CC, Huia R KH, Faabergb KS, Wennblomc T, Murtaugh M, Stadejeke T, Leunga FC. (2010). Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Vir Res.* 154. p. 7–17.
- Snijder EJ, Meulenberc JM. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol.* 79. p. 961–979.
- Stadejek T, Skrzypiec E, Chabros K, Pejsak Z, Podgorska K. (2010). *Comparison of four ELISAs for detection of antibodies against different genetic subtypes of European genotype PRRSV.* Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. p. 145.

- Straw B, Zimmermann JJ, D’Allaire S, Taylor DJ. (2006). Diseases of Swine. Ninth edition. Iowa (USA). Blackwell Publishing. p. 387-417
- Strutzberg-Minder K, Beyerbach M, Tschentscher A, Boehmer J, Kreienbrock L, Homuth M. (2010). Analysis of ELISA and PCR testing for PRRS in German pig herds. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada. p. 481
- Taylor DJ, Diseases of Swine, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, IA. p. 201–232.
- Takuya I, Masumi T, Takashi N, Yasuo M, Takeo S. (2001). Analysis of Open Reading Frame 5 in Japanese Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Vet Med Sci.* 63 (11). p. 1203-1207.
- Truyen U, Wilhelm S, Genzow M, Schagemann G. (2006B). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): A Ring Test Performed in Germany to Assess RT-PCR Detection Methods. *J Vet Med.* 53. p. 68-74.
- Van Breedam W, Delputte PL, Van Gorp H, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X, Nauwynck HJ. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol.* 91. p. 1659-1667. Disponible en: DOI 10.1099/vir.0.020503-0. [Revisado el 16-08-14]
- Van Gorp H, Van Breedam, Delputte PL, Nauwynck HJ. (2009). The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Arch Virol.* 154(12). p.1939-43.
- Wadey CN, Faragher JT. (1981) Australian infectious bronchitis viruses: Identification of nine subtypes by a neutralization test. *Res in Vet Sc.* 30. p.70–74

- Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB. (1997a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet Microbiol.* 57 (1). p.69-81. Disponible en DOI 10.1007/s00705-009-0527-1. [Revisado el 18-08-14]
- Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopher-Hennings J, Nelson EA. (1997b). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet Microbiol.* 55 (1-4). p.231-40.
- Wu J, Li J, Tian F, Ren S, Yu M, Chen J, Lan Z, Zhang X, Yoo D, Wang J. (2009). Genetic variation and pathogenicity of highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China. *Arch Virol.* 154. p. 1580-1597.
- Wu Haigang, Rao Pinbin, Jiang Yonghou, Opriessnig Tanja, Yang Zongqi. (2014). A sensitive multiplex real-time PCR panel for rapid diagnosis of viruses associated with porcine respiratory and reproductive disorders. *Molecular and Cellular Probes* xxx 1-7. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2014.07.001> . [Revisado el 13-08-14]
- www.atcc.com. [Revisado el 16-08-14]
- www.siap.com.mx [Revisado el 25-10-14]
- www.porcilis-prss.com [Revisado el 26-10-14]
- www.porcimex.org [Revisado el 26-10-14]
- www.veterinaria.org [Revisado el 16-08-14]
- Yufeng L, Xinglong W, Ping J, Wen C, Xianwei W. (2008). Genetic analysis of two porcine reproductive and respiratory síndrome viruses with different virulence isolated in China. *Arch Virol.* 153. p. 1877-1884.

- Zaulet M, Gurau MR, Petrovan V, Buburuzan L. (2012). Genetic Diversity Characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates in Romania, Based on Phylogenetic Analysis. *Int J Mol Sci.* 13. p. 12046-12061; Disponible en doi:10.3390/ijms130912046
- Zhang J., Zimmerman J. (2013). *Trends in applied PRRSV diagnostics (2009 to 2013)*. North American PRRS Symposium Proceedings. Chicago, Illinois. p. 27.
- Zhoua YJ, Yua H, Tianb ZJ, Li GX, Haob XF, Yana LP. (2009). Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008. *Vir Res.* 144. p.136–144.
- Zimmerman J. (2003). Historical Overview of PRRS Virus. *The PRRS Compendium*, second edition. p. 1-6.

ANEXOS

1. Clasificación de las muestras según su estado de procedencia.

Numero	Estado
1	Baja California Norte
2	Baja California Sur
3	Sonora
4	Chihuahua
5	Coahuila
6	Nuevo Leon
7	Tamaulipas
8	Sinaloa
9	Durango
10	Zacatecas
11	San Luis Potosi
12	Nayarit
13	Aguascalientes
14	Jalisco
15	Guanajuato
16	Querétaro
17	Hidalgo
18	Veracruz
19	Colima
20	Michoacán

21	Estado de México
22	Distrito Federal
23	Tlaxcala
24	Puebla
25	Morelos
26	Guerrero
27	Oaxaca
28	Tabasco
29	Chiapas
30	Campeche
31	Yucatán
32	Quintana Roo

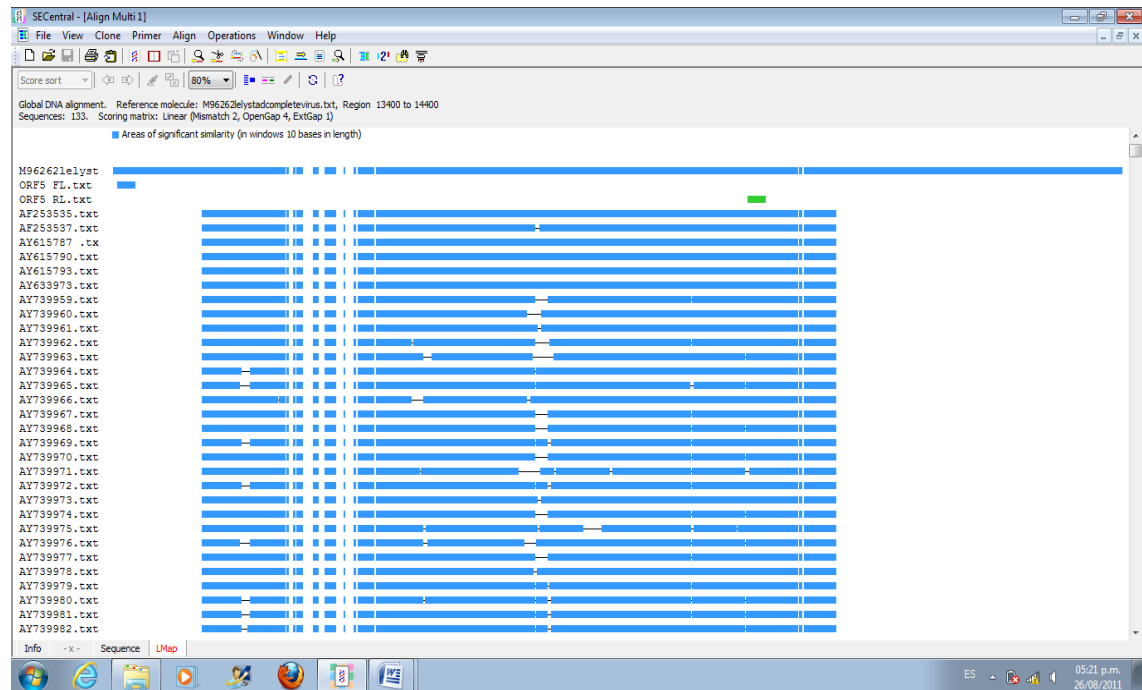
2. Muestras procesadas.

No. Muestra	Edad/Signos clínicos	No. De Muestras	Tipo de M.	Procedencia	Fecha de Recepción	PCR ORF 5	PCR ORF 7
3.1.1		1	Suero	Sonora		N	P
3.1.2		1	Suero	Sonora		N	P
3.1.3		1	Suero	Sonora		N	P
3.1.4		1	Suero	Sonora		N	P
3.1.5		1	Suero	Sonora		N	P
3.1.6 (G6)		1	Suero	Sonora		P	P
3.1.9		1	Suero	Sonora		N	P
5.1.1		1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	N	N
5.1.2	25 días	1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	P	N
5.1.3	45 días	1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	P	N
5.1.4	65 días	1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	P	N
5.1.5	95 días	1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12		P
5.1.6	125 días	1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12		P
5.1.7	155 días	1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	P	P
5.1.8		1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	P	P
5.1.9		1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	P	P
5.1.10		1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	P	N
5.1.11		1	Suero	Saltillo, Coahuila	23-10-12	P	N
14.6.1		1	Suero	Tepatitlan de Morelos, Jalisco		N	N
14.6.2		1	Suero	Tepatitlan de Morelos, Jalisco		P	N
15.1.6 (G2)	9 semanas	1	Suero	Pénjamo Guanajuato	11-10-12	P	N
15.1.7	9 semanas	1	Suero	Pénjamo Guanajuato	11-10-12	P	N
15.1.8	9 semanas	1	Suero	Pénjamo Guanajuato	11-10-12	P	N
15.1.9	9 semanas	1	Suero	Pénjamo Guanajuato	11-10-12	P	N
15.1.10	9 semanas	1	Suero	Pénjamo Guanajuato	11-10-12	P	P
15.2.1	3a semana	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	P
15.2.2	3a semana	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	P
15.2.3	3a semana	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	N
15.2.4	3a semana	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	N
15.2.27	1 parto	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	N
15.2.28	1 parto	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	N
15.2.29	1 parto	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	N
15.2.30	1 parto	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	P
15.3.8	8 semanas	1	Suero	Abasolo, Guanajuato	18-10-12	N	P
15.3.9	8 semanas	1	Suero	Abasolo, Guanajuato	18-10-12	N	P
15.3.10	8 semanas	1	Suero	Abasolo, Guanajuato	18-10-12	N	P
15.5.1	17 semanas	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	P
15.5.2	17 semanas	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	P
15.5.3	17 semanas	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	N
15.5.4	17 semanas	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	N
15.5.5	17 semanas	1	Suero	Pénjamo, Guanajuato	18-10-12	N	N
15.8.1 (A4)		1	Pulmón	Pénjamo, Guanajuato	20-04-12	P	N
15.9.1	8 semanas	1	Suero	Abasolo, Guanajuato		N	P
17.1.1	Hembra repetida o abortó	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		N
17.1.2	Hembra repetida o abortó	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		N
17.1.3	Hembra repetida o abortó	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		N
17.1.4	Hembra repetida o abortó	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		N
17.1.5	Hembra repetida o abortó	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		N
17.1.6	Hembra con momias	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		N
17.1.7	Hembra con lechones nacidos muertos	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		N
17.1.8	Hembra con momias	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		N
17.1.9	Hembra con momias	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		P
17.1.10	Hembra con momias	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		P
17.1.13	21 días	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		P
17.1.14	21 días	1	Hisopo Nasal	Santiago Tulantepec, Hidalgo	19-03-12		P
17.2.3	Destete	3	Hisopo Nasal	Tulancingo, Hidalgo	20-07-12		P
17.2.4	Hembra maternidad	2	Hisopo Nasal	Tulancingo, Hidalgo	21-07-12		N
17.2.6	Hembra maternidad	2	Hisopo Nasal	Tulancingo, Hidalgo	23-07-12		N
17.2.8	Detete	2	Hisopo Nasal	Tulancingo, Hidalgo	25-07-12		P
17.2.10	Crecimiento	2	Hisopo Nasal	Tulancingo, Hidalgo	22-07-12		P
18.1		3	Pulmón	Veracruz	30-08-12		P

No. Muestra	Edad/Signos clínicos	No. De Muestras	Tipo de M.	Procedencia	Fecha de Recepción	PCR ORF 5	PCR ORF 7
20.2.2	7 días	1	Suero	La Piedad, Michoacan	11-10-12	P	P
20.2.3	7 días	1	Suero	La Piedad, Michoacan	11-10-12	P	P
20.2.4	7 días	1	Suero	La Piedad, Michoacan	11-10-12	P	P
20.2.5	7 días	1	Suero	La Piedad, Michoacan	11-10-12	P	N
20.2.18	60 días	4	Suero	La Piedad, Michoacan	11-10-12	P	N
20.4.1		1	Suero	La Piedad, Michoacan		P	N
20.4.2		1	Suero	La Piedad, Michoacan		P	N
20.5.1	7a semana	1	Suero	La Piedad, Michoacan	18-10-12	P	P
20.5.2	7a semana	1	Suero	La Piedad, Michoacan	18-10-12	P	P
20.5.3	7a semana	1	Suero	La Piedad, Michoacan	18-10-12	P	P
20.5.4	7a semana	1	Suero	La Piedad, Michoacan	18-10-12	P	P
20.5.5	7a semana	1	Suero	La Piedad, Michoacan	18-10-12	P	P
21.1.1	Hembra repetida o abortó	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	17-02-12	N	N
21.1.2	Hembra repetida o abortó	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	18-02-12	N	N
21.1.3	Hembra repetida o abortó	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	19-02-12	N	N
21.1.4	Hembra repetida o abortó	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	20-02-12	N	N
21.1.5	Hembra repetida o abortó	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	21-02-12	N	N
21.1.6	6 s	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	22-02-12	N	N
21.1.7	5 s	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	23-02-12	N	P
21.1.8	4 s	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	24-02-12	N	N
21.1.9	3 s	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	25-02-12	N	N
21.1.10	7 s	1	hisopo nasal	Axapuxco, Estado de México	26-02-12	N	N
21.2.1		1	Suero	Estado de México		N	N
21.3.1		1	Suero	Xonacatlan, Estado de México	24-08-12	N	N
21.3.2		1	Suero	Xonacatlan, Estado de México	24-08-12	N	N
21.3.3		1	Suero	Xonacatlan, Estado de México	24-08-12	N	N
21.3.4		1	Suero	Xonacatlan, Estado de México	24-08-12	N	N
21.3.5		1	Suero	Xonacatlan, Estado de México	24-08-12		N
22.1.1		1	Suero	Xochimilco, DF	17-09-12		N
22.1.2		1	Suero	Xochimilco, DF	17-09-12		N
22.1.3		1	Suero	Xochimilco, DF	17-09-12		N
23.1.1	Engorda	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.2	Engorda	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.3	Engorda	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.4	Engorda	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.5	Engorda	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.6	Gestación	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.7	Gestación	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.8	Gestación	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.9	Gestación	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
23.1.10	Gestación	1	Suero	Huamantla, Tlaxcala	18-07-12		N
24.1.1 (A16)		2	Pulmón	Puebla	25-04-11	P	P
25.2.2	Hembra sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	P
25.2.3	Hembra sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	P
25.2.4	Hembra sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	P
25.2.5	Hembra sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	P
25.2.6	Lechon sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	N
25.2.7	Lechon sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	P
25.2.8	Lechon sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	P
25.2.9	Lechon sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	P
25.2.10	Lechon sin signos	1	Suero	Tenango, Morelos	19-07-12	N	P
25.3.1		2	Suero	Coatlan, Morelos	24-08-12	N	P
25.3.3		2	Suero	Coatlan, Morelos	24-08-12	N	P
25.3.5		2	Suero	Coatlan, Morelos	24-08-12	N	N
25.3.7		1	Suero	Coatlan, Morelos	24-08-12	P	N
25.3.8		1	Suero	Coatlan, Morelos	24-08-12		N
25.3.9		1	Suero	Coatlan, Morelos	24-08-12		P
25.4.1		1	Suero	Coatlan, Morelos	30-08-12		P
25.4.2		1	Suero	Coatlan, Morelos	30-08-12		P
25.4.3		1	Suero	Coatlan, Morelos	30-08-12		P

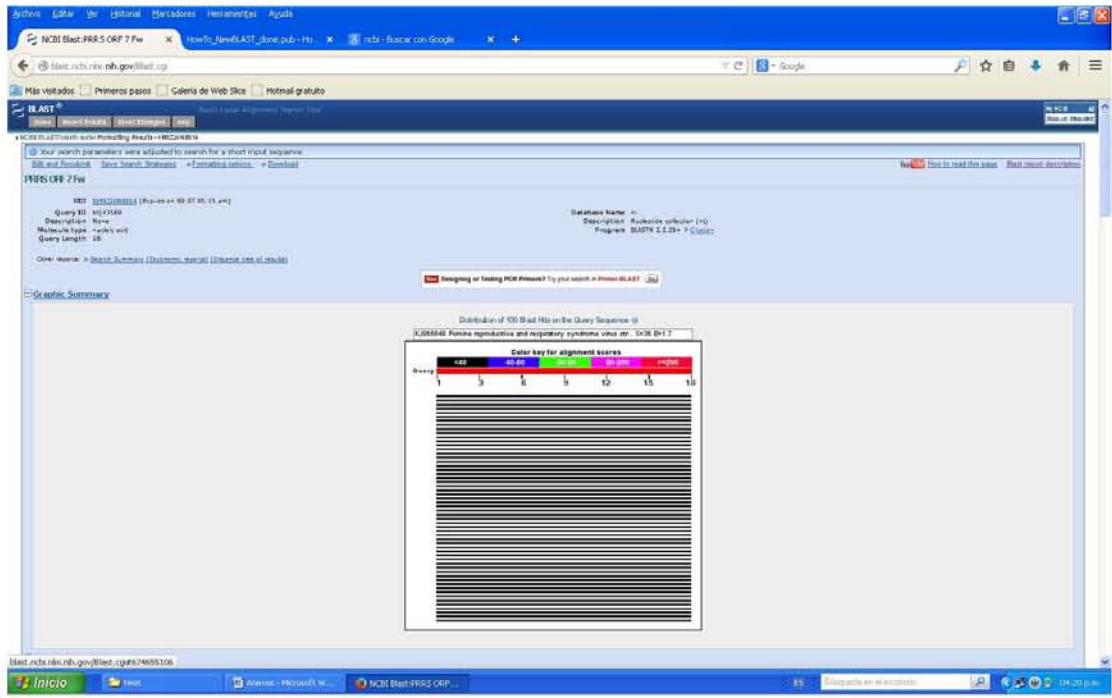
No. Muestra	Edad/Signos clínicos	No. De Muestras	Tipo de M.	Procedencia	Fecha de Recepción	PCR ORF 5	PCR ORF 7
25.4.3		1	Suero	Coatlan, Morelos	30-08-12		P
25.4.4		1	Suero	Coatlan, Morelos	30-08-12		P
25.4.5		1	Suero	Coatlan, Morelos	30-08-12		P
25.4.6		1	Suero	Coatlan, Morelos	30-08-12		N
25.4.7		1	Suero	Coatlan, Morelos	30-08-12		N

3. Alineación de oligonucleótidos



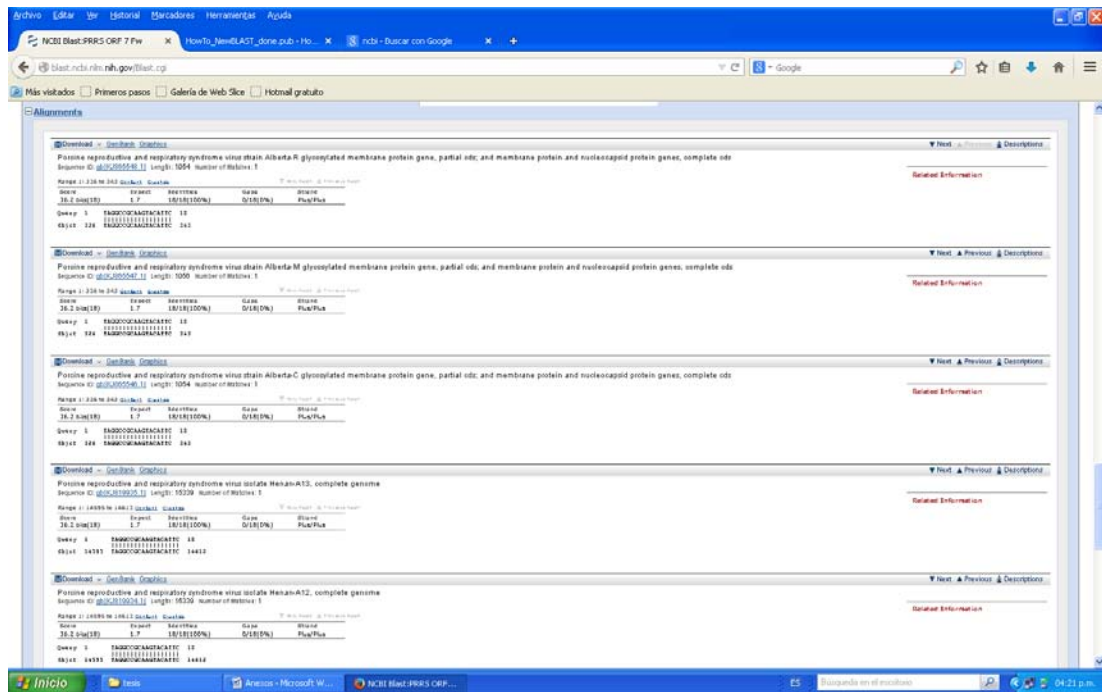
4. BLAST

a) Blast realizado para el oligonucleótido PRRS ORF 7 Forward

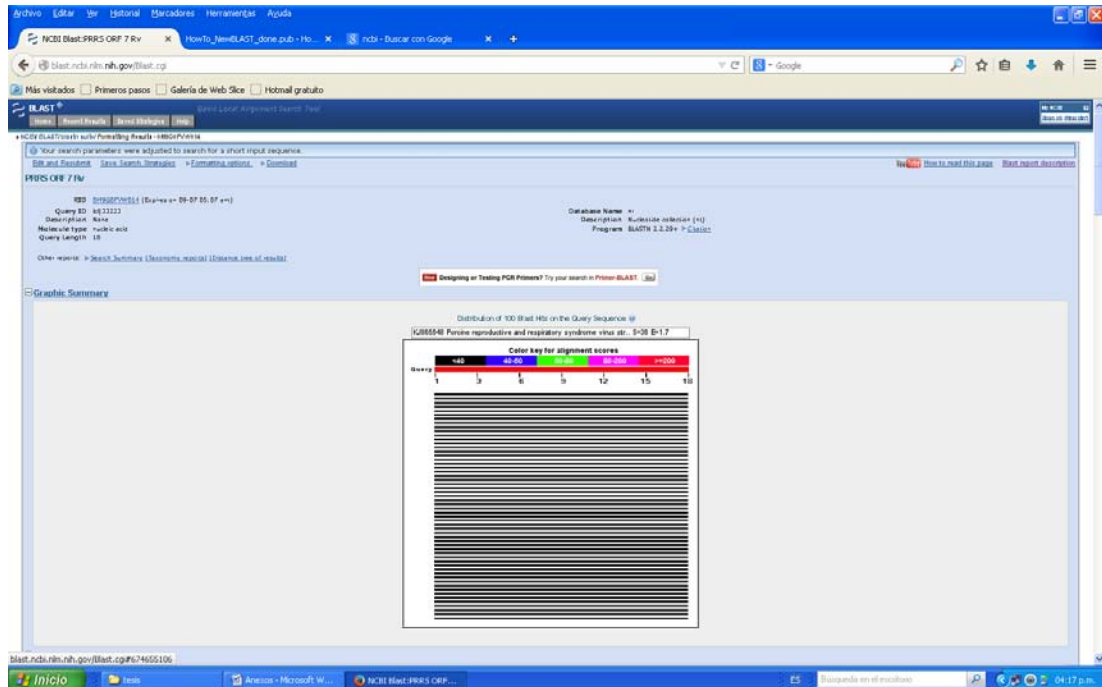


Sequences producing significant alignments:

Description	Max. Score	Total Score	Query Cover	Identical
PRRS virus (GenBank accession: FJ424848.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424849.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424850.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424851.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424852.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424853.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424854.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424855.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424856.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424857.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424858.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424859.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424860.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424861.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424862.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424863.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424864.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424865.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424866.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424867.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424868.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424869.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424870.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424871.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424872.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424873.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424874.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424875.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424876.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424877.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424878.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424879.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424880.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424881.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424882.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424883.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424884.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424885.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424886.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424887.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424888.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424889.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424890.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424891.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424892.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424893.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424894.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424895.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424896.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424897.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424898.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424899.1)	38.2	38.2	100%	1.7
PRRS virus (GenBank accession: FJ424900.1)	38.2	38.2	100%	1.7



b) Blast realizado para el oligonucleótido PRRS ORF 7 Rv



Archivo Editar Ver Historial Búsquedas Herramientas Ayuda

NCBI Blast:PRRS ORF 5 Rv | HomeTo_NeufLAST_dome.pub - Ho... | ncbi - Buscar con Google

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

Más visitados Primeros pasos Galería de Web Slice Notmal gratuito

Algunos resultados

Download - GenBank, GenBank

PREDICTED: Nannoparas gallii sp. H5N1-like 1 (L7811), transcript variant X3, mRNA
 Sequence ID: [gq106100.1](#) Length: 1008 Number of Hits: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Mismatches	Pct/Pos
36.3 (36.1E)	1.7	18/18(100%)	0(0%)	0(0%)	100%

Query 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Hit 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Download - GenBank, GenBank

PREDICTED: Nannoparas gallii sp. H5N1-like 1 (L7811), transcript variant X2, mRNA
 Sequence ID: [gq106100.1](#) Length: 965 Number of Hits: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Mismatches	Pct/Pos
36.2 (36.1E)	1.7	18/18(100%)	0(0%)	0(0%)	100%

Query 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Hit 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Download - GenBank, GenBank

PREDICTED: Nannoparas gallii sp. H5N1-like 1 (L7811), transcript variant X1, mRNA
 Sequence ID: [gq106100.1](#) Length: 1222 Number of Hits: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Mismatches	Pct/Pos
36.3 (36.1E)	1.7	18/18(100%)	0(0%)	0(0%)	100%

Query 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Hit 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Download - GenBank, GenBank

Positive reproductive and respiratory syndrome virus isolate H5N1-A12, complete genome
 Sequence ID: [GQ106100.1](#) Length: 18209 Number of Hits: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Mismatches	Pct/Pos
36.3 (36.1E)	1.7	18/18(100%)	0(0%)	0(0%)	100%

Query 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Hit 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Download - GenBank, GenBank

Positive reproductive and respiratory syndrome virus genomic RNA, nearly complete genome, strain: Yamagata10.7
 Sequence ID: [GQ106100.1](#) Length: 15200 Number of Hits: 1

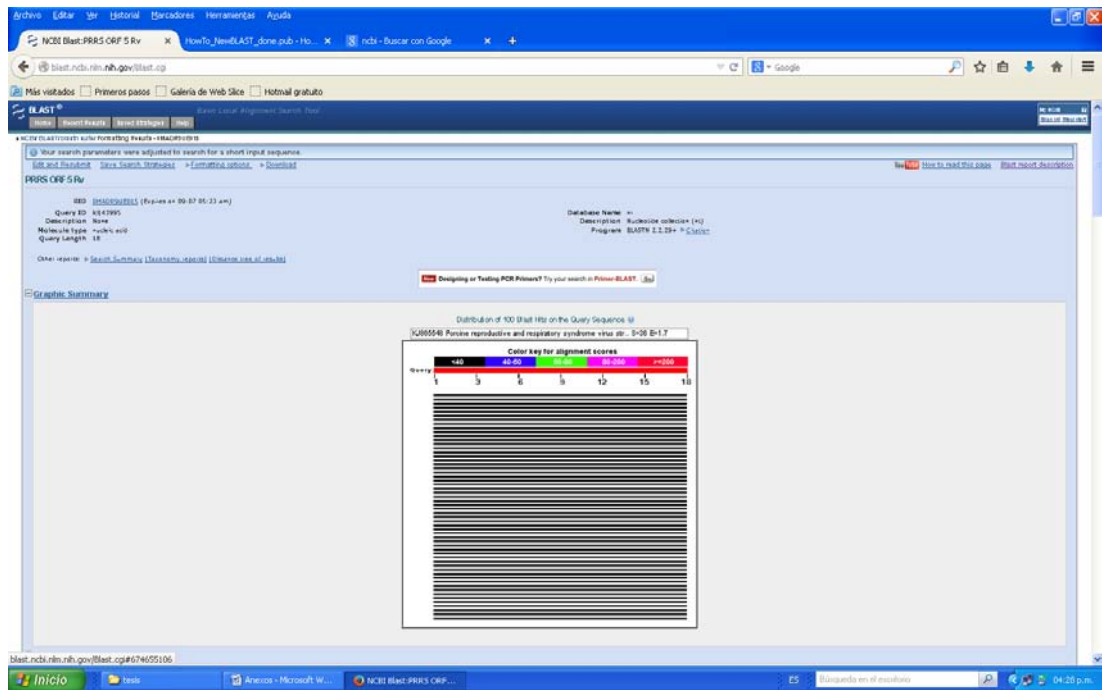
Score	Expect	Identities	Gaps	Mismatches	Pct/Pos
36.3 (36.1E)	1.7	18/18(100%)	0(0%)	0(0%)	100%

Query 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Hit 1: [GACACTTGGGCTATAGDQ 13](#)
 11111111111111111111

Inicio | Inicio - Microsoft W... | NCBI Blast:PRRS ORF... | 25 | Búsqueda en el navegador | 04/24 p.m.

d) Blast del oligonucleótido PRRS ORF 5 Rv

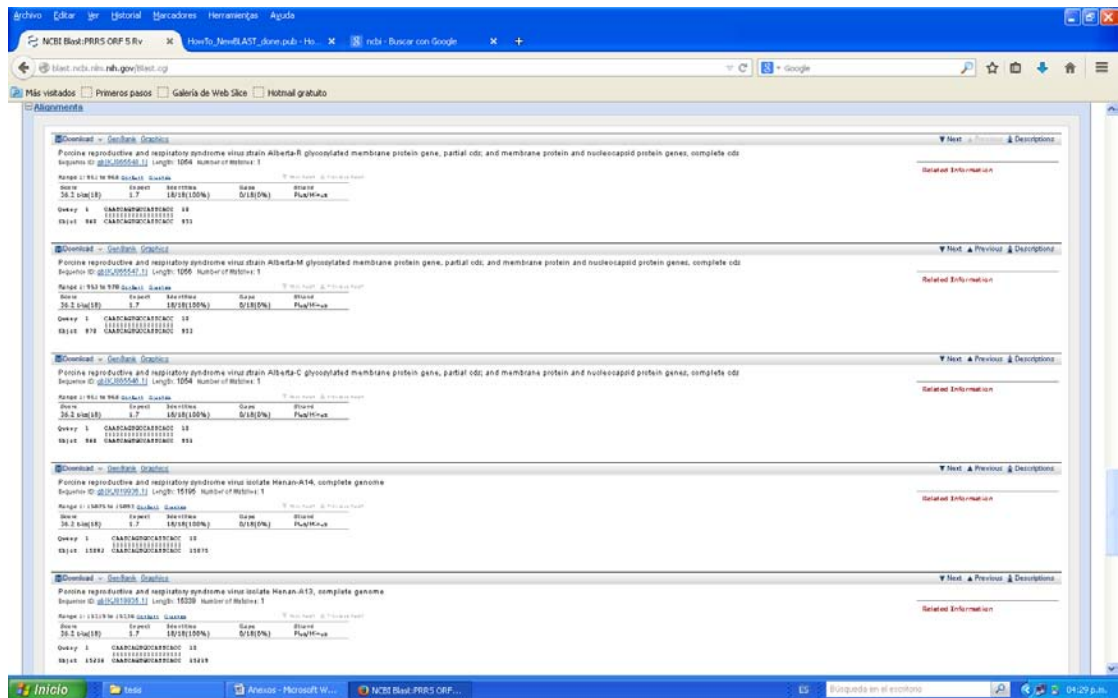


Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected

Alignment	Description	Max score	Ident score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.1
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.2
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.3
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.4
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.5
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.6
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.7
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.8
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.9
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.10
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.11
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.12
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.13
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.14
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.15
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.16
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.17
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.18
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.19
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.20
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.21
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.22
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.23
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.24
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.25
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.26
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.27
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.28
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.29
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.30
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.31
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.32
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.33
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.34
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.35
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.36
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.37
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.38
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.39
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.40
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.41
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.42
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.43
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.44
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.45
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.46
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.47
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.48
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.49
<input type="checkbox"/>	GenBank RefSeq: NC_015211.1:PPRS ORF 5 Rv	36.2	36.2	100%	1.7	100%	U08554.50



5. Buffer de Carbonatos

Preparación de 1 litro

1 litro de agua bidestilada

16.8 g de Bicarbonato de sodio anhidro pM 84.01 (NaHCO₃ JT Baker Cat. 3506-20 para llevarlo a una concentración final de 0.2 M)

6. PBS 10 X (siempre diluir a 1X para su uso)

1 litro de agua bidestilada

3.86 gr de Fosfato de Sodio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄, JT Baker Cat. PI381801)

10.25 g de Fosfato de Sodio dibásico heptahidratado (Na_2HPO_4 , JT Baker Cat. PI382401)

74 g de Cloruro de Sodio (NaCl, JT Baker Cat. 3624-500)

Preparación: Se colocó el cloruro de sodio en 500 ml de agua bidestilada, se colocó el fosfato de sodio dibásico lentamente, se colocaron 300 ml de agua bidestilada y el fosfato de sodio monobásico, se aforó colocando los 200 ml de agua restantes. Mezclar hasta que se hayan diluido las sales.

7. PBS-Tween

Para la preparación de un litro.

PBS a una concentración 1X= 997 ml

Tween 20= 3 ml

8. PBS-BSA 1%

Para la Preparación de .5 litros

500 ml de PBS 3% Tween

5 g de BSA (Sigma Ovoalbumina Cat. A-4161)

9. Cantidad de muestras positivas al virus de PRRS de acuerdo al tipo de muestra.

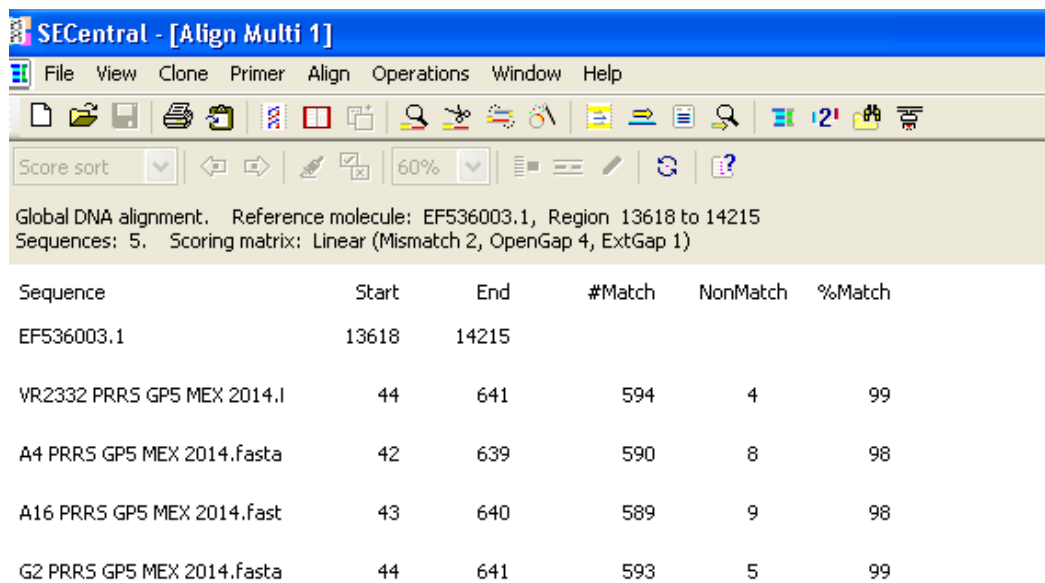
Tipo de Muestra	Total	Porcentaje	Positivas	% Positividad
Suero	103	72.56%	66	64.08%
Hisopo nasal	37	26.06%	8	21.62%
Pulmón	2	1.41%	2	100%
Total	142	100%		

10. Porcentajes de similitud entre las cepas obtenidas y la cepa de referencia de la glicoproteína 5 (GP5) en secuencia de nucleótidos y de aminoácidos.

Nucleótidos

Sequence	Start	End	#Match	NonMatch	%Match
EF536003.1	13618	14215			
VR2332 PRRS GP5 MEX 2014.I	44	641	196	3	98
A4 PRRS GP5 MEX 2014.fasta	42	639	193	6	96
A16 PRRS GP5 MEX 2014.fast	43	640	193	6	96
G2 PRRS GP5 MEX 2014.fasta	44	641	195	4	97

Aminoácidos



Sequence	Start	End	#Match	NonMatch	%Match
EF536003.1	13618	14215			
VR2332 PRR5 GP5 MEX 2014.I	44	641	594	4	99
A4 PRR5 GP5 MEX 2014.fasta	42	639	590	8	98
A16 PRR5 GP5 MEX 2014.fasta	43	640	589	9	98
G2 PRR5 GP5 MEX 2014.fasta	44	641	593	5	99

11. Porcentajes de similitud entre las cepas obtenidas y la cepa de referencia de la nucleocápside (N) en secuencia de nucleótidos y de aminoácidos.

Nucleótidos

SECentral - [Align Multi 1]

File View Clone Primer Align Operations Window Help

Score sort 60%

Global DNA alignment. Reference molecule: EF536003.1, Region 14719 to 15090
Sequences: 9. Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Sequence	Start	End	#Match	NonMatch	%Match
EF536003.1	14719	15090			
347_75-Fwd	179	550	370	2	99
A4 PRRS N MEX 2014.fasta	26	294	269	103	72
A16 PRRS N MEX 2014.fasta	28	296	269	103	72
CSI_75-Fwd	179	550	370	2	99
G2 PRRS N MEX 2014.fasta	171	542	370	2	99
G3 PRRS N MEX 2014.fasta	172	543	370	2	99
G6 PRRS N MEX 2014.fasta	170	541	370	2	99
PRRS N C+.fasta	171	542	370	2	99

Aminoácidos

SECentral - [Align Multi 1]

File View Clone Primer Align Operations Window Help

Score sort 60%

Global Protein alignment. Reference molecule: EF536003.1, Region 14719 to 15090
Sequences: 9. Scoring matrix: BLOSUM 62

Sequence	Start	End	#Match	NonMatch	%Match
EF536003.1	14719	15090			
347_75-Fwd	179	550	123	1	99
A4 PRRS N MEX 2014.fasta	28	294	89	35	71
A16 PRRS N MEX 2014.fasta	30	296	89	35	71
CSI_75-Fwd	179	550	123	1	99
G2 PRRS N MEX 2014.fasta	171	542	123	1	99
G3 PRRS N MEX 2014.fasta	172	543	123	1	99
G6 PRRS N MEX 2014.fasta	170	541	123	1	99
PRRS N C+.fasta	171	542	123	1	99