



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“Identificación y caracterización de variantes endémicas del virus de
PRRS en granjas porcinas de México”**

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

PRESENTA:
NANCY REBECA MARTÍNEZ BAUTISTA

Tutor principal: Dr. José Ivan Sánchez Betancourt (FMVZ-UNAM)
Comité tutor: Dra. Edda Sciotto Conde (IIB-UNAM)
Dr. Humberto Ramírez Mendoza (FMVZ-UNAM)

Ciudad Universitaria, CDMX, Marzo 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

*A SIMÓN MARTÍNEZ FONSECA,
hasta que nos volvamos a encontrar.*

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Doctorado en Ciencias de la producción y salud animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al CONACYT, Proyecto de Ciencia Básica No. 254244.

A la Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo (DEAR). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

A la Unidad de Negocios Porcinos de Zoetis, México.

A la M. en C. Jacquelynne Brenda Cervantes Torres y al Dr. René Álvaro Segura Velázquez por el apoyo técnico otorgado.

RESUMEN

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es causado por un virus de ARN que se caracteriza por su alta variabilidad genética y antigénica que genera una enfermedad de importancia económica en la industria porcina.

En este estudio se analizaron un total de 8,126 muestras de sueros de 275 granjas tecnificadas y semi-tecnificadas de 30 de los 32 estados de México, representativas de las ocho regiones del país.

Se encontraron anticuerpos anti-virus PRRS (vPRRS) contra un virus de campo aislado en mexicano en 15 a 49 por ciento de los sueros ensayados, 2.4 a 9.8 frente a la vacuna y 7.7 a 26 por ciento contra el virus de campo.

El virus vPRRS fue detectado por RT-PCR en 77 de los 1,630 pools de sueros probadas en siete de las ocho regiones geográficas en las que se dividió la República Mexicana. Se determinaron las secuencias de los genes del marco de lectura abierto 5 y 7 de 20 aislamientos de vPRRS. El análisis de las secuencias obtenidas y las publicadas en el Genbank reveló que todas pertenecían a la especie PRRSV2. Se encontraron diferencias importantes en la ORF5 y ORF7 entre secuencias del virus aislado y de referencia debido a inserciones y sustituciones en posiciones que juegan un papel clave en el reconocimiento, la estructura y la función del virus.

Los resultados obtenidos nos permiten establecer la magnitud de la transmisión del virus de PRRS y de la cepa viral más frecuente que prevalece en México.

El virus de PRRS está presente en la producción porcina de México, las cepas circulantes presentan importantes cambios en su ORF5 y ORF7, los cuales probablemente son una explicación de los resultados obtenidos en el análisis serológico con la cepa de campo y cepa vacunal.

ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is caused by a genetically diverse RNA virus that produced an economically significant disease in the swine industry.

In this study a total of 8,126 samples of sera from 275 technified and semitechnified farms of 30 of the 32 states of Mexico, representative of the eight regions of the country, were tested.

Anti-PRRSv antibodies against a Mexican isolated wild virus were found in 15 to 49 percent of the sera tested, 2.4 to 9.8 against the vaccine and 7.7 to 26 percent against the wild virus.

The vPRRS virus was detected by RT-PCR in 77 of the 1,630 pools of samples tested in seven of the eight geographic regions in which the Mexican Republic was divided. The complete sequences of the open reading frame 5 and 7 of 20 vPRRS isolates were determined. The analysis of the sequences together with those published in the GenBank revealed that all belonged to the North American-type. Striking differences were found in the ORF5 and ORF7 between sequences of the isolated and the reference virus due to insertions and substitutions in positions that play a key role in the recognition, structure and function of the virus.

Overall, these results established the magnitude of the PRRS virus transmission and the most frequent virus strain that prevail in Mexico.

PRRS virus is present in Mexican porcine production, circulating strains present important changes in their ORF5 and ORF7, which are probably an explanation of the results obtained in the serological analysis with the field strain and vaccine strain.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
I. INTRODUCCIÓN	12
II. ANTECEDENTES	13
Agente etiológico	14
Proteínas no estructurales (NSPs) del virus de PRRS.....	16
Proteínas estructurales del virus de PRRS.....	16
Patogenia de la enfermedad	18
Aislamiento del virus <i>in vitro</i>	20
Respuesta inmune	20
Secuenciación de semiconducción	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVO	23
Objetivos específicos.....	23
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	24
Muestras.....	24
ELISA para anticuerpos del vPRRS vacunales y de campo.....	24

Extracción de ARN.....	25
RT-PCR para los ORF5 y ORF7 del vPRRS.....	25
Secuenciación de los ORF5 y ORF7 del vPRRS.....	26
Análisis de los resultados.....	27
VII. RESULTADOS.....	29
Seroprevalencia (ELISA) del vPRRS.....	29
Prevalencia (RT-PCR) del vPRRS.....	30
Secuenciación de ORF5 y ORF7 del vPRRS.....	34
Análisis filogenético de ORF5.....	35
Cambios en la secuencia de ORF5 (nt y aa).....	37
Análisis filogenético de ORF7.....	43
Cambios en la secuencia de ORF7 (nt y aa).....	45
VIII. DISCUSIÓN.....	49
IX. CONCLUSIONES.....	60
X. REFERENCIAS.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas que constituyen el vPRRS. Se enlistan las proteínas estructurales y no estructurales del vPRRS.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la detección de ORF5 y ORF7 del vPRRS.

Tabla 3. Seroprevalencia y prevalencia del virus de PRRS a nivel regional. Se observa la cantidad de muestras obtenidas en cada región, la proporción de sueros con anticuerpos para la cepa de campo y el virus vacunal; así como la seroprevalencia y prevalencia estimada para cada una de las regiones.

Tabla 4. Secuencias del vPRRS: Identificación, tipo de muestra y número de acceso en GenBank

Tabla 5. Identidad de la secuencia de nucleótidos del ORF5 del vPRRS. Identidad expresada en porcentaje de las secuencias obtenidas en el presente estudio al comparar la secuencia de nucleótidos del ORF5 con la cepa de referencia VR2332 (GenBank número de acceso EF536003.1) y entre ellas mismas.

Table 6. Sustitución de aminoácidos presentes en el ORF5 de las cepas de vPRRS aisladas en México al ser comparadas con la cepa de referencia VR2332. La composición de aminoácidos fue deducida de la secuencia de nucleótidos, sólo se indican las posiciones que presentaron cambios.

Tabla 7. Secuencia de aminoácidos del ectodominio del ORF5 del vPRRS y su alineamiento con la cepa de referencia VR2332. Mutaciones observadas en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que conforman el ectodominio de ORF5, las inserciones se muestran con sombra gris.

Tabla 8. Identidad de la secuencia de nucleótidos del ORF7 del vPRRS. Identidad expresada en porcentaje de las secuencias obtenidas en el presente estudio al comparar la secuencia de nucleótidos del ORF7 con la cepa de referencia VR2332 (GenBank número de acceso EF536003.1) y entre ellas mismas.

Table 9. Sustitución de aminoácidos presentes en el ORF7 de las cepas de vPRRS aisladas en México al ser comparadas con la cepa de referencia VR2332. La composición de aminoácidos fue deducida de la secuencia de nucleótidos, sólo se indican las posiciones que presentaron cambios.

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de epítopes lineales en el ORF7 del vPRRS y su alineamiento con la cepa de referencia VR2332. Mutaciones observadas en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que conforman epítopes importantes en el ORF7, las inserciones se muestran con sombra gris.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia de la familia *Arteriviridae*. Deshidrogenasa lática (LDV) del ratón, Arteritis viral equina (EAV), Arteritis viral de los burros (EAV Donkey) y el virus de la Fiebre hemorrágica del simio (SHFV).

Figura 2. Clasificación del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. PRRSV1 dividido en tres subtipos; PRRSV2 clasificado en nueve linajes según el ORF5.

Figura 3. Patogenia del virus de PRRS. Obtenida de Rossow *et al.*, 1995.

Figura 4. Secuenciación por semiconducción: incorporación de nucleótidos. Cuando un nucleótido es incorporado a la cadena molde de ADN mediante una polimerasa, un ion de hidrógeno es liberado.

Figura 5. Regiones de la República Mexicana. Estados que integran cada una de las ocho regiones de México.

Figura 6. Seroprevalencia del vPRR estimada a nivel nacional para la cepa vacunal y la cepa de campo.

Figura 7. El vPRRS a través de las regiones de México. A. Seroprevalencia de anticuerpos anti- vPRRS a nivel regional, B. Prevalencia del vPRRS a nivel regional. La escala de gris en ambos mapas representa la clasificación de las ocho regiones de México, según la diferencia estadística determinada por la prueba de Tukey. Las regiones con el color más intenso representan los valores más altos, el gris más claro identifica las regiones con los valores más bajos.

Figura 8. Árbol filogenético de ORF5 del vPRRS. Análisis filogenético molecular de 316 secuencias de nucleótidos del ORF5 del vPRRS por el método Neighbor-Joining,

usando un bootstrap test de 1000 replicas. Los triángulos en color rojo representan las cepas obtenidas en este estudio, en color azul las cepas históricas previamente reportadas.

Figura 9. Árbol filogenético de ORF7 del vPRRS. Análisis filogenético molecular de 93 secuencias de nucleótidos del ORF7 del vPRRS por el método Neighbor-Joining, usando un bootstrap test de 1000 replicas. Los triángulos en color rojo representan las cepas obtenidas en este estudio, en color azul las cepas históricas previamente reportadas.

I. INTRODUCCIÓN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) es de gran importancia en la industria porcícola mundial por las pérdidas económicas que genera (FAO, 2011). El agente etiológico de esta enfermedad es un virus del orden de los Nidovirales, familia *Arteriviridae*, género *Porarterivirus* que se caracteriza por su alta variabilidad genética; clasificado de forma general en dos especies diferentes: PRRSV1 European strain Lelystad LV y PRRSV2 American strain ATCC VR2332 (Adams et al., 2017). Consta de nueve marcos de lectura abiertos: ORF 1a y ORF 1b que codifican para proteínas no estructurales (NSPs); ORF 2a, 2b, 3, 4, 5 que codifican para las proteínas glicosiladas estructurales Gp2a, Gp2b, Gp3, Gp4 y Gp5, respectivamente. ORF6 codifica para la proteína de matriz (M) y ORF7 codifica para la nucleocápside (N). En México, las autoridades sanitarias han reconocido la circulación del virus PRRS (vPRRS) en las granjas tecnificadas a partir del año 1999, sin embargo, a la fecha no se tienen datos claros de la prevalencia de esta a nivel nacional. A pesar de existir avances significativos en el estudio de esta enfermedad, no ha sido posible su control y erradicación. Entre las causas que pueden explicar la imposibilidad de erradicar este virus figura su alta variabilidad genética y la baja inmunidad protectora que induce, lo que ha dificultado el desarrollo de vacunas eficientes.

Este estudio fue diseñado para identificar y caracterizar las variantes endémicas del vPRRS en México y cuyos resultados pueden ser útiles en estudios futuros sobre el control y erradicación de esta enfermedad en nuestro país.

II. ANTECEDENTES

En 1991 la industria porcina fue afectada por una enfermedad desconocida llamada “enfermedad misteriosa del cerdo” (MSD, por sus siglas en inglés *Mystery swine disease*). Los signos clínicos de las en cerdas enfermas eran anorexia y fiebre y las gestaciones se interrumpían por abortos en el último tercio de la gestación, lechones nacidos débiles, mortinatos o momificados, los lechones presentaban problemas respiratorios y aumento en el porcentaje de mortalidad. Después de varias investigaciones fue aislado el agente causal en lechones y cerdas, identificado como el “virus Lelystad”. Anticuerpos dirigidos contra este virus también fueron encontrados en cerdos con la enfermedad misteriosa del cerdo en Inglaterra, Alemania y Estados Unidos (Wensvoort *et al.*, 1991).

En 1987 se presentan signos clínicos en cerdos de una enfermedad desconocida en Estados Unidos, seguido de brotes en Europa y Asia en 1990. En el año de 1991, Europa informa que esta enfermedad es ocasionada por un agente viral del género *Arterivirus* y se le asigna el término de “Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino” (PRRS) por la signología que desarrollaban los cerdos infectados (Zimmerman, 2003).

La enfermedad está presente en todo el mundo, con excepción de Australia, Nueva Zelanda, Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza. Algunos otros países están participando activamente en campañas de erradicación (OIE, 2008).

El PRRS es de gran importancia en la industria porcícola mundial por las pérdidas económicas que genera, en Estados Unidos se ha estimado que el costo total de las pérdidas anuales de productividad debido al vPRRS en los hatos de cría y engorda fue de \$664 millones de dólares (Holtkamp *et al.*, 2013). En México se ha calculado que la pérdida por cerda al año es de \$586.40 (Amador, 2013).

Agente etiológico

En el X Congreso Internacional de Virología en agosto de 1996, el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV) propuso clasificar el orden Nidovirales de la siguiente manera: El orden incluye tres familias, *Arteriviridae*, *Coronaviridae* y *Rinoviridae*. Los miembros de la familia *Arteriviridae* se caracterizan por ser virus pequeños, envueltos y de cadena simple positiva de ARN (ssARN) con una longitud entre 12.7 y 15.7 kilobases (kb) y su extremo 3' es poliadenilado. Esta familia incluye al virus de deshidrogenasa láctica (LDV) del ratón, arteritis viral equina (EAV), arteritis viral de los burros (EAV donkey) y al virus de la fiebre hemorrágica del simio (SHFV) (Snijder *et al.*, 1998) (figura 1).

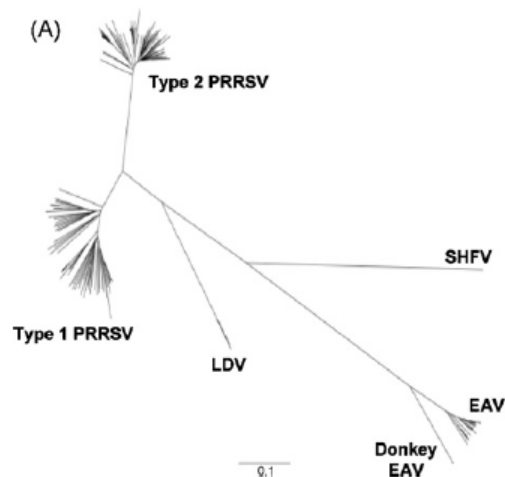


Figura 1. Relaciones filogenéticas de miembros de la familia *Arteriviridae*.

Deshidrogenasa láctica (LDV) del ratón, arteritis viral equina (EAV), arteritis viral de los burros (EAV donkey) y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (SHFV) (Murtaugh *et al.*, 2010).

El vPRRS es un virus pequeño, envuelto, de ARN de cadena simple, polaridad positiva con un genoma de aproximadamente 15 Kb, al comparar la secuencia de nucleótidos de diferentes cepas se ha observado que existen dos especies antigénicamente distintas: PRRSV1 European strain Lelystad LV y PRRSV2 American strain ATCC VR2332.

(Nelsen *et al.*, 1999; Meulenberg, 2000; OIE, 2010; Adams *et al.*, 2017). La comparación entre sus secuencias nucleotídicas revelan una identidad del 55 al 80 % entre ellas. El análisis de diferentes cepas de un mismo tipo muestra heterogeneidad significativa que varía según la proteína analizada. Varios estudios han demostrado que el vPRRS tiene una gran diversidad genética que lo hace distinto en virulencia (Nelsen *et al.*, 1999; Batista *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010) (figura 2).

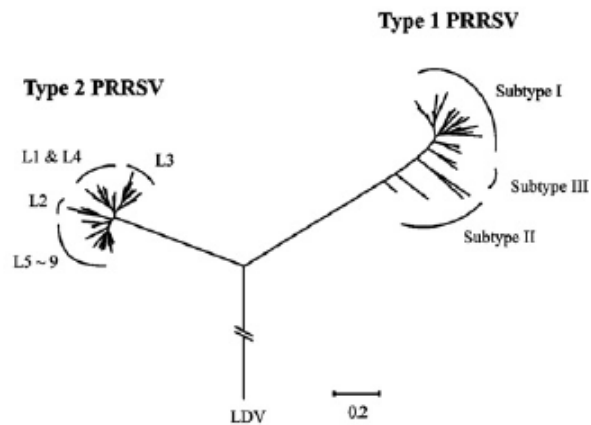


Figura 2. Clasificación del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino.

PRRSV1 dividido en tres subtipos; PRRSV2 clasificado en nueve linajes según el ORF5 (Murtaugh *et al.*, 2010).

El vPRRS consta de nueve marcos de lectura abiertos (ORF's), dos de estos genes, ORF 1a y ORF 1b constituyen aproximadamente 75 al 80% del genoma viral, codifican proteínas no estructurales (NSPs). Los ORF's 2a, 2b, 3, 4, 5 están ubicados en el extremo 3', constituyen aproximadamente el 20 al 25% del genoma con una longitud de 3 Kb y codifican para las proteínas glicosiladas estructurales Gp2a, Gp2b, Gp3, Gp4 y Gp5, respectivamente. El ORF6 codifica para la proteína de matriz (M) no glicosilada y el ORF7 codifica para la proteína no glicosilada de la nucleocápside (N), la cual constituye entre el 20 y 40% de las proteínas que contiene el virión (Meulenberg, 2000; Wang *et al.*, 2010) (tabla 1).

Proteínas no estructurales (NSPs) del vPRRS

Los ORF1a y ORF1b están ubicados en el extremo 5' y constituyen entre el 70 y 80 % del genoma viral, tienen una longitud aproximada de 12 kb y codifican para trece poliproteínas no estructurales (nsp), nsp1a, nsp1b, nsp2 a nsp12, las cuales tienen actividad de ARN polimerasa involucradas en la replicación y transcripción del ARN viral. La región que codifica para la nsp2 es la más variable y directamente relacionada con la replicación viral (Amonsin *et al.*, 2009; Kedkovid *et al.*, 2010).

Proteínas estructurales del vPRRS

El ORF2 codifica para la proteína 2a, además contiene un marco interno de lectura que codifica para una proteína no glicosilada nombrada 2b de aproximadamente 10 Kda; la glicoproteína Gp2 es el componente menor de la envoltura del vPRRS (Wu *et al.*, 2001).

Uno de los genes del vPRRS de mayor interés para su estudio es el gen ORF5, debido a que es el gen con mayor variabilidad genética, el ORF5 está compuesto por 603 pb, para la cepa americana y aislados obtenidos de granjas del norte de México y 606 pb para la cepa europea. Al comparar la secuencia del ORF5 obtenida en México con la cepa americana se observa que el porcentaje de similitud es del 88% y con la vacuna Ingelvac PRRS virus vivo modificado (MLV por sus siglas en inglés) corresponde al 87% (Macías *et al.*, 2006). Con base en el análisis de 8,624 secuencias de este gen pertenecientes al PRRSV2, se han clasificado en 9 linajes y cada linaje a su vez se divide en sub-linajes, lo que demuestra la gran diversidad genética de este virus (Shi *et al.*, 2010a). La Gp5 es la proteína estructural más variable, con sólo 51-55% de identidad de aminoácidos entre aislados americanos y europeos. Presenta varios dominios, un péptido señal, un ectodominio, una región transmembranal y un endodominio. En el ectodominio se han detectado dos epítopes que inducen la producción de anticuerpos (Ostrowski *et al.*, 2002).

El ORF6 codifica para la proteína estructural no glicosilada de matriz (M). Es la proteína más conservada con 78-81 % de identidad de aminoácidos entre la cepa americana y la

européa.

La proteína de la nucleocápside (N) codificada por el ORF7 es la más abundante del virus, no es glicosilada y está compuesta por 123 aminoácidos. Esta proteína es altamente antigénica y genera una respuesta de anticuerpos de forma rápida y persistente (Yan-Jun *et al.*, 2006). En las cepas europeas y americanas contiene dominios antigénicos que han sido mapeados dentro de su genoma y epitopes lineales altamente conservados, por lo cual es empleada en el desarrollo de pruebas diagnósticas para la identificación de anticuerpos específicos para vPRRS en suero (Xiofang *et al.*, 2011). En México, Batista *et al.*, (2004), analizaron las secuencias del gen ORF7 de 31 aislados del vPRRS procedentes de granjas de los estados de Sonora y Puebla, obteniendo como resultado que el ORF7 muestra una similitud genética del 88% al 100% al ser comparados con la cepa de referencia americana.

Tabla 1. Proteínas virales del PRRS.

Proteína	ORF	Características	Función / importancia
NSPs	ORF1a, 1b	proteína no estructural	Enzimas y proteínas involucradas en la replicación y transcripción.
Gp2a	ORF2a	proteína estructural	Poco antigénica, 29-30 KDa.
Gp2b	ORF2b	proteína estructural	Poco antigénica, 29-30 KDa.
Gp3	ORF3	proteína estructural	Tamaño de 45-50 KDa, se ha encontrado en forma soluble.
Gp4	ORF4	proteína estructural	Tamaño de 31-35 KDa. Participa en la inducción de anticuerpos neutralizantes.
Gp5	ORF5	proteína estructural	Tamaño de 25 KDa, Constituye heterodímeros con la proteína M que pueden ser encontrados en el retículo endoplasmico de las células infectadas, interacción virus-célula huésped, induce apoptosis, participa en la inducción de anticuerpos neutralizantes.
Matriz (M)	ORF6	proteína estructural, no glicosilada	Tamaño de 18 KDa, constituye heterodímeros con la proteína Gp5 que pueden ser encontrados en el retículo endoplasmico de las células infectadas, interacción virus-célula huésped. Es la más conservada.
Nucleocápside (N)	ORF7	proteína estructural, no glicosilada	Es la más pequeña (15 KDa), constituye 20-40% de las proteínas que contiene el virión, induce elevada producción de anticuerpos sin actividad protectora.

Lunney et al., 2016

Patogenia de la enfermedad de PRRS

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino es una de las enfermedades que afecta a cerdos de todas las edades causando falla reproductiva, abortos en el último tercio de gestación, nacidos muertos y aumento en la tasa de mortalidad en la primera semana de edad de los lechones, además de generar cuadros con problemas respiratorios, aumento en la tasa de mortalidad de lechones, cerdos destetados, en crecimiento y finalización (figura 3).

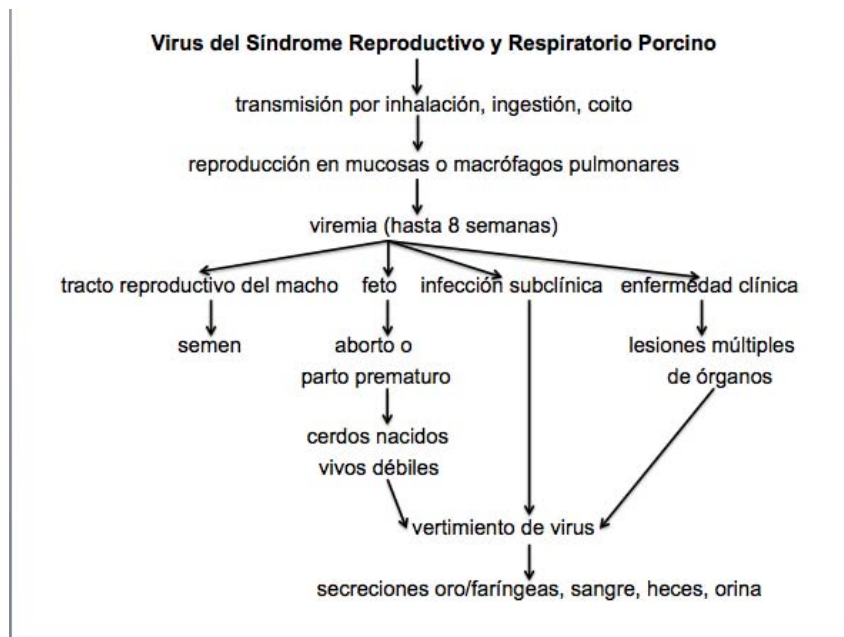


Figura 3. Patogenia del vPRRS. Obtenida de Rossow *et al.*, 1995.

El tropismo del vPRRS está determinado por la presencia o ausencia de mediadores específicos en las células diana, los macrófagos son célula blanco para el virus. El contacto inicial del virus con el macrófago porcino se produce a través del heparán sulfato en la superficie celular. Posteriormente, el virus se acopla a moléculas de sialoadhesina creando una interacción más estable. La interacción del virus con este receptor implica la unión del heterodímero viral formado por sus proteínas M/Gp5 con la sialoadhesina. La unión del virus a la sialoadhesina es seguida por la internalización del complejo virus-receptor a través de endocitosis mediada por clatrina. Después de la internalización, el genoma viral

se libera en el citoplasma. Esta última etapa de la entrada se produce cuando el virus está presente en el endosoma temprano y es críticamente dependiente de la acidificación del endosoma y su reconocimiento con el receptor CD163 presente en el macrófago (Breedam *et al.*, 2010).

Este virus genera viremia prolongada y persistencia. Estudios previos han demostrado que el vPRRS puede persistir en los cerdos durante largos períodos después de la infección inicial y que los animales persistentemente infectados pueden eliminar el virus (Allende *et al.*, 2000).

Una característica de los cerdos infectados con vPRRS es la viremia prolongada como se demuestra en el estudio realizado por Macías *et al.*, 2006, donde reportan cerdos virémicos hasta cuatro semanas postinfección (pi). Los sementales infectados pueden contener virus en el semen hasta por 70 días pi. (Christopher-Hennings *et al.*, 2001).

En los sementales, el vPRRS infecta células germinales del testículo tales como espermátides y espermátocitos induciendo la apoptosis. Estas células infectadas pueden ser las principales responsables de la excreción de vPRRS en el semen; también infecta macrófagos presentes en el intersticio de los testículos (Sur *et al.*, 1997).

En las piaras donde se presenta esta enfermedad se observa desbalance de las infecciones, ocasionadas por microorganismos primarios y secundarios, por lo que se incrementan las enfermedades de diversa índole como rinitis atrófica, neumonías y salmonelosis (Salinas *et al.*, 2008).

El vPRRS puede ser transmitido a grandes distancias a través de vías que son características de la producción moderna de cerdos, en particular el transporte de los cerdos y el uso de semen contaminado (Shi *et al.*, 2010a).

Aislamiento del virus *in vitro*

El vPRRS se replica principalmente en macrófagos alveolares de cerdo (PAM, por sus siglas en inglés *Porcine Alveolar Macrophages*), en cultivo primario de macrófagos alveolares y en líneas celulares continuas como células derivadas de riñón de mono verde africano (MA.104) y células derivadas de éstas (CL2621 o MARC-145) observándose efecto citopático caracterizado por redondeamiento y desprendimiento celular (Benfield *et al.*, 1992; Snijder *et al.*, 1998; Muelenberg, 2000).

Respuesta inmune

El vPRRS puede infectar y replicarse en macrófagos y células dendríticas, los cuales son importantes en el desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa. Una característica de la respuesta innata frente a virus es la producción de IFN tipo I (α y β), todas las células nucleadas tiene la habilidad de producir IFNs α/β ; sin embargo, las células dendríticas plasmacitoides son las principales productoras de IFN tipo I, el cual induce la síntesis de proteína antivirales como proteína cinasa y oligoadenilato-sintetasa que inhiben la replicación y síntesis de proteínas virales. Este virus también inhibe la expresión de ARNm de las citocinas pro-inflamatorias IFN α , TNF α e IL-1 β . La falta de una respuesta inflamatoria y la débil o nula respuesta antiviral crea un microambiente desfavorable para el desarrollo de la respuesta adaptativa (Flores-Mendoza *et al.*, 2010; Hanzhong *et al.*, 2017).

Los cerdos infectados con el vPRRS presentan seroconversión entre el día 7 y 9 pi, alcanzando su máximo de 28 a 56 días pi. Los títulos de anticuerpos forman una meseta tras alcanzar un máximo y después disminuyen. Los anticuerpos que aparecen durante la fase temprana de infección no tienen capacidad neutralizante, pero es hasta la semana cuatro pi, en la fase tardía de la infección, cuando se pueden encontrar anticuerpos con actividad neutralizante (Allende *et al.*, 2000; López *et al.*, 2004; Macías *et al.*, 2006).

El epítipo con mayor actividad neutralizante se encuentra en la proteína Gp5, nombrado epítipo B, seguido por el epítipo presente en la proteína Gp4 y el de la proteína M (Allende

et al., 2000). El epítotope A del ectodominio de Gp5 induce una fuerte respuesta de anticuerpos no neutralizantes rápidamente después de la infección; se encuentra localizado a siete residuos de aminoácidos del epítotope B, que es un inductor de la producción de anticuerpos neutralizantes (Ostrowski *et al.*, 2002).

La respuesta de anticuerpos desencadenada por el vPRRS está representada por IgM detectadas entre 5–7 días pi y declinan rápidamente hasta no ser detectadas 2 o 3 semanas después. Las IgG son detectadas a los 7-10 días post-infección (dpi), alcanzando niveles altos entre la semana 4-6 pi, manteniéndose constantes por varios meses y decaen alrededor de los 300 días pi. Los anticuerpos neutralizantes IgG están dirigidos a las proteínas estructurales Gp4, Gp5 y M, estos anticuerpos pueden ser detectados a partir de la tercera semana pi manteniéndose hasta 604 días pi (Nelson *et al.*, 1994).

En cerdos de 4 meses de edad infectados experimentalmente con PRRSV2, se ha detectado viremia hasta el día 30 pi, anticuerpos en suero desde el día 14 hasta el 120 pi y persistencia del virus en el tejido linfoide de tonsila y ganglios linfáticos desde los 30 hasta 135 días pi, fue posible hacer el aislamiento del vPRRS en muestras de suero en los días 7 a 14 pi. La presencia simultánea del vPRRS y de anticuerpos específicos en el suero de los cerdos durante la viremia del periodo temprano de infección se interpreta como un indicador de la inhabilidad protectora de los anticuerpos en esta fase (Batista *et al.*, 2004).

Secuenciación de semiconducción

La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) consiste en tecnologías más rápidas, precisas, fáciles de operar y de menor costo. Los sistemas NGS son típicamente representados por Solid, Ion Torrent PGM Genome Analyzer / HiSeq 2000/MiSeq de Illumina, y GS FLX Titanium / GS Junior Roche.

Ion Personal Genome Machine (PGM) fue lanzado por Ion Torrent en el 2010, es de tamaño pequeño y cuenta con tasas de rotación rápida. Utiliza tecnología de secuenciación de semiconductores. Cuando un nucleótido se incorpora en las moléculas de ADN por la polimerasa, se libera un hidrogenión. Al detectar una baja en el pH de la solución, reconoce que un nucleótido a sido incorporado.

Cada vez que el chip se llena con un nucleótido después de otro, si no es el nucleótido complementario a la cadena molde de ADN no se unirá, no se liberarán iones de hidrógeno en la solución y, por lo tanto, no se registrará ningún cambio; si hay 2 nucleótidos añadidos, se detecta doble voltaje por la cantidad de iones liberados (Lin *et al.*, 2012) (figura 4).

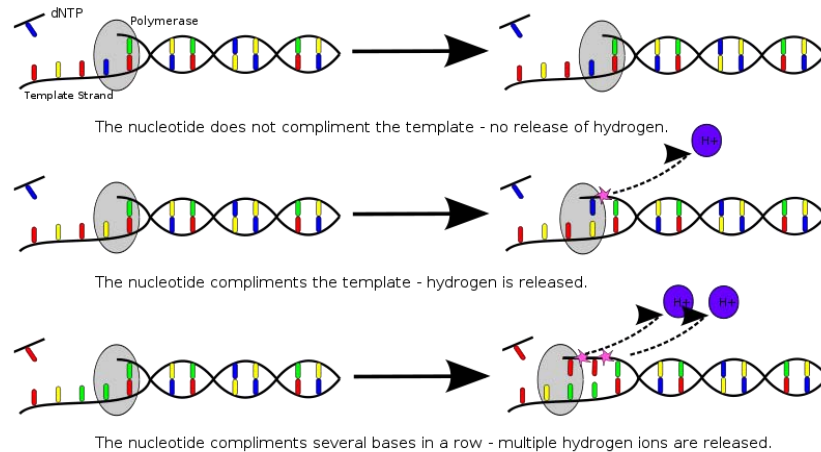


Figura 4. Secuenciación por semiconducción: incorporación de nucleótidos.

Cuando un nucleótido es incorporado a la cadena molde de ADN mediante una polimerasa, un ion de hidrógeno es liberado (<https://www.thermofisher.com/>).

Cada pocillo del chip contiene una plantilla de ADN diferente, lo que permite la **secuenciación masiva en paralelo**. A diferencia de otros métodos de secuenciación, la secuenciación por semiconducción no requiere de fluorescencia y de barrido de la cámara, lo que resulta en mayor velocidad y menor costo.

Los pasos requeridos para obtener la secuencia de ADN mediante este método son construcción de la librería, preparación del templado, corrida de secuencia y análisis de datos.

III. JUSTIFICACIÓN

El Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino es una enfermedad viral de alta importancia a nivel mundial por las grandes pérdidas económicas que genera. A pesar de existir avances significativos en el estudio de esta enfermedad, no ha sido posible su control y erradicación debido a la alta variabilidad genética que caracteriza a su agente causal. Identificar y caracterizar las variantes endémicas del vPRRS en México será una herramienta útil en estudios futuros sobre el control y erradicación de esta enfermedad en nuestro país.

IV. HIPÓTESIS

En México, existen cepas endémicas del vPRRS con alta variabilidad genética que circulan en las granjas de producción porcina nacionales.

V. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente estudio fue identificar y analizar las cepas del vPRRS endémicas de México y conocer su distribución geográfica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la prevalencia del vPRRS en cerdos de México.
- Estimar la seroprevalencia del vPRRS en cerdos de México.
- Caracterizar los ORF5 y ORF7 del vPRRS en muestras de sangre obtenidas en granjas porcinas de México.
- Analizar la variación genética del vPRRS en muestras de cerdos de México.
- Analizar la distribución geográfica del vPRRS en cerdos de México.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Un total de 8,126 muestras de sangre de las cuales se separó el suero por centrifugación fueron obtenidas de 275 unidades de producción porcina de tipo tecnificada y semitecnificada en 30 Estados de la República Mexicana (no se incluye Michoacán y Ciudad de México) durante el periodo de mayo 2013 a marzo 2014, las cuales fueron colectadas a través del programa de Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Porcinas, por el personal de SAGARPA-SENASICA. El tamaño promedio de las muestras fue de 30 sueros por granja, obtenidas de diferentes etapas de producción incluyendo destete, desarrollo, crecimiento, engorda, vientres, reemplazos y sementales. Los sueros fueron refrigerados y remitidos al 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), donde se almacenaron a -70°C hasta su uso.

ELISA para anticuerpos del vPRRS vacunales y de campo

La estimación de la seroprevalencia del vPRRS se realizó detectando la presencia de inmunoglobulinas IgG específicas para el vPRRS a través de la técnica de ELISA indirecto desarrollado por el DMZC de la UNAM, que permite identificar anticuerpos específicos contra la cepa de referencia VR-2332 del vPRRS y para un aislado de campo obtenido en el DMZC-FMVZ, UNAM. La metodología empleada para este ensayo fue previamente descrito por García (2016). La publicación y patente en los que se reporta la estandarización del método se encuentran en proceso. Los controles negativos (5 en cada ensayo) son analizados por duplicado y la DO_{450} no debe ser mayor a 0.3 en cada uno de ellos. El punto de corte negativo-positivo se determinó utilizando el promedio de las densidades ópticas de los 5 controles negativos y sumándole tres desviaciones estándar resultante de este promedio ($\text{Prom.} + (\text{DS} \times 3)$), de esta manera, se asume que es estadísticamente probable que los valores por debajo de este valor tienen un 99% de probabilidad de ser negativos y contrariamente, los valores por arriba del punto de corte tienen el 99% de probabilidad de ser positivos.

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó haciendo uso de perlas magnéticas del kit comercial 5X MagMax™ Pathogen RNA/DNA (Applied biosystems, USA), a partir de 50 µl de muestra y siguiendo las indicaciones del fabricante. El ácido nucleico purificado se resuspendió en 50 µl de buffer de elución y se almacenó a -70°C hasta su uso.

RT-PCR para los ORF5 y ORF7 del vPRRS

Se utilizó la técnica de RT-PCR punto final para la identificación de las muestras positivas y para la amplificación del ORF5 y ORF7 del vPRRS, haciendo uso del kit comercial OneStep RT-PCR, (QIAGEN, Alemania). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la detección de ORF7 del vPRRS

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud	Tamaño del amplicón
ORF5-7 F	5' TTT GGC AAT GTG TCA GGC ATC GTG 3'	24 pb	1700 pb
ORF5-7 R	5' CCA TTC ACC ACA CAT TCT TCC 3'	21 pb	

Ambos oligonucleótidos se emplearon a una concentración de 10 pmol, haciendo uso de un termociclador Labnet International, Inc., siguiendo el protocolo de 50°C 30 min para la retrotranscripción; 95°C 15 min y 94°C 30 seg; 59°C 1 min; 72°C 1 min durante 40 ciclos; con una extensión final de 72°C 10 min. Los productos de la amplificación fueron observados en gel de agarosa al 2%, mezclando 5 µl del producto de amplificación más 2 µl de buffer de carga 6X (6X DNA loading Dye, Thermo Cientific.), su uso un marcador de peso molecular de ADN de bajo rango (ADN pBR322/Mspi, BioTecMol). Posterior al corrimiento electroforético se hizo la tinción de los geles de agarosa con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/µl, visualizándolo en un transiluminador de luz UV y software

Gel Logic 112. Las muestras se consideraron positivas cuando se observó una banda de alrededor de 1700 pb.

Secuenciación de los ORF5 y ORF7 del vPRRS

Se realizó la secuenciación de 9 muestras obtenidas de los 1,630 pools provenientes de toda la República Mexicana, así como 11 muestras positivas obtenidas del servicio de diagnóstico del DMZC

1. Construcción de la librería

El ADN total fue cuantificado con el Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Invitrogen, USA) y el Qubit Fluorometer (Invitrogen, USA).

Se utilizó el kit Ion Plus Fragment Library (Life technologies, USA) para la construcción de librerías de 200 nucleótidos con un input de 100 ng de ADN, siguiendo el protocolo de fragmentación del ADN total con Bioruptor Sonication System durante 17 ciclos de 30s de encendido y 30s de apagado. Posteriormente el ADN fragmentado fue purificado con Agencourt. AMPure. XP Kit (Beckman Coulter, USA) y fue confirmada la obtención de fragmentos de ADN de 200 pb con el kit Agilent High Sensitivity DNA (Agilent, USA), el software y equipo Agilent 2100 Bioanalyzer.

Se identificaron cada una de las muestras que se incluyeron en un mismo flujo de secuenciación con los adaptadores del kit Ion Xpress Barcode Adapters (Life technologies, USA) al mismo tiempo que se reparan los extremos de los fragmentos y se realizó una tercera purificación.

Se seleccionaron los fragmentos que tuvieron alrededor de 350 pb mediante electroforesis con E-Gel SizeSelect 2% Agarose Gel (Invitrogen, USA). Una vez seleccionados los fragmentos se amplificó la librería y se realizó una cuarta purificación.

Se calculó la molaridad del ADN de cada muestra con el kit Agilent High Sensitivity DNA para determinar el factor de dilución requerido de cada librería para ajustarlas a 100 pM de forma individual y posteriormente se preparó el templado.

2. Preparación del templado

Una vez obtenidas las librerías se elaboró el templado con el Ion OneTouch™ 2 System y el Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Life technologies, USA). En un volumen de 5 µl se elaboró una mezcla equimolar de todas las librerías previamente ajustadas a 100 pM y se adicionó 20 µl de agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 25 µl, esta mezcla se sometió a PCR de emulsión en el que las librerías reconocen por complementariedad las Ion Sphere Particles (ISPs).

3. Corrida de secuencia

La reacción de secuencia se llevó a cabo con el kit Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing, empleando un chip Ion 314 Chip v2, con 500 flujos, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las lecturas obtenidas fueron sometidas a filtro de calidad usando el plug-in FastQC, todas las lecturas con un Q-score ≥ 20 fueron alineadas y ensambladas con AssemblerSPAdes v5.4.0. La profundidad genómica promedio fue de 300X.

Análisis de los resultados

Las muestras fueron clasificadas según el estado de procedencia y siguiendo la clasificación de las 8 regiones agropecuarias de México: **1. Noreste:** Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas; **2. Noroeste:** Baja California Norte y Sur, Chihuahua, Durango, Sinaloa y Sonora; **3. Occidente:** Colima, Nayarit, Michoacán y Jalisco; **4. Oriente:** Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Veracruz; **5. Centro-norte:** Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas; **6. Centro-sur:** Ciudad de México, Estado de México y Morelos; **7. Sureste:** Campeche, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán; **8. Suroeste:** Chiapas, Guerrero y Oaxaca (figura 5).

Para la asociación de variables se realizaron estudios de distribución de frecuencias, tablas de contingencia para el 95% de confianza, modelo lineal generalizado y prueba de Tukey, haciendo uso del programa JMP v12.

Para el análisis de las secuencias obtenidas se usó el Torrent Suite Server, nucleotide Blast del NCBI y el programa MEGA V7 y DNASTAR.



Figura 5. Regiones de la República Mexicana. Estados que integran cada una de las ocho regiones de México.

VII. RESULTADOS

Seroprevalencia (ELISA)

Un total de 3,420 sueros presentaron anticuerpos específicos para el vPRRS, lo que representa un 42.09 % del total de muestras obtenidas en todos los estados de México con excepción de Michoacán y Ciudad de México. Los sueros positivos fueron clasificados en 1,477 sueros seropositivos para el virus de campo, 319 sueros seropositivos para virus vacunal y 1,624 sueros seropositivos para ambas cepas empleadas, (sueros dobles positivos) (figura 6).

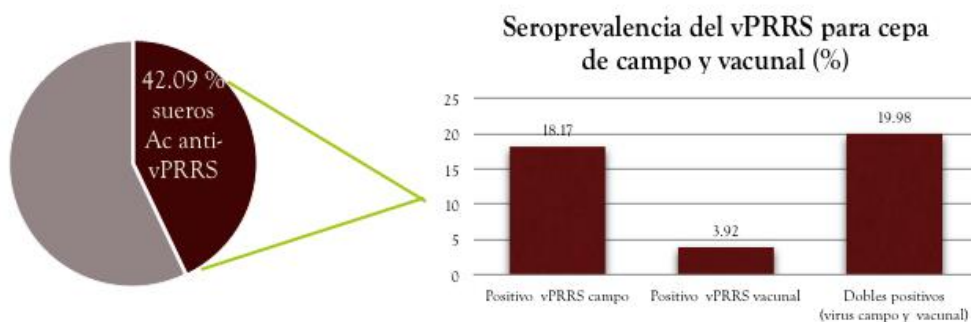


Figura 6. Seroprevalencia del PRRv estimada a nivel nacional para la cepa vacunal de referencia VR2332 y la cepa de campo.

La seroprevalencia del vPRRS fue diferente entre las regiones ($p < 0.001$) (tabla 3). La menor proporción de cerdos seropositivos se identificó en la región centro-sur, en la cual únicamente el 1.8% de las muestras analizadas presentaron seropositividad al virus de campo; en esta región no se registraron sueros con anticuerpos específicos para la cepa vacunal, ni dobles positivos. Por otra parte, la mayor presencia de anticuerpos específicos al virus de campo se observó en la región Noroeste con el 26.1%, seguido de las regiones Suroeste (24.1%), Centro-norte (23.6%), Occidente y Oriente (14.3%), Noreste (11.0%), Sureste (7.7%) y Centro sur (1.8%).

Tabla 3. Seroprevalencia y prevalencia del virus de PRRS a nivel regional.

Región	Seroprevalencia								Prevalencia	
	No. de sueros	Anti-PRRS Campo (%)	Anti-PRRS Vacc (%)	Doble positivo (%)	Total (%)	P1	P2	P3	No. de pools	Total (%)
Noreste	325	11	2.4	2.4	15.8 ^b	0.0001	0.0001	NS	66	3.07 ^{bc}
Noroeste	1,041	26.1	2.4	20.6	49.1 ^a	0.0001	0.0001	0.033	211	10.95 ^b
Oriente	750	14.3	3.5	6.9	24.7 ^b	0.0001	0.0001	0.055	150	3.33 ^{bc}
Occidente	2,850	14.3	4.6	28.9	47.8 ^a	0.0001	0.0001	0.0001	570	1.40 ^c
Centro-norte	2,249	23.6	3.2	14.4	41.2 ^a	0.0001	0.0001	0.0001	450	5.33 ^{bc}
Centro-sur	161	1.8	0	0	1.8 ^c	NS	NS	NS	33	27.2 ^a
Sureste	480	7.7	9.8	11.5	29.0 ^b	NS	NS	NS	96	6.25 ^{bc}
Suroeste	270	24.1	5.2	14.4	43.7 ^a	0.001	0.006	0.0005	54	0

Número de muestras analizadas para cada región. Diferencia de literales indica diferencia significativa entre regiones: seroprevalencia $p < 0.001$; prevalencia $p < 0.003$. Porcentaje de sueros con anticuerpos anti-vPRRS para la cepa de campo y la cepa vacunal, respectivamente. La seroprevalencia para vPRRS cepa de campo versus la cepa vacunal (P1) y los dobles positivos versus cepa de campo (P2) o la cepa vacunal (P3).

La seroprevalencia más alta hacia vPRRS, sin diferenciar entre virus vacunal y de campo, se encontró en la región Noroeste (49.1), seguido de la región Occidente (47.8%), Suroeste (43.7%) y Centro norte (41.2%) (figura 7A).

Prevalencia del vPRRS (RT-PCR)

La prevalencia de vPRRS a nivel nacional se estimó en un 4.6% de los 1,630 pools de suero provenientes de las 8 regiones de la República Mexicana, analizados mediante la técnica de RT-PCR.

A nivel regional, la presencia del vPRRS difiere significativamente entre de las regiones ($p < 0.003$). En siete regiones se identificaron animales positivos a la presencia del virus de PRRS (tabla 3).

La región donde se encontró un mayor porcentaje de positividad a vPRRS fue la región Centro-sur, en donde el 26.8% de las muestras analizadas resultaron positivas. Las muestras fueron obtenidas de cerdos en las etapas de destete, desarrollo y reproductoras, pertenecientes a dos granjas de la región. Por otra parte, en la región Noroeste el 10.95% de las muestras (23 pools de suero) fueron positivas las cuales provenían de 10 granjas y pertenecen a cerdos en las etapas de destete, desarrollo y crecimiento. En el Noreste del país 3.07% de las muestras analizadas resultaron positivas al vPRRS (2 pools), provenientes de una misma explotación y corresponden a cerdas reproductoras.

En el Occidente la positividad fue del 1.4%; las muestras provinieron de 7 granjas diferentes y fueron obtenidas de cerdos en desarrollo y reproductoras/reemplazo. La positividad de la región oriente fue del 3.3%, las muestras son de 3 granjas, un pool pertenece a cerdos en desarrollo y del resto se desconoce la etapa productiva de los cerdos.

En 10 granjas de la región Centro-norte se detectó la presencia del virus de PRRS en las etapas reproductoras y engorda; el porcentaje de positividad registrado fue del 5.3%.

Del Sureste del país, se desconoce la etapa productiva de los cerdos, aunque el porcentaje de muestras positivas fue de 6.25%, provenientes de tres granjas.

En la región Suroeste no se detectó ninguna muestra positiva a la presencia de este virus y por tal motivo se excluyó del análisis estadístico (figura 7B).

Se consideró como granja positiva, aquella granjas con uno o más pools de sueros positivos a vPRRS. Así se identificaron 36 explotaciones porcinas positivas, estimando una frecuencia a nivel de granja del 13.09%.

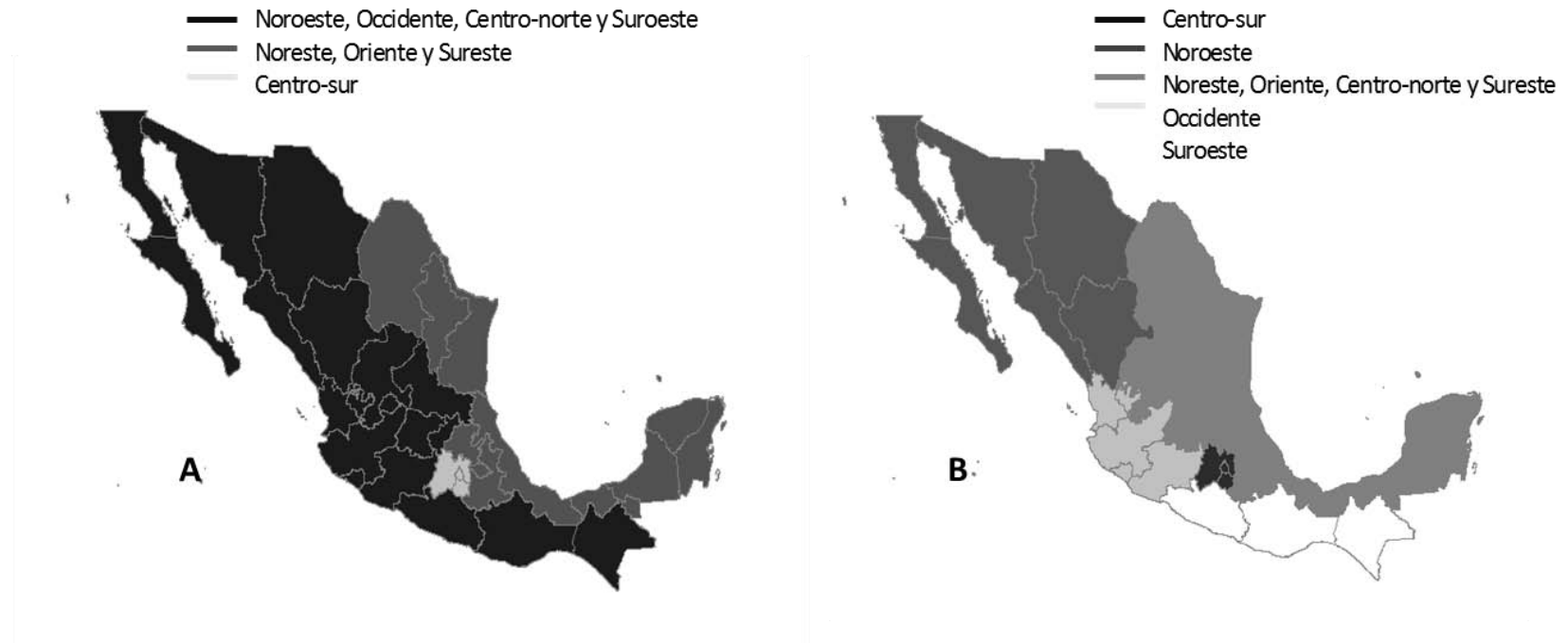


Figura 7. Identificación del vPRRS a través de las regiones de México.

A. Seroprevalencia de anticuerpos anti- vPRRS a nivel regional, B. Prevalencia del vPRRS a nivel regional. La escala de gris en ambos mapas representa la clasificación de las ocho regiones de México según la diferencia estadística determinada por la prueba de Tukey. Las regiones con el color más intenso representan los valores más altos, el gris más claro identifica las regiones con los valores más bajos.

Secuenciación de ORF5 y ORF7 del vPRRS

En 20 muestras positivas a la presencia del vPRRS se obtuvieron las secuencias de nucleótidos que conforman los ORF5 y ORF7. Estas muestras provienen de los Estados de Jalisco (3), Puebla (4), Guanajuato (1) y Veracruz (12), las cuales fueron ingresadas a el GenBank.

Tabla 4. Secuencias del vPRRS: identificación, tipo de muestra y número de acceso en GenBank

Identificación	Tipo de muestra	No. de acceso en el GenBank	
		Gp5	Nucleocápside
vPRRS/Mex/Jal/DMZC181/2015	suero	MF279253	MF352172
vPRRS/Mex/Jal/DMZC205/2015	suero	MF279254	MF352173
vPRRS/Mex/Pue/DMZC217/2015	suero	MF279255	MF352174
vPRRS/Mex/Ver/DMZC01/2015	suero	MF279256	MF352175
vPRRS/Mex/Ver/DMZC02/2015	suero	MF279257	MF352176
vPRRS/Mex/Ver/DMZC03/2015	suero	MF279258	MF352177
vPRRS/Mex/Ver/DMZC04/2015	suero	MF279259	MF352178
vPRRS/Mex/Ver/DMZC05/2015	suero	MF279260	MF352179
vPRRS/Mex/Pue/DMZC06/2015	suero	MF279261	MF352180
vPRRS/Mex/Pue/DMZC07/2015	suero	MF279262	MF352181
vPRRS/Mex/Pue/DMZC08/2015	suero	MF279263	MF352182
vPRRS/Mex/Gto/DMZC43/2016	pulmón	MF279264	MF352183
vPRRS/Mex/Jal/DMZC144/2016	pulmón	MF279265	MF352184
vPRRS/Mex/Ver/DMZCIN27-1/2016	BAL	MF279266	MF352185
vPRRS/Mex/Ver/DMZCIN27-2/2016	BAL	MF279267	MF352186
vPRRS/Mex/Ver/DMZCIN27-3/2016	BAL	MF279268	MF352187
vPRRS/Mex/Ver/DMZCIN27-4/2016	BAL	MF279269	MF352188
vPRRS/Mex/Ver/DMZCIN27-5/2016	BAL	MF279270	MF352189
vPRRS/Mex/Ver/DMZCIN27-6/2016	BAL	MF279271	MF352190
vPRRS/Mex/Ver/DMZCIN27-7/2016	BAL	MF279272	MF352191

Análisis filogenético de ORF5

El análisis filogenético incluye 316 secuencias de nucleótidos del ORF5 del PRRSv de los estados de Jalisco, Puebla, Guanajuato y Veracruz procedentes de este estudio, secuencias obtenidas del GenBank y secuencias publicadas por Shi et al., 2010a, 2010b, 2013.

La relación filogenética del ORF5 demuestra que las secuencias incluidas se clasifican en diferentes ramas, en las cuales se encuentran distribuidas las secuencias mexicanas de este estudio y estudios previos.

En la rama superior se observa un cluster que incluye las cepas del estado de Veracruz y dos cepas de Jalisco, las cuales comparten este grupo con mas cepas mexicanas y dos muestras históricas aisladas en los Estados Unidos (USA): SDSU73 que fue aislada como cepa atípica en 1996 en cerdas con alto porcentaje de abortos, mortalidad en cerdas gestantes y afección en cerdos jóvenes, cepa Abst vacc, además de otras cepas que han sido clasificadas como linaje 8. En la rama de las secuencias del linaje 8, pero en un cluster diferente se agrupó una secuencia del estado de Puebla identificada en 2015 con estrecha relación filogenética con las muestras históricas 98-31701 aislada en Iowa (USA) en cerdos vacunados, cepa 24901 aislada en Guatemala en 1994 y la cepa P129.

En un grupo diferente se ubican cepas mexicanas ciad que muestran estrecha relación con cepas históricas previamente clasificadas como linaje 8 :IngelvacATP y JA-142 aislada en 1997 en USA.

En la rama media del árbol se encuentra el cluster de las cepas clasificadas como linaje 5 que incluye las secuencias históricas NADC8 aislada en USA en 1992, Jyn1 aislada en Japón, LU534 aislada en Australia, la cepa de referencia para PRRS tipo americano VR2332 aislada en 1991, PA8 aislada en Canadá e IngelvacMLV, además de la cepa Pue/DMZC217 identificada en México en 2015.

En la rama inferior se formaron diferentes clusters que agrupan a las cepas del los linajes 1, 2, 3 y 4. En el cluster del linaje uno se encuentran las cepas mexicanas identificadas como Gto/DMZC43/2016(MEX) y las secuencias Pue/DMZC06/2015(MEX) y Pue/DMZC07/2015(MEX), que se relacionan estrechamente con las cepas 02SP3 de Tailandia, 98-3298 de USA y la IAF-EXP91 de Canadá (figura 8).

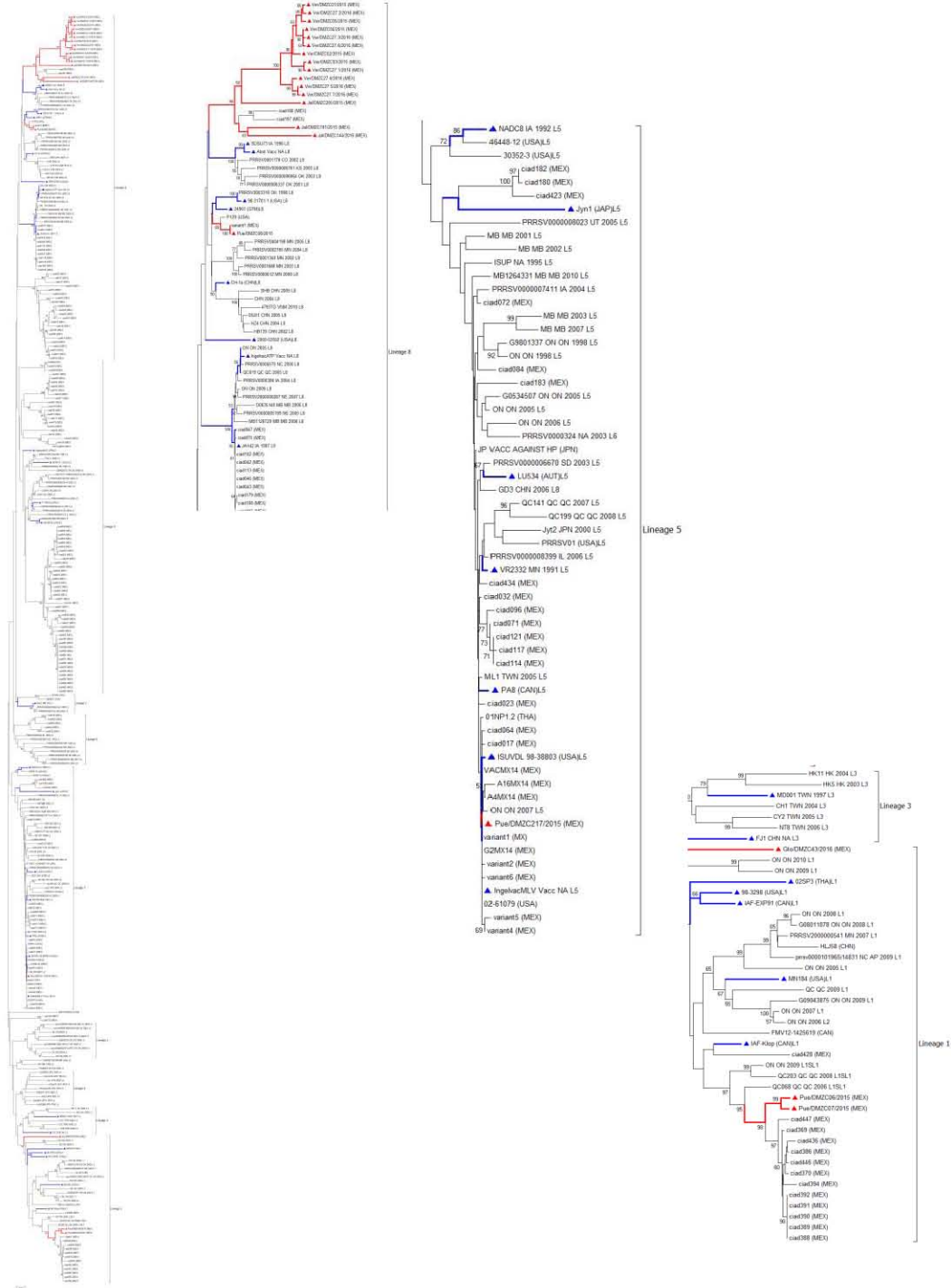


Figura 8. Árbol filogenético contruido con secuencias nucleotídicas de la región ORF5 del vPRRS.

Análisis filogenético molecular de 316 secuencias de nucleótidos del ORF5 del vPRRS por el método Neighbor-Joining, usando un bootstrap test de 1000 replicas. Los triángulos en color rojo representan las cepas obtenidas en este estudio, en color azul las cepas históricas previamente reportadas. Se muestran los valores de bootstrap $\geq 50\%$.

Cambios en la secuencia de ORF5 (nt y aa)

La comparación de la secuencias de nucleótidos indica una similitud del 78.2-99.8 % entre las cepas obtenidas en este estudio y del 80.9–98.3 % al comparar estas nuevas cepas reportadas con la cepa de referencia VR2332. La mayor divergencia genética entre las secuencias reportadas en este estudio se encuentra entre las cepas de Jalisco y Puebla y Guanajuato (tabla 5).

Tabla 5. Similitud entre las secuencias de nucleótidos del ORF5 del vPRRS.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	EF536003.1 VR2332	***	85.4	80.9	81.7	82.6	88.7	98.3	83.9	84.4	82.1	82.3	82.3	82.4	82.1	82.6	81.8	81.8	82.8	83.4	82.3	83.3
2	Gto/DMZC043/2016		***	80.9	82.1	82.9	85.6	84.9	84.7	85.2	83.1	83.6	83.3	83.1	83.1	83.3	83.1	82.8	82.8	83.3	82.9	83.1
3	Jal/DMZC144/2016			***	86.4	87.1	86.3	80.4	78.2	78.4	82.8	83.7	82.7	83	83.2	82.7	82.8	82.5	83.7	83.8	82.8	83.7
4	Jal/DMZC181.2/2015				***	86.8	86.6	81.6	79.2	79.7	84.3	85.3	83.9	84.3	84.1	83.9	83.9	84.1	84.8	85.3	84.1	85.1
5	Jal/DMZC205/2015					***	87	82.7	80.4	80.3	86.6	86.8	86.6	86.3	86.6	86.6	86.5	85.8	87.8	87	86	86.6
6	Pue/DMZC/2015						***	89.3	83.2	83.1	85.3	86.3	85.5	85.6	85.1	85.5	85.1	85.1	86.3	86.5	85.5	86.3
7	Pue/DMZC217/2015							***	84	84.1	82	82.2	82.5	82.3	82	82.8	81.7	81.7	82.7	83.3	82.2	83.2
8	Pue/DMZCH/2015								***	97.2	80.4	80.7	80.4	80.7	80.5	80.4	80.4	80.4	79.4	80	80.5	79.9
9	Pue/DMZCM/2015									***	80.4	80.4	80.3	80.8	80.6	80.3	80.4	80.4	79.4	80.1	80.6	79.9
10	Ver/DMZC01/2015										***	98.2	97.9	98.7	99	97.5	99.3	98.7	95.7	95.6	98.5	95.4
11	Ver/DMZC02/2015											***	98	98.5	97.7	97.7	97.7	98.2	95.6	95.7	98.7	95.9
12	Ver/DMZC03/2015												***	97.9	97.2	99.7	97	97.5	95.1	94.7	98	94.9
13	Ver/DMZC04/2015													***	98.5	97.5	97.9	99.7	95.6	95.7	99.8	95.6
14	Ver/DMZC05/2015														***	96.9	99.2	98	95.7	95.6	98.2	95.2
15	Ver/DMZCIN27-1/2016															***	96.7	97.2	95.1	94.7	97.7	94.9
16	Ver/DMZCIN27-2/2016																***	98	95.6	95.4	97.7	95.2
17	Ver/DMZCIN27-3/2016																	***	95.1	95.2	99.5	95.1
18	Ver/DMZCIN27-4/2016																		***	98.7	95.4	98.5
19	Ver/DMZCIN27-5/2016																			***	95.6	99.8
20	Ver/DMZCIN27-6/2016																				***	95.7
21	Ver/DMZCIN27-7/2016																					***

Similitud expresada en porcentaje entre las secuencias obtenidas en el presente estudio al comparar la región ORF5 con la cepa de referencia VR2332 (GenBank número de acceso EF536003.1) y entre ellas mismas.

El alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos del ORF5 del vPRRS de las 20 cepas del DMZC y la cepa de referencia americana VR2332 (GenBank número de acceso EF536003.1) demuestra que las cepas provenientes del Estado de Veracruz presentan una inserción de dos tripletes de nucleótidos: 90ACC y 108AGC al ser comparadas con la cepa de referencia VR2332, generando una longitud de 609 nucleótidos. Todas las secuencias obtenidas presentan sustituciones en diferentes posiciones.

Al inferir la secuencia de aminoácidos (aa), se identificaron numerosos cambios con respecto a la cepa de referencia (tabla 6). Los cambios observados con mayor frecuencia fueron: E3G, Y11C, S32N/D, N33S/G, D34S/N/T, S35N, L39/F, D54K/G/E, N58K/H/G/D/E, S66T, V91A, A92G, V94A/I/L, T95I, V102Y/C/H, V124A/T/I, F127L, A128T, A137S/T, R164G, I189V/L/S y R191K. Además, hubo sustituciones que sólo se presentaron en cepas de un mismo estado, principalmente en Veracruz, con cambios como L2W, T7I, L41S, L45M, D54K/G/E y R199H. Todas las cepas del Estado de Veracruz presentan inserción de una treonina (T) entre las posiciones 30-31 y una serina (S) entre los aminoácidos 36-37, también presente en una muestra de Jalisco del año 2016.

Los dominios funcionales de Gp5 como el péptido señal, ectodominio, regiones transmembrana y endodominio fueron identificados en las secuencias de aminoácidos. Las primeras 26 posiciones corresponden al dominio del péptido señal, en el cual se observaron los siguientes cambios de aa: L2W en todas las secuencia provenientes del Estado de Veracruz, L2S en Jal/DMZC144/2016, E3G en todas las cepas excepto en Pue/DMZC217/2016, K4N/R en Jal/DMZC181/2015 y Ver/DMZCIN27-02/2016, C5Y en Veracruz y Jalisco, T7I en Veracruz, G9V/A para Jalisco y Veracruz, C19Y Jal/DMZC181/2015 y cepas de Veracruz, F25L/S en Jal/DMZC205/2015 y las cepas de Veracruz, A26V en Guanajuato, Puebla y Veracruz; entre otros cambios observados.

Table 6. Sustitución de aminoácidos presentes en la región ORF5 de las cepas de vPRRS aisladas en México al ser comparadas con la cepa de referencia VR2332.

Posición	2	3	4	5	7	9	11	12	13	14	15	16	17	19	24	25	26	27	28	29	30	32	33	34	35	39	41	44	45	47	54		
VR2332 EF536003.1	L	E	K	C	T	G	Y	S	Q	L	L	S	L	C	C	F	A	V	L	V	N	-	S	N	D	S	-	L	L	N	L	L	D
Jal/DMZC181/2015	.	G	N	.	.	V	C	.	R	.	F	.	.	Y	-	N	.	S	N	-	F	.	.	.	I	.
Jal/DMZC205/2015	.	G	.	.	.	V	C	.	R	.	.	.	S	.	.	L	-	N	S	N	.	-	F	.	.	.	I	.
Pue/DMZC217/2015	C	A	.	-	-
Ver/DMZC01/2015	W	G	.	Y	I	A	C	Y	.	S	V	T	.	G	T	N	S	F	S	.	M	.	K
Ver/DMZC02/2015	W	G	.	Y	I	A	C	Y	.	S	V	T	.	G	T	N	S	F	S	D	M	.	G
Ver/DMZC03/2015	W	G	.	Y	I	A	C	Y	.	S	V	.	.	A	.	T	.	S	T	N	S	F	S	D	M	.	E
Ver/DMZC04/2015	W	G	.	Y	I	A	C	Y	.	S	V	T	.	G	T	N	S	F	S	.	M	.	E
Ver/DMZC05/2015	W	G	.	Y	I	A	C	Y	.	S	V	T	.	G	T	N	S	F	S	K	M	.	.
Pue/DMZC06/2015	.	G	.	.	.	C	F	V	.	P	T	.	.	-	D	.	R	.	-	I	.
Pue/DMZC07/2015	.	G	.	.	.	C	.	.	.	F	V	.	P	T	S	.	-	D	.	S	.	-	I	.
Pue/DMZC08/2015	.	G	.	.	.	C	.	R	W	G	D	.	-	N	S	S	.	-	F
Gto/DMZC43/2016	.	G	.	.	.	C	L	.	S	.	F	V	A	.	.	T	.	-	D	.	T	.	-	I	.
Jal/DMZC144/2016	S	G	.	Y	.	V	.	R	.	.	.	S	D	-	N	.	S	N	S	F
Ver/DMZCIN27-1/2016	W	G	.	Y	I	A	C	Y	.	S	V	.	.	A	.	T	.	S	T	N	S	F	S	D	M	.	E
Ver/DMZCIN27-2/2016	W	G	R	Y	I	A	C	Y	.	S	V	T	.	G	T	N	S	F	S	.	M	.	N
Ver/DMZCIN27-3/2016	W	G	.	Y	I	A	C	Y	.	S	V	T	.	G	T	N	S	F	S	.	M	.	K
Ver/DMZCIN27-4/2016	W	G	.	.	.	A	C	.	R	.	P	.	.	Y	.	S	V	T	.	G	S	N	S	F	S	.	M	.	.
Ver/DMZCIN27-5/2016	W	G	.	.	.	A	C	.	R	Y	.	S	V	T	.	G	N	N	S	F	S	.	M	.	.
Ver/DMZCIN27-6/2016	W	G	.	Y	I	A	C	Y	.	S	V	T	.	G	T	N	S	F	S	D	M	.	E
Ver/DMZCIN27-7/2016	W	G	.	.	.	A	C	.	R	Y	.	S	V	T	.	G	N	N	S	F	S	D	M	.	.

La composición de aminoácidos fue deducida de las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio, sólo se indican las posiciones que presentaron cambios; las inserciones se muestran con sombra gris

Continuación de Tabla 6. Sustitución de aminoácidos presentes en la región ORF5 de las cepas de vPRRS aisladas en México al ser comparadas con la cepa de referencia VR2332.

Posición	57	58	59	61	66	72	80	90	91	92	94	95	101	102	104	106	114	120	121	124	127	128	137	146	151	164	167	170	187	189	191	198	199	200
VR2332 EF536003.1	A	N	K	D	S	V	G	T	V	A	V	T	F	V	G	Y	V	L	T	V	F	A	A	L	R	R	V	E	T	I	R	G	R	P
Jal/DMZC181/2015	S	H	N	.	T	G	.	.	Y	Y	.	.	I	.	.	F	L	T	S	.	.	G	.	.	.	L	K	.	.	.
Jal/DMZC205/2015	G	G	.	.	T	.	.	M	A	G	.	.	.	Y	E	L	T	S	.	.	G	.	.	.	L	K	.	.	.
Pue/DMZC217/2015	G
Ver/DMZC01/2015	.	G	R	.	T	.	.	A	G	A	I	.	Y	A	L	T	S	.	.	G	.	.	.	L	K	.	H	L
Ver/DMZC02/2015	.	D	.	.	T	.	.	A	G	A	I	.	Y	A	L	T	S	.	.	G	.	.	.	L	K	.	H	L
Ver/DMZC03/2015	.	G	.	.	T	.	.	A	G	A	I	.	Y	T	.	T	S	.	.	G	.	.	A	L	K	.	H	L
Ver/DMZC04/2015	.	D	R	.	T	.	.	A	G	A	I	.	C	I	A	L	T	S	Q	.	G	.	.	.	L	K	.	H	L
Ver/DMZC05/2015	V	G	R	.	T	.	.	A	G	A	I	.	C	A	L	T	S	.	.	G	.	.	.	L	K	.	H	L
Pue/DMZC06/2015	N	D	.	.	T	L	.	A	G	I	.	Y	Y	.	H	.	.	I	.	L	T	T	.	K	G	I	N	.	V	K	.	.	.	
Pue/DMZC07/2015	K	D	.	.	T	L	.	A	G	I	.	Y	Y	.	H	.	.	I	.	L	T	S	.	K	G	I	N	.	V	K	.	.	.	
Pue/DMZC08/2015	.	E	.	.	T	.	C	.	.	G	.	.	Y	I	.	L	.	S	L	.	.	.	L	
Gto/DMZC43/2016	D	K	.	.	T	.	.	A	G	L	.	Y	Y	I	L	.	S	.	.	G	.	.	.	V	K	C	.	.	
Jal/DMZC144/2016	G	D	N	N	T	.	.	.	G	.	.	Y	H	F	.	A	L	T	S	.	.	G	.	G	S	L	K	.	L	
Ver/DMZCIN27-1/2016	.	G	.	.	T	.	.	A	G	A	I	.	Y	T	.	T	S	.	.	G	.	.	A	L	K	.	H	L
Ver/DMZCIN27-2/2016	V	G	R	.	T	.	.	A	G	A	I	.	Y	R	A	L	T	S	.	.	G	.	.	.	L	K	.	H	L
Ver/DMZCIN27-3/2016	T	D	R	.	T	.	.	A	G	A	I	.	C	I	A	L	T	S	Q	.	G	.	.	.	L	K	.	H	L
Ver/DMZCIN27-4/2016	.	G	.	.	T	.	.	A	G	A	I	.	Y	A	L	.	S	.	.	G	.	.	.	S	K	.	H	L
Ver/DMZCIN27-5/2016	.	D	.	.	T	.	.	A	G	A	I	.	Y	A	L	.	S	.	.	G	.	.	.	S	K	.	H	L
Ver/DMZCIN27-6/2016	.	D	R	.	T	.	.	A	G	A	I	.	C	I	A	L	T	S	Q	.	G	.	.	.	L	K	.	H	L
Ver/DMZCIN27-7/2016	.	D	.	.	T	.	.	A	G	A	I	.	Y	A	L	.	S	.	.	G	.	.	.	S	K	.	H	L

La composición de aminoácidos fue deducida de las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio, sólo se indican las posiciones que presentaron cambios.

El ectodominio de Gp5 está ubicado entre los aa 27-64 y en el cual también se presentan cambios al comparar las secuencias obtenidas y la secuencia de la cepa de referencia. V27A en la cepa del Estado de Guanajuato, L28P en Pue/DMZCHz/2015, V29A/T/G para Puebla y Veracruz, N30T/D/S cepas de Jalisco, Guanajuato y Puebla, todas las cepas del Estado de Veracruz tienen una inserción de una treonina y serina.

Algunos de los cambios mencionados se encuentran en posiciones con importancia biológica y estructural, por ejemplo, en el sitio de glicosilación N33 donde se observaron sustituciones por los aa treonina, serina, asparagina o arginina en las secuencias de Veracruz (tabla 7). Además en este dominio se ubica el principal epítipo neutralizante (aa 36 – 52), en el cual se identificó la inserción de una serina; L39F, la cual junto con H38 son aminoácidos críticos en este epítipo; L41S, en el sitio de glicosilación N44D/K y L45M para Veracruz y L47I en Jalisco, Guanajuato y Puebla.

En el dominio de transmembrana uno (TM1), ubicado entre los aa 65-82, en la posición S66 en todos los casos hubo cambio por una treonina, excepto en el virus Pue/DMZC217/2015; V72L y G80C en cepas del Estado de Puebla.

En el dominio de transmembrana dos (TM2), ubicado entre los aa 96-100, no se observaron cambios con respecto a la cepa de referencia VR2332. La cepa Pue/DMZC217/2015 es la cepa con menores cambios al ser comparada a la cepa VR2332, sólo presentó cambio en tres aa.

Análisis filogenético de ORF7

El análisis filogenético incluye 93 secuencias de nucleótidos del ORF7 del PRRSv de los estados de Jalisco, Puebla, Guanajuato y Veracruz procedentes de este estudio, secuencias obtenidas del GenBank .

La relación filogenética del ORF7 demuestra que las secuencias incluidas se clasifican en diferentes ramas, en las cuales se encuentran distribuidas las secuencias mexicanas (MEX) de este estudio y estudios previos (figura 9).

En la rama superior se observa un cluster que incluye únicamente las cepas del estado de Veracruz y en la misma rama pero en un cluster diferente se agrupan las tres cepas de Jalisco de este estudio de los años 2015 y 2016, con dos cepas mexicanas reportadas en el Genbank.

Algunas cepas mexicanas reportadas por Batista et al., 2004 del estado de Puebla y Sonora forma un cluster que incluye además la cepa Pue/DMZC08/2015(MEX) y las cepas históricas de Estados Unidos (USA) JA-142, IngelvacATP, MN30100, cepa China (CHN) CH-1a y la P129.

En una rama diferente y ubicada en la parte media del árbol se agruparon dos cepas del estado de Puebla 06 y 07 del año 2015 en estrecha relación filogenética con la cepa histórica de USA MN184 y de Canadá IAF-Klop.

En la rama inferior se formaron dos clados, uno de ellos con la cepa de Guanajuato de este estudio mostrando estrecha homología con cepas mexicanas reportadas previamente por Batista et. al. provenientes del estado de Sonora y Puebla. En el segundo clado de esta rama se encuentra la cepa Pue/DMZC217/2015 en estrecha relación con cepas históricas ISU-P, NADC-8 de USA, PA8 de CAN y la cepa de referencia americana VR2332.

Análisis filogenético molecular de 93 secuencias de nucleótidos del ORF7 del vPRRS por el método Neighbor-Joining, usando un bootstrap test de 1000 replicas. Los triángulos en color rojo representan las cepas obtenidas en este estudio, en color azul las cepas históricas previamente reportadas. Se muestran los valores de bootstrap $\geq 50\%$.

Cambios en la secuencia de ORF7 (nt y aa)

La comparación de las secuencias de nucleótidos de ORF7, indica que las cepas endémicas de México del vPRRS tienen una similitud del 81.8 al 100% entre ellas y del 87.8 al 99.5% al ser comparadas con la secuencia del VR2332 (tabla 8).

Tabla 8. Similitud entre las secuencia de nucleótidos del ORF7 del vPRRS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	EF536003.1VR2332	88.5	91.2	92.3	91.3	94.1	99.5	89.8	90.6	90.8	91	91.1	91.6	90.8	91.4	90.4	91.3	87.8	90.6	91.6	89.9
2	Gto/DMZC043/2016		84.8	87.8	85.5	87.1	88.5	82.4	82.1	84	84.3	83.6	84.5	83.6	83.5	83.2	84.3	81.8	84.4	84.6	83.8
3	Jal/DMZC144/2016			93.8	91.7	90.9	91.2	85.5	85.8	89.5	89.8	90.2	89.5	89.2	90.4	89.1	89.2	87.1	90.3	89.5	89.8
4	Jal/DMZC181.2/2015				93.9	92.5	92.3	86.4	86.1	90	90.3	90.6	90.5	89.8	90.7	89.7	90.3	87.6	90.9	90.6	90.3
5	Jal/DMZC205/2015					91.3	91.3	87.1	87.4	89.7	90	89.7	89.7	89.6	90.1	89.4	89.4	87.3	90.6	89.7	90
6	Pue/DMZC/2015						94.6	87.3	87.3	91.6	91.8	91.9	91.8	91.6	91.9	91.2	91.6	88.6	91.4	91.8	90.8
7	Pue/DMZC217/2015							89.5	90.3	91	91.3	91.3	91.8	91	91.7	90.7	91.6	88.1	90.9	91.8	90.2
8	Pue/DMZCH/2015								98	85.6	85.3	86.5	86.4	85.1	86.5	84.8	86.1	83.3	86.5	86.4	85.9
9	Pue/DMZCM/2015									85.3	85.6	86.2	86.1	85.3	86.5	85	85.9	83	85.7	86.1	85.1
10	Ver/DMZC01/2015										98.1	97	98.1	99.2	97.4	99.3	98.4	93.6	96.5	98.1	95.9
11	Ver/DMZC02/2015											96.7	97.8	97.8	97.1	98	97.6	93.4	96.2	97.8	95.7
12	Ver/DMZC03/2015												98.4	96.7	99.6	96.7	98.1	92.8	95.2	98.4	95.1
13	Ver/DMZC04/2015													97.8	98.5	98	99.7	93.9	96.7	100	96.2
14	Ver/DMZC05/2015														97.1	99.6	98.1	93.4	96.2	97.8	95.7
15	Ver/DMZCIN16-27-1/2016															97.3	98.2	92.9	95.8	98.5	95.2
16	Ver/DMZCIN16-27-2/2016																98.2	93.5	96.1	98	95.8
17	Ver/DMZCIN16-27-3/2016																	93.6	96.5	99.7	95.9
18	Ver/DMZCIN16-27-4/2016																		96.6	93.9	96.6
19	Ver/DMZCIN16-27-5/2016																			96.7	99.5
20	Ver/DMZCIN16-27-6/2016																				96.2
21	Ver/DMZCIN16-27-7/2016																				

Similitud expresada en porcentaje de las secuencias obtenidas en el presente estudio al comparar las secuencias de nucleótidos del ORF7 con la cepa de referencia VR2332 (GenBank, número de acceso EF536003.1) y entre ellas mismas.

El alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos del ORF7 del vPRRS de las cepas endémicas de México y la cepa de referencia VR2332 (GenBank número de acceso EF536003.1) demuestra que todas las cepas presentan sustituciones en diferentes posiciones. La longitud de la secuencia del ORF7 del PRRSV2 es de 372 nucleótidos, las cepas de Jalisco tuvieron una longitud de 375 nucleótidos y la cepa de Guanajuato 372 nucleótidos. En este sentido y con respecto a la cepa de referencia, las cepas del Estado de Jalisco presentaron inserción de 3 nucleótidos entre las posiciones 128-129, Jal/DMZC144/2016 inserción de AAA, Jal/DMZC181/2015 inserción AGG y Jal/DMZC205/2015 inserción de AAG. Por su parte, la cepa del Estado de Guanajuato presentó delección de 3 nucleótidos CAG en las posiciones 354 a 356.

Los cambios observados en las secuencias de nucleótidos tuvieron efecto en la deducción de las secuencias de aa (tabla 9), se encontraron diferentes sustituciones de aminoácidos en las cepas de México, las más comúnmente identificadas fueron N10K/R, R11K, K12N, D15N, K47R, N48S, V116A y A118T. En la tabla 8 se muestran las posiciones con sustituciones o inserciones de aminoácidos identificados en las cepas endémicas de México, tomando como referencia la cepa VR2332, todas las cepas provenientes del Estado de Jalisco presentaron inserción de dos aa KG, RR y KK ubicados entre los aa 42 -43.

Los epítopes lineales y discontinuos de ORF7, previamente descritos por otros autores fueron identificados en las secuencias de aa obtenidas en el presente estudio, observando que las sustituciones e inserciones de aa están ubicadas en algunos de los dominios funcionales de esta proteína (tabla 10). Las cepas mexicanas del vPRRS mostraron cambios en los determinantes antigénicos conformados por los aa 2 a 12, en los cuales todas las cepas tuvieron sustituciones en los últimos tres aminoácidos; el epítope de la posición 42-48 tuvo inserción de dos aminoácidos y sustituciones en diferentes posiciones. Además se identificaron epítopes lineales y fragmentos de epítopes discontinuos como los ubicados en las posiciones 25 a 30 y 78 a 86, que se mantienen conservados en todas las cepas.

Table 9. Sustitución de aminoácidos presentes en la región genética de ORF7 de las cepas de vPRRS aisladas en México al ser comparadas con la cepa de referencia VR2332.

Posición	3	5	7	8	10	11	12	13	15	28	36	39	42-43	43	44	45	47	48	49	69	90	97	100	108	116	117	118	119	120	121	
VR2332 EF536003.1	N	N	K	Q	N	R	K	K	D	K	S	K	-	-	K	N	K	K	N	P	S	T	I	T	H	V	T	A	S	P	S
Jal/DMZC181/2015	K	K	N	Q	N	.	.	.	K	G	.	.	R	A	.	T	.	.	.	
Jal/DMZC205/2015	K	K	N	Q	K	.	.	.	R	R	N	.	R	S	A	
Pue/DMZC217/2015	K	-	-	
Ver/DMZC01/2015	.	S	.	.	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Ver/DMZC02/2015	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Ver/DMZC03/2015	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Ver/DMZC04/2015	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Ver/DMZC05/2015	.	S	.	R	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Pue/DMZC06/2015	K	.	R	.	R	P	.	.	-	-	R	.	R	S	.	.	V	A	.	A	.	A	.	T	.	.	
Pue/DMZC07/2015	K	.	.	.	R	P	.	.	-	-	R	.	.	S	.	.	V	A	.	A	.	A	.	T	.	.	
Pue/DMZC08/2015	K	K	.	N	-	-	S	.	.	.	G	
Gto/DMZC43/2016	S	.	R	.	K	K	N	R	.	.	R	.	-	-	I	R	.	L	G	S	.	.	Q	.	A	.	-	.	.	.	
Jal/DMZC144/2016	K	K	N	Q	S	.	R	K	K	.	.	R	.	.	I	A	.	T	P	.	.	.	
Ver/DMZCIN27-1/2016	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Ver/DMZCIN27-2/2016	.	S	.	R	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Ver/DMZCIN27-3/2016	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Ver/DMZCIN27-4/2016	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	.	.	.	S	.	
Ver/DMZCIN27-5/2016	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	R	S	A	
Ver/DMZCIN27-6/2016	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	.	.	S	A	
Ver/DMZCIN27-7/2016	R	K	N	.	N	.	.	.	-	-	.	R	S	A	.	.	.	S	P	

La composición de aminoácidos fue deducida de las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio. Sólo se indican las posiciones que presentaron cambios. Las inserciones se muestran en sombra gris.

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de epítopes lineales en el ORF7 del vPRRS y su alineamiento con la cepa de referencia VR2332.

	Epítoto lineal												ORF7a																														
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53			
VR2332 EF536003.1	P	N	N	N	G	K	Q	Q	N	R	K	M	L	G	K	I	I	A	Q	Q	N	Q	S	R	G	K	G	P	G	-	-	K	N	K	K	K	N	P	E	K	P	H	
Jal/DMZC181/2015	K	K	N	K	G	.	.	.	R
Jal/DMZC205/2015	K	K	N	R	R	N	.	.	.	R	S
Pue/DMZC217/2015	K	
Ver/DMZC01/2015	.	.	.	S	R	K	N	S	
Ver/DMZC02/2015	R	K	N	S	
Ver/DMZC03/2015	R	K	N	S	
Ver/DMZC04/2015	R	K	N	S
Ver/DMZC05/2015	.	.	.	S	.	.	R	.	.	R	K	N	S
Pue/DMZC06/2015	K	.	R	.	.	R	.	.	.	P	R	.	.	R	S		
Pue/DMZC07/2015	K	R	.	.	.	P	R	.	.	S		
Pue/DMZC08/2015	K	K	S	
Gto/DMZC43/2016	.	S	.	.	.	R	.	.	.	K	K	N	R	I	R		
Jal/DMZC144/2016	K	K	N	R	.	.	K	K	.	.	.	R	
Ver/DMZCIN27-1/2016	R	K	N	S	
Ver/DMZCIN27-2/2016	.	.	.	S	.	.	R	.	.	R	K	N	S	
Ver/DMZCIN27-3/2016	R	K	N	S	
Ver/DMZCIN27-4/2016	R	K	N	S	
Ver/DMZCIN27-5/2016	R	K	N	R	S	
Ver/DMZCIN27-6/2016	R	K	N	S	
Ver/DMZCIN27-7/2016	R	K	N	R	S		

Mutaciones observadas en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que conforman determinantes antigénicos importantes en ORF7. Las inserciones se muestran con sombra gris.

VIII. DISCUSIÓN

En México, las explotaciones porcinas se han visto afectadas por el vPRRS. Se ha detectado la presencia del virus y anticuerpos específicos para esta enfermedad en cerdos de diferentes regiones del país y de diferentes etapas productivas. En este estudio se describe por primera vez en una muestra representativa de las diferentes regiones de México, la prevalencia del virus de PRRS, así como, la probabilidad de contacto con el mismo (fig 7). La prevalencia y seroprevalencia de esta enfermedad en las explotaciones porcinas puede estar asociada a diferentes factores como la región en la que se ubican las granjas y la etapa productiva de los cerdos.

En todas las regiones se identificaron cerdos con anticuerpos específicos para el virus de PRRS (tabla 3). Aproximadamente, la mitad de la población de cerdos incluidos en este estudio (42.09%) ha generado una respuesta de anticuerpos contra el virus. Identificamos que del total de sueros con anticuerpos para el virus de PRRS, la mayor proporción son sueros con anticuerpos para virus de campo, lo que sugiere que una mayor proporción de cerdos han estado expuestos a cepas de campo contra la proporción de cerdos que probablemente han sido vacunados para esta enfermedad.

Además, una quinta parte de los sueros analizados son ELISA positivos para ambas cepas (vacunal y de campo), desafortunadamente no fue posible conocer cuáles de estos cerdos han sido vacunados contra esta enfermedad y poder diferenciar si estos dobles positivos se deben a vacunación o a desafío con cepas de campo.

En el presente estudio, la prevalencia del virus de PRRS a nivel nacional (4.6%) es menor que la prevalencia estimada a nivel de granja (13.09%). Estos resultados pueden atribuirse a que según datos del INEGI, el mayor número de existencias de ganado no corresponde a las entidades con mayor número de unidades de producción de ganado porcino; el 58.2% de estas unidades se concentran en siete Estados: 13.7% en Veracruz, 11.2% en Puebla, 9.1% en Guerrero, 7.1% en Oaxaca, 6.4% en San Luis Potosí, 5.5% en Chiapas y 5.2% en Guanajuato (INEGI, 2007).

A nivel regional, la prevalencia del virus de PRRS es estadísticamente significativa a través de las regiones. Las regiones con mayor presencia del virus son Centro-sur y Noroeste; en la región Occidente se identificó una menor prevalencia al vPRRS, mientras que todos los cerdos procedentes de la región Suroeste fueron negativos a la presencia del virus. En el Noreste, Oriente, Centro-norte y Sureste del país la prevalencia de esta enfermedad es similar entre sí.

En la región Noreste (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas) sólo en el estado de Coahuila se detectó la presencia del virus. Probablemente porque los Estados que conforman esta región no juegan un papel importante en la porcicultura nacional por tener un bajo inventario de porcinos y granjas semitecnificadas y tecnificadas. En esta región, aproximadamente una sexta parte de la población de cerdos ha sido infectada por el vPRRS, principalmente por cepas de campo, donde se observó mayor seroprevalencia.

En la región Noroeste (Baja California Sur, Baja California Norte, Chihuahua, Durango, Sinaloa y Sonora) también se identificó la presencia del vPRRS, siendo la segunda región con mayor prevalencia. Es importante considerar que en el Estado de Sonora se alojan el 0.3% de las unidades de producción porcina en las que concentra el 18.8% del inventario porcino, siendo el primer lugar a nivel nacional, el cual distribuye a grandes ciudades como Ciudad de México y Guadalajara, y destina animales para la exportación (INEGI, 2007; SIAP, 2013). Según los resultados obtenidos, uno de cada dos cerdos de esta región ha generado una respuesta de anticuerpos anti-vPRRS, con mayor frecuencia contra cepas de campo.

La menor circulación viral se identificó en la región Occidente (Nayarit, Colima, Michoacán y Jalisco). Sin embargo, esta región ocupa el segundo lugar de cerdos con anticuerpos anti-vPRRS. Aproximadamente un tercio de la población analizada ha generado una respuesta de anticuerpos para cepas de campo y la cepa vacunal, lo cual puede atribuirse a que el Estado de Jalisco tiene gran variedad de sistemas y tipos de productores, encontrando incluso un gran número de pequeños productores en la zona urbana (Bobadilla SEE, *et al.*, 2010) concentra el 1.6% de las unidades de producción.

Jalisco ocupa el segundo lugar a nivel nacional del inventario porcino, es uno de los Estados que concentra y vende un mayor número de vientres, al igual que Michoacán (INEGI, 2007; SIAP, 2013), estado no incluido en este estudio.

En la región Oriente (Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Veracruz) se observó pocas muestras con la presencia del vPRRS, aunque aproximadamente uno de cada cuatro cerdos ha sido infectado con cepas de campo, ya que la mayor proporción de cerdos con anticuerpos anti-vPRRS fue para la cepa de campo.

En esta región, los Estados de Veracruz y Puebla desempeñan un papel importante en la porcicultura nacional ya que juntos concentran el 24.9% de la unidades de producción de ganado porcino y el 14.8% del inventario nacional de cerdos (INEGI, 2007; SIAP, 2013).

En la región Centro-Norte (Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas) el vPRRS se identificó en pocos casos, lo cual no significa que los cerdos alojados en esta región no se infecten con el virus, aproximadamente uno de cada 2 cerdos ha sido infectado, ya que presentan anticuerpos específicos para esta enfermedad.

La prevalencia más alta a nivel nacional se encontró en la región Centro-Sur (Ciudad de México, Estado de México y Morelos), aproximadamente en uno de cada cuatro cerdos se pudo identificar la presencia del virus. Cabe mencionar que en esta región predominan las unidades de producción porcina de tipo semitecnificado, principalmente en el Estado de México.

En el Sureste (Campeche, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán) hay presencia del vPRRS (6.2%) pero no significativamente diferente a las regiones Noreste, Oriente y Centro-Norte. La prevalencia de esta zona está determinada por Yucatán. En Campeche, Quintana Roo y Tabasco no se identificaron muestras positivas.

En la región Suroeste no se identificaron cerdos positivos a la presencia del virus, aunque en esta región se encuentran Guerrero, Oaxaca y Chiapas, que según datos del INEGI, alojan el 21.7% de las unidades de producción porcina del país, principalmente de traspatio.

La importancia de esta enfermedad radica en las pérdidas económicas que genera en la

industria porcina a nivel mundial. Para poder controlar el PRRS es necesario conocer su prevalencia y seroprevalencia, así como los factores de riesgo que predisponen a esta infección: tipo de explotación, fin zootécnico, etc (Rovelo *et al.*, 2010).

Holtkamp y colaboradores (2013), demostraron que el costo total de las pérdidas de productividad asociadas a la presencia del vPRRS en las piaras de pie de cría y cerdos de engorda nacional de los EU es de \$664 millones de dólares anuales. La mayor proporción de estas pérdidas, estimadas en un 12% a 45%, se encuentra en los cerdos de pie de cría a razón de \$114.71 dólares por hembra al año. En México, se ha reportado una reducción en las utilidades que pueden ser de \$174.53 a \$1,467.45 pesos por hembra seropositiva al vPRRS al año, además de un aumento en los costos de producción por kilogramo de cerdo seropositivo producido de \$2.73 a \$5.88 pesos (Amador, 2013).

Diversos estudios han demostrado la variabilidad genética y antigénica del vPRRS, ambos factores le confieren a este virus mecanismos específicos para modular la respuesta inmune del cerdo generada ante una infección o por el empleo de la vacunación. Los mecanismos patogénicos mediante los cuales el vPRRS modula la respuesta inmune son: respuesta deficiente de la inmunidad innata caracterizada por supresión de la inducción de IFN tipo I y de TNF- α , uso de epitopes señuelo y escudos de glúcidos para prevenir la neutralización por anticuerpos (Osorio, 2012).

Hacer uso de una técnica diagnóstica que ayude a identificar y diferenciar anticuerpos anti-vPRRS para la cepa vacunal MLV y para cepas de campo (A4 PRRS MEX 2014), nos permite confirmar que en México circulan cepas del vPRRS con variabilidad antigénica, ya que los anticuerpos generados ante infecciones con algunas cepas de campo no tienen la capacidad de identificar a la cepa vacunal. Por lo tanto, es evidente la necesidad de actualizar los métodos diagnósticos, así como generar otra alternativa de vacuna o estrategia para el control de esta enfermedad.

Se han empleado diferentes vacunas contra el vPRRS desde 1994, las más usadas y eficientes han sido las vacunas de virus activo modificado, ya que brindan hasta 100% de protección para virus homólogos, pero tienen la desventaja de proteger sólo entre un 50 a 80% contra la infección con cepas heterólogas, en las cuales la vacunación disminuye la duración de la persistencia y los signos clínicos, pero no la proporción de animales

enfermos (Osorio, 2012; Flores-Mendoza *et al.*, 2010; Cano *et al.*, 2007; Cano *et al.*, 2007). Además interfieren de forma negativa en el diagnóstico de laboratorio de esta enfermedad (García, 2016). Sin embargo, las características propias de este agente viral, alta variabilidad genética y antigénica, no han permitido el desarrollo de una vacuna que confiera protección inmunológica ante la infección con virus heterólogos de PRRS.

Actualmente el PRRSV2 se ha clasificado en 9 linajes basados en el análisis filogenético de la secuencia del ORF5 (Shi *et al.*, 2010a). Esta clasificación podría cambiar si, además se analizaran otros ORFs o el genoma completo, ya que hay otras proteínas que a pesar de ser más conservadas, también presentan importantes cambios genéticos, por ejemplo la nucleocápside.

Todas las secuencias obtenidas en este estudio demuestran (tabla 4) pertenecer al PRRSV2 que en México es el único reportado, con excepción del informe de un sólo caso de una cerda infectada con PRRSV1 (López *et al.*, 2013).

El análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos de las cepas del vPRRS en México demuestra la relación entre la cepa de referencia VR2332 y las cepas mexicanas, incluyendo secuencias históricas de la base de datos de Shi *et al.*, 2010a.

De acuerdo al análisis filogenético podemos demostrar que en México se encuentran circulando cepas del virus de PRRSV2 que pueden ser clasificadas como linaje 1, 5 y 8 de acuerdo a lo reportado por Shi *et al.*, 2010a. En el árbol de ORF5 se observa que la mayoría de las secuencias reportadas en este estudio se encuentran en linaje 8, sin embargo este linaje se encuentra dividido en dos clados, el de abajo cuenta con 22 secuencias mexicanas, reportadas por el estado de Sonora. El clado superior cuenta con siete clusters, en el más grande de ellos se agrupan 15 secuencias mexicanas secuenciadas en este estudio, de las cuales 12 provienen del estado de Veracruz y 3 de Jalisco, en conjunto ambos estados representan más del 50% de la producción de carne de cerdo en México.

Es de suma importancia reportar que en las muestras provenientes del estado de Puebla se encontraron secuencias en tres diferentes linajes. La cepa Pue/DMZC08/2015n (MEX) se encuentra en el linaje 8, la cepa Pue/DMZC217/2015 está dentro del linaje 5 y las cepas

Pue/DMZC06 y 07/2015 están agrupadas en el linaje 1. La cepa de Puebla reportada en el linaje 5 tiene una estrecha homología a la cepa vacunal Ingelvac MLV. En ese cluster se encuentran en total 12 cepas mexicanas relacionadas a la cepa vacunal, 4 secuencias reportadas en USA y 1 secuencia de Tailandia.

Las cepas situadas en el linaje 1 pertenecen al Estado de Guanajuato y Puebla, pero se ubican en clusters diferentes. Demostrando que la cepa de Gto/DMZC43/2016 está alejada del resto de las secuencias mexicanas que conforman éste linaje. Nuestras dos secuencias Pue/DMZC/06 y 07 2015 están agrupadas en el mismo cluster con secuencias reportada en el estado de Sonora.

El análisis filogenético del ORF7 demuestra que aun siendo el segundo ORF más conservados dentro del genoma del PRRSV en este estudio se identificó que las cepas mexicanas del presente estudio tienen cambios en su secuencia de nucleótidos que generan que estas cepas se distribuyan en ambos clados del árbol filogenético. El cado superior está formado por 4 clusters, el más grande de ellos está agrupando a las cepas del estado de Veracruz y Jalisco, de la misma forma que en el análisis de ORF5, además de dos cepas mexicanas reportadas previamente. Del total de las secuencias mexicanas, solamente la cepa Pue/DMZC08/2015 demostró homología con las secuencias vacunal IngelvacATP, con las cepas históricas de China y USA así como la cepa P129 agrupándose todas ellas en el cado superior.

En un tercer cluster, las cepas de Puebla DMZC06 y 07 tiene estrecha homología entre sí y con cepas históricas.

La menor homología se encontró en las Gto/DMZC43/2016 y Pue/DMZC217, con respecto al resto de las cepas mexicanas de este estudio, ya que se ubican en el clado inferior y en clusters diferentes, esta cepa de Puebla es la mas cercana a la VR2332.

Esto es de suma importancia debido a la función del ORF7 en la generación de anticuerpos tempranos, que no son capaces de proteger pero que son el blanco de pruebas serológicas comerciales.

Con éstos resultados obtenidos es importante conocer las implicaciones en la variación genética de las regiones descritas como altamente inmunogénicas, debido a que se demuestra una gran variabilidad del virus en México identificada en diferentes linajes.

Esta relación entre las cepas mexicanas y la cepa vacunal puede ser el resultado del uso extensivo de la vacunación con MLV, la cual puede revertir y ser virulenta. Nuestros resultados demuestran que la identificación de cepas endémicas con diferencias genéticas es esencial para los programas de vacunación y el desarrollo de pruebas diagnósticas que permitan el control eficiente del vPRRS en México.

Futuros análisis deben incluir la identificación de las variantes genéticas considerando el genoma completo de este virus y de esta forma determinar los epítopes que participan en la respuesta inmune protectora frente a la infección. Para ello se han sugerido posibles alternativas como secuenciar genomas completos del vPRRS circulante en una determinada zona geográfica y elaborar ensayos funcionales, identificar e implementar epítopes y anticuerpos que confieran neutralización cruzada (Osorio, 2012).

Se ha identificado que el vPRRS cuenta con un epítope altamente inmunodominante, conservado en el PRRSV2 y que no genera anticuerpos neutralizantes. Este epítope es llamado Epitopo-M201, se encuentra localizado en el extremo carboxilo-terminal (residuos 161-174) de la proteína M y es considerado una alternativa para la elaboración de vacunas DIVA (por sus siglas en inglés differentiating infected from vaccinated animals) que nos permitirá diferenciar animales infectados con cepa de campo y animales vacunados (Vu *et al.*, 2013).

ORF5 codifica para la principal proteína de envoltura Gp5, con características de un perfil hidropático y con 2 a 4 sitios de glicosilación, una longitud de 603 pb (201 aa) que contiene el principal epítope neutralizante en el extremo N-terminal del ectodominio, lo cual implica su participación en el reconocimiento del receptor (Wang *et al.*, 2010).

Las cepas del vPRRS que circulan en la población porcina de México presentan numerosos cambios en su secuencia de nucleótidos, los cuales generan cambios en su secuencia de aa ubicados en epítopes que participan en el reconocimiento virus-receptor, en la respuesta inmune y, por lo tanto, en la producción de anticuerpos con capacidad protectora o

neutralizantes. Hemos identificado que algunos cambios en la secuencia de aa de esta proteína parecen ser característicos del estado de procedencia de la muestra. Tal es el caso de las cepas del Estado de Veracruz, que de forma general presentan sustituciones e inserciones en las mismas posiciones al ser comparadas entre si y que no están presentes en cepas de otros estados (tabla 6).

La Gp5 es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes, con los sitios de glicosilación N33, N44 y N51 localizados en los principales epítopes neutralizantes (Wang *et al.*, 2010). En la posición 33 de las cepas mexicanas se encuentran sustituciones de asparagina por serina (S), ambos aminoácidos neutros polares con perfil hidrofílico, en algunos casos este sitio de glicosilación fue ocupado por una glicina (G) que es neutro polar hidrofóbico; en el sitio de glicosilación de la posición 44, cinco cepas del Estado de Veracruz presentan sustituciones por aa ácidos o básicos: N44D/K, los cuales pueden afectar la estructura y función de la proteína; el aminoácido asparagina (N) de la posición 51 se encuentra conservado en todas las cepas de este estudio.

También se ha reportado que el principal epítipo neutralizante (PNE) del vPRRS está ubicado en medio del ectodominio de Gp5 (posición de aa 36-52). Estos determinantes antigénicos neutralizantes están flaqueados por múltiples sitios N-glicosilación, los cuales son probablemente importantes para el plegamiento correcto y la actividad biológica de la proteína. La pérdida de estos sitios de glicosilación favorecen la sensibilidad de estos virus a la neutralización *in vitro* y la inmunogenicidad del epítipo neutralizante cercano (Wang *et al.*, 2010).

En el ectodominio, cerca del PNE, correspondiente a la secuencia V27/A27LVN es el sitio principal de reconocimiento de anticuerpos (Yin *et al.*, 2012). En las cepas mexicanas se identificaron cambios en diferentes posiciones de este determinante antigénico en casi todas las secuencias, excepto en 10 cepas de Veracruz y 2 de Jalisco, en las que esta región se observa conservada.

La proteína de la nucleocápside (N) codificada por el ORF7 es la más abundante del virus, es no glicosilada y está compuesta por 123 aa. Esta proteína es altamente antigénica y genera una respuesta de anticuerpos de forma rápida y persistente (Yan-Jun *et al.*, 2006). Las cepas europeas y americanas contienen dominios antigénicos que han sido mapeados dentro de su genoma y epítopes lineales altamente conservados, por lo cual la proteína N es empleada en el desarrollo de pruebas diagnósticas para la identificación de anticuerpos específicos para vPRRS en suero (Xiofang *et al.*, 2011), actualmente esta proteína es empleada para el diagnóstico serológico de este virus en kits comerciales de ELISA, ya que es altamente conservada en comparación con la Gp5. Además, N es inductora de anticuerpos no neutralizantes generados en infecciones tempranas y de forma persistente.

Batista y colaboradores (2004) identificaron la inserción de un triplete de nucleótidos que da origen a la inserción de una glutamina (Q) en la posición 14 de la secuencia de aa de la nucleocápside de una cepa proveniente del Estado de Sonora. Nuestros resultados demuestran que las cepas analizadas de los Estados de Guanajuato, Jalisco, Puebla y Veracruz no presentan esta inserción. Sin embargo, las cepas del Estado de Jalisco tienen inserción de dos aa (KK/G/R) (tabla 9).

Diferentes estudios han demostrado que la nucleoproteína del vPRRS contiene varios epítopes lineales o continuos y discontinuos o conformacionales. En la secuencia de aa de esta proteína se han identificado 4 regiones antigénicas: tres sitios antigénicos contienen epítopes lineales y un sitio contiene epítopes dependientes de conformación. Los epítopes lineales se denominan A, B y C, y han sido identificados en las posiciones 2-12, 25-30 y 40-46, respectivamente; el epítopo D discontinuo se encuentra en los aa 51-67 y 80-90 (Muelenberg, 1988). Todas las cepas secuenciadas en este estudio presentaron sustituciones de aa en diferentes epítopes, ya sea por aa del mismo grupo como N/S, ambos del grupo neutro polar (hidrofilicos), y sustituciones por aa de diferentes grupos como N por K/R donde N es un aa neutro polar sustituido por un aa básico K o R; también se presentaron inserciones en dos cepas provenientes del Estado de Jalisco y una de Veracruz (tabla 10), estos cambios pueden alterar la estructura y función de la proteína y puede ser una de las

causas por las cuales los programas de vacunación no han logrado el control de la enfermedad.

La secuencia de aa E⁵⁰KPHFPLA⁵⁷, representa una región de inmunodominio de la proteína N que está altamente conservada en cepas americanas y europeas. Esta región de 8 aa es un grupo de tres diferentes epítopes y se encuentra ubicada en la parte más hidrofílica de la proteína (Yan-Jun Z *et al.*, 2006). Esta secuencia de aminoácidos también se mantuvo conservada en las cepas mexicanas estudiadas, evidenciando la importancia de esta región para su probable uso en el diagnóstico de esta enfermedad.

Se ha identificado una pequeña proteína llamada 7ap (ORF7a), que es codificada “overlapping” en la región que codifica para la proteína N del vPRRS, puede tener una longitud de 36 a 56 aa dependiendo de la cepa. Posee múltiples funciones como sintonización nuclear y citoplasmática de los procesos celulares normales y de inmunosupresión. El ORF7a que codifica para la proteína 7ap contiene una metionina en una posición conservada y está seguida de una región codificante ubicada en la posición 26 a 53 de aa (Olasz *et al.*, 2016).

En la secuencia de aa de la nucleocápside se han identificado otros determinantes antigénicos como I⁷⁹QTAFNQGA⁸⁷, epítipo lineal conservado en cepas europeas y americanas, la posición de esta región depende de la cepa en estudio. En una cepa aislada en Japón en 1993 se encontró la mutación Q80H. De acuerdo a la estructura tridimensional antigénica de la proteína N, I⁷⁹QTAFNQGA⁸⁷ está situado en una vuelta desde un alfa-hélice hasta una lámina-beta, lo que sugiere que está expuesto sobre la superficie de la proteína N y estaría fácilmente disponible para la unión con células B (An *et al.*, 2005). Todas las cepas de nuestro estudio tienen esta región altamente conservada, ya que no se identificó ningún cambio de aa. Una mutación en este epítipo podría generar que no sea reconocido por los anticuerpos, vacunales o por cepa de campo, específicos para el vPRRS. El vPRRS se replica en el citoplasma al igual que otros virus ARN. Durante la infección, la proteína N está localizada específicamente en el núcleo y nucléolo en adición a su distribución normal en el citoplasma. La secuencia de aa 41PGKK(N/S)KKKN es una señal

de localización nuclear de la proteína N asociada con la virulencia y con la respuesta del huésped a PRRS. Se ha demostrado experimentalmente que la presencia de deleciones o sustituciones en la secuencia de aa de esta región puede inducir títulos más altos de anticuerpos neutralizantes, viremias con menor título y de menor duración que una cepa de campo; es posible que las mutaciones de lisina en NLS puedan afectar negativamente a la interacción de ARN de la proteína N. La localización de la proteína N en el núcleo y nucléolo de la célula huésped parece asociarse con la patogénesis del PRRSV, a pesar de que el mecanismo preciso aún no se ha dilucidado. (Pei *et al.*, 2008).

En el presente estudio hemos evidenciado que el PRRSV2 está presente en la producción porcina de México representando una prevalencia del 4.7% y una seroprevalencia de 42%, y que las cepas del vPRRS demostraron tener cambios en su secuencia de nucleótidos y aa.

IX. CONCLUSIONES

El virus del PRRS se encuentra circulando en la población porcina de México, en el presente estudio se identificó la presencia del virus y de anticuerpos específicos para una cepa de campo y para la cepa VR2332 de este virus.

Cerca de la mitad de la población porcina de México ha generado una respuesta humoral frente al virus de PRRS. Se identificaron cerdos seropositivos para la cepa de campo A4 PRRS MEX 2014, principalmente.

La prevalencia del virus de PRRS a nivel nacional es del 4.7%.

La seroprevalencia y la prevalencia del vPRRS en México dependen de la ubicación geográfica donde se encuentran ubicadas las explotaciones porcinas, ya que hay diferencia estadísticamente significativa a través de las ocho regiones de México.

En la región Centro-Sur se identificó la menor prevalencia del vPRRS y la seroprevalencia más alta para este virus a nivel nacional. En la región suroeste no fue identificada la presencia del virus, pero esta región se agrupa estadísticamente entre las regiones con mayor proporción de cerdos seropositivos.

Las cepas del vPRRS que circulan en la población porcina de México presentan numerosos cambios en su secuencia de nucleótidos, los cuales generan cambios en su secuencia de aa ubicados en epítopes que participan en el reconocimiento virus-receptor, en la respuesta inmune y por lo tanto, en la producción de anticuerpos con capacidad protectora o neutralizantes.

En el presente estudio hemos evidenciado que el PRRSV2 está presente en explotaciones porcinas de México y que las cepas circulantes presentan importantes cambios en su

genoma. Esto probablemente es una explicación de los resultados obtenidos en el análisis serológico que nosotros realizamos.

Futuros análisis deben incluir la identificación de las variantes genéticas en el genoma completo de este virus y de esta forma determinar los epítopes que participan en la respuesta inmune protectora frente a este virus.

X. REFERENCIAS

Adams, M., Lefkowitz, E., King, A., Harrach, B., Harrison, R., Knowles, N., Kropinski, A., Krupovic, M., Kuhn, J., Mushegian, A., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F., Gorbalenya, A., Davison, A. (2017). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses 2017. *Arch Virol.*162(8):2505-2538. doi: 10.1007/s00705-017-3358-5.

Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J of Virol.* 74(22):10834-10837.

Amador CJ. 2013. Efecto económico del virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo porcino (PRRS) en granjas porcinas de ciclo completo en México. Tesis-UNAM, Maestria.

Amonsin A, Kedkovid R, Puranaveja S, Wongyanin P, Suradhat S, Thanawongnuwech R. 2009. Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (vPRRS) isolates in Thailand (US and EU genotypes). *J of Virol.* 6(143):1-10.

An TQ, Zhou YJ, Qiu HJ, Tong GZ, Wang YF, Liu JX, Yang JY. 2005. Identification of a novel B cell on the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display. *Virus Genes.* 31(1):81-87.

Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. 2004. Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *J of Swine Health and Production.* 12(4):170-175.

Batista L, Pijoan C, Dee S, Olin M, Molitor T, Joo HS, Xiao Z, Murtaugh M. 2004.

Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *The Canadian J of Veterinary Research*. 68:267–273.

Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RT, Gorcyca D, Chladek D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4: 127-133.

Barroso MG, Williams JJ, López AA. 2002. Identificación de factores de riesgo asociados a la exposición al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino dentro de granjas porcinas del Estado de Yucatán, México. *Vet. México*. 33(4):363-369.

Bobadilla SEE, Espinoza OA, Martínez CFE. 2010. Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008. *Rev Mex Cienc Pecu*. 1(3):251-268.

Breedam MV, Delputte PL, Van Gorp H, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X, Nauwynck HJ. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J of General Virol*. 91:1659–1667.

Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Trincado CA, Pijoan CB. 2007. Effects of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *AJVR*. 68(5):565-571.

Cano JP, Dee SA, Murtaugh MP, Pijoan C. 2007. Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine*. 25:4382-4391.

Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. INEGI.
http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/agro/ca2007/resultados_agricola/

Christopher-Heninings, J, Holler LD, Benfield DA, Nelson EA. 2001. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J Vet Diagn Invest.* 13:133-142.

FAO. 2011. Focus on Porcine reproductive and respiratory syndrome. 5:1-8
<http://www.fao.org/docrep/013/al849e/al849e00.pdf>

Flores-Méndoza L, Hernández J. 2010. Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (vPRRS): escribiendo una historia. *Vet Méx.* 41(2):139-159.

García PM. (2016) Desarrollo de una prueba de diagnóstico serológico (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos en contra del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). Tesis-UNAM, Maestria.

Hanzhong K, Dongwang Y. 2017. The viral innate immune antagonism and alternative vaccine desing for PRRS virus. *Vet Microbiol.* 209:75-89.

Holtkamp DJ, Kliebenstein BJ, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, Wang C, Yeske PE, Mowrer CL, Haley CA. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J of Swin health and Production.* 21(2):72-84.

Kedkovid R, Ayudhya SNN, Amonsin A, Thanawongnuwech R. 2010. NSP2 gene variation of the North American genotype of the Thai vPRRS in central Thailand. *J of Virol.* 7(340):1-6.

Kim HK, Nguyen VG, Park JH, Rho SM, Han JY, Park BK. 2012. Epidemiologic and phylogenetic characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in

conventional swine farms of Jelu Island as a candidate region for vPRRS eradication. *Transboundary and emerging diseases*. 59:26-71.

Li B, Fang L, Guo X, Gao J, Song T, Bi J, He K, Chen, Xiao S. 2011. Epidemiology and evolutionary characteristics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China between 2006 and 2010. *J Clin Microbiol*. 49(9):3175-3183.

Lin Liu, Yinhu Li, Siliang Li, Ni Hu, Yimin He, Ray Pong, Danni Lin, Lihua Lu, and Maggie Law. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J of Biomed and Biotechnol*. 2012:1- 11.

López HSM, Huitrón BGG, Lagunas BS, Soriano VE, Cabrera TA y Cruz VF. 2013. Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (vPRRS) en granjas porcinas tecnificadas del Estado de México. *Rev Mex Cienc Pecu*. 4(4):469-488.

Macías MJ, Yépiz-Placencia G, Osorio F, Pinelli-Saavedra A, Reyes-Leyva J, Hernández J. 2006. Isolation and characterization of the gene ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Mexico. *Vet Méx*. 37(2): 197-208.

Meulenbergh JJM. 2000. vPRRS, the virus. *Vet Res* 31: 11-21.

Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. 1999. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Comparison: Divergent Evolution on Two Continents. *J of Virol*. 73(1): 270–280.

Nelson EA, Christopher-Hennings J, Benfield DA. 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest*. 6:410-415.

Neumann JE, Kliebenstein JB, Johnson CB, et al. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc*. 227(3):385-392.

OIE (Oficina internacional de epizootias). 2008. Report of the OIE *ad hoc* Group on porcine reproductive and respiratory syndrome. Paris, 9 - 11 June. Fecha de consulta: enero 2016.

OIE (Oficina internacional de epizootias). 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome Terrestrial Manual. 1-13. Fecha de consulta: enero 2016

Olasz F, Dénes B, Bálint A, Magyar T, Belák S, Zádori Z. 2016. Characterisation of the nucleic acid binding features of the vPRRS 7ap and its ability to induce antinuclear antibodies. *Acta Veterinaria Hungarica* 65:1, 124-134.

Osorio FA. 2012. El vPRRS vs. el Cerdo: Dinámica de la infección individual. Simposio Internacional de PRRS. México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, Lopez OJ. 2002. Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Gp5 Ectodomain. *J of Virol.* 76(9): 4241–4250.

Pei, Y., Hodgins, D. C., Lee, C., Calvert, J. G., Welch, S. K. W., Jolie, R., ... Yoo, D. 2008. Functional mapping of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus capsid protein nuclear localization signal and its pathogenic association. *Virus Research*, 135(1):107-114.

Rossow KD, Collins JE, Goyale M, Nelson A, Christopher-Hennings J, Benfiel A. 1995. Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection in Gnotobiotic Pigs. *Vet Pathol.* 32 (36):361-373.

Rovelo CA, Alzina LA, Rodríguez BJC, Segura CJC, Villegas PS. 2010. Prevalencia y factores de riesgo asociados con el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino en sementales de granjas porcinas en el sureste de México. *Rev. Cient.* XX(1):17-23.

Salinas MJA, Lara AJ, Flores AH, Ávalos RR, Zárata RJJ, Riojas VV, Segura CJC. 2008. Presencia de animales seropositivos al síndrome reproductivo y respiratorio porcino en Nuevo León. *Vet Méx.* 39(2): 215-221.

Shi M, Lam TT, Hon CC, Murtaugh MP, Davies PR, Hui RK, Li J, Wong LT, Yip CW, Jiang JW, Leung FC. 2010a. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol.* 84(17):8700-11.

Shi, M., Lam, T., Hon, CC., Hui, RK., Faaberg, KS., Wennblom, T., Murtaugh, MP., Stadejek, T., Leung, FC. 2010b. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *J Virus Research.* 154(1-2),1-17.doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.014.

Shi, M., Lemey, P., Singh, BM., Suchard, M., Murtaugh, M., Carman, S., D'Allaire, S., Delisle, B., Lambert, M., Gagnon, C., Ge, L., Qu, Y., Yoo, D., Holmes, E., Chi-Ching, LF. 2013. The spread of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) in North America: A phylogeographic approach. *J Virol.* 447(1-2),146-154. doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.028.

SIAP (Servicio de información agroalimentaria y pesquera). 2013. Producción agropecuaria y pesquera. Ganado porcino. SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/opt/poblagand/Porcinos.pdf>. Fecha de consulta: enero 2016

Snijder EJ, Meulenbergg JJM. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J of General Virol.* 79: 961-979.

Sotomayor GA 2011. Determinación de muestras positivas al virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRS) con la técnica de RT-PCR. Tesis-UNAM. Maestría.

Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, Osorio FA. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol.* 71(12):9170-9.

Vu HLX, Kwon B, De Lima M, Pattnaik AK, Osorio FA. 2013. Characterization of a serologic marker candidate for development of a live-attenuated DIVA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine.* 31(40):4330-4337.

Wang C, Wu B, Amer S, Luo J, Zhang H, Guo Y, Dong G, Zhao B, He H. 2010. Phylogenetic analysis and molecular characteristics of seven variant chinese field isolates of vPRRS. *BMC Microbiol.* 10(146):1-12.

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, Boer EA, de Tibben HJ, Jong MF, de Veld P, van 't Groenland GJR, Gennep JA, van Voets MT, Verheijden JHM, Braamskamp J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus, *Vet. Q.* 13:121-130.

Wu WH, Fang Y, Farwell R, Steffen-Bien M, Rowland RR, Christopher-Hennings J, Nelson EA. 2001. A 10-kDa Structural Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Encoded by ORF2b. *Viol.* 287: 183–191.

Xiaofang Hao, Zengjun Lu, Wendong Kuang, Pu Sun, Yu Fu, Lei Wu, Qing Zhao, Huifang Bao, Yuanfang Fu, Yimei Cao, Pinghua Li, Xingwen Bai, Dong Li, Zaixin Liu. 2011. Polymorphic genetic characterization of the ORF7 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (vPRRS) in China. *J of Virol.* 8(73):1-9.

Yan-Jun Zhou, Tong-Qing An, Jin-Xia Liu, Hua-Ji Qiu, Yun-Feng Wang, Guang-Zhi Tong. 2006. Identification of a Conserved Epitope Cluster in the N Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Viral Immunology.* 19(3):383-390.

Yin G, Gao L, Shu X, Yang G, Guo S, Li W. 2012. Genetic Diversity of the ORF5 Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates in Southwest China from

2007 to 2009. PLoS ONE 7(3): e33756

Zimmerman J. 2003. Historical Overview of PRRS Virus. The PRRS Compendium.

Second

edition.

1-6

<http://www.pork.org/filelibrary/PRRS/2003Compendium/PRRSChapter1.pdf>. Fecha de
[consulta: enero 2016.](#)