



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTENIA**

**Expresión recombinante de proteínas no estructurales del virus de PRRS  
para evaluar su potencial antigénico e inmunogénico**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**MARÍA JOSEFINA CONTRERAS LUNA**

**TUTOR PRINCIPAL: JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. GLADIS DEL CARMÉN FRAGOSO GONZÁLES**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

**DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX, agosto 2022



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

A mis padres, Gloria e Isaías los mejores ejemplos de perseverancia, esfuerzo y amor incondicional.

A mis hermanos Isabel, Diego e Isaías quienes han hecho de mi vida lo más divertido y siempre han sido mi apoyo, los quiero mucho gracias por estar siempre para mí.

A mi compañero de vida Alfonso, por creer en mí y apoyar siempre mis decisiones, todo lo que hemos recorrido y vivido juntos me ha permitido estar donde estoy, gracias por tu amor y cobijo. *Me tienes en tus manos y me lees igual que un libro. Sabes lo que yo ignoro y me dices las cosas que no me digo.* Te amo para siempre.

A mi hermosa Luisita, luz de mi vida y energía de todos los días, te amo sunshine.

A mi querido Milán, no sabes leer pero si sabes que te amo perrito hermoso.

## **Agradecimientos**

Al programa de Doctorado en ciencias de la Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (ID 492430). Al proyecto de ciencia básica CONACYT CB-2015-254244.

Al Dr José Iván Sánchez Betancourt, gracias por aceptar ser mi asesor desde la maestría, sin conocerme me otorgo su voto de confianza, apoyo mi formación en todo momento y sigue siendo un gran mentor. ¡Muchas gracias doc!

El mi comité tutorial Dra. Gladis Del Carmén Fragozo Gonzáles y al dr Rogelio Alejandro Alonso Morales, por el acompañamiento en la realización de este trabajo, así como todos sus invaluable consejos y aportaciones.

Al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas en especial a la M en C. Cristina Parada Colín por su apoyo en la purificación de las proteínas recombinantes generadas para este trabajo, a la .M en C. patricia de la Torre por su apoyo en la secuenciación de productos. También a la Dra Jacqueline Cervantes por su apoyo en la estandarización y desarrollo de las técnicas empedadas en esta investigación, así como de su invaluable asesoría y a la Dra Adriana Ayón Nuñez por su asesoría para la generación de proteínas recombinantes, gracias por ser la luz en el camino.

Al doctor Dr. Pavel Isa y al laboratorio 5 de Virología del IBT, UNAM por facilitarme células MA104 para llevar a cabo los experimentos de este trabajo.

A la Dra Catalina Flores-Maldonado y al Dr Gerardo Contreras del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Cinvestav-IPN por facilitarme células MA104 así como medio de cultivo los cuales fueron de gran utilidad para llevar a cabo este trabajo.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos. Gracias al Jefe de Departamento Gerardo Ramírez por la disposición y amabilidad durante el trabajo de laboratorio, así como al Sr. Inocente Lara siempre dispuesto a resolver cualquier duda y a la señora Carmen Díaz siempre tan alegre y dispuesta a apoyarme, gracias por tanta platica amena y divertida.

A la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por las facilidades prestadas.

Al Grupo de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos.

A mis queridos amigos Mariana Pérez y Saúl Reveles, siempre sinceros y con quien sé puedo confiar plenamente ¡gracias amigos!

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Por ser la sede donde desarrolle todos mis estudios desde la licenciatura, maestría y ahora el doctorado, por ser siempre mi amada casa de estudios.

## **Resumen**

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una enfermedad viral de los cerdos económicamente significativa en todo el mundo causando falla reproductiva en hembras y mortalidades en los cerdos jóvenes. Las vacunas disponibles no han logrado controlar la enfermedad haciendo necesario utilizar nuevas estrategias para ayudar a controlar la circulación continua del virus. Las proteínas no estructurales (Nsp's) del virus desempeñan un papel clave en el procesamiento y la maduración del virión y se sabe que pueden generar respuestas de anticuerpos pronunciadas contra el virus de PRRS, por lo que el objetivo de este trabajo fue producir y purificar proteínas recombinantes de las Nsp's 1, 2, 7 y 11 de ORF1 de PRRSV para estudiar in vitro su comportamiento inmunogénico y antigénico. En este trabajo se clonaron y expresaron las Nsp's 1 y 11 con las cuales se desarrolló una prueba de ELISA utilizando Nsp1 con un punto de corte de 0.189 y para Nsp11 con un valor de corte de 0.179 a una densidad óptica de 450nm y se compararon con una prueba de ELISA-UNAM altamente específica con un virus de campo como antígeno de placa. Se probó un panel de 50 muestras de suero de cerdos positivos a PRRS y 50 negativos obteniendo un 92% (92+/8-) de positividad para Nsp1 y 99% (99+/1-) para Nsp11; la sensibilidad para Nsp1 fue 53.8% y 98.03% de especificidad, Nsp11 obtuvo una sensibilidad de 50.50% y 100% de especificidad ambas en comparación con la prueba ELISA-UNAM. Además, se montó una prueba de seroneutralización utilizando sueros hiperinmunes de Nsp1 y Nsp11 elaborados en cerdo en la cual se observó que el suero hiperinmune de Nsp1 tuvo un título protector de 1:32 a 100 Dosis Infectantes (DI) y 1:16 con 300 DI; en el caso de Nsp11 se obtuvo un título protector de 1:8 con 100 DI y 1:4 con 300 DI; con dosis más elevadas (500 y 1000 DI) la respuesta neutralizante de los sueros fue menor. Este trabajo permitió evaluar la antigenicidad, inmuno-genicidad de estas Nsp's y establecer un antecedente para proponer el uso de estas proteínas en ensayos futuros.

**Palabras clave. PRRS, Arterivirus, proteínas no estructurales, protección**

## **Abstract**

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an economically significant disease of pigs worldwide causing reproductive failure in sows and mortalities in young pigs. The available vaccines have failed to control the disease making it necessary to use new strategies to help control the continuous circulation of the virus. The nonstructural proteins (Nsp's) of the virus play a key role in the processing and maturation of the virion and it is known that they can generate pronounced antibody responses against the PRRS virus, the objective of this work was to produce and purify recombinant proteins of the Nsp's 1, 2, 7 and 11 of ORF1 of PRRSV to study in vitro its immunogenic and antigenic behavior. In this work the Nsp's 1 and 11 were cloned and expressed with which an ELISA test was developed using Nsp1 with a cut-off point of 0.189 and for Nsp11 with a cut-off value of 0.179 at an optical density of 450nm and comparing them with a highly specific ELISA-UNAM test with a field virus as a plaque antigen and testing a panel of 50 PRRS and 50 negative pig serum samples obtaining 92% (92 + / 8-) positive for Nsp1 and 99% (99 +/1) for Nsp11; The sensitivity for Nsp1 was 53.8% and 98.03% specificity, Nsp11 obtained a sensitivity of 50.50% and 100% specificity both compared to the ELISA-UNAM test. In addition, a seroneutralization test was used using hyperimmune sera of Nsp1 and Nsp11 made in pig in which the hyperimmune serum of Nsp1 observed a protective titer of 1:32 to 100 Infecting Dose (DI) and 1:16 with 300 DI, in the case of Nsp11 a protective title of 1: 8 was obtained with 100 DI and 1: 4 with 300 DI; with higher doses (500 and 1000 DI) the neutralizing response of the sera was lower. This work allowed to evaluate the antigenicity, inmngenicity of these Nsp's and establish a background to propose the use of these proteins in future trials.

**Keywords.** PRRS, *Arterivirus*, proteínas no estructurales, protección

## Índice

	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMEN</b>	4
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>LISTA DE TABLAS</b>	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	9
<b>ABREVIATURAS</b>	10
<b>I. Introducción</b>	11
<b>II. Antecedentes</b>	13
Síndrome reproductivo y respiratorio porcino	13
Replicación	18
Patogenia	19
Signos clínicos	21
Respuesta inmune	21
Vacunación contra PRRS	24
Proteínas no estructurales, algunas funciones	25
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	28
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	29
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b>	30
Objetivos específicos	30
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	31
Propagación del PRRSV	31

Estandarización de RT-PCR para la obtención de proteínas recombinantes	32
Ligación de los amplificadores por PCR de las Nsp's 1, 2, 7 y 11 en el vector pET23a(+) linearizado	35
Clonación	36
Transformación	36
Expresión e inducción	37
Purificación de las proteínas	38
Cuantificación de las proteínas por el método de LOWRY	39
Identificación de proteínas por Western blot	39
Obtención de sueros hiperinmunes	39
Western blot para sueros hiperinmunes	40
ELISA para detección de anticuerpos contra las proteínas clonadas	41
Seroneutralización	43
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>60</b>
<b>XI. ANEXOS</b>	<b>68</b>



## LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Proteínas que conforman el virus de PRRS y sus funciones	17
<b>Tabla 2.</b> IniciadoresPrimers a con sitios de restricción utilizados para expresargenerar NSP´s de ORF 1 del genoma del PRRSV	33
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de RT-PCR para amplificar las Nsp´s 1, 7 y 11 del ORF1 de PRRSV	33
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de trabajo para digestión del vector pET23a (+)	35
<b>Tabla 5.</b> Reacción de restricción para liberar el inserto de proteínas clonadas.	36
<b>Tabla 6.</b> Producción de carne de cerdo por entidad en México, 2018.	41
<b>Tabla 7.</b> Comparativo de la prueba de ELISA UNAM, Nsp1 y Nsp11	50
<b>Tabla 8.</b> Comparación de títulos de anticuerpos neutralizantes para las diferentes dosis infectantes de PRRSV probadas en la prueba de seroneutralización	51
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones de la curva estándar para cuantificación de proteína	83
<b>Tabla 10.</b> Condiciones probadas para estandarizar la prueba de ELISA para Nsp´s	84

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Clasificación e historia evolutiva de todos los linajes de PRRSV de tipo 2	15
<b>Figura 2.</b> Estructura del genoma del virus de PRRS	16
<b>Figura 3.</b> Ciclo de replicación del virus de PRRS	20
<b>Figura 4.</b> Mapa del vector pET23A(+)	35
<b>Figura 5.</b> Proceso de clonación y expresión de proteínas Nsp's recombinantes del PRRSV	38
<b>Figura 6.</b> Calendario de inmunización de los cerdos	40
<b>Figura 7.</b> Titulación de sueros hiperinmunes Nsp1 y Nsp11	49
<b>Figura 8.</b> Confirmación de la clonación de la proteína Nsp11 virus de PRRS	68
<b>Figura 9.</b> Confirmación de la clonación de la proteína Nsp11 virus de PRRS	77
<b>Figura 10.</b> Curva estándar de cuantificación qRT_PCR PRRSV	80
<b>Figura 11.</b> qRT-PCR del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino	80

## **Abreviaturas**

PRSS: síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo

PRRSV: virus de PRRS

IFN: interferón

Nsp's: proteínas no estructurales

LDH: virus elevador de lactato-deshidrogenasa

EAV: virus de la arteritis viral equina

ORF: marco de lectura abierto

pp: poliproteínas

RTC: complejo de replicación y transcripción

NK: células asesinas naturales o NK por su siglas en inglés ( Natural killer)

PI: post infección

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

CD: células dendríticas

IRF3: factor regulador de interferón 3

NendoU: endonucleasa específica de uridilato

N: nucleocápside

ADCC: citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo

CDC: citotoxicidad mediada por el complemento dependiente de anticuerpos

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

CPE: efecto citopático

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa

SH Nsp1: suero hiperinmune de Nsp1

SH Nsp11: suero hiperinmune de Nsp1

SH PRRS: suero hiperinmune de VPRRS

## I. Introducción

El síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRSS) fue descrito por primera vez en la década de los 80's en Estados Unidos de Norte América (Keffaber 1989), es una enfermedad viral grave de los cerdos que causa grandes pérdidas económicas a la industria porcina en todo el mundo. Se caracteriza por la falla reproductiva en cerdas adultas y jóvenes desarrollando fiebre transitoria, lechones muertos por camada además de abortos, los lechones vivos presentan pérdida de apetito, letargo, diarrea y en ocasiones mueren, cerdos jóvenes en crecimiento desarrollan neumonía y retrasos en el crecimiento (Goyal 1993; Collins et al. 1992; Pileri y Mateu 2016). PRRS es considerado una de las enfermedades infecciosas con mayor impacto en la industria porcina, que causa grandes pérdidas económicas (Holtkamp et al. 2013) y aunque existen varias vacunas como herramientas para el control de la enfermedad, ninguna es plenamente eficaz contra todas las cepas del virus de PRRS (Darwich, Díaz, y Mateu 2010). La enfermedad surgió con dos genotipos diferentes en continentes separados (América y Europa) (Keffaber 1989; Albina 1997) cuyo virus posee una notable diversidad fenotípica y genética, debido a su replicación y recombinación que genera un genoma viral extraordinariamente flexible (Matthew A. Kappes y Faaberg 2015). Estos y otros factores son los responsables de la falta de una protección completa de las vacunas (Darwich, Díaz, y Mateu 2010).

El virus de PRRS (PRRSV) infecta y se replica en células que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa como macrófagos particularmente alveolares y células dendríticas (Lunney, Benfield, y Rowland 2010), logra inhibir la expresión de interferón (IFN) tipo I ( $\alpha/\beta$ ), el cual es responsable de inducir la síntesis de una gran cantidad de proteínas antivirales (Darwich, Díaz, y Mateu 2010). La falta de una respuesta inflamatoria y la débil respuesta inmune innata crea un microambiente desfavorable en el desarrollo de la respuesta adaptativa (A Burgara-Estrella et al. 2013) ocasionando una aparición retardada de anticuerpos neutralizantes hasta 3-4 meses después de la infección (Flores-Mendoza y Hernández 2010). Las proteínas no estructurales (Nsp's) del PRRSV juegan un papel clave en el procesamiento y la maduración del repertorio de proteínas

estructurales del virión. Se ha comprobado que existe una respuesta de anticuerpos contra estas proteínas no estructurales en los cerdos infectados y vacunados (Johnson, Yu, y Murtaugh 2007), la cual aparece desde el momento más temprano de la infección y pueden ser presentados al sistema inmune en el contexto de las principales vías de presentación de antígenos del complejo de histocompatibilidad, generando una respuesta de anticuerpos pronunciada, equivalente a la respuesta inmune contra las proteínas estructurales y estos anticuerpos se mantienen en el organismo por varios meses (Brown et al. 2009; F. X. Wang et al. 2013; Lunney et al. 2016).

Trabajos previos sobre la respuesta inmune al PRRSV se han enfocado principalmente en el estudio de la respuesta inmune contra proteínas estructurales como N ó GP5 pero la alta variabilidad así como las pobres respuestas del individuo frente al virus no han permitido encontrar la estrategia ideal para enfrentar este agente infeccioso (Chand, Tribble, y Rowland 2012; Renukaradhya et al. 2015). Los anticuerpos específicos para Nsp's se producen en títulos altos como respuesta a la replicación del virus, especialmente contra las proteínas Nsp1a, Nsp1b, Nsp2 y Nsp7 (Fang y Snijder 2010), y se piensa que estos anticuerpos pueden usarse para diferenciar los anticuerpos post-infección y post-vacunales en animales donde previamente se aplicaron vacunas inactivadas.

En este trabajo se clonaron y expresaron las proteínas Nsp1 Nsp11 no estructurales en células de *Escherichia coli* para comparar su sensibilidad y especificidad diagnósticas con un panel de sueros de cerdos de diferentes estados y que han estado en contacto con PRRSV y con la finalidad de determinar la respuesta inmune humoral al PRRSV frente a Nsp's y desarrollar nuevas herramientas para la identificación de animales infectados con el virus, adicionalmente fueron evaluados sueros hiperinmunes elaborados con las proteínas recombinantes Nsp1 Nsp11 en una prueba de seroneutralización para determinar si estas proteínas también tienen participación en el bloqueo o disminución de la infección por el PRRSV.

## II. Antecedentes

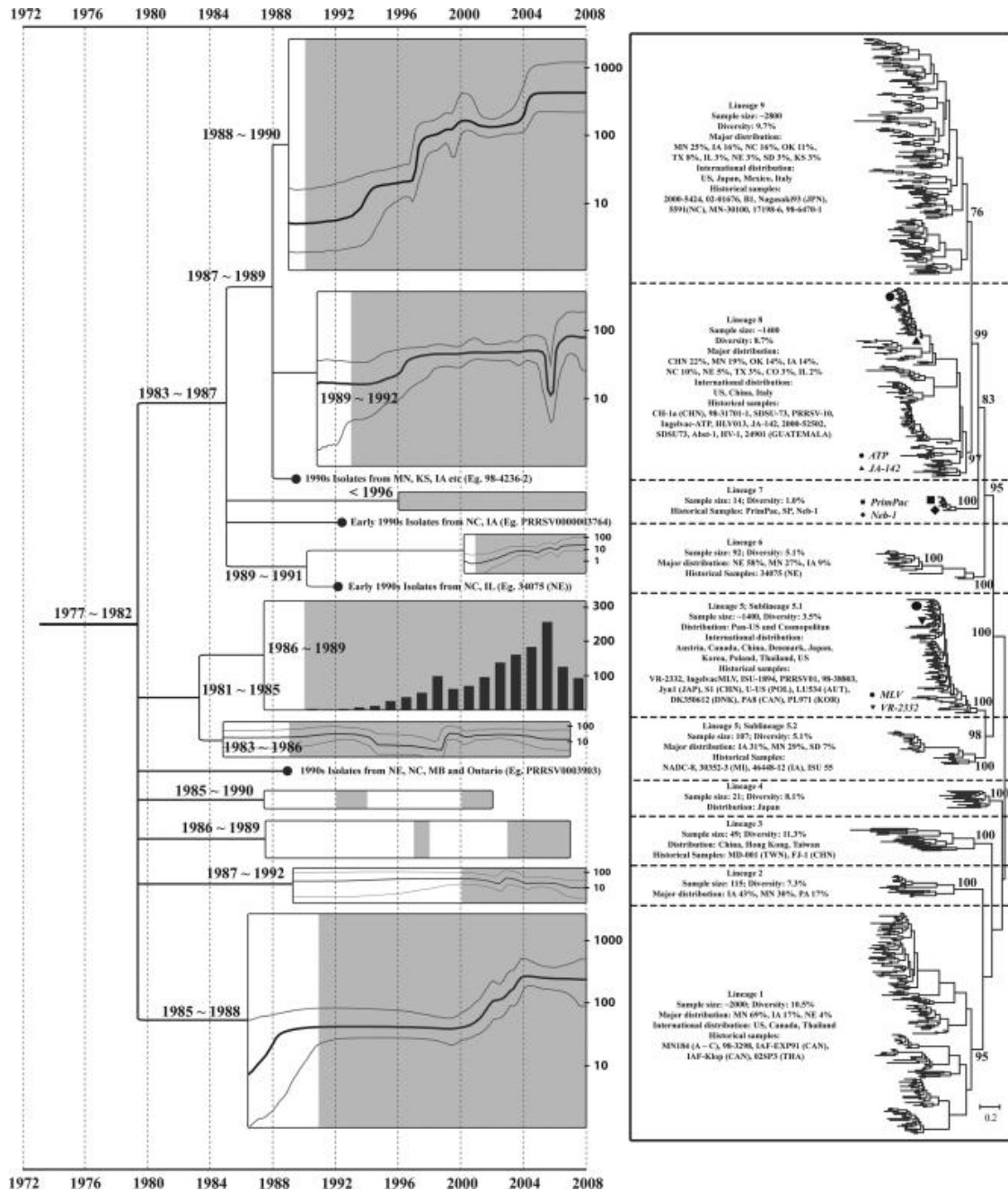
### Síndrome reproductivo y respiratorio porcino

El síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRSS *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) fue descrito por primera vez en la década de los 80's en Estados Unidos de América (Keffaber 1989). Es una enfermedad grave de los cerdos que se caracteriza por la falla reproductiva en cerdas adultas y jóvenes, neumonía en cerdos jóvenes en crecimiento, y un aumento en la mortalidad predestete (Goyal 1993; OIE 2008). La falla reproductiva provoca infertilidad en las cerdas, abortos y mortinatos. También se observa el nacimiento de lechones débiles que mueren poco después del nacimiento a causa de las enfermedades respiratorias y las infecciones secundarias causada por agentes infecciosos como *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Haemophilus parasuis* (Maclachlan, Dubovi, y Fenner 2011; Goyal 1993). Los verracos infectados con el virus de PRRS (PRRSV) y en animales vacunados con virus atenuado, el virus puede encontrarse en el semen, lo que puede provocar cambios en la morfología y función del espermatozoide (OIE 2008) además de que el virus puede transmitirse vía genital o por uso de semen contaminado (Christopher-Hennings et al. 2008). La enfermedad es causada por el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) un virus RNA envuelto, monocatenario, sentido positivo, recientemente reasignado al orden Nidovirales familia Arteriviridae, género Betaarterivirus, subgénero Ampobarterivirus y asignando dos especies diferentes y que son causantes de la enfermedad: Betaarterivirus suid 1 antes PRRSV-1 y Betaarterivirus suid 2 antes PRRSV-2 (King et al. 2018).

En la familia *Arteriviridae*, también se incluyen el virus de lactato-deshidrogenasa de elevación (LDH), el virus de la arteritis viral equina (EAV) y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (Collins et al. 1992; Dea et al. 1992; J. J. Meulenberg et al. 1993). El virus posee características importantes: capacidad de infectar macrófagos/monocitos por lo que se da una infección persistente, modulación del sistema inmune y alta variabilidad genética y antigénica (Macías et al. 2006). Por comparación de secuencias de los virus aislados, este se ha dividido en dos

diferentes genotipos: virus Lelystad o PRRSV tipo 1 (europeo), y virus de América del Norte o PRRSV (Matthew A. Kappes y Faaberg 2015) y se encontró que la identidad de aminoácidos entre estos dos tipos es menos de 60% (Murtaugh, Elam, y Kakach 1995).

Reportado a principios de 1990 en Europa Occidental (Wensvoort et al. 1991) el PRRSV (virus de Lelystad) se aisló inicialmente en Holanda y fue considerado como el ancestro de PRRSV tipo 1 que formaba un grupo filogenético altamente homólogo (similar a Lelystad) con muestras contemporáneas provenientes de Bélgica, Francia, Alemania, Gran Bretaña, Países Bajos y España (Goyal 1993; Nodelijk 2002) sin embargo, estos virus similares a Lelystad apenas representaban una pequeña parte de la diversidad de PRRSV Tipo 1, y por lo tanto no se pueden considerar como un virus ancestral (Shi et al. 2010). La diversidad de PRRSV se descubrió a medida que se incrementaron los casos y los muestreos en Europa, Asia y América (Nodelijk 2002; Stadejek et al. 2013). El PRRSV tipo 2 ó PRRSV tipo americano o del Norte (por su identificación y ubicación original) posee nueve linajes definidos por Shi y colaboradores (Shi et al. 2010), siete se han mantenido por su diversidad norteamericana y dos restantes se encuentran sólo en los países asiáticos. El “ancestro” de tipo 2 de la cepa VR-2332, se aisló de muestras de tejidos infectados colectados en la epidemia a finales de los años 80´ (Collins et al. 1992) aunque las primeras secuencias no fueron logradas hasta principios de 1990 (Figura 1). PRRSV es considerado uno de los virus ARN con más rápida evolución en el planeta con una tasa de  $4.7$  a  $9.8 \times 10^{-2}$  /sitio/año (Hanada et al. 2005), llegando a formar cuasiespecies estrechamente relacionadas (Goldberg et al. 2003; Chen et al. 2015). La deriva antigénica y genética son los mecanismos posibles que explican la aparición de nuevas variantes genéticas y con ello la aparición de nuevos virus con mayor virulencia o con la capacidad de evadir la respuesta inmune generada por la vacunación (Chand, Tribble, y Rowland 2012).

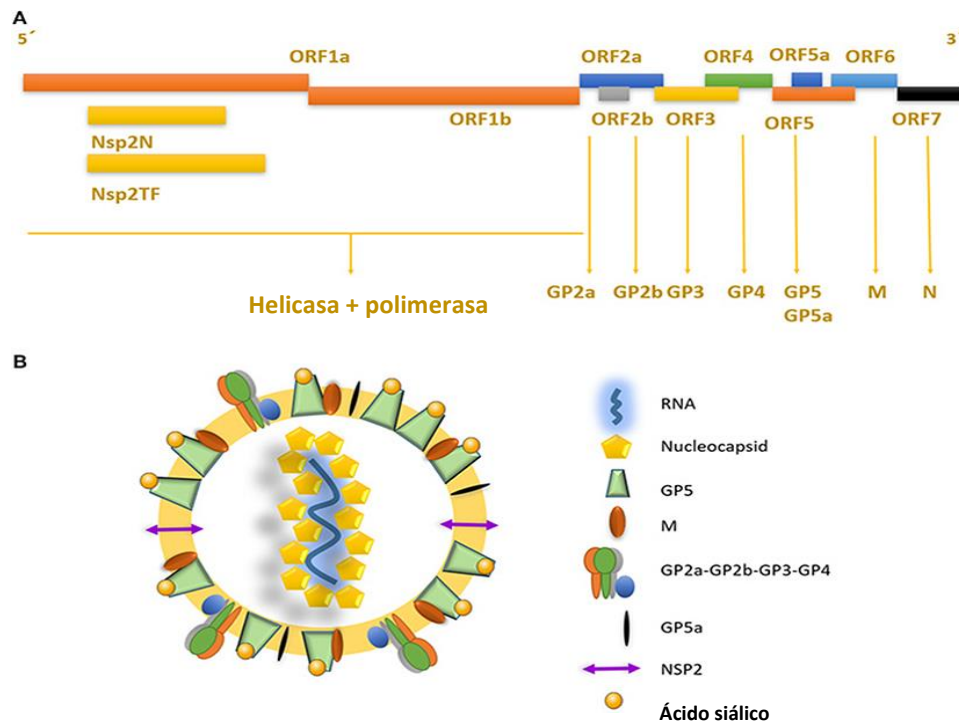


**Figura 1.** Clasificación e historia evolutiva de todos los linajes de PRRSV de tipo 2. Linajes divididos por líneas de puntos. La información de cada linaje se indica al lado de la filogenia, incluida la diversidad del linaje, su distribución dentro de los Estados Unidos, su distribución internacional, y algunos aislados conocidos. Tomado de *Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses* (Shi et al. 2010).

El genoma del PRRSV (Figura 2) es de aproximadamente 15 kb con 10 marcos de lectura abiertos (ORF), entre ellos genes que expresan la replicasa ubicados en el



extremo 5' seguido de los genes que codifican proteínas estructurales en el extremo 3' (Snijder, Kikkert, y Fang 2013). La mayor parte del genoma (~60–70%) codifica para proteínas no estructurales que se encuentran en el extremo 5' del genoma, inicialmente expresan dos poliproteínas diferentes pp1a y pp1ab que se dividen en al menos 14 Nsp's y están implicadas en la replicación viral. Las proteínas estructurales se expresan en genes ubicados cerca del extremo 3' (ORF 2-7), estos genes codifican cuatro glucoproteínas asociadas a la membrana (GP2a, GP3, GP4 y GP5), tres proteínas de membrana no glicosiladas (E, ORF5a y M) y una proteína de la nucleocápside (N) (Lunney et al. 2016) y otras proteínas que están asociadas a la envoltura viral y empaquetamiento de ARN (Dokland 2010) (Tabla 1).



**Figura 2.** Estructura del genoma del virus de PRRS. A) Las proteínas no estructurales se encuentran en el extremo 5' del genoma, codifican para dos poliproteínas pp1a y pp1ab que se dividen en al menos 14 Nsps (Nsp1 a Nsp12 y Nsp1a y Nsp1b, y Nsp7a, y Nsp7b, las proteínas estructurales ubicadas cerca del extremo 3' están asociadas a la envoltura viral y al empaque de ARN. (B) PRRSV partícula viral madura, con una bicapa lipídica donde se encuentran glicoproteínas del receptor viral involucradas en la infección y la internalización celular. El ARN positivo monocatenario está asociado con la proteína nucleocápside en la capa interna del virus. Tomado y modificado de *Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV)*. (Montaner-Tarbes et al. 2019).

**Tabla 1. Proteínas que conforman el virus de PRRS y sus funciones**

<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Función</b>
ORF1a	Nsp1 $\alpha$	Contiene proteasa PLP $\alpha$ c; proteína de zinc-finger; regulador de síntesis de ARNm; potencial antagonista de interferón (IFN)
	Nsp1 $\beta$	Contiene proteasa PLP $\alpha$ c, potencial antagonista de IFN
	Nsp2	Contiene proteasa PLP2; enzima desubiquitinante; potencial antagonista de IFN; proteína transmembrana involucrada en la modificación de la membrana formando complejo de replicación
	Nsp3	Proteína de dominio transmembrana (TM) implicada en la modificación de la membrana; formando complejo de replicación
	Nsp4	Proteasa; inductor de apoptosis; potencial antagonista de IFN
	Nsp5	Proteína transmembranal posiblemente involucrada en modificaciones membranales
	Nsp6	¿?
	Nsp7 $\alpha$	La proteína Nsp7 recombinante es altamente antigénica
	Nsp7 $\beta$	
Nsp8	Dominio N-terminal de Nsp9	
ORF1b	Nsp9	ARN polimerasa dependiente de ARN
	Nsp10	ARN NTPasa / helicasa; contiene dominio putativo de unión a zinc
	Nsp11	Endoribonuclease Uridilato específica (NendoU)
	Nsp12	¿?
ORF2a	GP2a	Proteína estructural menor glicosilada; esencial para la infectividad del virus; incorporada en el virion como un complejo multimérico con GP3-4; proteína de fijación viral
ORF2b	E	Proteína estructural menor no glicosilada y miristoilada; esencial para la infectividad del virus; incorporado en virion como un complejo multimérico; posee propiedades de tipo canal iónico y puede funcionar como una viroporina en la envoltura
ORF3	GP3	Proteína estructural menor glicosilada; esencial para la infectividad del virus; altamente antigénica y puede estar involucrada en la neutralización viral; incorporada en los viriones como un complejo multimérico con GP2a y GP4.
ORF4	GP4	Proteína estructural menor glicosilada; esencial para la infectividad del virus; formación del complejo GP2a-3-4 para incorporar al virión; proteína de unión viral y puede estar implicada en la neutralización viral
ORF5	GP5	Proteína estructural mayor glicosilada; proteína transmembranal con un número variable de sitios de N-glicosilación; es la proteína estructural más variable; forma un heterodímero unido por disulfuro con proteína M
ORF5a	ORF5a	Proteína estructural menor hidrofóbica no glicosilada; esencial para la viabilidad del virus; incorporada en virión como un complejo multimérico
ORF6	M	Proteína estructural mayor no glicosilada, altamente conservada, la formación de un heterodímero con GP5 es crucial para la infectividad viral, participa en el ensamblaje e infectividad del virus
ORF7	N	Proteína estructural no glicosilada y fosforilada, componente de la capsida viral, altamente antigénica, potencial antagonista de IFN

Tomado y modificado de *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System* (Lunney et al. 2016)

Los genes importantes para la adaptación del virus generalmente expresan las proteínas ubicadas en el exterior del virión, donde interactúan con el medio ambiente, incluyendo el sistema inmune del huésped. Los ORFs 3, 4, 5, y 6 son los genes que codifican los componentes exteriores del virión del PRRSV, por lo que se consideran candidatos importantes para su adaptación en los cerdos (Hanada et al. 2005). El virus puede ser aislado de linfonodos hasta 100 días después de la infección y los cerdos persistentemente infectados pueden transmitir el virus a cerdos sanos. La replicación del virus en el huésped disminuye gradualmente hasta que el virus se extingue, en alrededor de 200 días después de la infección (Lu, Archibald, y Ait-Ali 2014), el mecanismo por el cual se mantiene la infección por un largo tiempo, depende de varios factores como estructura del virión dominada por proteínas de la superficie fuertemente glicosiladas, la re-dirección de la respuesta humoral hacia proteínas no superficiales como la proteína N , la deriva antigénica y genética dentro de los genes estructurales y no estructurales (Chand, Tribble, y Rowland 2012)

### **Replicación**

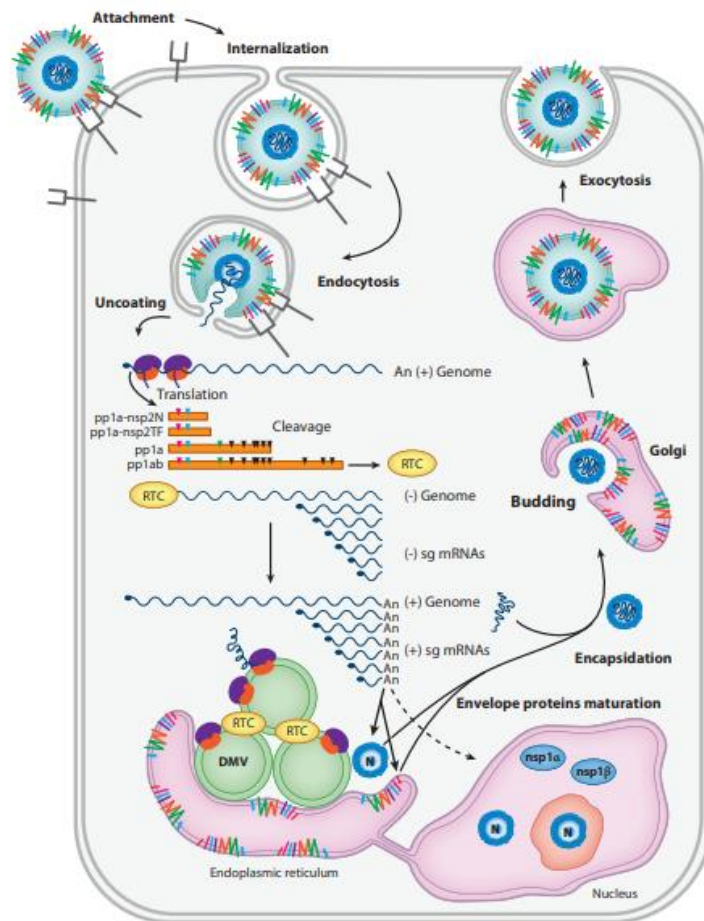
La replicación viral comienza por la interacción de las glucoproteínas virales con los receptores celulares CD163 y CD169 activando la endocitosis mediada por clatrina y la liberación del genoma viral en el citoplasma; existen otras moléculas involucradas en la entrada viral, como CD151 y vimentina (Zhang y Yoo 2015). Después de la entrada celular, el PRRSV provoca una serie de modificaciones intracelulares para completar su ciclo de replicación, que incluye reordenamientos de orgánulos de membrana intracelular para generar el complejo de replicación. Estos incluyen la formación de vesículas perinucleares de doble membrana aparentemente derivadas del retículo endoplásmico, síntesis de ARN genómico, transcripción de ARN segmentado y expresión de proteínas virales (M A Kappes y Faaberg 2015). Una vez que el genoma ingresa al citoplasma, ORF1a y ORF1b, ubicadas en los tres cuartos proximales del extremo 5` del genoma viral, se transcriben para producir dos poliproteínas grandes, pp1a y pp1ab, el procesamiento autocatalítico de estos precursores genera al menos 14 proteínas

no estructurales 10 codificados en ORF1a (NSP1 $\alpha$ , NSP1 $\beta$ , NSP2 a NSP6, NSP7 $\alpha$ , NSP7 $\beta$  y NSP8) y 4 codificados en ORF1b (NSP9 a NSP12). La mayoría, si no todos, de los NSP se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC) que se acumula en vesículas de doble membrana derivadas de retículo endoplásmico inducidas por virus. El RTC dirige tanto la amplificación del genoma (replicación) como la síntesis de ARNm subgenómico (transcripción) (Fang y Snijder 2010) produciendo un conjunto anidado de seis ARNm subgenómicos principales a través de los cuales se expresan ocho ORF en su mayoría superpuestos situados en la región proximal 3' del genoma viral que codifican para ocho proteínas estructurales que constituyen el virión infeccioso (Dokland 2010) es decir, cuatro componentes menores codificados en ORF2a (GP2 / 2a), ORF2b (E), ORF3 (GP3) y ORF4 (GP4); tres componentes principales codificados en ORF5 (GP5), ORF6 (M) y ORF7 (N,) y una proteína recientemente identificada codificada en ORF5a que se superpone con el extremo 5' de ORF5 (J. J. Meulenber et al. 1995; Yun y Lee 2013). En la etapa tardía de la replicación viral, múltiples copias de las proteínas N se unen al ARN genómico recién sintetizado para formar un complejo de nucleocápside, que brota en la luz del retículo endoplásmico liso y rugoso y / o complejo de Golgi y adquiere las seis proteínas de la envoltura viral, es decir, E, M y GP2 a GP5. Finalmente, los viriones maduros de la progenie acumulados en los compartimientos de la membrana intracelular se liberan al espacio extracelular a través de la exocitosis (Fang y Snijder 2010; Yun y Lee 2013; Montaner-Tarbes et al. 2019). (Figura 3).

## **Patogenia**

Los cerdos son el único huésped natural conocido de PRRSV, tiene un tropismo muy restringido a células del linaje monocítico. El macrófago alveolar porcino completamente diferenciado sirve como célula blanco para la infección por PRRSV, las células dendríticas también pueden soportar la replicación de PRRSV (Lunney et al. 2016), el ciclo de replicación es rápido y la infección produce lisis de la célula afectada y una apoptosis inducida por el virus en las células adyacentes (Chand, Tribble, y Rowland 2012).

El virus ingresa por vía oronasal y genital; penetra a epitelios nasal y tonsilar, a macrófagos pulmonares y a endometrio uterino. Tiene un período de incubación de tres días a varias semanas, y tiene periodos de latencia en casos endémicos. Llega a tejidos linfoides regionales y después se distribuye a nivel sistémico por las vías sanguínea y linfoide, circulando libre o ligado a monocitos circulantes produciendo leucopenia. El virus es eliminado principalmente por saliva, orina, semen, secreciones mamarias y transplacentarias, y excremento (López-Heydeck et al. 2015).



**Figura 3.** Ciclo de replicación del virus de PRRS, tomado de: *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System* (Lunney et al. 2016)

El PRRS genera una infección multisistémica; por lo que el virus se ha aislado en fosas nasales, pulmones, estómago, intestino delgado, colon, corazón, cerebro,

riñón, timo, bazo, tonsilas y linfonodos. La persistencia del virus se da cuando es aislado exclusivamente en las tonsilas, bazo y tejido linfoide, ya que durante esta fase la replicación se restringe a estos tejidos (Van Reeth 1997).

### **Signos clínicos**

El PRRS tiene mucha variabilidad de signos clínicos, incluyendo infecciones subclínicas o inaparentes. Los signos clínicos están influidos por la cepa del virus, nivel de inmunidad de la piara y tipo de manejo (densidad de animales, ventilación, etc.) y puede haber complicaciones por infecciones secundarias. La enfermedad clínica en una piara no expuesta afecta a animales de todas las edades, las manifestaciones más frecuentes de la enfermedad son inespecíficas como inapetencia, fiebre y disnea, en cerdas adultas agalactia, celos irregulares, disminución de la tasa de partos, abortos en el último tercio de gestación, partos prematuros y nacimiento de lechones nacidos débiles o muertos y expulsión de fetos momificados. Los verracos, presentan anorexia, letargia y signos respiratorios, pueden perder la libido y tener mala calidad del semen. En cerdos lactantes, la mortalidad previa al destete puede alcanzar el 100%, presentan disnea, taquipnea, apatía, emaciación, edema periorcular y palpebral (Benfield et al. 2000). En cerdos de engorda puede haber mortalidad de los animales afectados, presentan anorexia, fiebre, letargia; pueden presentar hiperemia cutánea o cianosis de las extremidades, orejas, hocico, mamas y vulva. Los signos respiratorios, incluyen la presencia de disnea, taquipnea, estornudos, conjuntivitis y edema palpebral. Los cerdos afectados no tienen un desarrollo normal, el pelo está áspero y disminuye la ganancia de peso diaria, esto produce una gran variación del tamaño en cerdos de edades similares (Benfield et al. 2000) (Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso 2012).

### **Respuesta inmune**

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra las infecciones virales. Incluye barreras físicas, como piel y membranas mucosas; barreras químicas, como péptidos antimicrobianos, pH, lípidos y enzimas; y células

inmunes, como monocitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y células asesinas naturales (NK por sus siglas del inglés Natural Killer). Después de cualquier infección viral, la activación adecuada del sistema inmune innato del huésped es crítica para prevenir la replicación viral e invasión a los tejidos (Abul K. Abbas ; Andrew H. Litchman; Shiv Pillai. 2017). El virus de PRRS entra por vía oronasal y genital, infecta macrófagos pulmonares y/o endometrio. Su periodo de incubación va de tres días a varias semanas dependiendo de la edad de los animales afectados, dosis infectante y estado inmunológico del individuo. En tejidos linfoides regionales, se distribuye a nivel sistémico por vía sanguínea y linfoide, circulando libre o ligado a monocitos circulantes produciendo leucopenia, los macrófagos alveolares son su célula blanca, así como células dendríticas y monocitos, importantes en el desarrollo de las respuestas inmunes innata y adaptativa (Flores-Mendoza y Hernández 2010; Chand, Tribble, y Rowland 2012). PRRSV inhibe la expresión del IFN I, elemento clave de la respuesta inmune innata implicado en infecciones virales. Sus funciones incluyen: bloquear la replicación viral en la célula, desarrollo de las células T CD8+, regulación del MHC-II (complejo principal de histocompatibilidad), diferenciación de células presentadoras de antígeno, estimulación de la proliferación de células de memoria a través de IL-15 y la prolongación de la vida media de los linfocitos T activos (Abul K. Abbas ; Andrew H. Litchman; Shiv Pillai. 2017). La inhibición de los IFN de tipo I se ha atribuido a la capacidad de las Nsp's de inhibir el promotor de IFN- $\beta$  mediante el bloqueo de la translocación del factor de transcripción IRF3 y la inhibición de NF-kappaB (NF-kB) (Rascón-Castelo et al. 2015). Las proteínas antagonistas de la inducción de IFN incluyen Nsp1, Nsp2, Nsp11, y N. Nsp1 se auto-escinde en subunidades Nsp1a y Nsp1b, se localizan en el núcleo de la célula e inhiben la expresión IFN-b. Nsp2 inhibe la inducción de IFN mediante el bloqueo de la activación IRF3, Nsp11 también actúa como antagonista de IFN. La proteína de Nucleocápside (N) inhibe la inducción de IFN-b al interferir con la activación inducida por IRF3. Nsp's son proteínas tempranas, y N es una proteína de presentación tardía, lo que implica su participación en diferentes etapas de la replicación viral, otras proteínas como Nsp7, Nsp12 y GP3 también son capaces

de inhibir la señalización del IFN (Butler et al. 2014). La infección por PRRSV induce la expresión de IL-10, capaz de inhibir la expresión de la IL-1 y el TNF- $\alpha$ . La falta de una respuesta inflamatoria y la débil respuesta antiviral (inducida por IFN tipo I) crea un microambiente desfavorable en el desarrollo de la respuesta adaptativa (Alexel Burgara-Estrella et al. 2013).

En la respuesta humoral se pueden encontrar anticuerpos IgM anti-PRRSV entre los días cinco y siete postinfección (PI); pero, dos o tres semanas después son indetectables, posteriormente se detectan anticuerpos IgG entre los días siete y 10 PI, con incremento entre la segunda y cuarta semana (Diaz et al. 2012). Los anticuerpos tipo IgA son detectados a partir de los 14 días hasta los 25 días PI y desaparecen al mes aproximadamente, los anticuerpos neutralizantes aparecen entre la segunda y tercera semana PI y pueden permanecer durante periodos prolongados, pero con títulos bajos. Estos primeros anticuerpos anti-PRRSV se dirigen contra la proteína N durante la primera semana PI (Diaz et al. 2012; Loemba et al. 1996), no tienen un efecto neutralizante y se han relacionado con la diseminación del PRRSV en macrófagos, a través de un fenómeno conocido como incremento de la infección dependiente de anticuerpos (Antibody Dependent Enhancement, ADE, por sus siglas en inglés) (Cancel-Tirado, Evans, y Yoon 2004; Flores-Mendoza y Hernández 2010) temprana a partir del día 9 PI; pero generalmente se presentan a partir del día 28 PI (K. J. Yoon et al. 1995), también se han detectado Ac's contra GP4, proteína M y GP3 (Diaz et al. 2012). La respuesta de células T específicas contra el PRRSV, aparece en la cuarta y séptima semana PI con un declive entre las semanas 9 y 11 (Flores-Mendoza y Hernández 2010). El fenotipo de células T secretoras de IFN- $\gamma$  consiste de linfocitos CD4+ CD8+ de memoria y CD4+ cooperadoras (Mateu y Diaz 2008). Los cerdos tienen una importante población de células T doble positivas CD4 / CD8 que representan las células T de memoria, estas células son capaces de producir IFN y se localizan en los sitios de inflamación desempeñando un rol en la mediación de la inmunidad protectora (Zuckermann 1999). Las células T CD8+ aumentan después de 4-5 semanas de PI en pulmón, mientras que el aumento de las células CD4 + es menor. PRRSV puede interferir con la presentación de



antígenos y la activación de los linfocitos T así como reducir la expresión del MHC I y II en células dendríticas (CD) mediante la alteración de los patrones de citocinas de los macrófagos, CD y la modificación de la expresión de moléculas implicadas en la presentación de antígenos (Loving et al. 2015).

### **Vacunación contra PRRS**

Desde el comienzo de los brotes de PRRSV el desarrollo de vacunas eficaces ha sido un desafío. Las vacunas clásicas no funcionan correctamente por razones como mutación viral o falta de conocimiento sobre cómo el sistema inmune porcino interactúa con todas las proteínas PRRSV (Cano et al. 2007; Nan et al. 2017). No existe relación en la protección contra cepas homólogas o heterólogas y las cepas altamente divergentes dificultan el desarrollo de una vacuna universal (M A Kappes y Faaberg 2015). La mayoría de las vacunas (Porcilis PRRS de Merck, Ingelvac PRRSFLEX EU de Boehringer Ingelheim, Amervac-PRRS de Hypra, Pysrvac-183 de Syva) contra PRRSV-1, así como algunas para controlar PRRSV-2 (Fostera PRRS de Zoetis, Ingelvac PRRS MLV / Ingelvac PRRSATP de Boehringer Ingelheim) se basan en virus vivos modificados (MLV, por sus siglas en inglés, atenuado por pasaje múltiple en cultivo celular).

La mayoría de las vacunas de las especies PRRSV-1 y PRRSV-2 provocan respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas al conferir protección contra cepas parentales homólogas y protección parcial a las cepas heterólogas, es posible controlar algunos brotes de PRRSV mediante el uso de MLV más las buenas prácticas de manejo. Existen problemas de seguridad, como una alta tasa de mutación que origina la reversión a la virulencia y la recombinación entre vacunas y cepas de campo (Lunney y Chen 2010; Renukaradhya et al. 2015)

Las vacunas inactivadas no son efectivas ya que las respuestas inmunes provocadas no son suficientes para prevenir la propagación del virus. Sin embargo, este tipo de vacuna puede aumentar los anticuerpos neutralizantes y las respuestas de IFN- $\gamma$  después de una infección por el virus de campo o la vacunación con MLV y puede contribuir a la eliminación viral (Montaner-Tarbes et al. 2019). Actualmente se están evaluando nuevas estrategias para superar estos

problemas, incluidos antígenos atrapados en nanopartículas, enfoques basados en plantas o vacunas vectorizadas (Renukaradhya et al. 2015; Uribe-Campero et al. 2015).

Se han hecho varios intentos para usar proteínas estructurales para desarrollar vacunas contra PRRSV porque son blancos específicos de anticuerpos neutralizantes, pero no se observó reducción de la viremia después del desafío. , Una explicación se basa en la presencia de pocos epítomos neutralizantes en sus secuencias, la mayoría de los cuales se encuentran en regiones variables de las proteínas (Huang y Meng 2010; Montaner-Tarbes et al. 2019). El punto crítico de conocimiento para combatir PRRSV es caracterizar con precisión epítomos comunes que están presentes en todas las cepas de PRRSV, responsables de generar una respuesta inmune eficiente. Se necesitan nuevos enfoques de vacunación, capaces de obtener respuestas celulares y de anticuerpos efectivas con protección a mediano y largo plazo contra cepas homólogas y heterólogas (Montaner-Tarbes et al. 2019).

### **Proteínas no estructurales, algunas funciones**

Entre las proteínas no estructurales de PRRSV con capacidad de modulación de IFN tipo I, el Nsp1 ha sido considerado como el antagonista más fuerte de la producción de IFN- $\beta$  al actuar sobre la fosforilación del factor regulador de interferón 3 (IRF3) y la translocación nuclear (Montaner-Tarbes et al. 2019). La reactividad de los anticuerpos contra Nsp1 y N es altamente dependiente del replegamiento de proteínas desnaturalizadas, sugiriendo que la respuesta del anticuerpo porcino se dirige principalmente a epítomos conformacionales. Las respuestas de anticuerpos fuertes a Nsp1 y Nsp2 pueden beneficiar al huésped al limitar las consecuencias patológicas de las actividades de proteasas virales de estas proteínas que se liberan de las células en apoptosis (Johnson, Yu, y Murtaugh 2007). La inducción de la apoptosis antes de la finalización de la replicación viral limitaría la producción del virus de la progenie y su propagación en el huésped (Costers et al. 2008).

Nsp2 se empaqueta dentro o sobre el virión del PRRSV, presumiblemente a través de la interacción con la envoltura viral, se le ha reconocido como una proteína transmembrana de múltiples extensiones, considerándola una proteína integral de membrana al poseer una topología trans, el extremo N-terminal permanece citoplásmico, el dominio C-terminal está incrustado en membrana manteniendo una orientación luminal (Matthew A. Kappes, Miller, y Faaberg 2015). Nsp2 es multifuncional no solo como proteasa viral, también como antagonista viral de las defensas del huésped y parece ser una proteína altamente inmunogénica. Los anticuerpos para Nsp2 se montan 7 días post infección y duran muchos meses siendo una proteína muy inmunogénica por lo que esta proteína se puede utilizar para monitorear el virus circulante durante los primeros días de infección (F. X. Wang et al. 2013).

Nsp7 también es altamente inmunogénica, su respuesta de anticuerpos es comparable a las respuestas de anticuerpos a Nsp1 y Nsp2, así como a los antígenos utilizados en la prueba de ELISA IDEXX comercial (Janková y Celer 2012). La región central de Nsp2 contiene dominios hipervariables con inserciones y deleciones, la mayoría de los epítomos de células B identificados se localizan en estas regiones. En contraste, Nsp7 está relativamente conservado dentro de cada genotipo y es divergente entre genotipos (Brown et al. 2009). Péptidos de fagos a Nsp7 tienen un gran potencial como reactivos de diagnóstico para la detección de virus, y como candidatos antivirales eficaces para inhibir la replicación de PRRSV. Mediante el análisis TCID50 y PCR en tiempo real se demostró que los péptidos interfieren con la replicación del virus. Es posible que el péptido específico penetre en las células y se combine con Nsp7, interrumpiendo así su función e inhibiendo la replicación del virus pudiendo usarse como un reactivo antiviral para PRRSV (H. Wang et al. 2015).

Nsp11, es una endoribonucleasa conservada de Nidovirus con una endonucleasa específica de uridilato (NendoU) antagoniza el IFN tipo I, específicamente la producción de IFN $\beta$ , activada por el receptor 1 como el gen inducible por ácido retinoico, que muestra la especificidad del sustrato hacia las proteínas de

señalización antivirales mitocondriales (MAVS) y RIG-I. Otro mecanismo de respuesta antiviral de la Nsp11 está relacionado con el inflamasoma y la síntesis de IL-1 $\beta$  al interactuar con el complejo silenciador de ARN (RISC). *In vitro* en la línea celular MARC-145, esta proteína y Nsp1a son responsables de inhibir RISC y regular negativamente la expresión de la proteína argonauta-2, un titulador viral, lo que demuestra una relación directa entre este complejo silenciador y la replicación viral. Se han estudiado otras proteínas no estructurales, pero existe una brecha importante en la información sobre las funciones e interacción *in vivo* e *in vitro* en las vías de señalización. Además, la enorme variación entre las cepas hace que sea difícil caracterizar todas las variantes de proteínas e interacciones con los sistemas celulares (macrófagos, células dendríticas, monocitos y otros) (Montaner-Tarbes et al. 2019). Las proteínas no estructurales del PRRSV juegan un papel clave en el procesamiento y la maduración del repertorio estructural del virión, por ejemplo, usando clonación y expresión de Nsp1 y Nsp2 se ha determinado la respuesta de anticuerpos en sueros de cerdos infectados y vacunados. Los cerdos montan respuestas de anticuerpos con reactividad cruzada significativa que parecían equivalentes o mayores que la respuesta a la nucleocápside (N) (Johnson, Yu, y Murtaugh 2007). Las Nsp's están disponibles desde el momento más temprano de la infección para su presentación al sistema inmune en el contexto de las principales vías de presentación de antígenos del complejo de histocompatibilidad de clase I; la infección citolítica también libera proteínas virales en espacios intersticiales, generando una respuesta de anticuerpos pronunciada, equivalente a la respuesta inmune a las proteínas estructurales (Brown et al. 2009). La respuesta temprana a Nsp's indica que las proteínas se muestran en la superficie de las células infectadas para su presentación a las células B y se detectan después de la liberación de células muertas y moribundas (en apoptosis) y los anticuerpos dirigidos contra Nsp1 y Nsp2 pueden aparecer temprano en el curso de la infección por PRRSV a un nivel que depende de su inmunogenicidad y abundancia (Johnson, Yu, y Murtaugh 2007). Ello permite sugerir que una vía mediante la cual las Nsps pueden ser utilizadas como inmunógenos es mediante la citotoxicidad mediada por células

dependiente de anticuerpo (ADCC), que se basa en la unión de IgG a antígenos virales presentados en la superficie de células infectadas provocando la señalización hacia células efectoras como NK a través de receptores que reconocen la Fc de las IgG. Actualmente, no hay investigaciones publicadas que examinen el papel de ADCC en la infección por PRRSV en macrófagos; sin embargo, la migración de células inmunes a endometrio infectado con PRRSV sugiere un aumento del reclutamiento de células NK en el tejido infectado. La citotoxicidad mediada por el complemento dependiente de anticuerpos (CDC) es otro método potencial para la destrucción de macrófagos infectados con PRRSV. El CDC implica la unión de anticuerpos a células infectadas y la posterior fijación del complemento por la vía clásica (Owen JA, Punt 2016). Estas funciones efectoras de anticuerpos no se han examinado en un modelo de infección por PRRSV o durante periodos prolongados de infección (Rahe y Murtaugh 2017). La viremia que genera la infección por el PRRSV y su distribución en diferentes órganos genera anticuerpos contra NSP en diferentes momentos.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de PRRSV provoca grandes afecciones clínicas y productivas en las granjas porcinas y está reportada como la enfermedad que mayor impacto económico genera a nivel mundial, sin embargo, hasta el momento no existe un biológico capaz de conferir una protección efectiva que permita controlar y/o erradicar la enfermedad. Por otro lado, se ha demostrado que varias proteínas virales no estructurales (Nsp's) en PRRSV regulan negativamente la producción de IFN. Una respuesta inflamatoria disminuida y una débil respuesta antiviral (inducida por los IFN tipo I) crea un microambiente desfavorable en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Las Nsp's no han sido consideradas como inmunogénicas pero recientemente se ha demostrado que estimulan una respuesta inmune humoral temprana y semejante a la que se genera por proteínas estructurales en el huésped. por lo que en este trabajo se produjeron y purificaron proteínas recombinantes de las Nsp's 1, 2, 7 y 11 de ORF1 de PRRSV para estudiar in vitro su comportamiento inmunogénico y antigénico

#### **IV. HIPÓTESIS**

La expresión de proteínas recombinantes Nsp1, Nsp2, Nsp7 y Nsp11 del ORF1 del virus del PRRS evaluadas *in vitro* determinando su actividad y reconocimiento por anticuerpos de cerdos expuestos previamente al virus, indicaran que dichas proteínas pueden ser consideradas como candidatas a ser usadas como inmunógenos contra el virus del PRRS.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Producir y purificar proteínas recombinantes de las Nsp's 1, 2, 7 y 11 de ORF1 del PRRSV para estudiar in vitro su comportamiento inmunogénico utilizando pruebas de ELISA y sSeroneutralización.

### **Objetivos específicos**

- 1.- Expresar en sistemas bacterianos las proteínas recombinantes Nsp's 1, 2, 7 y 11 del ORF1 del PRRSV.
- 2.- Evaluar la capacidad inmunogénica de las Nsp's 1, 2, 7 y 11 del ORF1 de PRRSV al generar sueros hiperinmunes en cerdos.
- 3 Evaluar la capacidad antigénica de las Nsp's 1, 2, 7 y 11 de ORF1 del PRRSV por medio de la prueba de ELISA
- 4.- Evaluar la capacidad neutralizante de las Nsp's 1, 2, 7 y 11 del ORF1 del PRRSV con la prueba de seroneutralización.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### Propagación PRRSV

Para replicar el virus del PRRSV se utilizó la cepa de virus PRRS ATCC® VR-2332™, se infectó la línea celular MA-104 (ATCC® CRL-2378.1™), las células fueron crecidas con Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM), suplementadas con L-glutamina y con suero fetal bovino al 10% usando 150 µl por 5x10<sup>6</sup> células y cbp 5 ml de Medio de crecimiento de Eagle modificado de Dulbecco, agregado con 1000 UI de penicilina / estreptomina y 2% de suero bovino fetal. Una vez que se ha observado el efecto citopático (CPE) de VPRRS, el virus se recupera y se almacena a -70 ° C hasta su uso.

La extracción del ARN se realizó utilizando un kit comercial QIAamp® Viral RNA (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la generación del ADN complementario se utilizó la enzima transcriptasa-reversa incluida en el kit comercial One step® (QIAGEN) y finalmente para la realización de la RT-PCR se realizó con el kit QIAGEN OneStep RT-PCR Kit® (catalogo 210212), la mezcla de reacción se optimizó a 10 µl manteniendo las concentraciones entre los reactivos de la siguiente manera:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
Buffer 5x	2.0 µl	0.2X
DNTP's	0.4 µl	80 µM
Fw	0.2 µl	0.4 µM
Rw	0.2 µl	0.4 µM
Solución Q	2.0 µl	0.2X
Taq	0.4 µl	
Agua libre de RNAsas	3.3 µl	
Templado	1.5 µl	

El diseño de los iniciadores se realizó considerando la obtención de un amplicón de 600 pb

**ORF7** - Seq-F 5' AAGTGCCGCAGGCTTTCATC 3'

**ORF7**- Seq- R 5' CCACACGGTCGCCCTAATTG 3'



Para las condiciones de amplificación se utilizó un Termociclador Digital con Gradiente y bloque para 96 tubos de 0.2 ml, Ultigene Optimax, LABNET®, bajo las siguientes condiciones de amplificación:

1. cDNA: 50°C por 30 min
  2. PCR: 95°C por 15 min
  3. Desnaturalización: 94°C por 60 s
  4. Alineación 59°C por 30 s
  5. Extensión: 72°C por 2 min
  6. Extensión final: 72°C por 10 min
  7. Mantenimiento 4°C
- 35 ciclos

Una vez obtenido el producto de la RT-PCR para identificar que muestras fueron positivas se colocaron 5µl de estas con 2µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 2% (Bioline agarose Cat.AG 5-112 D) en Buffer TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X y se corrió a 90 volts (fuente de poder Bio Rad Power Pac Basic) en una cámara de electroforesis horizontal (Galileo bioscience 80-0780) durante 50 minutos. Una vez terminado el corrimiento, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 10 minutos y se visualizó en un transiluminador Bio Imaging Systems y un sistema de visualización de imágenes “Kodac Gel Logic 112”, identificando los amplicones esperados con ayuda de marcadores de peso molecular de 100 a 1000 pb (markers Puc Mix 8). Se utilizó la vacuna PRRS MLV Ingelvac® como control positivo (Imagen 1).

La cuantificación viral en las infecciones se realizó por medio de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) utilizando el kit comercial POCKIT™ PRRSV Reagent Set, siguiendo las instrucciones del proveedor, en un termociclador Rotor-Gene de Corbett Research®) adicionando una curva estándar.

#### Estandarización de RT-PCR para la obtención de Proteínas recombinantes

Se amplificaron las Nsp’s 1, 2, 7 y 11 del gen ORF-1 mediante RT-PCR, el diseño de los iniciadores para la RT-PCR incluyo en sus extremos secuencias correspondientes a los sitios de restricción enzimática *BamHI*, *XhoI* y *EcoR1* (Tabla 2), a partir de la cepa de referencia PRRSV de ATCC (ATCC® VR-2332™) según la metodología descrita anteriormente.

**Tabla 2.** Iniciadores con sitios de restricción utilizados para expresar NSP's de ORF 1 del genoma del PRRSV

Nsp	Secuencia (5' - 3')	Tamaño	Ref
<b>Nsp1</b>	F:5'GCGGATCC/G▼AATTC/TCTGGGATACTTGATCGGTG EcoR1 R:5'GGTGGTGGTG/C▼TCGAG/GCCGTACCACTTGTGAC XhoI	1148	(Johnson, Yu et al. 2007)
<b>Nsp2</b>	F:5'AATGGGTCGC/G▼GATCC/GCTGGAAAGAGAGCAAG BamH I R:5'GGTGGTGGTG/C▼TCGAG/TCGAGTATCATTTTTGGGG Xho I	2155	
<b>Nsp7</b>	F:5'AATGGGTCGC/G▼GATCC/TCTCTGACTGGTGCCCTCG BamH I R:5'GGTGGTGGTG/C▼TCGAG/TTCCCATTGAACTCTTCCAT Xho I	776	
<b>Nsp11</b>	F:5'AATGGGTCGC/G▼GATCC/AGCGTGTTGTAGATTCTCTCCG BamH I R:5'GGTGGTGGTG/C▼TCGAG/CATAGCTGGCAAGCTGATACC Xho I	750	

Para las condiciones de amplificación se utilizó un Termociclador Digital con Gradiente y bloque para 96 tubos de 0.2 ml, Ultigene Optimax, LABNET®, bajo el siguiente esquema:

**Tabla 3.** Condiciones de RT-PCR para amplificar las Nsp's 1, 7 y 11 del ORF1 de PRRSV

Nsp	cDNA	PCR	Desnat.	Alineación	Extensión	Ext final
<b>Nsp1</b>	50°C 30 min	95° C 15 min	94° C 60 s	57°C 60 s	72° C 2 min	72° C 10 min
<b>Nsp7</b>	50°C 30 min	95° C 15 min	94° C 60 s	57°C 60 s	72° C 2 min	72° C 10 min
<b>Nsp11</b>	50°C 30 min	95° C 15 min	94° C 60 s	54°C 60 s	72° C 2 min	72° C 10 min

35 ciclos

Para la proteína Nsp2 se realizó una transcripción reversa-reacción cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando el kit Superscript II RT, Invitrogen®. La reacción de amplificación se optimizó a 24 µl manteniendo las concentraciones entre los reactivos de la siguiente manera:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	
Templado	5.0 µl	} 60°, 5 min
Rw ORF7	1.0 µl	
DNTP's mix	1.0 µl	
5x first stand Buffer	4.0 µl	} 42°, 2 min
DTT	2.0 µl	
Solución Q	2.0 µl	
RNAsa Out	1.0 µl	} 42°, 50 min, 70° por 15 min
Enzima SSII	1.0 µl	

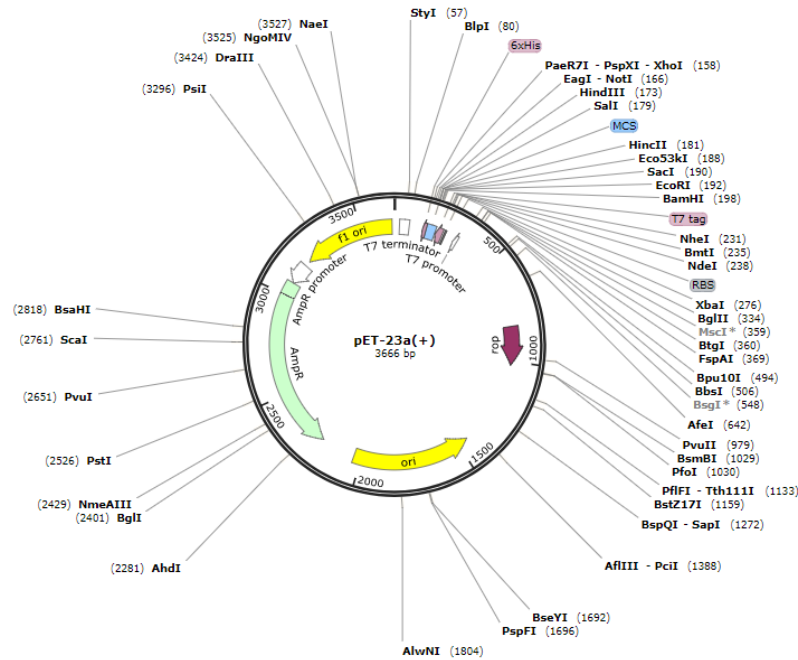
En el caso de la proteína Nsp1 se detectó presencia de bandas inespecíficas por lo que se realizó una purificación para aislar el producto de la PCR de interés utilizando el kit NucleoSpin® Extract II® de Clontech Laboratories, Inc. Todos los productos de RT-PCR fueron secuenciados para confirmar la identidad de los fragmentos del ORF-1.

Para el caso de la NSP2 debido a su tamaño se realizó un paso previo de transcripción reversa (RT) utilizando el kit Superscript II RT de Invitrogen®. En un volumen de 16 µl de RNA se agregó 1 µl de oligo ORF7 Fw y se adicionó 1 µl de dNTPs, esta mezcla se colocó en el termociclador a una temperatura de 60° C por 5 minutos, se bajó la temperatura a 4° C y se adicionaron 4 µl de 5X first stand buffer, 2 µl de 0.1 M DTT y 1 µl de RNAsa Out, se aumentó la temperatura a 42°C por 2 minutos, pasado este tiempo se bajó a 4°C y se adicionó 1 µl de enzima Superscript RT, se aumentó la temperatura a 42°C por 50 minutos y por último a 70°C por 15 minutos. La PCR se llevó a cabo con el uso del Kit LongAmp™ HotStart Taq 2X Master Mix de BioLabs® con la mezcla de trabajo:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
cDNA	1.5 µl
Fw Nsp2	0.4 µl
Rw Nsp2	0.4 µl
LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix	5.0 µl
Agua libre de RNAsas	2.7 µl

Ligación de los amplificadores de las Nsp's 1, 2, 7 y 11 en el vector pET23a(+)  
linearizado

Se utilizó un vector de clonación pET23a (+) que posee el promotor T7 y adiciona colas de histidina His-Tag que favorecen el reconocimiento de la proteína. Contiene un sitio múltiple de restricción que permite clonar el gen de interés y un cassette de resistencia al antibiótico ampicilina (figura 4).



**Figura 4. Mapa del vector pET23A(+). Se muestra el sitio múltiple de clonación y el cassette de resistencia a Ampicilina. Imagen creada en Snapgene.**

La linearización del vector se realizó mediante restricción utilizando las enzimas de interés bajo el siguiente esquema:

**Tabla 4. Mezcla de trabajo para digestión del vector pET23a (+)**

	<b>Restricción 1 (Nsp's 2, 7 y 11)</b>	<b>Restricción 2 (Nsp 1)</b>	
<b>Buffer NEB 3.1</b>	5 µl	5 µl	
<b>pET23a(+)</b>	3.57 µl (1000 ng)	<b>pET23a(+)</b>	3.57 µl (1000 ng)
<b>BamHI</b>	1 µl	<b>EcoRI</b>	1.5 µl
<b>XhoI</b>	1 µl	<b>XhoI</b>	1.5 µl
<b>Agua DEPC</b>	39.43 µl	<b>Agua DEPC</b>	38.43 µl
<b>Total</b>	50 µl		50 µ

Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 18 horas.

## Clonación

Para la clonación de los productos de RT-PCR de las Nsp's y el vector linearizado se utilizó el kit In-Fusion® HD Plus Complete Cloning System from Clontech Laboratories, Inc., Takara Bio Company siguiendo las indicaciones del fabricante.

## Transformación

La transformación se llevó a cabo en Stellar™ Competent Cells® de Clontech Laboratories, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Solo las colonias que hayan incorporado el plásmido con inserto DNA tendrán resistencia al antibiótico y crecerán en el medio selectivo. De las colonias que crecieron se seleccionaron al azar cuatro para confirmar la presencia del vector-inserto. Las colonias de interés se inocularon en 5 ml de medio líquido LB-ampicilina) por separado y se incubaron a 37°C a 250 rpm por 16 horas. Las colonias crecidas se centrifugaron a 3900 rpm por 30 minutos. Se retiró todo el sobrenadante y se realizó la purificación con el QIAprep Spin Miniprep Kit® de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra purificada se separó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en Buffer TAE 1X y se corrió a 100 volts en cámara de electroforesis horizontal durante 90 minutos. De las colonias seleccionadas una expresó el inserto por lo que se realizó una reacción de digestión para liberar el inserto (tabla 5) y corroborar su presencia (figura 5). El ADN de las colonias positivas fue enviado a secuenciación para su confirmación (ver anexo 2) a la Unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

**Tabla 5.** Reacción de restricción para liberar el inserto de proteínas clonadas.

	<b>Restricción (Nsp 1)</b>
<b>Buffer NEB 3.1</b>	5 µl
<b>pET23a+Nsp</b>	3.34 µl (1000 ng)
<b>EcoR1</b>	1 µl
<b>XhoI</b>	1 µl
<b>Agua DEPC</b>	39.43 µl
<b>Total</b>	50 µl

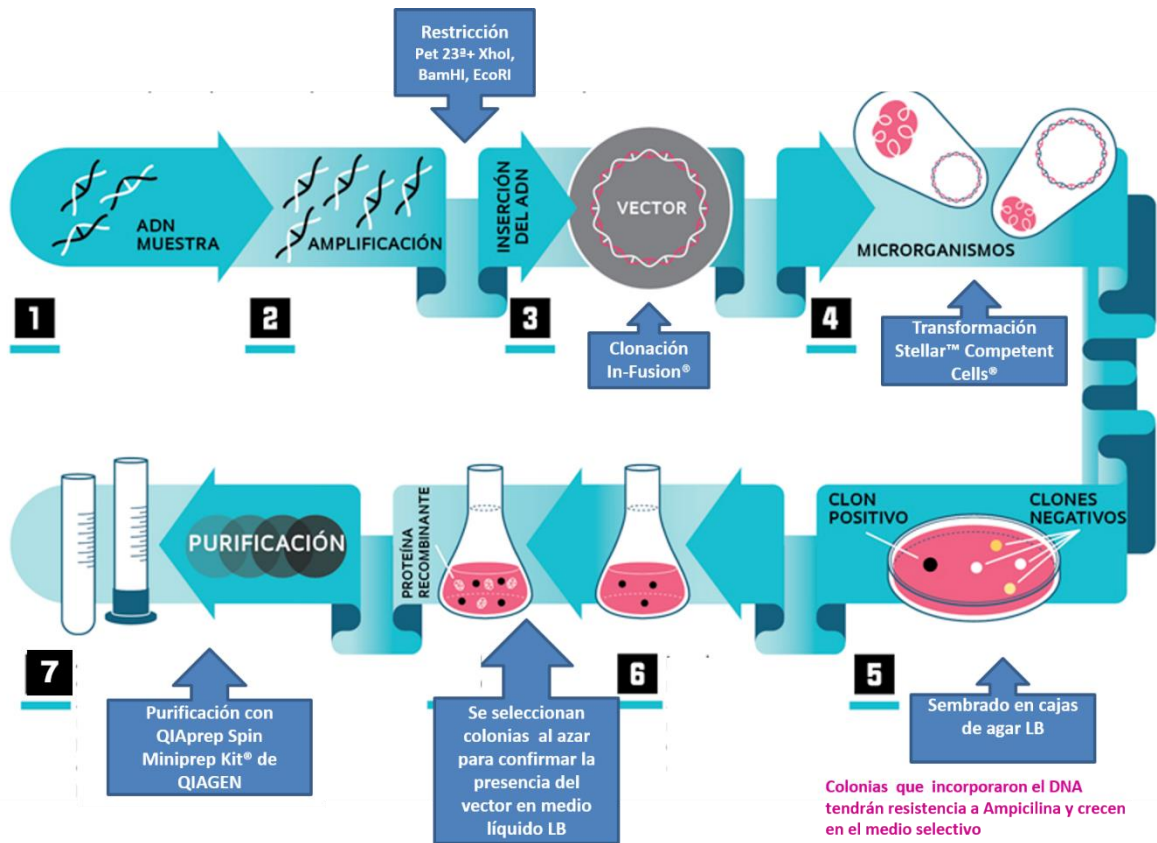
Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 16 horas.

### Expresión e inducción

Se llevó a cabo la transformación de células OverExpress™ C41(DE3) Chemically Competent Cells Sigma-Aldrich®, para ello se utilizaron las clonas que resultaron positivas con el plásmido recombinante pET23a purificado, la metodología se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Se eligió una colonia al azar y se inoculó en 5 ml de medio líquido LB y se dejó crecer a 37°C con agitación (225 rpm) 16 horas. Se tomó 1 ml del cultivo y se transfirió a un nuevo tubo con 4 ml de medio líquido LB, se dejó crecer a 37°C con agitación (225 rpm); se midió la densidad óptica ( $DO_{400nm}$ ) hasta llegar a 0.60<sub>abs.</sub> se realizó la inducción con IPTG con una concentración final de 1mM y se incubó a 37°C con agitación (225 rpm) durante ocho horas tomando 1 ml de la muestra a diferentes tiempos (0,2,4, 6 y 8 horas) para determinar el tiempo óptimo para la inducción de la proteína. Se incubaron las muestras en hielo durante 10 minutos y se cosecharon las células por centrifugación a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 100µl de solución de lisis (Tris-HCL 20 mM) y se procedió a sonicar las muestras sobre hielo por pulsos 10 segundos por tres ciclos y se dejó reposar por 30 segundos entre ciclos.

Se centrifugaron a 8,000 rpm durante cinco minutos, se tomó el sobrenadante y se guardó como fracción soluble. El "pellet" se resuspendió en buffer de lavado (Tris-HCL 20 mM pH8.0) y se centrifugaron a 13,000 rpm durante cinco minutos por dos repeticiones. El pellet se resuspendió en 40 µl de buffer de solubilización (Tris-HCL 20 mM, Urea, EDTA, NaCl) para obtener así la fracción insoluble (cuerpos de inclusión). Las proteínas expresadas fueron separadas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10% comprobando que la proteína se expresó al teñir las bandas de proteínas con azul de Coomasie. El corrimiento se llevó a cabo en un equipo Bio-Rad con un separador de 1.5mm a 115 volts. A partir de las 2 horas post-inducción se observó la expresión en la fracción insoluble y continuó expresándose en mayor cantidad conforme avanzó el tiempo (Figura 5)



**Figura 5.** Proceso de clonación y expresión de proteínas Nsp<sup>s</sup> recombinantes del PRRSV

### Purificación de las proteínas

Para la purificación de las proteínas recombinantes con una cola de 6 histidinas en el extremo N terminal aportada por el vector de clonación pET23a(+), se utilizó una columna de afinidad HisTrap™ HP (GE Healthcare Life Sciences) y mediante cromatografía de afinidad en un sistema ÄKTA prime plus (GE Healthcare Life Sciences). La columna se equilibró con tampón de ligado y cantidades crecientes de Imidazol desde 20mM a 60mM para eliminar proteínas no unidas (ver anexo 5). Mediante la determinación de la absorbancia de cada una de las fracciones de purificación se graficó el proceso (cromatograma), las fracciones de elusión en donde hubo un pico de concentración se tomaron para comprobar la purificación el gel de poliacrilamida, para verificar la presencia de la proteína limpia.

### Cuantificación de las proteínas por el método de LOWRY

Para determinar la concentración de las proteínas purificadas se elaboró una curva de calibración a partir de una solución de albumina sérica bovina (BSA) (10 mg/mL). La concentración que tienen las proteínas se determina por interpolación de los valores de absorbancia en la curva (ver anexo 6).

### Identificación de proteínas por Western blot

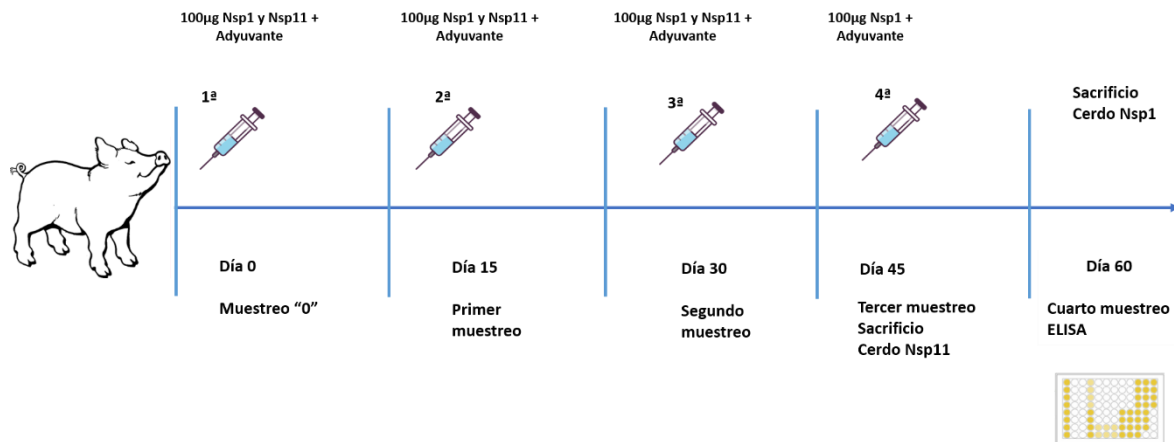
Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 1D y 2D / SDS-PAGE a 110 V durante 1 h (4°C) después de su separación por SDS-PAGE, se bloquearon con BSA al 3% en PBS-T durante 1 h, se lavaron con PBS-T y se incubaron durante 1 h utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) dirigido a la etiqueta his6 del producto recombinante, diluido 1: 4000. Las membranas se lavaron con PBS-T y se incubaron durante 1 h con anticuerpo policlonal IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma) diluido 1: 2000. La reacción se reveló utilizando 3 mg / ml de 3,3-diaminobencidina (Sigma) en PBS-T y 30% de peróxido de hidrógeno diluido 1: 1000.

### Obtención de sueros hiperinmunes

Se utilizaron las proteínas recombinantes obtenidas. Para cada proteína se inmunizaron dos cerdos de la raza Landrace con un peso aproximado de 15 kg, realizando tres inoculaciones con la proteína Nsp11 y cuatro inmunizaciones con la proteína Nsp1 a intervalos de 15 días cada una y en una proporción de 1:1 con adyuvante Montanide para todas las inmunizaciones; la inoculación se realizó por vía intramuscular profunda en la tabla del cuello como emulsión, a una concentración de 100 µg de proteína por ml de inóculo. El día de la primera inmunización se tomó una muestra de sangre para obtener el suero del sangrado "0" o basal, de igual forma se tomó muestra de sangre siete días después de cada inmunización para monitorear los títulos de los sueros hiperinmunes y determinar el tiempo óptimo de su obtención. Dos semanas después de la última inmunización, se realizó la eutanasia a los cerdos positivos con la finalidad de obtener el suero en blanco. La eutanasia se realizó mediante anestesia y posterior



exanguinación de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Los cerdos tuvieron restricción de alimento de 24 h, se tranquilizaron con 2.2 mg/kg xilacina vía intramuscular y anestesiados con 4.4 mg/kg Tiletamina-Zolacepam vía intramuscular; esto favoreció la sedación e inmovilización durante aproximadamente 20 minutos, los necesarios para realizar la exanguinación (figura 6). Se obtuvo el suero de los cerdos mediante centrifugación de la muestra y almacenado a -20°C hasta su utilización (El Comité de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria Medicina y Zootecnia, FMVZ-UNAM SICUAE, número DC-2018/2-2 concedió la aprobación ética para el uso de animales de experimentación).



**Figura 6. Calendario de inmunización de los cerdos**

### Western blot para sueros hiperinmunes

Para confirmar que los sueros hiperinmunes elaborados en cerdo son reconocidos por PRRSV completo estos fueron probados por prueba de Western Blot. Para ello se transfirió virus PRRS ATCC® VR-2332™ proveniente de cultivo celular en células MA-104 de 48 horas post infección. Se utilizó el tampón de lisis y extracción RIPA (Thermo Scientific) para la monocapa infectada con el PRRSV siguiendo las especificaciones del proveedor, una vez que se obtuvo el extracto de virus se realizó la transferencia a una membrana de de PVDF de 1D y 2D / SDS-

PAGE a 110 V durante 1 h (4° C) después de su separación por SDS-PAGE, se realizó un bloqueo con BSA al 3% en PBS-T durante 1.5 h, se lavaron con PBS-T y se incubaron durante 2 h con suero hiperinmune NSP1 o NSP11 1: 25 y 1:50. Las membranas se lavaron con PBS-T tres veces y se incubaron durante 1 h con anticuerpo policlonal IgG anti-cerdo acoplado a peroxidasa (Sigma) diluido 1: 2000. La reacción se reveló utilizando 3 mg / ml de 3,3-diaminobencidina (Sigma) en PBS-T y 30% de peróxido de hidrógeno diluido 1: 1000.

### ELISA para detección de anticuerpos contra las proteínas clonadas

Una vez purificadas y cuantificadas las proteínas se montó una prueba de ELISA específica para cada proteína y para evaluarlas se utilizaron 10 sueros conocidos provenientes de cerdos pertenecientes a los siguientes estados de la república mexicana: Jalisco, Guanajuato, Sonora, Michoacán y Yucatán, clasificados entre los 10 estados altamente productores de cerdo según información obtenida del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) cuya información está actualizada al año 2018 (Tabla 6). Se utilizaron 10 sueros negativos y 10 sueros positivos de cada uno de los estados anteriormente mencionados, dando así un total de 100 sueros a evaluar. Los sueros fueron evaluados previamente por la prueba de ELISA-UNAM (García-Plata; 2016).

**Tabla 6.** Producción de carne de cerdo por entidad en México, 2018.

Estado	Producción (toneladas)
<b>Jalisco</b>	<b>301,147.72</b>
<b>Sonora</b>	<b>261,756.80</b>
Puebla	165,562.94
<b>Yucatán</b>	<b>138,917.13</b>
Veracruz	129,665.38
<b>Guanajuato</b>	<b>113,521.95</b>
<b>Michoacán</b>	<b>44,394.39</b>
Chiapas	28,342.87
Oaxaca	27,680.26
Querétaro	22,461.79

La prueba de ELISA se montó siguiendo las especificaciones recomendadas por el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los Animales Terrestres 2017, de la OIE (OIE 2017), se probaron varias concentraciones de conjugado y dilución de los sueros para llegar a las condiciones óptimas para realizar la prueba (ver anexo 7), como se describe a continuación :

Se utilizaron placas con 96 pozos de poliestireno que fueron sensibilizadas con 0.1 µg/ml de antígeno de Nsp1 ó Nsp11 diluyéndolo en un volumen final por pozo de 100 µl de Buffer de carbonatos (carbonato de sodio, 1.59 g; bicarbonato de sodio, 2.93 g; agua destilada, 1 000 mL; pH, 9.6).

- Las placas se cubrieron con plástico para sellar y se incubaron toda la noche a 4°C.
- Para el lavado de las placas se empleó un lavador de placas de 96 pozos (marca BioTek®), el sobrenadante de cada placa se eliminó y se lavaron tres veces con solución de lavado PBS-Tween 20 al 3%, después del lavado se agitaron brevemente boca abajo sobre una toalla de papel para eliminar los residuos de la solución de lavado.
- Una vez lavada la placa se bloqueó para evitar la unión inespecífica en los espacios donde no se unió el antígeno usando 100µl de albumina sérica bovina (PBS-BSA 1%) por pozo, se cubrieron nuevamente con plástico y se incubaron a 37°C una hora, se repitió el proceso de lavado.
- Se añadieron 100 µl del suero hiperinmune (dilución 1:100 en PBS-BSA pH 7.2), y se incluyeron sueros positivos y negativos (testigos o controles de placa). Las placas se incubaron una hora a 37°C.
- Las placas se lavaron nuevamente como se describió anteriormente y se adicionaron 100 µl de anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y dirigido a IgG totales de cerdo (Anti-Pig IgG Fc Secondary Antibody, HRP®, SIGMA-ALDRICH). En una dilución 1:120 000, las placas se incubaron a 37°C por 60 minutos.
- Para el revelado se utilizó Tetra Methyl Benzidine (TMB, Invitrogen). Se evaluaron los niveles de anticuerpos en función de la absorbancia obtenida.

Se siguieron las cinéticas de lectura cada cinco minutos hasta llegar a un máximo de 30 minutos. La reacción se detuvo empleando una solución de ácido sulfúrico 0.2 M y se capturó la absorbancia en un espectrofotómetro de placas a una longitud de 450nm.

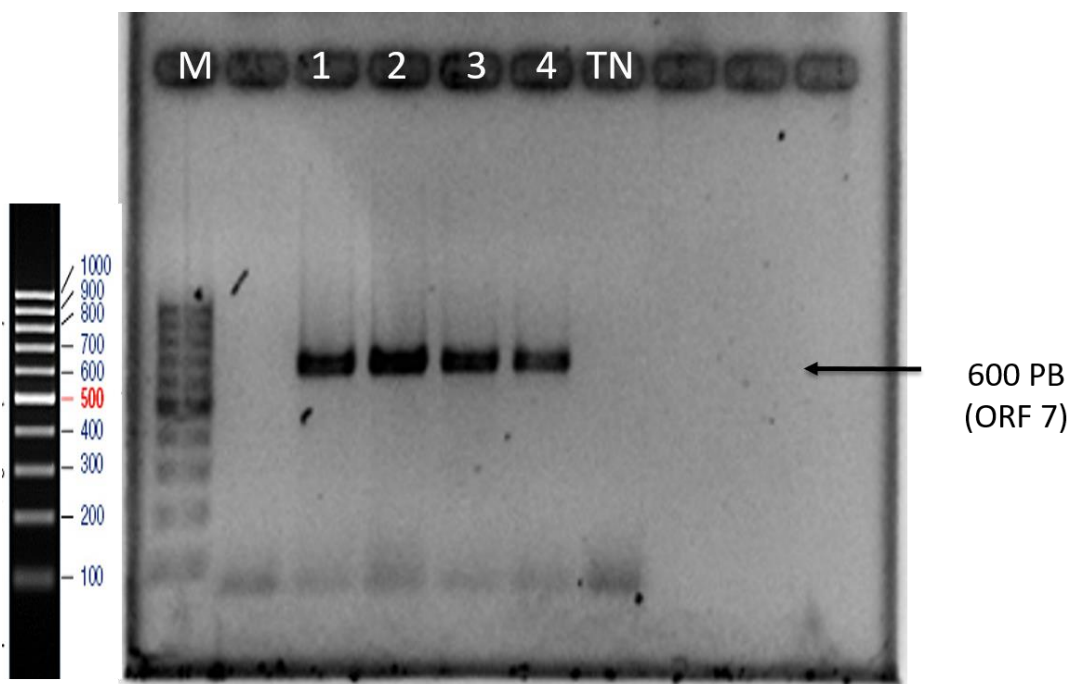
### Seroneutralización

Los anticuerpos generados en cerdos contra las proteínas recombinantes fueron evaluados por seroneutralización. Se obtuvieron monoestratos celulares confluentes de la línea MA-104 colocando 100 µl de una concentración de 105 células/ ml en placas estériles de 96 pozos con fondo plano en un volumen de 150 µl de MEM adicionado con 10% de suero fetal bovino por 24 horas. En placas estériles de 96 pozos con fondo en "U" se realizaron diluciones dobles en serie del suero hiperinmune de Nsp1 (SH Nsp1), Nsp11 (SH Nsp11), suero hiperinmune de VPRRS (SH PRRS) como control positivo y un suero negativo iniciando 1:2 y hasta 1:1240 con MEM sin suero, todas por cuadruplicado, los sueros fueron inactivados previamente a 56° C por 30 minutos. Una vez finalizadas las diluciones, se colocaron 50 µl del virus con 100, 300, 500 y 1000 DICC50%, cada suero se procesó por duplicado y se calculó el título promedio. El virus fue previamente titulado por el método de Reed and Muench (Del Castillo, Noé, y Casillas 2010) obteniendo un título viral de  $10^{-5.2}$  DICC50%. Se incubaron los sueros diluidos con el virus durante una hora a temperatura ambiente, después estas diluciones se adicionaron a los monoestratos de células MA-104 previamente decantadas y se suplementaron con MEM al 2% de suero fetal bovino hasta tener un volumen final de 150 µl por pozo (modificado de OIE, 2018). Los títulos de seroneutralización se expresaron como la dilución más alta de suero que neutralizó los efectos citopáticos del virus después de 96 horas de incubación a 37° C en 5% CO<sub>2</sub> (ver anexo 8).

## VII. Resultados

### Propagación del virus y Detección molecular de ARN viral

La propagación del virus y detección molecular de ARN viral se obtuvo a través del cultivo celular de la línea MA-104 e infectada con VPRRS Vacunal y/o cepa ATCC-VR-2332 (Imagen 1) y llevando a cabo la reacción de RT-PCR.



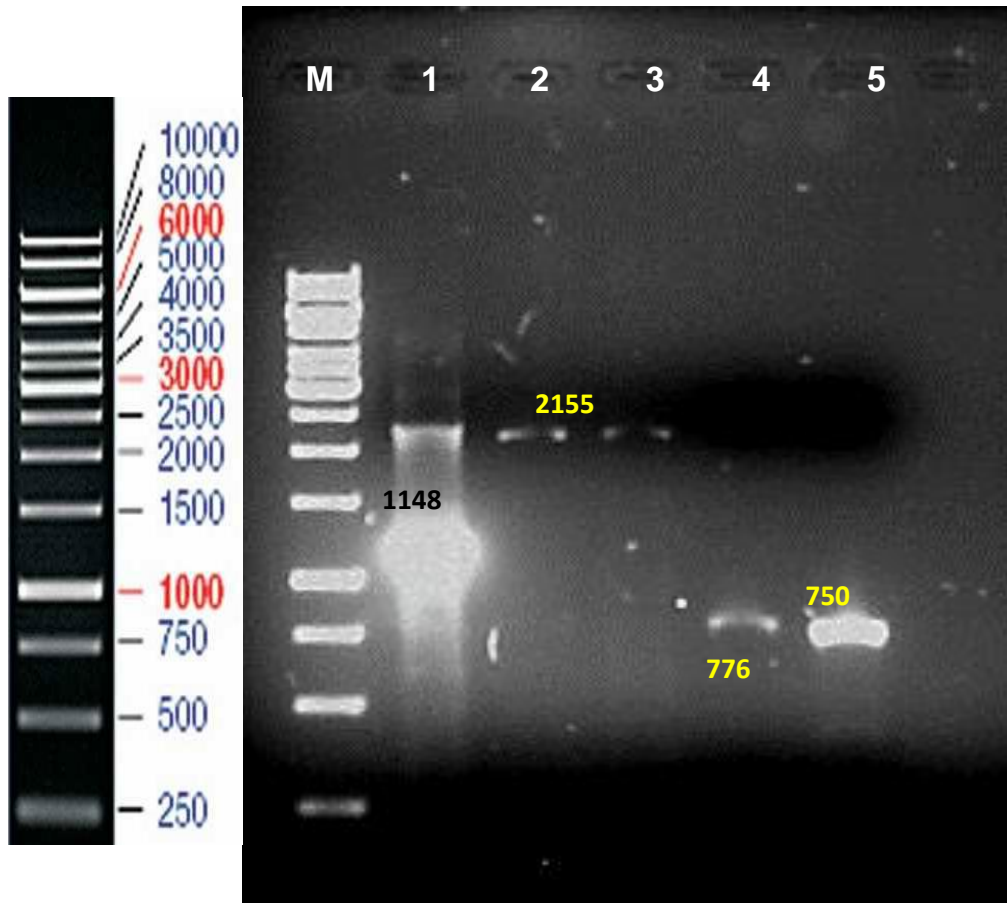
**Imagen 1.** RT-PCR Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Gel agarosa 2%. Los amplicones obtenidos por RT-PCR fueron analizados en una cámara de electroforesis utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 1000pb (M). VR2332 a 72 horas post infección (sobrenadante) (1), VR2332 a 96 horas post infección (sobrenadante) (2), VR2332 a 96 horas post infección (3). Los siguientes controles fueron probados: Vacuna PRRS MLV Igelvac® (4) y control negativo (TN).

El número de copias por ml que se obtuvieron fue de  $4.58 \times 10^5$  copias /ml = 458,000 copias /ml de (ver anexo 4).

### Estandarización de RT-PCR para la obtención de Proteínas recombinantes

La amplificación de los fragmentos ARN de 1148 pb de Nsp1, 2155 pb de Nsp2, 775 pb de Nsp7 y 750 pb de Nsp11 del gen ORF-1 mediante RT- PCR y usando

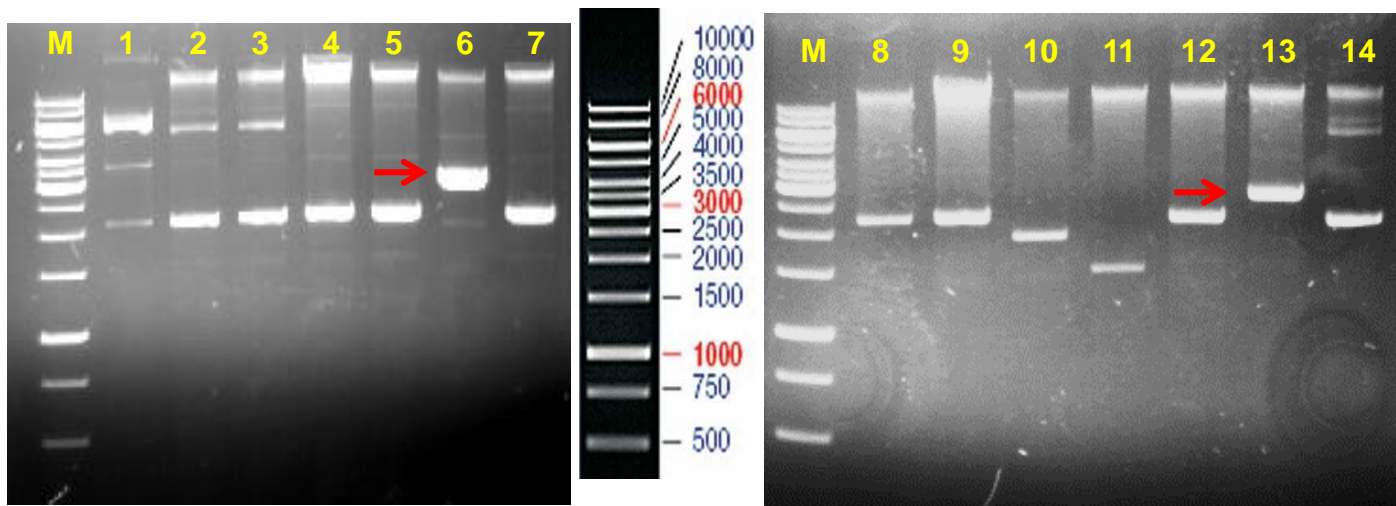
los oligonucleótidos iniciadores específicos cuyo resultado se muestra en la Imagen 2.



**Imagen 2.** RT-PCR Nsp's 1,2,7 y 11 del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Gel agarosa 1%. Los amplicones obtenidos por RT-PCR fueron analizados en una cámara de electroforesis utilizando un marcador de peso molecular de 250 a 10000pb

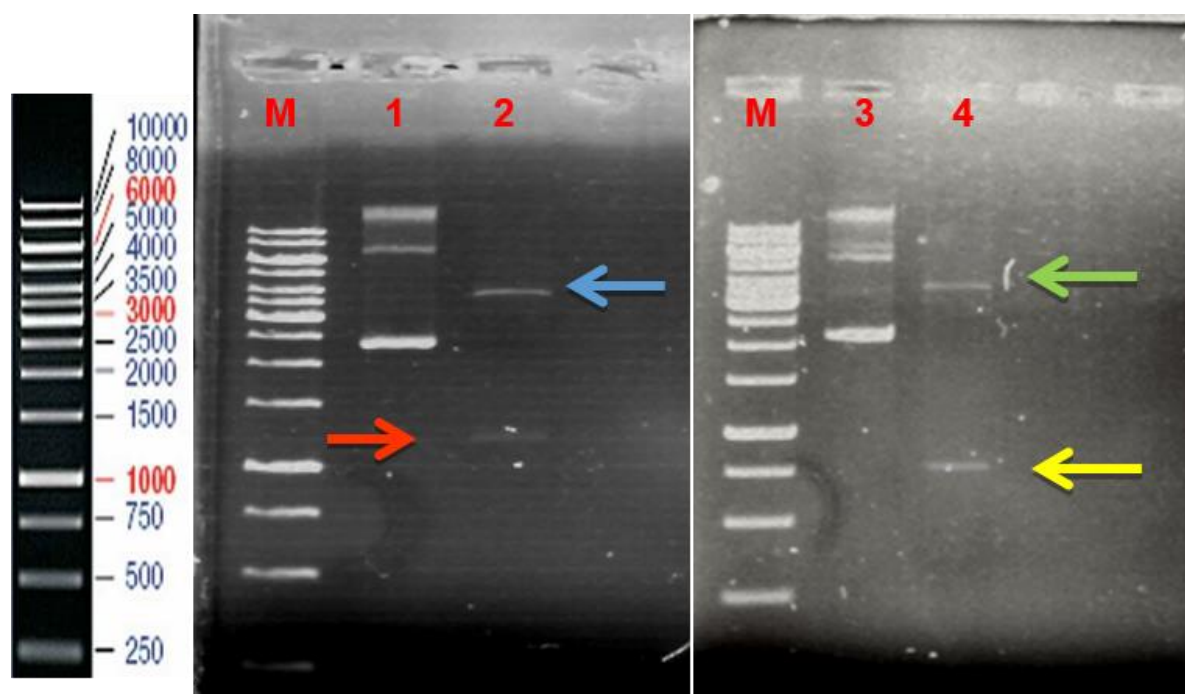
### Clonación y transformación de los productos de RT-PCR de las Nsp's

La clonación y transformación de las proteínas Nsp1 y Nsp11 se puede observar en la imagen 3, las Nsp2 y Nsp7 no lograron clonarse usando la metodología anteriormente descrita. Por medio de una digestión se corroboró su presencia; se observó una banda liberada de un peso aproximado de 1100pb, similar al tamaño de Nsp1 y otra de un peso aproximado de 750pb, similar al tamaño de Nsp11 (imagen 4) así como la confirmación por medio de secuenciación (ver anexo 2).



**Imagen 4.** Clonación de Nsp1 y Nsp11 del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Gel agarosa 1%. Las purificaciones fueron analizadas utilizando un marcador de peso molecular de 500 a 10000pb (M). pET23a C+ (1), pET23a (2,3), Nsp1 neg (4,5, 7), Nsp1 vector con inserto, flecha roja (6), pET23a C+ (8,9), Nsp11 neg (10, 11,12, 14), Nsp11 vector con inserto, flecha roja (13).

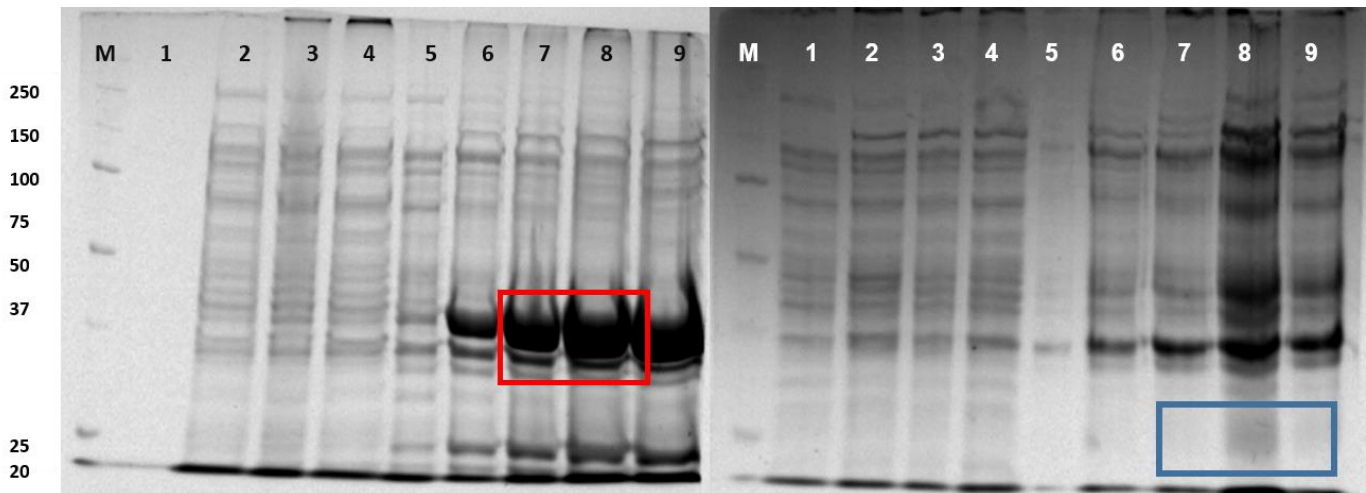
Por medio de una digestión se corroboró su presencia de las clonas, se observó una banda liberada de un peso aproximado de 1100pb, similar al tamaño de Nsp1 y otra de un peso aproximado de 750pb, similar al tamaño de Nsp7 (Imagen 4).



**Imagen 4.** Liberación de Nsp1+pET23a. Gel agarosa 1%. Las muestras fueron analizadas utilizando un marcador de peso molecular de 500 a 10000pb (M), pET23a (flecha azul) Nsp1 (flecha roja). pET23a (flecha verde) Nsp11 (flecha amarilla).

### Expresión e inducción

Una vez que se llevó a cabo la transformación en células de expresión con las clonas positivas que contenían el plásmido recombinante de las NSP's se realizó la inducción de los mismos, se determinó que a partir de las 2 horas post-inducción se empieza a ver la expresión en la fracción insoluble y continúa expresándose en mayor cantidad conforme avanza el tiempo (Imagen 5); se tomó como tiempo óptimo de expresión a las 4 horas post-inducción para la Nsp1 y de 6 horas para la Nsp11.

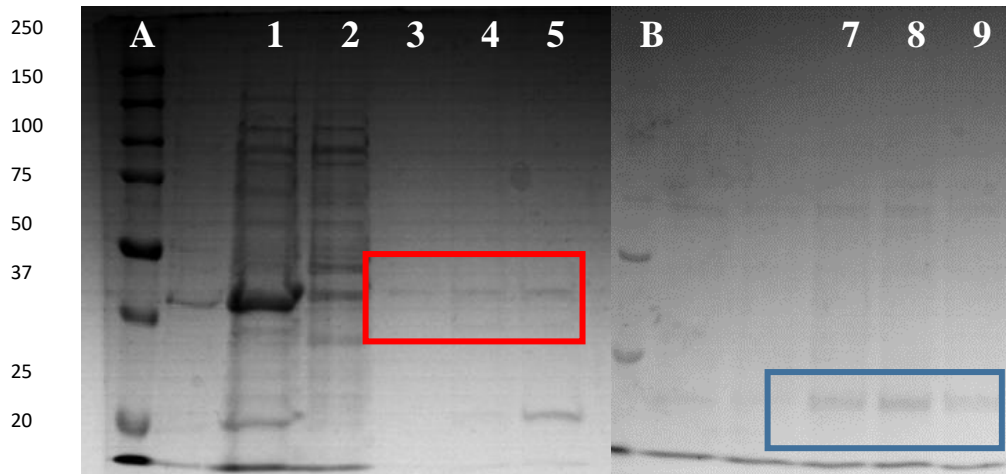


**Imagen 5.** Expresión de Nsp1 y Nsp11 en células OverExpress™ Chemically Competent Cells Sigma-Aldrich® . Gel de poliacrilamida al 10%. Se corrieron las proteínas totales, fracción soluble (FS) y fracción insoluble (FI) obtenidas. Las muestras fueron analizadas utilizando un marcador de peso molecular en KDa (M), FS tiempo=0h (1), FS tiempo=2h (2), FS tiempo=4h (3), FS tiempo=6h (4), FI tiempo=0h (5) FI tiempo=2h (6), FI tiempo=4h (7), FI tiempo=6h (8), FI tiempo=8h (9). Tiempo óptimo de expresión Nsp1 cuadro rojo ( izquierda) , tiempo óptimo de expresión Nsp11 cuadro azul (derecha).

### Purificación y cuantificación de las proteínas e identificación por Western blot

Al terminar con el proceso de elusión en las columnas fue posible obtener las fracciones en donde hubo un pico de concentración, se visualizaron en un gel de poliacrilamida y se verificó la presencia de la proteína limpia (Imagen 6).

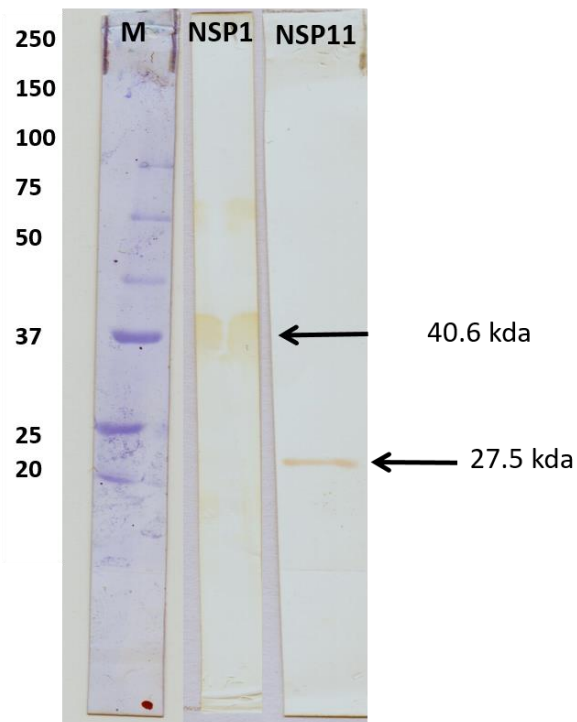




**Imagen 6. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie.**

- A. Marcador de peso molecular. 1. NSP1 Extracto completo 3, 4, 5 NSP1 purificada.  
 B. Marcador de peso molecular. 2. NSP11 Extracto completo, 7, 8 y 9 NSP11 purificada.

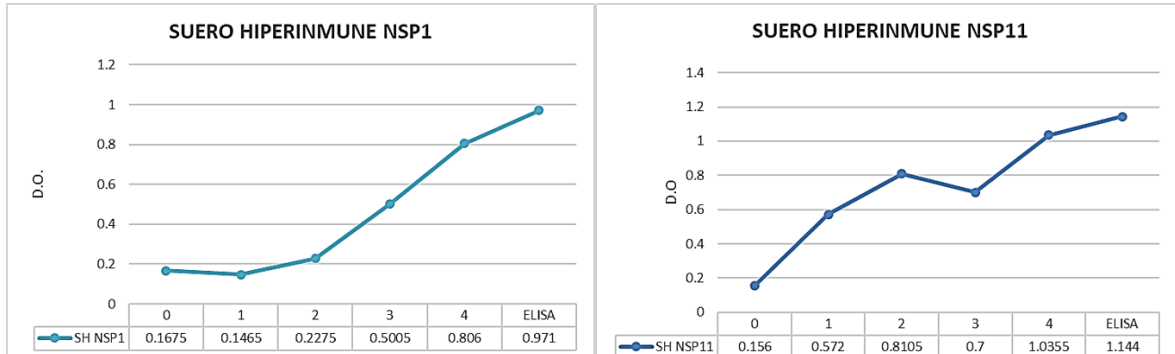
Las proteínas Nsp1 y Nsp11 recombinantes purificadas reaccionaron al anticuerpo anti His6 en inmunotransferencia como se muestra en la Imagen 7.



**Imagen 7.** Proteína NSP1 y NSP11 recombinante detectada por Western Blot con anti-His6 . (M) Marcador de peso molecular, unidad de referencia en kDa.

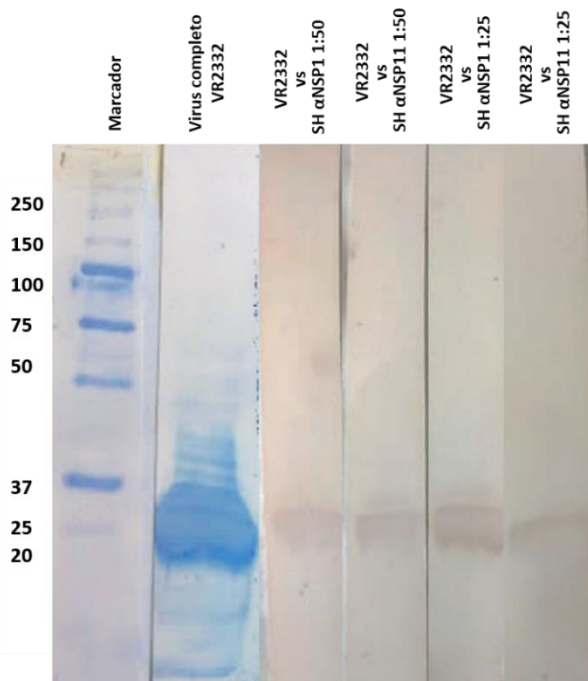
## Obtención de sueros hiperinmunes, Western Blot y prueba de ELISA

Los sueros hiperinmunes se evaluaron desde el inicio del programa de inmunización y hasta que se llevó a cabo la prueba de ELISA para los 100 sueros, el título fue aumentando gradualmente conforme se hacían las inoculaciones obteniendo, el suero hiperinmune de Nsp1 tuvo una lectura final en D.O. de 0.9871 y de 1.144 para Nsp11.



**Figura 7.** Título sueros hiperinmunes Nsp1 y Nsp11

Para la prueba de Western blot de PRSSV vs sueros hiperinmunes se logró observar un reconocimiento del antígeno o virus completo hacia los sueros hiperinmunes para NSP1 o NSP11 en las diferentes diluciones que se utilizaron (Imagen 8).



**Imagen 8.** Suero hiperinmune vs NSP1 y NSP11 detectado por Western Blot con anti IgG pig frente a virus completo PRRS cepa VR2332. Marcador de peso molecular, unidad de referencia en Kda, suero hiperinmune de NSP1 (SH  $\alpha$ NSP1), suero hiperinmune de NSP11 (SH  $\alpha$ NSP11).

Para la prueba de ELISA de ambas proteínas se utilizaron las mismas condiciones anteriormente mencionadas salvo que cada una contó con su suero control positivo (NSP1 ó NSP11), como controles negativos se utilizaron los sueros basales de cada uno de los cerdos utilizados para la producción de los sueros hiperinmunes (muestreo inicial o cero). Todos los experimentos se realizaron por duplicado y de cada placa utilizada se obtuvo el punto de corte, en el caso de NSP1 el punto de corte fue de 0.189 y para Nsp11 fue de 0.179.

De los 100 sueros analizados y que previamente fueron evaluados con ELISA-UNAM, sueros que fueron elegidos conociendo que el 50% fue reconocido como positivo y 50% como negativo. En el caso de ELISA Nsp1 92 el 92 % de las muestras fueron y 8% negativas. Para la prueba de ELISA con Nsp11 99 muestras fueron positivas (99%) y solo 1 negativa (Tabla 7). La sensibilidad para la proteína Nsp1 se calculó para 53.8% y 98.03% de especificidad; para la proteína Nsp11 la sensibilidad fue de 50.50% y 100% de especificidad ambas en comparación con la prueba ELISA-UNAM.

**Tabla 7.** Comparativo prueba de ELISA UNAM, Nsp1 y Nsp11

ESTADO	ELISA UNAM		ELISA NSP1		ELISA NSP11		Reactividad (positivo/negativo)		
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	UNAM	Nsp1	Nsp11
<i>Sonora</i>	10	10	19	1	20	0	10/10	19/1	20/0
<i>Jalisco</i>	10	10	15	5	20	0	10/10	15/5	20/0
<i>Michoacán</i>	10	10	20	0	20	0	10/10	20/0	20/0
<i>Guanajuato</i>	10	10	20	0	20	0	10/10	20/0	20/0
<i>Yucatán</i>	10	10	18	2	19	1	10/10	18/2	19/1
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>92</b>	<b>8</b>	<b>99</b>	<b>1</b>	<b>50/50</b>	<b>92/8</b>	<b>99/1</b>
<b>%</b>	50%	50%	92%	8%	99%	1%			

## Seroneutralización

Se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes en los sueros hiperinmunes de NSP1 (SH Nsp1), NSP11 (SH Nsp11) y PRRS, el suero negativo no tuvo ninguna respuesta en la prueba; el efecto citopático (Desprendimiento celular, células alargadas, células con núcleos de diferentes tamaños) en los cultivos fue evidente para diferenciar aquellas respuestas positivas de las negativas (imagen 9).

Los sueros tuvieron una mejor respuesta en aquellas condiciones donde las dosis infectantes fueron menores (100 y 300) obteniendo el suero hiperinmune de Nsp1 un título protector de 1:32 a 100 DI y 1:16 con 300 DI, en el caso de Nsp11 se obtuvo un título protector de 1:8 con 100 DI y 1:4 con 300 DI; con dosis más elevadas (500 y 1000) la respuesta neutralizante de los sueros fue menor (tabla 8).

**Tabla 8. Comparación de títulos de anticuerpos neutralizantes para las diferentes dosis infectantes de PRRSV probadas en la prueba de seroneutralización.**

<b>Suero</b>	<b>Título con dosis infectante</b>			
	<b>100</b>	<b>300</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
<b>SH Nsp1</b>	32	16	8	4
<b>SH Nsp11</b>	8	4	4	4
<b>SH PRRS</b>	8	4	4	2
<b>Suero negativo</b>	0	0	0	0

Los valores de los títulos se expresan como la inversa de la dilución del suero

Se observa que el suero que tuvo mayor actividad neutralizante fue el suero hiperinmune de Nsp1 contrastando con el suero hiperinmune de PRRSV que fue el que obtuvo una menor respuesta frente al virus en cultivo celular, el suero hiperinmune de Nsp11 también mostro una actividad neutralizante frente a las diferentes dosis infectantes del virus que fue menor a la actividad del SH Nsp1 y mayor que el SH PRRS.

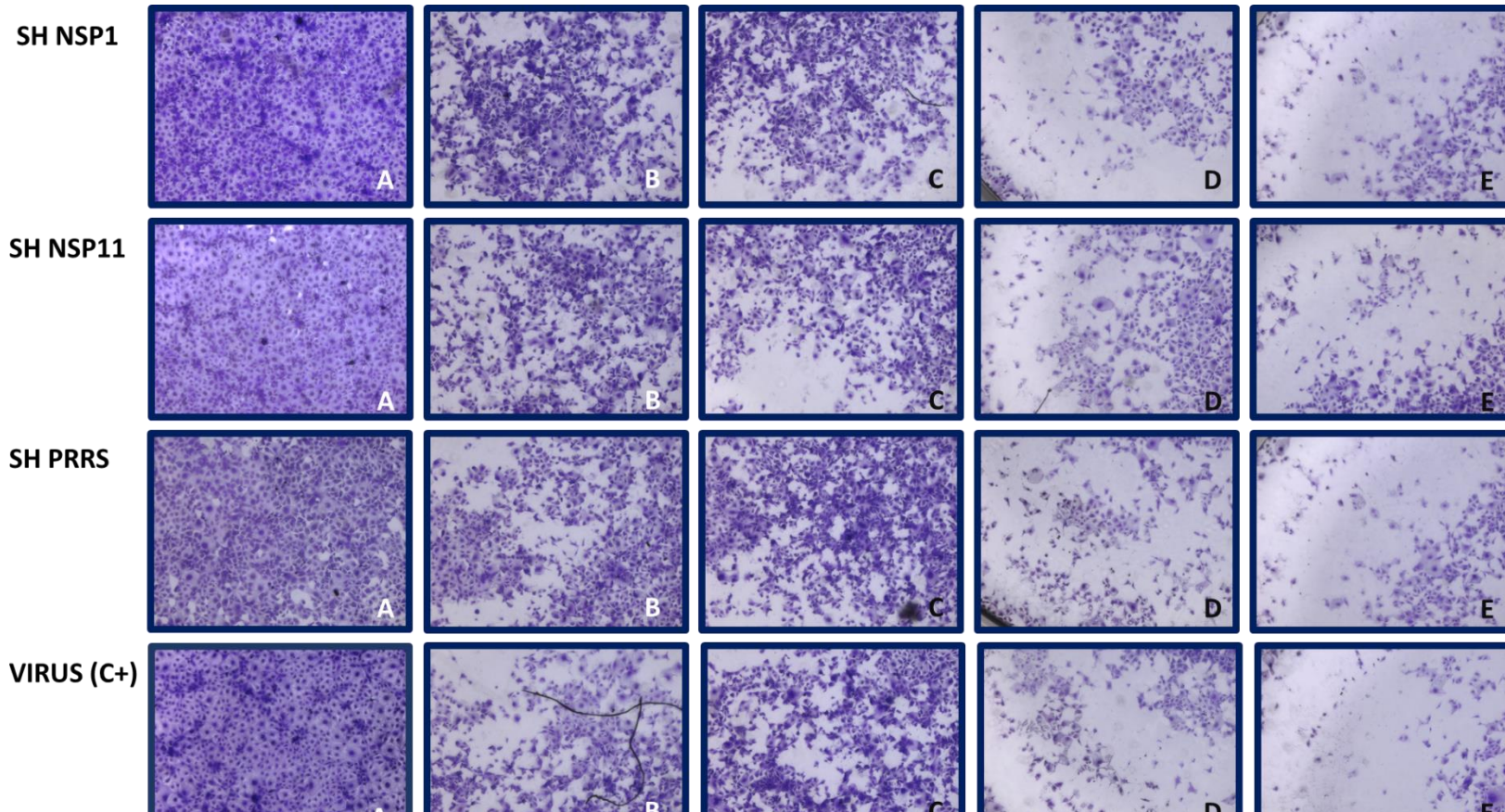


Imagen 9. Seroneutralización del virus de PRRS VR2332 vs diferentes sueros hiperinmunes a diferentes concentraciones donde: Suero Hiperinmune (SH) NSP1 A) Suero positivo, SH NSP1 B)100 dosis infectantes, SH NSP1 C)300 dosis infectantes, SH NSP1 D) 500 dosis infectantes, SH NSP1 E)1000 dosis infectantes., SH NSP11 A) Suero positivo, SH NSP11 B)100 dosis infectantes, SH NSP11 C)300 dosis infectantes, SH NSP11 D) 500 dosis infectantes, SH NSP11 E)1000 dosis infectantes, SH PRRS A) Suero positivo, SH PRRS B)100 dosis infectantes, SH PRRS C)300 dosis infectantes, SH PRRS D) 500 dosis infectantes, SH PRRS E)1000 dosis infectantes, Control positivo virus (C+) A) Monoestrato sin infectar, C+ B)100 dosis infectantes, C+ C) 300 dosis infectantes, C+ D)500 dosis infectantes y C+ E) 1000 dosis infectantes. Monoestrato células MA-104, confluencia 80% a 96 hpi. Vista al microscopio invertido 40X y tinción con cristal violeta.

## VIII. Discusión

El PRRS se observó por primera vez en 1987 en los Estados Unidos (Keffaber 1989), en 1990 se extendió a Canadá (H 1990) y se reportó el primer brote de la enfermedad en Alemania (Nodelijk 2002) que se extendió rápidamente por Europa (Goyal 1993; Nodelijk 2002). En 1994 fue reconocido oficialmente en 16 países de tres continentes (América, Asia y Europa) (Nodelijk 2002; Stadejek et al. 2013). La enfermedad es de alta importancia económica debido a los efectos adversos graves sobre la producción porcina, provocando un aumento de 20 a 30% en la tasa de muerte fetal (Goyal 1993). El costo de pérdidas por PRRS en la cría y engorda de cerdos en USA se estimó en \$ 664 millones de dólares al año solo en reproductoras es de \$ 302.06 millones, mayoritariamente debido a la reducción de los ingresos de destete (Neumann et al. 2005; Holtkamp et al. 2013).

La enfermedad surgió con dos genotipos diferentes en continentes separados (Keffaber 1989). El virus posee una notable diversidad fenotípica y genética, debido a su replicación y recombinación que genera un genoma viral extraordinariamente adaptable (Matthew A. Kappes y Faaberg 2015).

Desde la aparición del PRRS no se ha desarrollado con éxito una vacuna eficaz para prevenirlo, las vacunas de ADN, de subunidades o las vacunas con virus completo han sido probadas, pero su valor potencial como sustitutos de la vacuna MLV de PRRSV actualmente en uso sigue siendo incierto (Nan et al. 2017). Por ello la detección de los anticuerpos tempranamente podría jugar un papel importante en la vigilancia y toma de medidas preventivas contra PRRSV. Una respuesta inmune temprana y prolongada contra proteínas de virus no estructurales podría ser la clave para lograr este objetivo. Este estudio buscó probar si las proteínas no estructurales tienen actividad inmunogénica y antigénica en la respuesta inmune frente al virus de PRRS.

Las proteínas Nsp1 y Nsp11 recombinantes se expresaron con éxito en células de *E. coli* OverExpress™ Chemically Competent Cells Sigma-Aldrich® ambas en la fracción insoluble, se observó que el rendimiento de las proteínas fue mayor para Nsp1 que para Nsp11.

Las Nsp's 2 y 7 no se lograron clonar, aunque se intentó varias veces haciendo pequeñas modificaciones a la metodología, se necesita hacer más ensayos cambiando condiciones para tratar de lograr una clonación exitosa de estas proteínas. Algunas de las dificultades y limitaciones que suelen presentarse en los protocolos de síntesis y purificación de proteínas es 1) la recombinación de un plásmido recombinante que codifica la proteína recombinante en el genoma del hospedero teniendo como consecuencia la interrupción de genes importantes en el genoma del hospedero y dar origen a genotipos desconocidos que son incapaces de sintetizar la proteína de interés, 2) el deterioro de la fisiología celular del hospedero debido al manejo es un factor que afecta el desarrollo y crecimiento del hospedero además del estrés nutricional al que están sujetos los microorganismos hospederos, 3) una inadecuada aireación del cultivo que puede provocar limitaciones en la producción de aminoácidos y la estabilidad del plásmido, en conjunto estos factores pueden ocasionar errores de transcripción que repercuten en la integridad de la proteína recombinante (Mattanovich et al. 2004; Barron, Piskareva, y Muniyappa 2007; Guevara-Hernández et al. 2013). Estos errores aleatorios son difíciles de detectar, ya que producen una mezcla heterogénea de polipéptidos. Las proteínas alteradas pueden estar presentes en cantidades pequeñas, pero el número total de moléculas defectuosas puede ser el causal del bajo o nulo rendimiento de la proteína.

La generación de sueros hiperinmunes usando los productos recombinantes de las Nsp's del PRRSV fue satisfactoria al obtener una buena respuesta por parte de los animales y observar un incremento en la D.O. en la evaluación por ELISA de los mismos, otros estudios donde se trabajó con sueros hiperinmunes muestran que estos fueron elaborados en otras especies como ratón (Bi et al. 2017) o en su caso el uso de cerdos para inoculación a partir de péptidos (Díaz et al. 2009). Se sabe que las proteínas no estructurales del PRRSV juegan un papel clave en el procesamiento y la maduración del repertorio estructural del virión, los cerdos montan respuestas de anticuerpos con reactividad cruzada significativa que parecen equivalentes o mayores que la respuesta a la proteína de nucleocápside N (Johnson, Yu, y Murtaugh 2007).

El análisis por Western Blot mostró que el virus completo del PRRS obtenido a partir de la infección de células MA-104 y cosechado 48 horas post infección es reconocido por los sueros hiperinmunes específicos contra las Nsp's, contrastando con otros estudios en donde se han identificado regiones de proteínas usando fragmentos de péptidos expresados como proteínas antigénicas o identificando epítomos utilizando péptidos sintéticos (de Lima et al., 2006). Las Nsp's están disponibles desde el momento más temprano de la infección para su presentación al sistema inmune a través de la unión con antígenos del complejo de histocompatibilidad de clase I; la infección citolítica también libera proteínas virales a espacios intersticiales, generando una respuesta de anticuerpos pronunciada, equivalente a la respuesta generada por proteínas estructurales (Brown et al. 2009), la respuesta temprana a las Nsp's indica que las proteínas se muestran en la superficie de las células infectadas para su presentación a las células B y los anticuerpos dirigidos contra ellas pueden aparecer temprano en el curso de la infección por el PRRSV (Johnson, Yu, y Murtaugh 2007).

La prueba de PRRSV ELISA-UNAM contiene virus de campo completo como antígeno para el diagnóstico serológico de infecciones por el PRRSV. Las proteínas recombinantes Nsp1 y Nsp11 demostraron ser inmunorreactivas., Nsp1 fue reconocida por el 98.03% de los sueros utilizados y Nsp11 para un 100%, es un índice mayor para el que ya indicaba la prueba ELISA-UNAM que se consideraba muy sensible en comparación con la prueba comercial IDEXX (García-Plata; 2016). Un análisis de la cinética de la respuesta de anticuerpos mostró que la respuesta a Nsp7 es comparable a las respuestas de anticuerpos a Nsp1 y Nsp2, así como a los antígenos utilizados en el ELISA comercial de IDEXX (Brown et al. 2009). La sensibilidad obtenida en la ELISA Nsp1 (53.8) y de Nsp11 (50.5%) al compararlas con la prueba ELISA-UNAM no es muy elevada, pero a diferencia de esta última se logró detectar un mayor número de sueros falsos negativos, es decir fueron más sensibles. Una prueba diagnóstica de alta sensibilidad es útil en el contexto clínico de la infección. Janková & Celer, realizaron un trabajo con Nsp7 y de acuerdo a sus resultados proponen que el uso de Nsp's para la detección de anticuerpos post-infección y post-vacunación



sea cuando las vacunas inactivadas se usan ampliamente para controlar la infección por PRRS en granjas positivas y también para monitorear granjas seronegativas que podrían no serlo y más cuando existe una alta prevalencia y proximidad entre las mismas lo que las hace vulnerables a la infección, esta diferenciación podría ayudar a mejorar la vigilancia y el control de PRRSV (Janková y Celer 2012). En nuestro estudio varios de los sueros identificados como negativos resultaron positivos debido a la alta sensibilidad de la prueba y consideramos que es importante tener una alta sensibilidad usando antígenos de placa como las Nsp`s las cuales se sintetizan de forma temprana en la infección y por lo tanto son reconocidas por el sistema inmune antes que las proteínas estructurales y además duran muchos meses. Según Johnson (Johnson, Yu, y Murtaugh 2007), las Nsps están disponibles desde el inicio de la infección para su presentación al sistema inmune vía presentación del antígeno de clase I del complejo principal de histocompatibilidad. La infección citolítica libera proteínas virales a espacios intersticiales y existe la hipótesis de que se generará una respuesta pronunciada de anticuerpos, equivalente a la respuesta inmune que se genera contra las proteínas estructurales, además existen títulos sostenidos de anticuerpos vs Nsps, durante un período de infección de hasta 202 días, mientras que la respuesta del anticuerpo a la proteína N disminuye gradualmente después de 126 días (Brown et al. 2009).

Los títulos neutralizantes presentes en los sueros hiperinmunes de Nsp1 y Nsp11 muestran que estas proteínas no estructurales tienen una actividad antigénica importante en la respuesta del individuo y que en algún momento de la infección pueden favorecer la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente al virus. Existen reportes anteriores de la actividad neutralizante de anticuerpos contra PRRS utilizando principalmente sueros hiperinmunes de proteínas GP5, M o N (Loemba et al. 1996; I. J. Yoon et al. 1994; Gonin et al. 1999), pero reportes del papel de la actividad neutralizante que pueden llegar a tener las proteínas no estructurales desconocemos si existe algún estudio o protocolo anteriormente descrito.

No obstante, se ha demostrado que la Nsp2 del virus de PRRS se empaqueta dentro o sobre el virión, presumiblemente a través de la interacción con la envoltura viral. Históricamente se le ha reconocido como una proteína transmembrana de múltiples extensiones, pero además se demostró que la Nsp2 de longitud completa es una proteína de membrana integral (Matthew A. Kappes, Miller, y Faaberg 2015) lo cual podría ser un antecedente para explicar la neutralización del virión involucrando los anticuerpos generados contra proteínas no estructurales.

Estudios anteriores reportan que la principal actividad neutralizante frente a PRRS está dirigida a GP5 (Lopez y Osorio 2004; Popescu et al. 2017; Vashisht et al. 2008), no obstante, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las proteínas no estructurales Nsp1 y Nsp11 pueden ser reconocidas por el sistema inmune del individuo afectado y llegar a montar una respuesta de anticuerpos que además pueden tener un papel neutralizante

Un estudio en lechones utilizó los clones infecciosos (rHuN4-F112 y rCH-1R) de la cepa vacunal HP-PRRSV atenuada HuN4-F112 y la cepa vacunal PRRSV clásica CH-1R mas una serie de clones quiméricos intercambiando individualmente las regiones del ORF1 dentro del genoma entre los dos clones parentales, se rescataron los virus y se analizó la cinética de crecimiento, la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes (NA) y la viremia en lechones inoculados con cepas de PRRS. Los títulos de NA de los sueros de lechones inoculados con rHuN4-F112 contra rHuN4-F112-C1 fueron significativamente más bajos que los títulos de NA contra el propio rHuN4-F112. Por el contrario, los títulos de NA de los sueros de lechones inoculados con rHuN4-F112 contra rHuN4-F112-C27 fueron significativamente más altos que los títulos de NA contra rCH-1R. Estos resultados indicaron que ORF1a también tiene una región de neutralización de PRRSV. En la actualidad, estas vacunas aún se encuentran en etapa experimental, posiblemente porque la región de neutralización sigue sin estar clara (Leng C et al. 2017). Las proteínas no estructurales son las primeras proteínas virales en ser sintetizadas en células infectadas con PRRSV, son esenciales para el ciclo de vida viral y es probable que su presencia en las células sea tóxica por su actividad de proteasa,

estas proteínas se expresan temprano en el ciclo viral, están disponibles desde el primer momento de la infección para la maquinaria del proteosoma de los macrófagos para su degradación y presentación al sistema inmune en el contexto de MHC de clase I y II (Johnson, Yu, y Murtaugh 2007) aunque los anticuerpos dirigidos contra proteínas del ORF 1 podrían inducir respuestas de anticuerpos débiles debido a que su expresiones más baja en comparación con proteínas estructurales como ORF 5, 6 y 7 (J. J. M. M. Meulenber 2000) son un foco de atención que podría orientar las estrategias del control de PRRSV a otras perspectivas. La información disponible sobre Nsp`s sugiere que estas contienen regiones altamente antigénicas y conservadas entre diferentes cepas de PRRSV, por lo cual pueden utilizarse como estimuladoras de la respuesta inmune, los inmunogenos basados en Nsp`s podrían inducir protección contra diferentes cepas, con una respuesta efectiva y rápida a la infección y previniendo los efectos inmunomoduladores del virus (Rascón-Castelo et al. 2015).

## **IX. Conclusiones**

Usar proteínas virales no estructurales para la detección de anticuerpos post-infección y post-vacunación podría ser de ayuda no solo para controlar la infección por PRRS en granjas ya positivas sino también para proteger rebaños seronegativos al ayudar a mejorar la vigilancia y el control de la infección por PRRS.

Este trabajo mostró que las Nsp`s recombinantes del PRRSV pueden ser antigénicas e inmunogénicas al lograr inducir una respuesta de anticuerpos en cerdos inoculados con estas mismas y además fueron reconocidas por sueros de campo de cerdos que ya habían sido expuestos al virus en forma natural.

En este estudio se presenta un acercamiento para proponer el uso de proteínas recombinantes de proteínas no estructurales como una nueva alternativa de inmunógeno frente al virus de PRRS y que podrían ser utilizadas como una herramienta diagnóstica más precisa, las pruebas serológicas actuales no tienen un rendimiento diagnóstico del 100%, algunas de estas pueden dar resultados

falsos positivos. Por lo tanto, una combinación de pruebas montadas con diferentes antígenos mejoraría la precisión del diagnóstico.

Sin embargo, aun hacen falta estudios más precisos que ayuden a corroborar estas hipótesis.

## Bibliografía

Abul K. Abbas ; Andrew H. Litchman; Shiv Pillai. 2017. *INMUNOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR Octava Edicion. Elsevier.*

Albina, E. 1997. "Epidemiology of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS): An Overview." *Vet Microbiol* 55 (1–4): 309–16.

Barron, Niall, Olga Piskareva, and Mohan Muniyappa. 2007. "Targeted Genetic Modification of Cell Lines for Recombinant Protein Production." In *Cytotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9050-y>.

Benfield, D A, J E Collins, S A Dee, P G Halbur, H S Joo, K M Lager, W L Mengeling, et al. 2000. "Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino." In *Enfermedades Del Cerdo*.

Bi, Caihong, Zengyu Shao, Yuanfeng Zhang, Liang Hu, Jiangnan Li, Li Huang, and Changjiang Weng. 2017. "Identification of a Linear B-Cell Epitope on Non-Structural Protein 12 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Using a Monoclonal Antibody." *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3355-8>.

Brown, E, S Lawson, C Welbon, J Gnanandarajah, J Li, M P Murtaugh, E A Nelson, et al. 2009. "Antibody Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Nonstructural Proteins and Implications for Diagnostic Detection and Differentiation of PRRSV Types I and II." *Clin Vaccine Immunol* 16 (5): 628–35. <https://doi.org/10.1128/CVI.00483-08>.

Burgara-Estrella, A, I Diaz, I M Rodriguez-Gomez, S E Essler, J Hernandez, and E Mateu. 2013. "Predicted Peptides from Non-Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Are Able to Induce IFN-Gamma and IL-10." *Viruses* 5 (2): 663–77. <https://doi.org/10.3390/v5020663>.

Burgara-Estrella, Alexel, Ivan Díaz, Irene M. Rodríguez-Gómez, Sabine E. Essler, Jesús Hernández, and Enric Mateu. 2013. "Predicted Peptides from Non-Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Are Able to Induce IFN- $\gamma$  and IL-10." *Viruses* 5 (2): 663–77. <https://doi.org/10.3390/v5020663>.

Butler, J E, K M Lager, W Golde, K S Faaberg, M Sinkora, C Loving, and Y I Zhang. 2014. "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS): An Immune Dysregulatory Pandemic." *Immunol Res* 59 (1–3): 81–108. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8549-5>.

Cancel-Tirado, S M, R B Evans, and K J Yoon. 2004. "Monoclonal Antibody Analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Epitopes Associated with Antibody-Dependent Enhancement and Neutralization of Virus Infection." *Vet Immunol Immunopathol* 102 (3): 249–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.017>.

Cano, J P, S A Dee, M P Murtaugh, C A Trincado, and C B Pijoan. 2007. "Effect of Vaccination with a Modified-Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

Virus Vaccine on Dynamics of Homologous Viral Infection in Pigs.” *Am J Vet Res* 68 (5): 565–71. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.5.565>.

Castillo, C E Del, M P Noé, and F M Casillas. 2010. *Texto y Cuaderno de Trabajo. LABORATORIO DE VIROLOGÍA*. Edited by Primera edición. México.: Universidad Nacional Autónoma de México.

Chand, Ranjni J, Benjamin R Tribble, and Raymond R R Rowland. 2012. “Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Current Opinion in Virology* 2 (3): 256–63. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.002>.

Chen, N, J C Dekkers, C L Ewen, and R R Rowland. 2015. “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication and Quasispecies Evolution in Pigs That Lack Adaptive Immunity.” *Virus Res* 195: 246–49. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.006>.

Christopher-Hennings, J, E A Nelson, G C Althouse, and J Lunney. 2008. “Comparative Antiviral and Proviral Factors in Semen and Vaccines for Preventing Viral Dissemination from the Male Reproductive Tract and Semen.” *Anim Health Res Rev* 9 (1): 59–69. <https://doi.org/10.1017/s1466252307001387>.

Collins, J E, D A Benfield, W T Christianson, L Harris, J C Hennings, D P Shaw, S M Goyal, et al. 1992. “Isolation of Swine Infertility and Respiratory Syndrome Virus (Isolate ATCC VR-2332) in North America and Experimental Reproduction of the Disease in Gnotobiotic Pigs.” *J Vet Diagn Invest* 4 (2): 117–26.

Costers, Sarah, David J. Lefebvre, Peter L. Delputte, and Hans J. Nauwynck. 2008. “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Modulates Apoptosis during Replication in Alveolar Macrophages.” *Archives of Virology* 153 (8): 1453–65. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0135-5>.

Darwich, L, I Díaz, and E Mateu. 2010. “Certainties, Doubts and Hypotheses in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Immunobiology.” *Virus Res* 154 (1–2): 123–32. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.017>.

Dea, S, R Bilodeau, R Athanassious, R Sauvageau, and G P Martineau. 1992. “Swine Reproductive and Respiratory Syndrome in Quebec: Isolation of an Enveloped Virus Serologically-Related to Lelystad Virus.” *Can Vet J* 33 (12): 801–8.

Díaz, I, M Gimeno, L Darwich, N Navarro, L Kuzemtseva, S Lopez, I Galindo, et al. 2012. “Characterization of Homologous and Heterologous Adaptive Immune Responses in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection.” *Vet Res* 43: 30. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-30>.

Díaz, Ivan, Joan Pujols, Lillianne Ganges, Mariona Gimeno, Laila Darwich, Mariano Domingo, and Enric Mateu. 2009. “In Silico Prediction and Ex Vivo Evaluation of Potential T-Cell Epitopes in Glycoproteins 4 and 5 and Nucleocapsid Protein of Genotype-I (European) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Vaccine* 27 (41): 5603–11.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.029>.

Dokland, T. 2010. "The Structural Biology of PRRSV." *Virus Res* 154 (1–2): 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>.

Fang, Y, and E J Snijder. 2010. "The PRRSV Replicase: Exploring the Multifunctionality of an Intriguing Set of Nonstructural Proteins." *Virus Res* 154 (1–2): 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.030>.

Flores-Mendoza, Lilián, and Jesús Hernández. 2010. "Vacunas Contra El Virus Del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV): Escribiendo Una Historia." *Veterinaria Mexico* 41 (2): 139–59.

García-Plata; 2016. "Desarrollo de Una Prueba de Diagnostico Serológico (Elisa) Para La Detección de Anticuerpos Específicos En Contra Del Virus Del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (Prrs)." Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.iingen.unam.mx/es-mx/Publicaciones/Tesis/Paginas/default.aspx>.

Goldberg, Tony L, James F Lowe, Suzanne M Milburn, and Lawrence D Firkins. 2003. "Quasispecies Variation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus during Natural Infection☆." *Virology* 317 (2): 197–207. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2003.07.009>.

Gonin, Patrick, Boroushan Pirzadeh, Carl A. Gagnon, and Serge Dea. 1999. "Seroneutralization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Correlates with Antibody Response to the GP5 Major Envelope Glycoprotein." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. <https://doi.org/10.1177/104063879901100103>.

Goyal, Sagar M. 1993. "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome." *J Vet Diagn Invest* 5: 656–64.

Guevara-Hernández, E, A López-Zavala, L Jiménez-Gutierrez, and R Sotelo-Mundo. 2013. "Current Perspectives on the Use of Recombinant Proteins and Their Importance in Scientific and Industrial Research." *Biotecnica*.

H, Hill. 1990. "Overview and History of Mystery Swine Disease(Swine Infertility/Respiratory Syndrome). Proc Mystery SwineDis Comm Meet." *Livest Conserv Inst* 1: 29–30.

Hanada, K, Y Suzuki, T Nakane, O Hirose, and T Gojobori. 2005. "The Origin and Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses." *Mol Biol Evol* 22 (4): 1024–31. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi089>.

Holtkamp, D.J., J.B. Kliebenstein, E.J. Neumann, J.J. Zimmerman, H.F. Rotto, T.K. Yoder, C. Wang, P.E. Yeske, C.L. Mowrer, and C.A. Haley. 2013. "Assessment of the Economic Impact of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on United States Pork Producers." *Journal of Swine Health and Production*.

Huang, Y W, and X J Meng. 2010. "Novel Strategies and Approaches to Develop the next Generation of Vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory

Syndrome Virus (PRRSV).” *Virus Research* 154 (1–2): 141–49. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.020>.

Janková, J., and V. Celer. 2012. “Expression and Serological Reactivity of Nsp7 Protein of PRRS Genotype I Virus.” *Research in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.06.007>.

Johnson, C R, W Yu, and M P Murtaugh. 2007. “Cross-Reactive Antibody Responses to Nsp1 and Nsp2 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *J Gen Virol* 88 (Pt 4): 1184–95. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82587-0>.

Kappes, M A, and K S Faaberg. 2015. “PRRSV Structure, Replication and Recombination: Origin of Phenotype and Genotype Diversity.” *Virology* 479–480: 475–86. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>.

Kappes, Matthew A., and Kay S. Faaberg. 2015. “PRRSV Structure, Replication and Recombination: Origin of Phenotype and Genotype Diversity.” *Virology* 479–480: 475–86. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>.

Kappes, Matthew A., Cathy L. Miller, and Kay S. Faaberg. 2015. “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nonstructural Protein 2 (Nsp2) Topology and Selective Isoform Integration in Artificial Membranes.” *Virology* 481: 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.028>.

Keffaber, K K. 1989. “Reproductive Failure of Unknown Etiology.” *Am. Assoc. Swine Pract. News* 1: 1–10.

King, Andrew M.Q., Elliot J. Lefkowitz, Arcady R. Mushegian, Michael J. Adams, Bas E. Dutilh, Alexander E. Gorbalenya, Balázs Harrach, et al. 2018. “Changes to Taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018).” *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3847-1>.

Leng C, Zhang W, Zhang H, Kan Y, Yao L, Zhai H, Li M, Li Z, Liu C, An T, Peng J, Wang Q, Leng Y, Cai X, Tian Z, Tong G. ORF1a of highly pathogenic PRRS attenuated vaccine virus plays a key role in neutralizing antibody induction in piglets and virus neutralization in vitro. *Virol J*. 2017 Aug 22;14(1):159. doi: 10.1186/s12985-017-0825-2. PMID: 28830563; PMCID: PMC5568364.

Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. eds. KUBY. *Inmunología*, 7e. McGraw Hill;2016.<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1953&sectionid=143392292>

Lima, M de, A K Pattnaik, E F Flores, and F A Osorio. 2006. “Serologic Marker Candidates Identified among B-Cell Linear Epitopes of Nsp2 and Structural Proteins of a North American Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Virology* 353 (2): 410–21. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.05.036>.

Loemba, H D, S Mounir, H Mardassi, D Archambault, and S Dea. 1996. “Kinetics of Humoral Immune Response to the Major Structural Proteins of the Porcine



Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Arch Virol* 141 (3–4): 751–61.

López-Heydeck, Sandra Maricruz, Rogelio Alejandro Alonso-Morales, Hugo Mendieta-Zerón, and Juan Carlos Vázquez-Chagoyán. 2015. “Síndrome Reproductivo y Respiratorio Del Cerdo (PRRS): Revisión TT - Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS): Review.” *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 6 (1): 69–89.

Lopez, O. J., and F. A. Osorio. 2004. “Role of Neutralizing Antibodies in PRRSV Protective Immunity.” *Veterinary Immunology and Immunopathology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.005>.

Loving, C L, F A Osorio, M P Murtaugh, and F A Zuckermann. 2015. “Innate and Adaptive Immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Vet Immunol Immunopathol* 167 (1–2): 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.003>.

Lu, Z H, A L Archibald, and T Ait-Ali. 2014. “Beyond the Whole Genome Consensus: Unravelling of PRRSV Phylogenomics Using next Generation Sequencing Technologies.” *Virus Res* 194: 167–74. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.004>.

Lunney, J K, D A Benfield, and R R Rowland. 2010. “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: An Update on an Emerging and Re-Emerging Viral Disease of Swine.” In *Virus Res*, 154:1–6. Netherlands: Published by Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.009>.

Lunney, J K, and H Chen. 2010. “Genetic Control of Host Resistance to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infection.” *Virus Res* 154 (1–2): 161–69. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.004>.

Lunney, J K, Y Fang, A Ladinig, N Chen, Y Li, B Rowland, and G J Renukaradhya. 2016. “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System.” *Annu Rev Anim Biosci* 4: 129–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>.

Macías, María José;, Gloria; Yépiz-Plascencia, Fernando; Osorio, Araceli; Pinelli-Saavedra, and Jesús. Reyes-Leyva, Julio; Hernández. 2006. “Aislamiento y Caracterización Del Gen ORF5 Del Virus Del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) En México.” *Vet. Méx.* 37 (9): 197–208. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Maclachlan, Nigel James, Edward J Dubovi, and Frank C N - Jefferson or Adams Building Reading Rooms SF780.4; .F48 2011 Fenner. 2011. *Fenner’s Veterinary Virology*. 4th ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP.

Mateu, E, and I Diaz. 2008. “The Challenge of PRRS Immunology.” *The Veterinary Journal* 177 (3): 345–51. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.022>.

Mattanovich, Diethard, Brigitte Gasser, Hubertus Hohenblum, and Michael Sauer. 2004. “Stress in Recombinant Protein Producing Yeasts.” In *Journal of*

*Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.035>.

Meulenbergh, J J, R J Bende, J M Pol, G Wensvoort, and R J Moormann. 1995. "Nucleocapsid Protein N of Lelystad Virus: Expression by Recombinant Baculovirus, Immunological Properties, and Suitability for Detection of Serum Antibodies." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2 (6): 652–56. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=170215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Meulenbergh, J J, M M Hulst, E J de Meijer, P L Moonen, A den Besten, E P de Kluyver, G Wensvoort, and R J Moormann. 1993. "Lelystad Virus, the Causative Agent of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS), Is Related to LDV and EAV." *Virology* 192 (1): 62–72. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1008>.

Meulenbergh, Janneke J M M. 2000. "Review Article PRRSV , the Virus" 31: 11–21.

Montaner-Tarbes, Sergio, Hernando A. del Portillo, María Montoya, and Lorenzo Fraile. 2019. "Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV)." *Frontiers in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>.

Murtaugh, M P, M R Elam, and L T Kakach. 1995. "Comparison of the Structural Protein Coding Sequences of the VR-2332 and Lelystad Virus Strains of the PRRS Virus." *Arch Virol* 140 (8): 1451–60.

Nan, Yuchen, Chunyan Wu, Guoqian Gu, Weiyao Sun, Yan Jin Zhang, and En Min Zhou. 2017. "Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective." *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01635>.

Neumann, E J, J B Kliebenstein, C D Johnson, J W Mabry, E J Bush, A H Seitzinger, A L Green, and J J Zimmerman. 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): 385–92.

Nodelijk, G. 2002. "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) with Special Reference to Clinical Aspects and Diagnosis. A Review." *Vet Q* 24 (2): 95–100. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695128>.

OIE. 2008. "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome." *Terrestrial Animal Health Code*.

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2017. "Manual de Las Pruebas de Diagnóstico y de Las Vacunas Para Los Animales Terrestres 2017." Capítulo 1.1.6. Principios y Métodos de Validación de Las Pruebas de Diagnóstico de Las Enfermedades Infecciosas. 2017. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/E\\_summry-02-02-2018.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/E_summry-02-02-2018.htm).

Pileri, Emanuela, and Enric Mateu. 2016. "Review on the Transmission Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus between Pigs and Farms and

Impact on Vaccination.” *Veterinary Research*. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0391-4>.

Popescu, Luca N., Benjamin R. Tribble, Nanhua Chen, and Raymond R.R. Rowland. 2017. “GP5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) as a Target for Homologous and Broadly Neutralizing Antibodies.” *Veterinary Microbiology* 209 (May): 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.016>.

Rahe, Michael C., and Michael P. Murtaugh. 2017. “Effector Mechanisms of Humoral Immunity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Veterinary Immunology and Immunopathology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.02.002>.

Rascón-Castelo, E, A Burgara-Estrella, E Mateu, and J Hernández. 2015. “Immunological Features of the Non-Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *Viruses* 7 (3): 873–86. <https://doi.org/10.3390/v7030873>.

Reeth, Kristien Van. 1997. “Pathogenesis and Clinical Aspects of a Respiratory Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection.” In *Veterinary Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01331-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01331-4).

Renukaradhya, Gourapura J, Xiang-Jin Meng, Jay G Calvert, Michael Roof, and Kelly M Lager. 2015. “Inactivated and Subunit Vaccines against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: Current Status and Future Direction.” *Vaccine* 33 (27): 3065–72. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.102>.

Shi, M, T T Lam, C C Hon, M P Murtaugh, P R Davies, R K Hui, J Li, et al. 2010. “Phylogeny-Based Evolutionary, Demographical, and Geographical Dissection of North American Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses.” *J Virol* 84 (17): 8700–8711. <https://doi.org/10.1128/jvi.02551-09>.

Snijder, E J, M Kikkert, and Y Fang. 2013. “Arterivirus Molecular Biology and Pathogenesis.” *J Gen Virol* 94 (Pt 10): 2141–63. <https://doi.org/10.1099/vir.0.056341-0>.

Stadejek, T, A Stankevicius, M P Murtaugh, and M B Oleksiewicz. 2013. “Molecular Evolution of PRRSV in Europe: Current State of Play.” *Vet Microbiol* 165 (1–2): 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.029>.

Uribe-Campero, Laura, Alberto Monroy-García, Ana L. Durán-Meza, María V. Villagrana-Escareño, Jaime Ruíz-García, Jesús Hernández, Héctor G. Núñez-Palenius, and Miguel A. Gómez-Lim. 2015. “Plant-Based Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus VLPs Induce an Immune Response in Mice.” *Research in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.07.012>.

Vashisht, Kapil, Tony L. Goldberg, Robert J. Husmann, William Schnitzlein, and Federico A. Zuckermann. 2008. “Identification of Immunodominant T-Cell Epitopes Present in Glycoprotein 5 of the North American Genotype of Porcine Reproductive

and Respiratory Syndrome Virus.” *Vaccine* 26 (36): 4747–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.047>.

Wang, Feng Xue, Ni Song, Li Zhi Chen, Shi Peng Cheng, Hua Wu, and Yong Jun Wen. 2013. “Non-Structural Protein 2 of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus: A Crucial Protein in Viral Pathogenesis, Immunity and Diagnosis.” *Research in Veterinary Science*.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.03.015>.

Wang, Heng, Rongchang Liu, Jin Cui, Shengchao Deng, Jiexiong Xie, Zhangyong Nin, and Guihong Zhang. 2015. “Characterization and Utility of Phages Bearing Peptides with Affinity to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nsp7 Protein.” *Journal of Virological Methods* 222: 231–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.026>.

Wensvoort, G, C Terpstra, J M Pol, E A ter Laak, M Bloemraad, E P de Kluyver, C Kragten, et al. 1991. “Mystery Swine Disease in The Netherlands: The Isolation of Lelystad Virus.” *Vet Q* 13 (3): 121–30.  
<https://doi.org/10.1080/01652176.1991.9694296>.

Yoon, I. J., H. S. Joo, S. M. Goyal, and T. W. Molitor. 1994. “A Modified Serum Neutralization Test for the Detection of Antibody to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Swine Sera.” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* <https://doi.org/10.1177/104063879400600326>.

Yoon, K J, J J Zimmerman, S L Swenson, M J McGinley, K A Eernisse, A Brevik, L L Rhinehart, M L Frey, H T Hill, and K B Platt. 1995. “Characterization of the Humoral Immune Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus Infection.” *J Vet Diagn Invest* 7 (3): 305–12.


Yun, S I, and Y M Lee. 2013. “Overview: Replication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.” *J Microbiol* 51 (6): 711–23.  
<https://doi.org/10.1007/s12275-013-3431-z>.

Zhang, Q, and D Yoo. 2015. “PRRS Virus Receptors and Their Role for Pathogenesis.” *Vet Microbiol* 177 (3–4): 229–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.002>.

Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, G. W. 2012. “PRRSV.” In *Diseases of Swine*, edited by G. W. Zimmerman, J., Benfiel D. A., Dee, S.A., Murtaugh M. P., Stadejek T., Stevenso, 461–86. John Wiley and Sons, Inc.

Zuckermann, Federico A. 1999. “Extrathymic CD4/CD8 Double Positive T Cells.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72 (1–2): 55–66.  
[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00118-X](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00118-X).

# Immunogenic and antigenic analysis of recombinant NSP1 and NSP11 of PRRS virus

María Josefina Contreras-Luna<sup>1</sup> | Gladis Fragoso-Gonzalez<sup>3</sup> |  
René Alvaro Segura-Velázquez<sup>2</sup> | Jacquelynne Brenda Cervantes-Torres<sup>5</sup> |  
Rogelio Alonso-Morales<sup>4</sup> | Luis Alfonso Ramírez-Martínez<sup>5</sup> |  
Dolores Adriana Ayón-Núñez<sup>2</sup> | Raúl José Bobes<sup>3</sup> | José Ivan Sánchez- Betancourt<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Unidad de Investigación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

<sup>4</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Laboratorio de Genética Molecular Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

<sup>5</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Microbiología e Inmunología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

## Correspondence

Jl Sánchez-Betancourt, Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 3000, Copilco, Coyoacán, Mexico City, 04510, Mexico.  
Email: aisb\_7@yahoo.com.mx

## Abstract

**Background:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is an enveloped RNA virus in the order Nidovirales, family Arteriviridae, genus Betaarterivirus. Antibodies against nonstructural proteins (NSPs) from this virus can be found in pigs starting 4 days postinfection and they remain detectable for several months.

**Objective:** The goal of this study was to evaluate the immunogenicity and antigenic properties of recombinant proteins NSP1 and NSP11 expressed in *Escherichia coli* cells, as well as to assess the neutralization activity that they elicit.

**Methods:** We obtained the complete ORF-1 genes coding for NSP1 and NSP11 from PRRSV using the VR-2332 strain. Cloning was performed with the pET23a(+) vector with a histidine tag (His6), linearized by restriction enzyme digestion; the expression of the NSP1 and NSP11 clones was induced in OverExpress C41(DE3) chemically competent cells. Recombinant proteins were used to generate hyperimmune sera and we perform serological assays to confirm neutralizing antibodies.

**Results:** The expressed recombinant NSP1 and NSP11 were found to be immunogenic when injected in pigs, as well as demonstrated higher specificity in recognition of antigen in field sera from pigs positive infected with PRRSV. Furthermore, both NSP1 and NSP11 recombinant proteins elicited PRRSV neutralizing antibodies.

**Conclusions:** In this study, we demonstrated the immune humoral response to NSP 1 and NSP11, and neutralizing-antibody response to PRRSV VR2332 strain in sera from hyperimmunized pigs.

## KEYWORDS

betaarterivirus, neutralization, nonstructural proteins, PRRS

## 1 | INTRODUCTION

The causal agent of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an enveloped RNA virus from the order Nidovirales, family *Arteriviridae*, genus *Betaarterivirus*, subgenus *Ampobarterivirus*. The PRRS virus (PRRSV) has two known variants: *Betaarterivirus suis* 1, previously known as PRRSV-1, and *B. suis* 2, previously known as PRRSV-2 (King et al., 2018). Because PRRS increases fetal death rates by 20%–30% (Goyal, 1993), it has a strong negative economic impact on pork production. In the United States, economic losses due to PRSS have been estimated at 664 million dollars annually. On pig farms alone, losses are calculated at 302.06 million dollars, chiefly due to lower prices at time of weaning (Holtkamp et al., 2013; Neumann et al., 2005).

There are commercial vaccines available on the market worldwide, the most widely used contain the entire genome based on modified active virus (MLV) or inactive form. Most PRRS vaccines elicit specific humoral and cellular immune responses that confer protection against homologous parental strains and partial protection to heterologous strains, but there are safety concerns, such as a high mutation rate that causes reversion to virulence and recombination between vaccines and field strains (Renukaradhya et al., 2015), in addition, the response they induce is late, which confers partial protection when the animals face the field virus. (Renukaradhya et al., 2015).

While previous studies have focused on the immune response against PRRSV structural proteins like N or GP5, their high variability and poor individual response to the virus have prevented us from finding a feasible strategy against this pathogen agent (Chand et al., 2012; Renukaradhya et al., 2015). Besides, we have demonstrated the neutralization capacity of NSP1 (Leng et al., 2017; Su et al., 2019), which have been used in this study.

PRRSV infects cells that participate in both the innate and the adaptive immune response, such as macrophages 'particularly with alveolar location and dendritic cells' (Lunney et al., 2010; Rossow, 1998; Welch & Calvert, 2010). NSP 11 has a function similar to NSP1 and antagonizes IFN type I, specifically IFN $\beta$  production (Montaner-Tarbes et al., 2019). An anti-NSP11 monoclonal antibody (mAb) created to test reactivity against genotype 1 and genotype 2 PRRSV was able to induce humoral immune response in PRRSV infected pigs. Furthermore, a B-cell epitope on the surface of NSP11 using a specific mAb was also able to induce humoral immune response in pigs infected with PRRSV (Jiang et al., 2017). The goal of this study was to evaluate immunogenicity, as well as the neutralization ability of recombinant NSP1 and NSP11 to contribute towards potential development of new generation PRRSV vaccines.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Propagating PRRSV

To replicate PRRSV, we infected MA-104 line cells (ATCC® CRL-2378.1; Benfield et al., 1992) with the PRRSV ATCC® VR-2332 strain.

The cells were propagated in Eagle's minimal essential medium (MEM), supplemented with L-glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS). We resuspended  $5 \times 10^6$  cells in 150  $\mu$ l, adding as much of Dulbecco's modified MEM (DMEM) supplemented with 1000 UI penicillin/streptomycin and 2% FBS as required to complete 5 ml. Virus replication was verified by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) using the POCKIT™ PRRSV Reagent Set kit, following the manufacturer's directions, in a Rotor-Gene thermocycler (Corbett Research, Sydney, Australia).

### 2.2 | Producing recombinant proteins, cloning and expressing NSP1 and NSP11

We designed specific primers to amplify the entire *ORF-1* genes that code for NSP1 and NSP11 from the PRRSV ATCC VR-2332 strain, via RT-PCR. These primers end sequences incorporated BamHI, XhoI and EcoRI (Table 1), which correspond to enzymatic restriction sites. We obtained viral RNA using the OneStep RT-PCR Kit® (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The samples were amplified for 35 cycles, preceded by an initial cDNA cycle at 50°C for 30 min and a denaturing stage at 95°C for 15 min. A final extension cycle was performed at 72°C for 10 min. We used a master-cycler gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) to carry out the RT-PCR, and both primers and test conditions are shown in Table 1.

We verified the presence of amplified fragments on 2% agarose gels with tris-acetate-EDTA buffer (TAE 1X) by staining with ethidium bromide and observing samples in a transilluminator. We used a pET23a(+) vector with a histidine tag (His6), linearized by restriction enzyme digestion, for cloning with an In-Fusion HD Plus Complete Cloning System kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA), following the manufacturer's instructions. BL21 Stellar Competent Cells (Clontech Laboratories) were transformed with the recombinant plasmid. To verify cloning (vector-insert), the cultures were purified with the QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen). The identity of obtained amplicons was verified by sequencing. The expression of the NSP1 and NSP11 clones was induced in OverExpress™ C41(DE3) chemically competent cells (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) with 1 mM IPTG 1 mM at 37°C for 6 and 8 h, respectively. Induced cells were recovered and lysed in a buffer containing Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM and EDTA 1 mM. The expressed proteins were assessed by 12% SDS-PAGE at 110V for 140 min and stained with Coomassie blue.

### 2.3 | Purifying recombinant NSP1 and NSP11

Histidine-tagged, recombinant NSP1 and NSP11 were purified in a His-Trap HP affinity column (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL) by affinity chromatography with an ÄKTAprime Plus system (GE Healthcare Life Sciences), following the manufacturer's protocol. The Lowry method was chosen to quantify eluted proteins.

**TABLE 1** Primers and reaction conditions to generate ORF-1 NSPs from the PRRSV genome

NSP	Sequence (5'-3')	Size (pb)	Temperature (°C)	Cycle time (s)
NSP1 <sup>a</sup>	F:5'GCGGATCC/GAATTC/TCTGGGATACTTGATCGGTG	1148	A 94	60
	EcoR1		B 57	60
	R:5'GGTGGTGGTG/CTCGAG/GCCGTACCACCTGTGAC		C 72	120
	Xho1			
NSP11	F:5'AATGGGTCGC/GGATCC/AGCGTGTGTAGATTCTCTCCG	750	A 94	60
	BamHI		B 54	60
	R:5'GGTGGTGGTG/CTCGAG/CATAGCTGGCAAGCTGATACC		C 72	120
	Xho1			

PCR denaturation (A), alignment (B) and extension (C) temperatures. In each stage, the temperature was maintained for the time shown in the next column.

<sup>a</sup>Modified from Brown et al. (2009).

## 2.4 | Characterizing NSP1 and NSP11 by western blot

We transferred eluted proteins to a PVDF membrane and performed 1D/2D SDS-PAGE at 110 V for 1 h (4°C). Following protein separation, the membranes were blocked with 3% BSA in PBS-T for 1 h. After this, membranes were washed with PBS-T and incubated for 1 h with a mouse monoclonal antibody (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) targeting the His6 label of the recombinant product, in a 1:4000 dilution. The membranes were then washed with PBS-T and incubated for 1 h with mouse anti-mouse polyclonal antibody, IgG isotype, linked to horseradish peroxidase (Sigma) in a 1:2000 dilution. We visualized the reaction using 3 mg/ml 3,3-diaminobenzidine (Sigma) in PBS-T and 30% hydrogen peroxide in a 1:1000 dilution.

## 2.5 | Producing hyperimmune sera to NSPs

We immunized four York-Landrace pigs from a PRRS-free farm, two pigs each received either recombinant NSP1 or NSP11. The absence of anti-PRRSV antibodies was verified using the commercial HerdChek PRRS 2XR Ab ELISA test (IDEXX, Westbrook, MA). Each pig was vaccinated four times at 15 day intervals with 100 µg protein doses in a 1:1 protein-Montanide adjuvant emulsion, via deep intramuscular route in the neck. We established a baseline using a blood sample taken before the first immunization. Then, blood samples were taken 7 days following each immunization, to monitor serum antibody titres and determine when peak antibody titres occurred via ELISA tests.

## 2.6 | Western blot for hyperimmune sera

To confirm PRRSV recognition by pig hyperimmune sera, we performed a western blot assay. MA-104 cells were infected with the PRRSV ATCC VR-2332 strain, then 48 h after infection we recovered virions from the infected cell monolayer with the RIPA lysis and extraction buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA), following the manufacturer's instructions. Viral particles were transferred to a PVDF membrane and performed a 1D/2D SDS-PAGE at 110 V for 1 h (4°C). Upon separation, the membranes were blocked with 3% BSA in PBS-T for 1.5 h, they were

then washed with PBS-T and incubated for 2 h with hyperimmune NSP1 or NSP11 serum in 1:25 and 1:50 dilutions, respectively. We washed the membranes three times with PBS-T and incubated for 1 h with anti-swine polyclonal antibody, IgG isotype, linked to horseradish peroxidase (Sigma) in a 1:2000 dilution. The reaction was visualized using 3 mg/ml 3,3-diaminobenzidine (Sigma) in PBS-T and 30% hydrogen peroxide in a 1:1000 dilution.

## 2.7 | Antigenicity of recombinant NSPs

To determine the antigenicity of the recombinant proteins, we developed an ELISA method (ELISA "in house") using purified recombinant NSPs as antigen sources and following the previous report (García-Plata, 2016). We used 50 negative and 50 positive sera (commercial kit) from pigs belonging to farms where PRRSV is present, and then compared the results with an ELISA "in house".

Before tests on field sera were run, we tested the purified recombinant proteins against known positive sera identified with high antibody titres and found recognition by these sera against both proteins.

We coated 96-well plates (MicroWell, Nunc-Immuno, Thermo Scientific) with the purified NSP1 or NSP11 recombinant protein using 0.1 µg/ml per well and diluted in carbonate buffer. The wells were incubated overnight at 4°C, then washed three times with 3% PBS-Tween BSA, blocked with 1% PBS-BSA and incubated for 60 min at 37°C, then the plates were washed three times with PBS-Tween.

Serum samples were diluted 1:100 in 1% PBS-BSA dilution buffer on each plate, with hyperimmune sera for each recombinant NSP included as positive controls and baseline sera from the hyperimmunized pigs included as negative controls. Plates were incubated for 60 min at 37°C, then washed three times with PBS-Tween 3%. We added 100 µl of 1:120 000 dilution peroxidase-linked secondary antibody (anti-pig IgG, Sigma-Aldrich) to each well and then incubated the plates for 60 min at 37°C. Each serum was tested in duplicate. After washing the plates as described above, the reaction was visualized using 100 µl per well with tetra-methyl benzidine (TMB, Invitrogen, Carlsbad, CA) and stopped after 30 min with 0.2 M sulfuric acid. Absorbance was measured in an Epoch monochromator spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT) at a wavelength of 450 nm.

**TABLE 2** PRRSV concentration as determined by qRT-PCR in different cell passages

Name	Type	CT	Copies/ul
PRRS C(+)	Test positive control	29.61	199 679 036
VR2332	Virus 1st passage MA-104	32.71	1 462 606
VR2332	Virus 2nd passage MA-104	32.65	1 619 783
VR2332	Virus 3rd passage MA-104	29.86	133 309 614

The cut-off point to distinguish negative and positive samples was calculated as the mean reading of negative controls plus twice the standard deviation. Values below this limit were considered negative and any value above this point was regarded as positive. We calculated assay sensitivity as  $TP/(TP + FN) \times 100$ , and specificity as  $TN/(TN + FP) \times 100$ , where  $TP$ ,  $TN$ ,  $FP$ , and  $FN$  stand for the number of true negative, true positive, false positive and false negative results, respectively (OIE, 2019). We also calculated the kappa concordance coefficient.

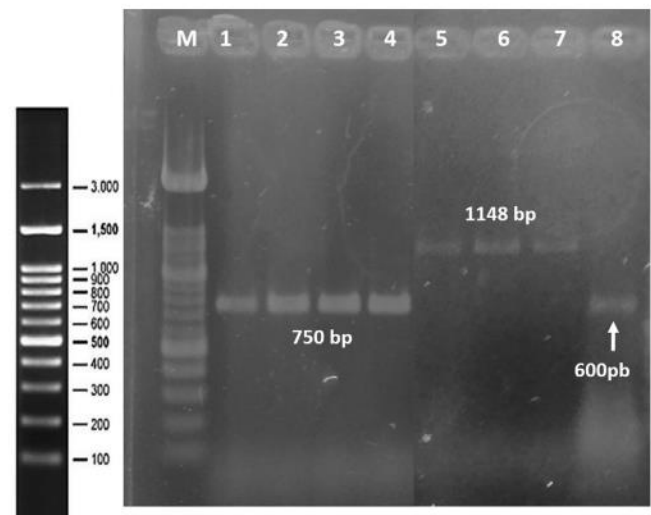
## 2.8 | Serum neutralization

A serum neutralization assay was performed to estimate the NSPs neutralizing capacity of hyperimmune sera. Sera were heat inactivated at 56°C for 30 min, and then serum neutralization assay was performed following the method described by Leng et al., 2017 with some modifications. We diluted hyperimmune sera for NSP1 or NSP11 using a two-fold serial dilution in MEM. Then, 100  $\mu$ l of each diluted sample was mixed with an equal volume of the PRRSV (ATCC, VR2332) strain (100, 300, 500 and 1000 TCID<sub>50</sub>). The mixtures were incubated for 1 h at 37°C and then transferred to a 96-well plate containing confluent MA-104 cell monolayers prepared 24 earlier. The plates were incubated at room temperature for 60 min, and then they were kept at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 96 h and monitored daily for CPE. The presence of virus-specific CPE in each well was recorded after 96 h of incubation. The neutralization antibody (NA) titre of each hyperimmune serum sample against the PRRSV was calculated using the Reed-Muench method.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Replication and cloning of recombinant proteins

We confirmed replication of PRRSV in MA-104 cells via qRT-PCR (Table 2). The ORF-1 genes amplified were of 1148 bp is for NSP1 and 750 bp for NSP11 (Figure 1). NSP1 and NSP11 recombinant were analyzed by SDS-PAGE (Figure 2). Un-purified NSP1 and NSP11 are shown in lanes 1 and 2, respectively (Figure 2). Purified NSP1, with an expected molecular weight of 40.26 kDa, is shown in lanes 3 and 4, while NSP11, with an expected molecular weight of 27.5 kDa (including N'-terminal poly-histidine), is shown in lanes 7 and 8.

**FIGURE 1** RT-PCR Gradients for amplification of the Nsp1 and Nsp11 proteins. 2% agarose gel. Amplicons used by RT-PCR were analyzed in an electrophoresis chamber using a molecular weight marker of 100–12,000 bp and 100–1000 bp (M). Nsp1 (1–4), Nsp11 (5–7), 58° (8) Positive control (ORF7)

### 3.2 | Purification and yield of recombinant proteins

Expressed proteins are located in the insoluble fraction of bacterial cells and were purified by inclusion antibodies under denaturation conditions. We obtained fractions in the concentration peaks in a polyacrylamide gel, and the presence of pure proteins was verified. Production yield was 597.5  $\mu$ g/ml for NSP1 and 201.7  $\mu$ g/ml for NSP11. Both recombinant proteins reacted with anti-His6 antibodies in immunotransfer. We found antigen and complete virus recognition for NSP1 or NSP11 in the different dilutions that were used in the western blot testing of hyperimmune sera (Figure 3).

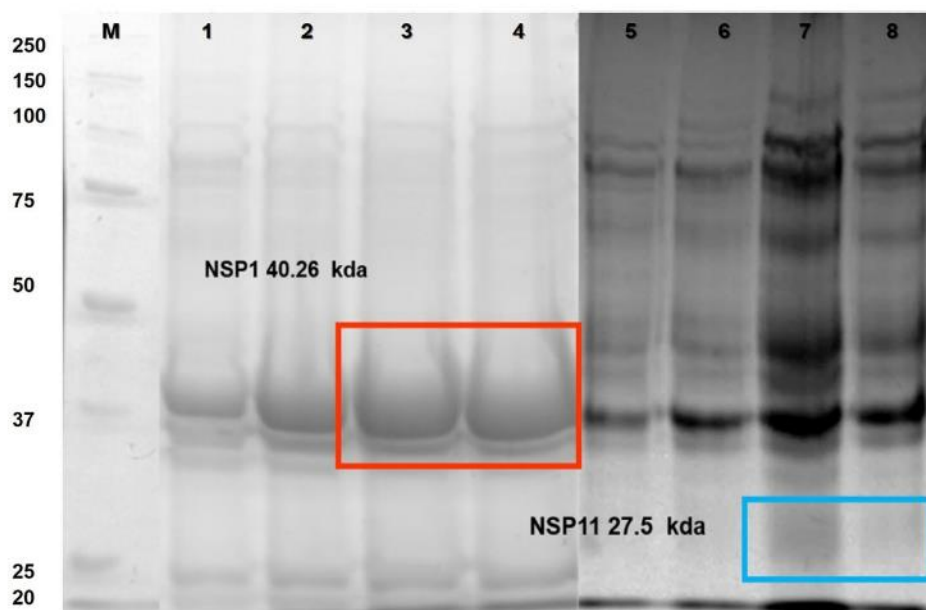
### 3.3 | Hyperimmune sera

Pigs immunized with recombinant NSPs seroconverted at different times postinoculation (Figure 4). Specific antibodies against NSP1 were detectable between days 30 and 45 postinfection and anti-NSP11 antibodies were detected on day 15 postinfection, the highest levels were observed on day 60, with an optical density value of 1.035.

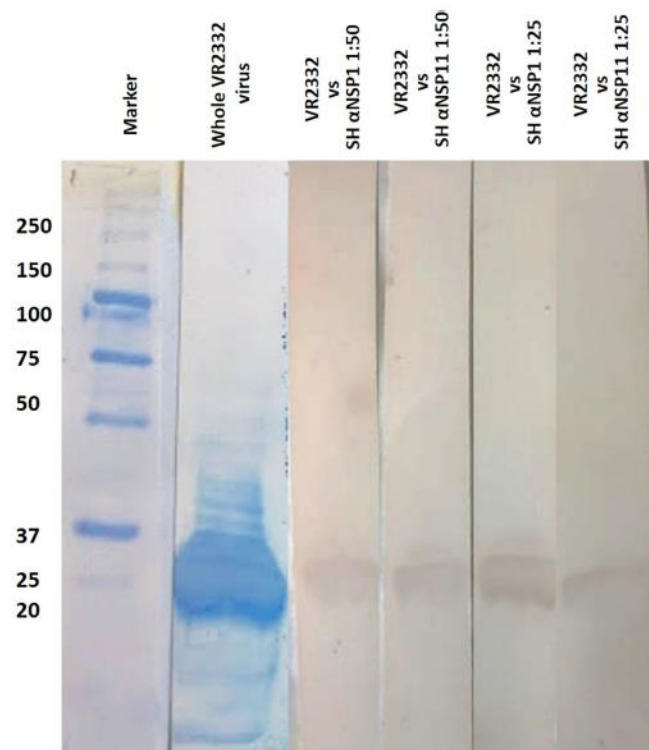
### 3.4 | Specificity and sensitivity of recombinant proteins

Sera obtained from five different states of Mexico were tested with commercial ELISA kit. We used 50 positive sera and 50 negative sera to confront with NSP1 and NSP11 in the ELISA in house. The recombinant NSP1 detected specific anti-NSP1 antibodies in 92 out of 100 serum samples (98.03% specificity and 53.8% sensitivity), while recombinant





**FIGURE 2** NSP1 expression in OverExpress™ chemically competent cells. 12% polyacrylamide gel. Total NSP1 proteins (1–4) and NSP11 (5–8). All samples were analyzed using a molecular weight marker as a reference value in kDa (M). Time: NSP1 = 2 h (2), NSP11 = 4 h (3), NSP1 = 6 h (4), NSP11 = 0 h (5), NSP11 = 2 h (6), NSP11 = 4 h (7), NSP11 = 6 h (8)



**FIGURE 3** Hyperimmune serum against NSP1 and NSP11 detected by Western blot with anti-pig IgG, compared with whole PRRSV VR2332 strain. Molecular weight marker as a reference value in kDa (M); hyperimmune serum for NSP1 (SH αNSP1); hyperimmune serum for NSP11 (SH αNSP11)

NSP11 detected 99 out of 100 positive serum samples (99% specificity and 50.5% sensitivity) (Table 3).

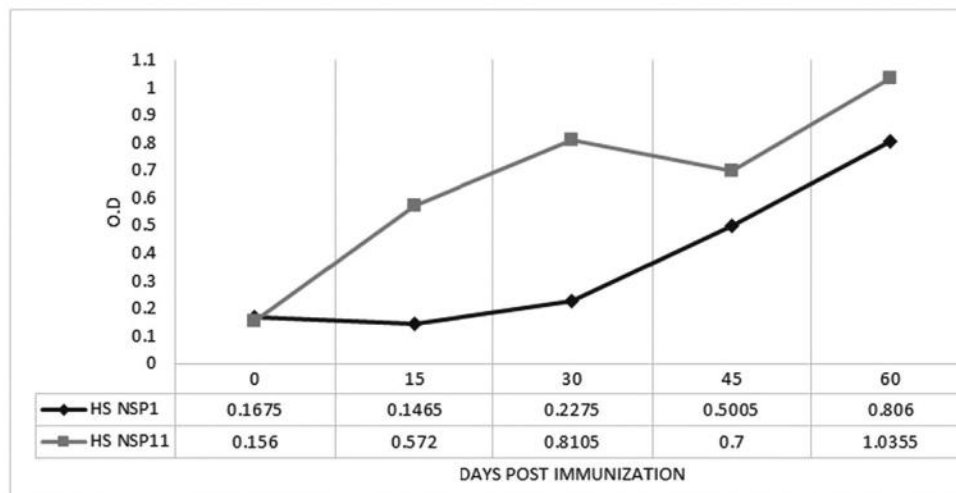
### 3.5 | Neutralization antibody

We detected antibodies for NSP1, NSP11 and PRRSV in hyperimmune sera. Negative serum samples showed no response to the test and the cytopathic effect to differentiate positive from negative responses was evident in cell cultures (Figure 5). Hyperimmune sera showed a better response at lower infecting doses (100 and 300). For NSP1, we obtained protective titres of 1:32 at an infectious dose of 100, and of 1:16 titres at an infectious dose of 300. We found protective titres of 1:8 and 1:4 for NSP11 at infectious doses of 100 and 300, respectively. At higher infective doses (500 and 1000) we observed lower serum neutralizing responses (Table 4).

## 4 | DISCUSSION

No effective anti-PRRSV vaccine has been developed yet, and although DNA, subunit and attenuated vaccines have been tested, their potential as a substitute of the MLV anti-PRRS vaccine currently in use, is uncertain (Nan et al., 2017). An early and long-lasting immune response against PRRSV NSPs could be the key to this goal.

Some studies have reported the production of hyperimmune sera against PRRSV in mice (Bi et al., 2017), or by inoculating pigs with peptides (Díaz et al., 2009). In both these cases, the hyperimmune serum is targeted to B-cell epitopes, which have a higher probability of generating antibodies. On the other hand, PRRSV NSPs play a key role in the processing and maturation of the virion structural repertoire. Swine are known to mount antibody responses to these proteins with significant cross-reactivity, which seems to be equal to or higher than that induced by nucleocapsid protein (Johnson et al., 2007).



**FIGURE 4** Time-course for seroconversion of pigs inoculated with recombinant NSP1 and NSP11. Serum samples were taken on days 0, 15, 30, 45 and 60 postimmunizations

**TABLE 3** Comparison between ELISA, ELISA NSP1 and ELISA NSP11

STATE	ELISA		ELISANSP1		ELISANSP11		Reactivity (positive/negative)		
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	ELISA	Nsp1	Nsp11
Sonora	10	10	19	1	20	0	10/10	19/1	20/0
Jalisco	10	10	15	5	20	0	10/10	15/5	20/0
Michoacán	10	10	20	0	20	0	10/10	20/0	20/0
Guanajuato	10	10	20	0	20	0	10/10	20/0	20/0
Yucatán	10	10	18	2	19	1	10/10	18/2	19/1
TOTAL	50	50	92	8	99	1	50/50	92/8	99/1
%	50%	50%	92%	8%	99%	1%			

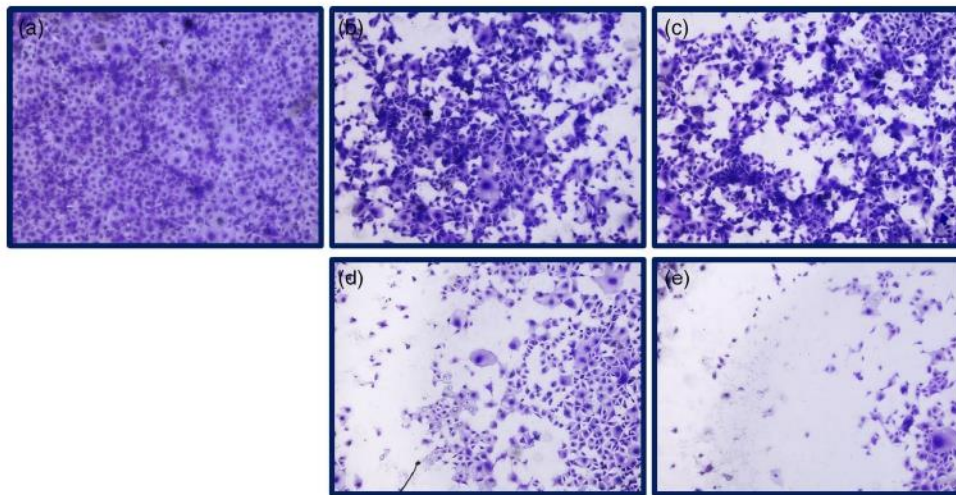
Additionally, early antibody detection could play an important role in surveillance and in the implementation of preventive measures against the virus. PRRSV inhibits the expression of type-I ( $\alpha/\beta$ ) interferon (IFN), which in turn induces the synthesis inhibition of several antiviral proteins (Darwich et al., 2010; Yoo et al., 2010). Type-I IFN expression interference is largely due to the capacity of NSPs to inhibit the IFN- $\beta$  promoter by blocking IRF3 translocation and inhibiting NF- $\kappa$ B (Rascón-Castelo et al., 2015). Additionally, the expression of IL-10 is induced, while that of IL-1 and TNF- $\alpha$  is inhibited. This causes a limited inflammatory response, which in turn leads to a less effective adaptive response, resulting in delayed production of neutralizing antibodies until 3–4 weeks postinfection (Flores-Mendoza & Hernández, 2010).

The Western blot assay results (Figure 3) also indicated that whole PRRSV cultured in MA-10<sup>4</sup> cells can be recognized by the hyperimmune sera specific for whole NSPs. This is very important because NSPs are available for antigenic presentation through MHC-I and -II from the earliest moments of infection. Cytolytic infection also releases viral proteins into interstitial spaces, generating a strong antibody response, equivalent to the immune response to structural proteins (Brown et al., 2009). Early response to NSPs indicates that these proteins are shown on the surface of infected cells for their presenta-

tion to B cells. On the other hand, anti-NSP antibodies can be detected early during viral infection at levels that depend on their immunogenicity and abundance (Johnson et al., 2007). Neutralizing antibody titres are produced in piglets inoculated with chimeric viruses, where the 5' untranslated region (UTR) + open reading frame (ORF) 1a, ORF1b and ORF2-7 + 3'UTR was exchanged between two infectious strains, that study also found that ORF1a is also a PRRSV neutralization region (Leng et al., 2017); several works have focused in detecting antibodies against viral structural proteins (Cancel-Tirado et al., 2004; Díaz et al., 2009; Wootton et al., 1998). These justify the use of NSPs as components of a candidate vaccine that could elicit an early, protective immune response against PRRSV.

The time-course of antibody response showed that antibody response to NSP7 is comparable to the response to NSP1 and NSP2, as well as to the antigens used in the IDEXX commercial ELISA kit (Brown et al., 2009). Recombinant NSP1 and NSP11 demonstrated to be immunoreactive: NSP1 was recognized by 98.03% of serum samples known to be positive, and NSP11 was recognized by 100% of those samples.

Our study found that several serum samples previously labelled as negative are now identified as positive, due to higher test sensitivity



**FIGURE 5** Cytopathic effect of PRRSV VR2332 strain at different concentrations. (a) Negative control; (b) 100 ID; (c), 300 ID; (d) 500 ID; and (e) 1000 ID. MA-104 cell monolayer, confluence 80% at 96 h postinfection. Microphotography under inverted microscope 40x and crystal violet stain. ID: infective dose

**TABLE 4** Neutralizing antibody titres for different PRRSV infecting doses in a serum neutralization assay

Serum	Titre with infecting dose			
	100	300	500	1000
SHNSP1	32	16	8	4
SHNSP11	8	4	4	4
SHVR2332	8	4	4	2
Negative serum	0	0	0	0

Titres are expressed as the inverse of serum dilution.

when using NSP1 or NSP11 as the antigen source. Given the current lack of an effective vaccine, there exists a great need for the development of a high-sensitivity plate test that uses antigens like the NSPs used in this study. These antigens are expressed early on during the infectious process and are recognized by the immune system before the structural proteins are. Additionally, this response lasts for several months. Johnson et al. (2007) found that NSPs are available for antigenic presentation through MHC-I and -II at the earliest moments of infection. Because cytolitic infection also releases viral proteins into interstitial spaces, we can know that an induced strong antibody response to NSPs will be comparable to the immune response elicited by structural proteins. Furthermore, sustained anti-NSP antibody titres have been found for up to 202 days, while the antibody response to the N protein gradually decreases after 126 days (Brown et al., 2009).

Neutralizing titres in hyperimmune sera against NSP1 and NSP11 indicate that the antigenic activity could be relevant in the individual response. Furthermore, that at some point during infection, they may play an important role in the neutralizing activity of antibodies against the virus. Various studies have reported PRRSV antibody neutralization, mainly using hyperimmune sera against proteins GP5, M or N

(Gonin et al., 1999; Loemba et al., 1996; Yoon et al., 1994). However, few reports show that there is a neutralization region in PRRSV ORF1, mainly in NSP2, which has been better studied so far (Leng et al., 2017).

The main neutralizing activity against PRRSV has been reported to target the GP5 protein (Lopez & Osorio, 2004; Popescu et al., 2017; Vashisht et al., 2008). However, our results suggest that NSPs, in this case NSP1 and NSP11, can be recognized by the immune system of hosts that can then elicit an antibody response with neutralizing capacity and NSPs are the first viral proteins to be synthesized in cells infected by PRRSV. These suggests that both proteins

contain highly antigenic regions, and are well conserved across different PRRSV strains. Thus NSP-based immunogens could induce protection against different viral strains, with an effective and rapid response to the infection, preventing the immunomodulatory effects of the virus (Rascón-Castelo et al., 2015).

Recombinant protein-based approaches allow us to rapidly and easily synthesize large amounts of a product whose characteristics are very similar to those of a natural protein, and as epitope-based vaccines have several benefits including safety, high specificity and ease of use (Nan et al., 2017). Herein, we demonstrated that NSP1 and NSP11 open a new approach to produce a protective recombinant vaccine to control PRRS.

These suggests that both proteins contain highly antigenic regions, however further studies are needed to confirm whether this humoral response provide cross-neutralization against heterologous PRRSV strains.

## 5 | CONCLUSIONS

Our results indicate that recombinant PRRSV NSPs can be antigenic and immunogenic. This study is an initial exploration to propose the use of recombinant proteins as a novel immunogenic approach against PRRSV and/or to develop a more precise diagnostic tool.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the research grant No. CB/2015/254244. CONACYT awarded a scholarship to MJ Contreras-Luna (ID 492430).

The authors thank the Research Unit of Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. They also thank Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal and Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia de cerdos.

Thanks to Brenda Ileri Saenz Jiménez by technical development prior to this study.

## CONFLICT OF INTERESTS

Authors declare no conflict of interests.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Contreras-Luna: investigation; writing – original draft; writing – review and editing; formal analysis. Fragoso-Gonzalez: writing – review and editing. Segura-Velázquez; resources. Cervantes-Torres: investigation. Alonso Morales: writing – review and editing. Ramírez-Martínez: investigation; writing – review and editing; formal analysis. Ayón-Núñez: methodology; validation. Bobes: methodology; validation; resources. Sánchez-Betancourt: conceptualization; resources; supervision; writing – review and editing.

## ETHICAL STATEMENT

The Committee for Animal Experiments at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, FMVZ-UNAM (SICUAE, number DC-2018/2-2) granted ethical approval for the use of experimental animals.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data related of this experimental study are available on request from the corresponding author.

## PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/vms3.699>

## ORCID

José Ivan Sánchez-Betancourt  <https://orcid.org/0000-0001-8201-9669>

## REFERENCES

- OIE. (2019). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2019*. OIE. (World Organisation for Animal Health), pp. 1–18. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/chapitre\\_validation\\_diagnostics\\_assays.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf)
- Benfield, D. A., Nelson, E., Collins, J. E., Harris, L., Goyal, S. M., Robison, D., Christianson, W. T., Morrison, R. B., Gorceyca, D., & Chladek, D. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), 127–133. <https://doi.org/10.1177/104063879200400202>
- Bi, C., Shao, Z., Zhang, Y., Hu, L., Li, J., Huang, L., & Weng, C. (2017). Identification of a linear B-cell epitope on non-structural protein 12 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, using a monoclonal antibody. *Archives of Virology*, 162(8), 2239–2246. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3355-8>
- Brown, E., Lawson, S., Welbon, C., Gnanandarajah, J., Li, J., Murtaugh, M. P., Nelson, E. A., Molina, R. M., Zimmerman, J. J., Rowland, R. R., & Fang, Y. (2009). Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. *Clinical and Vaccine Immunology*, CVI, 16, 628–635. <https://doi.org/10.1128/CVI.00483-08>
- Cancel-Tirado, S. M., Evans, R. B., & Yoon, K. J. (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102, 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.017>
- Chand, R. J., Tribble, B. R., & Rowland, R. R. (2012). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opinion in Virology*, 2(3), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.002>
- Darwich, L., Diaz, I., & Mateu, E. (2010). Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Research*, 154, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.017>
- Diaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., & Mateu, E. (2009). In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 27, 5603–5611. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.029>
- Flores-Mendoza, L., & Hernández, J. (2010). Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): Escribiendo una historia. *Veterinaria México* 41, 139–159. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922010000200007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922010000200007)
- García-Plata, M. (2016). Desarrollo de una prueba de diagnóstico serológico (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos en contra del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) [Master's Thesis], Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México, México. <http://132.248.9.195/ptd2016/febrero/0741360/Index.html>
- Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C. A., & Dea, S. (1999). Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(1), 20–26. <https://doi.org/10.1177/104063879901100103>
- Goyal, S. M. (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5, 656–664.
- Holtkamp, D. J., Kliebenstein, J. B., Neumann, E. J., Zimmerman, J. J., Rotto, H. F., Yoder, T. K., Wang, C., Yeske, P. E., Mowrer, C. L., & Haley, C. 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), 72–84. <https://www.aasv.org/shap/issues/v21n2/v21n2p72.pdf>
- Jiang, N., Jin, H., Li, Y., Ge, X., Han, J., Guo, X., Zhou, L., & Yang, H. (2017). Identification of a novel linear B-cell epitope in nonstructural protein 11 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus that are conserved in both genotypes. *PLoS One*, 12(11), e0188946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188946>
- Johnson, C. R., Yu, W., & Murtaugh, M. P. (2007). Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*, 88, 1184–1195. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82587-0>
- King, A. M. Q., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adams, M. J., Dutilh, B. E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Junglen, S., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Nibert, M. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., ... Davison, A. J. (2018). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018). *Archives of Virology*, 163(9), 2601–2631. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3847-1>
- Leng, C., Zhang, W., Zhang, H., Kan, Y., Yao, L., Zhai, H., Li, M., Li, Z., Liu, C., An, T., Peng, J., Wang, Q., Leng, Y., Cai, X., Tian, Z., & Tong, G. (2017). ORF1a of

- highly pathogenic PRRS attenuated vaccine virus plays a key role in neutralizing antibody induction in piglets and virus neutralization in vitro. *Virology journal*, 14, 159. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0825-2>
- Loemba, H. D., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D., & Dea, S. (1996). Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology*, 141(3-4), 751-761. <https://doi.org/10.1007/BF01718333>
- Lopez, O. J., & Osorio, F. A. (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(3), 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.005>
- Lunney, J. K., Benfield, D. A., & Rowland, R. R. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Research*, 154(1-2), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.009>
- Montaner-Tarbes, S., del Portillo, H. A., Montoya, M., Fraile, L., & (2019). Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV). *Frontiers Veterinaria Science*, 6, 38. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>
- Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y. J., & Zhou, E. M. (2017). Improved vaccine against PRRSV: Current Progress and future perspective. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01635>
- Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L., & Zimmerman, J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227, 385-392.
- Popescu, L. N., Triple, B. R., Chen, N., & Rowland, R. R. R. (2017). GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) as a target for homologous and broadly neutralizing antibodies. *Veterinary Microbiology*, 209, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.016>
- Rascón-Castelo, E., Burgara-Estrella, A., Mateu, E., & Hernández, J. (2015). Immunological features of the non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses*, 7, 873-886. <https://doi.org/10.3390/v7030873>
- Renukaradhya, G. J., Meng, X.-J., Calvert, J. G., Roof, M., & Lager, K. M. (2015). Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction. *Vaccine*, 33, 3065-3072. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.102>
- Rossow, K. D. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Veterinary Pathology*, 35(1), 1-20. <https://doi.org/10.1177/030098589803500101>
- Su, J., Zhou, L., He, B., Zhang, X., Ge, X., Han, J., Guo, X., & Yang, H. (2019). Nsp2 and GP5-M of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Contribute to Targets for Neutralizing Antibodies. *Virologica Sinica*, 34(6), 631-640. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00149-6>
- Vashisht, K., Goldberg, T. L., Husmann, R. J., Schnitzlein, W., & Zuckermann, F. A. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 26, 4747-4753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.047>
- Welch, S. K. W., & Calvert, J. G. (2010). A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Research*, 154(1-2), 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.018>
- Wootton, S. K., Nelson, E. a, & Yoo, D. (1998). Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5, 773-779.
- Yoo, D., Song, C., Sun, Y., Du, Y., Kim, O., & Liu, H. C. (2010). Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research*, 154(1-2), 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.019>
- Yoon, I. J., Joo, H. S., Goyal, S. M., & Molitor, T. W. (1994). A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(3), 289-292. <https://doi.org/10.1177/104063879400600326>

**How to cite this article:** Contreras-Luna, M. J., Frago-Gonzalez, G., Segura-Velázquez, R. A., Cervantes-Torres, J. B., Alonso-Morales, R., Ramírez-Martínez, L. A., Ayón-Núñez, D. A., Bobes, R. J., & Sánchez-Betancourt, J. I. (2022). Immunogenic and antigenic analysis of recombinant NSP1 and NSP11 of PRRS virus. *Veterinary Medicine and Science*, 1-9. <https://doi.org/10.1002/vms3.699>

## Anexo 2. Secuenciación Nsp's clonadas

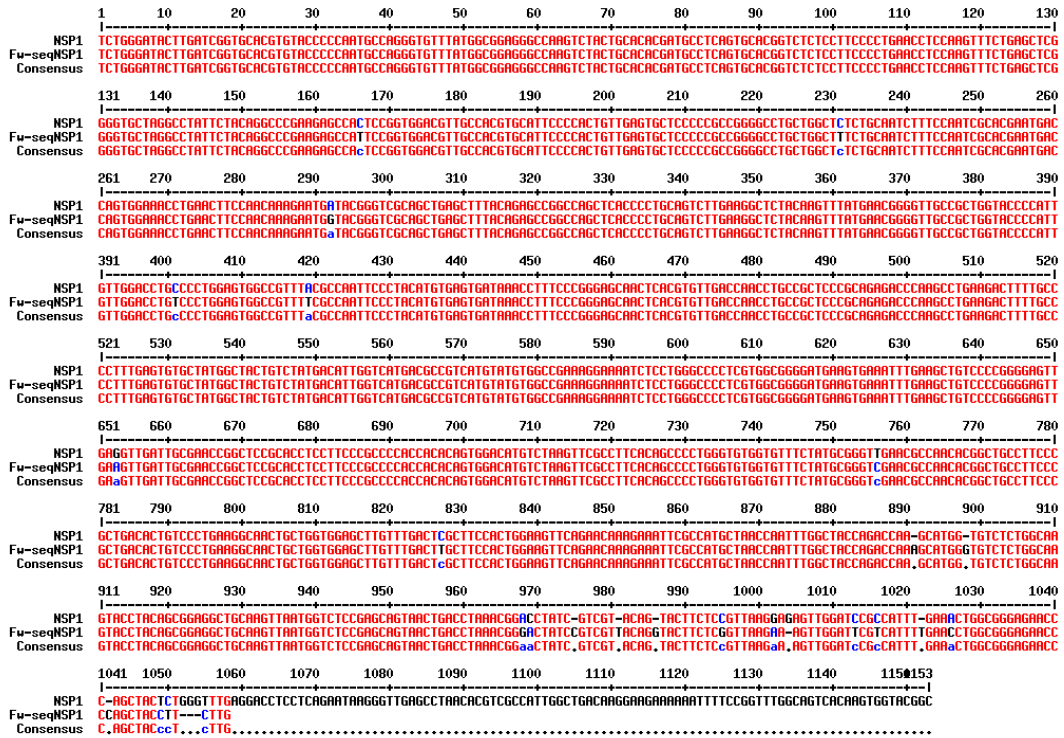


Figura 8. Confirmación de la clonación de la proteína Nsp1 del virus de PRRS. Metodología de clonación con *In-Fusion*® HD. Alineamiento creado en <http://multalin.toulouse.inra.fr>

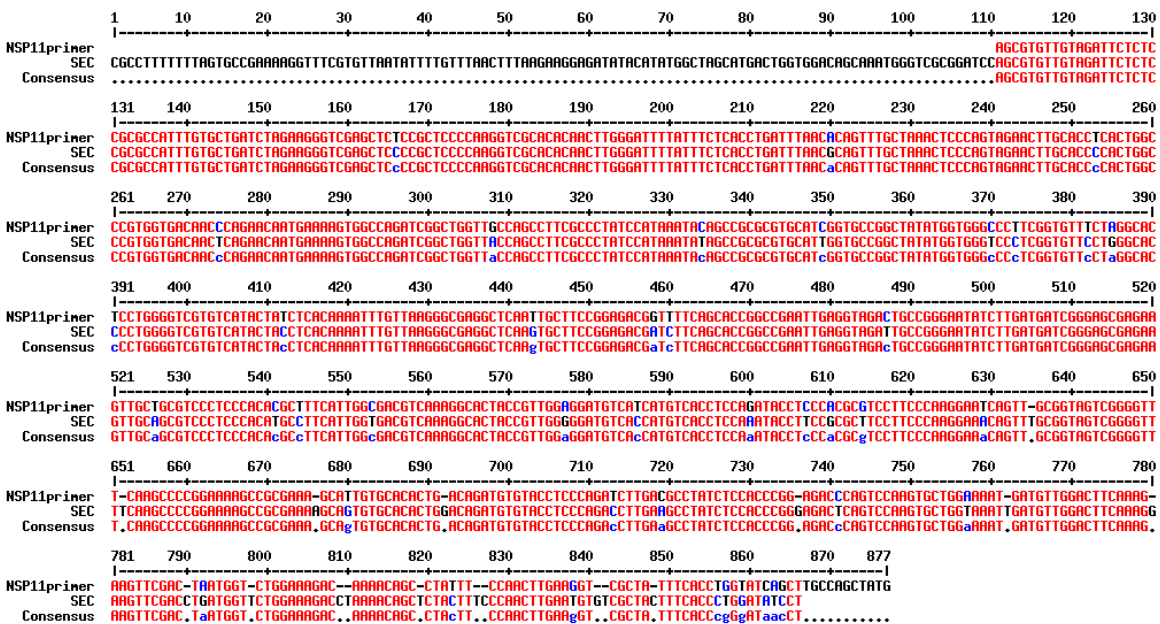
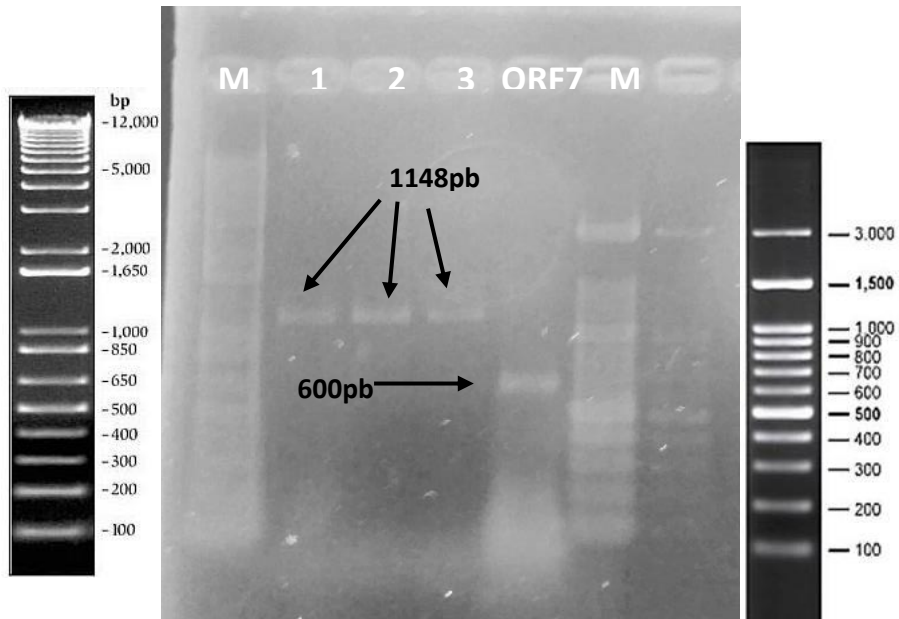
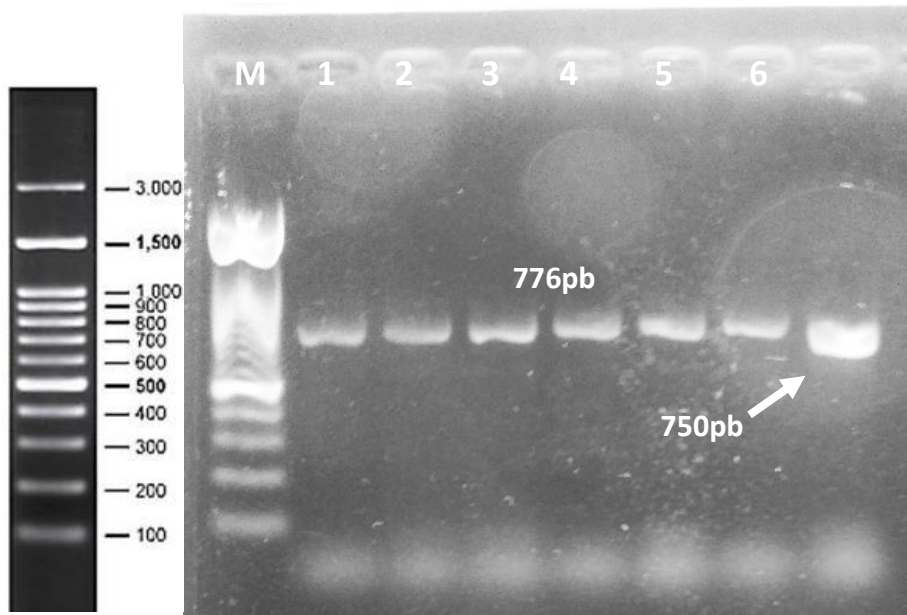


Figura 9. Confirmación de la clonación de la proteína Nsp11 virus de PRRS. Metodología de clonación con *In-Fusion*® HD. Alineamiento creado en <http://multalin.toulouse.inra.fr>

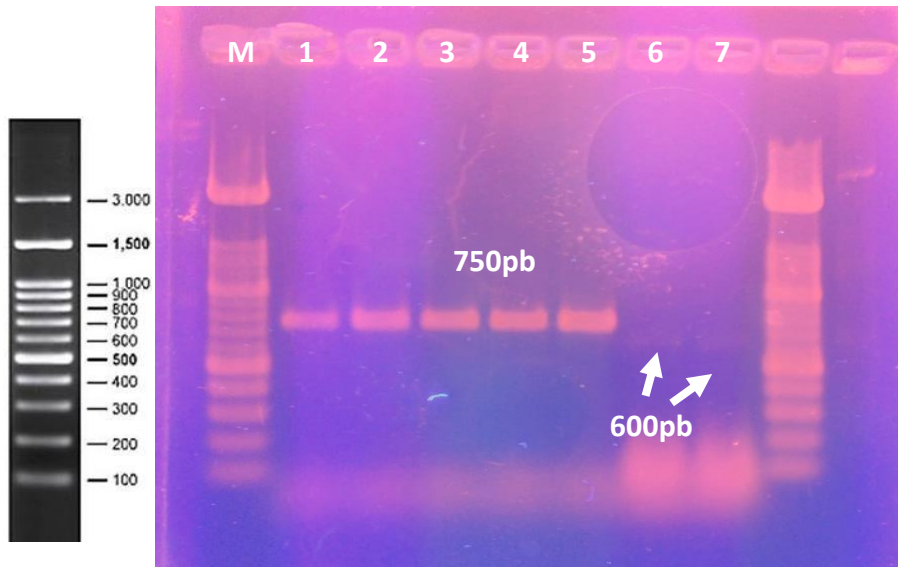
### Anexo 3. Gradientes Nsp's



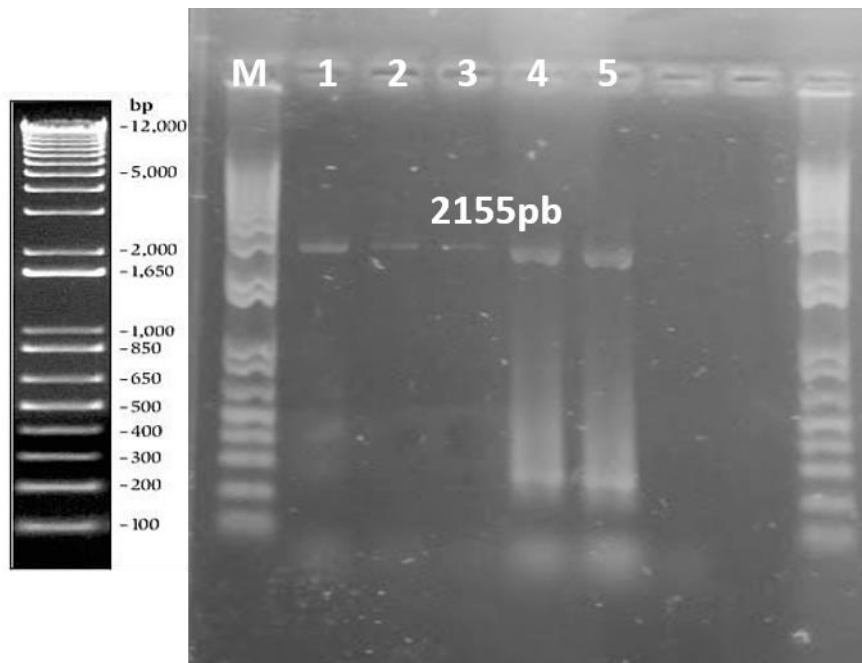
**Imagen 10.** RT-PCR Gradientes. Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, Nsp1. Gel agarosa 2%. Los amplicones obtenidos por RT-PCR fueron analizados en una cámara de electroforesis utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 12,000pb y 100 a 1000pb (M). 56° (1), 57°(2), 58° (3) Control positivo (ORF7).



**Imagen11..** RT-PCR Gradientes. Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, Nsp7. Gel agarosa 2%. Los amplicones obtenidos por RT-PCR fueron analizados en una cámara de electroforesis utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 12,000pb y 100 a 1000pb (M). 50° (1), 51°(2), 52° (3) ) 53° (4), 54°(5), 55° (6) Control positivo (Nsp11).



**Imagen 12. RT-PCR** Gradientes. Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, Nsp11. Gel agarosa 2%. Los amplicones obtenidos por RT-PCR fueron analizados en una cámara de electroforesis utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 3000pb (M). 54° (1), 55°(2), 56° (3), 57° (4), 58°(5), Control positivo ORF7 (6,7).



**Imagen 13. RT-PCR** Gradientes. Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, Nsp2. Gel agarosa 0.8%. Los amplicones obtenidos por RT-PCR fueron analizados en una cámara de electroforesis utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 12000pb (M). 47° (1), 49°(2), 51° (3), 53° (4), 55°(5).



## Anexo 4. qRT-PCR PRRS

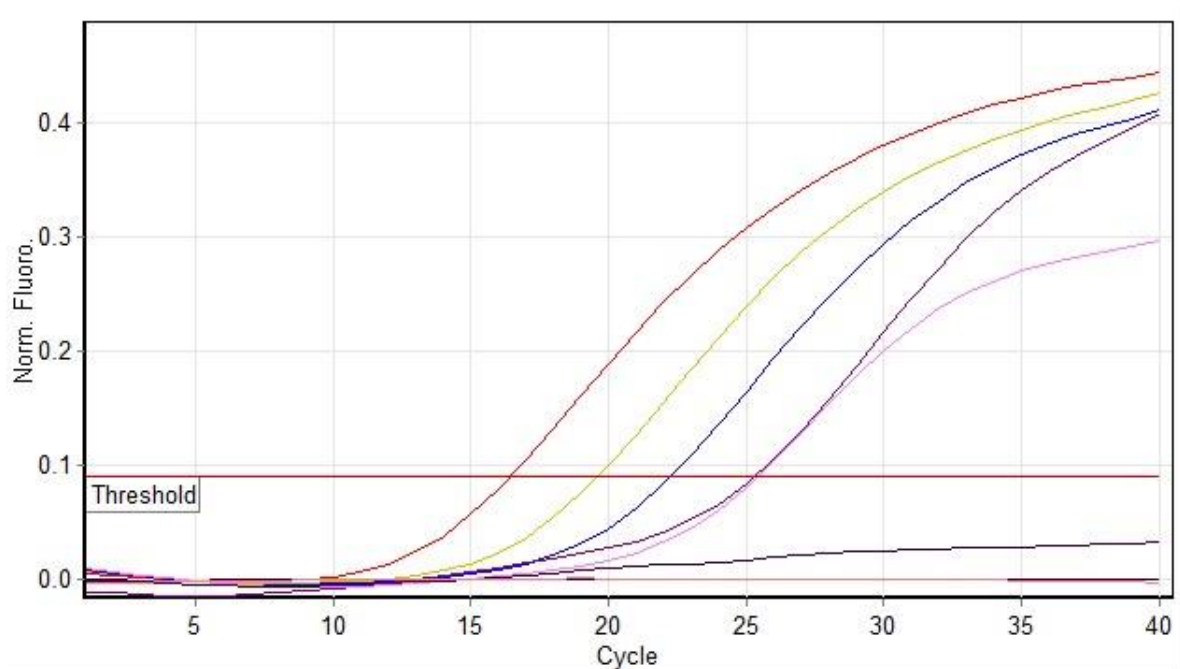
No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/reaction)	Calc Conc (copies/reaction)
1	Red	1 STD	Standard	16.49		5.00E+08	5.33E+08
2	Yellow	2 STD	Standard	19.67		5.00E+07	4.36E+07
3	Blue	3 STD	Standard	22.32		5.00E+06	5.43E+06
4	Purple	4 STD	Standard	25.36		5.00E+05	4.96E+05
5	Pink	VACUNA PRRS	Unknown	25.47			4.58E+05
6	Dark Purple	NTC	NTC				
7	Dark Purple	NTC	NTC				
8	Light Red	AGUA	Negative Control				

**Legend:**

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

**Figura 10.** Curva estándar de cuantificación qRT\_PCR PRRSV



**Figura 11.** qRT-PCR Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino

**Anexo 5. Metodología para purificar proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad en un sistema ÄKTA prime plus (GE Healthcare Life Sciences):**

1. Preparar 24 ml de buffer de unión. Mezclar 3 ml de solución stock de buffer fosfato 8x con 0,24 ml de imidazol 2 M y agua hasta 24 ml. Verificar el pH (7.4-7.6). Este buffer contendrá 20 mM de fosfato (1x), 500 mM de NaCl e 20 mM de imidazol.
2. Prepare 8 ml de buffer de elución. Mezclar 1 ml de solución stock de buffer fosfato 8x con 2 ml de imidazol 2 M y agua destilada hasta 8 ml. Verificar pH (7.4-7.6). Este buffer contendrá 20 mM de fosfato, 500 mM de NaCl e 500 mM de imidazol.
3. Usando una jeringa, equilibrar la columna con 10 ml de buffer de unión.
4. Aplicar la muestra con la jeringa.
5. Lavar con 10 ml de buffer de unión. Recoger la fracción de lavado.
6. Eluir con 5 ml de buffer de elución. Evite la dilución del eluido recogiendo en fracciones de 1 ml.
7. Verificar la purificación visualizando una alícuota de las muestras recogidas en SDS-PAGE.
8. Después de eluir la proteína, regenere la columna lavándola con buffer de unión (de acuerdo con el paso 3). La columna ahora está lista para una nueva purificación.

## Anexo 6. Cuantificación de las proteínas por el método de LOWRY

Para determinar la concentración de proteínas de las proteínas purificadas se elaboró una curva de calibrado a partir de una solución de albumina sérica bovina (BSA) (10 mg/mL). La concentración que tienen las proteínas se determina por interpolación de los valores de absorbancia en la curva.

### Soluciones

- Hidróxido de sodio (NaOH) 1N. Se pesan 10g de NaOH y se disuelven en agua destilada (aforar a 250 ml)
- Tartrato de Na al 2%. Se pesa 1g d Tartrato de Na, se disuelve en agua destilada (aforar a 50 ml)
- Sulfato de Cu ( $\text{CuSO}_4$ ) al 1%. Se pesa 0.5g de sulfato de Cu, se disuelve en agua destilada (aforar a 50 ml).
- Solución de carbonato de Na al 2% en NaOH 0.1N. Disolver en NaOH 1:10 (5ml de NaOH 1N en 45 ml de agua destilada), agregar 1g de carbonato de Sodio.

Las siguientes soluciones deben prepararse al momento del experimento

- **Solución A.** Mezclar 0.5 ml de Tartrato de Na con 0.5 ml de  $\text{CuSO}_4$ , se disuelven en 49 ml de Carbonato de Na 2%.
- **Solución B.** Mezclar un volumen de reactivo de Folin (ácido fosfomolibdotúngstico) con un volumen d agua destilada. Cubrir de la luz, se debe preparar antes de agregarlo a los tubos.
- Solución estándar de albumina. Pesar 1g de albumina y disolver el 100 ml de agua destilada (10mg/ml) y hacer una dilución 1:10 de stock para la curva.

La curva estándar se preparó de la siguiente forma:

**Tabla 9.** Concentraciones de la curva estándar para cuantificación de proteína

<b>TUBO</b>	<b>CURVA (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Stock albumina (<math>0.5 \mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b><math>\mu\text{l}</math> agua destilada</b>
1	500	50	0
2	400	40	10
3	300	30	20
4	200	20	30
5	100	10	40
6	50	5	45
7	0	0	50

Se prepararon diluciones de las fracciones obtenidas de la purificación de las proteínas de la siguiente manera:

Dilución	Vol. Muestra	Agua destilada
1:5	10 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$

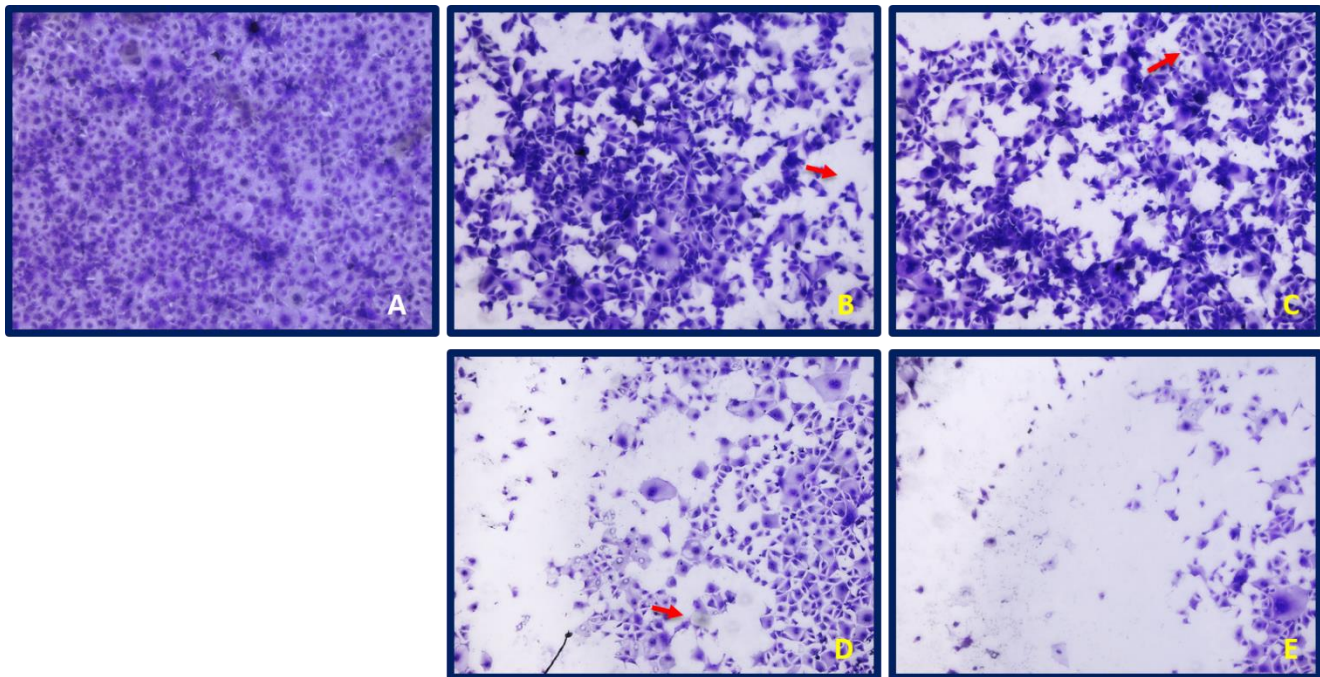
1. Agregar 150  $\mu\text{l}$  de solución A a todos los tubos
2. Incubar 10 minutos
3. Agregar 15  $\mu\text{l}$  de solución B a todos los tubos
4. Incubar 30 minutos
5. Leer a 550 nm en placa de 96 pozos con fondo plano (150  $\mu\text{l}$  / pozo)

## Anexo 7. Condiciones prueba de ELISA

Tabla 10. Condiciones probadas para estandarizar la prueba de ELISA para Nsp's

ANTÍGENO	CONCENTRACIÓN ANTIGENO/POZO	DIL SUERO	DIL CONJUGADO	REVELADO
NSP1	0.1 ug	1:100	1:140000	50 MIN
NSP11	0.1 ug	1:100	1:140000	50 MIN
NSP1	0.1 ug	1:200	1:120000	37 MIN
NSP1	.05 ug	1:100	1:120000	30 MIN
NSP1	.05 ug	1:50	1:120000	30 MIN
NSP1	0.1 ug	1:100	1:120000	30 MIN
NSP11	0.1 ug	1:100	1:120000	30 MIN
NSP1	0.1 ug	1:50	1:120000	30 MIN
NSP11	0.05 ug	1:100	1:120000	27 MIN
NSP11	0.1 ug	1:200	1:120000	16 MIN

## Anexo 8. Efecto citopático de PRRSV a diferentes dosis infectantes



**Imagen 14.** Efecto citopático del virus de PRRS VR2332 a diferentes concentraciones donde: A) Control negativo, B)100 dosis infectantes, C)300 dosis infectantes, D) 500 dosis infectantes y E)1000 dosis infectantes. Monoestrato células MA-104, confluencia 80% a 96 hpi. Vista al microscopio invertido 40X y tinción con cristal violeta. Efecto citopático indicado con la flecha roja ↑ Desprendimiento celular, células alargadas, células con núcleos de diferentes tamaños