



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

**DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE DIAGNOSTICO SEROLOGICO (ELISA)
PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS EN CONTRA DEL
VIRUS DEL SINDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO
(PRRS)**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

MARIANA GARCIA PLATA

Tutor Principal:

José Iván Sánchez Betancourt

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



México, DF.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Dedico con mucho amor este trabajo a mis padres por el valiente esfuerzo que realizaron día a día para poder realizarme como una profesional con valores y educación, permitirme realizar mis sueños y alcanzar mi meta. Gracias a mi mamá por el apoyo incondicional en toda la carrera como madre, amiga y por nunca dejarme sola.

A mi padre que aunque se encuentre lejos nunca dejó de ser un padre y un gran apoyo en todo momento, y me demostró que la distancia no es una limitante siempre que se quieran realizar las cosas. Por tu amor y tu apoyo te agradezco que hoy pueda realizarme como profesional.

A mis hermanas por el apoyo en todo momento y compartir grandes experiencias.

A mi tía y mi abuela materna que aunque ya no estén aquí fueron un fuerte y sólido apoyo durante mi vida y a las cuales recuerdo en cada momento, logro y como parte de mi esencia.

Agradezco a Fernando, por ser una persona tan bella que me acompaña día con día en todo momento sea bueno o malo y mostrarme que el amor es bello siempre y cuando lo disfrutes al máximo. Gracias por impulsarme y hacerme crecer tanto a tu lado.

Agradezco de manera infinita al Doc. José Iván Sánchez Betancourt por abrirme las puertas, ser un mentor en mi vida y un excelente ser humano, por tantas enseñanzas y lecciones. Y por permitirme trabajar junto a él y mostrarme la pasión por una carrera tan bonita.

Agradezco a mis amigos de carrera por compartir tantas experiencias juntos y seguir adelante, a pequeña Anita por ser siempre esporádica, a Caro por mostrarme los errores y los aciertos, a Ivan por mostrarme que siempre uno puede recuperarse y seguir adelante y a John por ser el sensato.

Agradezco Al Dr. René Alvaro Segura Velázquez y la M. en C. Jacquelynne Brenda Cervantes Torres por el apoyo técnico otorgado para la realización de la tesis y por todo el apoyo y afecto demostrado en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco plenamente a la Universidad por permitirme realizar mis estudios en esta hermosa universidad y sobre todo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Agradezco al Departamento de cerdos por abrirme las puertas y permitirme trabajar plenamente.

Este trabajo se desarrolló con apoyo del Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Adyuvantes y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CONTENIDO

Página

RESUMEN.....	1
HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE PRRS.	3
IMPACTO ECONOMICO.....	6
AGENTE ETIOLÓGICO	8
SIGNOS CLINICOS.....	13
PATOGENIA.....	15
RESPUESTA INMUNE.....	19
LESIONES.....	24
DIAGNOSTICO.....	26
PREVENCIÓN Y CONTROL	29
JUSTIFICACIÓN	32
HIPOTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	32
MATERIAL Y MÉTODOS	33
VIRUS.....	33
AISLAMIENTO VIRAL.....	35
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY	36
GENERACION DE CONTROLES.....	37
CONTROLES NEGATIVOS.....	38
CONTROLES POSITIVOS.....	39
ESTANDARIZACION DE LA ELISADMZC.....	41
SENSIBILIZACION.....	41
LAVADO DE PLACAS.....	43
BLOQUEO.....	43
DILUCION DE MUESTRAS.....	44
DILUCION DEL CONJUGADO.....	45
REVELADO.....	46
COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA DESARROLLADA CONTRA LOS KITS COMERCIALES.....	47
EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE ELISA DESARROLLADA CONTRA EL VIRUS DE REFERENCIA VR2332 Y PARA AISLADO DE CAMPO.....	48
RESULTADOS.....	52

VIRUS.....	52
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY.....	53
GENERACION DE CONTROLES.....	55
CONTROLES NEGATIVOS.....	55
CONTROLES POSITIVOS.....	55
ESTANDARIZACIÓN DE LA ELISADMZC.....	56
EVALUACIÓN DE LA ELISA DE AISLADO MEXICANO VS KITS COMERCIALES.....	61
EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE ELISA DESARROLLADA CONTRA EL VIRUS DE REFERENCIA VR2332.....	64
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES	72
ANEXO.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	75

GARCIA PLATA MARIANA. **DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE DIAGNOSTICO SEROLOGICO (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS EN CONTRA DEL VIRUS DEL SINDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRS).** BAJO LA DIRECCION DEL DR. JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT.

RESUMEN

Actualmente la enfermedad del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (de sus siglas en ingles PRRS) es una de las enfermedades virales más importantes que enfrenta la porcicultura nacional, tiene un fuerte impacto económico, ya que afecta a cerdos de todas las edades provocando problemas respiratorios y reproductivos, generando pérdidas económicas de hasta 252 dólares por hembra. Es un virus RNA que pertenece a la familia Arterivirus tiene alta variabilidad genética en sus principales proteínas. Esto provoca cambios estructurales en el virión y surgimientos de nuevas cepas altamente patógenas como la llamada “Lena” reportada en el año 2007, que es una recombinación de cepas del continente europeo y HP-PRRSV del continente asiático. En el territorio nacional poco se sabe acerca del surgimiento de nuevas variantes de PRRSV y el presente

estudio evidencia que los kits disponibles en el mercado, no tienen la sensibilidad suficiente para detectar los anticuerpos generados por estas nuevas cepas. Por tal motivo es muy importante desarrollar una técnica de ELISA indirecto basada en lineamientos del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas para los Animales Terrestres 2015 usando un aislado de campo, que sea capaz de detectar los anticuerpos específicos de esta nueva cepa que circula en nuestro país del cual se desconoce su prevalencia. Nuestros resultados mostraron que la FMVZ tiene una ELISA que emplea una cepa de campo mexicana que en comparación con los kits comerciales resultó con mayor sensibilidad diagnóstica.

INTRODUCCIÓN

HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE PRRS

La enfermedad de PRRS fue descrita por primera vez en los Estados Unidos de Norteamérica en las piaras de Carolina del Norte en 1987 donde se informó de brotes clínicos catastróficos; el síndrome incluye pérdidas reproductivas graves, extensa neumonía post-destete, reducción del rendimiento del crecimiento y aumento de la mortalidad (Zimmerman, 2012). En ausencia de un agente causal se le conoció como “Enfermedad Misteriosa Porcina” (MSD, del inglés Mystery Swine Disease) (Goyal, 1993; Christianson y Joo, 1994; Zimmerman, 2003).

Inicialmente una variedad de etiologías se propuso para MSD incluyendo el virus de la encefalomiocarditis, virus de la peste porcina clásica, enterovirus porcino, parvovirus porcino, virus de la pseudorrabia (enfermedad de Aujeszky) y la contaminación de los piensos con micotoxinas. La identificación de la etiología se complicó por el hecho de que uno o más de los patógenos sospechosos, así como otros agentes infecciosos, fueron comúnmente aislados de casos de MSD (Christianson, 1994; Zimmerman, 2003).

En 1988 Japón presentaba brotes y en 1991 Taiwán. Con esto la pandemia estaba presente en la mayoría de los países productores. Como no se conocía un agente etiológico específico en 1991 una serie de términos descriptivos para la

enfermedad con base en signos clínicos se produjo y fue llamada entre otros: Enfermedad Porcina de Orejas Azules, Enfermedad del Oído Azul, Epidemia de Aborto Tardío de las Cerdas (Alemania), Enfermedad Porcina Azul (Francia) y Peste Porcina (Goyal, 1993; Hurd, et al, 2001; Zimmerman, 2003).

En Europa, por primera vez se observó esta enfermedad en noviembre de 1990 cerca de Münster, Alemania. Para 1991 habían registrado más de 3000 brotes en los Países Bajos, Reino Unido, Francia y Dinamarca, para finales del año los Países Bajos reportaba 1347 brotes y 58 casos fueron reportados como positivos en Reino Unido. En el mismo año España reportaba solo tres casos y los animales fueron rápidamente sacrificados y desde entonces se han diagnosticado nuevos casos. Polonia fue confirmada en 1992 y la República Checa en 1995. Las evidencias serológicas sugerían que el PRRSV estaba ya presente antes en 1988 en Alemania del Este (OIE, 1992; Goyal, 1993; Zimmerman, 2003; Morilla, 2004). La etiología de MSD se determinó en junio de 1991 con el aislamiento del virus Lelystad por Wenswoort y colaboradores junto con en el Instituto Veterinario Central de los Países Bajos. El virus se aisló de lechones afectados, cerdas gestantes y sus fetos (Christianson, 1994; Hurd, et al. 2001; Heydeck, 2015).

Una vez que el virus entró en la población de cerdos domésticos, se expandió rápidamente a otros países. En Estados Unidos muestras obtenidas de 1985 de Iowa y Minnesota, resultaron positivas. En Asia, se han detectado anticuerpos

frente al PRRSV en suero de cerdos importados en Corea del Sur de 1985 y muestras colectadas en Japón en 1988 (Morilla, 2004; Heydeck, 2015).

En el primer Simposio Internacional de 1992 sobre el Síndrome de Infertilidad y Respiratorio Porcino (SIRS) celebrado en St. Paul, Minnesota, participantes del simposio tomaron la decisión de llamar al agente causal Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) y su virus PRRSV, y actualmente se conoce con este nombre a nivel mundial (Goyal, 1993; Christianson, 1994).

Así, en un periodo de 10 años, el PRRSV se introdujo y se hizo endémico en una gran proporción de la población porcina doméstica mundial. La fuente original del virus y las circunstancias que llevaron a que este se introdujese en la población porcina doméstica son desconocidas. Un animal salvaje que actuase como reservorio es la explicación más lógica, el Jabalí (*Sus scrofa*) era la especie candidata más razonable. Sin embargo, en Estados Unidos de 1976 a 1993 no hubo evidencia de la infección en muestras de suero procedentes de jabalís, evidenciando que éstos aparentemente no eran la fuente y PRRSV existía previamente antes de su entrada en el cerdo doméstico, desconociendo la entrada del virus (Morilla, 2004).

En México PRRS fue descrito clínicamente por primera vez en 1992, aunque se sospecha pudo entrar a finales de la década de 1980 y confundirse con

enfermedades como Ojo azul, Influenza porcina A, Fiebre porcina clásica y Aujeszky y originarse de animales importados según un reporte de la presencia de anticuerpos contra PRRSV en México en 1992 (Heydeck, 2015). Milán y colaboradores (1994) realizaron un estudio serológico con la prueba de inmunofluorescencia indirecta para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus en diferentes granjas provenientes de nueve estados del país. Los estados positivos fueron cuatro (Sonora, Jalisco, Guanajuato y Aguascalientes) con un 8.1% de prevalencia, indicando que los cerdos muestreados tuvieron contacto con animales portadores o con el virus. En el mismo año, se crea una barrera para mitigar el riesgo de la entrada del virus por importaciones de cerdos vivos infectados, afectando severamente el comercio. De 1991 a 1993 Estados Unidos exportaba un promedio de 127 mil cabezas de cerdos vivos a México y para 1995 las exportaciones cayeron a 4,900 cabezas; una recuperación se dio en 1996 con la importación de 40,600 cabezas (Petry, 1999).

IMPACTO ECONÓMICO

El PRRS es considerado una de las enfermedades con mayor repercusión económica para los porcicultores en todo el mundo (Heydeck, 2015) ya que afecta tanto el rendimiento reproductivo del pie de cría y el crecimiento en los lechones. Estos efectos visibles en la salud y el rendimiento de los cerdos tienen consecuencias financieras, (Holck, 2003), por ejemplo, los brotes ocasionan pérdidas económicas del 10% de la producción anual de lechones y se considera

una pérdida de US \$239 a \$300 por cerda por año en EUA, Alemania y Holanda. (Heydeck, 2015).

Holck y colaboradores (2003) mencionan que el promedio estimado del costo de un brote agudo sería de 255 dólares por cerda, mientras que otras investigaciones mencionan un promedio que va de los \$228 dólares a los \$336 por cerda. En cuanto a cerdos en crecimiento, el mismo autor menciona que el costo promedio es entre \$6.25 y \$15.25 dólares por cerdo.

Del Campo (2012), señala que la enfermedad en México podría costar entre 80 y 140 millones de dólares por año. Además, señaló que las pérdidas anuales por cerda reproductora van de los \$2,500 hasta los \$3,500 pesos. En el caso de una población de 1000 hembras ésta se calcula en \$3, 500,00 pesos. El mismo autor calculó en la línea de producción una pérdida de hasta \$60.00 pesos por cerdo vendido. Pero puede llegar hasta los \$150 pesos en casos graves.

El diagnóstico oportuno, así como, un buen manejo de la bioseguridad y del hato evitaría la circulación del virus en la granja evitando así pérdidas económicas por deficiencias en el crecimiento. Como en la mayoría de las granjas la densidad de población es amplia, un diagnóstico económico certero es de gran ayuda para los productores y para el control de la enfermedad.

AGENTE ETIOLÓGICO

El Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino dentro del International Committee on Taxonomy of Viruses pertenece al Orden *Nidovirales*, Familia: *Arteriviridae*, Genero: *Arterivirus*, dentro de los cuales se encuentra el virus de la arteritis viral equina (EAV), el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón (LDV) y el virus de la enfermedad hemorrágica del simio (SHFV) y recientemente el virus de la enfermedad de zarigüeya tambaleante (WPDV) (Rossow, et al., 1995; Morilla et al., 2004; OIE, 2008; Meulenbergh, 2000; Zimmerman, 2012; Yun, 2013; Butler, 2014; Heydeck, 2015). Estos virus se caracterizan por tener una alta variabilidad genética y antigénica, infectar monocitos-macrófagos e inducir infecciones persistentes y modulares el sistema inmune (Macías, et al., 2006).

El virus de PRRS tiene morfología pleomorfica. Es un virus pequeño envuelto formado por una cadena RNA de sentido positivo con alrededor de 15 kb de longitud, el virión tiene una forma esférica a oval de 50-70nm de diámetro, con proyecciones superficiales pequeñas que cubren toda la superficie del mismo, consiste en una nucleocápside (N) que encierra la cadena de RNA, la proteína de la nucleocápside está rodeada por una bicapa lipídica de aproximadamente 4,5 nm y es donde se encuentran las proteínas estructurales: proteína E de envoltura, la proteína M de membrana, y un complejo trimérico de las proteínas GP2-GP3-GP4 y GP5 (figura 1) (Morilla et al., 2004; Macías et al., 2006; Dokland, 2010; Zimmerman, 2012; Heydeck, 2015; Kappes, M. y Faaberg, K., 2015).

PRRSV se expresa a través de un conjunto de transcritos de RNAm subgenicos (mRNA1-mRNA7), cada uno utilizado para la traducción de uno o dos marcos de lectura abiertos (siglas en ingles ORFs) (Macías et al, 2006; Dokland, 2010).

El genoma viral contiene diez ORFs conocidos en la dirección 5' a 3' y presenta en el extremo 5' una región corta no traducible (UTR, por sus siglas en inglés, (untranslated region) seguida del ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6, ORF7 (figura 1) y en el extremo 3' una UTR seguida de una cola de poli A. (Macías et al, 2006; Zimmerman, 2012; Heydeck, 2015). El gran número de proteínas de la envoltura es característico de los Nidovirus, y todas las proteínas estructurales son esenciales para la infectividad (Dokland, 2010).

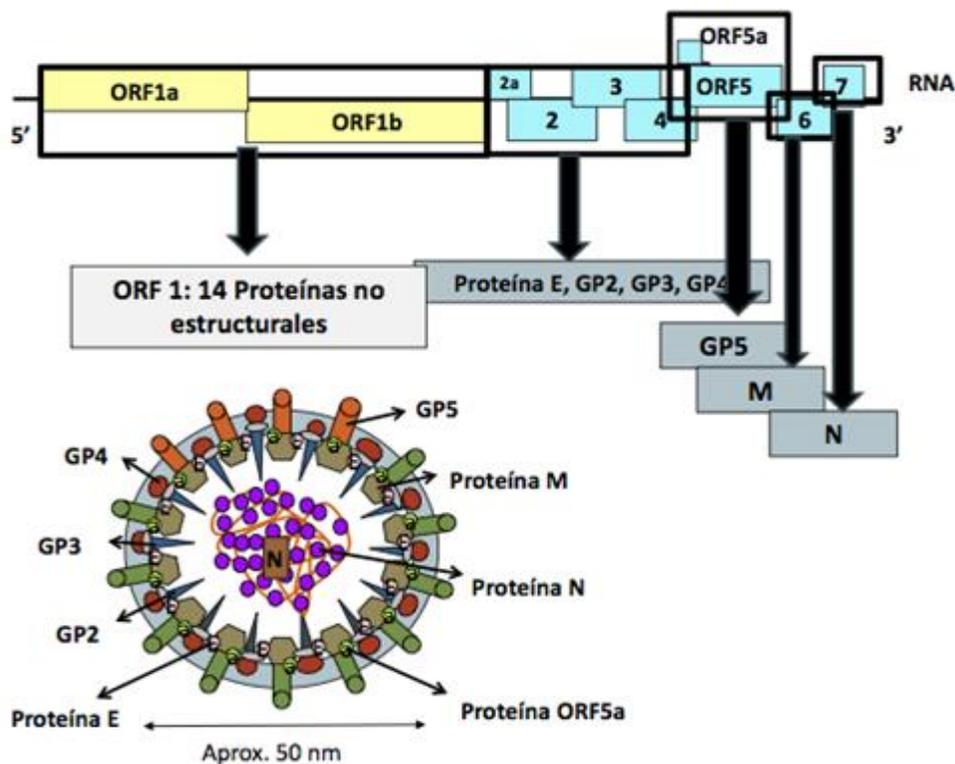


Figura 1. Organización genómica de PRRSV
Obtenida (<http://chil.org/blogs/liveblogsepor/383/by-tag/feria-industrial>)

El análisis de este virus aislado en Europa y América y sus diferencias en las secuencias genómicas ha llevado a la designación de dos genotipos principales de referencia: Europeo (EU o tipo I) representado por la cepa prototipo Lelystad y Norteamericano (NA o tipo II) representada por la cepa prototipo VR-2332; La comparación de sus secuencias de nucleótidos revela que comparten el 63 % de su identidad genómica (con variaciones del 55 al 70 % comparando todo el genoma). Hay una gran diversidad genética de cepas NA y una gran diversidad genética entre las cepas europeas EU y NA, lo cual ocasiona problemas en el diagnóstico y en los resultados de los programas de vacunación (Macías, 2006; OIE, 2008; Zimmerman, 2012; Heydeck, 2015).

El RNA viral de longitud completa (mRNA1) se utiliza para la traducción de dos marcos de lectura abiertos, ORF 1a y ORF 1b que constituye aproximadamente el 75% del tamaño del genoma, localizados en el extremo 5'. La traducción de ORF1a produce la poliproteína pp1a. ORF 1b se expresa a través de un cambio ribosómico, que conduce a la formación de una gran poliproteína pp1ab. Las poliproteínas pp1a y pp1ab son procesadas por proteasas virales para liberar 14 proteínas no estructurales, que incluyen cuatro proteasas (NSP1 α , NSP1 β , NSP2 y NSP4), NSP9-11 son las proteínas más conservadas dentro de los nidovirus; (NSP9) es la polimerasa dependiente de RNA, (NSP10) una helicasa y (NSP11) una endonucleasa. Los ORFs 2a, 2b y 3 a 5 codifican para las glicoproteínas estructurales (GP) GP2, GP3, GP4 y GP5. (Meulenberg, 2000; Morilla et al., 2004; Macías et al., 2006; Dokland, 2010; Zimmerman, 2012; Heydeck, 2015).

ORF 2a codifica para la glicoproteína GP2 (también llamada GP2a) y ORF2b codifica para la proteína E (Dokland, 2010). GP3 es una proteína fuertemente glicosilada expuesta en la superficie viral y junto con GP2 son poco antigénicas. GP4 y GP5 están involucradas en la inducción de anticuerpos neutralizantes (AN) (Macías et al., 2006; Dokland, 2010; Heydeck, 2015).

sgRNA5 codifica ORF5 y ORF5a. ORF5a codifica para la proteína ORF5a que es una pequeña proteína no glicosilada que se requiere para la viabilidad del virus. ORF5 codifica para la mayor glicoproteína de envoltura, conocida como glicoproteína de la cápsula (GP5), es el gen con mayor variabilidad debido a mutaciones y recombinaciones, de 88% a 97% de identidad entre cepas americanas, y de 51% a 59% entre cepas americanas y europeas. Esta proteína es la proteína de unión al receptor celular, es un blanco importante para los AN y exhibe una variación genética muy marcada dentro de su secuencia relativamente corta de 600 pares de bases, por lo que es comúnmente utilizado para la identificación y la construcción de árboles filogenéticos. La proteína GP5, induce apoptosis y genera AN, además, las mutaciones más importantes se encuentran principalmente en el ectodominio de esta proteína. GP5 y M forman un heterodímero unido por enlaces disulfuro que constituyen el complejo mayor de glicoproteína en el virión (Macías et al., 2006; Dokland, 2010; Butler et al., 2014; Heydeck, 2015; Kappes y Faaberg, 2015).

ORF6 codifica una proteína de membrana no glucosilada (M) que carece de una secuencia señal y se acumula en el retículo endoplásmico. Es el gen más conservado entre las cepas americanas (100% de identidad a nivel nucleótidos) y no presenta diversidad genética (Meulenbergh, 2000; Macías et al., 2006; Dokland, 2010; Heydeck, 2015).

mRNA7 codifica para el ORF 7 que a su vez codifica para la proteína de la nucleocápside (N); representa el 20-40% de la proteína total del contenido del virión, tiene 372 pares de bases y se utiliza para análisis genéticos, siendo el segundo gen más conservado, de 95 a 100% entre cepas americanas y de 57 a 59 % entre cepas europeas. Presenta 123-128 aminoácidos y es la proteína más pequeña de todas (15 kDa), además de que es considerada la proteína más inmunogénica por lo cual induce elevada producción de anticuerpos, sin actividad protectora evidente; Por lo tanto es la ideal para pruebas serológicas para detectar cerdos infectados; Actualmente es la proteína en la que se basa el "kit" de diagnóstico serológico Idexx HerdChek PRRS 2XR, que utiliza el método de enzymeLinked immunoabsorbent assay (ELISA). (Macías et al., 2006; Zimmerman, 2012; Heydeck, 2015).

Una característica notable del genoma de PRRSV ha sido la tasa de diversificación mutacional. Se ha estimado que el RNA de PRRSV puede haber evolucionado a un ritmo mayor a $4.7-9.8 \times 10^{-2}$ / sitio / año) (Murtaugh, et al., 2010;

Butler et al., 2014) en comparación con otros virus de RNA que mutan 10^{-3} - 10^{-5} / sitio/año. La frecuencia de mutación influye no sólo en una simple mutación, sino también por una alta tasa de recombinación (Butler et al., 2014).

Incluso nueve subtipos, se han identificado para el tipo 2 PRRSV cuando se basa en ORF5. Se cree que se ha acelerado la evolución viral debido a la producción porcina comercial, con un gran número de cerdos provenientes de diferentes lugares y la inseminación artificial (Murtaugh et al., 2010; Butler et al., 2014).

SIGNOS CLÍNICOS

Tal como se deduce en el nombre de la enfermedad, PRRS causa dos manifestaciones clínicas: fracaso reproductivo y enfermedad respiratoria (Butler, et al., 2014). PRRS es probablemente la enfermedad porcina más importante del último medio siglo. Las pruebas serológicas han revelado que hay muchas piaras rebaños infectadas en los que signos no son aparentes. Cuando los signos son evidentes, varían y son influenciados por diferentes factores como: la virulencia, si se trata de una infección inicial o en curso, la edad de los animales, otros agentes presentes en la población y el tamaño de la piara (ISU, 2015).

Sierra y colaboradores (2000) en un seguimiento clínico realizado de 12 granjas no pudieron establecer un patrón de presentación clínica ya que fue distinto para las granjas. El alto grado de variabilidad de PRRS da como resultado una gran variedad de presentaciones clínicas.

Dentro de los signos clínicos que pueden presentar los cerdos afectados por PRRS manifiestan fiebre, escalofríos, disnea, enrojecimiento de la piel, pelaje áspero edema en parpados, conjuntivitis, depresión, anorexia y diarrea, diferentes grados de neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis y linfadenopatías, algunos pueden presentar cianosis leve de las orejas, el abdomen y la vulva (ISU, 2015; Zimmerman et al, 2012; Heydeck, 2015).

En el área de reproducción a nivel de granja, un signo distintivo de PRRS es la falla reproductiva durante 1 a 3 meses, aumentan las tasas de aborto (a finales de la gestación) y se caracteriza por una “tormenta” de abortos, fetos momificados, mortinatos tipo I y II, lechones nacidos débiles y repeticiones de celo, baja fertilidad, disminución en el número de lechones nacidos, el período para detectar signos reproductivos varía con el tamaño de la piara pero suele ser de dos a tres meses de duración. Una lenta mejoría en el desempeño reproductivo comienza entonces. (ISU, 2015; OIE, 2008; Diosdado, et al., 2004; Zimmerman et al, 2012; Heydeck, 2015). La mortalidad en cerdas es del 1-4% asociada a edema pulmonar y cistitis. En casos graves existe de un 10-50% de abortos, 10% de mortalidad y signos nerviosos (Zimmerman et al, 2012).

Los sementales durante la enfermedad aguda, además de anorexia, letargo y signos respiratorios pueden disminuir su líbido y la calidad del semen, además ocurren cambios en el esperma 2-10 semanas después de la infección e incluyen

reducción de la motilidad y defectos acrosomales. Sin embargo, es de mayor importancia que en el semen se trasmite el virus a la cerdas convirtiéndose en una fuente de infección durante largos periodos de tiempo (Zimmerman et al, 2012; Butler, et al., 2014).

En lechones lactantes incrementa la tasa de mortalidad, presentan disnea y en animales en crecimiento ocasiona problemas respiratorios, además, asociado a otras infecciones de agentes bacterianos y virales como *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella cholerasuis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, virus de la encefalomiocarditis, Aujeszky, coronavirus respiratorio y paramixovirus, ocausa cuadros respiratorios y en general baja ganancia de peso (Diosdado, et al., 2004; ISU, 2015; Heydeck, 2015).

PATOGENIA

La transmisión de PRRS es mecánica por contacto directo con animales enfermos, o con material contaminado por la saliva, orina, semen, secreciones mamarias y excremento de éstos y agujas contaminadas; hay transmisión trans-placentaria a partir de la implantación (Zimmerman et al, 2012; Heydeck, et al., 2015).

En general, la vía de entrada de PRRSV es principalmente oro-nasal, se cree que penetra a epitelios nasal e inhibe el movimiento ciliar en tráquea y posteriormente viaja a macrófagos alveolares y lisa las células dendríticas del tracto respiratorio.

Superior. Alcanza los tejidos linfoides regionales y posteriormente se distribuye a nivel sistémico por las vías sanguínea y linfoide, circulando libre o ligado a monocitos circulantes, produciendo leucopenia y alcanzando el tracto uterino (Diosdado et al, 2004; Heydeck, et al., 2013; Heydeck, et al., 2015).

Los cerdos son los huéspedes naturales de PRRSV, el objetivo primario para la infección por el virus de PRRS son los macrófagos alveolares porcinos totalmente diferenciados (PAMs) (Welch y Calvert, 2010). A pesar de su tropismo celular restringido, varias investigaciones ha demostrado que PRRSV es capaz de replicarse en varias líneas de células no permisivas después de la transfección de estas células con el RNA genómico viral. Este hallazgo indica que el tropismo celular se determina por la presencia o ausencia de mediadores específicos de entrada en la célula diana. Se han identificado diferentes factores celulares con una actividad de mediador de la entrada PRRSV. Algunas de estas moléculas han demostrado facilitar la infección viral tras la unión del virus (Figura 2) (Van Breedam, et al., 2010).

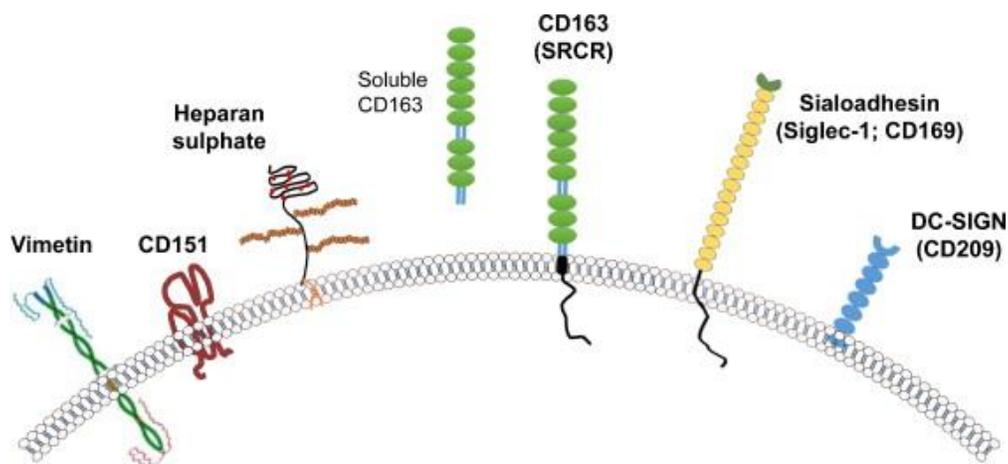


Figura 2. Receptores para PRRS

Obtenida: Zhang y Yoo. *Veterinary Microbiology* 2015; 177: 229-241.

El complejo GP5/M interactúa con moléculas de Heparan sulfato que se encuentra en la superficie de las células blanco, hace la unión del virión por medio del ácido sialico que contiene el complejo GP5/M y CD169 que ayuda a la internalización del virus. Tras la entrada por endocitosis mediado por clatrina, se forma el endosoma, una caída de pH en un rango 6.0 a 6.5 es esencial dentro del endosoma que contiene el virus. Estos datos sugieren que el virus libera su genoma cuando está presente en los endosomas tempranos, donde se encuentra con CD163 que interactúa con GP2a y GP4 que ayuda a la liberación del genoma viral en el citoplasma (Dokland, 2010; Van Breedam, 2010).

El bajo pH en el endosoma puede desencadenar cambios conformacionales de la proteína E en la envoltura del virión y permitir la afluencia de iones a la cavidad interior del virión a través de los poros, esto provoca cambios estructurales de las nucleocápside para una internalización exitosa. Las proteínas del genoma pp1a y pp1b comienzan la traducción. Estas poliproteínas se escinden por proteinasas internas y las proteínas virales no estructurales se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC) que se acopla por primera vez en la síntesis de RNA de cadena negativa. Tanto de longitud completa y longitud de subgenoma se producen menos hebras, esta última porción como plantillas para la síntesis de RNAm sg necesarios para expresar los genes de las proteínas estructurales, que residen en el 3' cuarto proximal del genoma. El genoma se empaqueta en la nucleocápside y queda envuelto, después de lo cual, los nuevos viriones salen de

la célula usando la ruta de exocitosis (figura 3) (Dokland, 2010; Snijder, et al., 2013).

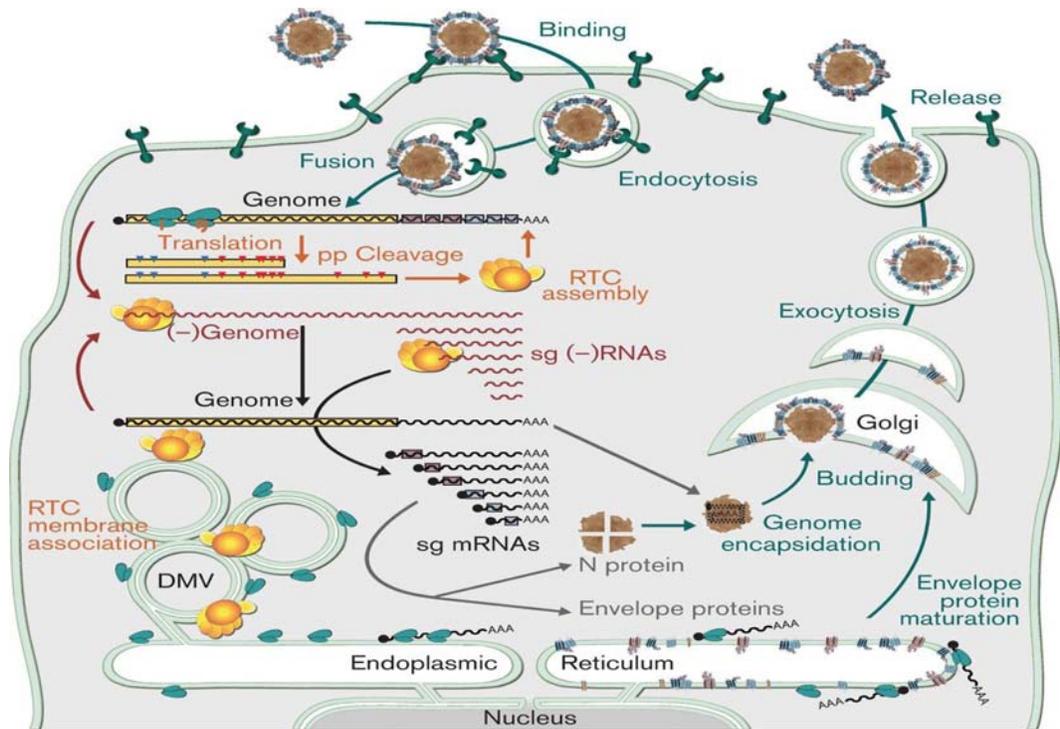


Figura 3. Ciclo de infección de un Arterivirus
Obtenida: Snijder, Kikkert y Fang. J. Gen. Virol, 2013. 94:2141-2163

Una consideración histórica de las prácticas de manejo de los cerdos, combinada con el conocimiento disponible sobre la interacción de PRRSV con estos animales, indica que PRRSV adquirió nuevas oportunidades para la transmisión y la replicación eficiente en animales, con la aparición de las prácticas de gestión de confinamiento de alta densidad en Europa y América del Norte en los últimos veinticinco años. Estos cambios facilitaron la expansión genética y nichos ecológicos en apoyo de una amplia gama de PRRSV (Murtaugh, et al., 2010).

RESPUESTA INMUNE

En el aspecto inmunológico, ante una infección de este tipo, se desarrolla una respuesta humoral rápida y fuerte inducen significativamente a IgG y receptores Fcg,, pero estos anticuerpos iniciales no confieren protección e incluso pueden ser dañinos, por mediar un incremento dependiente de anticuerpo (ADE, de sus singlas en inglés: Antibody Dependent Enhancement) que aumenta la replicación viral, debido a que a través estos anticuerpos al cubrir al virus pueden facilitar la entrada de virus a macrófagos planteándose que las IgG opsonizan las partículas virales y facilitan su entrada a monocitos y macrófagos a través de estos receptores y el receptor CD163, como se ha observado en células blanco *in vitro*. La internalización del virus por esta vía puede inducir la expresión de IL10 y en turno inducir la expresión de CD163 en los monocitos vecinos, incrementando la susceptibilidad a PRRS. La infección de macrófagos, monocitos y células dendríticas son esenciales para la función inmune, pero también parecen ser la llave en los componentes de patogenicidad de PRRSV importantes para evitar la infección (Heydeck et al, 2015).

Aunque se conoce que las células infectadas por virus inducen la expresión de interferones tipo I (como son IFN α e IFN β) que producen una respuesta antiviral innata, y que IFN α inhibe la replicación de PRRSV; diversos estudios han mostrado que PRRSV inhibe a interferones tipo I (IFN α/β) en cerdos, especialmente IFN α que no es detectable en los pulmones de cerdos en donde PRRSV se replica activamente. Una infección activa de PRRSV en los macrófagos

alveolares pulmonares (PAM) no da lugar a una producción de IFN- α e induce a la interleucina 10 (IL10) (Butler, et al., 2014; Heydeck et al, 2015). PRRSV es muy sensible al IFN tipo 1 y esa sensibilidad es confirmada *in vivo*. La presencia de IFN- α en el momento de la infección altera la respuesta inmune innata y adaptativa a PRRSV, incluso un día después de la infección se puede observar retraso en la viremia y disminución de la lesión pulmonar (Butler, et al., 2014; Heydeck et al, 2015).

Las proteínas nsp1, nsp2, nsp11 y la proteína N funcionan como antagonistas e inhiben a IFN. Las proteínas NSP se localizan en el núcleo de la célula e inhibe dramáticamente la expresión de IFN- β , mientras que la proteína de la Nucleocápside inhibe la inducción IFN- β al interferir con la activación del factor regulador de interferón 3 (IRF3). PRRSV no solo interviene con la inducción de IFN, sino también con la señalización de la activación de IFN (Butler, et al., 2014).

En casos de infección con PRRSV la inducción de anticuerpos neutralizantes (AN) se ve severamente retardada y sus niveles se mantienen bajos, lo cual no permite la eliminación efectiva de las células infectadas; los AN no solucionan la viremia, pero sí son importantes para evitar la infección (Heydeck et al, 2015).

En el caso de PRRSV tipo II codifica a un epítoto señalizante localizado en la posición de los aminoácidos 27-30 de GP5, el cual no es neutralizante, pero distrae la respuesta inmunitaria humoral y, de este modo, retrasa la inducción de anticuerpos neutralizantes. En general y debido a la alta frecuencia de mutación

en los virus de RNA, existe una considerable variación en GP5 entre las diversas cepas de PRRSV (Butler, et al., 2014).

La apoptosis que se observa en las células infectadas ocasiona una inmunosupresión por dos mecanismos: disminuye el número de células inmunes que comprometen la respuesta tanto innata como adaptativa, haciendo imposible erradicar la infección primaria; e induce efectos inmunosupresivos en las células sobrevivientes (Heydeck et al, 2015).

Un elemento en la cinética de la infección por PRRSV es la edad del huésped. Los anticuerpos de PRRSV se detectan al mismo tiempo en los lechones infectados y adultos, sin embargo, la viremia es inmediata, corta y no alcanza títulos grandes y es resuelta en las cerdas, mientras que en los lechones se desarrolla tarde y sigue siendo persistente.

La tan citada persistencia viral parece ser una característica de los lechones, los picos de anticuerpos IgG aparecen en el día 21 dpi en los lechones, pero persisten en niveles más bajos a partir de entonces ya que, a excepción de los verracos, el virus no persiste en los cerdos infectados en el futuro. Los lechones son mucho más susceptibles a una alteración inmune y PRRSV es un alterador inmune, de aquí que en los lechones persista la viremia por más tiempo. Aquellos anticuerpos que pueden ser detectados por ELISA aparecen tempranamente, pueden detectarse desde la primera semana después de la infección pero los anticuerpos con la actividad AN se presenta un mes después de la infección. Se puede

observar que la viremia alcanza su pico más alto al mes de la exposición a PRRSV (figura 4) (Butler, et al., 2014).

La base mecanicista en la enfermedad aguda, tales como dificultad respiratoria es probablemente una consecuencia de la liberación de citocinas inflamatorias en el pulmón. A raíz de la declinación en la sangre, la viremia periódicamente reaparece, con los tejidos linfoides como el principal sitio de replicación del virus. El virus puede aislarse de ganglios linfáticos durante más de 100 días después de la infección. Los niveles de replicación decaen poco a poco hasta que el virus eventualmente desaparece. El mecanismo para la desaparición no está claro, pero probablemente se da por la eliminación gradual de las células permisivas combinados con sólo una respuesta inmune parcialmente eficaz. Por definición, el PRRSV no es un virus 'persistente'. Sin embargo, ya que el promedio de vida de un cerdo de producción es de aproximadamente 180 días, la infección por PRRSV es "largo de la vida" para la gran mayoría de los cerdos (Heydeck, et al., 2015)

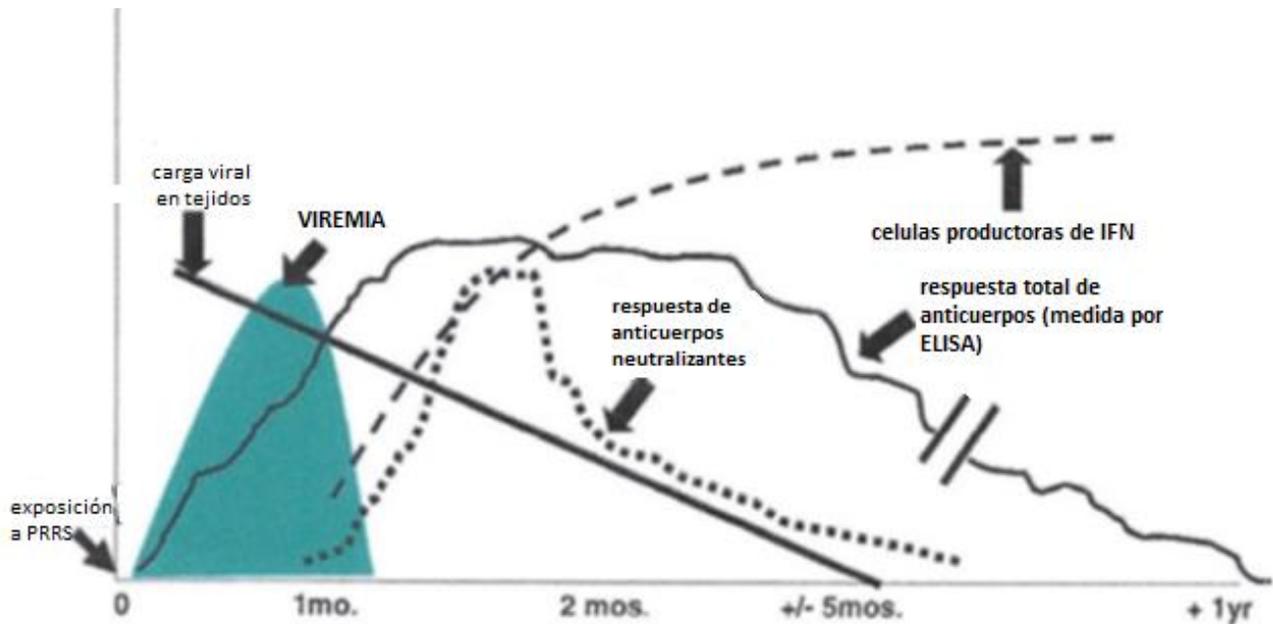


Figura 4: Cinética de los anticuerpos dirigidos hacia PRRS en cerdos. Modificada de: Butler, et al., Immunol Res, 2014, 59:81–108

Después de la infección, la respuesta más temprana y más fuerte de anticuerpos es contra la proteína N, que aparecen alrededor de la primera semana posinfección y permanece por algunos meses, pero no se correlacionan con protección (Macías, 2006). En contraste, la respuesta de anticuerpos contra el componente de superficie principal, el heterodímero GP5-M, es débil y retrasado. De hecho, algunos animales no generan una respuesta de anticuerpos detectables contra GP5 (Figura 5). La respuesta de anticuerpos neutralizantes, que también es débil y el retraso, sigue un patrón similar. Curiosamente, una fuerte respuesta de anticuerpos se hace contra las proteínas no estructurales (NSP), como nsp2 (Chand, et al., 2012).

Nsp2 no es un componente del virión y se encuentra solamente durante la infección de las células, por lo tanto, la respuesta de anticuerpos durante la infección se dirige principalmente contra las proteínas virales no asociadas con la neutralización del virus. (Chand, et al., 2012).

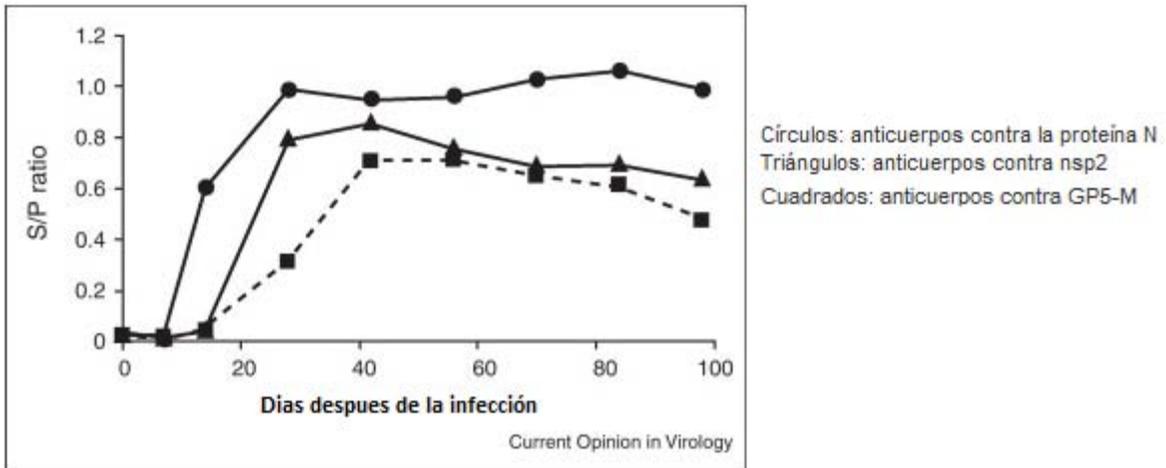


Figura 5. Respuesta de anticuerpos de las principales proteínas
Modificada: Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus.

Debido a la variabilidad genética viral y a su peculiar respuesta inmune, en una granja endémica se observan varios grupos de animales: animales no infectados, animales infectados y con excreción viral, animales recuperados de infección y que están protegidos, animales recuperados pero susceptibles y animales portadores (Heydeck et al, 2015).

LESIONES

PRRS es una enfermedad multisistémica. Causa viremia a las 12 horas post infección y se caracteriza por una neumonía intersticial, necrosis de linfocitos, los

ganglios linfáticos, vasculitis, miocarditis, diferentes grados de rinitis y encefalitis (Rossow, 1995; Heydeck, et al., 2015).

Las lesiones por una infección de PRRSV son similares y se describen en todas las edades de los cerdos. La gravedad y la distribución de las lesiones varía con la virulencia del virus infectante (Rossow, 1995; Zimmerman, et al, 2012).

La mayoría de los estudios de inoculación en el que han sido descritas las lesiones, los cerdos eran lactantes o eran cerdos destetados, de 1-70 días de edad. Las lesiones macroscópicas y microscópicas se observan en los pulmones y los ganglios linfáticos constantemente entre el día 4 al 28 posterior a la infección, donde la replicación viral tiene lugar. Las lesiones microscópicas también están en el útero de las cerdas y en los testículos de los verracos (Rossow, 1995; Zimmerman, et al, 2012).

En los pulmones se pueden presentar lesiones por diferentes grados de neumonía. A la histopatología se observa neumonía con engrosamiento del septo alveolar e infiltración de células inmunológicas, como neutrófilos en banda, leucocitos; células T que atraen a los linfocitos T citotóxicos. La presencia de células en apoptosis se ha asociado a la infección por virus de PRRS, estando presentes en diferentes tejidos infectados que incluyen pulmón, testículos y ganglios linfáticos (Heydeck, et al., 2015). El parénquima se observa elástico, ligeramente firme, no colapsado, con manchas de color gris-marrón, y húmedo. En

los casos de campo de PRRS, especialmente en cerdos de cría y traspatio, las lesiones pulmonares de PRRS son a menudo complicados o encubiertas por las enfermedades bacterianas y/o virales concurrentes (Zimmerman, et al, 2012).

Muchos ganglios linfáticos en la mayoría de los cerdos se agrandan de 2 a 10 veces lo normal y las lesiones microscópicas son predominantemente en los centros germinales, las cortezas pueden contener pequeños espacios quísticos revestidos por endotelio contener fluido proteico y linfocitos (Zimmerman, et al, 2012).

Las lesiones son más comúnmente vistos en camada infectadas PRRSV en lechones nacidos vivos que mueren o son sacrificados dentro de unos pocos días después del nacimiento. Las lesiones fetales incluyen edema perirenal, edema del ligamento esplénico, ascitis, hidrotórax y hidroperitoneo. Las lesiones microscópicas son leves e incluyen periarteritis en pulmón, corazón y riñón (Rossow 1995; Zimmerman, et al, 2012).

DIAGNOSTICO

Existen diferentes pruebas diagnósticas dirigidas para PRRSV, la elección de la prueba va a depender de los signos clínicos que presenten los animales, así como, la edad de los mismos. En la tabla 1 se enlista los más importantes.

PRUEBA	TIPO DE MUESTRAS	LINEA CELULAR	PROPÓSITO	OBJETIVO	OBSERVACIÓN
PCR	<ul style="list-style-type: none"> Sangre entera Pulmón Bazo Tonsilas Lechones abortados 		Determinar población libre de la infección. Confirmación de casos clínicos.	Utilizado para las estimaciones cuantitativas de la carga viral	Muy sensible y específica
AISLAMIENTO VIRAL (AV)	<ul style="list-style-type: none"> Suero Pulmón Ganglios linfáticos Bazo Cordón umbilical 	MARC-145 CL-2621 MA-104 PAM	Confirmación de casos clínicos	Replicación del virus	
SEROLOGÍA (ELISA)	<ul style="list-style-type: none"> suero fluidos orales 		Determinar población libre de la infección. Prevalencia de la infección	Detección de anticuerpos	Altamente sensible y específica
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	<ul style="list-style-type: none"> suero pulmón tonsilas bazo riñón 		Determinar población libre de la infección.	Útil hasta día 28, no se recomienda más allá de 90 días	Alta especificidad y sensibilidad moderada
ENSAYO DE INMUNOPEROXIDASA EN MONOCAPA (IPMA)	<ul style="list-style-type: none"> suero 	MARC-145	Determinar el estado inmunitario de los animales después de la vacunación	Detección de anticuerpos	
INMUNOFLUORESCENCIA (IFA)	<ul style="list-style-type: none"> Pulmón suero 	MARC-145	Determinar el estado inmunitario de los animales después de la vacunación	Detección de anticuerpos	Alta especificidad y sensibilidad variable

Tabla 1: Pruebas disponibles para el diagnóstico de PRRS
Obtenida de: Taylor, 2013; OIE, 2015; Carvajal, 2015)

Un primer paso importante en la elección de una prueba diagnóstica apropiada es decidir el propósito de las pruebas a realizar, que podrían incluir la detección de infección al menos en un animal de una granja, la determinación de la prevalencia del virus en la granja, la confirmación de la exposición al virus o vacuna, o la evaluación del momento en que se produce una infección (Tabla 1). Estos factores determinarán los animales que deben analizarse, el número de muestras necesarias y los tejidos apropiados a utilizar. El momento de realizar las pruebas es crucial, ya que existen varios aspectos de la infección y la respuesta inmunitaria, que incluyen la viremia, la diseminación del virus, la respuesta de anticuerpos y la aparición de lesiones, que pueden producirse en periodos específicos (figura 6). Además, es posible que la interpretación de los resultados de pruebas individuales no refleje el estado de todo el grupo porque el momento de desarrollar la infección variará en cada animal, por lo que hay que actuar con precaución (Boehringer Ingelheim, 2015)

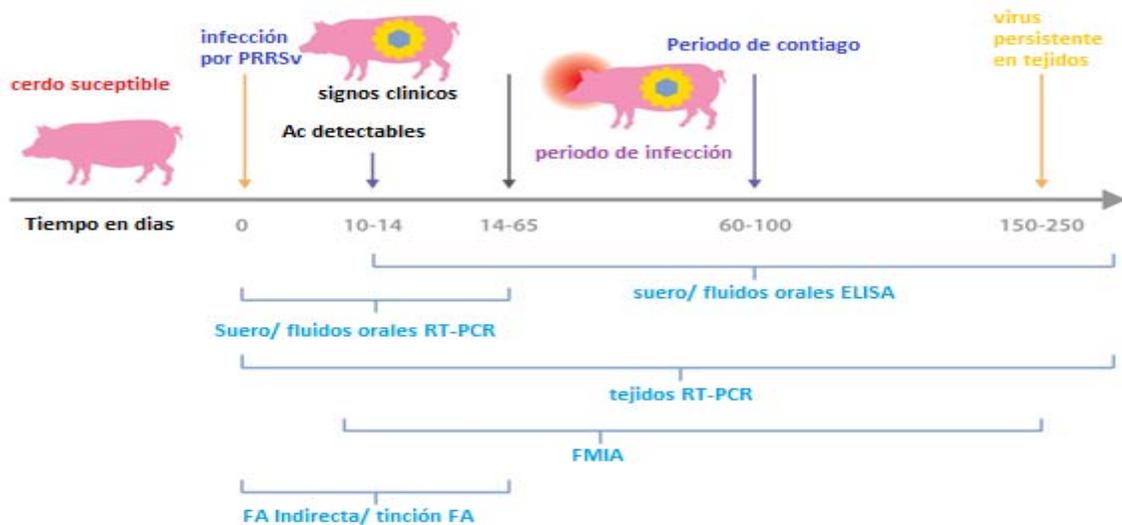


Figura 6: Evolución de la infección por PRRSV. Modificada de: Global PRRS Solución: <https://www.prrs.com/es/publicaciones-sobre-prrs/articulos/revision-sobre-diagnostico-prrs/>

PREVENCIÓN Y CONTROL

La manera más eficiente de controlar PRRS, es creando programas de prevención, cuyo objetivo es frenar el ingreso del PRRSV a la granja negativa o la introducción de nuevas variantes virales en granjas infectadas. Los protocolos actuales incluyen el uso de instalaciones de cuarentena, muestreo a pie de cría de nuevo ingreso, sanitación y secado de vehículos de transporte y equipo, protocolos de ingreso de personal, y control de insectos (Zimmerman, 2003).

Para controlar la circulación del PRRSV en granjas positivas, las hembras de reemplazo deben haber desarrollado inmunidad antes de su ingreso. Algunas estrategias incluyen el contacto con animales infectados activamente por el PRRSV, exposición intencional al PRRSV o la vacunación. La exposición de las cerdas de reemplazo a los 2 meses de edad provee tiempo para el desarrollo de inmunidad y resolución de la infección y resulta en la desaparición de los signos clínicos y producción de lechones negativos al PRRSV. Otro aspecto de un programa de prevención, es el cierre de granja al ingreso de reemplazos y el uso de semen procedente de sementales que nunca han estado en contacto con el PRRSV. Se ha observado disminuciones en variaciones mutacionales en granjas cerradas en comparación con las que introducen reemplazos. En el área de maternidad se basan en prácticas de manejo que limiten el riesgo de difusión del PRRSV entre camadas. Dentro de ello se incluye la restricción en la donación de

lechones y mantener un estricto todo dentro – todo fuera (Zimmerman et al., 2012; Carvajal, 2015).

El control de enfermedades asociadas tanto bacterianas como virales, es de suma importancia, a través de vacunación y programas estratégicos de medicación. Existen tratamientos contra una infección de PRRS, pero su eficacia aún no ha sido del todo certera.

El programa de vacunación debe establecerse para cada granja. El uso de vacunas de virus activo en pie de cría se utiliza para reducir la presencia de animales susceptibles, acelerar la producción de lechones negativos y, en caso de brotes, limitar la replicación del virus. Hembras negativas en su tercer trimestre de gestación produce infección fetal. A nivel individual no va a evitar la infección por cepas de campo aunque sí va a reducir la circulación vírica. Esto evitará la formación de subpoblaciones y se reducirá la presión de infección estabilizando la población (Boehringer Ingelheim, 2015).

Por otro lado son numerosos los estudios que concluyen que la vacunación de animales en fases de crecimiento mejora los niveles de salud por la reducción de sintomatología propia de la enfermedad y la asociada a infecciones oportunistas. La eficacia de las vacunas puede estar condicionada tanto por la variabilidad del virus como por la impredecible protección cruzada entre las distintas cepas y las

co-infecciones con virus que comprometan el correcto funcionamiento del sistema inmune de los animales (Boehringer Ingelheim, 2015).

Existen dos tipos de vacunas disponibles contra el virus de PRRS: las vacunas de virus vivos modificados (MLV por sus siglas en ingles "modified live virus") y vacunas de virus muerto (KV por sus siglas en ingles "Killed virus"). Ambos tipos de vacunas están disponibles para los dos genotipos. El uso de la vacunación aún está en duda respecto a la protección que proporciona si existen infecciones por cepas heterólogas (Sotomayor, 2014)

JUSTIFICACIÓN

La alta variabilidad genética y antigénica del virus de PRRS da como resultado nuevas cepas del virus circulando en el país. El diagnóstico serológico basado en kits comerciales donde se ocupan cepas de referencia, limita la especificidad hacia cepas con cambios genéticos y antigénicos. Recientemente se han encontrado variantes virales de alta patogenicidad en el continente Asiático y Europeo, lo cual genera un alto impacto económico y reduce la capacidad de los kits comerciales para detectar estas nuevas cepas virales. Por tal motivo es muy importante desarrollar un diagnóstico serológico específico que detecte anticuerpos contra virus presentes en México.

HIPÓTESIS

El desarrollo de una prueba de ELISA (ELISADMZC) con un virus aislado en campo, permitirá el reconocimiento de anticuerpos específicos para cepas de campo que los kits comerciales no pueden reconocer.

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar una prueba de diagnóstico serológico (ELISA) capaz de detectar los anticuerpos generados por un nuevo aislado mexicano de PRRS.

PARTICULARES

1. Replicar la cepa aislada en cultivo celular
2. Obtención de sueros empleados como controles negativos y positivos de la prueba de ELISADMZC
3. Estandarización de la prueba de ELISA
4. Evaluación de la prueba de ELISADMZC con sueros de campo

MATERIAL Y MÉTODOS

VIRUS

En el año 2013 en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) se presentó un caso clínico de un granja ubicada en el municipio de Tulancingo en el estado de Hidalgo, con diagnóstico presuntivo de una infección activa por el virus de PRRS, de la cual se remitieron 4 muestras de pulmón y 18 muestras de suero provenientes de hembras reproductoras.

Diagnóstico serológico: para el análisis serológico de los sueros se utilizó la técnica de unión enzimática (ELISA) con dos kits disponibles en el DMZC; fueron utilizados el kit CIVTEST SUIS PRRSS A/S de

laboratorios HIPRA, S.A. y por el kit IDEXX PRRS X3® No. Cat. 99-18070 de laboratorios IDEXX, Inc., que se realizaron bajo las especificaciones del fabricante. Ambos kits detectan anticuerpos IgG en contra de PRRS en el suero de los cerdos. La presencia o ausencia de anticuerpos en contra de PRRSV se determinará calculando el índice S/P para cada muestra.

En el caso del Kit CIVTEST SUIS PRRSS A/S valores mayores o igual a 20.0 se considerarán positivo, mientras que valores debajo del valor se consideran negativos.

Para el kit IDEXX PRRS X3 se determinara con la medida S/P que debe ser ≥ 0.4 para considerarse positivo.

Diagnóstico molecular: Se utilizó la técnica de RT-PCR para identificar el gen ORF7 del virus de PRRS, haciendo uso del kit comercial OneStep RT-PCR, (QIAGEN, Cat 210212). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, los oligonucleótidos empleados fueron diseñados en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos y están dirigidos a ORF7 (Tabla 2)

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño	Amplicón	Posición
ORF7-F	5' AAGTGCCGCAGGCTTTCATC 3'	20 pb	647 pb	14,726 – 15,373
ORF7-R	5' CCACACGGTCGCCCTAATTG 3'	20 pb		

Tabla 2: secuencia de Primers utilizados para el Diagnóstico molecular de PRRS

Cultivo celular

Aquellos sueros que resultaron positivos fueron almacenados en alícuotas de 2 ml y resguardados en congelación.

El aislamiento viral se realizó en células MA-104 provenientes de Macrófagos alveolares que tienen la propiedad de ser adherentes. (www.atcc.org).

La preparación del cultivo celular se llevó a cabo en un estado de esterilidad realizándose en campa de flujo continuo utilizando material estéril.

AISLAMIENTO VIRAL

Para realizar el aislamiento viral del virus de PRRS se empleó la línea celular MA-104, para lo cual se sembraron 2×10^6 cél/mL en botellas de cultivo de 25 cm² en medio Eagle esencial mínimo (DMEM, Cat. GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Cat. 16000-044 GIBCO), 100U/ml Penicilina, 100mg/ml Estreptomina, 1.25 ug/ml Anfotericina B (Kim, et al., 1993). Una vez obtenida una confluencia del 80%, se decantó el medio de cultivo y las células se infectaron con 1 ml de suero previamente filtrado. Posteriormente, se mantuvo en agitación durante 1 hora a 37°C asegurando que el inóculo cubriera todo el monoestrato celular y al término se adicionaron 5 ml del medio DMEM suplementado con

100U/ml Penicilina, 100mg/ml Estreptomicina, 1.25 ug/ml Anfotericina B. Las células infectadas se incubaron a 37°C y 5%CO₂ durante 3-5 días o bien, hasta observar efecto citopático (ECP). Se empleó como control negativo de la infección, células MARC145 en medio suplementado. Con la intención de liberar el virus de las células, se sometieron los cultivos a dos ciclos de congelación-descongelación y se centrifugaron a 15000 rpm durante 15min, para eliminar todo el debris celular y sólo quedarnos con el sobrenadante que contiene al virus. Finalmente, se confirmó la presencia del virus mediante RT-PCR, previamente descrito.

Cuantificación de proteína

Para determinar la cantidad de proteína presente en el aislamiento viral de PRRSTIPOII,EDOMEX,DMZC,2011 se realizó la prueba de Lowry (método de hidrólisis ácida).

LOWRY

Se realizó una curva patrón de albúmina identificando los tubos del 0 al 7 empezando por cero. Se preparó un volumen de 500 µl de una dilución 1/10 y 1/20 a partir de un stock de 10mg/ml de albúmina.

Se adiciono en cada tubo de la curva agua milliQ y la dilución del stock de albumina correspondiente.

Posteriormente se prepararon los tubos para la dilución de la muestra: 1/5, 1/10 y 1/20 con volumen final de 100 µl.

Se preparó la solución A (VER ANEXO 1) y se agregaron 300 µl a todos los tubos empezando por las diluciones de la muestra y después a los tubos de la curva. Se agitó la muestra utilizando un vortex y se dejó reposar durante 10 minutos cubierto con papel aluminio. Terminado el tiempo se volvió a mezclar con el vortex.

Se preparó la solución B (VER ANEXO 1) y se agregaron 30 µl por cada tubo en el mismo orden que la solución A. Se dejó cubierto durante 30 minutos con agitación constante cada 10 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo se colocaron por duplicado 200 µl de la muestra y la curva en una placa de 96 pozos y se obtuvieron las lecturas de absorbancia con un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 630nm (Epoch, Biotek)

GENERACIÓN DE CONTROLES

Los controles deben de utilizarse a lo largo de todo el desarrollo y estandarización de la prueba ELISADMZC. La generación de controles se realizó con base al capítulo de la OIE sobre validación 3.6.1 del Manual Terrestre disponible en línea (OIE, 2014).

Es necesario seleccionar al menos tres muestras de referencia bien definidas que contengan el analito abarcando resultados desde positivo alto a negativo. Las

muestras deberían representar tanto a los animales que se consideran infectados como a los no infectados dentro de la población que finalmente va a ser objeto de la prueba (OIE, 2013).

Para la obtención de controles tanto positivos como negativos se solicitó al centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIPP) ubicado en Jilotepec, Estado de México suero de cinco cerdos para realizar el diagnóstico contra distintas enfermedades, a fin de poder emplear los cerdos para generar antisueros específicos del virus de PRRS.

Una vez confirmada la negatividad del suero de los cerdos, se solicitaron cinco cerdos recién destetados al CEIPP-UNAM. Los animales se identificaron con aretes individuales.

Para la obtención de suero, se tomaron muestras de sangre total de la vena cava mediante el empleo de tubos sin anticoagulante S-Monovette 7.5ml Z (Sarstedt, Cat. 01.1601.100), se dejó que se formara el coágulo a temperatura ambiente durante un periodo entre 20 a 30 minutos (OIE, 2013). Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos y se recuperó el suero con una pipeta en tubos eppendorf de 1.5ml y finalmente se almacenaron a -20°C hasta su uso (OIE, 2013).

CONTROLES NEGATIVOS

Los sueros que se emplearon como controles negativos de la prueba, se seleccionaron a partir de las muestras de los cerdos previamente sangrados que

presentaron diagnóstico negativo a PRRS, evaluada tanto por RT-PCR como por ELISA. Para esto se emplearon los kits comerciales de IDEXX PRRS X3® y CIVTEST SUIS PRRS A/S® de HIPRA.

Después de que las muestras de suero se obtuvieron como se mencionó anteriormente, se alicuotearon e identificaron con el número correspondiente y fueron almacenados a -70 °C para evitar la degradación del suero (OIE, 2013).

CONTROLES POSITIVOS

Para generar los controles positivos de la prueba de ELISADMZC se infectaron los cinco cerdos con diagnóstico negativo a PRRS con el aislamiento antes descrito.

Las alícuotas de virus de 5 ml se inactivaron con formaldehído 0.05% y fueron resguardadas en congelación.

El protocolo que se siguió para la inmunización de los cerdos fue el siguiente:

- 4 inoculaciones con intervalo de 7 días posteriores a la primera inmunización.
- La primera inoculación por vía intranasal sin adyuvante
- El 2, 3 y 4to booster vía intramuscular empleando Adyuvante Incompleto de Freud, Sigma No. Cat. F5506, en una proporción 1:1 (1ml de antígeno y 1ml con adyuvante)

Para la primera inmunización se dejó descongelar el antígeno a temperatura ambiente. Una vez descongelado se tomaron 5 ml de antígeno en una jeringa de 10 ml y depositados en un aspersor nasal se dieron dos atomizaciones en cada fosa nasal a cada cerdo. Para las inmunizaciones intramusculares, se tomaron 5 ml de antígeno en una jeringa de 10 ml y en otra jeringa se tomaron 5 ml del adyuvante incompleto y se unieron por medio de una llave de 3 vías (figura 7) con la intención de formar una emulsión con el antígeno.



Figura 7: Llave de 3 vías.

Obtenida: <https://www.google.com.mx/imagenes>

Una vez que se mezclaron los componentes, se tomó en una jeringa 2 ml de la mezcla para cada cerdo.

La inoculación de la mezcla se realizó en la tabla del cuello utilizando una aguja rosa calibre 18G X 38 mm marca TERUMO para cada cerdo.

Terminando la inoculación se desechó el material contaminado y se vigiló a los cerdos durante una semana hasta la siguiente inoculación.

Los animales fueron sangrados antes de la 2, 3 y 4 inmunización con tubos Sarstedt S-Monovette 7.5ml Z para recuperar el suero de cada cerdo. Los sueros fueron alicuotado en microtubos de 1.5 ml y guardados en congelación a -70 °C.

ESTANDARIZACIÓN DE LA ELISADMZC

La estandarización de la prueba ELISADMZC se basó en los capítulos disponibles en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2015 disponible en línea que aportan información detallada y ejemplos que respaldan la norma de validación de la OIE publicada (OIE, 2014).

Sensibilización

Para realizar la sensibilización de la placa con el antígeno de PRRS cuantificado previamente se optó por 3 concentraciones iniciales que son 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml y 10µg/ml. Cada concentración se evaluó en una placa de 96 pozos.

El cálculo para establecer la cantidad del antígeno empleada por placa fue la siguiente:

→ Concentración a 0.1 µg/ml de Ag

$$\begin{array}{r}
 100 \text{ Pozos} \quad [] \mu\text{g} \text{ ---- } \mu\text{l} \\
 \text{X}0.1\mu\text{g de Ag} \quad 20\mu\text{g} \text{ ---- } \text{X} = \\
 \hline
 10\mu\text{g de Ag}
 \end{array}$$

→ Concentración a 1.0 µg/ml de Ag

$$\begin{array}{r}
 100 \text{ Pozos} \quad [] \mu\text{g} \text{ --- } \mu\text{l} \\
 \text{X}1.0\mu\text{g de Ag} \quad 200\mu\text{g} \text{ --- } \text{X} = \\
 \hline
 100\mu\text{g de Ag}
 \end{array}$$

→ Concentración a 10µg/ml de Ag

$$\begin{array}{r}
 100 \text{ Pozos} \quad [] \mu\text{g} \text{ ----}\mu \\
 \text{X}10.0\mu\text{g de Ag} \quad 2000\mu\text{g} \text{ ----}\text{X} = \\
 \hline
 1000\mu\text{g de Ag}
 \end{array}$$

La dilución del antígeno en cada placa se realizó considerando un volumen final por pozo de 100µl con Buffer de carbonatos (Anexo 1) y para calcular se utilizó la siguiente operación:

100µl de Buffer de carbonatos x 100 pozos = 10,000µl de Buffer esto es igual a 10 ml para cada placa.

El buffer de carbonatos se tomó con una pipeta y se transfirió a un tubo falcón de 50 ml, posteriormente se tomó el volumen de antígeno requerido de acuerdo al apartado anterior y se agregó en el tubo falcón. Se agitó vigorosamente la solución

y se transfirió a un reservorio, con la finalidad de poder tomar 100µl de la solución y colocarla en cada uno de los 96 pozos con la ayuda de una pipeta multicanal.

Las placas se cubrieron con envoltura de plástico para sellar e incubar durante la noche a 4°C, la envoltura de plástico es más fácil de usar y funciona bien (Coligan, J., et al. 1996).

Lavado de Placas

Para el lavado de las placas se empleó un lavador de placas de 96 pozos (marca BioTek®), que se utilizó durante toda la estandarización de la prueba. Se realizan 3 lavados con una solución de lavado PBS-Tween 20 al 0.3% entre cada paso de la prueba (Anexo 1). Después de ser lavadas se agitan suavemente boca abajo sobre una toalla de papel para quitar el residuo de la solución de lavado (Coligan, J., et al. 1996).

Bloqueo

Una vez lavada la placa, se procedió a bloquear la placa, esto con la intención de evitar la unión inespecífica en los espacios del pocillo donde no se unió el antígeno llamado “unión residual”, para lo cual se empleó una solución amortiguadora de Fosfatos/ Albumina Sérica Bovina (PBS-BSA 1 %, VER ANEXO

1), colocado con 100µl de la solución en cada uno de los 96 pozos. Se cubrieron nuevamente con plástico y se incubaron durante una hora a 37 °C (Coligan, J., et al. 1996).

Posterior a este pasó, se lavaron nuevamente las placas como anteriormente se mencionó.

Dilución de muestras

Para determinar la concentración adecuada del anticuerpo primario (muestras con anticuerpos) se realizaron 3 diferentes diluciones (1/100, 1/50 y 1/20) de los controles positivos y negativos.

Se añadieron los µl según correspondía de muestras de suero diluido en tampón de bloqueo PBS-BSA 1% a cada uno de los pocillos recubiertos en cantidades de 100µl.

Como cada dilución se ocupó para cada una de las placas por duplicado, las cantidades requeridas de cada dilución fueron las siguientes:

MUESTRA	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN POR PLACA	EXCEDENTE POR MUESTRA	TOTAL
Muestra	Placa con 0.1µg Placa con 1.0µg Placa con 10.0µg	200 µl 200µl= 600µl 200 µl	200 µl	800µl/100= 8µl Ag 792µl PBS-BSA
Muestra	Placa con 0.1µg Placa con 1.0µg Placa con 10.0µg	200 µl 200µl= 600µl 200 µl	200 µl	800µl/50= 16µl Ag 784µl PBS-BSA
Muestra	Placa con 0.1µg Placa con 1.0µg Placa con 10.0µg	200 µl 200µl= 600µl 200 µl	200 µl	800/20= 40µl Ag 760µl PBS-BSA

Una vez colocado el suero en las placas, se volvieron a envolver en plástico, y se incubaron 1 hora a 37°C.

Para colocar los sueros, se emplearon diferentes puntas, evitando la formación de burbujas. (Coligan, J., et al. 1996).

Dilución de Conjugado

En este ensayo de ELISA el objetivo es detectar la mayor cantidad de los anticuerpos que se unen al antígeno (Coligan, J., et al. 1996).

Después de realizar el lavado de las placas, se colocó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. El anticuerpo seleccionado está dirigido a IgG totales de cerdo (Serotec) y se realizaron diluciones seriadas a partir de la recomendada por el fabricante (1/10,000). El conjugado se preparó utilizando diluciones dobles seriadas a partir de la concentración recomendada: 1/10,000, 1/20,000, 1/40,00, 1/80,000 y 1/160,000, y se colocaron 100µl del conjugado diluido en PBS-BSA 1% (Anexo 1) por cada pozo.

DILUCIÓN	VOLUMEN FINAL EN POZO	PBS-BSA 1%	OPERACIÓN	TOTAL
1/10,000	100µl	10 ml	10,000/10,000	1µl
1/20,000			10,000/20,000	0.5µl
1/40,000			10,000/40,000	0.25µl
1/80,000			10,000/80,000	0.125µl
1/160,000			10,000/160,000	0.0625µl

Revelado

La prueba debe lograr una buena separación de los valores de densidad óptica (DO), representando todo el intervalo de funcionamiento de la actividad de anticuerpos. Es especialmente importante obtener una separación suficiente entre las muestras negativas y las positivas débiles. El valor de DO en el extremo inferior del intervalo de funcionamiento debe ser de 0,1 o menor para el control negativo en el ELISADMZC. Los valores de DO_{450nm} en el extremo superior del intervalo de funcionamiento no deben ser superiores a 2,0, puesto que por encima de este valor los lectores de placa empiezan a ser bastante inexactos, por tal motivo se busca un valor superior a 1,0 pero inferior a 2,0 (OIE, 2014).

Se empleó como sustrato de la peroxidasa el reactivo Tetra Methyl Benzidine (TMB, Invitrogen) con la finalidad de poder evaluar los niveles de anticuerpos en función de la absorbancia obtenida. Se siguieron cinéticas de lecturas cada 5 minutos hasta llegar a un máximo de 30 minutos. La reacción se detuvo empleando una solución de ácido sulfúrico 0.2M y se capturó la absorbancia en un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 450nm.

COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISADMZC DESARROLLADA CONTRA LOS KITS COMERCIALES

Para evaluar la sensibilidad de la prueba desarrollada en la UNAM, se emplearon muestras provenientes de diferentes estados de la República Mexicana. Del total de las muestras se emplearon 42 para el kit de HIPRA CIVTEST SUIS PRRS A/S® vs ELISADMZC, estas mismas 42 muestras para el kit de IDEXX PRRS X3® vs ELISADMZC y 81 muestras más probados con IDEXX y el ELISADMZC, esto porque las muestras fueron obtenidas de casos clínicos que llegaban en diferentes tiempos al laboratorio de Diagnóstico del DMZC que era remitidas por que se sospechaba de infección por PRRSv.

Las muestras se procesaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante y los resultados de cada prueba se determinaron como el fabricante lo especificó.

En el caso del Kit CIVTEST SUIS PRRS A/S® valores ≥ 20.0 se consideran positivo, mientras que valores debajo del valor se consideran negativos.

Para el kit IDEXX PRRS X3® valores S/P ≥ 0.4 se consideran positivos.

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE ELISADMZC CONTRA EL VIRUS DE REFERENCIA VR2332 Y PARA AISLADO DE CAMPO.

Para determinar la sensibilidad de la prueba con el virus que contiene la vacuna Ingelvac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim) se calculó la concentración de proteína total mediante el método de Lowry anteriormente descrito. Una vez determinada la concentración, se estandarizaron los mismos parámetros que para la prueba de ELISADMZC: sensibilización, dilución de las muestras, dilución del conjugado y determinación del tiempo de lectura.

Se utilizaron 360 sueros provenientes del estado de Hidalgo de 8 diferentes municipios y 12 diferentes granjas que fueron remitidos al LD de DMZC para diagnóstico de PRRS.

Como anteriormente se determinó la concentración utilizada para la sensibilización de las placas con virus, se utilizó la misma concentración para cubrir los pocillos con virus vacunal. En este caso la variante será la concentración determinada por el LOWRY para cada antígeno.

En cada placa se colocaron 40 sueros y fueron analizadas por duplicado, al dividir 360 entre 40 el resultado es de 9 placas para virus y 9 placas para vacuna.

Una vez que los cálculos se obtuvieron, la dilución de los antígenos (virus y vacuna) se realizó de igual manera utilizando con Buffer de carbonatos (Anexo 1) a un volumen final por cada pozo de 100 μ l y para calcular se utilizando la misma operación.

100 μ l de Buffer de carbonatos x 100 pozos = 10,000 μ l de Buffer esto es igual a 10 ml para cada placa por 9 placas para cada uno, entonces se tomó 90 ml de Buffer para vacuna y 90 ml de Buffer para vacuna.

Todos aquellos recipientes, placas y reservorios utilizados fueron identificados con el nombre del antígeno (virus y vacuna) con el fin de evitar confusiones.

El buffer de carbonatos se tomó con una pipeta volumétrica de 100mL y se transfirió a una botella de cultivo de 250 ml identificada según corresponda, posteriormente se tomó el volumen de antígeno de cada uno requerido de acuerdo al resultado y se agregó en la botella que correspondía. Se agitó vigorosamente la solución y se transfirió a un reservorio por cada antígeno, con la finalidad de poder tomar 100 μ l de la solución y colocarla en cada uno de los 96 pozos.

Las placas se envolvieron con plástico para sellar e incubar durante toda la noche a 4°C.

La metodología se realizó con base a lo descrito en la sección de estandarización; las placas se lavaron con un lavador de placas de 96 pozos (Elx 405 marca BioTek), realizando 3 lavados con una solución de lavado PBS-Tween 20 al 0.3% (Anexo 1) y después se envuelven en una toalla de papel grande para secarlas.

Posteriormente se hizo el bloqueo de las placas colocando 100µl de PBS-BSA 1 % (ANEXO 1), en cada uno de los 96 pozos de las placas. Se cubrieron nuevamente con plástico y se incuban durante una hora a 37 °C (Coligan, J., et al. 1996).

Posterior a este paso, se lavaron nuevamente las placas como anteriormente se mencionó.

Para la dilución de las muestras obtenidas de Hidalgo, la cantidad de muestra a utilizar se determinó con base al número de placas y considerando un duplicado con una dilución 1/100.

Se utilizaron como controles dos positivos con DO arriba de 0.800 y 5 negativos que no superaran D.O .250-300. Estos controles fueron colocados en los carriles A y B y se calculó el total necesario para las 18 placas.

Trascurrido el tiempo se lavaron las placas para colocar el conjugado utilizando la dilución que se estableció anteriormente. Se calculó la cantidad necesaria para las 18 placas y se colocó 100µl en cada pozo en todas las placas.

Se envolvieron en plástico y se colocaron dentro de la incubadora a 37 °C por una hora.

Se realizó un último lavado y se colocó 100µl del substrato TMB e inmediatamente después se colocan dentro de un cuarto oscuro y trascurrido el tiempo necesario para la lectura se detuvo la reacción con 50µl de Ácido Sulfúrico 0.2M (H₂SO₄). El tiempo de lectura para el ELISA de virus es de 12 min y para la vacuna se estableció de 23 min donde se apreciaba la DO de los blancos en un valor no

superior a 0.100. cinco minutos después de parar la reacción se leyeron las placas a 450 nm en el lector de placas.

RESULTADOS

Virus

Diagnóstico serológico

Kit	Resultado
CIVTEST SUIS PRRSS A/S	Negativo
IDEXX PRRS X3®.	Negativo

Diagnóstico molecular: El PCR de las muestras se consideraron positivas cuando se observó una banda de alrededor 600 pb., indicando la presencia del virus (figura 8)

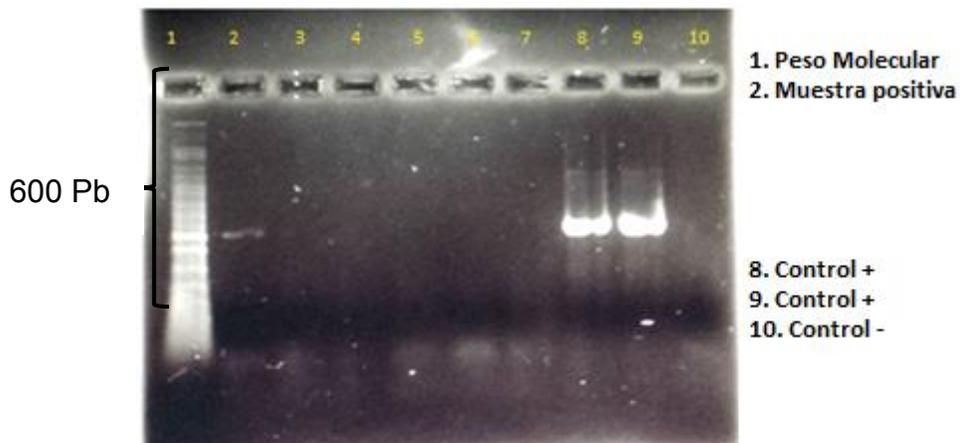


Figura 8: RT-PCR Positivo

Cuantificación de proteína

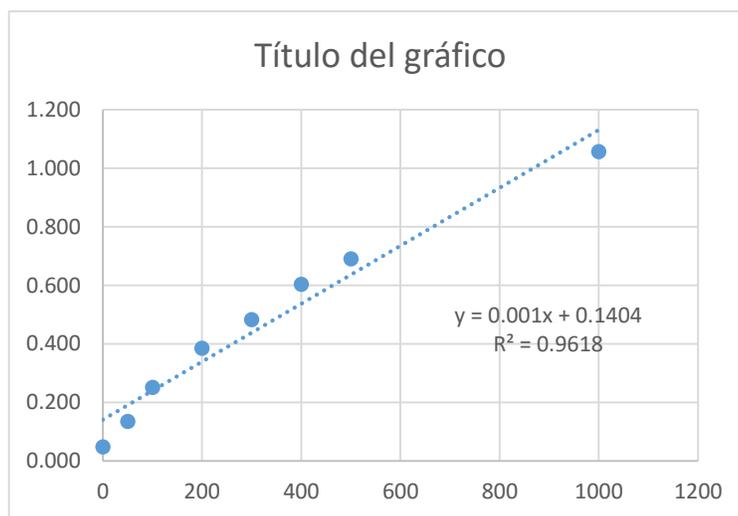
Para determinar la cantidad de proteína presente en el aislamiento viral se realizó la prueba de Lowry.

LOWRY

El aislamiento viral se ocupó durante todo el desarrollo de la ELISA como antígeno de recubrimiento de la placa, por tal motivo fue necesario conocer la cantidad de proteína presente. La figura 9 muestra la densidad óptica obtenida así como la regresión lineal obtenida de graficar la DO en función de la concentración de la curva, la cual permite interpolar los valores de concentración de proteína presente en el aislamiento. Se consideró para la determinación de proteína la dilución 1/10 con una concentración de 5.8 mg/ml, ya que el valor de DO obtenido se encontraba en la parte media de la curva.

	9	10	11	12	
A	0.047	0.048	1.155	1.177	630
B	0.133	0.137	0.708	0.741	630
C	0.246	0.255	0.458	0.466	630
D	0.376	0.393			
E	0.472	0.492			
F	0.591	0.616			
G	0.679	0.702			
H	1.017	1.096			

		DO [ug/ml]	
0.047	0.048	0.048	0
0.133	0.137	0.135	50
0.246	0.255	0.251	100
0.376	0.393	0.385	200
0.472	0.492	0.482	300
0.591	0.616	0.604	400
0.679	0.702	0.691	500
1.017	1.096	1.057	1000



	DO [ug/ml]	*dil	[mg/ml]
1:5	1.155 1.177	1.17	1025.6 5128.0 5.128
1:10	0.708 0.741	0.72	584.1 5841.0 5.841
1:20	0.458 0.466	0.46	321.6 6432.0 6.432

Figura 9: Determinación de proteína total por el método de Lowry.

GENERACIÓN DE CONTROLES

Controles negativos

Los sueros que se emplearon como controles negativos de la prueba provenían de cerdos que no estuvieron en contacto con el PRRSV, son muestras con diagnóstico serológico negativo contra la infección y además evaluados por RT-PCR.

Se emplearon los kits IDEXX PRRS X3® e HIPRA y los resultados obtenidos fueron negativos para ambos kits. Para el diagnóstico molecular por PCR resultado fue negativo.

Estas muestras que fueron confirmadas como negativas se guardaron en microtubos identificados con el número de cerdo según correspondía entre de 7 a 8 microtubos de cada animal; se mantuvieron en congelación, a -70 °C para evitar la degradación del suero; se descongelaba una alícuota para utilizarla en el ensayo. Una vez descongelada se volvía a congelar (OIE, 2013).

Controles positivos

Los sueros obtenidos de los cinco cerdos para generar controles positivos en los días 7, 14 y 21 después de la primera inoculación fueron sometidos a RT-PCR

como anteriormente se mencionó y la serología por IDEXX e HIPRA. Los resultados obtenidos se ejemplifican en la siguiente tabla.

PRUEBA	SANGRADO 7	SANGRADO 14	SANGRADO 21
RT-PCR	-	-	+
IDEXX	-	-	-
HIPRA	+	+	+

Los sueros del sangrado 7 y 14 resultaron positivos a serología por el kit de HIPRA, por tal motivo se resguardaron para ser utilizados como controles positivos. Los sueros del sangrado 21 fueron desechados ya que, eran positivos a RT-PCR indicando que había virus en la muestra.

Como en el caso de los controles negativos, los controles positivos del sangrado 7 y 14 fueron resguardados de la misma manera para ser utilizados en los ensayos.

ESTANDARIZACIÓN DE LA ELISADMZC

La estandarización de la prueba de ELISA se realizó siguiendo las especificaciones de la OIE descritas en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2015. Las muestras que se utilizaron como control positivo, contienen anticuerpos específicos en contra de la infección de PRRSV y los controles negativos utilizados están libres de anticuerpos contra

la infección, es decir, nunca estuvieron en contacto con el virus. Estas muestras fueron utilizadas durante toda la estandarización del ensayo y una vez, estandarizado, han sido ocupados como controles de prueba.

Después de ser probadas las diferentes diluciones del antígeno se eligió la concentración más adecuada que estuviera dentro de los rangos deseados, donde la DO no estuviera superior a lo que la bibliografía señala y que tuviera un buen rendimiento. Esto fue establecido observando la respuesta de los “Blancos” y de los controles tanto positivos como negativos.

En el caso del ensayo se utilizó Solución Amortiguadora de Fosfatos-Albumina Sérica Bovina (PBS-BSA 1 %) para la fase de bloqueo, que tiene un buen comportamiento en el ensayo y evita la unión residual.

Para determinar la concentración adecuada del anticuerpo primario (muestras con anticuerpos) se realizaron 3 diferentes diluciones: 1/100, 1/50 y 1/20 de los controles positivos y negativos. Una vez obtenido los resultados de cada dilución se repitió las veces necesarias en diferentes días hasta obtener el resultado deseado y que tuviera una respuesta adecuada y similar entre los diferentes ensayos. La dilución elegida fue aquella que daba más valores repetibles además de que cumplía con el objetivo de la prueba y se encontraba dentro de lo que señala la OIE para el Desarrollo y optimización de las pruebas de detección de anticuerpos.

En la siguiente fase del ensayo que corresponde al conjugado, se realizaron 15 ensayos hasta encontrar la dilución adecuada, esta dilución queda en un rango de 1/60,000 a 1/120,000.

Para revelar la unión del conjugado con los anticuerpos, se añadió la solución de sustrato de la peroxidasa el reactivo Tetra Methyl Benzidine (TMB, Invitrogen).

La hidrólisis se detuvo con 50µl de Ácido Sulfúrico 0.2M (H₂SO₄) en cada pocillo. Visualmente, la hidrólisis se detectó mediante la aparición de un color amarillo a una longitud de onda de 450nm (Coligan, J., et al. 1996). En el ensayo se siguieron cinéticas de lecturas cada 5 minutos hasta llegar a un máximo de 30 minutos, en cada ensayo que se realizó se monitorearon los tiempos y se observó en que tiempo la densidad óptica (DO) a 450nm era la más adecuada con lo antes mencionado, hasta establecer el tiempo de lectura en 12 min.

Para determinar si una muestra es positiva o negativa, se estableció un punto de corte donde la DO no debía sobrepasar 0.3 en cada uno de ellos. Una vez obtenido las densidades de los cinco controles negativos se obtuvo el promedio y se sumó tres desviaciones estándar, así, se establece el punto de corte para cada placa que se trabajó, donde aquellos valores ≥ 0.700 se consideran positivos y los que se encuentren por debajo del punto de corte serán negativos. La figura 10 muestra en color azul los “blancos” en duplicado. El color amarillo muestra los controles positivos 1 y 2 con su duplicado y el color rojo muestra los controles negativos del 1 al 5 con sus duplicados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.047	0.049	0.078	0.075	0.062	0.064	0.122	0.113	0.088	0.090	0.066	0.076
B	0.506	0.499	0.159	0.156	0.224	0.223	0.048	0.046	0.124	0.117	0.257	0.275
C	0.427	0.433	0.171	0.173	0.270	0.256	0.070	0.067	0.061	0.062	0.056	0.057
D	0.111	0.112	0.058	0.056	0.064	0.066	0.097	0.084	0.203	0.207	0.062	0.064
E	0.051	0.066	0.073	0.071	0.086	0.086	0.066	0.067	0.084	0.096	0.061	0.068
F	0.067	0.069	0.059	0.076	0.058	0.060	0.167	0.165	0.081	0.081	0.073	0.079
G	0.068	0.066	0.132	0.132	0.084	0.080	0.116	0.128	0.097	0.103	0.077	0.082
H	0.096	0.090	0.077	0.065	0.267	0.265	0.077	0.071	0.145	0.143	0.212	0.220

Figura 10: Densidades ópticas obtenidas en un ensayo de ELISADMZC.

En la tabla 3 se muestra la repetibilidad intra-ensayos de los cinco controles negativos llamados estándar (Std) y dos controles positivos (Ctrl) en diez diferentes ensayos para poder observar el nivel de concordancia entre los resultados de réplicas de una muestra entre distintos ensayos. Se muestra el promedio (**X**) de cada control, así como, su Desviación Estándar (**DS**) que nos indica que tanta variación existe en el mismo control pero diferentes ensayos y el coeficiente de variación (**CV**) que se obtiene de dividir la DS entre el X y que indica que tanta homogeneidad tienen cada control en los diferentes ensayos, a menor CV mayor homogeneidad en los valores de los controles. Los coeficientes de variación para cada muestra se encuentran por debajo del 30% determinado para las muestras de diagnóstico por la OIE.

	Ens 1	Ens 2	Ens 3	Ens 4	Ens 5	Ens 6	Ens 7	Ens 8	Ens 9	Ens 10	Prom	D.S	CV
Controles negativos													
Std 1	0.083	0.083	0.073	0.079	0.095	0.083	0.062	0.065	0.078	0.095	0.080	0.0109	13.7517
Std 2	0.061	0.061	0.055	0.045	0.053	0.062	0.063	0.055	0.061	0.068	0.058	0.0065	11.1030
Std 3	0.098	0.098	0.104	0.084	0.094	0.111	0.095	0.092	0.104	0.116	0.100	0.0094	9.4446
Std 4	0.085	0.085	0.070	0.076	0.079	0.080	0.100	0.070	0.107	0.084	0.084	0.0119	14.2786
Std 5	0.065	0.065	0.068	0.060	0.062	0.076	0.08	0.055	0.066	0.074	0.067	0.0077	11.4030
Controles positivos													
Ctrl 1	1.248	1.325	1.071	1.477	1.18	1.368	1.336	1.174	1.359	1.478	1.3016	0.1327	10.1936
Ctrl 2	1.174	1.293	1.195	1.31	1.026	1.244	1.152	1.251	1.179	1.454	1.2278	0.1134	9.2384

Std. Estándar; Ctrl. Control; X. Promedio; D.S. Desviación Estándar; C.V. Coeficiente de Variación

Tabla 3: Repetibilidad inter-ensayos entre los controles negativos utilizados para determinar el punto de corte negativo-positivo y los Controles positivos utilizados como control de ensayo.

EVALUACIÓN DE LA ELISADMZC VS KITS COMERCIALES

Para evaluar la sensibilidad de la prueba ELISADMZC, se compararon 123 muestras por IDEXX PRRS X3® y ELISADMZC y 42 sueros por HIPRA y ELISADMZC. Los resultados se obtuvieron por DO y según especifica el fabricante se determina si son positivos o negativos.

IDEXX VS ELISADMZC			
NUMERO DE MUESTRAS PROCESADAS 123			
RESULTADO	IDEXX	ELISADMZC	AMBAS
POSITIVO	12	103	6
NEGATIVO	111	20	13

Tabla 4: Resultados obtenidos de la comparación del Kit IDEXX en comparación con la ELISADMZC.

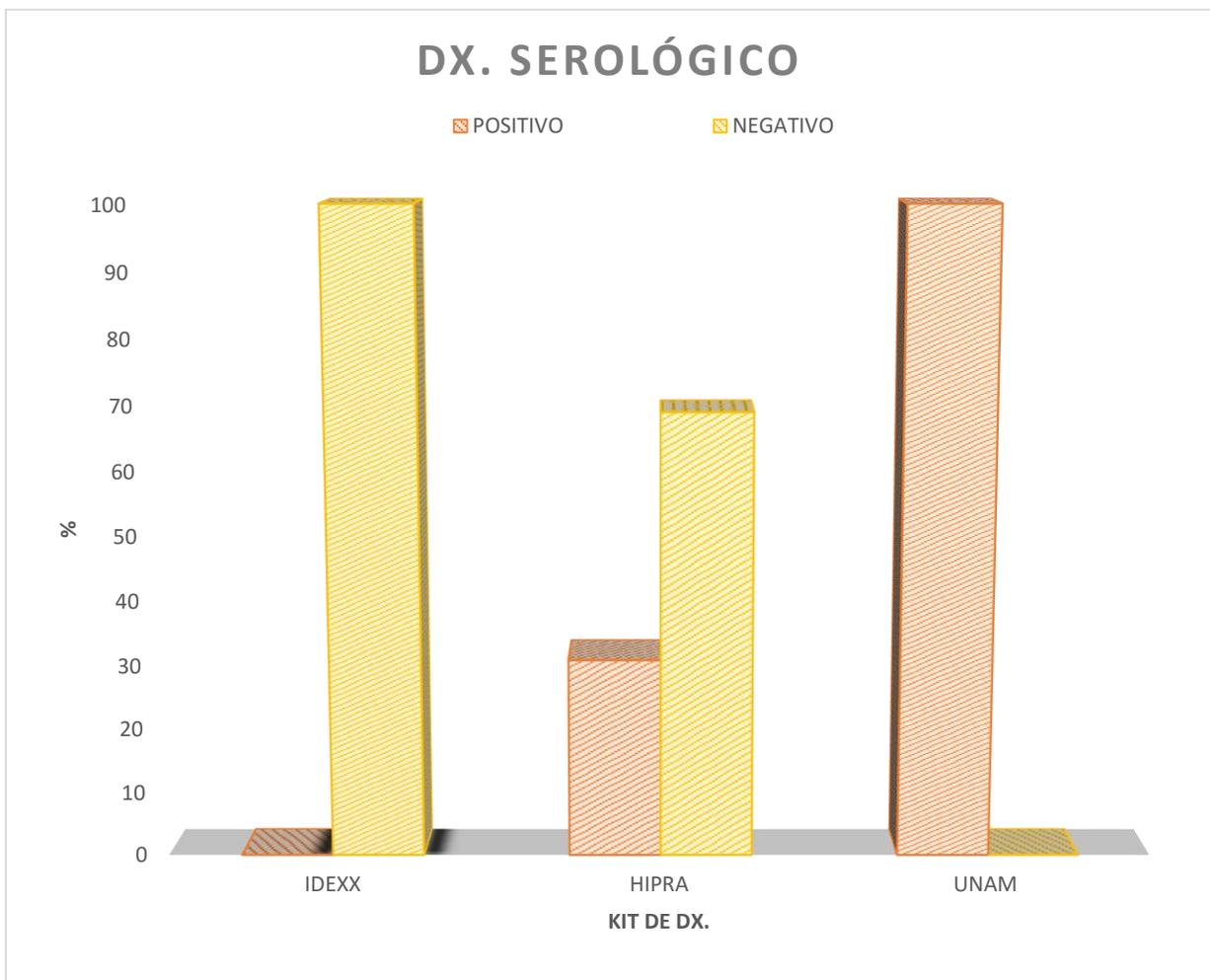
En la tabla 4 se observa que el total de las 123 muestras el ELISADMZC detectó como positivos a PRRS el 83.73% (103 de 123 muestras) y el 16.26 % (20 de 123 muestras) como negativo a una infección. Mientras que solo 9.75% (12 de 123 muestras) son positivas a PRRS por la prueba de IDEXX PRRS X3® y el 90.24% (111 de 123 muestras) lo detecta como negativo a PRRS. El kit comercial detectó como negativas 97 muestras de las 103 que fueron positivas al ELISADMZC, esto indica que 94.17% de las muestras no las detecta el kit comercial y 6 muestras de las 20 que el ELISADMZC detectó como negativas resultaron como positivas al kit IDEXX PRRS X3®.

En la comparación con el kit HIPRA de las 42 muestras el ELISADMZC detectó 97.61% (41 de 42 muestras) de positivos para PRRS y solo 2.38% (1 de 42 muestras) como negativos. Mientras que el kit de HIPRA detectó 30.95% de positivos para PRRS (13 de 42 muestras) y 69.5% de negativos a PRRS (29 de 42 muestras) como se muestra en la tabla 5. El kit comercial detectó como negativas 28 de las 41 muestras que detectó como positivas el ELISADMZC, esto indica que 68.3% de las muestras no son detectadas por el kit comercial y la muestra que fue negativa para el nuevo ensayo también resultó negativa para el kit pero las 13 muestras detectadas como positivas por el kit CIVTEST SUIS PRRS A/S® también fueron positivas para el nuevo ensayo (100%). 13 de las muestras fueron positivas y solo una negativa para ambas pruebas.

HIPRA VS ELISADMZC			
NUMERO DE MUESTRAS PROCESADAS 42			
RESULTADO	HIPRA	ELISADMZC	AMBAS
POSITIVO	13	41	13
NEGATIVO	29	1	1

Tabla 5: Resultados obtenidos de la comparación del Kit de HIPRA en comparación con la ELISADMZC.

Las 42 muestras que fueron analizadas por HIPRA, están dentro de las 123 muestras analizadas por IDEXX, y estas a su vez por la ELISADMZC. La comparación de los resultados (Grafica 1) muestran que el kit de HIPRA detectó una positividad del 31% (13 de 42 muestras), mientras que IDEXX no detectó ninguna como positiva (0 de 42 muestras) y la ELISADMZC detectó el 98% como positivos (41 de 42 muestras).



Grafica 1: Resultados de 42 muestras sometidas a los 3 diferentes Kits.

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE ELISADMZC CONTRA EL VIRUS DE REFERENCIA VR2332

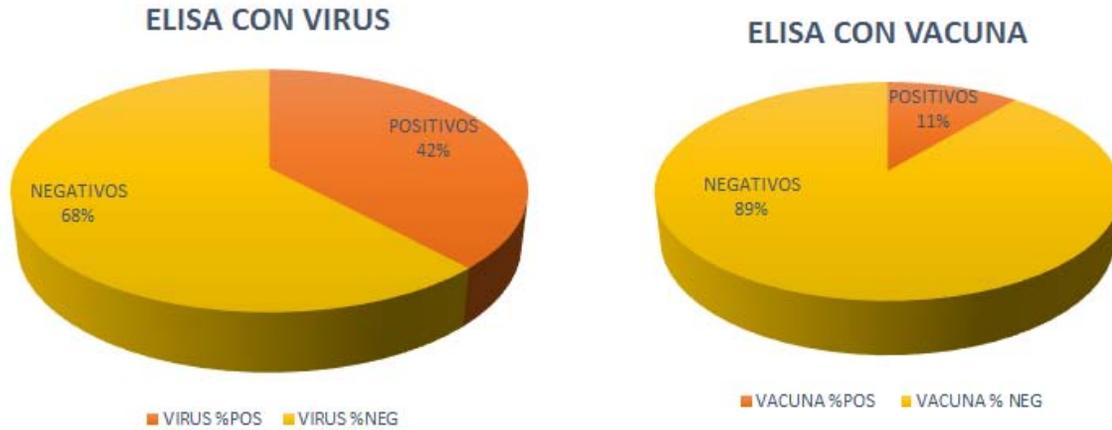
Con los resultados que se obtuvieron por la DO se estableció el punto de corte con el promedio de los controles negativos más 3 desviaciones estándar para cada placa tanto en vacuna como en virus.

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Nº DE GRANJA	Nº de muestras	PRRSTIPOII, EDOMEX, DMZC, 2011		VACUNA	
		%POS	%NEG	%POS	%NEG
1	30	40%	60%	63%	37.00%
2	30	10%	90%	0%	100.00%
3	30	33%	67%	0%	100.00%
4	30	70%	30%	17%	83.00%
5	30	30%	70%	3%	97.00%
6	30	20%	80%	0%	100.00%
7	30	33%	67%	7%	93.00%
8	30	10%	90%	0%	100.00%
9	30	73%	27%	23%	77.00%
10	30	96%	4%	3%	97.00%
11	30	40%	60%	3%	97.00%
12	30	50%	50%	10%	90.00%

Tabla 6: Porcentaje de positivos y negativos en ensayo de ELISA virus vs vacuna.

El total de muestras positivas del Estado de Hidalgo en la ELISA donde se utilizó el virus fue de 42.22%, (152 de 360 muestras) mientras que el total de positivos para el ELISA donde se utilizó la vacuna fue de 10.83% (39 de 360 muestras) (Grafica 2)



Grafica 2: Porcentaje de positivos y negativos con ambas ELISAS

De las 360 muestras, solo 27 resultaron positivas y 195 muestras fueron negativas para las dos ELISAS.

Los resultados nos muestran que la ELISA desarrollada es capaz de detectar anticuerpos dirigidos contra la cepa de referencia VR-2332 y que además es capaz de detectar anticuerpos dirigidos a una nueva variante de PRRS.

DISCUSIÓN

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, pertenece a la familia *Arteviridae* y se caracteriza por su alta variabilidad genética y antigénica. El genoma de PRRS tiene una tasa de mutación de 10^{-2} /sitio / año (Butler et al, 2014). Diversos estudios en el mundo se han realizado para identificar la variabilidad que tiene el virus de PRRS, pero poco se sabe acerca de la existencia de nuevas cepas circulantes en México, que es el séptimo productor de carne de cerdo a nivel mundial y el tercero a nivel Latinoamérica (FAO) y que tiene una fuerte repercusión económica para los porcicultores nacionales.

En México los estudios realizados sobre variaciones del virus, muestran que existe una variación en sus principales proteínas de envoltura, Macías y colaboradores (2006) presentan por primera vez el aislamiento y caracterización del gen ORF 5 del virus de PRRS en México. En los resultados obtienen que las mutaciones del virus de PRRS aislados en México se encuentra en el ectdominio conservado de la proteína GP5 que está sujeto a la recombinación genética y bajo una intensa presión inmunológica para evadir la respuesta inmune del huésped. Esto supone que los cambios en las regiones potencialmente inmunogénica alterarían el reconocimiento de anticuerpos frente a virus heterólogos. (Murtaugh, M., et al, 2010). En particular en el ORF 5 se ha evaluado una tasa de mutación de hasta 9.6×10^{-3} sustitución/sitio/año (Shi et al, 2010).

Sotomayor (2014) en sus estudios de variación antigénica de cinco aislados y la cepa de referencia VR2332, muestra que la cepa de referencia no presenta relación antigénica completa con ninguna de las cepas de campo estudiadas. Además, Sotomayor señala que el análisis de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de GP5 y ORF7 reveló la prevalencia de dos subgenotipos o cepas presentes en México.

Galiote y colaboradores (2015), en un trabajo de investigación presentan un análisis genético del gen ORF5 en doce cepas de campo aisladas de México de 2009 a 2015 y se comparan con la cepa de referencia VR-2332, cepa vacunal (MLV) y la cepa Lelystad. Encontraron que tres cepas aislada del 2015 no tienen relación genética con el resto de la cepas, su similitud es del 85% con el resto, esto indica que han evolucionado de manera diferente al resto. Galiote concluye que las cepas analizadas pertenecen al genotipo Norteamericano con porcentaje de similitud entre 84.7% a 91.4%, pero a nivel nucleótidos se identificaron dos grupos concordando con la información de Sotomayor, además del grupo de la cepa de referencia. Con esta información concluyen que existen circulando nuevas cepas que han evolucionado genéticamente y presentan mutaciones en los aminoácidos. En el estudio se muestra que la cepa vacunal que utilizaron pertenece al mismo "cluster" de la cepa de referencia VR-2332 indicando que es la cepa utilizada en la vacuna y es la misma vacuna que se utilizó como antígeno para realizar la comparación con la ELISADMZC.

También hay amplia evidencia de que dos o más cepas de PRRSV pueden infectar un cerdo individuo. La combinación de la cría con la mutación genética y la

recombinación entre las diferentes cepas virales ha hecho que el estudio de la evolución de PRRSV sea un desafío (Butler et al., 2014).

Existen muchas pruebas diagnósticas disponibles en el mercado en México y el mundo para diagnóstico de PRRS, ejemplo de esto, es el Laboratorio de Diagnóstico del DMZC, que dispone de una variedad de pruebas tanto moleculares como serológicas para el diagnóstico de PRRS (aislamiento viral, ELISA con kit comercial y PCR). Los precios son variables y dependen del tipo de prueba.

Las técnicas moleculares como la RT-PCR están diseñadas para detectar cantidades ínfimas del material genético. Cuentan con parámetros muy altos para especificidad, sensibilidad y rapidez que hacen de esta prueba diagnóstica una invaluable herramienta de diagnóstico y control de la enfermedad. Su uso queda restringido casi por completo a determinar si el virus de PRRS está presente en la explotación y en cuestiones de comprobación de piaras libres de la enfermedad o situaciones relacionadas (compras de reemplazos y sementales libres de la enfermedad) pero por ser una prueba molecular el precio es alto (*Boehringer Ingelheim*).

La necesidad de desarrollar una prueba serológica, surge de la problemática que actualmente se tiene con la enfermedad, aquellas pruebas que tiene como antígeno la cepa de referencia VR-2332 limitan el diagnóstico o dan resultados falsos negativos, generando pérdidas económicas. Estudios de desafío

heterólogos indican que la inmunidad a una cepa no confiere inmunidad a todas las cepas. En hatos convencionales, la persistencia podría ser debido a la re-infección con variantes diferentes para el que los cerdos están ausentes de protección (Butler et al., 2014).

Las técnicas serológicas demuestran la exposición previa al virus así como su circulación en la granja, por lo que son una herramienta fundamental para elaborar las estrategias de control. La prueba de ELISA es comúnmente la más utilizada para detección de anticuerpos de PRRS debido a su sensibilidad, especificidad, velocidad y reproducibilidad. Una característica de las pruebas de detección de anticuerpos es su capacidad de procesar gran cantidad de muestras en un corto periodo de tiempo, además del bajo costo que representa el procesar una sola muestra en comparación con otros métodos diagnóstico. Esto genera una ventaja sobre los demás métodos para la detección de anticuerpos, y por lo anterior, son de utilidad para realizar estudios epidemiológicos del país sobre detección de anticuerpos específicos a nuevas cepas del virus. Actualmente existen para México dos kits disponibles en el mercado (*Boehringer Ingelheim*), El ELISA comercial más utilizado es HerdChek® X3 PRRS ELISA, IDEXX Laboratories, Westbrook que se considera el estándar de referencia para la detección de anticuerpos contra PRRSV. Es un ELISA indirecto que utiliza la proteína N como el antígeno de recubrimiento en la placa tanto en cepa América y cepa europea. La proteína N es la proteína viral más abundante y es altamente inmunogénica además de que induce una respuesta de anticuerpos en los cerdos (Scott, J. 2013).

El nuevo ensayo demostró ser capaz de detectar mayor número de muestras con anticuerpos dirigidos hacia PRRSV. En la comparación que se realiza de los tres kits con 42 sueros, los resultados demostraron que la sensibilidad es mayor para el ensayo de ELISADMZC, el Kit de HIPRA solo detectó el 31% como muestras positivas que equivale al 13 muestras de las 42 sometidas, 100% de las muestras que detectó el kit de HIPRA como positivas también lo fueron para la prueba desarrollada. En el caso del kit de IDEXX no detectó ninguno como positivo y el 100% se determinaron negativas. La ELISADMZC fue capaz de detectar un 98% de positividad que equivale a 41 muestras positivas de las 42 sometidas a la prueba, en el caso de la muestra que resulto ser negativa para el ensayo de ELISADMZC, también lo fue para los dos kit comerciales. Con estos resultados se evaluó la sensibilidad de la prueba demostrando que es mayor en comparación con los kits disponibles en el mercado; que se puede especular que utilizan como antígeno de placa la cepa de referencia VR-2332 limitando el diagnóstico de PRRS.

Toiber Estrella (2014), en un estudio comparativo reciente de los sistemas de ELISA comerciales realizado dentro de la misma institución para su tesis de maestría, emplea tres ensayos diferentes de ELISA para 622 sueros, estos son IDEXX, HIPRA y ELISA UNAM que utiliza un ORF-7 recombinante. Obtuvo como resultado, que HIPRA reconoció solo el 48% de las muestras como positivas y que IDEXX encontró como positivas tan solo el 37%. El 39% de las muestras fue negativo para las ELISAS comerciales, pero no para el ELISA UNAM. Este estudio, respalda el trabajo realizado y comprueba que existen nuevas variantes

de PRRS que no pueden ser detectadas por los Kits comerciales, siendo IDEXX el más utilizado comercialmente (Scott, J. 2013), generando falsos negativos y pérdidas económicas.

La utilización y empleo del ELISA DMZC que utiliza virus completo ayudara en gran medida a un diagnóstico serológico más eficiente y al control de PRRS.

En el ELISA realizado con antígeno vacunal, aquellos resultados que son dobles positivos, tanto para el ELISADMZC como para la ELISA vacunal, podemos determinar que existe antigenicidad cruzada con la cepa de referencia (VR-2332), se puede asumir que la cepa de campo tiene estructuras que comparte con el virión de la cepa de referencia. Característica que permite que el ensayo desarrollado sea capaz de detectar anticuerpos contra la cepa de referencia y la de campo. Para determinar si los anticuerpos detectados son vacúnales o de campo, se necesita realizar pruebas de diferenciación de anticuerpos.

PRRS es una enfermedad devastadora con consecuencias económicas significativas para los productores de cerdos, es importante seguir estudiando el virus para poder controlar la enfermedad, además de realizar estudios a nivel nacional para saber la situación epidemiológica del país. Como menciona López-Heydeck y colaboradores es importante profundizar en la investigación y vigilancia, iniciando con el diagnóstico de nueva cepas del virus, la secuenciación de los virus, así como de elaboración de vacunas efectivas a cepas nuevas.

CONCLUSIONES

1. Se logró realizar el aislamiento y replicación de una nueva cepa de campo de PRRSV a partir de un caso clínico.
2. Se logró replicar el aislado de virus en cerdos experimentalmente.
3. Se generaron controles positivos y negativos que sirven como controles en el ensayo.
4. Se desarrolló un ensayo de ELISA con un aislado de campo.
5. El ensayo es capaz de detectar anticuerpos específicos contra PRRSV
6. Se probó que la sensibilidad del ensayo es mayor a la de los kit comerciales.
7. Existe antigenicidad cruzada entre la cepa de referencia y el cepa de campo

ANEXO

SOLUCION A:

- 25ml de agua milliQ
- 2.5ml NaOH
- 0.5gr Na₂CO₃
- Quitar 500 µl de la solución y agregar 250 µl tartrato de sodio y 250 µl sulfato de Cu

SOLUCIÓN B:

- Es en una proporción 1.1
- Folin
- Agua milliQ

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS 1x)

- 100ml PBS al 10x
- 900ml agua bidestilada
- Llevarlo a un Ph 7.2-7.4

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS/ ALBUMINA SERICA BOVINA
(PBS-BSA 1 %)

- 1L de PBS al 1x
- 10gr (1%) de Albumina Sérica Bovina (BSA)
- Filtrar y mantener a 4 °C

PBS Tween .3%

- 1L PBS al 1x
- 3ml de Tween 20^R

BOFER DE CARBONATOS

- 1L de agua milliQ
- 3.8gr de NaHCO₃
- 1.92gr Na₂CO₃
- Llevar a Ph 9.6
- Filtrar y guardar a 4 °C

REFERENCIAS

1. Zimmerman JJ, Benfield D.A, Dee, SA, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenso GW, et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). Zimmerman JJ, Benfield D.A, Dee, SA, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenso GW, EDITORS. Diseases of Swine. John Wiley and Sons, Inc, 2012: 461-486
2. Goyal, S.M. (1993). Porcine reproductive and respiratory síndrome; review article. J Vet Diagn Invest 5:656:664.
3. Christianson, W. T. y Joo, Han Soo (1994). Porcine reproductive and respiratory síndrome: A review. Swine Health and prod. 2(2) 10-28
4. Zimmerman, J. Chapter one: Historical Overview of PRRS Virus. De: Kyoung-Jin, Y, Neumann, E. editors. 2003 PRRS Compendium Producer Edition. Iowa: National Pork Board. 2003: 3-7
5. Hurd HS, Bush EJ, Losinger W, Corso B, Zimmerman JJ, Wills R, et al. (2001) Outbreaks of porcine reproductive failure: Report on a collaborative field investigation. J Swine Health Prod. 9(3) 103-108.

6. OIE (Office International des Épizooties). 1992. World Animal Health 1991. Volume VII. Number 2. Animal Health Status and Disease Control Methods (Part One: Reports), p. 126.
7. Morilla, A., Yoon, K-J., Zimmerman, J.J. (2004) Enfermedades Víricas emergentes del cerdo. Barcelona, España: Multimédica Ediciones Veterinarias.
8. Milián, S.F., Cantó, A.G., Weimersheimer, R.J., Coba, A.M., Anaya, E.A., Correa, G.P. (1994). Estudio seroepidemiológico para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus del Síndrome Disgénico del Cerdo en México. Tec. Pecu. Mex. (32) 3. 139-144.
9. Heydeck, ML., Morales, AA., Zerón, MH. y Chagoyán, VC. (2015) Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. Rev. Méx. Cienc. Pecu. 6(1). 69-89.
10. Petry, M., Paarlberg, PL. y Lee JG. (1999) PRRS and the North American Swine Trade: A Trade Barrier Analysis. Journal of Agricultura and Applied Economics. 31(3). 245-436.

11. Holck, JT y Polson DD. Chapter six: The Financial Impact of PRRS Virus. De: Kyoung-Jin, Y, Neumann, E. editors. 2003 PRRS Compendium Producer Edition. Iowa: National Pork Board. 2003: 46-54

12. Martín Del Campo, AH. Impacto económico de la enfermedad de PRRS en granjas porcinas. . Memorias del Simposio Internacional de PRRS: Ayer, hoy y Mañana, México 2012; 2012 octubre 1; Distrito Federal, México. Universidad Nacional Autónoma de México.

13. Rossow, K. D., Collins, J. E., Goyal, S. M., Nelson, E. A., Hennings, J. C. y Benfield, D. A. (1995). Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Gnotobiotic Pigs. *Vet. Pathol.* 32. 361-373.

14. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2008. Report of the OIE *Ad Hoc* Group on Porcine Reproductive Respiratory Syndrome. Appendices IV and V. Paris, 9 – 11 Junio 2008.

15. Meulenber, J.J.M. (2000) PRRSV, The virus. *Vet. Res.* 31. 11-21

16. Yun, S. y Lee, YM. (2013) Overview: Replication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Microbiology.*, 51(6), 711-723

17. Butler, JE., Lager, KM., Golde, W., Faaberg, KS., Sinkora, M., Loving, C., et al. (2014). Porcine reproductive and respiratory síndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunol Res.*, 59, 81-108.
18. Macías, MJ., Plascencia, GY., Osorio, F., Saavedra, AP., Leyva, JR., Hernández, J. (2006). Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México. *Vét. Méx.*, 37(2), 197-208
19. Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. *Virus Research.*, 154(1-2), 86-97.
20. Kappes, M. A. y Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, 479(480). 475-486.
21. Murtaugh, M., Stadejek, T., Abrahante, J., Lam, T. y Leung, C. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory síndrome virus. *Virus Research*. 154. 18-30
22. Iowa State University. Collage of Veterinary Medicine. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS):
<http://vetmed.iastate.edu/vdpam/new-vdpam-employees/food-supply-veterinary-medicine/swine/swine-diseases/porcine-reproductive-> [Consulta: 1 de agosto del 2015].

23. Diosdado, VF., González, VD., Moles, CL., Morillas GA. (2004) Asociación entre anticuerpos contra el virus del síndrome disgénico y respiratorio porcino y anticuerpos contra otros patógenos. *Veterinaria México*. 35(2). 148-152.
24. Sierra, N., Ramírez, R. y Mota, D. (2000) Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Arch. Med. Vet.* 32(1).
25. Heydeck, S-M, Huitrón, GG., Bernabé, SL., Vargas, ES., Torres, AC. Y C-Valdés, F. (2013). Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) en granjas porcinas tecnificadas del Estado de México. *Rev. Mex. De cienc. Pecuarias*. 4(4).
26. W. Welch, S-K. y Calvert, J. G. (2010). A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Research*. 154(1) 98-103.
27. Van Breedam, W., Delputte, P. L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., et al., (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol*. 91. 1659-1667.
28. Zhang, Q. y Yoo D. (2015). PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Veterinary Microbiology*. 177(3). 229-241.

29. Snijder, E.J., Kikkert, M. y Fang, Y. (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 94. 2141-2163.
30. Chand, R. J., Tribble, B. R. y Rowland, R. R. (2012). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory síndrome virus. *Virology.* 2(3). 256-263.
31. Taylor, D.J. *Pig Diseases*. 9ba ed. North Burniston Road: 2013
32. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2015. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. Capítulo 2.8.7. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* 2015. Mayo 2015.
33. Carvajal Velázquez, M. Antonio. 2015. Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS). *Porcicultura.com*
34. *Boehringer Ingelheim*.
http://www.bivetmedica.com.mx/content/dam/internet/ah/vetmedica/mx_ES/f/ash/prrst2.swf [consulta: 3 de agosto del 2015].

35. Sotomayor, A. (2014). Identificación de variaciones genéticas de aislados del Arterivirus porcino (PRRS) y su relación antigénica. Tesis de Maestría. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
36. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2014. Desarrollo y Optimización de las Pruebas de Detección de Anticuerpos. Directriz sobre validación 3.6.1. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2014. Mayo 2014.
37. Coligan, J., Bierer, B., Margulies, D., Shevach, E. y Strober, W. Editores (1996). Current protocols in immunology: Enzyme-linked immunosorbent assay. Medical center.
38. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2013. Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico. Sección 1.1. Capítulos introductorios. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2013. Mayo 2013.
39. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2013. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Capítulo 1.1.5. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2013. Mayo 2013.

40. Galiote, A., Lucio-de, E., Merino, E., Mendoza, MA., Martínez, D., Munguía, J., Morales, J.A. Análisis genético del gen ORF5 de virus de PRRS aislados en México desde 2009 a 2015. Memorias de Congreso XLIX AMVEC; 2015 julio-agosto 29-01; León (Guanajuato) México: Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. 2015.
41. Toiber, A. (2014). Análisis de la variabilidad antigénica y genética del virus de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSV) en cepas mexicanas. Tesis de Maestría. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
42. Scott, J. (2013). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Diagnostic update and search for novel modified live vaccines. Tesis de Maestría. Ames, Iowa. Iowa State University.