

4

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL I (SANIDAD ANIMAL)

TESIS DOCTORAL

GENETICA MOLECULAR DEL VIRUS DEL
SINDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO
PORCINO: ASPECTOS EVOLUTIVOS,
DIAGNOSTICOS E INMUNOGENOS.

PALOMA SUAREZ FERREIRO
Madrid, octubre de 1995

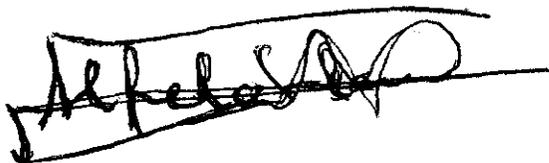
Memoria presentada por Paloma Suárez Ferreiro
para optar al grado de Doctor en Veterinaria.
Madrid, Octubre de 1995

D. ALFREDO SOLANA ALONSO, Catedrático del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y D. JOSE M^a CASTRO ARGANDA, Profesor Titular del mismo Departamento.

CERTIFICAN;

que la tesis doctoral titulada: "Genética Molecular del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino; aspectos evolutivos, diagnósticos e inmunógenos", de la que es autora la licenciada en Veterinaria por la UCM D^a PALOMA SUAREZ FERREIRO, ha sido realizada en las dependencias del Dpto. de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de Madrid, en colaboración con los Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular IV de la misma y el laboratorio del Dr. Juan Ortin del Centro Nacional de Biotecnología, UAM. Dicha tesis, realizada bajo nuestra dirección, cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de doctor en Veterinaria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación -como directores de la mencionada tesis doctoral-, en Madrid a siete de octubre de mil novecientos noventa y cinco.



Fdo: Alfredo Solana



Fdo: José M^a Castro

A mis padres

A mi abuela Pepita, en su recuerdo

"...de todas las ciencias que el hombre puede y debe saber, la principal es la ciencia de vivir haciendo el mínimo posible de mal y el máximo posible de bien..."

Liev Nikoláievich Tolstói

Es muy difícil resumir en escasamente tres páginas todas las vivencias que tuvieron lugar en los últimos cinco años, pero de lo que no cabe duda es de que todas ellas van ligadas a las muchas personas que contribuyeron a la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. José María Castro su confianza en mi al "adoptarme" bajo su tutela, su constante ilusión, inquietud y, sobre todo, su apoyo incondicional.

Al Dr. Alfredo Solana, por aceptarme en el Departamento, concederme la libertad para escoger el camino que yo creía más conveniente, y su ayuda en las correcciones de esta Tesis.

Al Dr. Juan Ortín, sin cuya participación no se habría realizado el segundo objetivo de esta Tesis, por la formación, de todo tipo, que adquirí durante mi estancia en su laboratorio. Enseñanzas, que sin duda, me serán de gran utilidad en el futuro independientemente de que continúe o no en "ésto" de la Ciencia. Gracias Juan.

Al resto de componentes del Departamento de Patología Animal I, de la Facultad de Veterinaria de Madrid. A Cinta, que siempre estuvo disponible cuando tocaron los "marrones" y con quien me embarqué en "eso" del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino; a Aurora que continuará la línea; a Santa y Toño, por vuestra amistad, teneros siempre a mano y soportar estoicamente mis "ligeros" saqueos; a Gloria y Carmen, por escucharme en mis momentos de explosión; a Nivaldo, "o rey do PCR"; a Silvia, Charo y Javier quienes me amenizaron las comidas; a Isabel, Ricardo, Mar, Rocio, Cristina, Flan y por supuesto, a Paco y Pascual, que me ayudaron en la desagradable tarea de los sacrificios.

Al Dr. Jose Manuel Troncoso, sin cuya invitación a una cerveza y a la reflexión subsidiaria esta Tesis nunca habría tenido lugar.

Al Dr. Rafael Zardoya, con quien fue un verdadero placer trabajar, por tu comprensión en los inicios y amistad.

Al Dr. Jose Manuel Bautista, de quien siempre envidiaré su optimismo que hace que hasta las cosas más difíciles sean posibles.

Al resto de miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de nuestra Facultad, a los Doctores Amando Garrido, Amalia, Antonio, Mila y Enrique por vuestra siempre extraordinaria acogida y ayuda y.....como no, a María José, compañera de aventuras "intra y extra Universitarias" por su gran generosidad.

A todos los componentes del laboratorio del Dr. Juan Ortín del Centro Nacional de Biotecnología, a mi querida "Amelita", por su gran apoyo y comprensión en todo momento, a Ana Beloso, por mimarme como lo hizo, a; Puri, compañera además de Alemán; Juanjo, por dejarme "oKupar" su sitio; Susana de la Luna, verdadero "Maniatis" andante; Bea; Fernanda; Thomas; Tomás; Nani y Susana, por vuestra incansable paciencia y cariño con la persona que iba a realizar una estancia de "sólo" dos meses en vuestro laboratorio.

A Margarita Díaz-Guerra, por su amistad, su dedicación en mis continuas visitas a su laboratorio, y de quien aprendí que la labor de un buen científico es buscar la explicación a las cosas. A los demás componentes del laboratorio del Dr. Esteban, y al resto de amigos que dejé en el CNB, sobre todo a los miembros del laboratorio del Dr. Enjuanes.

A Maria Jesús Martín y a Joaquin Dopazo, por la construcción de los árboles filogenéticos.

Al Dr. Enrique Tabarés, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma, y al resto de miembros de su laboratorio, por asesorarme en mis dudas.

Por último, quiero dar las gracias a todas aquellas personas que ajenas a este "mundo de la Ciencia", contribuyeron en gran manera a la realización final de esta Tesis;

En primer lugar quiero agradecer a mis padres su gran comprensión, apoyo y paciencia con mis cambios de humor.

A mi amiga Pili, que siempre estuvo dispuesta a distraerme, por sus 25 años de amistad que espero que dure, como poco, otros 75. A Lola, compañera de mesa en el Departamento pero también amiga, Ana y Chus, gracias por "no daros nunca de baja" y por los buenos ratos que pasamos juntas. A mis primos Teresa, David y Manolo por proporcionarme siempre unas vacaciones envidiables, así como al resto de mi familia.

A aquellos que se quedaron en el camino y al resto de amigos que, por olvido, no he citado porque ésta, mi Tesis, es también la vuestra.

Madrugada del 4 de octubre de 1995

El desarrollo de esta Tesis ha sido posible gracias al disfrute de una beca de la Comunidad Autónoma de Madrid y otra de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

ABREVIATURAS

A	Adenosina o desoxiadenosina
a a	Aminoacido
ADN	Acido deoxirribonucléico
ADV	Virus de la enfermedad de Aujeszky
ARN	Acido ribonucléico
ATP	Adenosin-trifosfato
BrEt	Bromuro de etidio
β-gal	β-galactosidasa
BSA	Seroalbumina bovina
BVD	Virus de la diarrea vírica bovina
C	Citosina o deoxicitosina
cpm	cuentas por minuto
°C	Grado centígrado
EMV	Virus de la encefalomiocarditis
DEPC	Dietilpirocarbonato
DI50CT	Dosis infectiva 50 cultivo de tejido
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EAV	Virus de la arteritis vírica equina
ECP	Efecto citopático
EDTA	Acido etilen-diaminotetra-acético
fg	Fentogramo
g	gramo
G	Guanosina o deoxiguanosina
h	Horas
H C	Virus de la peste porcina clásica
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFD	Inmunofluorescencia directa
IPMA	Inmunoperoxidasa en monocapa
IPTG	Isopropil-β-D-thiogalactopiranosido
K b	Kilobases
K D	Kilodaltons
LB	Medio de Luria y Bertani
LDV	Virus lactato deshidrogenasa del ratón
LV	Virus Lelystad
MAP	Macrófagos alveolares porcinos
mdi	Multiplicidad de infección
min	Minuto
ml	Mililitro
M	Molar
m M	Milimolar
NP40	Nonidet 40

ORF	Marco de lectura abierta
32P	Isótopo fósforo 32
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pdb	pares de bases
pg	Picogrammo
pGPR-5	Plásmido pGEM-T con la ORF-5 del PRRSV clonada
pi	Post-infección
PPV	Virus del parvovirus porcino
pRPR-5	Plásmido pRSET-A con la ORF-5 del PRRSV clonada
pTPR-5	Plásmido pTM-1 con la ORF-5 del PRRSV clonada
PRRS	Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino
PRRSV	Virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción en reverso
35S	Isótopo azufre 35
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SHFV	Virus de la enfermedad hemorrágica del simio
SN	Seroneutralización
T	Timidina o deoxitimidina
TAE	Tampón de tris-ácido acético-EDTA
TBE	Tampón de tris-ácido bórico-EDTA
TCID50	Dosis infecciosa causante de un 50% de efecto citopático
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TGE	Virus de la gastroenteritis transmisible porcina
TK	Timidin quinasa
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UFP	Unidades formadoras de placas
UTR	Región no traducible de los ARN mensajeros de picornavirus
UV	Ultravioleta
vTF7-3	Virus vacunal recombinante que expresa la ARN polimerasa del fago T7
vv-PR5	Virus vacunal recombinante que expresa la ORF-5 del PRRSV
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol-b-D-galactósido
µg	microgrammo
µl	microlitro

I. INTRODUCCION

1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD.....	3
2. IMPORTANCIA ECONOMICA.....	6
3. EPIZOOTIOLOGIA.....	8
4. ETIOLOGIA.....	12
4.1. Características generales del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV).....	12
4.1.1. Propiedades de la partícula vírica.....	12
4.1.1.1. Morfología.....	12
4.1.1.2. Propiedades físico-químicas.....	12
4.1.1.2.1. Densidad.....	12
4.1.1.2.2. Estabilidad a la temperatura.....	12
4.1.1.2.3. Estabilidad al pH.....	12
4.1.1.2.4. Actividad hemaglutinante.....	13
4.1.1.2.5. Actividad neutralizante.....	13
4.1.1.3. Acido nucleico.....	13
4.1.1.4. Proteínas.....	13
4.1.2. Replicación vírica.....	13
4.2. Relación con otros virus.....	13
4.2.1. Virus lactato-deshidrogenasa del ratón.....	14
4.2.2. Virus de la arteritis vírica equina.....	16
4.2.3. Virus de la fiebre hemorrágica del simio.....	18
4.3. Biología molecular del PRRSV.....	19
5. PATOGENIA.....	22
6. SINTOMATOLOGIA.....	24
6.1. Presentación aguda.....	24
6.1.1. Fase inicial.....	24
6.1.2. Fase de climax.....	25
6.1.3. Fase final.....	26
6.2. Presentación crónica.....	26
6.3. Presentación subclínica.....	26

7. LESIONES.....	26
7.1. Lesiones Macroscópicas.....	27
7.2. Lesiones Microscópicas.....	27
7.2.1. Aparato respiratorio.....	27
7.2.2. Cerebro.....	28
7.2.3. Aparato circulatorio.....	28
7.2.4. Otros órganos.....	29
7.2.4.1. Bazo.....	29
7.2.4.2. Corteza tímica.....	29
7.2.4.3. Hígado.....	29
7.2.4.4. Placenta.....	29
8. INMUNOLOGIA DEL PRRS.....	30
9. DIAGNOSTICO.....	32
9.1. Diagnóstico clínico.....	32
9.2. Diagnóstico anatomo-patológico.....	33
9.3. Diagnóstico laboratorial.....	33
9.3.1. Técnicas indirectas.....	34
9.3.1.1. IPMA.....	34
9.3.1.2. IFI.....	35
9.3.1.3. ELISA.....	35
9.3.1.4. Seroneutralización.....	35
9.3.2. Técnicas directas.....	36
9.3.2.1. IFD.....	36
9.3.2.2. Inmunoperoxidasa.....	36
9.3.2.3. Inmunohistoquímica.....	37
9.4. Diagnóstico diferencial.....	37
10. PROFILAXIS.....	38
10.1. Profilaxis Higio-sanitaria.....	38
10.2. Profilaxis médica.....	41
11. TRATAMIENTO.....	42

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS.....	44
-------------------	----

III. MATERIAL Y METODOS

1. CELULAS EUCARIOTICAS.....	47
1.1. Líneas celulares empleadas.....	47
1.1.1. Preparación de macrófagos alveolares porcinos...	47
1.1.2. Células COS-1.....	48
1.1.3. Células HeLaS3.....	48
1.1.4. Células BSC-40.....	48
1.1.5. Células HuTK-143.....	48
1.1.6. Células MA-104.....	49
1.1.7. Células N2A.....	49
1.2. Mantenimiento y conservación de líneas celulares.....	49
2. VIRUS.....	50
2.1. Cepas de virus.....	50
2.1.1. Cepas del PRRSV.....	50
2.1.2. Virus porcinos utilizados en los ensayos de especificidad.....	51
2.1.2.1. Virus de la peste porcina clásica.....	51
2.1.2.2. Virus influenza H1N1.....	51
2.1.2.3. Virus influenza H3N2.....	51
2.1.2.4. Virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGE).....	51
2.1.2.5. Virus del parvovirus porcino (PPV).....	51
2.1.2.6. Virus de la pseudorrabia (ADV).....	51
2.1.2.7. Virus de la diarrea vírica bovina (BVD).....	51
2.1.3. Otros virus.....	52
2.1.3.1. Virus vacuna recombinante que expresa la ARN polimerasa del fago T7 (vTF7-3).....	52
2.1.3.2. Virus vacuna salvaje.....	52
2.2. Replicación y titulación de virus.....	52
2.2.1. PRRSV.....	52
2.2.2. Virus vacuna.....	52
2.2.3. Titulación del PRRSV.....	53
2.2.4. Titulación del virus vacuna.....	53
2.3. Purificación del PRRSV.....	53

3. CEPAS BACTERIANAS EMPLEADAS.....	54
3.1. Cepas de Escherichia coli.....	54
3.1.1. JM-109.....	54
3.1.2. DH-5.....	54
3.1.3. BL21(DE3)pLysS.....	54
3.2. Multiplicación y conservación de cepas bacterianas.....	54
4. VECTORES DE CLONAJE.....	55
4.1.- pGEM-T.....	55
4.2.- pRSET.....	56
4.3.- pTM-1.....	58
5. TRANSCRIPCIÓN EN REVERSO; REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR); Y CLONAJE DE LOS FRAGMENTOS DE PCR.....	59
5.1. Procesamiento de muestras.....	59
5.1.1. Cultivos celulares.....	59
5.1.2. Muestras biológicas.....	59
5.2. Extracción de ARN.....	60
5.3. Transcripción en reverso.....	60
5.4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	61
5.4.1. Oligonucleótidos.....	61
5.4.2. Reacción de PCR.....	62
5.5. Ligación de fragmentos de PCR al vector pGEM-T.....	63
6. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.....	64
6.1. Selección por IPTG/X-gal.....	65
6.2. Selección de colonias por sondas e hibridación.....	65
7. ANÁLISIS DEL ADN.....	67
7.1. Obtención de ADN plasmídico.....	67
7.2. Modificaciones efectuadas en plásmidos; restricciones y ligaciones.....	67
7.3. Análisis y purificación de fragmentos de ADN.....	68
7.4. Secuenciación de ADN.....	68
7.4.1. Oligonucleótidos empleados.....	68
7.4.2. Reacción de secuenciación.....	69
8. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	69
8.1. Determinación de la concentración proteica.....	69
8.2. Electroforesis de proteínas (SDS/PAGE).....	70
8.3. Detección de la proteína codificada por la ORF-5 del	

PRRSV sobre geles de transferencia a filtros de nylon.....	70
8.3.1. Sueros utilizados.....	70
8.3.2. Western-Blot.....	71
8.4. Inmunoprecipitación.....	72
9. SISTEMAS DE EXPRESION DE PROTEINAS.....	72
9.1. Expresión transitoria en células infectadas con VTF7-3. Marcaje radiactivo celular.....	72
9.2. Expresión en <i>E.coli</i> . Marcaje radiactivo de la proteína.....	73
10. MUTAGENESIS DIRIGIDA.....	74
10.1. Oligonucleótidos utilizados.....	74
10.2. Mutagénesis.....	74
11. SINTESIS DEL VIRUS VACUNA RECOMBINANTE.....	76
12. MARCADORES ASOCIADOS A MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS....	77
12.1. Extracción de ADN cromosómico.....	78
12.2. Extracción de ARN total.....	78
12.3. Tinción de la cromatina nuclear con Hoëchst.....	78
13. PURIFICACION DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5.....	79
14. ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD.....	80
15. TECNICAS DE ANALISIS SEROLOGICO.....	82
15.1. Inmunofluorescencia.....	82
15.2. IPMA.....	82
15.3. Seroneutralización.....	83

IV. RESULTADOS

1. APLICACION DE LA TÉCNICA DE TRANSCRIPCION EN REVERSO- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) AL DIAGNOSTICO DEL PRRS.....	85
1.1. Amplificación dentro de la ORF-7 del PRRSV.....	85
1.2. Sensibilidad de la técnica.....	87
1.2.1. Sensibilidad en sobrenadantes de cultivos.....	87
1.2.2. Sensibilidad intrínseca de la reacción de PCR.....	88
1.2.3. Sensibilidad en muestras biológicas.....	89
1.3. Especificidad de la técnica.....	93

2. EXPRESION Y CARACTERIZACION DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5 DEL PRRSV TANTO EN UN SISTEMA EUCARIOTA COMO PROCARIOTA.....	94
2.1. Amplificación de la ORF-5 del PRRSV.....	94
2.2. Expresión de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV en un sistema eucariota.....	95
2.2.1. Expresión transitoria en células Cos-1 mediante infección con vTF7-3 y transfección plasmídica...	95
2.2.2. Clonaje de las ORFs-5 en el vector pRSET-A y expresión en células Cos-1 de las proteínas codificadas por los plásmidos resultantes.....	99
2.3. Expresión de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV en un sistema procariota.....	103
2.4. Mejora de las condiciones de expresión de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV en un sistema eucariota.....	109
2.4.1. Mutagénesis dirigida del pRSET-A.....	109
2.4.2. Clonaje de la ORF-5 del PRRSV en el plásmido pTM-1 y síntesis de un virus vacuna recombinante.....	112
2.5. Inducción de apoptosis por la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV.....	115
2.5.1. Inducción de muerte celular programada por la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV.....	116
2.5.2. Inducción de apoptosis por el PRRSV.....	119
2.6. Purificación de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV.....	121
2.7. Estudios de inmunogenicidad con la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV.....	124
3. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DEL PRRSV EN AISLADOS DE CAMPO ESPAÑOLES Y EUROPEOS.....	126
3.1. Variabilidad en el interior de la ORF-7 de cepas europeas del PRRSV.....	126
3. 2. Variabilidad en el interior de la ORF-5 de cepas europeas del PRRSV.....	131

3.3. Porcentajes de similitud nucleotídica y aminoacídica dentro de las ORFs 7 y 5 de cepas europeas del PRRSV.....138

3.4. Árboles filogenéticos resultantes del análisis de las secuencias nucleotídicas de las ORFs 7 y 5 de cepas europeas del PRRSV.....142

V. DISCUSION

1. DISCUSION.....146

VI. CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES.....170

VII. BIBLIOGRAFIA

1. BIBLIOGRAFIA.....173

I. INTRODUCCION

Con el descubrimiento a lo largo de este siglo de los diversos quimioterápicos y antibióticos antimicrobianos, vacunas, fármacos antivíricos y las acciones conducentes a la lucha y hasta erradicación de algunas enfermedades como la viruela, se creyó por un sector importante de la sociedad que las enfermedades infecciosas del hombre estaban en vías de ser controladas en un futuro cercano, al menos en los llamados países desarrollados. Sin embargo, la aparición de una nueva enfermedad o síndrome como el SIDA, ocasionada por un virus con mecanismos de actuación muy complejos y frente al cual se desconoce cómo llevar a cabo una efectiva profilaxis médica o vacunal, ha llevado a la humanidad a percatarse de su gran error al presuponer la posibilidad de lucha efectiva frente a la totalidad de los agentes infecciosos.

También en la patología animal, se ha observado este fenómeno con la aparición o actualización de nuevas enfermedades causadas por diferentes agentes infecciosos, tanto bacterianos (*Afipia felix*, *Borrelia burgdorferi*..), como víricos (*Parvovirus canino*, *Leucosis felina*..). Pero quizás de todos ellos, destaca por su relevancia el síndrome reproductor y respiratorio porcino sobre cuyo agente vírico causal versará esta Tesis Doctoral.

1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

El síndrome reproductor y respiratorio porcino es una enfermedad de reciente aparición que afecta a la especie porcina, y que se caracteriza por un fallo reproductor en cerdas, neumonía en cerdos en crecimiento y aumento de la mortalidad en lactación.

En 1987, por parte de veterinarios clínicos e investigadores de diversos lugares y centros, se fue denunciando la existencia de una nueva enfermedad que afectaba al cerdo y a la que denominaron enfermedad misteriosa del cerdo, por el desconocimiento existente de su etiología. Tres años mas tarde, la enfermedad ya se había presentado en once estados de Estados Unidos de América (EE.UU) y dos provincias de Canadá (Hill, 1990). También en 1990, apareció por primera vez en el continente europeo, concretamente en Münster, Alemania (Busse y cols, 1992) desde donde se difundió a otros países como Holanda, Francia, Bélgica, Inglaterra y Dinamarca. (Paton y cols, 1991; Meredith, 1991). En España la enfermedad se localizó por primera vez en Huesca en enero de 1991, debido a la importación de cerdos desde Alemania, ordenando las autoridades españolas el sacrificio obligatorio de los mismos. Sin embargo, cinco días después la enfermedad apareció en dos granjas que se encontraban a 500 metros del foco inicial (Plana y cols, 1992). Hasta la fecha se han detectado brotes de la enfermedad en los continentes Americano (EE.UU y Chile); Asiático (Japón, Corea y China) y Europeo (Austria, Italia, Luxemburgo y Malta además de los anteriormente citados), (Meredith, 1995).

Desde la aparición de la enfermedad se le han dado numerosas denominaciones, entre ellas destacamos las siguientes: enfermedad misteriosa del cerdo (Hill, 1990); aborto enzoótico tardío del cerdo (Meredith, 1992); síndrome respiratorio y aborto epidémico porcino (Terpstra y cols, 1991); enfermedad de la oreja azul (White, 1991); síndrome infertilidad y respiratorio porcino (Collins y cols, 1991); enfermedad del 89; plaga del 89; síndrome del fallo reproductor del cerdo; síndrome reproductor y respiratorio porcino (Keffaber, 1989). Aunque en los EE.UU la denominación mas aceptada es la de síndrome infertilidad y respiratorio porcino (SIRS). Los participantes en el

primer simposio internacional de la enfermedad celebrado en Minnesota en 1992 aceptaron como denominación mas idonea para la misma la de síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRS) (Collins, 1992). La Oficina Internacional de Epizootias también reconoce la denominación PRRS (Meredith, 1992).

Uno de los aspectos mas oscuros y costosos de la nueva enfermedad fue la determinación de cual era el agente/agentes involucrados en la misma, ya que transcurrieron cuatro años desde la aparición clínica de la enfermedad hasta que se aisló el hoy conocido agente causal. A este respecto múltiples agentes fueron considerados en un principio, tanto víricos, bacterianos, e incluso micotoxinas.

Dentro de los agentes víricos el que en un principio se consideró como mas probable causa de la enfermedad fue el virus de la encefalomiocarditis. Algunos autores expusieron su teoría de que la entonces llamada enfermedad misteriosa era producida por una variante neumotrópica del virus de la encefalomiocarditis como parecía ser corroborado por los siguientes hechos: hayazgo de una tasa significativa de anticuerpos frente al virus ($> 1/16$) en algunos fetos afectados, aislamiento del virus en dos ocasiones de fetos porcinos, lesiones histopatológicas como miocarditis o encefalitis, el que el virus experimentalmente pudiera causar muerte fetal y momificación tras la infección en útero y que aislados de campo fueran altamente patogénicos para lechones de tres días tras inoculación experimental así como que inoculaciones en cerdas gestantes dieran infecciones transplacentarias y muertes fetales, y por último el que una vacuna frente a la enfermedad redujera algo los síntomas clínicos y la mortalidad. En contra del virus de la encefalomiocarditis como causa de la enfermedad se encontraba el que no todas las hembras afectadas seroconvertían al virus, y el aislamiento y detección del mismo por inmunofluorescencia no siempre era posible (Joo y cols, 1990).

En 1990, se señalaron diferencias en los cuadros clínicos que aparecían en Canadá con respecto a los de EE.UU (Dial y cols, 1990). En este sentido, algunos autores canadienses han señalado la coexistencia en su país de dos agentes infecciosos, el virus del

síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), que fue aislado en el país por primera vez por Dea y cols (1992) y un nuevo virus Influenza A de subtipo desconocido aislado de lesiones pulmonares y cuyo cuadro clínico se denominó con las siglas PNP (neumonía necrotizante y proliferativa). Ambos virus presentan diferencias tanto en su cuadro clínico como en sus lesiones. Así, mientras el PRRS se caracteriza por fallo reproductor, y problemas respiratorios que afectan principalmente a cerdos no destetados sin un aumento febril significativo en cerdas, con lesiones de neumonía intersticial difusa caracterizada por infiltración de las paredes alveolares por macrófagos, la causada por el nuevo virus influenza A, en cambio, vendría principalmente determinada por signos respiratorios (polipnea y disnea) tanto en cerdos destetados como no destetados mas graves en criaderos y unidades de finalización del engorde, con fallo reproductor previo a la aparición de signos respiratorios en algunas de las granjas afectadas, así como elevación de temperaturas y anorexia en las cerdas enfermas. El cuadro patológico se caracteriza por proliferación de neumocitos tipo II, bronquiolitis necrotizante y presencia de coágulos de células necróticas y fibrina en el lumen alveolar (Morin y cols, 1990; Elazhary y cols, 1991; Morin y cols, 1992). De todo lo expuesto se desprende que posiblemente en Canadá cohabiten las infecciones por el virus de la encefalomiocarditis y por el virus influenza atípico actuando éstas como infecciones víricas secundarias a un primer virus inmunosupresor, probablemente el PRRSV (Dea y cols, 1992).

Otros de los virus inicialmente propuestos como agentes causales fueron el parvovirus porcino y la enfermedad de Aujeszky. Sin embargo, si bien ámbos producen daño reproductor en cerdas, como rasgos diferenciadores del primero frente al PRRSV está el hecho de que éste es generalmente subclínico para las hembras, los fetos mueren raramente tras los 70 días postinfección con dicho virus y amenudo uno de los principales signos de la aparición en una granja es el elevado número de fetos momificados, incluso toda la camada. Por si fuera poco, los antígenos frente a parvovirus que son muy estables en los fetos incluso en los momificados no se encontraron en casos de enfermedad misteriosa, ni tampoco seroconversión en hembras (Mengeling y cols, 1990). En el caso de la posible etiología de la

enfermedad asociada al virus de Aujeszky tampoco se aisló el agente ni se vió seroconversión en los animales afectados de PRRS, que además, no presentaban síntomas nerviosos.

Dentro de las posibles causas bacterianas, se señaló una serovariante de *Leptospira interrogans; bratislava* (Bolin y cols, 1990), así como la posible autoría de *Clamidia psittacii* (Daniels, 1990) e incluso *Campilobacter* (Erickson, 1990). También una micotoxina, la denominada fumonisina, fue especulada como posible etiología del PRRS, ya que por su efecto inmunosupresor pudiera favorecer la infección por otros agentes víricos o bacterianos que ya desarrollarían la enfermedad (Bane y cols, 1990).

El hoy bien conocido agente etiológico fue aislado por primera vez en 1991 mediante cultivo en macrófagos alveolares porcinos (MAP) a partir de muestras de animales enfermos por PRRS que incluían macerados de pulmón, cerebro, amígdalas y otros órganos de lechones de 2 a 10 días de edad, así como de plasma y suero de cerdas afectadas. Además se consiguió transmitir y reproducir experimentalmente la enfermedad (Terpstra y cols, 1991), denominando al virus por ellos aislado, virus Lelystad (LV), en honor a la ciudad holandesa donde se realizó el aislamiento. En EE.UU el virus no fue aislado hasta 1992 (Collins y cols, 1992), descubriéndose ya una diferencia antigénica considerable entre los aislados americanos con respecto al virus europeo (LV) mediante la técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) (Wensvoort y cols, 1992).

2. IMPORTANCIA ECONOMICA

Es indudable que el intenso y urgente desarrollo de la investigación relacionada con esta enfermedad ha venido motivado por las graves pérdidas económicas que la misma ha originado en las explotaciones porcinas.

Aunque es muy difícil determinar el quebranto económico atribuible a la enfermedad, debido a que es frecuente la complicación

por infecciones bacterianas secundarias (Loula, 1991), el impacto directo e indirecto atribuible al PRRS se puede establecer comparando los parámetros antes de la aparición de un brote en una granja, con los obtenidos durante y después del mismo. En este sentido, las pérdidas en la producción varían entre ninguna (infección detectada únicamente por un sondeo serológico), hasta un 20 % de pérdidas en la producción. Estas variaciones son atribuibles a las condiciones higiénicas de la granja, factores de manejo, variaciones en la virulencia de la cepa vírica etc.

Las pérdidas atribuibles a la enfermedad se fundamentan principalmente en un aumento de la tasa de lechones nacidos muertos, del número de momificaciones y de la mortalidad en lactación, junto con otros parámetros como retraso en el retorno a celo, acortamiento del periodo de gestación (5-7 días), y en cerdos destetados aumento de infecciones respiratorias, de la mortalidad, y de infecciones secundarias que causan disminución de la ganancia de peso y del consumo de pienso, con el consiguiente aumento del índice de conversión (Polson y cols, 1990)

Otras pérdidas vendrían dadas por el costo de tratamientos, gastos de mano de obra adicional, costos derivados de políticas de control y/o erradicación, investigación etc. En nuestro país, como ya se citó, la aparición de la enfermedad supuso el sacrificio de los cerdos afectados (Plana y cols, 1992).

Como un dato mas de la relevancia económica del problema, en un estudio económico realizado por Polson y cols (1990) sobre una explotación de 250 hembras en un brote agudo de la enfermedad, obtuvo unos gastos medios de 236 dólares por hembra, lo que supuso unas pérdidas totales de 59.781 dólares. Estudiando la evolución en el tiempo de los principales parámetros de producción involucrados en el proceso observó que la tasa de nacidos muertos alcanzaba un máximo en el primer mes tras la aparición de la enfermedad, disminuyendo hasta niveles normales en el tercer mes. La mortalidad en lactación y la momificación tras alcanzar un máximo en el segundo mes, la primera descendía mucho en el tercer y cuarto mes, mientras que la momificación mantenía el máximo en el tercer mes y caía a niveles

normales el quinto mes. El número de nacidos totales por camada, se mantuvo mas bajo de lo normal incluso en los dos años posteriores al brote. La tasa de partos empezó a declinar en el primer mes y alcanzó el máximo a los tres meses retornando a niveles normales en el séptimo mes. Los resultados anteriores se reflejaron en que durante los cuatro meses posteriores al brote el número de cerdos destetados por cerda disminuyó en 2,85 cerdos con respecto a los niveles basales de antes del brote; el número de cerdos destetados, debido al aumento de la mortalidad en lactación, fue el 82,1 % del número de nacidos vivos por camada. El descenso del número de cerdos nacidos vivos totales se debió al descenso del total de lechones nacidos por camada (28,2 %), al aumento del número de nacidos muertos (24,8 %), y al aumento del número de cerdos momificados (47 %). En el caso de areas enzoóticas, los efectos de la infección se han observado incluso tras 24 meses del brote agudo, con aumentos del 1 % en la mortalidad en cerdos de cría y del 0,5 % en la fase de cebo, así como descensos del número de lechones nacidos vivos por camada del 0,5 %.

En otros casos se presentan tasas de mortalidad en lactación tan altas como del 60-80 % en el comienzo del brote, incrementos en la mortalidad neonatal de 2 a 3 cerdos por camada, y aumentos en la tasa de nacidos muertos de hasta un 20 % (Reotutar, 1989).

Cuando esta enfermedad se establece crónicamente en una explotación, las pérdidas ocasionadas según el estudio económico de Moore y cols (1990) alcanzan a 18 dólares por cerdo en el momento del envío al matadero.

3. EPIZOOTIOLOGIA

Como ya se citó anteriormente, la enfermedad está ampliamente difundida en América del Norte y Europa, donde se sospecha que la incidencia clínica de la enfermedad tiende a disminuir, probablemente debido a la existencia de cepas de baja virulencia que causan infecciones subclínicas (Anelli, 1992). No obstante, aún existen pocos datos sobre la situación real de la enfermedad en los distintos países.

En EE.UU, estudios realizados mediante el empleo de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) frente a sueros recogidos en 1980 con anterioridad a la primera notificación de la enfermedad, han demostrado que el PRRSV estaba presente en el estado de Iowa en 1985 y en el de Minnesota en 1986. Tras la aparición clínica de la enfermedad, la incidencia se incrementó rápidamente alcanzándose un punto máximo en la misma durante los años 1989 y 1990. Así, en una encuesta realizada al azar sobre 396 granjas de 17 estados, 141 granjas tenían animales seropositivos al PRRSV, lo que suponía que un 36 % de las granjas encuestadas habían tenido contacto con el virus. La prevalencia de las granjas seropositivas variaba de 0 % en Oregón, Pensilvania y Tennessee al 82 % de Michigan (Morrison y cols, 1992).

Con respecto a la situación en Europa, no se conocen datos de la prevalencia de la misma, aunque se ha observado una disminución en la presentación clínica de la enfermedad tras el máximo observado en 1991. En un estudio serológico retrospectivo se observó la presencia de animales seropositivos en granjas alemanas entre 1988 y 1989 (Ohrlinger, 1992). Nuestro país se considera oficialmente exento de la enfermedad, sin embargo, en una encuesta realizada en el año 1992 por los laboratorios Hipra, Amer-Girona, se demostró que en hembras de granjas de producción de lechones, sobre un total de 56 explotaciones 35 eran positivas a la enfermedad (62,5 %); en explotaciones en ciclo cerrado de 214 granjas 131 eran positivas (61,2 %) y en explotaciones de engorde de 32 encuestadas 24 lo eran (75 %). La misma encuesta realizada en el año 1993 reveló positividades de 39 sobre 51 (76,5 %) en hembras de granjas de producción de lechones; 44 sobre 63 (69,8 %) en explotaciones en ciclo cerrado y de 25 sobre 29 (82,2 %) en granjas de engorde.

Aunque no se conoce totalmente cuales son con exactitud los medios de transmisión de la enfermedad, se considera que el mas frecuente es por contacto cerdo a cerdo (Komijn, 1991), por traslados de cerdos entre granjas (Edwards y cols, 1992), así como la vía aerógena, pudiéndose difundir por aire a distancias superiores a los 3 km, incluso 20 km (De Jong, 1991). Las investigaciones efectuadas no

han podido demostrar la transmisión del virus por medios indirectos como vehículos de transporte, ni tampoco por la vía hematológica (Scott, 1992). Igualmente no se ha conseguido aislar el virus o reproducir experimentalmente la enfermedad en ratones y ratas por lo que no parecen actuar como reservorios de la misma (Hooper y cols, 1994). Sin embargo, el PRRSV ha sido aislado de heces de patos expuestos al virus en el agua de bebida (Zimmerman y cols, 1993).

Parece ser posible la transmisión del virus por semen ya que cerdas inseminadas con semen recogido de verracos que presentaban sintomatología aguda y durante el periodo de máxima fiebre, enfermaban y seroconvertían a la enfermedad (Yeager y cols, 1993). Por otra parte, el PRRSV se ha aislado del semen de verracos infectados intranasalmente (Swenson y cols, 1993) con eliminaciones del virus a partir del día tercero postinfección (pi) hasta el día 43. También se ha conseguido el aislamiento del virus del tracto genital de un verraco en la segunda semana pi, no así a tiempos más tardíos (Blackburn y cols, 1992). En cuanto a la transmisión vía transplacentaria, esta se logró experimentalmente cuando las hembras eran infectadas durante el último tercio de la gestación (día 93), y no así cuando lo eran antes de la mitad de la misma (días 45-50) (Christianson y cols, 1992).

En infecciones experimentales se ha demostrado ampliamente la difusión por proximidad o por contacto (Christianson y cols, 1992) siendo el virus aislado esporádicamente a partir de nariz, heces, orina (Christianson y cols, 1992; Rossow y cols, 1992) y saliva (Wills y cols, 1995). No se han señalado infecciones humanas atribuibles al PRRSV, ni transmisión atribuible a insectos. En cuanto a la supervivencia del virus en canales de cerdos infectados, se ha observado que es posible el aislamiento del PRRSV tras 25 días a 4 °C, no así a los 32 días; a -20 °C el virus permanecía aún infectivo (Frey y cols, 1995). Tampoco se conoce cual es la supervivencia del virus en el medio ambiente ni en productos cárnicos.

Como factores de riesgo que incrementan la posibilidad de una infección por PRRSV en una granja se han señalado la presencia de un elevado número de individuos, el alojamiento en un único edificio, la

introducción de nuevos animales, el almacenamiento de purines bajo las granjas, la exposición a vehículos de transporte, las malas condiciones higiénicas, o la presencia de fumonisina en los piensos (Fiedler y cols, 1991; Vogel y cols, 1991; Blane y cols, 1992). La incidencia de la enfermedad es mayor en los meses de invierno, en que la presencia de bajas temperaturas, elevada humedad y la disminución del fotoperiodo facilitan la difusión de la misma (Keffaber, 1989; Komijn y cols, 1991).

Una vez que la enfermedad se instaura en una granja la misma parece persistir. Se ha demostrado que tras un año de un brote de PRRS en una granja, el virus aún circulaba por las zonas de cría y engorde, con elevadas tasas de seroconversión en el area de cría y existiendo numerosos cerdos seropositivos de tres meses de edad (Thacker, 1992). Este hecho también ha sido corroborado en infecciones experimentales, con persistencias superiores a los 12 meses, aislándose el virus incluso en títulos de 10^4 DI₅₀CT 6 semanas pi en diferentes órganos, pudiendo persistir conjuntamente durante varias semanas virus y anticuerpos (Ohrlinger y cols, 1992). También se ha demostrado la existencia de infecciones subclínicas o asintomáticas, lo que viene a demostrar que animales recuperados aparentemente de la enfermedad pueden servir de fuente de infección para cerdos susceptibles (Zimmerman y cols, 1992).

Existe una evolución con respecto a la presentación anterior de la enfermedad, con la aparición mas frecuente de formas crónicas. También es frecuente la infección subclínica o inaparente o asintomática como lo demostró la presencia de anticuerpos. Esto puede deberse a la presencia de cepas de PRRSV no patógenas o poco patógenas (Ohrlinger, 1992).

4. ETIOLOGIA

4.1. CARACTERISTICAS GENERALES DEL VIRUS DEL SINDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO

4.1.1. Propiedades de la partícula vírica

4.1.1.1. Morfología: El virus presenta pleomorfismo acusado aunque existe un predominio de los viriones esféricos con tamaños que oscilan entre 48 y 80 nm (62 nm de media). Estos viriones constan de zonas centrales electrodensas rodeadas de un envuelta membranosa. El core central mide de 25 a 35 nm de diámetro. La replicación vírica se inhibe tras el tratamiento con etanol o eter, lo que demuestra la presencia de una envoltura lipídica (Benfield y cols, 1992-a).

4.1.1.2. Propiedades físico-químicas:

4.1.1.2.1. Densidad: No se observan bandas del virus tras su purificación en gradientes de sacarosa. Sin embargo, en cloruro de cesio se observa una banda opalescente entre 1,18 y 1,19 g/ml, siendo 130 veces mayor el título al encontrado en sacarosa (Benfield y cols, 1992-a).

4.1.1.2.2. Estabilidad a la temperatura: La infectividad del virus se reduce en un 50 % tras una incubación de 12 horas a 37 °C y se inactiva completamente tras 48 horas de incubación a 37 °C o 45 minutos a 56 °C. El virus, tras un mes de incubación a 4 °C permanece inalterable. Lo mismo sucede cuando se conserva a -70 °C tras cuatro meses de incubación.

4.1.1.2.3. Estabilidad al pH: La infectividad del virus se reduce en un 90 % a pH inferior a 5 o mayor de 7.

4.1.1.2.4. Actividad hemaglutinante: No hemaglutina globulos rojos de pollo, cobaya, cerdo, oveja o humano (tipo 0). (Wensvoort y cols, 1991).

4.1.1.2.5. Actividad neutralizante: No se detectan anticuerpos neutralizantes en sueros de animales positivos mediante la técnica de IPMA en MAP infectados con el virus. No así cuando como sustrato se usan líneas celulares.

4.1.1.3. Acido nucleico: El tratamiento del virus con inhibidores de ADN como mitomicina C o bromo-deoxiuridina no reducen su infectividad, lo que demuestra que es un virus ARN.

4.1.1.4. Proteínas: Se han detectado tres proteínas de aproximadamente 15, 19 y 25 KD cuando se utiliza un suero policlonal de un animal convaleciente de la enfermedad. La primera de ellas es la proteína de la nucleocápsida, las dos siguientes proteínas de membrana, siendo la primera no glicosilada y la segunda si (Meulenberg y cols, 1995).

4.1.2. Replicación vírica

El PRRSV se cultiva de forma óptima en tres tipos de sistemas celulares: cultivos primarios de MAP (Wensvoort y cols, 1991); la línea celular CL2621 (Benfield y cols, 1992-b) y un clón derivado de la línea MA-104 (Kim y cols, 1993).

4.2. RELACION CON OTROS VIRUS

Como ya se ha expuesto, uno de los principales problemas que planteó en un principio esta enfermedad fue la identificación del agente etiológico. Una vez salvado este aspecto, y debido a la importancia de la nueva enfermedad, las investigaciones se centraron en la caracterización del virus.

Ya desde un inicio se comprobó que el PRRSV recordaba a los virus lactato deshidrogenasa del ratón (LDV), arteritis vírica equina (EAV) y

la fiebre hemorrágica del simio (SHFV), tanto en su morfología y tamaño, en los patrones proteicos, así como en la evidencia de que tanto *"in vivo"* como *"in vitro"* los macrófagos eran la célula diana utilizada para su multiplicación (Pol y cols, 1991; Plageman, 1992-a).

4.2.1. Virus lactato-deshidrogenasa del ratón

Este virus fue descubierto hace aproximadamente 30 años. Su denominación se debió a que produce un aumento de los niveles séricos de esta enzima por encima de 5 a 10 veces los normales en los ratones afectados (Riley y cols, 1960). Su importancia se debe a que es un contaminante muy frecuente de los tumores transplantables de los ratones (Riley y cols, 1978).

El agente muestra una gran especificidad tanto de hospedador, sólo afecta al ratón tanto doméstico como salvaje y no así a la rata, cobaya, hamster o conejo (Rowson y cols, 1985), como de infección celular. En este sentido se ha visto que el virus se multiplica exclusivamente en cultivos primarios de macrófagos de peritoneo, bazo, médula roja y probablemente pulmón e hígado, pero no en cultivos primarios de macrófagos activados o monocitos periféricos (Rowson y cols, 1985). Además, es de vital importancia en su cultivo la edad del ratón origen de las células; así, en ratones de 1 a 2 semanas de edad, un 80 % de los macrófagos son susceptibles a la infección, mientras que si el origen de las células son ratones de 2 a 5 semanas de edad, la susceptibilidad celular se reduce a un 5-10 % del total de la población celular (Onyekaba y cols, 1989-b). Esta diferencia de susceptibilidad según la edad del ratón probablemente se deba a una disminución de la proporción de células que expresan una proteína de superficie que actúe como receptor para el virus. Este último hecho se ha relacionado con una característica del virus, la posibilidad de producir infecciones persistentes en los individuos infectados. Según esta hipótesis, el virus persistiría en el animal mediante su replicación en los nuevos macrófagos susceptibles que se forman a razón de 100 a 1000 por día a partir de células precursoras no susceptibles (Stueckemann y cols, 1982; Onyekaba y cols, 1989-a).

El patrón proteico del virus revela la existencia de tres proteínas denominadas VP-1, VP-2 y VP-3. La VP-1 esta constituida por la proteína de la nucleocápsida y es de 13-15 kilodaltons (KD). La envuelta del virus posee dos proteínas, una de ellas no glicosilada (VP-2) de 17-19 KD y la otra glicosilada (VP-3), con un tamaño que varía de 24-44 KD (Michaelides y cols, 1973; Brinton-Darnell y cols, 1975; Coutelier y cols, 1986).

Al microscopio electrónico y por inmunofluorescencia se observa la localización perinuclear del virus (Stueckmann y cols, 1982-a; Harty y cols, 1987), siendo morfológicamente un virus esférico con envuelta y con un tamaño que oscila de 50-55 nm de diámetro y una nucleocápsida de 20-35 nm (Brinton-Darnell y cols, 1975; Horzinek y cols 1975). La densidad determinada en gradientes de sacarosa y glicerol es de 1,13-1,14 g/ml (Brinton-Darnell y cols, 1975).

El LDV es un virus ARN de cadena única y polaridad positiva con un tamaño de 14.222 pares de bases (pdb) (Godeny y cols, 1993), que presenta en su extremo 3' una cola de poliA de longitud variable (Plagemann y cols, 1992-b). Su genoma ha sido completamente secuenciado (Godeny y cols, 1993) poseyendo en su extremo 3' una zona no codificante de unos 80 nucleótidos que es precedida por dos zonas de lectura abierta (ORFs) completas en diferente marco de lectura en las que se superponen 11 nucleótidos. La situada mas proximal al extremo 3' codifica una proteína de unos 12,2 KD que ha sido identificada como la VP-1 por secuenciación del extremo amino-terminal de la misma; la siguiente ORF codifica una proteína de 171 aminoácidos con ningún sitio potencial de glicosilación, pero con tres segmentos potenciales de unión a membrana que se supone codificaría la VP-2. Esta última ORF se superpone en 10 nucleótidos con otra ORF vecina que pudiera codificar una proteína de 265 aminoácidos, cuya función aunque aún no determinada, en función de su tamaño y de la presencia de cuatro posibles sitios de glicosilación podría ser la VP-3. Del total de las ocho ORFs encontradas en este virus, recientemente se ha determinado que la ORF-7 codificaría la nucleocápsida vírica; la ORF-6 una proteína de la envuelta no glicosilada; la ORF-5 la glicoproteína de la envuelta mayoritaria; la ORF-2 una glicoproteína de la envuelta minoritaria; y

las ORFs 3 y 4 glicoproteínas de función desconocida (Chen y cols, 1994).

La localización de los genes de las proteínas estructurales en el extremo 3' de este virus pudiera recordar en un primer análisis a los alfa o rubitogavirus. Sin embargo, en dichos virus nunca se observa la solapación de las zonas de lectura abierta, no observándose similitudes entre los extremos 3' de éstos con respecto al LDV. Esta organización del genoma también se ha observado en arterivirus, coronavirus y torovirus (Spaan y cols, 1990), ya que en el LDV se observó la existencia de un agrupamiento de siete ARNs mensajeros subgenómicos derivados del extremo 3' del virus, de tamaños que oscilan de 1 a 3,6 kilobases (Kb). Todos ellos poseían en su extremo 5' una secuencia común al ARN genómico (secuencia conductora), que posiblemente se incorpora por un proceso de "splicing" a una secuencia nucleotídica específica situada previamente a las zonas codificantes para cada proteína (Kuo y cols, 1991).

4.2.2. Virus de la arteritis vírica equina

Este virus fue aislado por primera vez en 1953 en un brote surgido en Bucyrus, Ohio (Doll y cols, 1957) donde un 50 % de las yeguas preñadas de la granja afectada abortaron. Desde entonces han aparecido brotes poco frecuentes tanto en EE.UU como en Europa (Mumford, 1985). Sin embargo, los sondeos serológicos demuestran la gran difusión del virus correspondiéndose con infecciones subclínicas o inaparentes con sintomatología respiratoria que puede causar confusión con influenza equina (Mumford, 1985).

La replicación del virus se inicia en los macrófagos de pulmón (McColum y cols, 1971; Crawford y cols, 1973), desde donde difunde al resto del organismo detectándose el virus en todos los órganos con excepción del cerebro. Las células primarias de multiplicación del virus son los macrófagos de los lugares donde está presente, siendo células secundarias de replicación las células endoteliales (Mumford, 1985). "*In vitro*" también se observa la mayor amplitud de espectro del virus con respecto al del LDV, ya que se consigue su replicación en gran cantidad

de células; tanto cultivos primarios de células renales de caballos (McCollum y cols, 1961), conejos (McCollum y cols, 1962) y hamsters (Wilson y cols, 1962) como en líneas celulares establecidas, BHK21 (Hyllseth, 1969); RK-13 (McCollum, 1976); Vero (Hyllseth, 1973) e incluso una línea diploide de origen dérmico de caballo, la NBL-6 (McCollum y cols, 1986). También en este virus se ha observado la existencia de infecciones persistentes en caballos, con eliminaciones de virus vía semen incluso uno a dos años pi (Timoney y cols, 1986).

El patrón proteico de este virus se compone de 3 proteínas; la VP-1 de 12-14 KD; la VP-2 que es una proteína de la envuelta no glicosilada de 17-18 KD, y una tercera compuesta por un número variable de proteínas glicosiladas de pesos moleculares sin definir completamente (den Boon y cols, 1991).

El EAV es mas estable a la temperatura que el LDV (Harry y cols, 1981) y como éste su localización es perinuclear como se ha detectado por inmunofluorescencia y microscopía óptica (van Berlo y cols, 1980). Morfológicamente es un virus esférico con envuelta, con un diámetro de 60-83 nm y una nucleocápsida con un diámetro de 35 nm. Su densidad en gradientes de sacarosa varía de 1,17 g/ml a 1,2 g/ml (Hyllseth, 1970).

Este virus es un ARN de una sola cadena con tamaño aproximado de 13 Kb y polaridad positiva (van der Zeijst y cols, 1975), siendo la organización de su genoma, como en el LDV, similar a los coronavirus (Spaan y cols, 1990; den Boon y cols, 1991). El virus presenta una cola de poliA en su extremo 3', y en su replicación se han detectado la formación de diferentes ARNs víricos con tamaños que oscilan de 0.8 a 12.7 kb siendo este último correspondiente al tamaño del ARN genómico (van Berlo y cols, 1982). Con posterioridad (Spaan y cols, 1990; den Boon y cols, 1991) se ha demostrado la existencia de seis ARNs subgenómicos derivados del extremo 3' de tamaños que varían de 0,8 a 3,2 Kb. También en experimentos de traducción "*in vitro*" se ha comprobado que el ARN mas pequeño codificaba la nucleoproteína (VP-1) (van Berlo, 1986). Al igual que en el LDV se ha observado la presencia en el extremo 5' de estos ARN la presencia de una secuencia líder de 207 nucleótidos que es codificada por el extremo 5' del ARN genómico

(Spaan y cols, 1990), uniéndose a cada ARN por una secuencia común 5'-UCAAC-3' que se localiza a diferentes distancias previamente al codón de iniciación del ARN en cuestión (de Vries y cols, 1990; den Boon y cols, 1991). Aunque precediendo a cada zona de lectura abierta puedan aparecer mas de una de estas secuencias, siempre es una determinada donde se produce la unión de la secuencia líder.

En el EAV se distinguen siete ORFs (den Boon y cols, 1991). De la 2 a la 7 se solapan unas con otras de modo que se leen en diferente alineación con respecto a la inmediatamente anterior y posterior, siendo variable el número de nucleótidos de solapamiento. Además estas ORFs ocupan únicamente aproximadamente 3 Kb del genoma ya que las restantes 9 Kb del extremo 5' del genoma lo ocupa el gen de la polimerasa vírica, dividido a su vez en dos ORFs denominadas 1a y 1b.

A pesar de su similitud en la estructuración del genoma, cuando se compararon las 2,6 Kb del extremo 3' de los virus LDV y el EAV, no se encontraron grandes homologías con excepción de un segmento de 60 nucleótidos de largo dentro de la zona de lectura abierta 6, con un 63 % de similitud nucleotídica (Plageman y cols, 1992-b), además entre ámbos virus no se observan relaciones serológicas).

Actualmente este virus está incluido dentro del género Arterivirus de la Familia Togaviridae (Westaway y cols, 1985).

4.2.3. Virus de la fiebre hemorrágica del simio

El virus fue aislado por primera vez de monos a partir de brotes que se dieron simultáneamente en EE.UU y la Unión Soviética en 1964. La enfermedad cursa con fiebre, edema facial, anorexia, adipsia, deshidratación y hemorragias generalizadas, con mortalidades próximas al 100 %, en los monos del género macacus (Gravell y cols, 1986). Otros géneros pueden presentar una infección persistente y subclínica contribuyendo así a la difusión de la enfermedad.

El virus se cultiva en líneas de riñón de mono como las MA-104 o la BSC-1 (Wood y cols, 1970). Se ha observado a partir de un

aislamiento de un mono asintomático la aparición de una infección persistente en la línea MA-104 (Gravell y cols, 1980). También se sospecha que los macrófagos puedan ser las células diana del virus en los monos macacos (Gravell y cols, 1986).

Al microscopio electrónico en células MA-104 se observa una estructura similar a la de los dos virus anteriores, aunque los diámetros del virus y de su nucleocápsida son ligeramente mas pequeños, 40-45 nm y 22-25 nm respectivamente (Wood y cols, 1970). En gradientes de sacarosa muestran una densidad de 1,15 g/ml.

El genoma del virus es un ARN de una sola cadena poliadenilado (Sgripanti, 1985). A nivel proteico se han identificado tres proteínas estructurales: una proteína de nucleocápsida de 12 KD (proteína de la nucleocápsida, (N ó VP-1); una proteína no glicosilada de la envuelta de 16 a 18 KD (M ó VP-2) y una glicoproteína de la envuelta (E ó VP-3) de unos 50 KD. No se ha encontrado ninguna relación antigénica entre este virus y el LDV, el EAV, flavivirus, pestivirus y alfa y rubi togavirus.

4.3. BIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS DEL SINDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO

Ya en 1992 se estableció la hipótesis de que el PRRSV estaba relacionado con los virus anteriormente citados (Plagemann, 1992-a). Esta hipótesis se confirmó al lograrse secuenciar por entero el virus (Meulenbergh y cols, 1993). Tomando como sustrato macrófagos infectados con el virus, y tras la extracción del ARN vírico, síntesis de ADN complementario, fraccionamiento del mismo y clonaje en un vector, se consiguió la identificación total de la secuencia vírica, demostrando que el virus era un ARN de cadena positiva con un tamaño de aproximadamente 15.088 bases que termina en una cadena de poliA de longitud variable con un máximo de 20 adeninas en su extremo 3'. En el interior del ARN genómico se observaron ocho ORFs, de las cuales las 1a y 1b codifican la polimerasa vírica, de la 2 a la 6 codificaban proteínas asociadas a membrana y la 7 codificaba la nucleocápsida vírica. Al igual que en los virus anteriormente citados, en células infectadas, se observa la formación de ARNs subgenómicos,

concretamente 7, que contienen los extremos 3' víricos y una secuencia líder idéntica para todos ellos que deriva de la parte 5' del virus que se une a las zonas 3' mediante un sitio de unión que precede a cada ORF (Figura 1). Además precediendo a la ORF 1a se ha identificado la secuencia 5'-UUAACC- 3', que es similar a la que aparece en el LDV precediendo a los ARNs mensajeros 5, 6 y 8 (Plagemann, 1992-b). En el caso de los ARNs mensajeros del 4 al 7 la secuencia de unión encontrada sería 5'-(U/A)(U/C)AACC- 3', en el caso de los ARNs 2 y 3 ésta se ha identificado como 5'-UAAACC- 3' y 5' -UUGACC- 3' respectivamente.

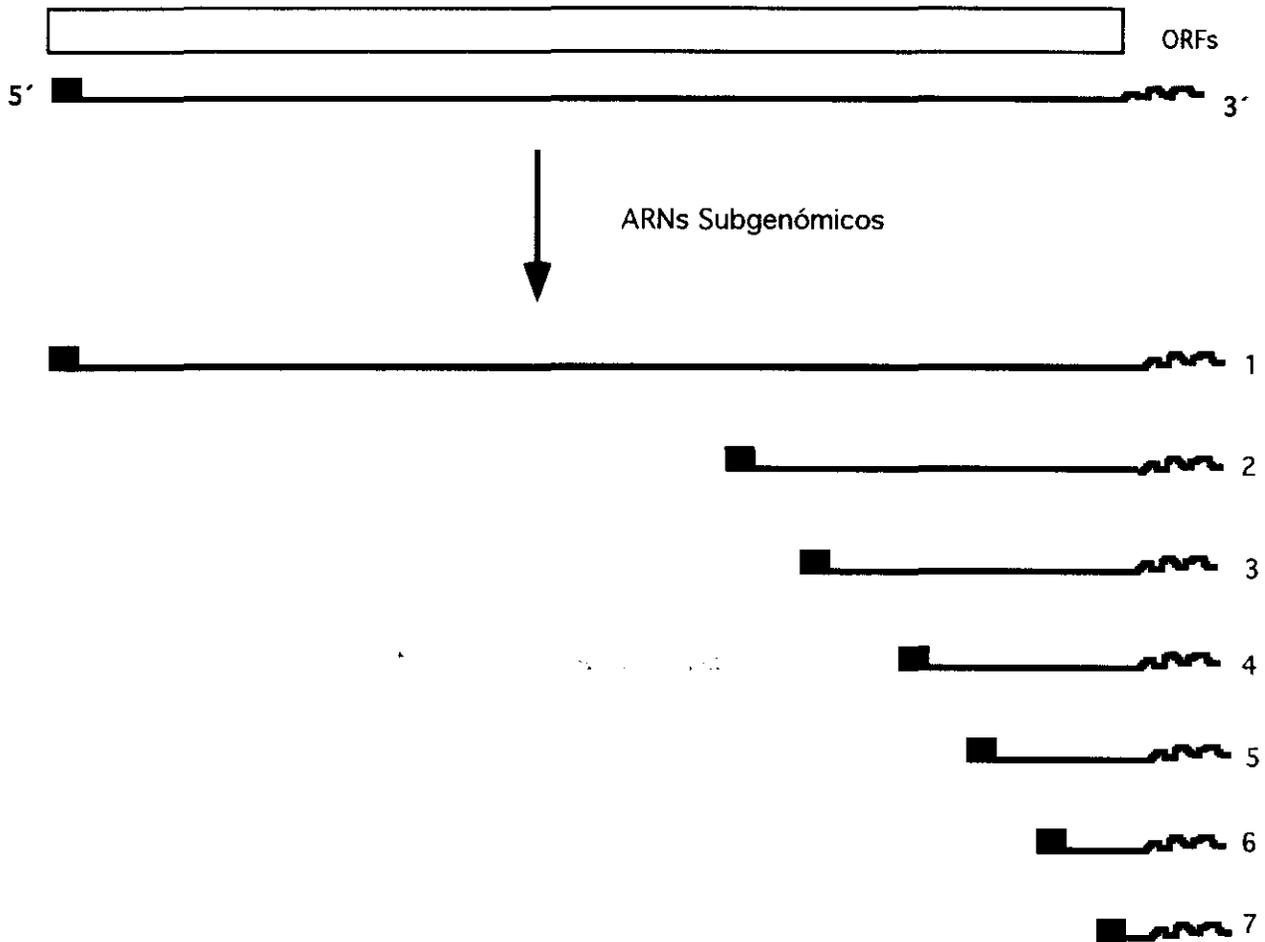


Figura 1.- Organización genómica del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino. Durante la replicación vírica se producen un total de siete ARNs subgenómicos que contienen en su extremo 5' una secuencia líder derivada del extremo 5' genómico (■), y en su extremo 3' una cola de poliA (~~~~~).

Por todo ello, se puede deducir que existen similitudes y diferencias entre los coronavirus y los virus LDV, EAV, y el PRRSV. Las similitudes vendrían determinadas, por la organización del genoma, la expresión de las proteínas estructurales mediante la síntesis de ARNs subgenómicos que derivan del extremo 3' del virus y por los dominios conservados de la polimerasa vírica. Así, en todos ellos la polimerasa vírica se expresa mediante el solapamiento de dos regiones denominadas 1a y 1b entre las cuales se forma una estructura similar a un nudo mediante la cual, por un fenómeno de deslizamiento, se expresa la parte 1b por un cambio de fase ribosomal. Además, en las polimerasas de estos virus se han encontrado tres zonas bien definidas. Una zona denominada región hidrofóbica, otra que posee dominios ricos en cisteínas y una secuencia consenso denominada serín proteasa constituida por tres residuos aminoacídicos histidina, aspartico y serina en posiciones mas o menos próximas. Las diferencias entre éstos virus se fundamentarían en los datos obtenidos por secuenciación de los mismos (estando los tres últimos mucho más relacionados entre si), y el tamaño del genoma. Así mientras en coronavirus y torovirus oscila entre 27-30 Kb (Spaan y cols, 1988; Snijer y cols, 1990), el de los tres virus citados oscila entre 13 a 15 Kb, con tamaños para la polimerasa vírica de 20-22Kb (Bournsnell y cols, 1987) en coronavirus, frente a los 10-11 Kb del resto (Plagemann y cols, 1992-b). Otra diferencia con respecto a coronavirus vendría dada por su morfología ya que en ningún caso se presentan las espículas típicas de los mismos (Timoney y cols, 1986).

Estudiando la similitud de las secuencias de las polimerasas, proteínas asociadas a membranas y nucleocápsida entre el PRRSV y el EAV, se observaron variaciones de entre un 20 a un 36 % mientras que con respecto a las secuencias conocidas del LDV oscilaban de un 29 a un 67 %, indicando la mayor similitud con éste último. Este hecho viene también corroborado porque "in vitro" ámbos se multiplican preferentemente en células de cultivos primarios de macrófagos, mientras que el espectro de multiplicación celular del EAV es mucho mas amplio como ya se señaló.

Como resumen se puede establecer que los tres virus presentan similitudes morfológicas y parecen poder dar lugar a infecciones persistentes, por lo cual se ha propuesto la inclusión del PRRSV dentro de la nueva Familia Arteriviridae (Meulenberg y cols, 1993). Con posterioridad se ha propuesto que la denominación de la nueva Familia no sea Arteriviridae, nombre únicamente relacionado con el EAV, sino el de Familia Mamurnaviridae (macrophage multiple RNA viruses), denominación que señalaría tanto a las células diana de éstos virus, como su propiedad de síntesis de múltiples ARNs subgenómicos (Conzelmann y cols, 1993).

Se han caracterizado recientemente la totalidad de las proteínas del PRRSV, denominándolas respectivamente N, M y E, donde la N posee 15 KD y se corresponde con la nucleocápsida vírica, siendo codificada por la ORF-7; la M de 18 KD correspondería a la proteína de membrana no glicosilada, codificada por la ORF-6 y la E, de 25 KD sería una proteína de membrana glicosilada, codificada por la ORF-5. También señalan la existencia de dos bandas débiles de 28 y 42 KD, que atribuyen a dímeros de la ORF-5 (Meulenberg y cols, 1995).

5. PATOGENIA

Pocos son aun los datos disponibles sobre la patogenia del PRRS. La enfermedad presenta un periodo de incubación variable oscilando entre 5 y 35 días según los distintos autores (Dea y cols, 1992; Edwards y cols, 1992).

Parece ser que el virus penetra por vía oro-nasal, desde donde difunde a pulmón para replicar en macrófagos alveolares. No obstante, para algunos autores se produciría una primera multiplicación vírica en los epitelios nasal y bronquiolar (Pol y cols, 1991). Desde el pulmón el virus se disemina vía hematogena circulando de forma libre, o ligado a leucocitos o monocitos circulantes. La viremia se detecta de los días 1 pi hasta como máximo el día 56, aunque suele ser mas corta (Edwards y cols, 1992). Debido a la diseminación hematogena, el virus llega a los distintos órganos destacando, de modo importante, el bazo donde posiblemente los macrófagos esplénicos soporten la replicación vírica.

En este sentido, por inmunoperoxidasa sólo se ha detectado la presencia de antígenos víricos en bazo y pulmón (Pol y cols, 1991).

En hembras gestantes el virus puede llegar vía hematógica a la placenta, atravesarla y llegar al feto produciendo su muerte. El paso a la placenta puede no requerir necesariamente su asociación a células hemáticas, ya que el virus ha sido aislado tanto de suero como de plasma o leucocitos periféricos. En inoculaciones experimentales de hembras preñadas se ha demostrado que la incidencia de la infección transplacentaria con el PRRSV es marcadamente mayor en hembras expuestas al virus con posterioridad a los 90 días de gestación. Este hecho se corresponde con los principales trastornos reproductivos asociados al virus, como partos prematuros, o cerdos nacidos muertos y débiles. En el feto, el virus se ha aislado de pulmón, hígado, riñones, bazo, suero y fluidos corporales de fetos vivos, siendo imposible su aislamiento de fetos momificados o autolisados (Terpstra y cols, 1991). En el primer tercio de gestación se han descrito retornos a celo y bajas tasas de concepción indicando que la infección transplacental temprana es posible, terminando con la gestación en ese caso (Loula, 1991). En inoculaciones experimentales de hembras preñadas durante el segundo tercio de gestación se observó que cuando se sacrificaban éstas no se observaba la presencia del virus en ninguno de los fetos. Sin embargo, cuando el virus se inoculaba directamente en los fetos, éstos eran capaces de soportar la multiplicación del mismo, por lo que más que a una falta de susceptibilidad de los fetos al virus, se debería a diferencias de permeabilidad de la placenta (Christianson y cols, 1993). La inoculación experimental de hembras en gestación tardía por vía intranasal va acompañada de la presencia de lesiones importantes en la placenta materna como vasculitis multifocales, que pueden estar implicadas en la muerte fetal por hipoxia, o microseparaciones en las uniones materno-fetales epiteliales que pueden ser la causa del retraso en el crecimiento de los cerditos nacidos por la importancia de las células epiteliales en el transporte de nutrientes en la placenta (Stochore-Zurwieden y cols, 1993). Otros autores, sin embargo, únicamente han observado lesiones en placenta a nivel de miometrio (Christiansen y cols, 1992), posiblemente debido a diferencia de patogenicidad de las cepas víricas utilizadas.

En los machos, aunque el virus se puede eliminar por el semen, no se ha conseguido su aislamiento de testículos o glándulas accesorias (Ohrlinger, 1992), por lo que aun no se sabe si existe multiplicación vírica en el aparato reproductor masculino o si procede de contaminación sanguínea. En estudios experimentales se ha conseguido la seroconversión de hembras inseminadas con semen extraído de animales infectados por vía intranasal, retornando las mismas a celo con posterioridad, por lo que se especula que el semen contaminado con PRRSV pueda, además de tener una gran implicación en la transmisión de la enfermedad, ser una causa de problemas de infertilidad temprana en cerdas (Yaeger y cols, 1993). Se ha señalado la disminución de la calidad del semen en centros de inseminación donde se ha detectado la infección por PRRSV (Feitsma y cols, 1992). Sin embargo, en estudios experimentales realizados hasta la fecha sólo se ha observado la disminución del volumen y el incremento del pH del eyaculado sin alteración del resto de características morfológicas como concentración o movilidad entre muestras pre y post-exposición al PRRSV (Swenson y cols, 1994). El virus, no obstante, era eliminado por semen desde los días 3 al 43 pi.

6. SINTOMATOLOGIA

La sintomatología es variable, afectando a los sistemas reproductor, respiratorio y circulatorio. La enfermedad se puede presentar en tres formas: aguda, crónica y subclínica.

6.1. Dentro de la forma aguda de la enfermedad, se han señalado tres fases;

6.1.1. Fase inicial:

Como síntomas tempranos aparecen inapetencia, letargia, depresión y fiebre moderada (39-40 °C) (Hill, 1990). En algunas granjas también se observan como signos iniciales de la enfermedad cianosis transitoria de orejas, vulva, cola, y abdomen, que a menudo no afectan a más del 5 % de los cerdos afectados (De Jong y cols, 1991). Dicha

cianosis en casos extremos puede producir necrosis de las extremidades.

Los síntomas respiratorios, disnea y polipnea, son frecuentes en cerdos en crecimiento y cerdos de reemplazo, con frecuentes contaminaciones secundarias por micoplasmas y bacterias. Estos se caracterizan por toses, respiración laboriosa y polipnea (White, 1991).

Los abortos aparecen de modo esporádico, afectando a menos del 3 % de las hembras.

6.1.2. Fase de climax:

Predominan los síntomas reproductivos, con partos prematuros, aumento de animales nacidos muertos, momificaciones, lechones débiles y aumento de la mortalidad en lactación.

Los partos prematuros se producen entre los días 107 y 113 de gestación afectando hasta a un 30 % de las hembras, (De Jong y cols, 1991). Las tasas de nacidos muertos y de momificados pueden alcanzar el 25 y el 35 % respectivamente (Hooper y cols, 1992), lo que repercute finalmente en la obtención de una reducción media del número de lechones por camada de cuatro animales (Polson y cols, 1990).

Los cerditos recién nacidos a menudo son débiles, poseen dificultad para amamantarse, presentan edema periorcular, incoordinación y parálisis del tercio posterior, pelo erizado y mioclonia (Plana y cols, 1992). También pueden mostrar respiración laboriosa (Terpstra y cols, 1991), y tendencia a hemorragias como resultado del corte de la cola, en la región umbilical o en los lugares en que se les inyectó hierro, particularmente si se aplica con anterioridad a los 3 días de edad. En ocasiones aparece diarrea que apenas responde a los tratamientos de color negruzco o grisáceo, como resultado de presencia de sangre en intestino (Keefaber, 1989). La mortalidad en lactación puede alcanzar incluso al 80 % de los animales (Loula, 1991).

En cerdos en crecimiento, durante esta fase de climax, los signos son variables, desde granjas con enfermedad respiratoria severa a

otras en que no se observan dichos síntomas. Son frecuentes las complicaciones por infecciones secundarias tanto por bacterias; *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella cholerasuis*, *Pasterella multocida*, como por virus; herpesvirus, citomegalovirus, coronavirus porcino, paramixovirus etc.

6.1.3. Fase final:

Caracterizada por retorno de los parámetros reproductivos a la casi normalidad, y signos respiratorios variables en animales de finalización y engorde.

6.2. Frente a la descrita presentación aguda de la enfermedad, actualmente se observa que por muestreo serológico y aislamiento de virus el agente continúa circulando en las granjas (Keffaber y cols, 1992; Loula, 1992), tendiéndose a una presentación mas crónica caracterizada por la disminución del número de lechones por camada, reducción de la producción de cerdos en cebo (Christiansen y cols, 1992), aumento de la muerte postdestete de hasta 2 o 3 veces la normal, incrementos lentos de ganancia de peso, e incluso desequilibrios entre crecimiento y desarrollo.

6.3. Además también se han señalados casos de infecciones subclínicas en granjas americanas, apareciendo individuos asintomáticos seropositivos (Morrison, 1992).

7. LESIONES

En lechones lactantes, indudablemente la lesión mas frecuente asociada al PRRSV es la presencia de una neumonía intersticial. Sin embargo también se han señalado, aunque no de modo constante, otras como aumento del número de células en el miocardio o lesiones vasculares en el cerebro.

7.1. LESIONES MACROSCOPICAS

En la mayoría de las infecciones por el PRRSV no complicadas con otros agentes no se observan lesiones macroscópicas significativas. Algunos autores han citado la presencia de edema subcutáneo (anasarca), exceso de exudado abdominal sanguinolento, pleuritis, riñones congestivos, y ocasionalmente hemorragia del miocardio, con engrosamiento y moteado blanco del corazón (Hoeffling, 1990). También se han reseñado lesiones en pulmón con consolidación moderada, particularmente en los lóbulos craneales, y a veces presencia de fluido pericárdico o torácico, con frecuente enmascaramiento de las mismas por infecciones secundarias (Done y cols, 1992).

En infecciones experimentales realizadas con una cepa española en cerdos de 2 meses de edad se encontraron múltiples focos de consolidación en pulmón, ganglios linfáticos mandibulares congestivos así como ligeras hemorragias en la serosa del intestino delgado. En animales nacidos de madres infectadas, y sacrificados a los 8 o 12 días de edad se observaron focos pequeños de consolidación de color grisáceo (Plana y cols, 1992). La presencia de áreas de consolidación en pulmón también es notificada por diversos autores en lóbulos contiguos, mas pronunciadas en las caras ventrales de los lóbulos medios y accesorios, parte craneal del lóbulo caudal y a veces el apical (Ramos y cols, 1992).

7.2. LESIONES MICROSCOPICAS

A nivel microscópico se han señalado lesiones en el aparato respiratorio, cerebro y aparato circulatorio principalmente (Hoeffling, 1990).

7.2.1. Aparato respiratorio

En el epitelio nasal se ha señalado metaplasia, degeneración de las células epiteliales de la mucosa nasal con pérdida del epitelio ciliado y degeneración hidrópica de las células epiteliales (Collins y cols, 1992). Las células traqueales no se ven afectadas aunque muchas

células del epitelio bronquiolar sufren degeneración hidrópica y algunos lúmenes bronquiales se llenan de células de descamación, las paredes bronquiales no se infiltran de células inflamatorias (Pol y cols, 1991).

En pulmón, se observa la lesión mas consistentemente asociada a la infección por PRRSV; la presencia de una neumonía intersticial con engrosamiento del septo alveolar de células mononucleares (monocitos, células plasmáticas, linfocitos y neutrófilos) (Hoeffing, 1990; Pol y cols, 1991; Ramos y cols, 1992; Collins y cols, 1992). En ocasiones areas de neumonía catarral quizás debido a infecciones secundarias (Pol y cols, 1991; Done, 1992). También se produce hiperplasia de neumocitos tipo II sin acompañamiento constante de células epiteliales degeneradas. Los espacios alveolares se presentan llenos de acúmulos proteicos y células degeneradas con hipereosinofilia en el citoplasma y nucleo picnótico. También se aprecian acúmulos perivascuales e intersticiales de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Al microscopio electrónico existen abundantes células degeneradas y necróticas en el infiltrado intersticial, así como hiperplasia de neumocitos tipo II (Ramos y cols, 1992) . En mucosa nasal y tejido pulmonar se observan abundantes células epiteliales con elevada vacualización del citoplasma (Pol y cols, 1991).

7.2.2. Cerebro

Los cambios histológicos en cerebro no son constantes, de hecho existen autores que no los han observado nunca (Pol y cols, 1991; Done, 1992). Sin embargo, se ha señalado en ocasiones la presencia de encefalitis mononuclear subaguda y perivasculitis con macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos rodeando los vasos, así como inflamación de la materia blanca del cerebro mas grave en la médula (Collins y cols, 1992).

7.2.3. Aparato circulatorio

En el sistema vascular aparece una marcada hinchazón de las células endoteliales de capilares y venas pequeñas con alteración de la integridad endotelial y disfunción de las proteínas plasmáticas en la

capa subendotelial. Secundariamente se produce la adhesión al endotelio de fibrina, plaquetas y células rojas. También se dan pequeños trombos celulares unidos a la pared de las venas pulmonares, que pueden causar una completa oclusión del lumen causando una pronunciada congestión del lóbulo pulmonar correspondiente. La túnica media y adventicia de los vasos se caracteriza por degeneración, necrosis e infiltraciones mono y polimorfonucleares. Los macrófagos aparecen aumentados de tamaño, hinchados y con frecuencia contienen hemosiderina que puede verse en espacios interalveolares, lumen y pared celular de los vasos sanguíneos dañados. En el trombo se aprecian depósitos cálcicos (Goovaerts y cols, 1992). Esta lesión de daño endotelial seguido de depósitos de fibrina y plaquetas y trombosis vascular, pudiera ser de interés en la aparición de determinados signos clínicos como cianosis de vulva, extremidades y orejas.

7.2.4. Otros órganos

7.2.4.1. Bazo.- Ligera disminución de linfocitos en los acúmulos linfocitarios periarteriales (Pol y cols, 1991).

7.2.4.2. Corteza tímica.- criptas de amígdalas y ganglios linfáticos mesentéricos; con disminución de linfocitos con infiltración de neutrófilos en la médula de los linfonódulos mesentéricos (Pol y cols, 1991).

7.2.4.3. Hígado.- Tras el segundo día pi dilatación de los sinusoides que contienen abundantes neutrófilos (Pol y cols, 1991).

7.2.4.4. Placenta.- Al microscopio óptico la placenta parece similar a la de los individuos no infectados excepto por la presencia de algunas microseparaciones multifocales en el útero y en el epitelio coriónico en algunas hembras (50 %), En estas zonas se observa necrosis de las células epiteliales y descamación celular. A veces existe infiltración celular en la placenta fetal, no así en la materna. También se encuentran células mononucleares en el epitelio uterino, alrededor de los vasos sanguíneos, submucosa uterina y a veces incluso en miometrio. Ultraestructuralmente existen cambios degenerativos del

epitelio trofoblástico y maternal con vacualización del retículo endoplásmico rugoso e hinchazón mitocondrial. En algunas células endoteliales de capilares y pequeños vasos sanguíneos de la placenta materna se observa vacualización y partículas víricas en la superficie luminal, así como ocasionalmente entre las células epiteliales uterinas y el endotelio capilar de la placenta fetal (Stockhofer-Zurwieden, 1992).

8. INMUNOLOGIA DEL PRRS

La gran mayoría de los cerdos parecen ser inmunes clínicamente a la enfermedad tras recuperarse de PRRS. Sin embargo, una proporción de cerdos de la granja afectada suele escapar a la infección pudiendo con posterioridad sucumbir a ella, y contribuyendo, por ello, al mantenimiento de la infección en la misma. También se han señalado casos de reinfección de hembras durante la preñez (Plana, 1992). Hasta la fecha, no se ha conseguido aislar el virus de un animal infectado con posterioridad del tercer mes pi. Sin embargo, el virus puede persistir en una población infectada al menos durante seis meses tras el cese de los signos clínicos (Blackburn y cols, 1992), posiblemente debido a la infección de nuevos cerdos susceptibles.

Los lechones nacidos de hembras inmunes son inicialmente seropositivos, y a las cuatro semanas de edad seroconvierten a seronegativos. Sin embargo, pueden nuevamente seroconvertir a las 6-7 semanas por la exposición al virus existente en la granja, manteniendo títulos de 1/1024 o superiores mas allá de los seis meses (Dee y cols, 1993 I-b).

Se ha sugerido que la replicación del PRRSV pudiera incrementarse por la presencia de anticuerpos virus-específicos. La formación de inmunocomplejos es una respuesta inmune normal para la eliminación de virus por los fagocitos mononucleares. Sin embargo, en el caso del PRRS éstos parecen jugar un importante papel en el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente. Así, se ha comprobado que la presencia de anticuerpos específicos frente al virus incrementa de 2 a 4 veces la producción de antígenos víricos, con

aumentos del título vírico de 10 a 100 veces (Choi y cols, 1992). Todo esto parece indicar que los anticuerpos no siempre protegen frente a la infección por PRRSV, ya que la formación de inmunocomplejos incrementa la replicación vírica.

El hecho de que no exista protección cruzada entre distintas cepas del PRRSV, puede crear problemas para el desarrollo de vacunas efectivas frente a todas ellas, aunque se ha citado la existencia de protección cruzada de una vacuna viva preparada con una cepa norteamericana frente al LV europeo (Gorcyca y cols, 1992).

Aún existen muchas dudas con respecto a los mecanismos de inmunidad. Así, los anticuerpos detectados por los diferentes test serológicos aparentemente no protegen; no neutralizan el virus en cultivos de macrófagos y los animales seropositivos pueden ser a la vez virémicos (Ohlinger, 1992; Paton y cols, 1992). Según estas conclusiones se pone en duda que el análisis serológico de los animales pueda ser directamente utilizado como indicador de inmunidad. De hecho, en estudios experimentales se ha demostrado que el PRRSV puede ser aislado de pulmones de animales con anticuerpos neutralizantes frente al virus por encima del día 72 pi (Ohlinger, 1995). En general, los anticuerpos frente a la enfermedad tienen un papel protector limitado, los cerdos infectados pueden permanecer virémicos de 4 a 6 semanas posteriormente a la formación de anticuerpos, siendo capaces en este tiempo de la transmisión de la enfermedad a otros cerdos coexistiendo virus y anticuerpos (Wensvoort, 1995).

Otro aspecto ha considerar es el posible papel inmunosupresor del virus. Ya desde comienzos de la aparición de la enfermedad muchos investigadores señalaron la existencia en las granjas afectadas de un aumento tanto en la prevalencia como en la gravedad de otras enfermedades endémicas como rinitis atrófica, neumonía enzoótica, infecciones por *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasterella multocida* tipos A y D así como *Salmonella* (Dial y cols, 1990; Moore y cols, 1990).

Existen diferentes hechos que avalarían que el PRRSV provoque inmunosupresión: La multiplicación del mismo en macrófagos tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" con lisis de los mismos, su relación con virus como el LDV, o el de la EAV, que modulan la respuesta inmune mediante su replicación en macrófagos, la asociación entre la presencia del virus y múltiples enfermedades secundarias, etc. Sin embargo, en experimentos realizados por Molitor y cols (1990), se descubrió que la infección por el virus parece incrementar la respuesta humoral y celular frente a una amplia variedad de antígenos. Todo lo expuesto parece indicar que el virus actúa alterando la respuesta inmune, por una parte el virus en pulmón deprime la habilidad de respuesta frente a infecciones bacterianas o víricas secundarias, mientras que fuera del mismo actuaría aumentando las respuestas antígeno-específicas.

9. DIAGNOSTICO

Previamente al aislamiento del agente causal por primera vez, el PRRS se diagnosticaba por exclusión de otras posibles causas de trastornos reproductores y/o respiratorios, así como por la observación microscópica de la neumonía intersticial típica.

En la actualidad el diagnóstico de la enfermedad se fundamenta en:

9.1. DIAGNOSTICO CLINICO

Debido a la gran diversidad que se observa en la presentación clínica de la enfermedad éste sólo es útil en los casos en que la enfermedad se presente de forma aguda. La presencia del PRRSV en una granja debe ser sospechada cuando en menos de dos semanas se presentan tasas de abortos y partos prematuros superiores al 8 %, tasa de nacidos muertos mayor al 20 %, o mortalidad de lechones en la primera semana de vida superior al 25 % (Cromwijk, 1991).

9.2. DIAGNOSTICO ANATOMO-PATOLOGICO

Como ya se ha señalado la neumonía intersticial con engrosamiento de los septos alveolares e infiltración de células mononucleares es la lesión mas comunmente encontrada en casos de PRRS. Dicha lesión afecta a cerdos de todas las edades y a la totalidad de los lóbulos pulmonares.

Otras lesiones histológicas asociadas al PRRS en cerdos en crecimiento serian rinitis, encefalitis no supurativa y miocarditis multifocal (Collins y cols, 1992).

9.3. DIAGNOSTICO LABORATORIAL

En este sentido, el diagnóstico se fundamenta en el uso de técnicas directas, para la determinación de la presencia del virus, e indirectas, para la determinación de anticuerpos. Entre estas últimas, la mas popularmente conocida ha sido la técnica inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) que continua, de hecho, siendo la mas ampliamente usada en Europa, no así en EE.UU donde se impuso la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

El aislamiento del virus se puede realizar a partir de plasma, sangre y fracción leucocitaria de animales en fase aguda así como de macerados de distintos órganos de animales nacidos muertos o débiles pero no de fetos en fase de momificación. Aunque también se ha aislado de pulmón, cerebro, amígdalas, timo, nódulos linfáticos, bazo, corazón y médula osea, los tejidos mas idoneos son pulmón y suero mediante inoculación en cultivos primarios de macrófagos alveolares porcinos o en las líneas celulares CL2621 o MA-104, a partir de cuyos cultivos se pueden realizar el diagnostico por identificación indirecta.

El diagnóstico serológico se emplea entre otros para ayudar al diagnóstico diferencial con otras enfermedades reproductivas y/o respiratorias, establecer el estatus de infección de las granjas que donen o reciban reproductores e investigar la causa de una infección en una granja.

Una de las principales dificultades del diagnóstico serológico es la variación antigénica existente entre cepas del PRRSV (Wensvoort y cols, 1992). Así, una prueba serológica desarrollado frente a una cepa del PRRSV no siempre es idónea para la detección de anticuerpos frente a otras cepas. Este hecho es potencialmente un problema cuando cepas europeas se usan en pruebas aplicadas a sueros de EE.UU y Canadá o viceversa.

9.3.1. Técnicas indirectas

9.3.1.1. IPMA

El primer método diagnóstico de la enfermedad aplicado por Wensvoort y cols en 1991 para la detección de anticuerpos en cerdos, fue el ya citado IPMA , siendo de hecho la técnica diagnóstica mas ampliamente difundida para el diagnóstico actual de la enfermedad. Sin embargo, su uso en las enfermedades infecciosas no es nuevo, ya que habia sido aplicada a la detección de anticuerpos frente a varios Togavirus como la Peste Porcina Clásica (Wensvoort y cols, 1986) o la Diarrea Vírica Bovina (Jensen y cols, 1981). La técnica se fundamenta básicamente en que la peroxidasa es capaz de catalizar la oxidación de un reactivo, el 3-amino-9-etilcarbazol, por el agua oxigenada formándose un producto rojo insoluble que puede ser visualizado al microscopio óptico (Graham y cols, 1965). Además de MAP, también pueden ser utilizados como sustrato cultivos de las líneas celulares ya señaladas, detectándose anticuerpos frente a la enfermedad a partir del sexto día pi (Ohlinger y cols, 1991). Estos anticuerpos parecen persistir durante al menos 12 meses, aunque algunos cerdos se convierten en seronegativos tras 4 o 6 meses. Como inconvenientes de la misma estan el que a pesar de ser una técnica altamente específica, sin embargo, no es muy sensible (Wensvoort y cols, 1991), el que al deberse realizar la lectura por visualización al microscopio óptico no está exenta de subjetividad, no pudiendo ser por ello automatizada.

Aunque inicialmente en Alemania, Holanda y Gran Bretaña se consideraba la no existencia de falsos positivos a esta técnica

(Ohlinger y cols, 1991), el hecho de que con posterioridad se descubrieran anticuerpos frente a la enfermedad en sueros de animales tomados entre los años 88/89 hace sospechar la posible existencia de una agente vírico aun no conocido que pudiese causar reacciones cruzadas (Ohlinger, 1992). También es frecuente la existencia de falsos negativos, ya que un 25 % de los cerdos afectados no muestran seroconversión. Mediante el IPMA se pueden detectar anticuerpos en sangre precalostrual o en fluidos ascíticos de animales nacidos muertos o lechones débiles.

9.3.1.2. IFI

En EE.UU la inmunofluorescencia ha tenido mejor aceptación que el IPMA. Los niveles de detección son similares, hayándose anticuerpos a partir también del sexto día pi (Yoon y cols, 1992). Con esta técnica se pueden testar tanto IgG como IgM usando el correspondiente antiespecie conjugado con fluoresceína. Los inconvenientes son prácticamente los mismos que los del IPMA.

9.3.1.3. ELISA

Albina y colaboradores, 1992, propusieron una técnica ELISA para el diagnóstico serológico. Sin embargo, este ELISA, que como sustrato posee tapices celulares infectados con el virus entero, ha demostrado ser menos sensible y producir una elevada coloración de fondo al testar sueros de algunos animales seronegativos (Edwards y cols, 1992). Actualmente se han desarrollado otros ELISAS comerciales con los pocillos tapizados con un extrato celular que contiene la proteína codificada por la ORF-7 sintetizada por ingeniería genética. Con ello se logra eliminar el elemento subjetivo y se consigue el testaje a gran escala (Sanz y cols, 1995).

9.3.1.4. Seroneutralización

Otro método diagnóstico es la Seroneutralización (SN) in vitro. Sin embargo, esta sólo tiene utilidad cuando se utilizan como sustrato células diferentes a cultivos primarios de macrófagos alveolares

porcinos, ya que se ha observado que los anticuerpos son importantes en el mantenimiento de la infección por PRRS y que la formación de inmunocomplejos favorece la endocitosis de los mismos por los macrófagos (Choi y cols, 1992). Mediante el uso de una línea celular, la MA-104, los anticuerpos neutralizantes son además de aparición tardía (6-8 semanas pi) (Christoffer-Hennings y cols, 1992). Con posterioridad, se ha conseguido incrementar la sensibilidad de la técnica mediante la inclusión de suero fresco en la dilución del virus. De este modo, los anticuerpos neutralizantes pueden ser detectados entre los días 9-11 pi. Todo lo expuesto se atribuyó a que probablemente la neutralización temprana de los sueros se estimula por la presencia de complemento, es decir, los anticuerpos tempranos pueden tener baja afinidad de unión a virus o baja habilidad para neutralizar la infectividad vírica (Yoon y cols, 1994). A pesar de lo expuesto, la SN es considerablemente menos sensible que la IFI o el IPMA.

Si bien todas las técnicas anteriores son susceptibles de uso de un modo directo, es decir para la identificación del agente causal, lo son con mucha mayor frecuencia de un modo indirecto, en la determinación de anticuerpos.

9.3.2. Técnicas directas

9.3.2.1. *Inmunofluorescencia directa (IFD)*

Para la detección del virus en tejidos se ha usado la IFD para demostrar la presencia del antígeno vírico en secciones histológicas de tejidos como pulmón y bazo o en cultivos celulares. También se han diseñado anticuerpos monoclonales conjugados a fluoresceína que detectan tanto aislados europeos como norteamericanos (Benfield y cols, 1992-b; Nelson y cols, 1993).

9.3.2.2. *Inmunoperoxidasa*

Para la detección del proteína en tejidos fijados con formalina se ha desarrollado un test de inmunoperoxidasa que produce tinción

específica en el citoplasma de las células infectadas (Halbur y cols, 1994).

9.3.2.3. Inmunohistoquímica

En Canadá se han aplicado técnicas inmunohistoquímicas para la detección directa del virus a partir de monocapas de macrófagos o directamente de tejidos. Esta técnica se vio muy favorecida por la existencia de un anticuerpo monoclonal que es capaz de reconocer una de las proteínas del virus, concretamente la que migra a la altura de 15 KD en geles de poliacrilamida, y que corresponde posiblemente a la nucleocápside vírica. La reacción se visualiza con el uso de un segundo anticuerpo frente a la IgG de ratón marcada con oro cuyo efecto se incrementa con plata. Cuando en vez del monoclonal se usa un policlonal, sin embargo, el grado de inespecificidad se incrementa considerablemente (Magar y cols, 1993).

9.4. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial ha sido fundamental en la detección inicial de esta nueva enfermedad ya que en un principio se pensó que estaba causada por un agente ya existente como se ha expuesto anteriormente en el capítulo referente a la historia de la misma. En primer lugar debe establecerse con otras enfermedades que producen trastornos reproductivos y/o respiratorios agudos. Una guía de este diagnóstico se esquematiza en las tablas 1 y 2:

	PRRS	PNP
Virus causal	virus ARN de cadena positiva	variante de virus Influenza
Síntomas predominantes	reproductivos	respiratorios
Síntomas variables	respiratorios	reproductivos
Efectos respiratorios más severos	cerdos menores de 3 semanas	4-16 semanas
Duración síntomas respiratorios	días	meses
Lesiones macroscópicas en pulmón	mínimas/ninguna	lóbulos rojos e indurados
Lesiones microscópicas en pulmón	neumonía intersticial	proliferación y necrosis

Tabla 1.- Diagnóstico diferencial entre PRRS y neumonía necrotizante y proliferativa (PNP)(Collins, 1992).

Introducción

	PPV	EMC	PRRS
Mortalidad en lactación	No	Si	Si
No parto/cerda	1	Todos	Todos
Signos clínicos en cerdas	No	Ocasional	No obvio
Serología en cerdas	Alta	No obvio	Alta
Duración del problema reproductivo	1 Mes	1-4 Meses	1-4 Meses
Tipo de fallo reproductivo			
Aborto	Raro	No	Ocasional
Mortinatos	Bajo	Bajo	Alto
Momias-tamaño	Medianas	De grandes a pequeñas	Todos los t
Problema en la concepción	Mínimo	No	Obvio
Mortalidad en lechones	No	No	Si
Problemas resp. en lechones	No	No	Si
Enfermedades secundarias	No	No	Si

Tabla 2.- Diagnóstico diferencial entre infección por parvovirus porcino (PPV), infección por el virus de la encefalomiocarditis (EMC) y el PRRS (Pijoan, 1992).

Otro diagnóstico diferencial debe producirse con enfermedades que causen infertilidad crónica; en este sentido, en los casos de PRRS dichos problemas se producen en un periodo de tiempo corto y sólo afectan a parte de las hembras (White, 1995), cursando con anoestro, camadas pequeñas y débiles y aumento en la mortalidad en lactación.

En casos en que se observen aumento en la mortalidad de cerdos en lactación de forma crónica se deben analizar factores como problemas relacionados con el calostro o falta de higiene (White, 1995). En problemas respiratorios crónicos que afecten a cerdos en lactación o en crecimiento se deben descartar enfermedades como la producida por el virus influenza. Por último, el diagnóstico diferencial en los casos en que se observen síntomas como la oreja azul o partos prematuros se encaminará a descartar posibles toxemias, enfermedades terminales, fallos circulatorios, o frente al virus de la diarrea vírica bovina.

10. PROFILAXIS

10.1. PROFILAXIS HIGIO-SANITARIA

En el caso de granjas que permanezcan exentas de PRRSV, se debe evitar la entrada del mismo mediante cuarentena y estudio serológico

de los cerdos de reemplazo, restricción de visitas, cambio de ropa previo a la entrada en las mismas, evitar la entrada de vehículos en la granja etc. Estas medidas que aparentemente fueron muy efectivas para evitar la difusión de la enfermedad en granjas de Bélgica y Gran Bretaña, no lo fueron en otros países como Holanda, presumiblemente por la difusión de la enfermedad vía aérea en regiones ricas en ganado porcino bajo condiciones climatológicas favorables al virus.

Para evitar la difusión en granjas de nueva creación vía aerógena, se recomienda la construcción de las mismas al menos a 3 kilómetros de las ya existentes. Es importante que los reproductores elegidos procedan de zonas libres de la enfermedad, ya que cerdos de 6-7 meses de edad que procedan de una granja enzoóticamente infectada pueden ser virémicos (Dee, 1993-b). Para ello, es conveniente realizar el análisis serológico de la granja de procedencia, aunque esto no implica una total garantía, ya que pueden existir en una granja individuos seronegativos, particularmente cuando la infección ha sido enzótica durante algún tiempo, si los cerdos de la misma no se han alojado conjuntamente (Collins y cols, 1990; Christianson, 1991), si la granja está incubando la enfermedad o si adquirió la enfermedad tras el análisis serológico. Por todo ello, se requiere realizar los análisis antes y después del traslado de los cerdos y analizar todos los animales a movilizar. Es importante tomar sueros de animales en contacto y de modo pareado (con un intervalo de tres semanas) con el fin de saber la actividad del virus en el grupo; seroconversión o aumento de la tasa de anticuerpos entre ambas mediciones.

La utilización conjunta de una doble cuarentena (antes de salir de una granja y al entrar en la nueva) con un adecuado análisis serológico, puede reducir en gran manera el riesgo de introducción de la enfermedad en una granja exenta (Blackburn y cols, 1992). Otra medida de gran valor es el empleo de cerdos centinelas alojados con los animales en cuarentena convenientemente monitorizados clínica y serológicamente.

Otros parámetros a controlar es la posible eliminación del virus en semen cuando los verracos se han infectado recientemente o la

posible difusión del virus en embriones procedentes de hembras infectadas. Como el PRRSV es capaz de atravesar la placenta, con la histerectomía no es posible obtener cerdos exentos de la enfermedad, se requiere mantener los lechones en cuarentena hasta que sean evaluados serológicamente.

Las medidas de higiene también son de gran importancia en el control del PRRS. De hecho, se ha observado que las granjas con un elevado estatus sanitario e higiene son afectadas de modo menos grave por la enfermedad (Blaha, 1992) ya que las infecciones secundarias por patógenos existentes de modo enzoótico en las granjas son los determinantes de la morbilidad y mortalidad.

Por todo lo señalado, se imponen fundamentalmente prácticas de manejo adecuadas como el todo dentro todo fuera con limpieza y desinfección de salas entre grupos, separación por edades de los animales (Keffaber, 1992), exclusión en todo momento de movimientos de aire entre salas, destete temprano de los lechones a los 10-14 días cuando aun poseen anticuerpos maternos con el fin de trasladarlos a una zona limpia para que permanezcan sanos cuando la inmunidad maternal disminuya (Loula, 1995).

La Comunidad Económica Europea en su directiva 91/109 de marzo de 1991, ha establecido medidas de control para el movimiento de cerdos. Así, siempre que se encuentren dos de los tres signos clínicos siguientes: porcentaje de abortos mayores al 8 %; porcentaje de nacidos muertos mayor al 20 % o mortalidad en lactación mayor al 25 % en un periodo de 14 días, el único movimiento posible de los cerdos de esas granjas es el matadero hasta ocho semanas mas tarde de que los signos clínicos cesen. Sin embargo, esta medida no es del todo efectiva, mas teniendo en cuenta que las granjas generalmente permanecen infectadas mas de 8 semanas (Vogel, 1991).

El sacrificio de todos los animales afectados se aplicó sin éxito en un estado alemán y también, como ya se señaló, en las dos únicas granjas que el gobierno español reconoció como infectadas.

10. 2. PROFILAXIS MÉDICA

La única profilaxis médica teóricamente efectiva es el empleo de vacunas. La primera vacuna comercial frente al PRRS fue lanzada en España en 1993. Dicha vacuna se compone de una cepa de campo española e inactivada que se presenta en un adyuvante oleoso para aumentar la inmunogenicidad. Ha habido dificultades en introducir la misma en otros países debido a que contiene virus crecido en MAP lo cual pudiera causar problemas de contaminación con otros agentes infecciosos. Hasta la fecha se han usado más de un millón de dosis de la misma, y aparentemente mejora las tasas de fertilidad, de nacidos muertos, el número de cerdos destetados, y disminuye el número de abortos y aumenta el número de lechones por cerda y año en relación a controles no vacunados. Actualmente la misma empresa española está trabajando en la fabricación de una vacuna por ingeniería genética (Plana y cols, 1995).

En EE.UU se comercializa una vacuna viva modificada, que parece segura y efectiva para la prevención de los signos clínicos, la viremia y la leucopenia asociados a la forma respiratoria de la enfermedad, incrementando la ganancia de peso y disminuyendo los gastos por tratamientos tras la infección natural por el PRRSV. Aunque está elaborada con una cepa americana, parece conferir protección frente al LV europeo (Gorcyca y cols, 1995). En un estudio realizado en Canadá con dicha vacuna se observó además que verracos vacunados y posteriormente afectados con el virus no eliminaban este por semen una semana pi (Nielsen y cols, 1995).

El empleo de vacunas hace necesaria una correcta interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas a fin de no confundir los anticuerpos vacunales con los anticuerpos adquiridos por infección natural.

11. TRATAMIENTO

No existe un tratamiento específico frente al PRRS, dirigiéndose éstos a una terapia de soporte en los casos agudos y a la prevención o tratamiento de complicaciones por infecciones secundarias.

II. OBJETIVOS

El diagnóstico etiológico del PRRSV venía hasta el momento fundamentado en el aislamiento en cultivo celular de MAP de la muestra sospechosa para posteriormente, con la ayuda de un suero positivo, proceder a su identificación bien mediante la técnica de IPMA o por IFI. Indudablemente esto supone la dependencia continua de cultivos primarios de MAP, con las complicaciones que eso conlleva (coste elevado por la necesidad del uso de lechones para la extracción de macrófagos alveolares porcinos, problemas de contaminaciones, diferente sensibilidad al virus dependiendo del lote de macrófagos etc), así como el requerimiento de varios días hasta que el diagnóstico es posible. Con la publicación de la secuencia íntegra del LV, se posibilitó el desarrollo de métodos diagnósticos directamente dirigidos a la detección del genoma vírico en las muestras clínicas. Por todo ello, nuestro primer objetivo fue:

1.- Aplicación de la técnica de transcripción en reverso-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) al diagnóstico del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la misma tanto en cultivos celulares infectados como en muestras biológicas procedentes de animales naturalmente infectados.

En estudios preliminares se había señalado la presencia de tres proteínas de 15, 19 y 25 KD específicas del PRRSV. La primera de ellas corresponde a la nucleocápsida vírica, la segunda a una proteína de membrana no glicosilada y la última correspondería a una proteína de membrana glicosilada. Nuestro segundo objetivo fue identificar cual era la ORF que codificaba la proteína de 25 KD, para posteriormente, mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, expresarla y obtener en pureza dicha proteína. Así, nuestro segundo objetivo fue:

2.- Expresión y caracterización de la proteína codificada por la ORF-5 del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino tanto en un sistema eucariota como procariota.

Como ya ha sido citado, tanto la secuencia de nucleótidos, como la organización interna del genoma indica que el PRRSV es un miembro de la familia recientemente propuesta Arteroviridae en la que se incluye el virus LDV del ratón, el EAV y el de la SHFV. Propiedades características de estos virus y por tanto del PRRS son las infecciones subclínicas, infecciones persistentes que conviven en presencia de anticuerpos específicos, así como diferencias en el comportamiento clínico e inmunológico entre aislados. Esta situación unida a evidencias clínicas de campo, sugiere diferencias de virulencia y variabilidad antigénica entre distintos aislados de campo del virus PRRS Americanos y Europeos. Por todo ello nuestro tercer y último objetivo fue:

3.- Estudio de la variabilidad del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino en aislados de campo europeos.

III. MATERIAL Y METODOS

1. CELULAS EUCARIOTICAS

1.1. LINEAS CELULARES EMPLEADAS

1.1.1. Preparación de macrófagos alveolares porcinos.

Para obtener cultivos primarios de MAP se utilizaron cerdos de 4-8 semanas de edad, procedentes de una granja exenta de la enfermedad y libres de anticuerpos frente al PRRSV.

Los animales fueron sacrificados, previa inyección intramuscular de 0.02-0.1 g de azoperona, mediante incisión con bisturí en la vena yugular y sangría a muerte. Los pulmones fueron extraídos asépticamente, la tráquea ocluida con pinzas para evitar su contaminación, y trasladados a una cabina de flujo laminar donde se llevaron a cabo las siguientes operaciones. Los pulmones se sometieron a lavados de 200 ml de PBS (NaCl 37 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 81 mM; pH 7,2) a doble concentración de solución antibiótica (penicilina:150 UI/ml; estreptomycin: 150 mg /ml; nistatina: 0,375 mg /ml - Gibco-BRL) con la ayuda de una bomba peristáltica hasta completar un volumen final de 1 litro. Las células pulmonares en suspensión fueron centrifugadas a 3000 xg a 4 °C durante 15 minutos, tras lo cual el sedimento celular fue lavado con medio esencial mínimo con sales de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) a pH 7,2 con la solución antibiótica. Tras una nueva centrifugación las células fueron resuspendidas en 40 ml de medio y 100 µl de la solución celular fueron diluidos 1/10 y 1/100 con el fin de realizar un recuento celular en una cámara de Thoma.

La concentración de trabajo fue de $2,6 \times 10^6$ células/ml, siendo los MAP cultivados en DMEM más antibiótico suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB).

1.1.2. Células COS-1

Proviene de células renales de mono verde africano transformadas con el virus SV-40.

Se cultivaron en DMEM, suplementado con gentamicina (50 mg /ml), aminoácidos no esenciales, nistatina (0,375 mg /ml) y 5 % de SFB. Estas células se utilizaron para el cultivo de los virus vacuna (vTF7-3/VV-PR5) en experimentos de expresión.

1.1.3. Células HeLaS3

Proviene de un clón de la línea celular HeLa, obtenidas a partir de células de un carcinoma de cervix humano. Son células que crecen en suspensión. Se utilizaron para cultivar también los virus vacuna. El cultivo se realizó en DMEM suplementado con gentamicina (50 mg /ml), aminoácidos no esenciales, nistatina (0,375 mg /ml) y SFB al 5 %.

1.1.4. Células BSC-40

Proviene de la línea celular BS-C-1, que son células de riñón de mono verde africano. Estas células se emplearon en la producción y titulación de los virus vacuna, además de para su cultivo. Se cultivaron en DMEM suplementado con gentamicina (50 mg /ml), aminoácidos no esenciales, nistatina (0,375 mg /ml) y SFB al 5 %.

1.1.5. Células HuTK-143

Son células de osteosarcoma humano timidin kinasa negativas que fueron cedidas por el Dr. Mariano Esteban (Centro Nacional de Biotecnología). Se utilizaron para realizar la selección del virus vacuna recombinante. Las células fueron cultivadas en DMEM más 10 % de SFB y Bromo deoxiuridina a concentración de 25 mg /ml.

1.1.6. Células MA-104

Células de riñón de mono. Se utilizó un clón susceptible a la cepa 5710 del PRRSV que fue cedido junto con el virus adaptado por el Dr. Enrique España de laboratorios HIPRA. Se empleó en la realización de Inmunofluorescencias, seroneutralizaciones e IPMA. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con gentamicina (50 mg /ml), aminoácidos no esenciales, nistatina (0,375 mg /ml) y SFB al 10 %.

1.1.7. Células N2A

Células de neuroblastoma murino. Empleadas para estudios de muerte celular por apoptosis. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con gentamicina, aminoácidos no esenciales, antimicótico, SFB al 10 % y glutamina a concentración 2 mM. También, con la misma finalidad, se emplearon células N2A que establemente tenían clonado el proto-oncogén bcl-2 humano, que fueron cedidas amablemente por el Dr. Jaime Bernal (CIB, Madrid).

1.2. MANTENIMIENTO Y CONSERVACION DE LINEAS CELULARES

Las líneas celulares se mantuvieron mediante pases seriados en frascos y placas de cultivo celular (Nunc) tripsinizando el tapiz celular confluyente con tripsina-versene al 0.25 % (Gibco-BRL). Desprendido el tapiz, se agregaron 0,5 ml de SFB (aproximadamente el 10 % del volumen final) para neutralizar la tripsina. Posteriormente se centrifugó a 1.000 xg durante 10 minutos a 4 °C y el sedimento fue resuspendido en la cantidad de medio de crecimiento adecuado a la superficie del recipiente utilizado, teniendo en cuenta que el ajuste celular fue de 100.000 células por ml.

La congelación de las células se llevó a cabo en criotubos de 1 ml a una concentración de aproximadamente 5×10^6 células/ml en SFB suplementado al 10 % con DMSO. Posteriormente se congelaron a - 70 °C toda la noche, siendo finalmente almacenadas en nitrógeno líquido.

2. VIRUS

2.1. CEPAS DE VIRUS

2.1.1. Cepas del virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino

Las cepas españolas, fueron amablemente cedidas por el Dr. Enrique Espuña, de laboratorios HIPRA (Girona). Las cepas francesas, belgas, italianas y holandesas fueron cedidas por los Doctores Albina (Ploufragan-Francia), Pensaert (Universidad de Gante-Bélgica), Simone (Laboratorio de Brescia-Italia), y Wensvoort, (CDI-Lelystad-Holanda). Los datos de identificación son los siguientes:

<u>Nº de referencia</u>	<u>Fecha de aislamiento</u>	<u>Provincia/Pais</u>
5710	4/12/91	Lérida (España)
5711	4/12/91	Lérida "
2228	1/04/92	Barcelona "
2910	13/05/92	Tarragona "
3211	27/05/92	Barcelona "
4606	15/09/92	Lérida "
5999	5/11/92	Navarra "
705	4/02/93	Barcelona "
1468	4/03/93	Gerona "
VP035	7/03/95	Lérida (España)
NL 2.2	1991	Holanda
NL 3.1	1992	Holanda
NL 4.2	1993	Holanda
2156	Desconocida	Italia
4A	Desconocida	Francia
5A	Desconocida	Francia
6A	Desconocida	Francia
8D	Desconocida	Francia
AV30	Desconocida	Bélgica
92V058	Desconocida	Bélgica

2.1.2. Virus porcinos utilizados en los ensayos de especificidad

2.1.2.1. *Virus de la peste porcina clásica*; Cedido por el Laboratorio Central del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (Algete-Madrid). Cepa Alfort/187 crecida en la línea celular PK-15 con un título original de $10^{6.5}$ DI₅₀CT/ml.

2.1.2.2. *Virus influenza H1N1*; Cedido por el Dr. Pensaert, del Departamento de Virología de la Facultad de Veterinaria de Ghent, Bélgica. Cepa A/Bélgica/1/83 crecida en embrión de pollo con un título original de 6.4×10^7 DI₅₀CT/ml.

2.1.2.3. *Virus influenza H3N2*; Cedido por el Dr. Pensaert, del Departamento de Virología de la Facultad de Veterinaria de Ghent, Bélgica. Cepa A/Ghent/1/84 crecida en embrión de pollo con un título original de $1,2 \times 10^8$ DI₅₀CT/ml.

2.1.2.4. *Virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGE)*; Cedido por el Dr. L. Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología). Cepa Purdue crecida en la línea celular ST con un título original de $2 \times 10^{5.39}$ DI₅₀CT/ml.

2.1.2.5. *Virus del parvovirus porcino (PPV)*; Cedido por el Dr. Mengeling del Centro Nacional de Enfermedades Animales (Iowa-EE.UU). Cepa NADL-8 crecida en la línea celular pK-15 con un título original de $2,5 \times 10^5$ CC₅₀TI/ml.

2.1.2.6. *Virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV)*; Cedido por Laboratorios Intervet (Salamanca). Cepa NIA-3 crecida en la línea celular Vero con un título original de 4×10^6 DI₅₀CT/ml.

2.1.2.7. *Virus de la diarrea vírica bovina (BVD)*; Cedido por el Dr. McClurkin del Centro Nacional de Enfermedades Animales (Iowa-EE.UU). Cepa Singer crecida en la línea celular BT con un título original de 10^7 DI₅₀CT/ml.

Tras 2 o 3 días pi el medio se decantó, y las células se resuspendieron finalmente en 1 ml de PBS. La suspensión de las células fue tratada mediante ultrasonidos para liberar el virus intracelular durante 10 segundos en baño de sonicación, repitiéndose la operación 3 veces. Posteriormente fueron centrifugadas a 3000 xg durante 5 minutos, y el sobrenadante se guardó a - 80 °C hasta su titulación posterior.

2.2.3. Titulación del virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino

La titulación vírica se realizó sobre monocapas celulares de MAP siguiendo el método descrito por Reed y Muench (1938). La lectura final se realizó en el 4-5 día pi y los títulos se expresaron en DI₅₀CT/ml.

2.2.4. Titulación del virus vacuna

La titulación se realizó por formación de placas de lisis. Placas de cultivo celular M-6 confluentes de BSC-40, fueron inoculadas con 200 µl de diluciones decimales del sobrenadante almacenado a - 80 °C. Tras una hora de adsorción con agitaciones cada 15 minutos, los inóculos fueron retirados añadiéndose 3 ml/pocillo de medio de cultivo DMEM al que se le había añadido 0.8 % de bacto-agar y suplementado con 2,5 % de SFB. Transcurridos 3-4 días de incubación, las monocapas se fijaron con formadehido al 10 % durante 10 minutos, levantándose el agar, y tiñendo finalmente las mismas con cristal violeta al 2% en formaldehido al 10 % otros 10 minutos. Los títulos se expresaron en UFP por ml de inóculo.

2.3. PURIFICACION DEL VIRUS DEL SINDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO

El sobrenadante de un cultivo celular previamente centrifugado para eliminar los restos celulares Y con un título de $7,6 \times 10^7$ DI₅₀CT/ml, se centrifugó a 111.000 xg a 4 °C durante 2 horas. El sedimento obtenido se

mantuvo a 4 °C en 1 ml de solución salina (8,5g de ClNa en 1 l de agua) con un 1% de seroalbúmina bovina.

Con posterioridad, la muestra fue aplicada a capas de cloruro de cesio de densidades 1,25 g/ml y 1,15 g/ml, y centrifugada durante 2 horas a 111.000 xg. La banda que apareció entre las dos densidades de cloruro de cesio fue extraída, resuspendida en PBS y concentrada mediante una nueva centrifugación de dos horas a 111.000 xg a 4 °C .

3. CEPAS BACTERIANAS EMPLEADAS

3.1. CEPAS DE *Escherichia Coli*

Usamos la siguientes estirpes:

3.1.1. JM-109: Se utilizaron en las transformaciones con el plásmido pGEM-T .

3.1.2. DH-5: Se utilizaron en las transformaciones con el plásmido pRSET.

3.1.3. BL21(DE3)pLysS: Cepa bacteriana usada para expresión de la proteína cuya secuencia está bajo el promotor del bacteriófago T7 (Studier,1990). Requiere una concentración de 35 mg/ml de cloranfenicol en el medio de cultivo para que se conserve el plásmido pLys S.

3.2. MULTIPLICACION Y CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS

Las cepas fueron cultivadas en medio LB (bactotripton, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g y agar bacteriológico 15 g, llevándose a 1000 ml con agua y esterilizado en autoclave), y posteriormente mezcladas con glicerina y congeladas a -80 °C.

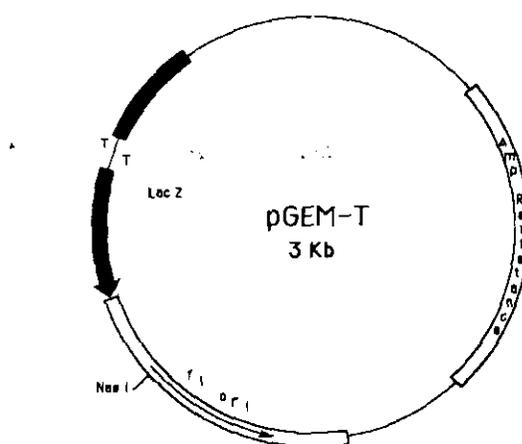
Los cultivos de bacterias transformadas con plásmidos se realizaron a partir de colonias bacterianas aisladas en placas de LB con Ampicilina (composición igual al LB, con 15 g de bacto-agar), creciéndose en medio líquido selectivo (con ampicilina 100 mg /ml) a 37 °C y 30 °C (cultivos de BL21(DE3) pLysS transformados con el pR-PR5).

4. VECTORES DE CLONAJE

4.1.- pGEM-T:

Se trata de un vector comercial (Promega) que se presenta de forma lineal teniendo la particularidad de poseer timinas en sus extremos 3', que posibilitan el clonaje directo de aquellos productos de PCR en que la Taq polimerasa añadió adeninas en sus extremos 3'.

Su estructura se muestra en la figura 2.



Material y métodos

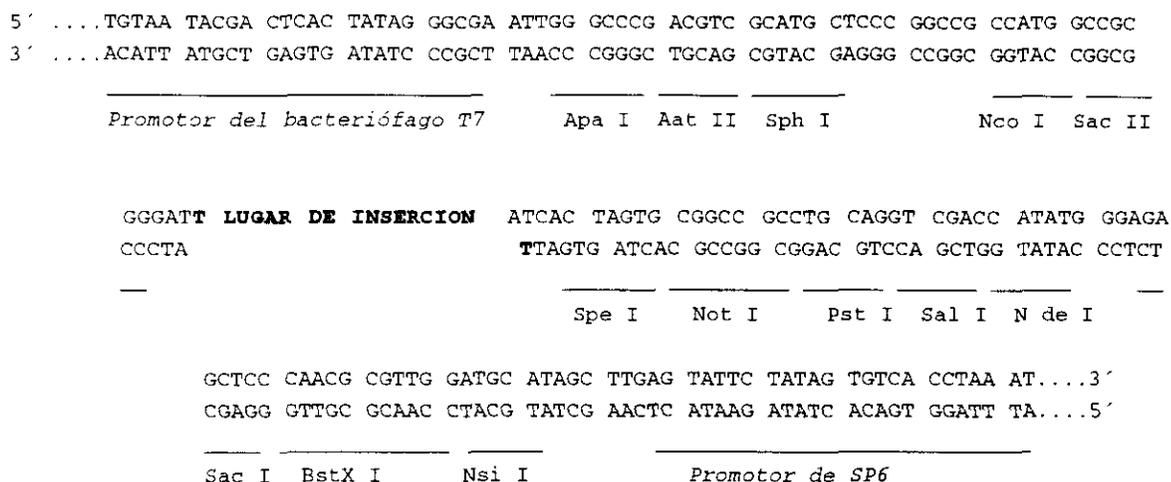


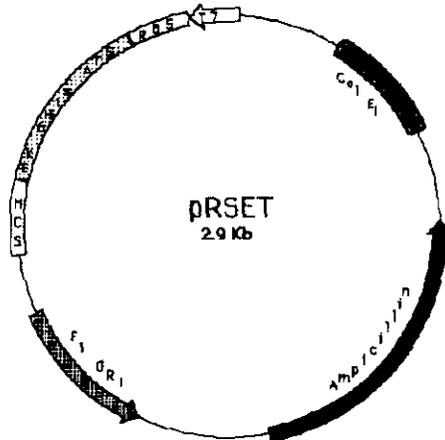
Figura 2.- Estructura del pGEM-T.

Posee, por lo tanto los promotores de T7 y de SP6 con los inicios de transcripción. Además se posibilita la secuenciación al poseer los sitios de unión de los cebadores ("primers") de ida y de vuelta de pUC/M13.

4.2.- pRSET:

Es otro vector comercial (Invitrogen), que como característica sobresaliente posee una cola de histidinas que posibilita la purificación de la poliproteína formada mediante el uso de una columna de níquel aceto nitrilo, aprovechando la afinidad de las histidinas por la misma. Además también posee el promotor del bacteriófago T7, siendo un vector tanto de transcripción como de translación.

Dicho vector está disponible en tres modalidades, A, B y C de modo que se posibilita el clonaje en fase del fragmento en cuestión. En nuestro caso el utilizado fue el pRSET-A. Su estructura se muestra en la figura 3.



ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA GAG CAA ATG
TAC GCC CCA AGA GTA GTA GTA GTA GTA GTA CCA TAC CGA TCG TAC TGA CCA CCT CTC GTT TAC

Cola de Histidinas

Bam HI Xho I Pst I

GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG GGA TCC GAG CTC GAG ATC TGC AGC
CCA GCC CTA GAC ATG CTG CTA CTG CTA TTC CTA GCT ACC CCT AGG CTC GAG CTC TAG ACG TCG

Bgl II Pvu II

Kpn I Bst BI

TGG TAC CAT GGA ATT CGA AGC TTG ATC CGG CTG CTA ACA AAG CCC GAA AGG AAG CTG AGT TGG
ACC ATG GTA CCT TAA GCT TCG AAC TAG GCC GAC GAT TGT TTC GGG CTT TCC TTC GAC TCA ACC

Neo I Hind III

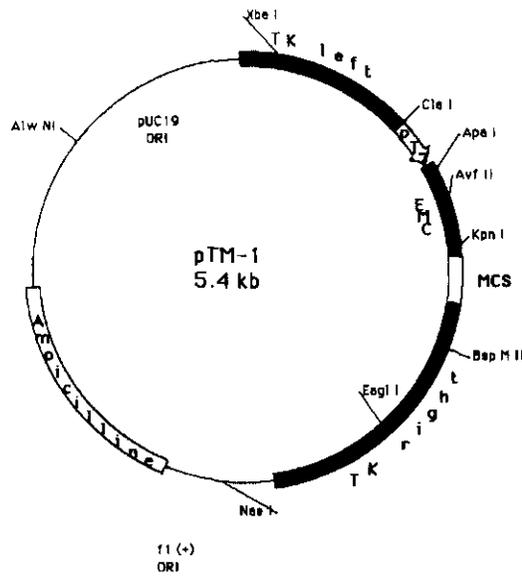
Eco RI

CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG....
GAC GAC GGT GGC GAC TCG TTA TTG ATC....

Figura 3.- Estructura del pRSET-A

4.3.- pTM-1.

Plásmido cedido por el Dr. Thomas Zürcker (Centro Nacional de Biotecnología. Universidad Autónoma de Madrid). Dicho vector además de permitir el clonaje bajo promotor del bacteriófago T7, y poseer la región no traducible del virus de la encefalomiocarditis, que posibilita la unión a ribosomas independiente de "cap" (Elroy-Stain,1989), incluye las zonas de recombinación homóloga con el virus vacuna. Su estructura se muestra en la figura 4.



...CC ATG GGA ATT CCC CGG GGA GCT CAC TAG TGG ATC CCT GCA GCT CGA GAG
 ...GG TAC CCT TAA GGG GCC CCT CGA GTG ATC ACC TAG GGA CGT CGA GCT CTC

Nco I Eco RI Sma I Sac I Spe I Bam HI Pst I Xho I
 Xma I

GCC TAA TTA ATT AAG TCG AC...
 CGG ATT AAT TAA TTC AGC TG...

Stu I Sal I
 Hinc II
 Acc I

Figura 4.- Estructura del pTM-1

5. TRANSCRIPCIÓN EN REVERSO: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR); Y CLONAJE DE LOS FRAGMENTOS DE PCR

5.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

5.1.1. Cultivos celulares

Los sobrenadantes de los cultivos de MAP inoculados con el PRRSV fueron centrifugados a 111.000 xg a 4 °C durante dos horas y el sedimento fue utilizado en la extracción de ARN total.

5.1.2. Muestras biológicas

Se utilizaron las muestras biológicas procedentes de cuatro cerdos con edad aproximada de 4-5 semanas. Estos cerdos fueron inoculados via intranasal con 1 ml por cada conducto nasal de una dosis de PRRSV de 5×10^6 DI₅₀CT/ml y sacrificados los días, 3, 5, 8 y 10 pi. Se procesaron por RT-PCR los siguientes órganos o tejidos; hígado, bazo, pulmón, riñón, amígdala, ganglios linfáticos inguinales, ganglios linfáticos submaxilares, macrófagos alveolares, suero, plasma, y fracción leucocitaria,

En el caso de las muestras líquidas, éstas fueron previamente centrifugadas a 3000 xg a 4 °C durante 15 minutos, esterilizadas por filtración con un filtro de 0.45 nm de poro, y finalmente centrifugadas a 111.000 xg durante 2 horas para sedimentar las partículas víricas.

En los lavados pulmonares se realizaron las mismas operaciones que con las muestras líquidas aunque previamente se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación para destruir los macrófagos alveolares.

Con respecto a las muestras de órganos, se maceraron 1/10 (peso/volumen) en DMEM con la ayuda de un "tenbroek". Se centrifugaron 3000 xg durante 15 minutos a 4 °C, y el sobrenadante fue esterilizado por

filtración con un filtro de 0.45 nm de poro, y ultracentrifugado como las muestras anteriores.

En todos los casos, el virus sedimentado fue utilizado para la extracción de ARN y posterior procesamiento.

5.2. EXTRACCION DE ARN

Se utilizó el método descrito por Chomcinsky y Sacchi (1987). Tras someter la muestra a centrifugación (111.000 xg durante 2 horas), se añadió al sobrenadante, 0,5 ml de la solución desnaturizadora (A 5 ml de la solución madre se le añaden 36 ml de β -mercaptoetanol // Solución madre: 27 g de Isotiocianato de Guanidina (Fluka): 1,76 ml de Citrato sódico 0,75 M pH 7 (Merk): 2,46 ml de sarcosil 10 % (Merk): 29.3 ml de agua). Posteriormente, la suspensión de virus desnaturizado se trasladó a un tubo eppendorff y se le añadió la siguiente mezcla: 50 μ l de acetato Na 2M pH 4; 0,5 ml de fenol saturado en agua y 100 μ l de la mezcla cloroformo/isoamílico (49/1). Tras mezclar por agitación y enfriar en hielo 15 minutos, las muestras se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 minutos a 4 °C, trasladándose la fase acuosa a otro tubo eppendorff al que se añadieron 0,5 ml de isopropanol, dejándose las muestras reposar durante al menos 1 hora a - 20 °C . Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 minutos y el sedimento fue resuspendido en 150 μ l de isopropanol, volviéndose a congelar al menos otra hora a - 20 °C. Una nueva centrifugación se llevó a cabo a 12.000 xg durante 10 minutos a 4 °C, y el sedimento se lavó con 200 μ l de etanol al 70 %, se desecó al vacío y fue finalmente resuspendido en 10 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (1ml en 1 l de agua bidestilada y autoclavada) e incubado a 65 °C durante 10 minutos.

5.3. TRANSCRIPCION EN REVERSO

Para la síntesis del ADN complementario al ARN, a los 10 μ l de ARN resuspendido en agua se le añadieron 10 μ l de tampón 5x de la

transcriptasa en reverso (250 mM Tris-HCl pH 8.3; 250mM KCl; 50 mM MgCl₂; 2.5 mM de espermidina; 50 mM DTT; 5 mM de cada dNTP), 3,5 µl del cebador reverso (ORF-7R o ORF-5R) a concentración de 1,42 mg /ml y 25 µl de agua bidestilada estéril.

Tras 5 minutos de incubación a 65 °C se dejó enfriar a temperatura ambiente 10 minutos con el fin de que el cebador se uniera adecuadamente con el ARN, añadiéndose a la mezcla de reacción 0,5 µl de RNAsina (40 U/ml) y 1 µl de transcriptasa en reverso de la ameloblastosis aviar (5-10 U/ml) incubándose 1 hora a 42 °C.

La determinación de la concentración de los cebadores se hizo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm en la gama ultravioleta.

5.4. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

5.4.1. Oligonucleótidos

Tomando como referencia la publicación por Meulenberg y cols (1993) de la secuencia íntegra del llamado LV, sintetizamos dos pares de cebadores: unos en el interior de la ORF-7 vírica que codifica la nucleocápsida, y otros que delimitan íntegramente la ORF-5 del virus. El diseño de los cebadores se realizó con la ayuda de un programa informático (Mac-Primer) tratando de evitar sucesos no deseados como apareamientos inter o intra cebador, la existencia de anillamientos no específicos etc. Finalmente los cebadores que satisfacían nuestros requerimientos delimitaban un fragmento de exactamente 312 pares de bases en el interior de la ORF-7 y de 609 pares de bases en el caso de la ORF-5.

Los oligonucleótidos empleados para PCR fueron sintetizados en la Unidad de Secuenciación del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia (UCM) y se muestran en la tabla número 3.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Posición	Utilización
ORF-7F	GGGAATGGCCAGCCAGTCAATCAACTGT	14638-14666	PCR (ORF-7)
ORF-7R	TGTAGAAGTCACGCGAAATCAGGCGCACT	14950-14912	PCR (ORF-7)
ORF-5F	ATGAGATGTTCTCACAAATTGGGGCGTTT	13484-13511	PCR (ORF-5)
ORF-5R	CTAGGCCTCCCATTGCTCAGCCGAAGT	14089-14063	PCR (ORF-5)

Tabla 3 : Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR. Se incluye la posición de los mismos en la secuencia del virus Lelystad (Meulenberg y cols 1993).

5.4.2. Reacción de PCR

A 3 µl del producto resultante de la reacción anterior (apartado 5.3) se le añaden:

- 5 µl de tampón 10x de la Taq polimerasa (100 mM Tris-HCl (Ph 8.8); 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 1 % Triton X-100)
- 1.5 µl de la mezcla de los 4 dNTPs (10 mM)
- 1 µl de cebador reverso (150 ng /µl)
- 1 µl de cebador directo (150 ng /µl)
- 0,25 µl de Taq polimerasa (Dynazyme-Fynzyme, Riihitontuntie, Espoo, Finland) (2 U/µl)
- 38 µl de agua tratada con DEPC.

Con el fin de evitar la evaporación durante los ciclos de amplificación de la muestra problema, a cada tubo de reacción le fue añadida una gota de aceite mineral (Sigma).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador utilizándose las condiciones que se señalan en la figura 5.

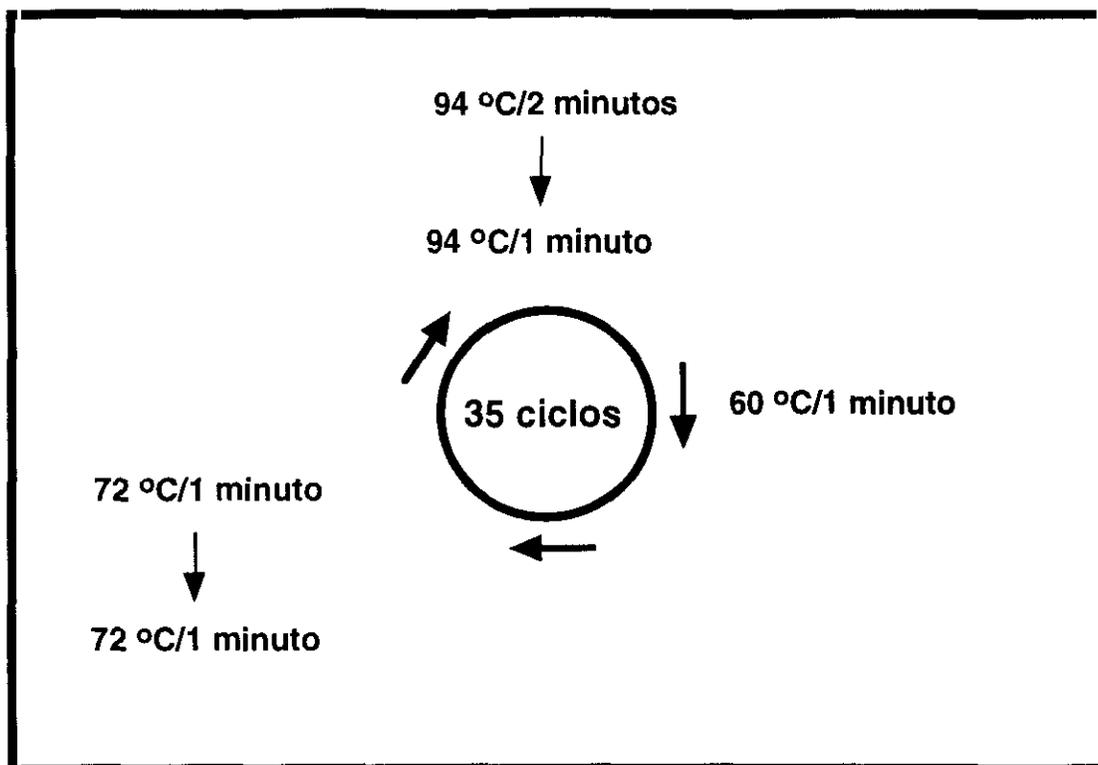


Figura 5: Ciclos de temperatura utilizados en las reacciones de PCR.

Los productos de PCR (1/10 del total) fueron visualizados en un transiluminador de ultravioleta, tras su inclusión en tampón de carga (Tampón de carga 6x: 30% glicerol en agua, azul de bromofenol 0,25 % y xilencianol 0,25 %) en geles de agarosa al 1.5 % en TBE (5x TBE: 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml 0.5M EDTA, pH 8, llevar hasta 1000 ml con agua). Como marcador de peso molecular se pusieron 2 μ l de ϕ 174 digerido con la enzima de restricción Hae III (Promega).

5.5. LIGACION DE FRAGMENTOS DE PCR AL VECTOR pGEM-T

Los productos de PCR fueron previamente pasados por una columna de Sephadex G-50 para eliminar posibles impurezas.

La cantidad de producto de PCR requerida por cada reacción viene especificada por la casa comercial suministradora del plásmido (Promega) y se haya de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ngr de vector} \times \text{Kb del inserto}}{\text{Kb del vector}} \times \frac{3}{1}$$

↓

relación deseada vector/inserto

De donde; 1 μ l de pGEM-T tiene 50 ng
Kb inserto = 0,3 en el caso de la ORF-7 y 0,5 en la ORF 5.
Kb del vector = 3

Tras medir en espectrofotómetro la absorbancia del producto a 260 nm, se ajustó la cantidad del mismo a 25 ng /reacción de ligación.

Finalmente, al producto de PCR requerido se le incorpora:

- 1 μ l de vector pGEM-T (proviene del pGEM-5Zf(+)) digerido con EcoRV, y con adición de timidinas en los extremos 3').
- 1 μ l de 10x tampón de T4 DNA ligasa (300 mM Tris-HCl pH 7.8; 100 mM Mg Cl₂; 100 mM DTT; 5 mM ATP).
- 1 μ l de T4 DNA ligasa (Promega); 3 U / ml .
- hasta 10 μ l de agua

La ligación, finalmente, se realizó mediante incubación a 15 °C durante 3 horas.

6. TRANSFORMACION DE BACTERIAS

La realización de células competentes y su transformación se hizo según la técnica de Hanahan (1983).

Para realizar la transformación, las suspensiones bacterianas fueron descongeladas lentamente en hielo, y a 100 μ l de las mismas se unieron a 10 μ l de DNA plasmídico, manteniéndose 20 minutos en hielo. Transcurrido

este tiempo se expusieron a un choque térmico de 42 °C durante 45 minutos, depositándose de nuevo en hielo. Finalmente a cada muestra se le incorporaron 400 µl de medio LB y tras 30-45 minutos de incubación a 37 °C, las bacterias transformadas se cultivaron sobre placas de LB con ampicilina.

Para seleccionar las colonias bacterias transformadas con plásmidos que incorporaron los insertos, se utilizaron los siguientes métodos de selección:

6.1. SELECCION POR IPTG/X-GAL: Previamente a la siembra de la mezcla transformante en placas de LB-ampicilina se incorporó a la misma 40 µl de X-gal (20 mg /ml en dimetil formamida) y 25 µl de IPTG (2 g en 10 ml de agua).

Las colonias de coloración blanca fueron consideradas positivas en principio, y por ello un número mínimo de 5 colonias fueron cultivadas en 5 ml de medio LB-Ampicilina a 37 °C. A la mañana siguiente se realizaron minipreparaciones de plásmido siguiendo el método de Birnboim y cols (1979) de la lisis alcalina.

6.2. SELECCION DE COLONIAS POR SONDAS E HIBRIDACION: Para ello, las placas con las colonias resultantes se pusieron en contacto con membranas de transferencia de ácidos nucleicos (Biodyne A, Pal). Posteriormente se trataron con una solución desnaturalizadora (0,5 M Hidróxido sódico; 1,5 M Cloruro sódico) durante 5 minutos y a continuación con una solución neutralizante (0,5 M tris-ClH pH 7,4; 1,5 M Cloruro sódico) el mismo tiempo. Para finalizar, se secaron durante 15 minutos a 37 °C. La fijación de los ácidos nucleicos a la membrana se obtuvo sometiendo a las mismas durante 2,5 minutos a luz ultravioleta en un transiluminador.

La prehibridación se efectuó en una solución compuesta por solución de Denhard 5x (Denhard 100x: 2 % ficoll; 2 % polivinilpirrolidona; 2%

Material y métodos

seroalbúmina bovina); SSC 5x (SSC 20x: 3 M Cloruro sódico; 0,3 M citrato sódico); 0,1 % SDS, manteniéndose esta de 1 a 2 horas a 68 °C.

La hibridación se realizó mediante el marcaje del inserto con el protocolo "Prime-It" de cebadores al azar (Stratagene) o el de un oligonucleótido incluido en el inserto.

En el caso de marcaje de inserto, partiendo del fragmento del inserto purificado por gene-clean en un gel de TAE al 1,5 % se realizó la siguiente reacción;

- 1 µl de ADN del inserto (aproximadamente 2 ng)
- 10 µl de cebadores al azar
- 23 µl de agua

Tras realizar una incubación de 5 minutos a 95 °C, se centrifugó la reacción añadiéndose 10 µl de tampón del cebador dATP (contiene todos los deoxinucleótidos excepto el deoxiadeniltrifosfato), 2 µl de $a^{32}P$ dATP (10mCi/ml), 4 µl de agua, 0.4 µl de T7 DNA pol (5U/µl). Tras ello se mantuvo a 37 °C durante 2-10 minutos, y se le añadió 2 µl de la mezcla de parada.

Para eliminar el resto de nucleótidos no unidos se pasó la mezcla de reacción por una columna de Sephadex G50-80 equilibrada en TE. El volumen final se ajustó a 100 µl y se midió en un contador de centelleo la incorporación de radiactividad en 1 µl de la reacción. La hibridación se realizó con 2×10^6 cpm y en el mismo medio que la prehibridación precalentado a 68 °C con 80 ml de ADN de salmón (10 mg /ml). La mezcla de hibridación fue previamente desnaturalizada mediante calentamiento a 100 °C/5 minutos. Tras incubarse toda la noche, las membranas fueron finalmente lavadas en una solución compuesta por 2x SSC y 0,1 % de SDS.

Una vez obtenido el nivel de lavado adecuado medido por seguimiento con contador Geiger, los filtros fueron enfrentados a películas

radiográficas y revelados tras 24 horas a - 80 °C. Las colonias positivas fueron recuperadas y amplificadas para la realización de minipreparaciones.

Cuando para la hibridación se utilizó un oligonucleótido, el marcaje radiactivo del mismo (aproximadamente 50 ng) se realizó mediante tratamiento con 2 µl de γ -ATP (10 mCi/ml) con la enzima polinucleótido kinasa. La prehibridación se llevó a cabo en Denhard 5x; SSC 6x; 0,2 % SDS a 65 °C, incorporando en la hibridación 500 µg de ARN de levadura. Tras incubación nocturna, los lavados se realizaron en 5x SSC; 0,1 % SDS.

7. ANALISIS DEL ADN

7.1. OBTENCION DE ADN PLASMIDICO

La obtención de minipreparaciones plasmídicas, se realizó según el método de la lisis alcalina (Birnboim, 1979), usándose el ADN así obtenido para la comprobación de la presencia del inserto o para secuenciación manual.

Para obtener preparaciones plasmídicas en mayores cantidades (midi o maxipreparaciones) se utilizaron columnas comerciales (Quiagen). El ADN así obtenido se secuenció en la Unidad de Secuenciación Automática de la Facultad de Farmacia, o se empleó para realizar la transfección en células Cos-1 infectadas con virus vacuna.

7.2. MODIFICACIONES EFECTUADAS EN PLASMIDOS: RESTRICCIONES Y LIGACIONES

Las técnicas de ADN recombinante fueron realizadas siguiendo, en grandes líneas, los métodos descritos por Sambrook y cols (1989). Las reacciones catalizadas por endonucleasas de restricción se llevaron a cabo en las condiciones recomendadas por las empresas suministradoras (Boehringer-Manhein, Bio-labs, y Promega).

En reacciones de defosforilación de plásmidos linearizados, la fosfatasa alcalina empleada fue suministrada por Boehringer-Manhein, siguiendo el tratamiento para la eliminación del enzima descrito (Sambrook y cols, 1989). Para rellenar los extremos 5' protuberantes se empleó el fragmento Klenow de la polimerasa (Boehringer-Manhein); para eliminar los extremos 3' protuberantes, o bien se trató con el enzima Mung-bean (Boehringer-Manhein), o con ADN polimerasa del bacteriófago T4 (Boehringer-Manhein) en presencia de dNTPs.

Las ligaciones plasmídicas se llevaron a cabo con la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Boehringer-Manhein).

7.3. ANALISIS Y PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN

El ADN plasmídico y los fragmentos resultantes de digestiones por enzimas de restricción fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7 % y al 1,5 % respectivamente en TBE con bromuro de etidio a concentración de 1 mg /ml. Como marcadores de peso molecular se utilizaron ADN del fago λ digerido con BstE II (fragmentos desde 117 a 8454 pares de bases) o ADN del fago ϕ X174 digerido con Hae III (fragmentos desde 72 a 1353 pares de bases). Los geles se visualizaron con la ayuda de un transiluminador.

Para la purificación de los insertos, los productos de las restricciones se separaron en geles de agarosa al 1.5 % en TAE (Tris-acetato 40mM pH 8; EDTA 2mM), las bandas cortadas, y el ADN extraído por el método comercial del Gene-clean siguiendo las indicaciones de la casa comercial (BIO 101 Inc, La Jolla, California).

7.4. SECUENCIACION DE ADN

7.4.1. Oligonucleótidos empleados

Se especifican en la tabla cuarta.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Utilización
pGEM-TF	GGCCGCCATGGCCGCGGG	Secuenciación automática
pGEM-TR	CAGGCGGCCGCACTAGTG	Secuenciación automática
M13-F	GTAAACGACGGCCAGT	Secuenciación manual

Tabla 4: Oligonucleótidos empleados en reacciones de secuenciación.

7.4.2. Reacción de secuenciación

La secuenciación manual del ADN se realizó por el método de los dideoxinucleótidos trifosfatos (Sanger y cols, 1977) utilizando [³⁵S] dATP como nucleótido trifosfato radioactivo, y la enzima Sequenasa. Escuetamente, los plásmidos a secuenciar fueron sometidos a desnaturalización, anillamiento con el oligonucleótido empleado, marcaje radiactivo, terminación y frenado con la solución de parada (98 % de formamida; 10 mM EDTA; 0.2 % de azul de bromofenol; 0.2 % de xilencianol).

Posteriormente las muestras fueron depositadas, previa ebullición, en un gel de secuenciación (10 ml de 10x TBE; 42 g de urea; 5,7 g de acrilamida; 0,3 g de bisacrilamida; 600 µl de APS 10 % y 30 µl de TEMED y hasta 100 ml de agua bidestilada). El gel se fijó, finalmente, con metanol 10 %-ácido acético 10 % durante 30 minutos y se secó una hora en un secador de geles. Posteriormente fueron impresionados con una película hasta su lectura.

8. MÉTODOS DE ANALISIS DE PROTEINAS

8.1. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION PROTEICA

La concentración proteica de la purificación parcial del virus resuspendido finalmente en 200 µl de PBS, se determinó usando el

reactivo BCA según protocolo propuesto por la casa suministradora (Pierce). A continuación se realizó una curva tomando como patrón concentraciones variables de seroalbúmina bovina a concentración conocida. La concentración proteica final resultó ser de 15,5 mg /ml.

8.2. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS (SDS/PAGE)

La separación de proteínas en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo con el procedimiento de Laemmli (1970). Se emplearon geles de separación del 12 % de poliacrilamida, así como gradientes del 10 al 12 %. Las muestras se solubilizaron en tampón de ruptura (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; SDS 2 %; DTT 0,1 M y glicerol 10 %) hirviéndose 5 minutos antes de aplicarse en el gel. Las muestras se resolvieron en Tris 0,025 M; Glicina 0,192 M; SDS 0,1 %; pH 8,6, usándose como control de peso molecular, marcadores de un rango entre 2,3-43 KD (Gibco).

La detección de las proteínas marcadas con ^{35}S se llevó a cabo mediante fluorografía (Bonner y Laskey, 1974). Los geles se secaron a 80 °C y se expusieron a -70 °C. En el caso de proteínas no marcadas, estas se visualizaron tiñendo los geles con azul brillante de Coomassie R-250 (Harlow y Lane, 1988), tras lo cual se destiñeron con ácido acético al 10 %.

8.3. DETECCION DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5 DEL PRRSV SOBRE GELES DE TRANSFERENCIA A FILTROS DE NITROCELULOSA O NYLON

8.3.1. Sueros utilizados

Los sueros porcinos utilizados en este estudio fueron obtenidos por nosotros como resultado de infecciones experimentales, con excepción del suero control positivo que nos fue cedido por el Dr. Enrique Espuña (Laboratorios Hipra) siendo producido frente a la cepa 5710, y con un título por IPMA de 1/100. Como control negativo se tomó suero de un lechón

exento de la enfermedad.

Debido a las inespecificidades obtenidos con nuestro suero en algunas reacciones inmunológicas, se realizó la preadsorción del mismo usando polvo de acetona según procedimiento descrito (Sambrook y cols, 1989), usando como sustrato tanto macrófagos alveolares porcinos, como células Cos-1 infectadas con virus vTF7-3.

En estudios de muerte celular inducida por apoptosis se utilizaron dos anticuerpos monoclonales comerciales, uno para comprobar la expresión del proto-oncogén bcl-2 humano en la línea celular N2A que expresa establemente dicho gen (Santa Cruz S.A), y otro que reconoce un péptido que se sitúa próximo a la cola de histidinas (In Vitro S.A).

8.3.2. Western-Blot

La transferencia de geles a membranas de inmobilón (Milipore) se realizó a 150 mA en tampón de transferencia de proteínas (0,01 M NaHCO₃; 0,003 M Na₂CO₃; Metanol 20 %), durante 4 horas.

Transferidos los geles, las membranas se saturaron con BSA al 3 % durante una hora a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron el suero positivo y el suero negativo por separado ya que siempre las muestras se procesaron por duplicado (para saber la dilución adecuada de nuestros sueros previamente se realizaron diluciones de los mismos para seleccionar la del título adecuado, que en este caso fue la 1/200). Los sueros fueron diluidos en 0,1 % de BSA, 0,05 % tween 20 en PBS incubándose otra hora a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados de 30 minutos en tween 20 al 0,05 % en PBS, y se enfrentaron a proteína A peroxidasa (Biorad) a dilución 1/2000. Se efectuaron nuevos lavados previamente a su revelado con quimoluminiscencia (ECL-Amersham).

8.4. INMUNOPRECIPITACION

Para los ensayos de inmunoprecipitación, los extractos celulares se diluyeron en tampón RIPA (Tris-HCl 0,01 M pH 7.5; NaCl 0,15M; DOC 1 %: NP-40 1 % y SDS 0,1 %) y se incubaron con una dilución 1/200 del suero positivo. Después de 2 horas a 4 °C se añadió una suspensión de proteína A-Sepharosa CL-4B (Sigma) al 25 % y se incubó durante 1 hora a la misma temperatura. Todas las incubaciones se realizaron en agitación. Los complejos inmunes se recogieron por centrifugación, se lavaron tres veces con tampón RIPA a 4 °C y, finalmente, se solubilizaron en tampón de ruptura para electroforesis de proteínas.

9. SISTEMAS DE EXPRESION DE PROTEINAS

9.1. EXPRESION TRANSITORIA EN CELULAS INFECTADAS CON VTF7-3. MARCAJE RADIOACTIVO CELULAR

Las células Cos-1 se cultivaron en pocillos de placas tipo M-6 hasta que el tapiz celular estaba formado en un 80-90 %. Tras decantar el medio de cultivo se lavaron dos veces con PBS para eliminar el exceso de suero y fueron infectados con vTF7-3 a una multiplicidad de infección (mdi) de 10 UFP/célula durante 1 hora. Aproximadamente 15 minutos antes del final de dicho tiempo, se realizó la mezcla de lipofectina (GIBCO-BRL) con el plásmido a razón de 1µl de lipofectina (1 mg /ml) cada 0.5 µg de ADN. Transcurrida la hora de adsorción vírica, se retiró el inóculo y el plásmido lipofectado se añadió a los tapices celulares, manteniéndose las células en DMEM durante 20-22 horas en que los extractos celulares fueron recogidos, lavados dos veces con PBS por centrifugación y el sedimento resuspendido directamente en tampón de lisis de proteínas para su análisis.

En una etapa posterior en la que se dispuso de un virus vacuna recombinante, se siguieron protocolos de dobles infecciones vTF7-3 + VV-PR5 recombinante, incorporándose cada uno de los virus a mdi 10, con

adsorción de una hora tras la cual se decantó el medio y se recolectaron los extractos como en el protocolo anterior.

Para el marcaje radiactivo de células Cos-1 transfectadas, a las 22 horas pi /transfección, se lavaron los tapices dos veces con medio DMEM sin metionina ni cisteína, dejándose durante 1 hora con 1 ml del mismo. Transcurrido ese tiempo se puso por cada pocillo 200 μ l de dicho medio con 4 mCi de ^{35}S Metionina/Cisteína (Amersham), incubándose una nueva hora al final de la cual, el medio fue decantado y los extractos recogidos para su posterior procesado.

9.2. EXPRESION EN *E.coli*. MARCAJE RADIOACTIVO DE LA PROTEINA EXPRESADA

Para comprobar la expresión de la proteína en *E. Coli*, partimos de una suspensión glicerolada de bacterias BL21(DE₃)pLysS, que fue transformada con un plásmido pRSET-A que contiene como inserto la ORF-5 de la cepa del PRRSV 4606. Como control negativo se incluyó una suspensión que se transformó con un plásmido sin inserto. Debido a que el plásmido pLysS confiere resistencia al cloranfenicol, las bacterias se sembraron en placas de LB con ampicilina (100 mg /ml) y cloranfenicol (35 mg /ml), y fueron crecidas a 37 °C durante la noche.

Algunas de las colonias crecidas se sembraron individualmente en 5 ml de LB con ampicilina (50 mg /ml) y cloranfenicol (35 mg /ml) incluyendo una control de plásmido sin inserto, incubándose a 30 °C en agitación, hasta que alcanzaron una DO₆₆₀ de 0,5. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en el mismo volumen de medio M9 (Sambrook et al, 1989) con ampicilina, incubándose 30 minutos a 30 °C en agitación. Transcurrido ese tiempo, se separaron porciones de 50 μ l del cultivo de cada amplificación que se incubaron con 10 μ Ci de ^{35}S metionina/cisteína (Amersham), durante 5 minutos a 30 °C, tras lo cual la reacción se detuvo con 50 μ l de tampón 2x de ruptura de proteínas (a esta muestra previa a la inducción se le denominó tiempo cero; T=0).

Al mismo tiempo, el resto de los cultivos fueron inducidos con Isopropil- β -D-thiogalactopiranosido (IPTG) a concentración final de 0.1 mM, incubándose durante otros 30 minutos a 30 °C en agitación. Transcurrido ese tiempo se volvieron a recoger otras porciones (muestra tomada tras 30 minutos de la inducción; T=30 min), y al cultivo resultante se le añadió rifampicina (Sigma) a concentración final de 100 mg /ml, incubándose a 30 °C, retirándose nuevas porciones a los 30 min (muestra tomada una hora postinducción; T= 1 h) y 1'30 h (muestra tomada dos horas postinducción; T= 2 h), para marcaje.

Las muestras así obtenidas fueron depositadas en un gel de proteínas que se procesó de manera similar al de secuenciación fijándose de 15 a 30 minutos en una solución de ácido acético 10 %-metanol 10 %, tras lo cual fue secado en un secador de geles y se impresionó con una película.

10. MUTAGENESIS DIRIGIDA

10.1. OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS

Se señalan en la tabla número 5.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Posición en el pRSET-A
Oligo de selección	CAGGAAAGAAGATCTGAGCAAAG	177-190
Oligo de mutagénesis	GAGAACCCCGCATGTTGACATCTCCTTC	2831-2858

Tabla 5: Oligonucleótidos empleados en la reacción de mutagénesis dirigida.

10.2. MUTAGÉNESIS.

Se siguió esencialmente el protocolo descrito por Deng y Nickoloff (1992) en el sistema "Transformer" de mutagénesis dirigida (Clontec). Así, en un primer paso se procedió a la desnaturalización del plásmido a mutar,

el pRSET-A (100 ng) por calentamiento a 100 °C durante 3 minutos junto con dos cebadores; uno el denominado de selección (100 ng) en el que se ha eliminado un sitio de restricción único de dicho plásmido, concretamente el Alf III creándose además una nueva diana de restricción Bgl II, y el mutagénico (1 µg), que en nuestro caso incorpora 6 cambios de base con respecto a la secuencia original. Este proceso se llevó a cabo en un tampón de anillamiento (20mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl). La unión de los cebadores al plásmido se produce durante el enfriamiento.

En un siguiente paso, se realizó la síntesis de la cadena mutante con T4 ADN polimerasa y T4 ADN ligasa en un tampón de síntesis que contiene los dideoxinucleótidos necesarios para este fin. Tras llevarse a cabo la reacción mediante incubación de una hora a 37 °C y calentamiento final a 75 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas, se procedió a la digestión de la mezcla de reacción con la enzima de selección Alf III. Aquellos plásmidos que no hayan incorporado el oligo de selección serán digeridos y por ello se presentarán en forma lineal, siendo, por ello, al menos 100 veces menos eficientes en la transformación de bacterias (Conley y cols, 1994). Realizada la primera selección se realizó la transformación del producto final en la cepa bacteriana *E. coli* BMH 71-18 *mut S*, cepa que posee incorporado el transposón Tn 10 en su ADN generándose una mutación que la hace ser deficiente en reparación. La transformación se hizo en medio líquido LB con ampicilina, y la minipreparación plasmídica resultante fue digerida por segunda vez con la enzima de selección Alf III, para asegurar la completa desaparición del plásmido parental. Luego se llevó a cabo una nueva transformación, esta vez en la cepa bacteriana DH-5, sembrándose en placas de LB con ampicilina. La selección de las colonias positivas se realizó por hibridación con el plásmido mutagénico marcado con fósforo radiactivo como ya se ha descrito anteriormente. Las colonias positivas fueron recogidas y comprobada la presencia del inserto primero mediante corte de selección con la enzima de restricción Hinc II, ya que la incorporación del oligo mutagénico al vector mutagenizado causa la aparición de esta nueva

diana que no aparece en el plásmido original. Los clones positivos por digestión fueron comprobados por secuenciación. En la figura 6 se señala esquemáticamente el procedimiento descrito.

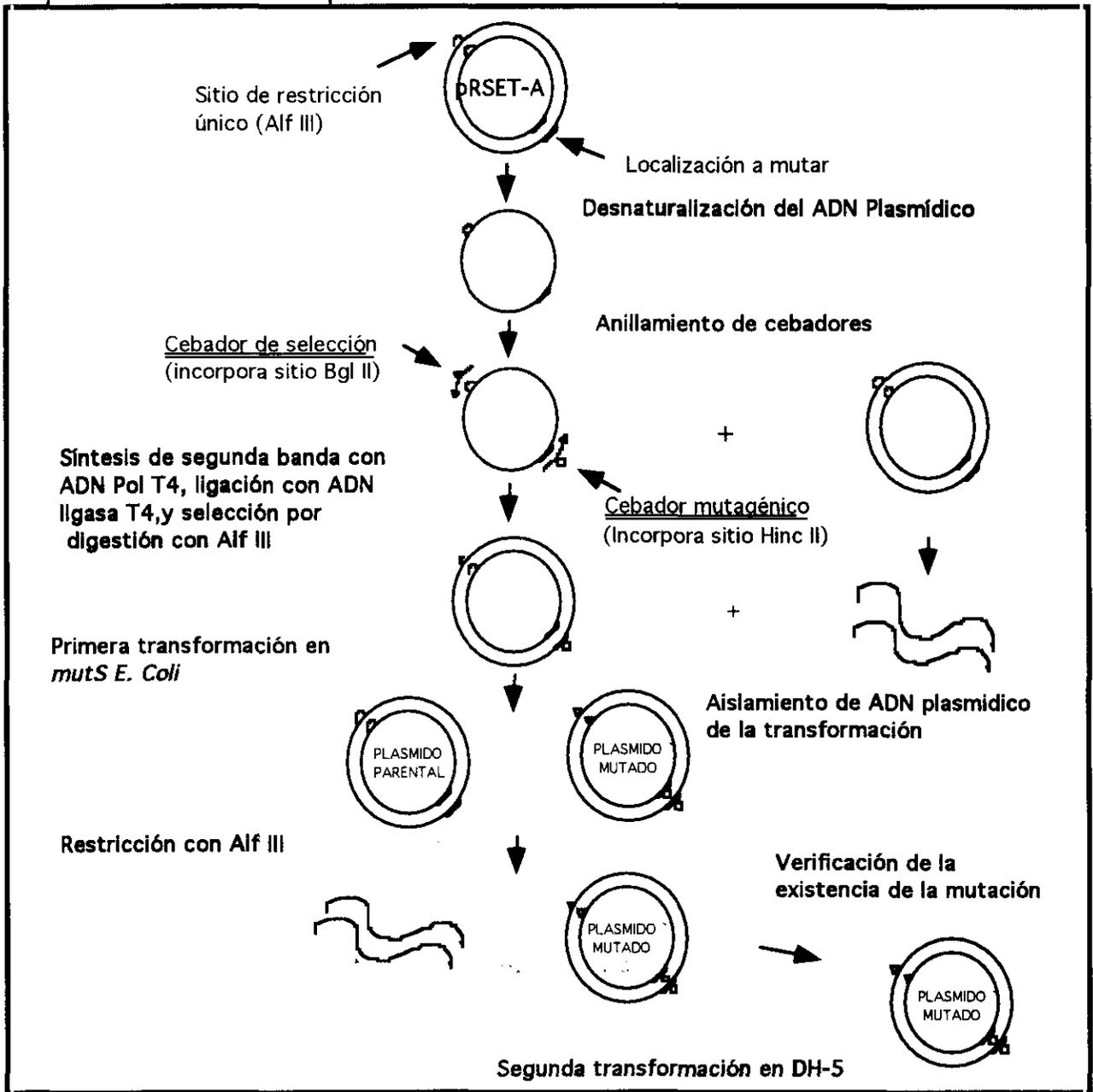


Figura 6: Mutagénesis dirigida del plásmido pRSET-A.

11. SINTESIS DEL VIRUS VACUNA RECOMBINANTE

Se siguieron las especificaciones descritas por Earll y Moss (1992).

Con este fin, en un cultivo confluyente de células Cos-1 (p60) se inoculó, previa sonicación, virus vacuna salvaje a mdi de 0.05 UFP/célula. Tras dos horas de adsorción con agitaciones cada 15 minutos, se realizó la transfección de 7 μ g de plásmido pTM-1 con inserto de la ORF-5 (pTPR-5) lipofectado en medio DMEM. A las 24 horas pi, el medio se cambió a DMEM con 5 % de SFB, recogiénose las células 24 horas más tarde y resuspendiéndolas en un volumen final de 500 μ l de DMEM con 2,5 % de SFB. Después de tres ciclos de congelación-descongelación, se realizaron diluciones decimales en un volumen de 100 μ l, sembrándose para la realización de la primera selección de virus TK- en células 143 TK- crecidas en medio con bromo-deoxiuridina. El cuarto día pi se examinaron y se eligieron un total de 12 placas transpasando cada una a un tubo tipo eppendorff con 500 μ l de DMEM con 2,5 % de SFB. Tras congelar-descongelar 3 veces, 100 μ l de 6 placas fueron diluidos decimalmente y sembrados en placas con medio de selección. Después de tres operaciones de selección con el fin de asegurar clones víricos puros, se seleccionaron 6 clones finales en los que se comprobó la presencia del inserto tanto por Dot-Blot como por expresión de la proteína codificada por la ORF-5 en sistemas de doble infección (recombinante que expresa la ORF-5 del PRRSV+vTF7-3). Al recombinante así seleccionado se le denominó VV-PR5.

12. MARCADORES ASOCIADOS A MUERTE CELULAR INDUCIDA POR APOPTOSIS

Se cultivaron células en placas p100, que fueron infectadas con vTF7-3 a mdi 10, coinfectadas con vTF7-3 y VV-PR5 a mdi 5 y 5, o con el PRRSV, según el experimento, dejándose como control células no infectadas. Los extractos celulares se recogieron a diferentes tiempos pi, y aproximadamente 2/3 se procesaron para extracción de ADN cromosómico y 1/3 para obtención de ARN utilizándose una pequeña alicuota para análisis de la proteína sintetizada por Western-Blot.

12.1. EXTRACCION DE ADN CROMOSOMICO

Los extractos celulares fueron lavados una vez con PBS por centrifugación, y finalmente resuspendidos en 1ml de PBS al que se le incorporó 500 μ l de una solución 10mM Tris pH 7.5; 10mM EDTA; 1 % SDS y 100 μ l de NaCl 5M. Tras dejarse un mínimo de 6 horas a 4 °C, los extractos fueron centrifugados a 12.000 xg durante 10 minutos a 4 °C y al sobrenadante se le añadió SDS y proteínasa K para obtener una concentración final de 0,5 % y 200 μ g /ml respectivamente, y 25 μ g de RNasa. Después de una incubación a 37 °C durante una hora, las muestras fueron extraídas dos veces con fenol, el ADN precipitado con etanol y resuspendido en agua añadiéndosele nuevamente RNasa. Tras una nueva incubación de 30 minutos a 37 °C, se cargó la mitad de la muestra en un gel de agarosa al 1,6 %, que fue teñido con bromuro de etidio tras la separación electroforética de las muestras y visualizado en un transiluminador de UV.

12.2. EXTRACCION DE ARN TOTAL

Para la extracción del ARN de las muestras se utilizó un kit comercial (Ultraspec-II-RNA Isolation system/ Biotricks). Las muestras se resuspendieron finalmente en 30 μ l de agua tratada con DEPC y 10 μ l se cargaron en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes.

12.3. TINCION DE LA CROMATINA NUCLEAR CON HOECHST

Se crecieron células sobre cristales de modo similar a como se verá en el apartado 15.1. Previamente, los cristales fueron tratados 15 minutos con una solución de polysina-L a concentración final del 0.1 % con el fin de evitar el desprendimiento de las células apoptóticas de los cristales. Tras realizar la infección del cultivo con los diferentes virus, los cristales se recogieron a diferentes tiempos pi y tras lavar los tapices con PBS, se realizó la fijación de los mismos con metanol frío durante 20 minutos a -20 °C. A continuación fueron lavados con PBS, y mantenidos hasta su

procesamiento. La tinción de la cromatina nuclear se realizó exponiendo las células fijadas al cristal a la tinción con Hoechst 33258 a dilución 1/10.000 durante 1 hora. Una vez montadas las preparaciones con moviol, se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia con filtro específico para Hoechst.

13. PURIFICACION DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5

Se siguió el método, con algunas variaciones, que se describe en las intrucciones de la resina de níquel-aceto-nitrilo (In vitro).

Para la obtención de los extractos celulares, se utilizaron placas p100 confluentes que fueron sometidas al protocolo de coinfección vTF7-3 y VV-PR5 ámbos a mdi 10. Después de una hora de adsorción, las células fueron recogidas a las 22 horas, lavadas con PBS dos veces por centrifugación, extrayéndose una pequeña muestras (fracción total). Los extractos fueron centrifugados nuevamente y resuspendidos en 250 µl por p100 de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM ClNa; 5 mM Cl₂Mg; 10 % glicerol; 1% NP-40; 10 mM imidazol; 1M hidrocloreuro de guanidina). Tras 10 minutos en agitación rotatoria a temperatura ambiente, los extractos fueron rotos con la ayuda de una jeringa de insulina y recogida otra muestra (fracción post-lisis). El sobrenadante se unió entonces a 50 µl por p100 de la resina previamente equilibrada en dicho tampón de lisis, manteniendose durante 1 hora en agitación rotatoria.

Los lavados de la resina se realizaron con la ayuda de una jeringa de insulina que actuó como columna, en cuyo cono se colocó una gasa para evitar que la resina fuera arrastrada. Transcurrida la hora de unión, la muestra se paso por la columna recogándose el extracto no adherido en un tubo tipo eppendorff. Sobre la resina contenida se realizaron múltiples lavados, primero con un tampón 20 mM fosfato pH 7.8; 500 mM ClNa; 20 mM Imidazol, y posteriormente con el mismo tampón pero con imidazol 1M. Todas las fracciones se recogieron y analizaron en geles de acrilamida-

bisacrilamida al 12 % por tinción de Comassie, y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

14. ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD

Con este fin, se inocularon ratones balb-c con 50 µl de resina que llevaba adherida la proteína expresada en células Cos-1 (correspondientes a media p100 de células Cos-1). Las inoculaciones se realizaron siguiendo la pauta que se adjunta en la tabla 6. Para ello, el coadyuvante oleoso de Freund (Difco) se usó a concentración 1/1 con respecto a la resina resuspendida en 100 µl de PBS/ratón.

DIA	VIA	ADYUVANTE DE FREUND	SANGRIA
0	Intraperitoneal	Completo	---
7	Intraperitoneal	Incompleto	---
14	---	---	+
21	Intraperitoneal	Incompleto	---
28	---	---	+
35	Intraperitoneal	Incompleto	---
42	---	---	+
49	Intraperitoneal	Incompleto	---
56	---	---	+

Tabla 6: Pauta de inoculación seguida en ratones balc-2 inoculados con una resina a la que se adhiere la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV.

Material y métodos

A cada ratón le fue así inoculada una concentración estimada de proteína de 2-5 mg /dosis. Las sangrias seriadas se realizaron con la ayuda de un capilar en el ángulo retroorbitario del ojo.

Por otra parte, también se realizaron coinfecciones de ratones balb-c y conejos con el vTF-7 y el VV-PR5. En los ratones la pauta de inoculación empleada fue la indicada en las tablas 7 y 8 respectivamente:

DIA	VIA	DOSIS DE CADA RECOMBINANTE	SANGRIA
0	Escarificación de la cola	5×10^6 UFP	-----
15	Escarificación de la cola	5×10^6 UFP	+
30	-----	-----	+

Tabla 7: Pauta de inoculación seguida en ratones balb-2 doblemente inoculados con los virus VVPR-5 y vTF7-3.

Los conejos fueron inoculados de acuerdo al siguiente protocolo:

DIA	VIA	DOSIS DE CADA RECOMBINANTE	SANGRIA
0	Intradérmica	5×10^7 UFP	-----
15	Intradérmica	5×10^7 UFP	+
30	-----	-----	+

Tabla 8: Pauta de inoculación seguida en conejos doblemente inoculados con los virus VVPR-5 y vTF7-3.

Después de la sangría, el suero fue analizado por las técnicas de Western-blot, inmunofluorescencia, seroneutralización e IPMA.

15. TECNICAS DE ANALISIS SEROLOGICO

15.1. INMUNOFLUORESCENCIA

Células MA-104 susceptibles a la multiplicación de la cepa 5710 del PRRSV fueron crecidas en cristales de inmunofluorescencia hasta una confluencia aproximada del 80 %. Los tapices celulares confluentes fueron infectados con 10^2 DI₅₀/CT de PRRSV e incubados a 37 °C hasta que mostraron un claro efecto citopático. El medio fue decantado y tras lavar los tapices con PBS, se realizó la fijación de los mismos con metanol frío durante 20 minutos a - 20 °C. A continuación, fueron nuevamente lavados con PBS, y mantenidos en el hasta su procesamiento.

Para la realización de la inmunofluorescencia, los cristales fueron saturados con PBS y seroalbúmina bovina al 1% durante 30 minutos. Enfrentados al anticuerpo a probar a dilución 1/50 una hora a temperatura ambiente, lavados tres veces durante 15 minutos con PBS y enfrentados al antiespecie correspondiente conjugado con fluoresceína otra hora. Tras un nuevo lavado, las preparaciones se fijaron con moviol, y se observaron en microscopio de epifluorescencia.

15.2. IPMA

Células MA-104 fueron crecidas en placas de 96 pocillos, al alcanzar la confluencia se infectaron con 10^2 DI₅₀/CT por pocillo, dejando alternativamente pocillos sin infectar. Tras 48 horas el medio fue decantado y las células lavadas con PBS y fijadas durante cinco minutos con paraformaldehído al 4 % en PBS. A continuación se lavaron nuevamente con PBS.

Para la realización del IPMA, los sueros a dilución 1/50 fueron depositados por duplicado en pocillos infectados y no infectados, y tras incubación de 1 hora a 37 °C, los pocillos fueron lavados con PBS y enfrentados a conjugados con peroxidasa. Tras nuevos lavados, la reacción fue revelada con una solución de 3-amino-9 etil carbazol y las placas visualizadas en microscopio óptico.

15.3. SERONEUTRALIZACION

Se siguió el protocolo descrito por Yoon y cols (1994).

Los sueros a emplear fueron previamente descomplementados mediante calentamiento a 56 °C durante un hora. A continuación se realizaron diluciones dobles en placas de 96 pocillos en DMEM con SFB al 3 %. A cada dilución se le añadieron 10^2 DI₅₀CT de PRRSV en el mismo diluyente pero con 20% de suero de la especie correspondiente. Tras mezclar e incubar las placas 1 hora a 37 °C, a cada pocillo se le añadieron 100 µl de células MA-104 (10^3 células/ml). Las placas se incubaron en una atmósfera de CO₂ a 37 °C durante cinco días, momento en que se realizó la lectura final.

IV. RESULTADOS

1. OBJETIVO PRIMERO: Aplicación de la técnica de transcripción en reverso-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) al diagnóstico del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la misma tanto en cultivos celulares como en muestras biológicas

1.1. AMPLIFICACION DENTRO DE LA ORF-7 DEL PRRSV

Para ello se utilizaron cebadores que delimitaban en el interior de la ORF-7 del PRRSV un fragmento de aproximadamente 310 pares de bases.

Tras realizar la extracción de ARN tomando como sustrato un mililitro de cultivo con 5×10^6 DI50CT de la cepa de referencia 5710, el cDNA fue obtenido con la transcriptasa en reverso, y la PCR realizada según las condiciones ya descritas. La muestra de PCR fue separada en un gel de agarosa al 1.5 % en TBE, obteniendo un único producto resultante de un tamaño que se correspondía perfectamente con lo esperado (figura 7).

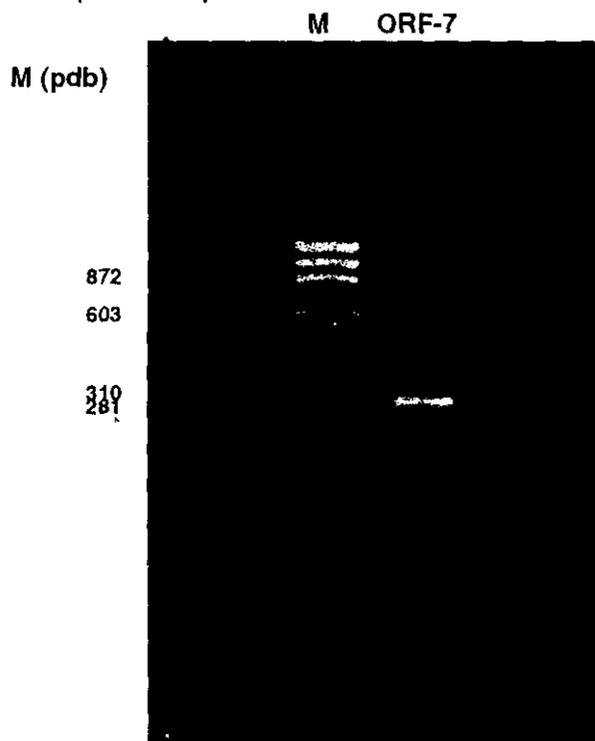


Figura 7: Amplificación del fragmento interno de la ORF-7 del PRRSV. **M:** marcador de peso molecular (ϕ 174 digerido con Hae II); **ORF-7:** Amplificación dentro de la ORF-7.

Para comprobar que realmente el producto amplificado correspondía a nuestro virus, el producto de PCR fue clonado en el plásmido pGEM-T (figura 8) ya que como se señaló dicho plásmido tiene, entre otras, la particularidad de presentarse en forma lineal y poseer en sus extremos 3' protuberantes una timidina lo que facilita, aprovechando la característica de la Taq polimerasa, de añadir dAdenosina en los extremos 3' de algunos de los productos de PCR amplificados, el clonaje de los mismos. Además dicho posee los promotores de T7 y SP6, así como un inicio de transcripción. Tras la ligación del vector al producto de PCR, la transformación de bacterias JM 109 competentes con los mismos y selección de las colonias positivas con IPTG y X-Gal, colonias aisladas fueron sembradas en medio LB con ampicilina realizándose minipreps de las mismas. Los plásmidos que parecieron positivos por un retraso en la migración en geles de agarosa al 0,8 % en TBE, fueron digeridos con Apa I - Pst I liberándose un inserto del tamaño esperado. Una vez comprobada la existencia del inserto se secuenciaron por secuenciación automática varios clones, obteniéndose diferencias en la secuencia del virus aislado en España con respecto al virus LV holandés, como se verá en el tercer apartado de este capítulo.

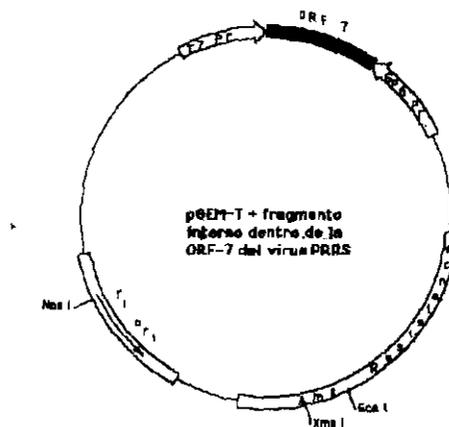


Figura 8.- Clonaje del producto de PCR resultante de amplificación interna de la ORF-7 en el pGEM-T.

1.2. SENSIBILIDAD DE LA TECNICA

1.2.1. Sensibilidad en sobrenadantes de cultivos celulares

Un punto fundamental, dada la finalidad de empleo con fines diagnósticos de la técnica, era la determinación de la sensibilidad de la misma. Para ello, partiendo de 1,9 ml de un cultivo en MAP del PRRSV con 5×10^6 DI₅₀CT/ml, y tras centrifugación del mismo a 111.000 xg durante dos horas, y extracción de ARN, se hicieron diluciones decimales cubriendo un rango desde 0,67 hasta $6,7 \times 10^6$ DI₅₀CT. Tras la realización de la RT-PCR los productos fueron separados en geles al 1.5 % de agarosa en TBE incluyendo como testigo negativo macrófagos alveolares porcinos no infectados. Los resultados indicaron positivities desde $6,7 \times 10^6$ hasta 6,7 DI₅₀CT (figura 9).

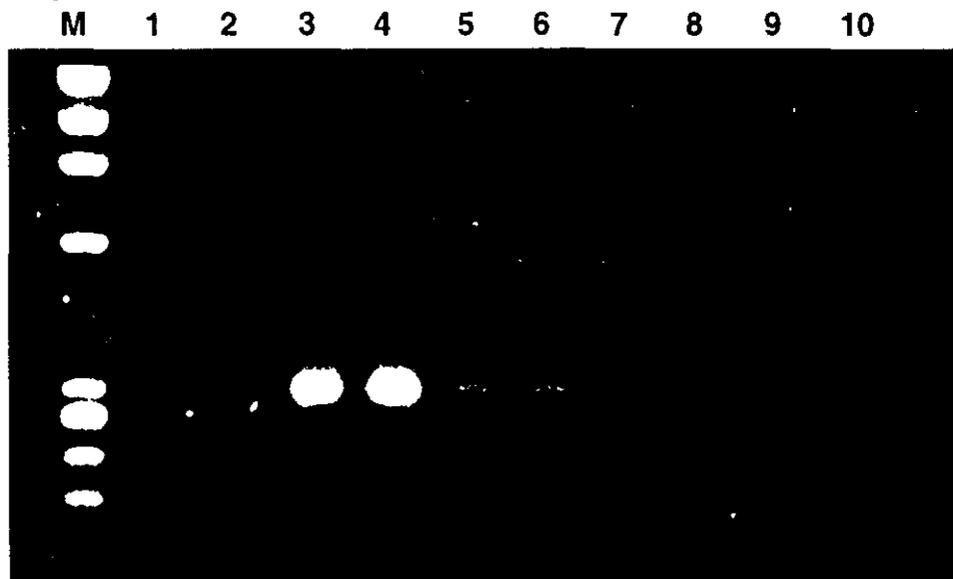


Figura 9 .- Sensibilidad de la técnica de RT-PCR. M: marcador de peso molecular (ϕ 174 digerido con Hae II); 1 y 2: Testigos negativos de PCR y RT respectivamente; 3: PCR correspondiente a la dilución $6,7 \times 10^6$ DI₅₀CT; 4: PCR correspondiente a la dilución $6,7 \times 10^5$ DI₅₀CT; 5: PCR correspondiente a la dilución $6,7 \times 10^4$ DI₅₀CT; 6: PCR correspondiente a la dilución $6,7 \times 10^3$ DI₅₀CT; 7: PCR correspondiente a la dilución $6,7 \times 10^2$ DI₅₀CT; 8: PCR correspondiente a la dilución $6,7 \times 10$ DI₅₀CT; 9: PCR correspondiente a la dilución 6,7 DI₅₀CT; 10: PCR correspondiente a la dilución 0,67 DI₅₀CT.

En un ensayo de confirmación, el virus se diluyó en suero realizándose tanto la extracción de ARN como la RT-PCR aisladamente, obteniéndose una sensibilidad de 4×10^2 DI₅₀CT/ml.

1.2.2. Sensibilidad intrínseca de la reacción de PCR

Para, con independencia de la transcripción en reverso, determinar la sensibilidad "intrínseca" de la reacción de PCR, se hicieron diluciones decimales de plásmido con inserto desde 100 picogramos hasta 1 fentogramo, obteniendo un nivel de detección de 10 fentogramos (figura 10).

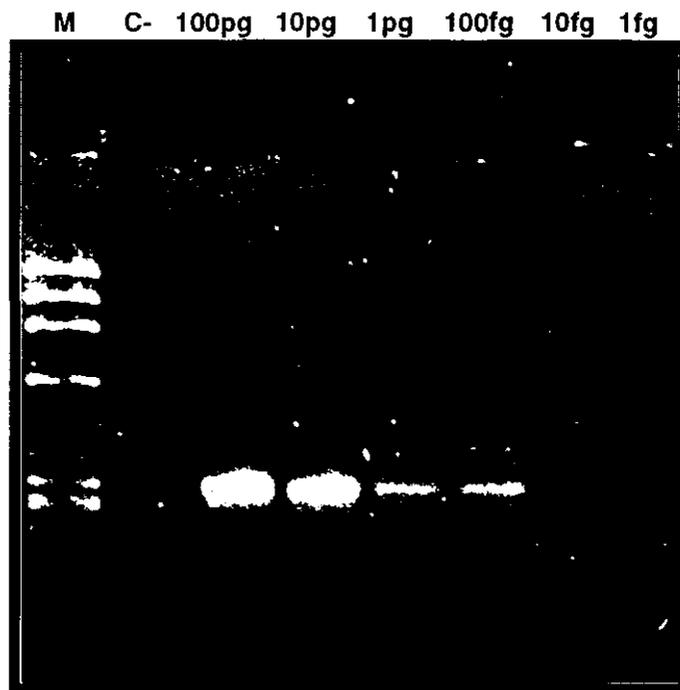


Figura 10 .- Sensibilidad intrínseca de la reacción de PCR. **M**: marcador de peso molecular (ϕ 174 digerido con Hae II); **C-**: Testigo negativo de PCR; **100pg**: 100 picogramos de plásmido pGEM-T+ inserto de la ORF-7; **10pg**: 10 picogramos del plásmido; **1pg**: 1000 fentogramos del plásmido; **100fg**: 100 fentogramos del plásmido; **10fg**: 10 fentogramos de plásmido; **1fg**: 1 fentogramo de plásmido.

1.2.3. Sensibilidad en muestras biológicas

Una vez determinada la sensibilidad "in vitro" se decidió realizar un estudio "in vivo" que a la vez nos pudiera orientar de la distribución del virus en función del tiempo en los distintos órganos y líquidos corporales. Para ello se diseñó un modelo experimental utilizando cinco lechones de 21-24 días, y dejando uno de ellos como testigo. Estos lechones fueron inoculados via intranasal con 1 ml de la cepa 5710 del PRRSV a la concentración de 5×10^6 $DI_{50}CT/ml$, siendo sacrificados en los días 3, 5, 8, y 10 pi.

Los resultados obtenidos de las mediciones de temperaturas y del estudio de lesiones macroscópicas se resume en la figura 11 y la tabla 9.

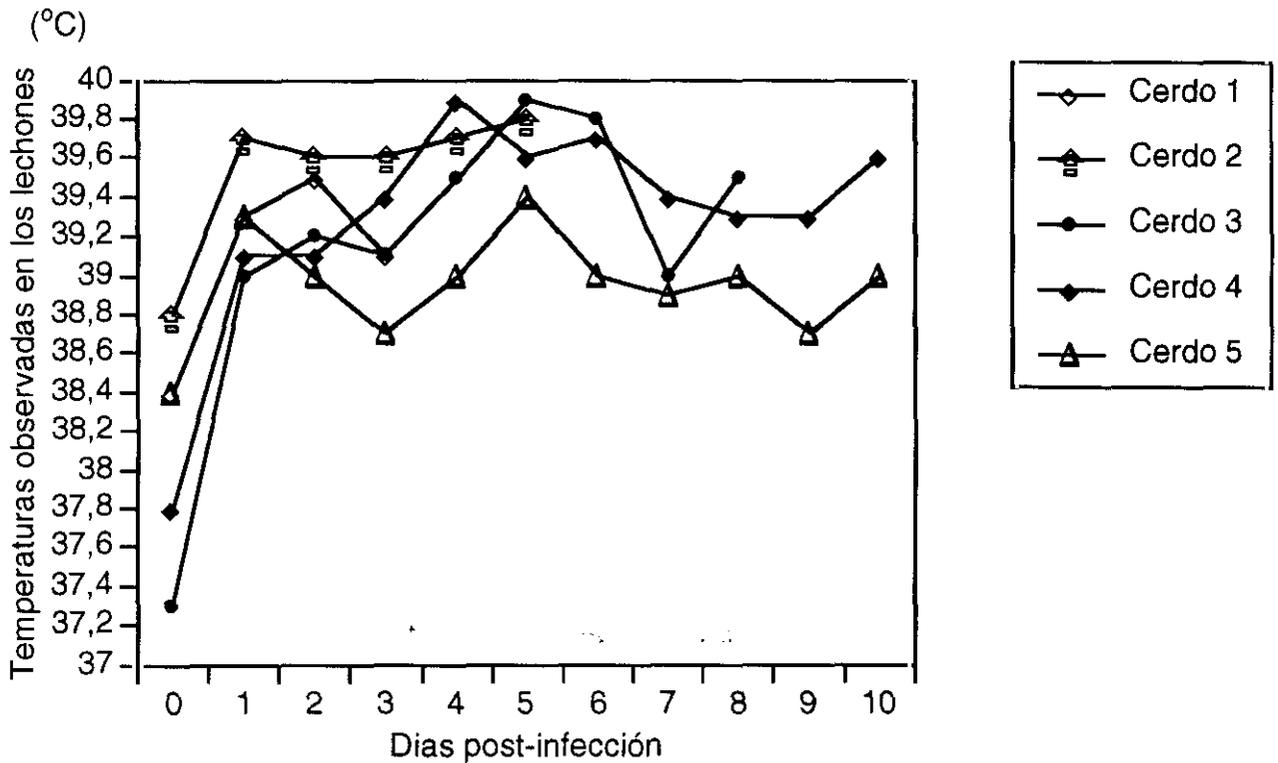


Figura 11.- Curva de temperaturas observadas con posterioridad a la infección experimental con 1 ml/cavidad nasal de 4×10^2 $DI_{50}CT/ml$ de cuatro lechones sacrificados los días 3, 5, 8 y 10 respectivamente. El cerco número 5 actuó como testigo.

<p>CERDO 1 (sacrificado 3^{er} día post-Infección)</p>	<p>Ganglios inguinales, suprarenales y retrofaringeos con infartación y hemorragias. Ganglios mesentéricos y submaxilares indurados.</p>
<p>CERDO 2 (sacrificado 5^o día post-Infección)</p>	<p>Ganglios inguinales hemorrágicos aunque no infartados. Hígado ligeramente friable.</p>
<p>CERDO 3 (sacrificado 8^o día post-Infección)</p>	<p>Ganglios inguinales ligeramente hemorrágicos</p>
<p>CERDO 4 (sacrificado 10^o día post-Infección)</p>	<p>Hígado friable. Ligera hepato y esplenomegalia. En pulmón se observan lesiones neumónicas.</p>

Tabla 9.- Lesiones observadas en los lechones sacrificados a diferentes tiempos postinfección.

Tras el sacrificio de los animales, y con el objetivo de conocer la distribución y título del PRRSV, los diferentes órganos fueron homogeneizados al 10 % en medio de cultivo (DMEM) y las muestras sometidas a un doble procesado, de una parte a extracción de ARN y RT-PCR, y por otra a titulación por DI₅₀CT en cultivos primarios de MAP. Los resultados obtenidos por ambas técnicas se muestran en las tablas 10 y 11. En las reacciones de RT-PCR se incluyeron como testigo positivo 1 ml de un cultivo vírico con un título de 5×10^6 DI₅₀CT/ml, y como testigo negativo un cultivo de macrófagos alveolares no infectados.

Los resultados obtenidos tras procesar las muestras correspondientes a los cerdos 2 y 4 (sacrificados respectivamente el día 5 y 10 postinfección) se presentan en las figuras 12 y 13.

Resultados

RT-PCR	Cerdo 1	Cerdo 2	Cerdo 3	Cerdo 4
Macrófagos pulmonares	+	+	+	+
Pulmón	+	+	+	-
Higado	+	-	-	-
Bazo	-	+	+	-
Riñón	+	+	+	-
Suero	+	+	+	+
Plasma	+	+	+	+
Fracción leucocitaria	+	+	+	-
Ganglio Submaxilar	+	+	+	-
Ganglio inguinal	-	+	+	-
Amígdala	+	+	+	-

Tabla 10.- Resultado de la reacción de RT-PCR en los distintos órganos y muestras biológicas ensayadas.

Titulaciones (DI ₅₀ CT/ml)	Cerdo 1	Cerdo 2	Cerdo 3	Cerdo 4
Macrófagos pulmonares	10 ^{4.69}	10 ⁵	10 ^{7.24}	10 ^{5.39}
Pulmón	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ^{2.49}
Higado	10 ^{2.74}	10 ²	10 ^{2.59}	-
Bazo	10 ^{2.49}	10 ²	10 ³	10 ^{1.75}
Riñón	10 ^{3.59}	10 ^{2.5}	10 ^{4.33}	10 ^{2.24}
Suero	10 ⁴	10 ^{3.49}	10 ^{4.74}	10 ³
Plasma	10 ^{4.49}	10 ^{3.5}	10 ⁴	10 ^{2.74}
Fracción leucocitaria	10 ^{4.63}	10 ^{3.5}	10 ^{4.49}	-
Ganglio Submaxilar	10 ^{2.39}	10 ³	10 ^{3.37}	10 ²
Ganglio inguinal	10 ²	10 ^{2.5}	10 ^{3.49}	10 ^{1.75}
Amígdala	10 ^{2.83}	10 ³	10 ^{3.49}	10 ^{1.75}

Tabla 11.- Titulaciones en DI₅₀CT/ml de los diferentes órganos y muestras biológicas ensayadas.

Este producto fue clonado en el pGEM-T y secuenciado para estudios de variabilidad, observándose también diferencias frente a la cepa LV del PRRSV. Los plásmidos resultantes, que tenían la ORF-5 clonada, se denominaron pGPR-5.

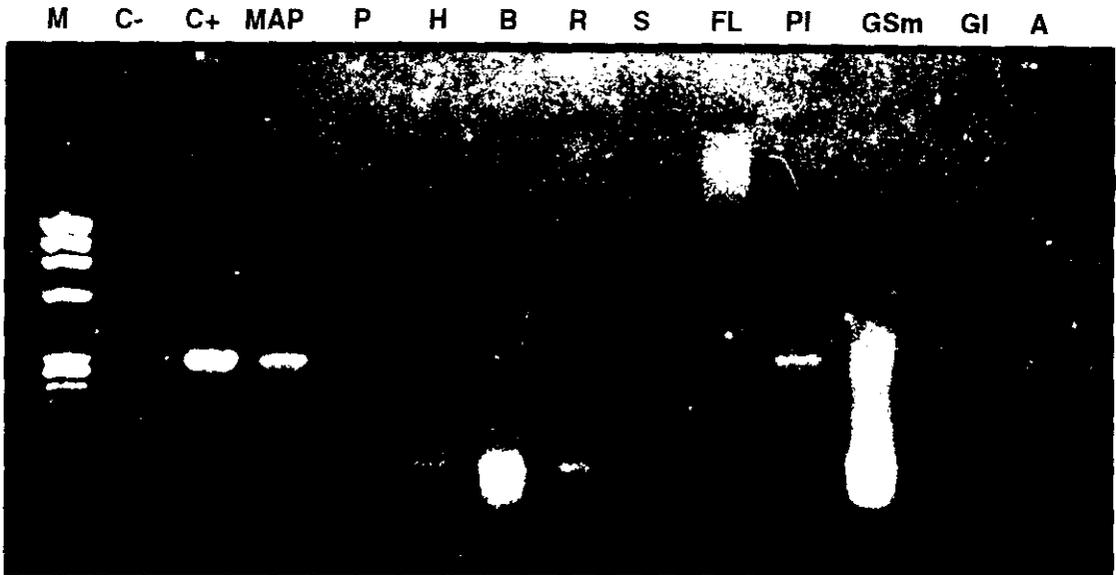
De igual modo se clonaron las ORFs-5 correspondientes a las cepas 3211, 2228, 4606 y 5999. Las ORFs-5 correspondientes a las cepas 5711 y 2910, incluidas también en este estudio, no fueron susceptibles de ser amplificadas bajo las condiciones estandar de PCR. Intentos de amplificación de las mismas mediante la reducción de la temperatura de anillamiento a 30 °C también resultaron fallidos.

2.2. EXPRESION DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5 DEL PRRSV EN UN SISTEMA EUCARIOTA

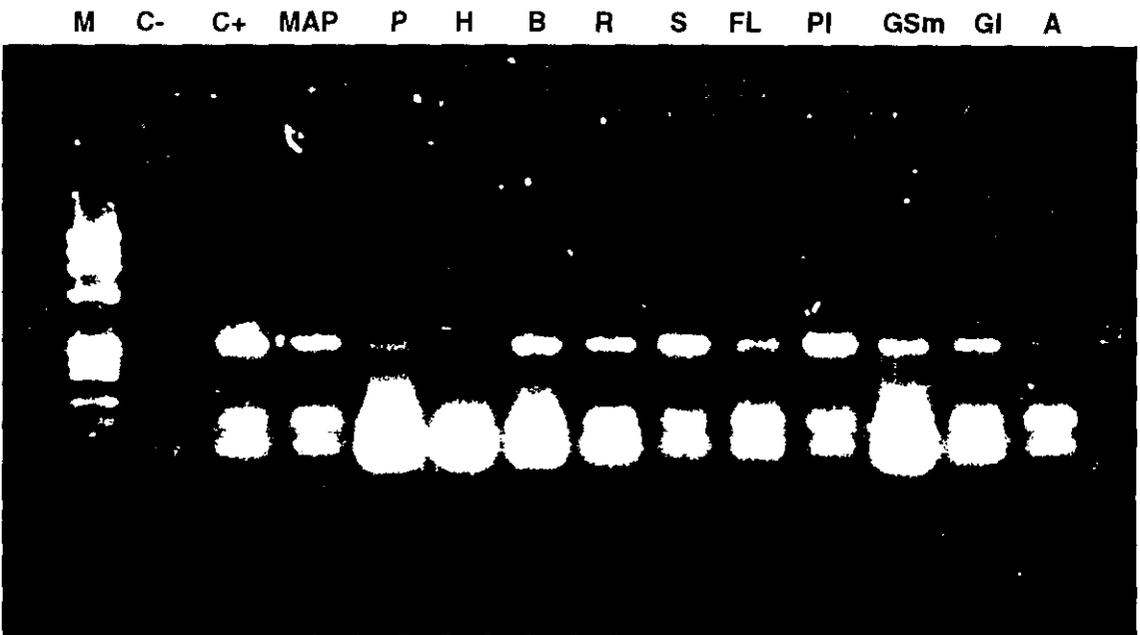
Una vez clonada la ORF-5, se dirigieron las investigaciones a la expresión de la proteína codificada por la misma así como a determinar el reconocimiento de ella por sueros de animales infectados experimentalmente con el PRRSV.

2.2.1. Expresión transitoria en células Cos-1 mediante infección con vTF7-3 y transfección plasmídica

Para ello se utilizó un sistema de expresión eucariota basado en el uso de un virus vacuna recombinante que posee el gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 integrado en su genoma (vTF7-3). La infección de células susceptibles con dicho virus hace que en las mismas se sintetize dicha enzima, posibilitando la expresión en dichas células de genes que esten bajo el promotor del bacteriófago T7 en un plásmido transfectado tras la infección. En este sentido, el virus vacuna es capaz de infectar a la mayoría de las líneas celulares aviares y de mamíferos. En nuestro caso utilizamos inicialmente las células Cos-1, que proceden originalmente de las células Vero, a las que se les infectó con el vTF7-3 a una mdi de 10



(figura 12)



(figura 13)

Figuras 12 y 13.- RT-PCR de los órganos de los cerdos números 2 (sacrificado el día 5 post-infección) y 4 (sacrificado el día 10 post-infección) respectivamente. **M:** marcador de peso molecular (ϕ 174 digerido con Hae II); **C-:** control negativo de PCR; **C+:** control positivo de PCR (sobrenadante de cultivo celular de PRRS); **MAP:** macrófagos alveolares porcinos; **P:** pulmón; **H:** hígado; **B:** bazo; **R:** riñón; **S:** suero; **FL:** fracción leucocitaria; **PI:** plasma; **GSm:** Ganglio submaxilar; **GI:** Ganglio inguinal; **A:** amígdala.

1.3. ESPECIFICIDAD DE LA TECNICA

Para comprobar la especificidad de la técnica se analizaron por RT-PCR distintos agentes víricos causantes de alteraciones respiratorias y/o reproductoras en el cerdo. Fueron incluidos los virus de la Peste Porcina Clásica (HC), virus de la Influenza porcina serotipos H1N1 y H3N2; virus de la Gastroenteritis Transmisible Porcina (TGE); Parvovirus Porcino (PPV); virus de la Enfermedad de Aujeszky (ADV) y el virus de la Diarrea Vírica Bovina (BVD). Como control positivo se incorporó la cepa 5710 del PRRSV.

Para la realización de la RT-PCR, las distintas cepas víricas empleadas se ajustaron a una $DI_{50CT/ml}$ de 10^5 . Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14. En la misma sólo se observa una banda de amplificación correspondiente a la cepa de PRRSV.

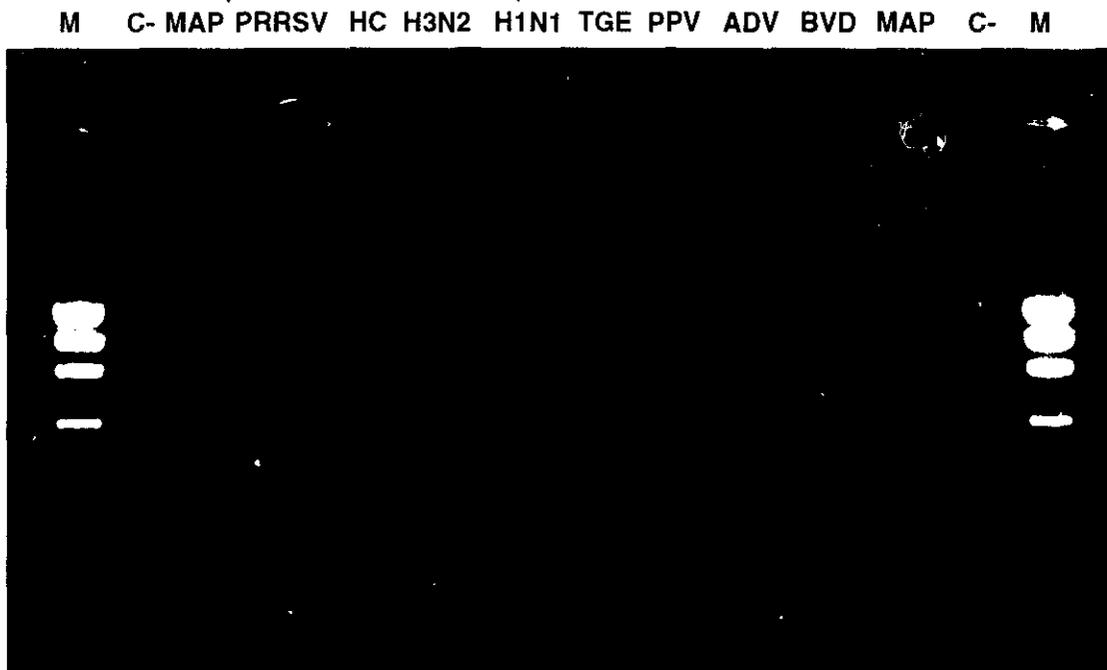


Figura 14.- Amplificación de diferentes agentes víricos implicados en procesos reproductores y/o respiratorios porcinos. **M:** marcador de peso molecular (\emptyset 174 Hae II); **C-:** Control negativo de PCR; **MAP:** macrófagos alveolares porcinos; **PRRS:** PRRS (cepa 5710); **HC:** virus de la peste porcina clásica (cepa Alfort/187); **H3N2:** virus Influenza (A/Ghent/1/84); **H1N1:** virus Influenza (cepa A/Bélgica/1/83); **TGE:** virus de la gastroenteritis transmisible porcina (cepa Purdue); **PPV:** virus del parvovirus porcino (cepa NADL-8); **ADV:** virus de la enfermedad de Aujeszky (cepa NIA-3); **BVD:** virus de la diarrea vírica bovina (cepa Singer).

2. OBJETIVO SEGUNDO.- Expresión y caracterización de la proteína codificada por la zona de lectura abierta número 5 del virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino tanto en un sistema eucariota como procariota

2.1. AMPLIFICACION DE LA ORF-5 DEL PRRSV

Dentro de este objetivo se pretendía clonar una zona de lectura abierta que codificara una posible proteína asociada a membrana del virus, para su posterior expresión en sistemas tanto eucariotas como procariotas. Con este fin se eligió la proteína codificada por la ORF-5, la proteína E, diseñándose cebadores frente a la misma que incluían en sus extremos el ATG iniciador el de ida y el de vuelta el codón de terminación TAG (->ATC), con lo que se conseguía clonar íntegra dicha ORF. Los cebadores utilizados fueron los descritos en material y métodos (capítulo 5.4.1).

Realizada la RT-PCR usando como patrón la cepa 5710, con similares condiciones a las usadas frente a la ORF-7, y tras separar el producto resultante en un gel al 1.5% de agarosa en TBE, obtuvimos un único producto de 609 pares de bases como se muestra en la figura 15.

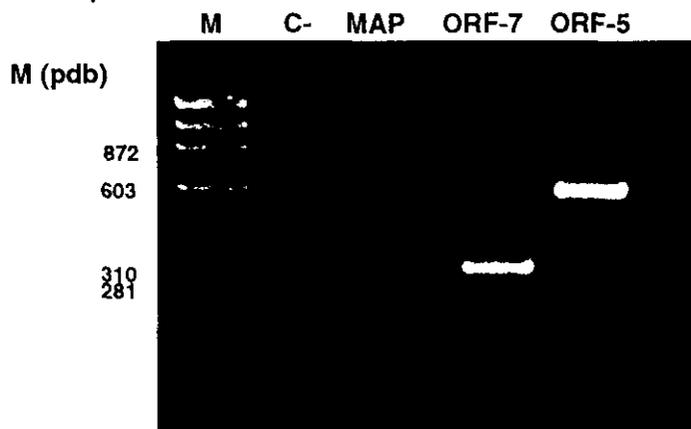
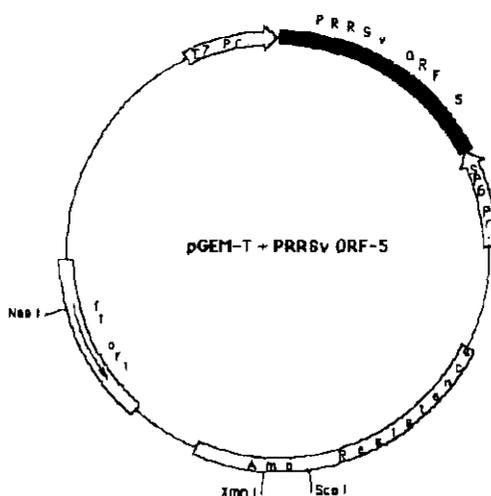


Figura 15.- Amplificación por PCR de la secuencia íntegra de la ORF-5 del virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino. **M:** Marcador de peso molecular (\emptyset 174 digerido con Hae II); **MAP:** controles negativos de macrófagos alveolares porcinos no infectados; **ORF-7:** amplificación dentro de la ORF-7; **ORF-5:** amplificación de la ORF-5.

UFP/célula. Tras una hora de adsorción se les transfectó el plásmido lipofectado, plásmido que posee la ORF-5 del PRRSV bajo el promotor de T7. Durante la incubación, que fue de aproximadamente 24 horas, el gen de la ORF-5 se transcribirá debido a la síntesis de la ARN polimerasa del fago T7.

Inicialmente, y debido a que poseíamos nuestra ORF clonada en el pGEM-T y aprovechando que dicho plásmido tenía dicho gen bajo el promotor de T7 decidimos comprobar si la misma era expresada en las células Cos-1. Debido a ello, el plásmido que contenía la zona de lectura abierta de la cepa de referencia 5710 fue transfectado en placas p35 a dos concentraciones de plásmido 2 μ gr y 5 μ gr, incluyendo siempre un testigo de células no infectadas, y un testigo de células infectadas pero no transfectadas. Los extractos celulares fueron recogidos y resuspendidos en 100 μ l de tampón de carga de proteínas. Un quinto (20 μ l) de las muestras así obtenidas fueron separadas en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 12 %, transferidas a nylon y enfrentadas a un suero positivo al PRRSV que previamente había sido titulado para Western-Blot, siendo la dilución idónea la 1/200. Tras revelar el filtro, sin embargo, no encontramos ninguna banda a la altura esperada de entre 22-26 KD. Al analizar este resultado se comprobó la existencia en el polilinker del vector de dos tripletes ATG que estaban en fase entre sí, pero no con el ATG iniciador de nuestra proteína que debía haber sido incorporado por el cebador de ida, de modo que si los ATG del plásmido eran tomados como iniciador, el ATG que daba comienzo a la traducción de nuestra proteína no se leía al no estar en fase y además, quedaba convertido en un TGA -> FIN. Todo lo expuesto queda reflejado en la figura 16.



5'TGTAAC TACGA CTCAC TATAG GCGGA ATTGG GCCCG ACGTC **GCATG** CTCCC GGCCG CC**ATG** GCCGC
 3'ACATT ATGCT GAGTG ATATC CCGCT TAACC CGGGC TGCAG CGTAC GAGGG CCGGC GGTAC CGGCG

Promotor de T7

Apa I Aat II Sph I

Nco I Sac II

GGGATT**TATGA****ORF-5**.....**TGAAA**TCAC TAGTG CGGCC GCCTG CAGGT CGACC ATATG
 CCCTA**A**TACT **ACTT**TAGTG ATCAC GCCGG CGGAC GTCCA GCTGG TATAC

Spe I Not I Pst I Sal I N de I

GGAGA GCTCC CAACG CGTTG GATGC ATAGC TTGAG TATTC TATAG TGTC A CCTAA AT....3'
 CCTCT CGAGG GTTGC GCAAC CTACG TATCG AACTC ATAAG ATATC ACAGT GGATT TA....5'

Sac I BstX I

Nsi I

Promotor de SP6

Figura 16.- ORF-5 clonada en el pGEM-T. En negrilla aparecen los dos ATG presentes en el polilinker que no están en fase con el ATG iniciador de la ORF-5 (en cursiva).

En vista de ello, se procedió a eliminar los dos ATG del polilinker en los plásmidos que tenían clonados las ORFs de las cepas 4606 y 5710. Comprobado que los sitios de restricción que se iban a usar no estaban en la secuencia clonada, los ADN fueron primeramente digeridos con la enzima de restricción Sac II, comprobado el corte en un gel de agarosa al 0.8 %, precipitados y digeridos nuevamente con la enzima Apa I. Como

ambas enzimas dejan extremos 5' protuberantes, éstos fueron enromados mediante relleno con T4 DNA polimerasa, para finalmente realizar una ligación romo-romo del vector con ADN ligasa y transformar el plásmido en bacterias DH-5 competentes. Tras realizar minipreparaciones de las colonias resultantes, los clones fueron seleccionados por ausencia de corte con Nco I. Posteriormente, y antes de pasar a estudios de expresión, los plásmidos fueron secuenciados usando el cebador universal de M13 a fin de comprobar que únicamente existía el ATG de nuestra secuencia insertada entre el promotor y la misma. A este respecto se usaron cuatro clones de cada cepa observándose que si bien la cepa 4606 poseía el ATG iniciador, la 5710 lo había perdido, posiblemente debido a errores durante la síntesis del oligonucleótido. Posteriormente otro clón inicial de dicha cepa fue secuenciado y, comprobada la existencia del ATG iniciador de la ORF, sustituyó al clón antiguo.

Una vez verificada la correcta situación de la ORF-5 de la cepa 4606 del PRRSV en el plásmido, y realizada una maxipreparación de la colonia elegida, se transfectó el plásmido pGEM-T que contenía la ORF-5 de dicha cepa (pGPR-5), en células Cos-1 previamente infectadas con vTF7-3. Los extractos fueron tratados de manera similar a como se describió anteriormente. Además se incluyó un marcador de peso molecular, un testigo de macrófagos no infectados, y el virus parcialmente purificado. Como resultado del Western-Blot realizado tanto frente a un suero positivo como a un suero negativo al PRRSV, encontramos una banda que migraba a la misma altura (aproximadamente 24-25 KD) que otra existente en el semipurificado vírico y que no aparecían en el filtro donde se había utilizado el suero -. Estos resultados se pueden observar en la figura 17. En esta figura, además, se observa en el carril correspondiente al semipurificado vírico otra banda virus-específica de aproximadamente 15 KD.

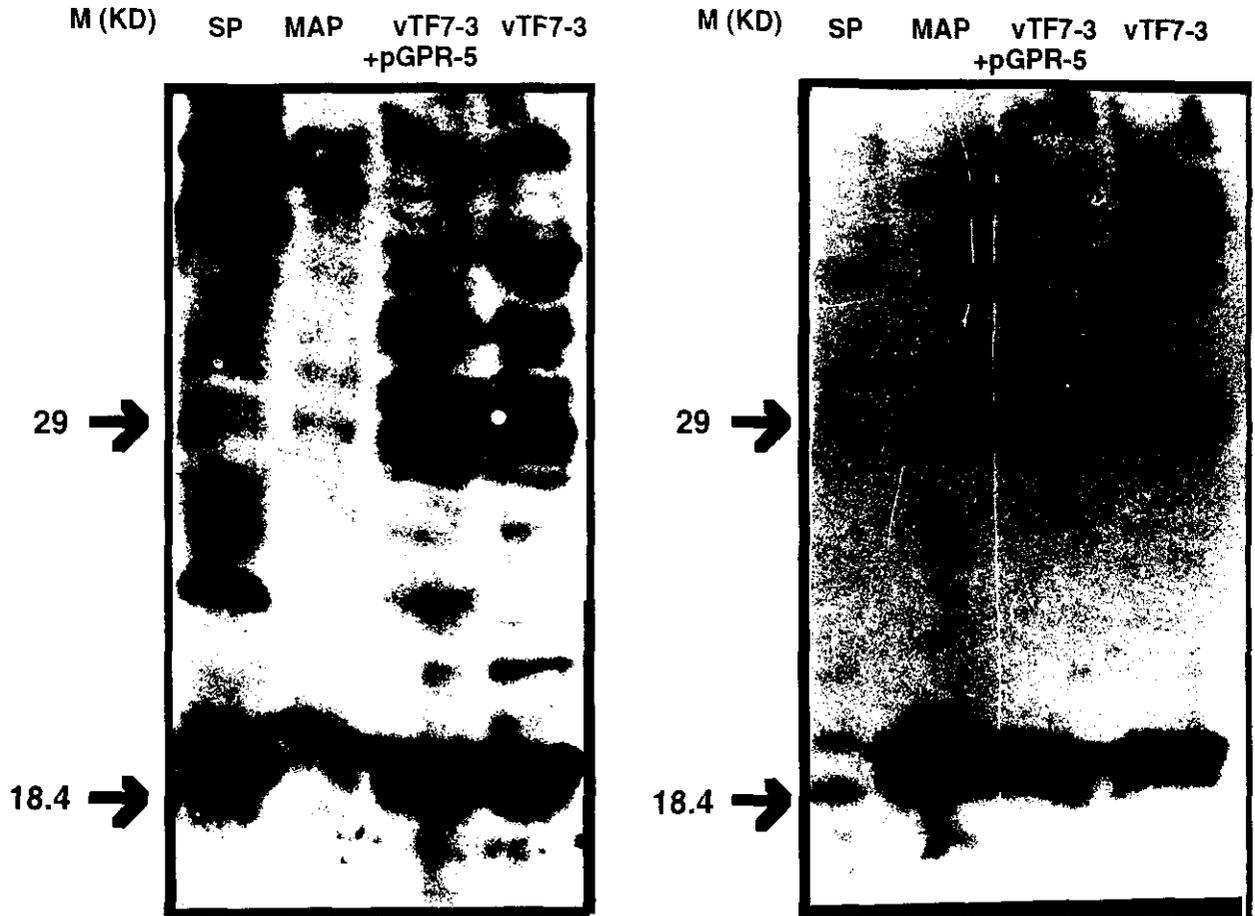


Figura 17.- Western blot frente a un suero positivo a PRRSV a la izquierda y frente a un suero negativo a la derecha. **M:** Marcador de peso molecular; **SP:** Semipurificado vírico; **MAP:** Macrófagos pulmonares porcinos no infectados; **vTF7-3 + pGPR-5:** Células Cos-1 infectadas con vTF7-3 y transfectadas con el plásmido pGEM-T con la ORF-5 de la cepa 4606 del PRRSV clonada; **vTF7-3:** Células Cos-1 infectas con vTF7-3.

2.2.2. Clonaje de las ORFs-5 en el vector pRSET-A y expresión en células Cos-1 de las proteínas codificadas por los plásmidos resultantes

Una vez comprobado que nuestra proteína se expresaba, y era reconocida por un suero positivo al PRRSV, se decidió traspasar las ORF-5 de las diferentes cepas clonadas en pGEM-T a un nuevo plásmido de expresión denominado pRSET. Mediante éste sistema, la proteína recombinante se expresa como proteína de fusión con una secuencia peptídica líder que contiene seis histidinas lo que favorece su purificación

por la afinidad de las histidinas al níquel acetonitrilo de una resina comercial (Invitrogen). Además dicho plásmido se presenta en tres versiones A, B, y C, referentes a las tres fases de lectura, lo que hace posible escoger aquel en que el inserto entra en fase con el ATG iniciador de la secuencia líder.

Con este fin, las cinco cepas clonadas inicialmente en el pGEM-T fueron digeridas mediante la enzima Pst-I, los extremos 3' protuberantes enromados con Mung-Bean, y nuevamente digeridos con Nco I, recuperándose los insertos mediante gene-clean en un gel de agarosa al 1.5 % en TAE. El pRSET que estaba en fase con la ORF-5 clonada en pGEM-T resulto ser el pRSET-A, dicho plásmido fue digerido con Hind III, enromado con el fragmento Klenow de la polimerasa y digerido con Nco I. Finalmente fue defosforilado, ligado a los diferentes insertos (ligación Nco I-romo dirigida) y se realizaron las diferentes transformaciones. A pesar de haber realizado abundantes minipreparaciones de las colonias obtenidas, no se logró ninguna positiva por lo que se realizó la selección de los clones positivos mediante hibridación en membranas de nitrocelulosa de las colonias previamente crecidas en placas de LB con ampicilina. Como sonda fue utilizado el inserto marcado con α^{32} ATP. De las colonias aparentemente positivas se realizaron minipreparaciones y fueron de nuevo seleccionadas mediante corte con las enzimas de restricción Not I-Pst I, que daban liberación del fragmento, y por presencia del nuevo sitio de restricción Bam HI, dando linearización del plásmido en algunas cepas y en otras liberación de un fragmento (cepas 5710, 5999 y 3211, con Bam HI interno). Finalmente se consiguieron clonar las ORFs-5 de las cinco cepas como se muestra en la figura 18. Los plásmidos obtenidos se denominaron pRPR-5.



Figura 18.- Clonaje de la ORF-5 del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino en los pRSET-A.

Una vez clonados los insertos de las cinco cepas en el pRSET-A, se comprobó mediante secuenciación que los insertos habían entrado correctamente en el nuevo plásmido. Tras realizar maxipreparaciones, se realizó la expresión de los mismos en células Cos-1. Los extractos fueron separados por duplicado en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 12 % transferidos a nitrocelulosa y enfrentados a un suero positivo y a un suero negativo al PRRSV. Se incluyeron además del marcador de peso molecular un testigo de células infectadas con vTF7-3, testigo de macrófagos así como de virus parcialmente purificado. Como resultado se observaron cinco bandas a la altura esperada que aparecieron en los extractos que fueron transfectados con los plásmidos con los diferentes insertos, y que no aparecían cuando se enfrentaron al suero negativo. Estos resultados se muestran en la figura 19.

Cuando se realizaron marcajes radiactivos de las células infectadas con vTF7-3 (md1 10) y transfectadas con el plásmido pRPR-5 (5 μ gr) de dos cepas, incluyendo como control células sin infectar ni transfectar y células únicamente infectadas con vTF7-3, y se inmunoprecipitaron los extractos, se observó la presencia de una banda específica a la altura esperada. Estos resultados se muestran en la figura 20.

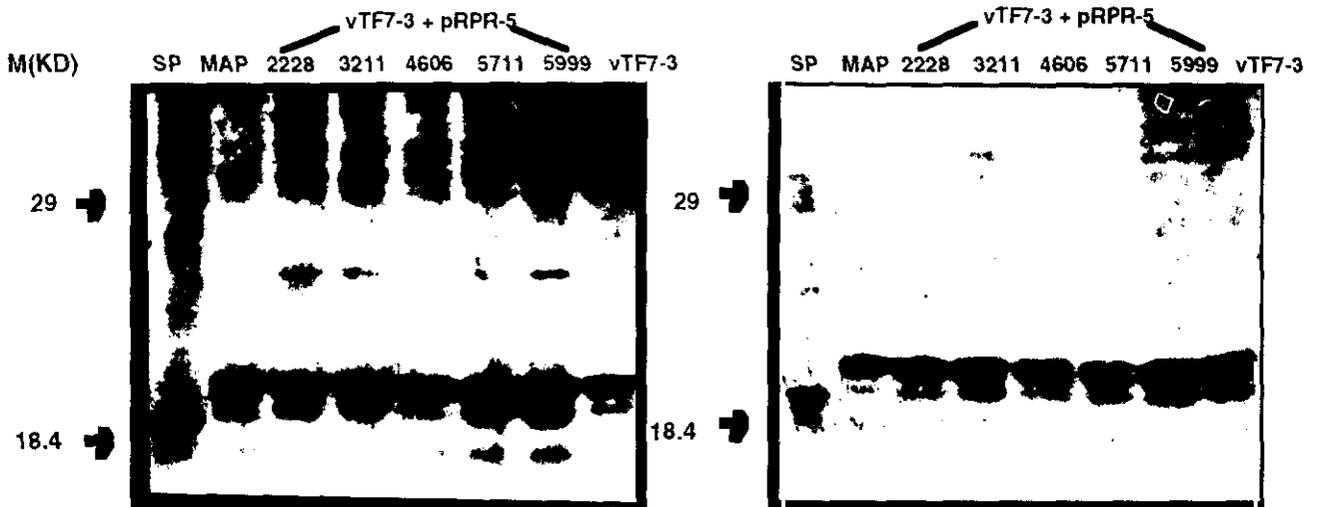


Figura 19.- Expresión en células Cos-1 de las proteínas codificadas por las ORF-5 de cinco cepas Españolas. El gel de la izquierda es el resultado de enfrentar a un suero positivo, el de la derecha a un suero negativo. **M**; marcador de peso molecular: **SP**; semipurificado vírico; **MAP**; macrófagos alveolares porcinos; **vTF7-3 + pRPR-5** (2228: 3211: 4606: 5711: 5999); Células Cos-1 infectadas con vTF7-3 y transfectadas con el plásmido pGEM-T con las ORFs-5 de diferentes aislados españoles del PRRSV clonados: **vTF7-3**; Células Cos-1 infectadas con vTF7-3.

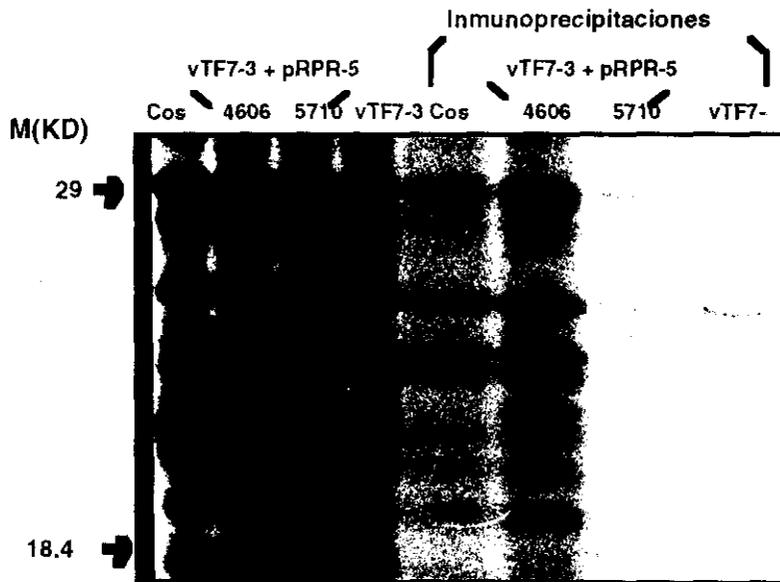


Figura 20.- Marcaje radiactivo de células Cos-1. **Cos**: Células Cos-1; **vTF7-3 + pRPR-5** (4606: 5710); Células Cos-1 infectadas con vTF7-3; y transfectadas con los plásmidos pRPR-5 de los aislados señalados; **vTF7-3**: Células Cos-1 infectadas con vTF7-3. En la izquierda de la figura se exponen las inmunoprecipitaciones correspondientes a esas muestras.

Debido a los bajos niveles de expresión obtenidos, de hecho, los intentos de visualizar dicha proteína en extractos separados en geles de poliacrilamida y teñidos por Comassie resultaron fallidos, se pensó que con el empleo de un sistema de expresión procariota se conseguiría la expresión de la proteína en cantidades superiores.

2.3. EXPRESION DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5 DEL PRRSV EN UN SISTEMA PROCARIOTA

Con este fin, fue utilizada la cepa bacteriana BL21(DE₃)plysS, que tiene la particularidad de ser deficitaria en varias proteasas por lo que algunas proteínas se pueden expresar de forma mas estable que en otras cepas que si las poseen. Además, la rifampicina puede usarse como inhibidor de la transcripción de la polimerasa del ARN del hospedador, y así reducir el nivel de síntesis proteica del mismo. También posee la T7 ARN polimerasa del fago DE3 que está bajo un promotor inducible por IPTG, de modo que al sintetizarse la misma cualquier plásmido que esté bajo promotor del bacteriófago T7 transcribirá el ADN puesto bajo su control. Al poseer el plásmido plysS se produce lisozima de gran importancia por dos razones; la lisozima es un inhibidor de la ARN polimerasa de T7, con lo que se favorecería la eliminación de los niveles basales que se producen incluso sin inducción con IPTG, de otra parte favorece la ruptura de la pared bacteriana de *E. coli* una vez rota la membrana interna (Studier y cols, 1989). La presencia de éste plásmido, por ello, aumentaría la tolerancia de plásmidos tóxicos.

Los pRPR-5, fueron transformados en bacterias BL21(DE₃)plysS competentes, sembrándose las bacterias transformadas en placas de LB con ampicilina y cloranfenicol (resistencia producida por el pLysS), tras lo cual se hicieron minipreparaciones para comprobar la existencia del plásmido. Con el fin de observar la expresión de la proteína en bacterias, 1 ml de una suspensión bacteriana en LB con ampicilina y cloranfenicol fue llevado a 10 ml, siendo crecidas a 37 °C hasta DO₆₆₀ nm de 0.6. En este

momento se tomaron 300 μ l (control de no inducido) y 2 ml fueron inducidos con 0.4 mM de IPTG. Tras dos horas de crecimiento a 37 °C se tomaron 300 μ l y junto al control de no inducido se centrifugaron y resuspendieron en 50 μ l de tampón de ruptura de proteínas. Un máximo de 10 μ l de cada muestra fueron cargados en un gel de de acrilamida-bisacrilamida al 12 %, se transfirieron y enfrentaron al suero problema. Sin embargo, no obtuvimos ninguna banda específica detectable por Western Blot enfrentado a nuestro suero problema positivo, ni tampoco por Comassie (datos no mostrados).

Al no obtener reconocimiento inmunológico de la proteína supuestamente expresada en el sistema procaríota, decidimos realizar el marcaje radiactivo de la misma a diferentes tiempos con el fin de comprobar que ésta realmente se estaba expresando. Para ello, partiendo de diferentes colonias de bacterias BL21(DE₃)plysS transformadas con el plásmido pRPR-5, incluyendo siempre como control una colonia de bacterias transformadas con plásmido sin inserto, fueron amplificadas en 5 ml de LB con ampicilina y cloranfenicol a 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 660 nm de 0,6. Alcanzada esta densidad óptica, el medio LB fue sustituido por medio M9 y tras 30 minutos de incubación a la misma temperatura se tomaron las siguientes muestras para marcaje radiactivo (capítulo 9.2 de material y métodos); T=0, no inducido: T=30 minutos, inducido con IPTG sin rifampicina: T=1 hora, inducido con rifampicina: T=2 horas, inducido con rifampicina. Finalmente, las muestras fueron separadas en un gel de de acrilamida-bisacrilamida del 12 %, fijadas en ácido acético y metanol al 10 %, y tras secado del gel éste fue expuesto durante una noche a película radiográfica. Los resultados indicaron la presencia de una banda proteica a la altura apropiada, con diferente intensidad de unas colonias a otras, que no aparecía en las muestra referente a bacterias transformadas con plásmido sin inserto como se muestra en la figura 21.

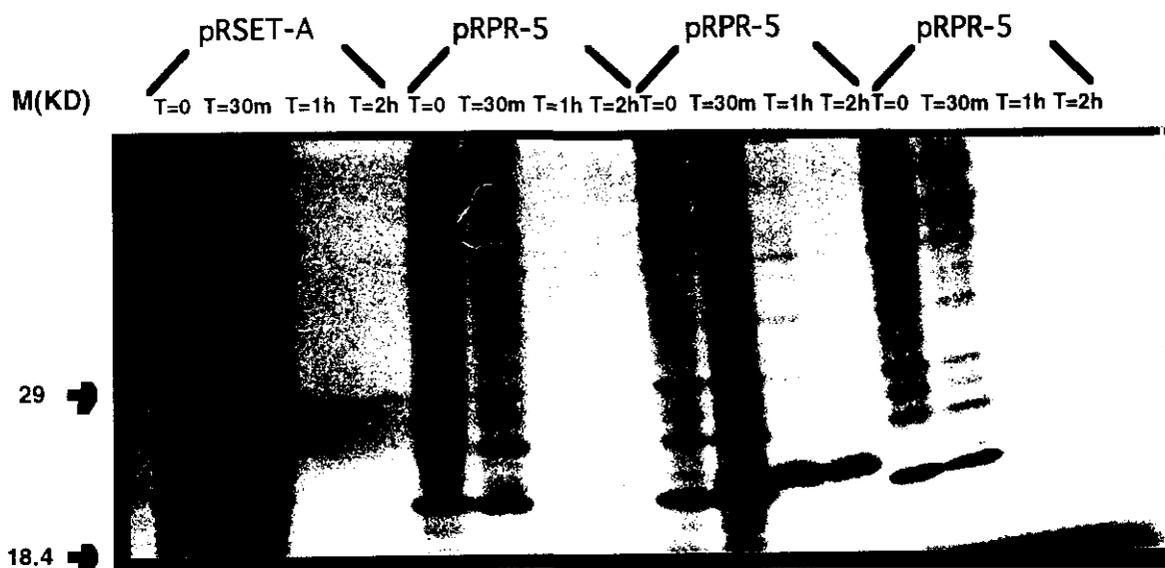


Figura 21.- Marcaje radiactivo de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRS expresada en bacterias BL21(DE₃)plysS. **pRSET-A:** muestras correspondientes a una colonia de bacterias transformadas con plásmido sin inserto; **pRPR-5:** muestras correspondientes a 3 diferentes colonias de bacterias BL21(DE₃)plysS transformadas con el plásmido pRPR-5. **T=0:** muestras no inducidas. **T=30 m:** muestras tras 30 minutos de inducción con IPTG. **T=1h** muestras tras una hora de inducción con IPTG y 30 minutos de tratarse con rifampicina. **T=2h** muestras tras dos horas de inducción con IPTG y 1,30 minutos de tratarse con rifampicina.

Si bien, en un principio el experimento se realizó a 37 °C, sin embargo observamos claramente que el tiempo necesario para llegar a la DO requerida era muy diferente en las bacterias transformadas con plásmido con inserto en relación a las transformadas con plásmido sin inserto que actuaban como control (9-10 horas de diferencia). Al disminuir la temperatura de crecimiento a 30 °C, el crecimiento de las bacterias transformadas con plásmido con inserto era ligeramente mejor, pero aun así existía una diferencia considerable en el tiempo necesario para alcanzar dicha DO con respecto a la colonia control (de 2 a 4 horas dependiendo de la colonia). Con el fin de ver si la diferencia de crecimiento se debía a una pérdida de plásmido por parte de las bacterias se hicieron siembras paralelas de diluciones de cultivos en placas de LB con y sin ampicilina, no observándose diferencias muy significativas al comparar el número de colonias observadas en ambos casos.

Cuando las muestras obtenidas del experimento anterior fueron separadas en geles procesados tanto para Comassie como para Western-Blot frente a nuestro suero control, no observamos reconocimiento detectable por parte del mismo frente a la proteína que habíamos comprobado previamente por marcaje radiactivo que se sintetizaba (datos no mostrados).

Como consecuencia del resultado obtenido, se consideró necesario diseñar un experimento para dilucidar si el suero sanguíneo no era capaz de reconocer la proteína sintetizada en bacterias o bien lo era pero a muy pequeños niveles. En este sentido, decidimos inmunoprecipitar los extractos marcados radiactivamente. Para ello, los extractos correspondientes a los tiempos 0 y 2 fueron enfrentados a una resina ligada a proteína A que había sido previamente enfrentada a una dilución 1/100 del suero positivo. Como control se usó también resina ligada a proteína A no enfrentada a suero. Los lavados de la resina unida a los anticuerpos con los extractos bacterianos se realizaron inicialmente con RIPA, no obteniéndose ninguna banda de inmunoprecipitación a la altura adecuada en geles de de acrilamida-bisacrilamida del 12 %. Sin embargo, cuando el experimento se repitió realizando los lavados en TNE + 1% NP-40 se detectó una ligera reacción de inmunoprecipitación con los extractos procedentes de una de las dos colonias de BL21(DE₃)plysS transfectadas con el plásmido pRPR-5 (figura 22). Al realizar nuevamente la técnica de Western-Blot usando el suero control positivo frente a los extractos anteriores se demostró una carencia de reconocimiento de la proteína por ese suero (datos no mostrados).

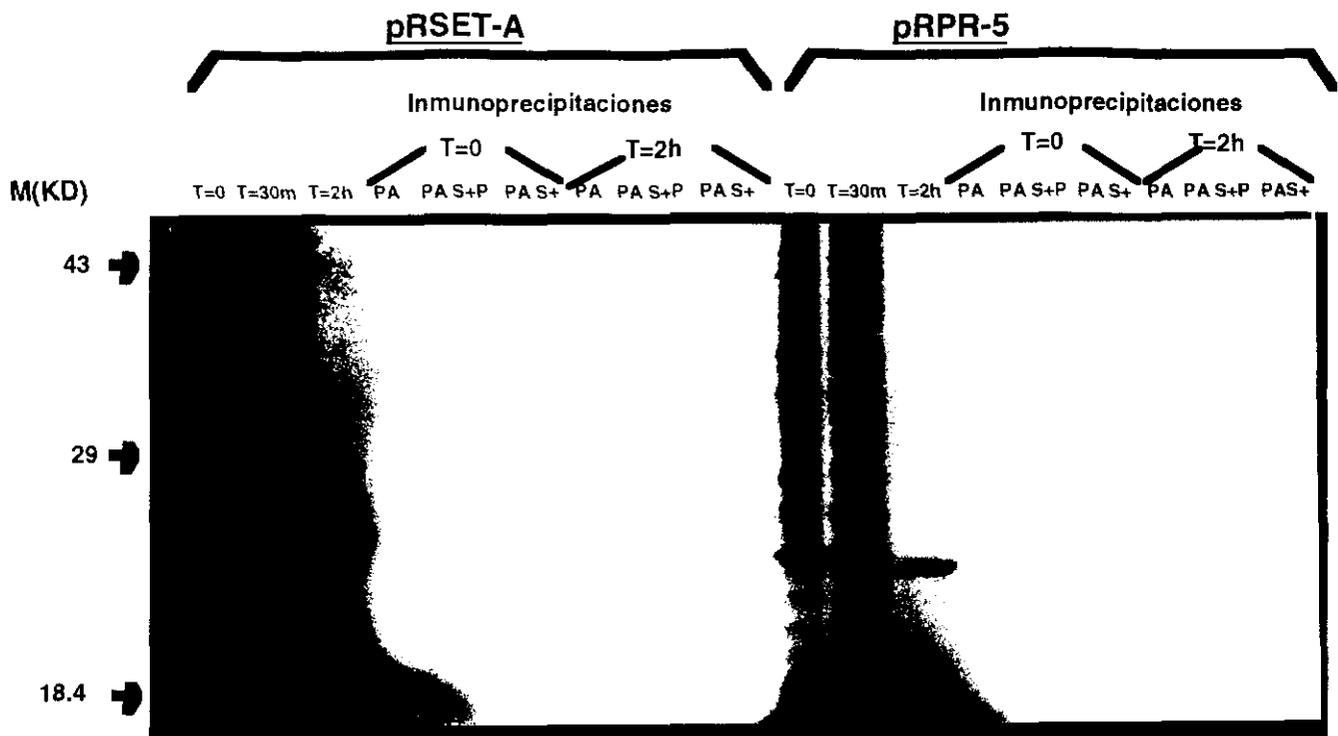
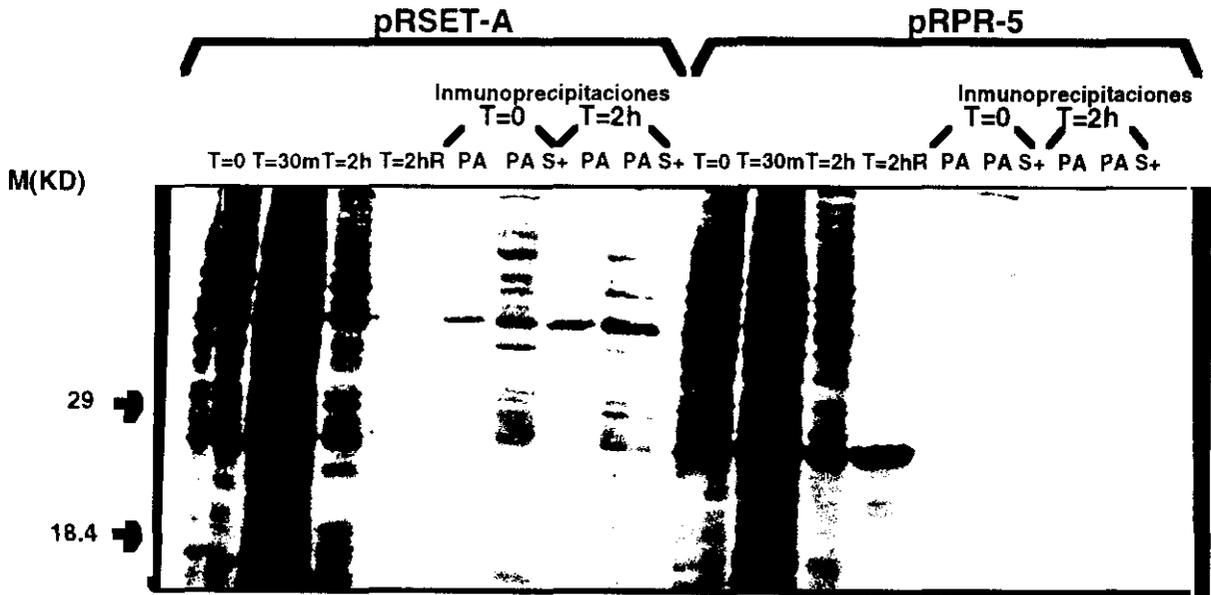


Figura 22.- Marcaje radiactivo de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRS expresada en bacterias BL21(DE₃)plysS e inmunoprecipitación de los extractos. **pRSET-A**: extractos correspondientes a una colonia bacteriana transformada con plásmido sin inserto; **pRPR-5**: extractos correspondientes a una colonia bacteriana transformada con plásmido pRPR-5. **T=0**: muestras no inducidas. **T=30 m**: muestras tras 30 minutos de inducción con IPTG. **T=2h** muestras tras dos horas de inducción con IPTG y 1,30 minutos de tratarse con rifampicina. **PA**: Inmunoprecipitaciones con proteína A sin ligar al suero control; **PA S+P**: Inmunoprecipitaciones con proteína A ligada a suero control preadsorbido a macrófagos alveolares porcinos; **PA S+**: Inmunoprecipitaciones con proteína A ligada a suero control no preadsorbido.

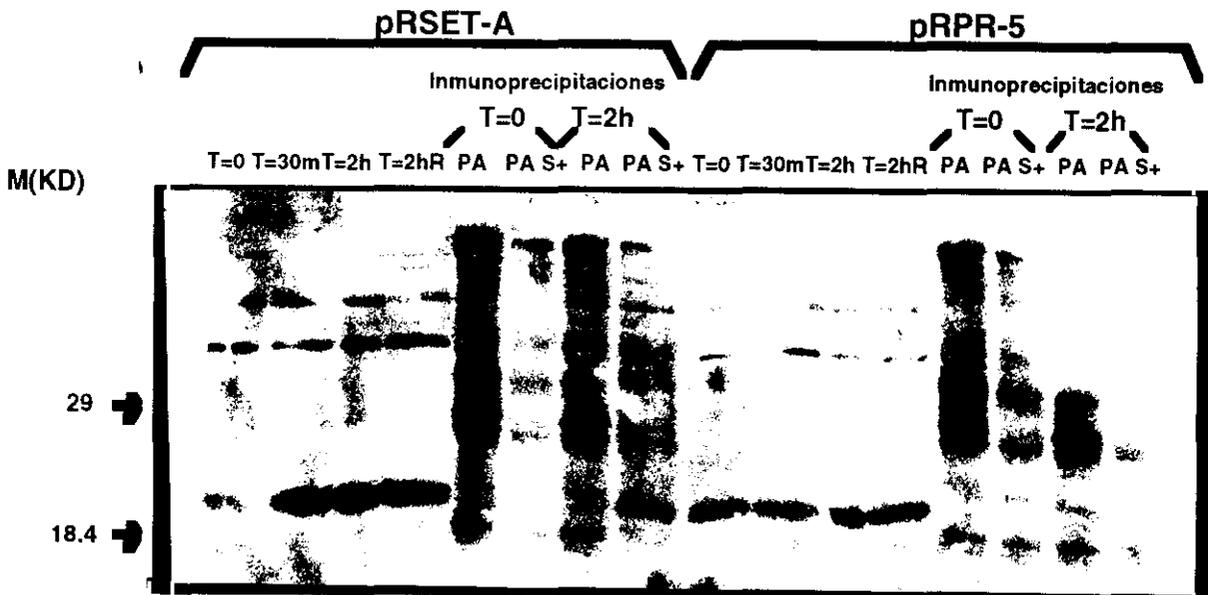
Los resultados anteriores mostraban que la proteína si bien era susceptible de ser inmunoprecipitada, lo era de forma muy poco eficiente. Por todo ello especulamos que quizás la proteína previamente inmunoprecipitada si fuera capaz de ser reconocida por el suero en Western-Blot. Finalmente decidimos repetir el experimento de toma de tiempos e inmunoprecipitaciones, separar las muestras en un gel de de acrilamida-bisacrilamida en gradiente del 12 al 20 %, transferir las muestras a nitrocelulosa y, el mismo filtro, tratarlo paralelamente

Resultados

primero exponiéndolo a radiografía y con posterioridad realizar sobre él un Western-Blot. Los resultados demuestran el reconocimiento de la proteína por Western-Blot, aunque a niveles muy bajos como se puede observar en las figuras 23 y 24.



(figura 23)



(figura 24)

Figuras 23 y 24.-Marcaje radiactivo de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRS expresada en bacterias BL21(DE₃)plysS e inmunoprecipitación de los extractos. **pRSET-A:** extractos correspondientes a una colonia bacteriana transformada con plásmido sin inserto; **pRPR-5:** extractos correspondientes a una colonia bacteriana transformada con plásmido pRPR-5. **T=0:** muestras no inducidas. **T=30 m:** muestras tras 30 minutos de inducción con IPTG. **T=2h:** muestras tras 2 horas de inducción con IPTG. **T=2hR** muestras tras dos horas de inducción con IPTG y 1,30 minutos de tratarse con rifampicina. **PA:** Inmunoprecipitaciones con proteína A sin ligar al suero control; **PA S+:** Inmunoprecipitaciones con proteína A ligada a suero control preadsorbido a macrófagos alveolares porcinos. La figura 24 muestra el Western-blot correspondiente a los extractos indicados en la figura 23.

2.4. MEJORA DE LAS CONDICIONES DE EXPRESION DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5 DEL PRRSV EN UN SISTEMA EUCARIOTA

Basado en lo que anteriormente se ha expuesto, el escaso o nulo reconocimiento de la proteína expresada en bacterias por nuestro suero control positivo, el que la proteína nunca fuera visualizada en Comassie, es decir, su bajo nivel de expresión, así como las evidencias de su toxicidad en bacterias, decidimos volver a sistemas de expresión eucariotas tratando de mejorarlos para incrementar el nivel de expresión.

2.4.1. Mutagénesis dirigida del pRSET-A

En este sentido, como el plasmido utilizado, el pRSET-A, es un vector diseñado para expresión en procariontes, con el fin de adecuarlo a sistemas eucariotas decidimos mutarlo para cambiar el sitio de reconocimiento de los ribosomas y hacerlo mas idóneo para su expresión en células eucarióticas. A este respecto, tomando como referencia el trabajo de Kozak (Kozak y cols, 1987) en el que estadísticamente obtiene las secuencias más consenso en eucariotas, diseñamos un cebador en el que su incorporación determinaría mutaciones en la secuencia del pRSET-A. Estas mutaciones se pueden observar en la figura 25.

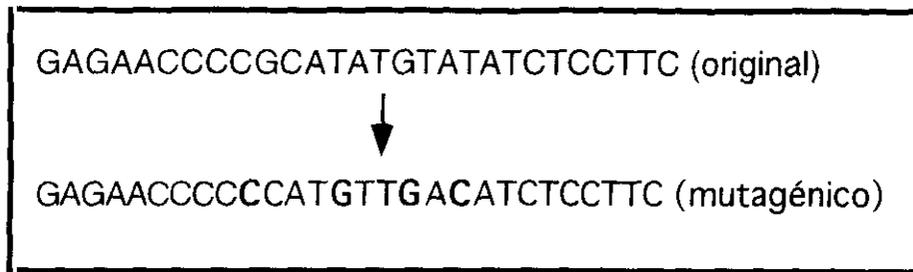


Figura 25.- Cambios de bases incorporados al pRSET-A con el fin de hacerlo más adecuado a un sistema eucariota.

La mutagénesis se realizó tal y como se describió en el esquema ya descrito en material y métodos (capítulo 10.2), con la salvedad de que la cantidad de plásmido mutagénico fue 10 veces más que la sugerida por la casa comercial (1 µgr en lugar de los 100 ngr sugeridos). Tras realizar la selección, secuenciamos los clones aparentemente positivos, obteniendo finalmente uno en el que la secuencia mutagenizada fue comprobada por secuenciación manual. Los resultados se muestran en la figura 26.

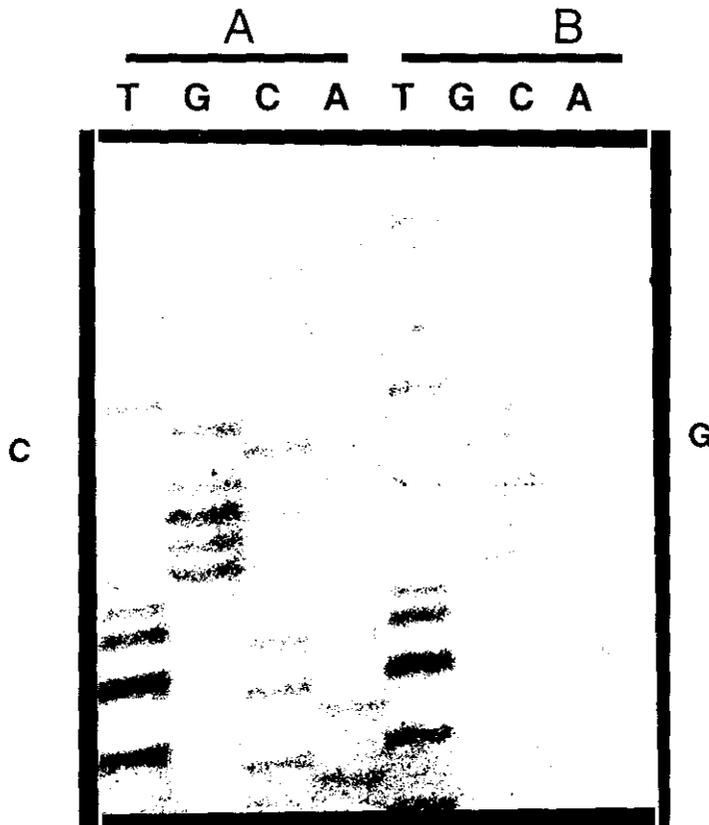


Figura 26.-Mutagénesis dirigida del plásmido pRSET-A. **A:** Clón negativo. **B:** Clón positivo.

Una vez escogido el clón positivo, clonamos el inserto de la cepa 5710 del pRSET-A original al nuevo pRSET modificado para eucariotas. Para ello el pRPR-5 fue digerido con la enzima de restricción Not I, enromado el extremo con el fragmento Klenow de la polimerasa y redigerido con la enzima Xho I. Los insertos aislados recobrados de un gel al 1.5 % en TAE. El pRSET mutado a eucariota fue digerido con la enzima Eco RI, rellenado el extremo con el fragmento Klenow de la polimerasa, redigerido con la enzima Xho I, defosforilado con fosfatasa alcalina, y finalmente el inserto fue incorporado al nuevo vector modificado mediante ligación Xho I-romo. Tras la transformación en bacterias DH-5 competentes, las colonias positivas fueron seleccionadas por hibridación con un cebador marcado radiactivamente. El plásmido así obtenido se denominó pRPR-5mt.

Tras realizar una maxipreparación del clón positivo, se llevó a cabo la expresión de la secuencia clonada en células Cos-1 con el fin de ver si los niveles de expresión obtenidos con el nuevo plásmido eran superiores a los obtenidos con el plásmido no mutado. Como controles se emplearon dos dosis de cada plásmido (62 ngr y 1 μ gr), incluyendo la cepa 5710 clonada en el pRSET original de la ORF-5 (pPPR-5). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27. En esta figura se puede observar la falta de un aumento significativo en la expresión de la proteína con el empleo del plásmido modificado con respecto al original. Igualmente, no se observaron bandas específicas por tinción con azul de Comassie (dato no mostrado).

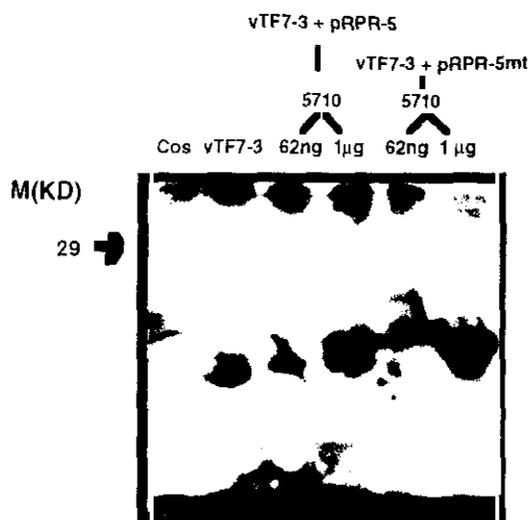


Figura 27.- A.- Western-blot de la expresión en células Cos-1 del pRSET-A mutagenizado con el fin de hacerlo más idóneo a células eucariotas. **M:** marcador de peso molecular; **Cos:** Testigo de células Cos-1; **vTF7-3:** Células Cos-1 infectadas con vTF7-3 a mdi 10; **vTF7-3 + pRPR-5:** Células Cos-1 infectadas con vTF7-3 a mdi 10 y transfectadas con el plásmido pRPR-5 de la cepa 5710 a concentración de 62 ngr o 1µg; **vTF7-3 + pRPR-5mt:** Células Cos-1 infectadas con vTF7-3 a mdi 10 y transfectadas con el plásmido pRPR-5 de la cepa 5710 mutagenizado con la secuencia de Kozak a concentración de 62 ngr o 1µg.

2.4.2. Clonaje de la ORF-5 del PRRSV en el plasmido pTM-1 y síntesis de un virus vacuna recombinante (VV-PR5)

En un nuevo intento de aumentar los niveles de expresión en eucariotas decidimos clonar la ORF-5 correspondiente a la cepa 5999 del pRPR-5, incluido el "tag" de histidinas, en un nuevo vector plasmídico, el pTM-1. Dicho vector permite el clonaje bajo promotor del bacteriófago T7, ya que posee la región no traducible del virus de la encefalomiocarditis haciendo posible la unión a ribosomas independiente de cap (Elroy-Stain y cols,1989). Este vector, además incluye las zonas de recombinación homóloga con el virus vacuna. Esto permitió la realización de un virus vacuna recombinante para poder expresar la proteína de fusión en sistemas de doble infección con vTF7-3. Para posibilitar el clonaje en la fase correcta de la ORF-5 de la cepa 5999, tuvimos que previamente modificar el polilinker de dicho plásmido, así el fragmento Eco RI-Pst I del pTM-1 se cambió por el Eco RI-Pst I del polilinker del pGEM-3 (figura 28).

El pTM-1 modificado fue digerido entonces con la enzima de restricción Sma I que produce extremos romos, y la ORF-5 de la cepa señalada fue liberada del pRSET-A mediante digestión con Nde I y Spe I. Tras enromar con el fragmento Klenow de la polimerasa, el inserto, incluyendo la cola de histidinas fue ligado romo-romo. La correcta orientación de los insertos se verificó por restricción y expresión en células Cos-1, observándose un aumento en la misma con respecto a la obtenida en el pRPR-5. El plásmido obtenido se denominó pTPR-5.

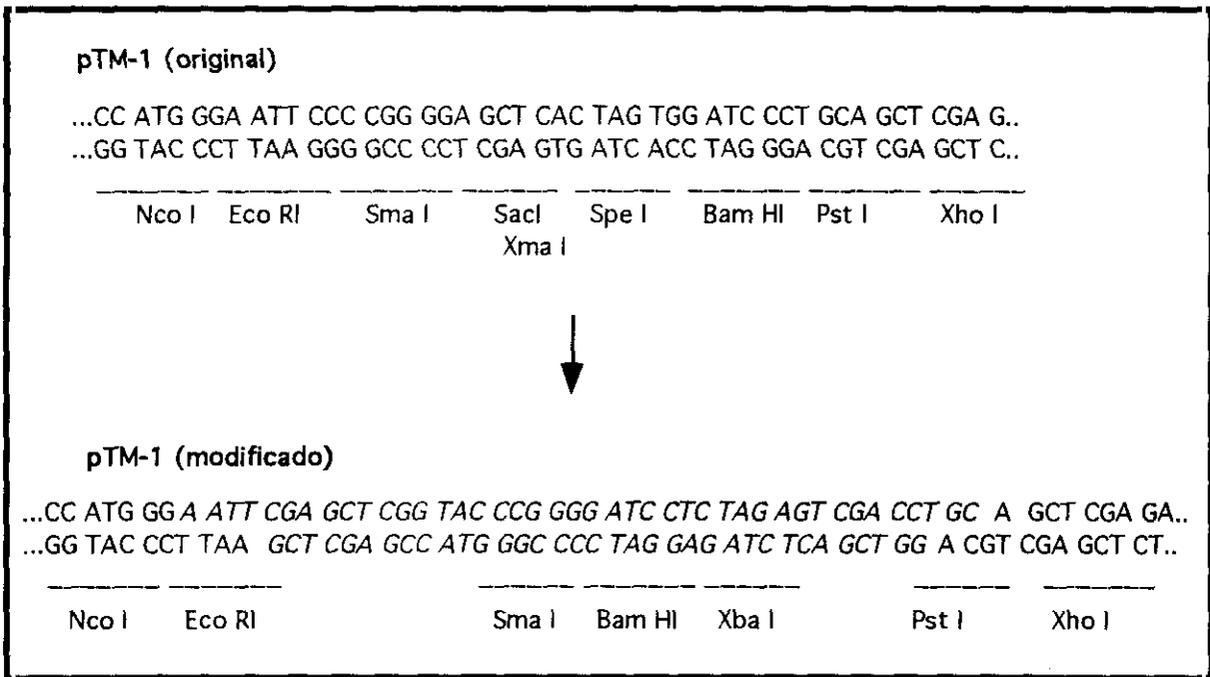


Figura 28.- Modificación del polilinker original del pTM-1, con el fin de posibilitar el clonaje en fase de nuestro inserto. En cursiva se indica la secuencia extraída del pGEM-3.

La síntesis del virus vacuna recombinante se realizó según procedimiento ya descrito en material y métodos (capítulo 11) y como se muestran esquemáticamente en la figura 29. Finalmente se obtuvieron un total de 6 clones víricos. Los extractos celulares obtenidos en células Cos-1 tras dobles infecciones vTF7-3 y cada uno de los recombinantes fueron testados tanto por Dot-Blot (dato no mostrado), como por Western-blot frente al suero de un cerdo positivo al PRRSV. Los resultados se muestran en la figura 30. En ésta se puede observar que todos los clones

fueron positivos. Los experimentos sucesivos se realizaron con el clón número 5.

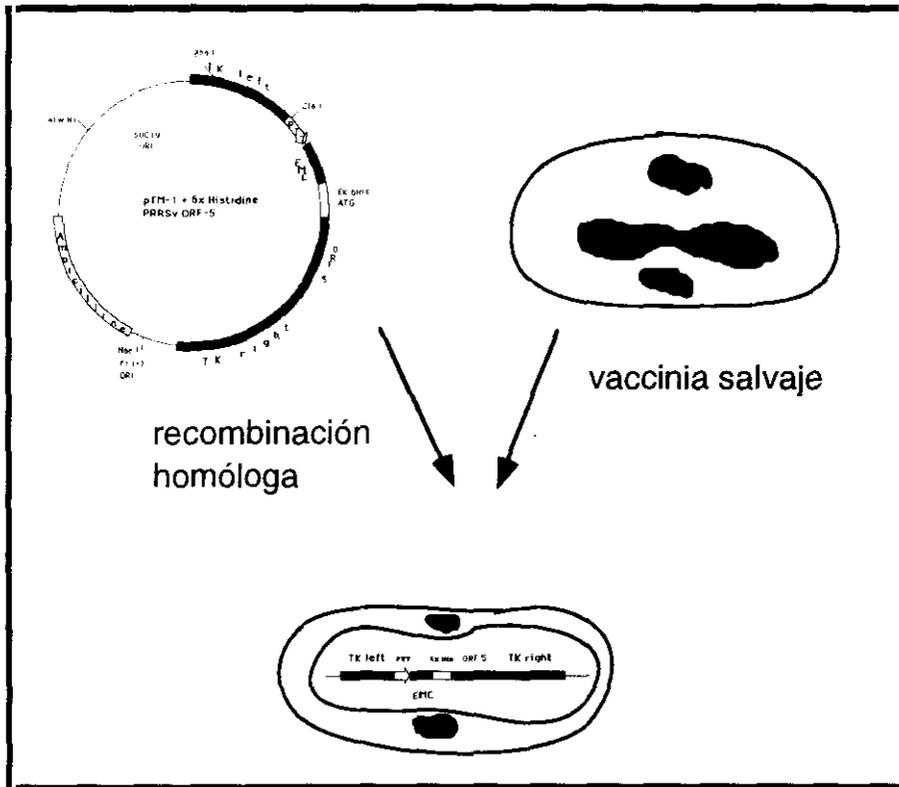


Figura 29.- Síntesis del virus vacuna recombinante VV-PR5. Esquemáticamente la ORF-5 del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino expresada como proteína de fusión con un "tag" de histidinas procedente del vector plasmídico pRSET fue clonada en un nuevo vector, el pTM-1, que contiene las zonas de recombinación homóloga del gen de la timidin kinasa del virus vacuna. Posteriormente, tras enfrentarse al virus vacuna salvaje y recombinarse se obtuvieron virus vacuna recombinantes.

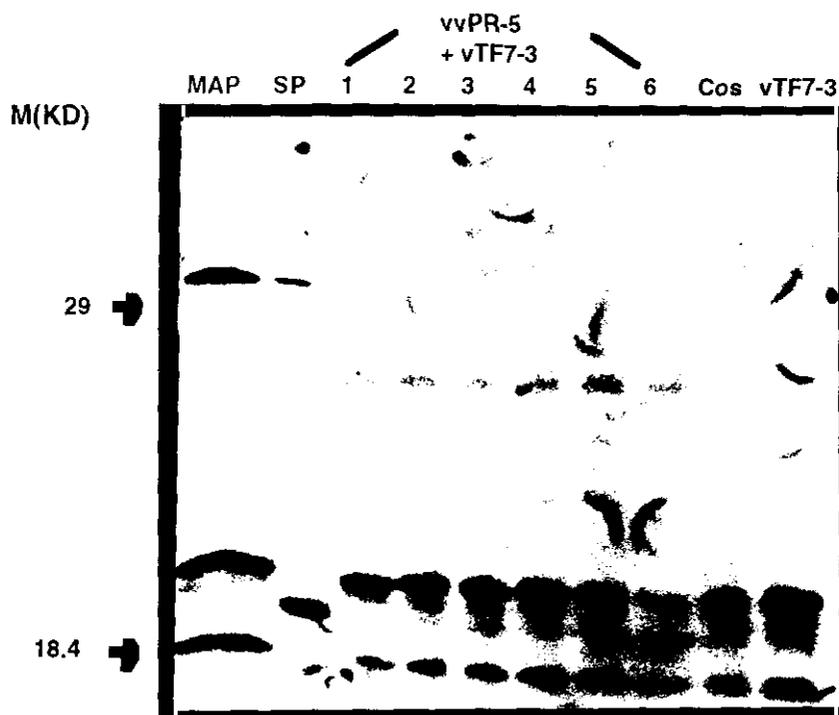


Figura 30.- Western-blot con un suero positivo al PRRSV frente a extractos celulares tras dobles infecciones vTF7-3/virus vacuna recombinante expresando la ORF-5 del PRRSV en células Cos-1. **M:** marcador de peso molecular; **MAP:** macrófagos alveolares porcinos no infectados; **SP:** semipurificado del PRRSV; **1-6:** Dobles infecciones vTF7-3 + VV-PR5; **Cos:** Testigo de células Cos-1; **vTF7-3:** células Cos-1 infectadas con vTF7-3.

2.5. INDUCCION DE APOPTOSIS POR LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5 DEL PRRSV

El hecho de que en cultivos doblemente infectados con vTF7-3 y VV-PR5 se observaran abundantes células muertas en el sobrenadante cuando se comparaban a cultivos únicamente infectados con vTF7-3, nos hizo especular que quizás la expresión de la proteína tenía un efecto letal también en cultivos de células eucariotas como ya había sido comprobado anteriormente tras la expresión de la proteína en bacterias (capítulo 2.3 de resultados). En este sentido, decidimos estudiar con más profundidad el proceso, y ver si dicha muerte se debía a muerte celular por un proceso de apoptosis. Para ello se seleccionaron tres marcadores a fin de evaluar la posible existencia de apoptosis ligada a la expresión de la proteína E del PRRSV; degradación de ADN cromosómico con fragmentación

internucleosomal (Skalka y cols, 1976), alteración en la morfología nuclear con condensación cromatínica (Clarke, 1990) y la recientemente descrita degradación del ARN ribosómico asociada al proceso (Houge y cols, 1995).

2.5.1. Inducción de muerte celular programada por la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV

Inicialmente trabajamos con la línea celular BSC-40 y para ello, placas p100 confluentes se inocularon, bien con el virus vTF7-3 a mdi 10, o se coinfectaron con ambos recombinantes (vTF7-3 y VV-PR5) ambos a mdi 5. Los extractos celulares fueron recogidos a las 12, 24, 36 y 48 horas pi procesándose según se ha descrito en materiales y métodos (capítulo 12). Al microscopio óptico invertido se observó que a partir de las 20 horas pi, el número de células en el sobrenadante de los cultivos era mayor en las coinfecciones que en aquellos cultivos infectados exclusivamente con vTF7-3, hecho que se hizo mas dramático a tiempos posteriores. Los resultados del análisis del ADN cromosómico, ARN ribosómico y morfología nuclear tras tinción con Hoechst se muestran en la figura 31. En ésta se puede observar que a partir de las 24 horas se producía la degradación del ADN cromosómico en forma de escalera típico del fenómeno de apoptosis (figura 31-A). Paralelamente, el ARN se degradaba en principio en fragmentos concretos que según avanzaba la infección acababan por desaparecer (figura 31-B).

Por tinción nuclear con Hoechst se observó condensación de la cromatina nuclear (figura 31-D). Dichos efectos no se detectaron al analizar los cultivos infectados unicamente con el virus vTF7-3. Con el fin de comprobar la expresión de la proteína en cuestión, también se hicieron Western-blot de los extractos enfrentándolos a un anticuerpo monoclonal que reconoce un péptido próximo a la cola de histidinas en la proteína de fusión sintetizada (Kroll y cols, 1993). Previamente se comprobó que tanto el monoclonal anteriormente mencionado, como el suero control positivo que hemos venido utilizando a lo largo de nuestros experimentos reconocían la misma proteína (datos no mostrados). Los resultados

muestran que no se producía un incremento en la acumulación de la proteína según transcurría el tiempo pi (figura 31-C).



Figura 31.- Inducción de apoptosis por la proteína E del PRRSV en células BSC-40. **a:** extractos celulares procedentes de cultivos infectados con vTF7-3 a mdi 10. **b:** extractos celulares procedentes de cultivos infectados con vTF7-3 y VV-PR5 ambos a mdi 5. **A:** ADN cromosómico. **B:** ARN ribosómico. **C:** Western-Blot. **D:** Hoechst.

Una vez comprobado que la proteína E del PRRSV era capaz de producir apoptosis en células BSC-40, decidimos estudiar si este efecto era o no exclusivo de esta línea celular, así como si era reversible por el proto-oncogén *bcl-2*. En este sentido, disponíamos en el laboratorio de la línea celular N2A de origen neural, así como la misma línea pero que establemente expresaba el proto-oncogén *bcl-2* humano como se verificó mediante Western-Blot con un anticuerpo monoclonal que reconocía dicha proteína (figura 32-A). Nuevamente se repitió el experimento anterior por paralelo en ambas líneas celulares, N2A y N2A que expresaba el proto-oncogén *bcl-2*, a las multiplicidades anteriormente señaladas. Se tomaron muestras a las 6, 9, 12, y 24 horas pi, ya que habíamos observado que al

microscopio óptico el efecto era mucho más temprano que en la línea celular BSC-40. A partir de la novena hora pi se empezó a observar la degradación del ADN (figura 32-B) que era mucho más intensa en la 12 hora pi. Tampoco se observó un incremento significativo en la acumulación de la proteína con el tiempo por análisis en Western-Blot (figura 32-C). De nuevo, la tinción nuclear por Hoechst mostró la típica condensación nuclear (figura 32-D). Los mismos efectos se observaron en la línea celular N2A que expresaba constitutivamente el gen del bcl-2 humano.

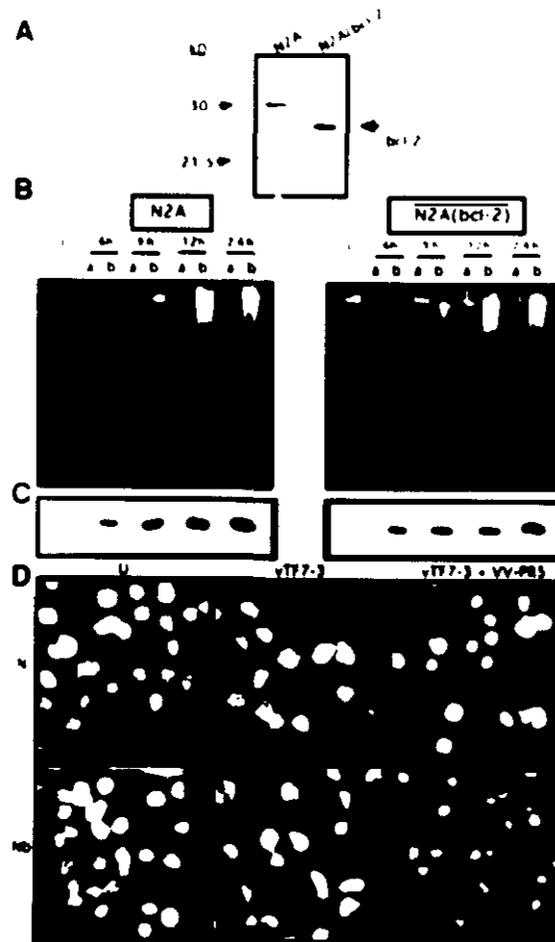


Figura 32.- Inducción de apoptosis por la proteína E del PRRSV en células N2A y no reversión de la misma en células N2A que establemente expresan el proto-oncogén bcl-2. **a:** extractos celulares procedentes de cultivos infectados con vTF7-3 a mdi 10. **b:** extractos celulares procedentes de cultivos infectados con vTF7-3 y VV-PR5 ambos a mdi 5. **A:** Reconocimiento de la proteína bcl-2 por Western-Blot con un anticuerpo monoclonal anti-bcl-2. **B:** ADN cromosómico. **C:** Western-Blot frente a los extractos anteriores. **D:** Hoechst.

2.5.2. Inducción de apoptosis por el PRRSV

Una vez comprobada la inducción de apoptosis por la proteína E del PRRSV en líneas celulares de diferentes orígenes, nos propusimos estudiar si el virus "per se" era capaz de producir este efecto. Para ello, cultivos celulares confluentes de células MA-104 fueron inoculados con una dosis vírica de 10^3 DI₅₀CT de la cepa 5710, dejando como controles negativos células no infectadas que se procesaron por paralelo. Se tomaron las muestras los días 1, 2, 4, y 5, donde el efecto citopático ya era evidente. Si bien al cuarto día pi se empezaba a intuir la degradación del ADN cromosómico, el día quinto ésta era mucho mayor, con la formación de los fragmentos internucleosomales típicos como se puede observar en la figura 33-A. Igualmente el ARN ribosómico aparecía ya intensamente degradado el cuarto día pi (figura 33-B).



Figura 33.- Inducción de apoptosis por el PRRSV en células MA-104. **U:** extractos celulares procedentes de células MA-104 no inoculadas con el virus. **I:** extractos celulares procedentes de células MA-104 inoculados con el PRRSV. **A:** ADN cromosómico. **B:** ARN ribosómico. **C:** Hoechst.

El resultado anterior indicaba, por tanto, que el PRRSV era capaz de inducir apoptosis en la línea celular MA-104. Para finalizar el estudio quisimos comprobar si el virus también podría causar apoptosis en la célula diana de su multiplicación *"in vivo"*; el macrófago alveolar. Para ello, cultivos primarios de MAP fueron inoculados con $2,3 \times 10^6$ DI₅₀CT de la misma cepa vírica usada en el experimento anterior. Paralelamente se procesaron para extracción de ADN cromosómico cultivos no inoculados a tiempos 24 y 28 horas pi. Los resultados que de muestran que el PRRSV induce apoptosis en MAP se muestran en la figura 34.

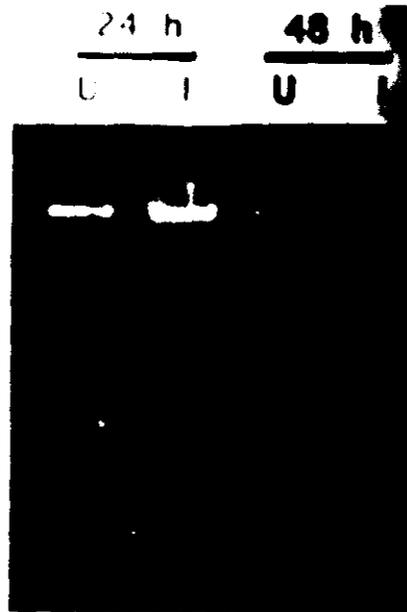


Figura 34.- Inducción de apoptosis por el PRRSV en cultivos primarios de MAP. U: extractos celulares procedentes de MAP no inoculados con el virus. I: extractos celulares procedentes de MAP inoculados con el PRRSV.

2.6. PURIFICACION DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5 DEL PRRSV

El que la proteína sintetizada fuera portadora del "tag" de histidinas, hace posible la purificación de la misma mediante unión a una resina que contiene níquel-acetonitrilo por el que las mismas tiene afinidad como ya se ha reseñado. En este sentido, se decidió intentar la purificación de la proteína E del PRRSV.

En este sentido, realizamos coinfección vTF7-3 y VV-PR5 en células Cos-1. Como control negativo se emplearon células únicamente infectadas con vTF7-3. Los extractos se lavaron en PBS recogándose una pequeña fracción (fracción denominada totales). El resto se resuspendió en tampón de lisis (50mM Tris HCl pH 8; 50 mM ClNa; 5mM Cl₂ Mg; 10 % glicerol; 0.1 % NP40; 20 mM imidazol) y tras congelar/descongelar 3 veces, el precipitado se desechó (fracción de precipitado). El sobrenadante, (fracción denominada sobrenadante totales) se mezcló con la resina, previamente equilibrada en el tampón de lisis, adsorbiéndose toda la noche en cámara fría en un tubo eppendorff. Tras centrifugar la muestra a 1000 xg durante 2 minutos, el sobrenadante fue eliminado (fracción no adherida), realizándose varios lavados de la resina con posterioridad. Finalmente, todas las fracciones, incluida la resina final, fueron cargados en un gel de proteínas al 12% y analizados por Western-Blot frente al suero control positivo. Sorprendentemente la proteína únicamente era detectada en las fracciones de totales, sobrenadante totales y no adherido, no así en los diferentes lavados ni en la resina, lo que parecía indicar que por alguna razón no se unía a la misma.

Debido a lo anteriormente expuesto modificamos el tampón de lisis aumentando al 1 % el porcentaje de NP-40 y eliminando totalmente el imidazol. Sin embargo, no conseguimos que la proteína se adheriera a la misma.

Se especuló entonces que quizás la conformación que presentaba la proteína fuese tal que la cola de histidinas permaneciese escondida, por lo que decidimos desnaturalizar parcialmente la misma con el fin de que esta se expusiese al exterior. Por ello, y siguiendo las recomendaciones dadas por la casa comercial suministradora, decidimos probar que ocurría cuando en el tampón de lisis se añadía hidrocloreuro de guanidina. En este sentido repetimos el experimento con una concentración final 4M de hidrocloreuro de guanidina en el tampón de lisis, y la unión en vez de a 4 °C, a temperatura ambiente durante dos horas. Como resultado obtuvimos que la proteína en esta ocasión sí que se adhería a la resina e intensamente, de modo que una parte quedaba retenida en ella y otra se eliminaba en los primeros lavados con un nuevo tampón de lavado (20mM fosfato pH 7,8: 500mM NaCl: 8M urea).

Ante los resultados obtenidos, decidimos realizar modificaciones tanto en el tampón de lisis como en el de lavado para fijar las condiciones más idóneas. Como nuestro objetivo principal era obtener una proteína con la mínima alteración de su conformación, se decidió determinar cuál era la concentración mínima de hidrocloreuro de guanidina que debía ser incorporada al tampón de lisis para que la misma se adheriera a la resina. En este sentido se hicieron pruebas añadiendo a diferentes extractos celulares doblemente infectados (vTF7-3/VV-PR5) tampones de lisis con concentraciones crecientes de hidrocloreuro de guanidina, concretamente 0.5M: 1M: 2M: 3M: 4M, así como un extracto que se resuspendió en tampón de lisis sin guanidina. Los lavados se hicieron en el tampón anteriormente señalado pero eliminando la urea e incorporando imidazol a concentración 20 mM. Como resultado final se obtuvo que cuando la unión se realiza sin guanidina, la proteína no se adhería y por tanto no aparecía en la resina. Por el contrario, en las muestras que contenían guanidina a concentración 1M la proteína aparecía intensamente adherida a la resina, excepto una cierta porción que se eliminaba con los lavados. Por ello decidimos realizar en experimentos posteriores siempre la unión en un tampón con 1 M hidrocloreuro de guanidina.

Otro punto a considerar, fueron las condiciones de tratamiento de la columna, en concreto el pH, las concentraciones de urea, y las concentraciones de imidazol. Así, tras unir la proteína en un tampón de lisis con hidrocloreuro de guanidina, la muestra fue dividida en tres partes cada una de las cuales se trató con una de las variables señalada. En el caso del pH, los lavados se realizaron en el tampón de lavado con 500mM NaCl, variando el pH del tampón fosfato 20mM; tras tres lavados con pH 7,8, se realizaron nuevos lavados con pH 6 y pH 4,3. Con respecto a la urea, los lavados se realizaron con el tampón de lavado base (20mM fosfato pH 7,8: 500mM NaCl) al que se le añadieron cantidades crecientes de urea. Así, tras dos lavados sin urea se realizaron lavados por duplicado con concentraciones 2M: 4M: 6M y 8M. Por último los lavados de la muestra tratada con diferentes concentraciones de imidazol se realizaron primero con el tampón de lavado base sin imidazol y posteriormente, con 20 mM: 200 mM: 500 mM: y 700 mM imidazol. Aunque la proteína se detectaba por Western-Blot en mayor proporción en los lavados realizados a pH 4, 6M urea y 500 mM imidazol, la mayor parte de la proteína seguía permaneciendo retenida en la resina.

Ante todo lo expuesto, y como el tener la proteína unida a la resina no era un inconveniente para conseguir la inmunización de animales, decidimos ajustar las condiciones para obtener la máxima cantidad de la misma adherida a dicho soporte. En este sentido, como de todas las variables anteriormente señaladas el imidazol era la menos nociva para la proteína, se decidió realizar los lavados utilizando cantidades crecientes de imidazol. Finalmente, la unión a la resina de los extractos celulares obtenidos en células Cos-1 se hizo con el tampón compuesto por 50mM Tris HCl pH 8; 50 mM ClNa; 5mM Cl₂ Mg; 10 % glicerol; 1 % NP40; 10 mM imidazol: 1 M hidrocloreuro de guanidina, y lavados primero con el tampón base a 20 mM imidazol y luego a 1 M imidazol y 2 M imidazol. Como resultado se obtuvo la presencia de la proteína pegada a la resina que se detectó tanto por Western-Blot como por Coomassie (figura 35).

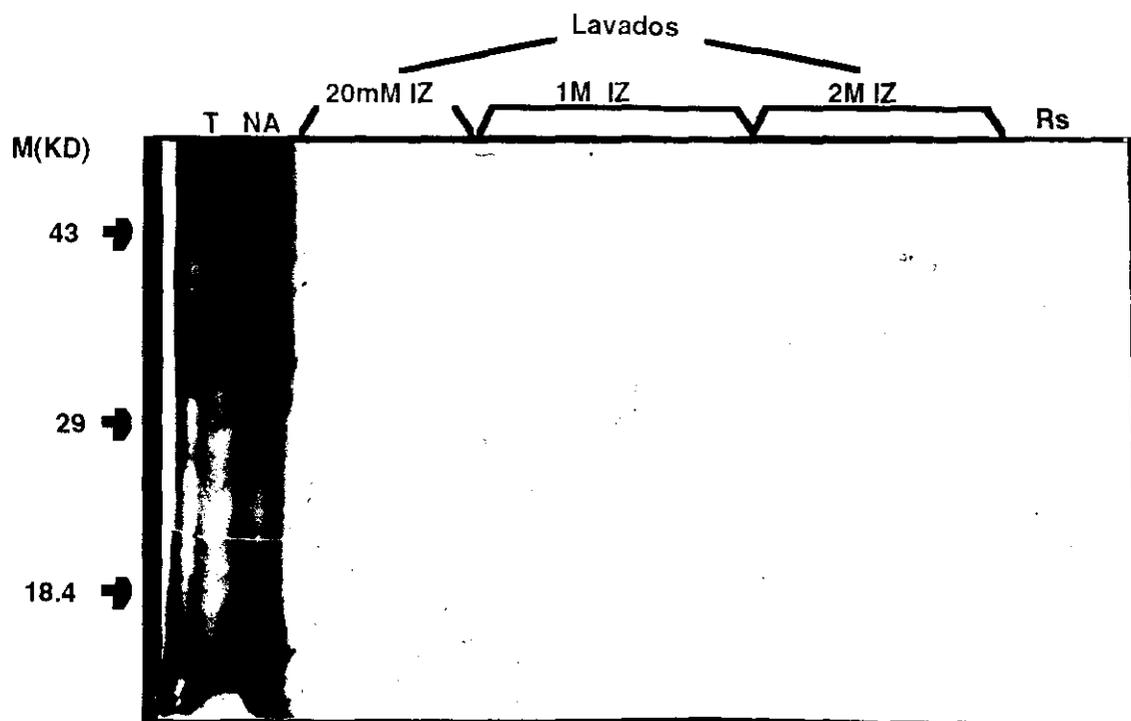


Figura 35.- Coomassie con los diferentes extractos tomados en la purificación de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRS, tras su expresión en células Cos-1. **M:** marcador de peso molecular; **T:** totales; **NA:** no adherido; **20 mM IZ:** lavados con un tampón que contiene imidazol a 20 mM; **1M IZ:** lavados con un tampón que contiene imidazol a 1M; **2M IZ:** lavados con un tampón que contiene imidazol a 2M; **Rs:** resina.

Con el fin de obtener una mayor producción decidimos realizar la expresión en células Hela S3 en lugar de en células Cos-1, sin embargo, los niveles de expresión obtenidos fueron considerablemente inferiores en esta línea celular (datos no mostrados).

2.7. ESTUDIOS DE INMUNOGENICIDAD CON LA PROTEINA CODIFICADA POR LA ORF-5 DEL PRRSV

En los estudios de inmunogenicidad de la proteína, se utilizaron ratones de la estirpe balb-c, que fueron inoculados bien intraperitonealmente con la proteína unida a la resina en adyuvante oleoso

de Freund, o por escarificación intradérmica en la cola con ambos recombinantes (vTF7-3 y VV-PR5). También se realizaron coinfecciones en conejo (capítulo 15 de material y métodos). Tras realizar las sangrias, los sueros fueron analizados por diferentes técnicas. Para Western-blot los sueros fueron diluidos 1/50 y enfrentados a extractos de cultivos coinfectados con los virus vTF7-3/VV-PR5 (control positivo), extractos de cultivos únicamente infectados con vTF7-3 (control negativo), y extractos del virus parcialmente purificado. Además de enfrentar a los sueros problemas de los ratones, también se enfrentaron al policlonal positivo a la enfermedad, y a un anticuerpo monoclonal que reconoce un péptido próximo a la cola de histidinas. Los resultados obtenidos demuestran falta de reconocimiento de la proteína por los sueros de los animales inoculados experimentalmente en las condiciones probadas.

Tampoco se obtuvo actividad neutralizante por parte de los sueros ni reconocimiento de tapices infectados por el virus mediante la técnica de IPMA. Por el contrario, el análisis de los sueros obtenidos mediante el uso de la resina con la proteína purificada a dilución 1/50 mediante la técnica de Inmunofluorescencia, mostró una clara e intensa fluorescencia localizada en el citoplasma celular y más intensamente en la porción perinuclear, y en el aparato de Golgi (datos no mostrados). Esta localización de la proteína en las células infectadas también se había observado mediante el empleo por inmunofluorescencia del anticuerpo que reconoce el péptido próximo a la cola de histidinas. En los sueros de los animales que habían sido coinfectados, aunque también se detectó esta localización, los niveles de fondos eran mayores.

3. OBJETIVO TERCERO : Estudio de la variabilidad del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino en aislados de campo Españoles y Europeos

En este sentido, disponíamos en el laboratorio de diversas cepas del PRRSV, cuyo origen, y año de aislamiento fue anteriormente señalado. Con el fin de detectar posibles variaciones existentes tras el cultivo "*in vitro*" de las cepas, se incluyeron los pases 2 y 9 en MAP, así como el pase 6 de la cepa 5710 adaptada a cultivo en un clon susceptible de la línea celular MA-104 (5710-CL). La cepa VP035 fue aislada de la misma granja en que cuatro años antes se había aislado la 5710. Como ya se indicó las cepas 2910 y 5711 no fueron susceptibles de ser amplificadas cuando se enfrentaron a los cebadores de la ORF-7.

La totalidad de las cepas fueron crecidas en MAP, sometidas a extracción de ARN, transcripción en reverso, y amplificación por PCR, usando tanto los cebadores dentro de la ORF-7, como los que incluían la totalidad de la ORF-5 vírica. Tras el clonaje de los fragmentos en el plásmido pGEM-T, transformación en la cepa bacteriana JM-109, y selección de clones positivos mediante digestión con enzimas de restricción, se realizaron midipreparaciones y fueron secuenciados automáticamente. Las secuencias obtenidas y alineadas con la correspondiente al virus Lelystad se describen a continuación.

3.1. VARIABILIDAD EN EL INTERIOR DE LA ORF-7 DE CEPAS EUROPEAS DEL PRRSV

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12. La traducción de las secuencias a proteínas se muestran en la tabla 13.

Resultados

```

14667
LV      GCCAGTGGCT  GGGTGCAATG  ATAAAGTCCC  AGCGCCAGCA  ACCTAGGGGA
PRRS 5710-2  *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 5710-9  *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 5710-CL *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 2228   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 2910   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 3211   *****<  *****<  *****<  *****A**  *****<
PRRS 4606   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 5711   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 5999   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 705    *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 1468   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS VP035  *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS NL 2.2 *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS NL 3.1 *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS NL 4.2 *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 2156   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 4A     *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 5A     *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 6A     *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 8D     *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS AV30   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 92V058 *****<  *****<  *****<  *****<  *****<

```

```

14717
LV      GGACAGGCCA  AAAAGAAATA  GCCTGAGAAG  CCACATTTTC  CCCTGGCTGC
PRRS 5710-2  *****A*  ****A*G**  *****<  *****<  ****A*****
PRRS 5710-9  *****A*  ****A*G**  *****<  *****<  ****A*****
PRRS 5710-CL *****A*  ****A*G**  *****<  *****<  ****A*****
PRRS 2228   *****<  *****<  *****<  *****<  ****A*****
PRRS 2910   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 3211   *****<  *****<  *****<  *****<  **T*A*****
PRRS 4606   *****<  *****<  *****<  *****<  ****A*****
PRRS 5711   *****<  *****G**  *****<  *****<  ****A*****
PRRS 5999   *****<  *****G**  *****<  *****<  ****A*****
PRRS 705    *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 1468   *****<  ***G*****  *****<  *****<  *****<
PRRS VP035  *****<  *****G**  *****<  *****<  ****A*****
PRRS NL 2.2 *****A*  *****<  *****<  *****<  **T*****
PRRS NL 3.1 *****<  *****<  *****<  *****<  **T*****
PRRS NL 4.2 *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 2156   *****<  *****<  *****<  *****C*  *****<
PRRS 4A     *****<  *****<  *****<  *****<  **T*****
PRRS 5A     *****<  *****<  *****<  *****<  **T*****
PRRS 6A     *****A*  *****<  *****<  *****<  **T*****
PRRS 8D     *****<  *****<  *****<  *****<  **T*****
PRRS AV30   *****<  *****<  *****<  *****<  *****<
PRRS 92V058 *****<  *****<  *****<  *****<  *****<

```

Resultados

```

14767
LV      TGAAGATGAC  ATCCGGCACG  ACCTCACCCA  GACTGAACGC  TCCCTCTGCT
PRRS 5710-2  *****  **T*****  *****  ***C*****  *****
PRRS 5710-9  *****  **T*****  *****  ***C*****  *****
PRRS 5710-CL *****  **T*****  *****  ***C*****  *****
PRRS 2228    *****  **T***G**  *****  ***C*****  *****
PRRS 2910    *****  *****  *T*****  ***C*****  *****
PRRS 3211    *****  **T*****  *****  ***C*****  *****T****
PRRS 4606    *****  **T*****  *****  ***C*****  *****
PRRS 5711    *****  **T*****  *****  ***C*****  *****
PRRS 5999    *****  **T*****  *T*****  ***C*****  *****
PRRS 705     *****  *****  *****  *****T*    *****
PRRS 1468    *****  *****T*   *****  *****      *****
PRRS VP035   *****  G*T*****  *****  ***C*****  *****
PRRS NL 2.2  *****  *****  *T*****  *****      *****
PRRS NL 3.1  *****  *****  *****  *****      *****
PRRS NL 4.2  *****  *****  *****  *****      *****
PRRS 2156    *****  *****  *****  ***C*****  *****T**TC
PRRS 4A      *****  *****  *T*****  *****      *****
PRRS 5A      *****  *****  *T*****  *****      *****
PRRS 6A      *****  *****  *****  *****      *****
PRRS 8D      *****  *****  *T*****  *****      *****
PRRS AV30    *****  *****  *****  *****      *****T*
PRRS 92V058 *****  *****  *****  *****      *****T*
    
```

```

14817
LV      TGCAATCGAT  CCAGACGGGT  TTCAATCAAG  GCGCAGGAAC  TCGCTCGCTT
PRRS 5710-2  *****  *****  **T*****  *****  *****
PRRS 5710-9  *****  *****  **T*****  *****  *****
PRRS 5710-CL *****  *****  **T*****  *****  *****
PRRS 2228    *****  *****  **T*****  *****  *****
PRRS 2910    *****  *****  **T*****  *****T*****
PRRS 3211    *****  *****  **T*****  *****  *****
PRRS 4606    *****  *****  **T*****  *****  *****
PRRS 5711    *****  *****  **T*****  *****  *****
PRRS 5999    *****  *****  **T*****  *****  *****
PRRS 705     *****  *****  *****  *****  *****
PRRS 1468    *****  *****  *****  *****  *****
PRRS VP035   *****  *****  *****  *****  *****
PRRS NL 2.2  *****  *****  *****  *****  *****
PRRS NL 3.1  *****  *****  *****  *****  *****
PRRS NL 4.2  *****  *****  *****  *****  *****
PRRS 2156    *****  T*****  **T*****  *****  *****
PRRS 4A      *****  *****  *****  *****  *****
PRRS 5A      *****  *****  *****  *****  *****
PRRS 6A      *****  *****  *****  *****  *****
PRRS 8D      *****  *****  *****  *****  *****
PRRS AV30    *****  *****  *****  *****  *****
PRRS 92V058 *****  *****  *****  *****  *****
    
```

Resultados

```

18867
LV      TCATCCAGCG  GGAAGGTCAG  TTTTCAGGTT  GAGTTTATGC  TGCCGGTTGC
PRRS 5710-2  *****
PRRS 5710-9  *****
PRRS 5710-CL *****
PRRS 2228    *****
PRRS 2910    *****
PRRS 3211    *****
PRRS 4606    *****
PRRS 5711    *****
PRRS 5999    *****
PRRS 705     *****
PRRS 1468    *****
PRRS VP035   *****
PRRS NL 2.2  *****
PRRS NL 3.1  *****
PRRS NL 4.2  *****
PRRS 2156    *****
PRRS 4A      *****
PRRS 5A      *****
PRRS 6A      *****
PRRS 8D      *****
PRRS AV30    *****
PRRS 92V058 *****

```

```

14917
LV      TCATAC
PRRS 5710-2  *****
PRRS 5710-9  *****
PRRS 5710-CL *****
PRRS 2228    *****
PRRS 2910    *****
PRRS 3211    *****
PRRS 4606    *****
PRRS 5711    *****
PRRS 5999    *****
PRRS 705     *****
PRRS 1468    *****
PRRS VP035   *****
PRRS NL 2.2  *****
PRRS NL 3.1  *****
PRRS NL 4.2  *****
PRRS 2156    *****
PRRS 4A      *****
PRRS 5A      *****
PRRS 6A      *****
PRRS 8D      *****
PRRS AV30    *****
PRRS 92V058 *****

```

Tabla 12.- Variabilidad dentro de la ORF-7 del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino.

Resultados

LV	CQLLGAMIKS	QRQQPRGGQA	KKKKPEKPHF	PLAAEDDIRH	HLTQTERSLC
PRRS 5710-2	*****	*****	**R*****	*****	*****
PRRS 5710-9	*****	*****	**R*****	*****	*****
PRRS 5710-CL	*****	*****	**R*****	*****	*****
PRRS 2228	*****	*****	*****	*****D	*****
PRRS 2910	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 3211	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 4606	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 5711	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 5999	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 705	*****	*****	*****	*****	*****L**
PRRS 1468	*****	*****	*R*****	*****	*****
PRRS VP035	*****	*****	*****	*****V**	*****
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 3.1	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 2156	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 4A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 5A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS AV30	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	*****	*****	*****	*****	*****

LV	LQSIQTAFNQ	GAGTASLSSS	GKVSFQVEFM	LPVAHT
PRRS 5710-2	*****	*****	*****	*****
PRRS 5710-9	*****	*****	*****	*****
PRRS 5710-CL	*****	*****	***N*****	*****
PRRS 2228	*****	*****	*****	*****
PRRS 2910	*****	*****	***G*****	*****
PRRS 3211	*****	*****	*****	*****
PRRS 4606	*****	*****	*****	*****
PRRS 5711	*****	*****	*****	*****
PRRS 5999	*****	*****	*****	*****
PRRS 705	*****	*****	*****	*****
PRRS 1468	*****	*****G	*****	*****A
PRRS VP035	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 3.1	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****	*****
PRRS 2156	*****	*****	*****	*****
PRRS 4A	*****	*****	*****	*****
PRRS 5A	*****	*****	*****	*****
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****A
PRRS AV30	*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	*****	*****	*****	*****

Tabla 13.- Traducción a proteínas de las secuencias obtenidas dentro de la ORF-7 del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino.

3. 2. VARIABILIDAD EN EL INTERIOR DE LA ORF-5 DE CEPAS EUROPEAS DEL PRRSV

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14. La traducción de las secuencias a proteínas se muestran en la tabla 15.

	13510				
LV	TTTCTTGACT	CCGCACCTCTT	GCTTCTGGTG	GCTTTTTTTTG	CTGTGTACCG
PRRS 5710-2	*****	**T*****	*****	*****	*****
PRRS 5710-9	*****	**T*****	*****	*****	*****
PRRS 5710-CL	*****	**T*****	*****	***C*****	*****
PRRS 2228	*****	**T***C***	A*****T**	*****	*****
PRRS 3211	*****	*T*****	*****	*G*****	*****
PRRS 4606	*****	**T*****	*****	*****	*****A*
PRRS 5999	*****	**T*****	*****	**C*****	*****
PRRS 705	*****	**T*****	A**T*****	*****	*****
PRRS 1468	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS VP035	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 3.1	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 2156	*****	**A*****	A*****	*****	*****
PRRS 4A	****C****	*****	*****	*T*****	****A****
PRRS 5A	****C****	*****	*****	*****	*****
PRRS 6A	****C****	*****	*****	*T*****	*****
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS AV30	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	*****	***G*****	*****	*****	*****

	13560				
LV	GCTTGTCCCTG	GTCCTTTGCC	GATGGCAACG	GCGACAGCTC	GACATACCAA
PRRS 5710-2	*****T**	*****T*	*****	A*A*****	*****
PRRS 5710-9	*****T**	*****T*	*****	A*AG*****	*****
PRRS 5710-CL	*****T**	*****T*	*****	A*AG*****	*****
PRRS 2228	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 3211	*****T**	*****	*****	*****	*****
PRRS 4606	*****T**	*****T*	*****	A*****	*****
PRRS 5999	*****T**	*****T*	*****G**A	A*A*****	*****
PRRS 705	*****A**	*****	*****	**AG*****	*****
PRRS 1468	***C*****	*****	*****	**A*****	*****
PRRS VP035	*****	*****	*****G**	**A*****	*****
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 3.1	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****	**A*****C*	*****
PRRS 2156	*T**A*****	*****	*****	**A*****	*****
PRRS 4A	*****	*****	*****G****	**A*****	*****
PRRS 5A	*****	*****	*****	**A*****	*****
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS AV30	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	*****	*****	*****	*****	*****

Resultados

```

13610
LV      TACATATATA ACTTGACGAT  ATGCGAGCTG  AATGGGACCG  ACTGGTTGTC
PRRS 5710-2 ***** *T*****
PRRS 5710-9 ***** *T*****
PRRS 5710-CL ***** *T*****
PRRS 2228 ***** ****A*****
PRRS 3211 ***** *****
PRRS 4606 ***** *TC*****
PRRS 5999 ***** *T*****
PRRS 705 ***** *****
PRRS 1468 ***** *T*****
PRRS VP035 ***** *****
PRRS NL 2.2 ***** *****
PRRS NL 3.1 ***** *****
PRRS NL 4.2 ***** *****
PRRS 2156 ***** *T*****
PRRS 4A ***** *****
PRRS 5A ***** *****
PRRS 6A ***** *****
PRRS 8D ***** *****
PRRS AV30 ***** *****
PRRS 92V058 ***** *****

```

```

13660
LV      CAGCCATTTT GGTGGGCAG  TCGAGACCTT  TGTGCTTTAC  CCGTTGCCA
PRRS 5710-2 ***** *AC*****
PRRS 5710-9 ***** *AC*****
PRRS 5710-CL ***** *AC*****
PRRS 2228 ***** *A*****
PRRS 3211 ***** *A*****
PRRS 4606 ***** *AC*****
PRRS 5999 ***** *AC*****
PRRS 705 ***** *T*****
PRRS 1468 ***** *****
PRRS VP035 ***** *****
PRRS NL 2.2 ***** *****
PRRS NL 3.1 ***** *****
PRRS NL 4.2 ***** *C*****
PRRS 2156 ***** *G**G*A***
PRRS 4A ***** *C*****
PRRS 5A ***** *****
PRRS 6A ***** *****
PRRS 8D ***** *****
PRRS AV30 ***** *A*****
PRRS 92V058 ***** *A*****

```

Resultados

13710

LV	CTCATATCCT	CTCACTGGGT	TTTCTCACAA	CAAGCCATT	TTTGTGACGG
PRRS 5710-2	*****	T*****	*****	*****	*****T**
PRRS 5710-9	*****	T*****	*****	*****	*****T**
PRRS 5710-CL	*****	T*****	*****	*****	*****T**
PRRS 2228	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 3211	*****T**	*****	*****	***T*****	*****T**
PRRS 4606	*****	T*****	*****	*****	*****T**
PRRS 5999	*****	T*****	*****	*****	*****T**
PRRS 705	*****T**	*****	*****	*****	*****
PRRS 1468	*****	*****	*****	***T*****	*****
PRRS VP035	*****T**	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 2.2	*****A**	*****	*****	*****	*****A
PRRS NL 3.1	***C*****	*****	*****	*****	*****T**
PRRS NL 4.2	*****	***G*****	*****	*****	*****
PRRS 2156	***C*****	T*****	**C**T***	*G*****	*****
PRRS 4A	*****	***G*****	*****	*****	*****
PRRS 5A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****A
PRRS AV30	*****	***G*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	*****	*****	*****	*****	*****

13760

LV	CTCGGTCTCG	GCGCTGTATC	CACTGCAGGA	TTTGTGCGC	GCGGTACGT
PRRS 5710-2	*****	*****G**	***A*****	*****	*****T**
PRRS 5710-9	*****	*****G**	***A**G**	*****	*****T**
PRRS 5710-CL	*****	*****G**	*C**A*****	***T*****	*****T**
PRRS 2228	**T*****	*****G**	**T*A****G	***TA**A*A	AA*****T**
PRRS 3211	*****	*****G**	***A*****	*****	*A*****T**
PRRS 4606	*****	*****G**	*G**AT***G	*****A	*****T**
PRRS 5999	*****T*	*****G**	**T*A*****	*****	*****T**
PRRS 705	*****	*****G**	**TAA****G	***TA**ATA	AA*****T**
PRRS 1468	*****	*****	*****	*****	*****T**
PRRS VP035	*****	*****	**T*A****G	***TG****A	AA*****T**
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	*****G*T**
PRRS NL 3.1	*****	***A*****	*****	C*****A**	*****
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****	*****	*****T**
PRRS 2156	*****C**T*	*A*****G**	TGTCA*****	***T*****A	A*****
PRRS 4A	*****	*****	*****	*****	*T*****T**
PRRS 5A	*****	*****	*****	*****	*****T**
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****	*****TT*
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****T**
PRRS AV30	*****A	*****	*****	*****	*****T**
PRRS 92V058	*****A	*****	*****	*****	*****T**

Resultados

	13810				
LV	ACTCTGCAGC	GTCTACGGCG	CTTGTGCTTT	CGCAGCGTTC	GTATGTTTTG
PRRS 5710-2	****A*****	**G*****	*****	*****C**	*****
PRRS 5710-9	****A*****	**G*****	*****	*****C**	*****
PRRS 5710-CL	****A*****	**G*****	*****	*****C**G	*****
PRRS 2228	****A****T	*****	*****C*	*****C**	**G**C****
PRRS 3211	****A*****	**G*****	*****	*****C**	*****
PRRS 4606	****A*****	**G*****	*****C**	*****C**	*****
PRRS 5999	****A*****	**G*****	*****	*****C**	*****
PRRS 705	****A****T	*****	*****C*	*****	**G**C****
PRRS 1468	*****	*****	*****	*****T	*****
PRRS VP035	G**A****T	*****	*****C*	*****C**	**G**C**T
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	**G*****
PRRS NL 3.1	****A*****	*****	*****	T*****	*****
PRRS NL 4.2	*****	****T****	*****	*****	*****
PRRS 2156	G**TA*T**	**G*****	T*****A**	*****C**	*****
PRRS 4A	*****	****T****	*****	*****	*****
PRRS 5A	****A*****	*****	*****	*****	**G*****
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****	**G*****
PRRS 8D	**A*****	*****	*****	*****	**G*****
PRRS AV30	****A*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	****A*****	*****	*****	*****	*****

	13860				
LV	TCATCCGTGC	TGCTAAAAAT	TGCATGGCCT	GCCGCTATGC	CCGTACCCGG
PRRS 5710-2	*****C**	*****	*****T*	****T*****	*****
PRRS 5710-9	*****C**	*****	*****T*	****T*****	*****
PRRS 5710-CL	*****C**	*****	*****T*	****T*****	*****
PRRS 2228	*****	*****	*****T*	*****C**	***C*****
PRRS 3211	*****	*****	*****T*	****T*****	*****
PRRS 4606	*****	*****	**T*****T*	****T*****	***C*****
PRRS 5999	*****	*****	*****T*	****T*****	*****
PRRS 705	*****	*****	*****T*	****T**C**	***C*****
PRRS 1468	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS VP035	*****	*****	*****T*	*****C**	***C*****
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 3.1	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 2156	*****	*A*****C	**T*****TG*	*****	T*****
PRRS 4A	*****T*	*****	*****	*****	*****
PRRS 5A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 6A	****T*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS AV30	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	*****	*****	*****	*****	*****

Resultados

```

13910
LV      TTTACCAACT  TCATTGTGGA  CGACCGGGGG  AGAGTTCATC  GATGGAAGTC
PRRS 5710-2 *****
PRRS 5710-9 *****
PRRS 5710-CL *****
PRRS 2228  **C*****
PRRS 3211  *****
PRRS 4606  *****
PRRS 5999  *****T*****
PRRS 705   *****
PRRS 1468  *****
PRRS VP035 **C*****
PRRS NL 2.2 *****
PRRS NL 3.1 *****
PRRS NL 4.2 *****
PRRS 2156  **C*****T*
PRRS 4A    *****
PRRS 5A    *****
PRRS 6A    *****
PRRS 8D    *****
PRRS AV30  *****
PRRS 92V058 *****

```

```

13960
LV      TCCAATAGTG  GTAGAAAAAT  TGGGCAAAGC  CGAAGTCGAT  GGCAACCTCG
PRRS 5710-2 *****G*****
PRRS 5710-9 *****G*****
PRRS 5710-CL *****
PRRS 2228  *G**G*****
PRRS 3211  *G**G*****
PRRS 4606  *****G*****
PRRS 5999  *****G*****
PRRS 705   **G**G*****
PRRS 1468  *****
PRRS VP035 **T**G*****
PRRS NL 2.2 *****
PRRS NL 3.1 *****
PRRS NL 4.2 *****
PRRS 2156  **G*****T*****
PRRS 4A    *****
PRRS 5A    *****
PRRS 6A    *****
PRRS 8D    *****
PRRS AV30  *****G*****
PRRS 92V058 *****G*****

```

Resultados

	14010				
LV	TCACCATCAA	ACATGTCGTC	CTCGAAGGGG	TTAAAGCTCA	ACCCTTGACG
PRRS 5710-2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 5710-9	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 5710-CL	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 2228	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 3211	*****	*****	*****	****T*****	*****
PRRS 4606	*****	*****	*****	*****	*****A
PRRS 5999	*****T**	*****	*****	*****	*****
PRRS 705	*****	*****A**	*****	*****	*****
PRRS 1468	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS VP035	*T*****	*****	*****	*****	*****A**
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 3.1	*****	*****A**	**T*****	*****	*****
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 2156	*****	*****T**	*****	*****	*****
PRRS 4A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 5A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS AV30	*****	*****	*****	A*****	*****
PRRS 92V058	*****	*****	*****	*****	*****
	14060				
LV	AGG				
PRRS 5710-2	***				
PRRS 5710-9	***				
PRRS 5710-CL	***				
PRRS 2228	***				
PRRS 3211	***				
PRRS 4606	***				
PRRS 5999	***				
PRRS 705	***				
PRRS 1468	***				
PRRS VP035	***				
PRRS NL 2.2	***				
PRRS NL 3.1	***				
PRRS NL 4.2	***				
PRRS 2156	***				
PRRS 4A	***				
PRRS 5A	***				
PRRS 6A	***				
PRRS 8D	***				
PRRS AV30	***				
PRRS 92V058	***				

Tabla 14.- Variabilidad en la ORF-5 del virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino.

Resultados

LV	FLTPHSCFWW	LFLLLCTGLSW	SFADGNGDSS	TYQYIYNLTI	CELNGTDWLS
PRRS 5710-2	*****	*****	**V***DN**	*****	*****E***
PRRS 5710-9	*****	*****	**V***DS**	*****	*****E***
PRRS 5710-CL	*****	*L*****	**V***DS**	*****	*****E***
PRRS 2228	****PY*C*	*****	*****	*****	*****A***
PRRS 3211	***L*****	V*****	*****	*****	*****
PRRS 4606	*****	*****	**V***D***	*****	*****E***
PRRS 5999	*****	P*****	**V***DNN**	*****	*****N***
PRRS 705	*****Y***	*****	*****S**	*****	*****A***
PRRS 1468	*****	*****S**	*****N**	*****	*****
PRRS VP035	*****	*****	*****N**	*****	*****
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 3.1	*****	*****	*****	*****	*****E***
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****N*P	*****	*****
PRRS 2156	*****Y***	*****	*****N**	*****	*****
PRRS 4A	*S*****	F***Y*****	*****N**	*****	*****
PRRS 5A	*S*****	*****	*****N**	*****	*****
PRRS 6A	*S*****	F*****	*****	*****	*****
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS AV30	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	***R*****	*****	*****	*****	*****

LV	SHFGWAVETF	VLYPVATHIL	SLGFLT'SHF	FDALGLGAVS	TAGFVGGRYV
PRRS 5710-2	***D*****	*****	*****	*****	*T*****
PRRS 5710-9	***D*****	**H*****	*****	*****	*T*****
PRRS 5710-CL	***D*****	*****	*****	*****	PT**F*****
PRRS 2228	***D*****	*****	*****	*****	IT**YDK***
PRRS 3211	***D*****	*****V****	*****	*****	*T*****
PRRS 4606	***D*****	*****	*****	*****	AI***R***
PRRS 5999	***D*****	*****	*****	*****	IT*****
PRRS 705	*Y*D*****	*****	*****	*****	IT**YDK***
PRRS 1468	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS VP035	*****	*****	*****	*****	IT**C*K***
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****	*****D*
PRRS NL 3.1	*****	*****	*****	*****	**L*D****
PRRS NL 4.2	***S*****	*****V****	*****	*****	*****
PRRS 2156	GE*H*****	*****V****	*****	*****	VT**F*K***
PRRS 4A	***S*****	*****V****	*****	*****	*****
PRRS 5A	*****	*F*****	*****	*****	*****
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****	*****L
PRRS 8D	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS AV30	***D*****	*****	*****	*****S***	*****
PRRS 92V058	***D*****	*****	*****	*****S***	*****

Resultados

LV	LCSVYGACAF	AAFVCFVIRA	AKNCMACRYA	RTRETFNFIVD	DRGRVHRWKS
PRRS 5710-2	*S*****	**L*****	*****	*****	****I*****
PRRS 5710-9	*S*****	**L*****	*****	*****	****I*****
PRRS 5710-CL	*S*****	**L*****	*****	*****	****I*****
PRRS 2228	*S*****L	**L*****	*****	*****	****I*****
PRRS 3211	*S*****	**L*****	*****	*****	****I*****
PRRS 4606	*S*****	**L*****	*****	*****	****I*****
PRRS 5999	*S*****	**L*****	*****	*****	****I*****
PRRS 705	*S*****L	*****	*****	*****	****I*****
PRRS 1468	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS VP035	*S*****L	**L**F**	*****	*****	****I*****
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	*****M**	*****
PRRS NL 3.1	*S*****	*****	*****	*****	*****
PRRS NL 4.2	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 2156	*S***V**	**L*****	T***V***	*****	****I*****
PRRS 4A	*****	*****S	*****	*****	*****
PRRS 5A	*S*****	*****	*****	*****	N*****
PRRS 6A	*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 8D	H*****	*****	*****	*****	*****
PRRS AV30	*S*****	*****	*****	*****	*****
PRRS 92V058	*S*****	*****	*****	*****	*****
LV	PIVVEKLGKA	EVDGNLVTIK	HVVLEGVKAQ	PLTR	
PRRS 5710-2	*****E*	**G*D*****	*****	****	
PRRS 5710-9	*****	**G*D*****	*****	****	
PRRS 5710-CL	*****	**G*D*****	*****	****	
PRRS 2228	***G*****	**G*D*****	*****	****	
PRRS 3211	***G*****	*IG*D*****	*****N**	****	
PRRS 4606	*****	**G*D*****	*****	****	
PRRS 5999	*****	**G*D*****	*****	****	
PRRS 705	*****	**G*D*****	*****	****	
PRRS 1468	*****	*****P**	*****	****	
PRRS VP035	*****	***D*****	*****	****	
PRRS NL 2.2	*****	*****	*****	****	
PRRS NL 3.1	*****	*****	**I*****	****	
PRRS NL 4.2	*****	*****I**	*****	****	
PRRS 2156	*****P**	**G*G*****	*****	****	
PRRS 4A	*****	*****	*****	****	
PRRS 5A	*****	*****	*****	****	
PRRS 6A	*****	*****	*****	****	
PRRS 8D	*****	*****	*****	****	
PRRS AV30	*****	*****	*****D**	****	
PRRS 92V058	*****	*****	*****	****	

Tabla 15.- Traducción a proteínas de las secuencias obtenidas dentro de la ORF-5 del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino.

3.3. PORCENTAJES DE SIMILITUD NUCLEOTIDICA Y AMINOACIDICA DENTRO DE LAS ORFs 7 Y 5 DE CEPAS EUROPEAS DEL PRRSV

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 16 y 17.

Tabla 16: Número de variabilidad (porcentaje de similitud) nucleotídica entre cepas (ORF-7: 256; ORF-nucleótidos totales)

ORF-7							
ORF-5	LV	5710-2	5710-9	5710-CL	2228	5999	4606
LV		9 (96.5 %)	9 (96.5 %)	10 (96.1%)	7 (97.3 %)	9 (96.5 %)	6 (97.6 %)
5710-2	28 (94.9 %)		0 (100 %)	1 (99.6 %)	4 (98.4 %)	4 (98.4 %)	3 (98.8 %)
5710-9	30 (94.5 %)	4 (99.2 %)		1 (99.6 %)	4 (98.4 %)	4 (98.4 %)	3 (98.8 %)
5710-MA104	30 (94.5 %)	8 (98.5 %)	8 (98.5 %)		5 (98 %)	7 (97.3 %)	4 (98.4 %)
.2228	35 (93.6 %)	37 (93.3 %)	39 (92.9 %)	41 (92.5 %)		4 (98.4 %)	1 (99.6 %)
.5999	35 (93.6 %)	12 (97.8 %)	14 (97.4 %)	13 (96.7 %)	42 (92.4 %)		3 (98.8 %)
.4606	34 (93.8 %)	13 (96.7 %)	15 (97.2 %)	18 (96.7 %)	38 (93.1 %)	21 (96.2 %)	
.3211	29 (94.7 %)	21 (96.2 %)	23 (95.8 %)	27 (95.1 %)	36 (93.4 %)	38 (93.1 %)	28 (94.9 %)
.705	43 (92.2 %)	42 (92.4 %)	42 (92.4 %)	44 (92 %)	22 (96 %)	47 (91.5 %)	45 (91.8 %)
.1468	11 (98 %)	33 (94 %)	35 (93.6 %)	23 (95.8 %)	44 (92 %)	42 (92.4 %)	40 (92.7 %)
VPO35	31 (94.3 %)	39 (92.9 %)	41 (92.5 %)	41 (92.5 %)	21 (96.2 %)	44 (92 %)	42 (92.4 %)
NL 2.2	7 (98.7 %)	33 (94 %)	35 (93.6 %)	35 (93.6 %)	38 (93.1 %)	40 (92.7 %)	38 (93.1 %)
NL 3.1	14 (97.4 %)	34 (93.8 %)	36 (93.4 %)	36 (93.4 %)	45 (91.8 %)	42 (92.4 %)	41 (92.5 %)
NL 4.2	11 (98 %)	35 (93.6 %)	37 (93.3 %)	37 (93.3 %)	44 (92 %)	42 (92.4 %)	42 (92.4 %)
.2156	64 (88.6 %)	61 (88.9 %)	63 (88.6 %)	62 (88.7 %)	67 (87.8 %)	63 (88.6 %)	61 (88.9 %)
4A	14 (97.4 %)	38 (93.1 %)	32 (94.2 %)	40 (92.7 %)	46 (91.6 %)	45 (91.8 %)	45 (91.8 %)
5A	8 (98.5 %)	8 (98.5 %)	32 (94.2 %)	32 (94.2 %)	37 (93.3 %)	37 (93.3 %)	37 (93.3 %)
6A	7 (98.7 %)	33 (94 %)	35 (93.6 %)	35 (93.6 %)	38 (93.1 %)	40 (92.7 %)	38 (93.1 %)
8D	5 (99 %)	31 (94.3 %)	33 (94 %)	33 (94 %)	38 (93.1 %)	38 (93.1 %)	36 (93.4 %)
AV30	8 (98.5 %)	28 (94.9 %)	30 (94.5 %)	32 (94.2 %)	35 (93.6 %)	35 (93.6 %)	33 (94 %)
92VO58	7 (98.7 %)	27 (95.1 %)	29 (94.7 %)	31 (94.3 %)	34 (93.8 %)	34 (93.8 %)	32 (94.2 %)
.5711							
.2910							
ORF-7							
ORF-5	LV	5710-2	5710-9	5710-CL	2228	5999	4606
LV		1 (98.8 %)	1 (98.8 %)	2 (97.6 %)	1 (98.8 %)	0 (100 %)	0 (100 %)
5710-2	12 (93.4 %)		1 (98.8 %)	1 (98.8 %)	2 (97.6 %)	1 (98.8 %)	1 (98.8 %)
5710-9	12 (93.4 %)	3 (98.3 %)		1 (98.8 %)	2 (97.6 %)	1 (98.8 %)	1 (98.8 %)
5710-CL	14 (92.3 %)	5 (97.2 %)	4 (97.8 %)		3 (96.5 %)	2 (97.6 %)	2 (97.6 %)
.2228	17 (90.7 %)	14 (92.3 %)	14 (92.3 %)	14 (92.3 %)		1 (98.8 %)	1 (98.8 %)
.5999	14 (92.3 %)	5 (97.2 %)	7 (96.1 %)	8 (95.6 %)	14 (92.3 %)		0 (100 %)
.4606	12 (93.4 %)	5 (97.2 %)	5 (97.2 %)	6 (96.7 %)	13 (92.9 %)	8 (95.6 %)	
.3211	13 (92.9 %)	11 (94 %)	11 (94 %)	13 (92.9 %)	14 (92.3 %)	12 (93.4 %)	12 (93.4 %)
.705	15 (91.8 %)	13 (92.9 %)	12 (93.4 %)	12 (93.4 %)	6 (96.7 %)	13 (92.9 %)	13 (92.9 %)
.1468	3 (98.3 %)	13 (92.9 %)	14 (92.3 %)	16 (91.3 %)	20 (89.1 %)	15 (91.8 %)	15 (91.8 %)
VPO35	11 (94 %)	11 (94 %)	11 (94 %)	12 (93.4 %)	10 (94.5 %)	11 (94 %)	12 (93.4 %)
NL 2.2	2 (98.9 %)	14 (92.3 %)	14 (92.3 %)	16 (91.3 %)	19 (89.6 %)	16 (91.3 %)	14 (92.3 %)
NL 3.1	5 (97.2 %)	13 (92.9 %)	13 (92.9 %)	15 (91.8 %)	16 (91.3 %)	16 (91.3 %)	13 (92.9 %)
NL 4.2	5 (97.2 %)	14 (92.3 %)	13 (92.9 %)	17 (90.7 %)	21 (88.5 %)	16 (91.3 %)	16 (91.3 %)
.2156	18 (90.2 %)	17 (90.7 %)	18 (90.2 %)	17 (90.7 %)	18 (90.2 %)	18 (90.2 %)	18 (90.2 %)
4A	7 (96.1 %)	16 (91.3 %)	18 (90.2 %)	19 (89.6 %)	20 (89.1 %)	17 (90.7 %)	17 (90.7 %)
5A	5 (97.2 %)	13 (92.9 %)	14 (92.3 %)	16 (91.3 %)	20 (89.1 %)	15 (91.8 %)	15 (91.8 %)
6A	3 (98.3 %)	15 (91.8 %)	15 (91.8 %)	15 (91.8 %)	20 (89.1 %)	16 (91.3 %)	14 (92.3 %)
8D	1 (99.4 %)	13 (92.9 %)	13 (92.9 %)	15 (91.8 %)	18 (90.2 %)	15 (91.8 %)	13 (92.9 %)
AV30	4 (97.8 %)	12 (93.4 %)	12 (93.4 %)	14 (92.3 %)	17 (90.7 %)	14 (92.3 %)	12 (93.4 %)
92VO58	4 (97.8 %)	12 (93.4 %)	12 (93.4 %)	14 (92.3 %)	17 (90.7 %)	14 (92.3 %)	12 (93.4 %)
.5711							
.2910							

Tabla 17: Número de variabilidad (porcentaje de similitud) aminoacídica entre cepas (ORF-7 :86; ORF-5 aminoacidos totales)

3.4. ARBOLES FILOGENÉTICOS RESULTANTES DEL ANALISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS DE LAS ORFs 7 Y 5 DE CEPAS EUROPEAS DEL PRRSV

Las relaciones filogenéticas entre aislados de PRRSV se obtuvieron usando el programa MEGA (Kumar y cols, 1994). Las distancias genéticas entre pares de secuencias nucleotídicas se estimaron por la fórmula $d = -\frac{3}{4} \ln(1 - \frac{4}{3} p)$ (Jukes y cols, 1969), donde p es la proporción de cambios nucleotídicos que se observan en las secuencias a comparar, y L es la longitud de las secuencias alineadas. Para obtener los árboles filogenéticos se usó el método del neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) con respecto a la distancia a la matriz. Para estimar la precisión de la topología del árbol filogenético, se usó el método de bootstrap (Efron, 1982; Felsenstein, 1985).

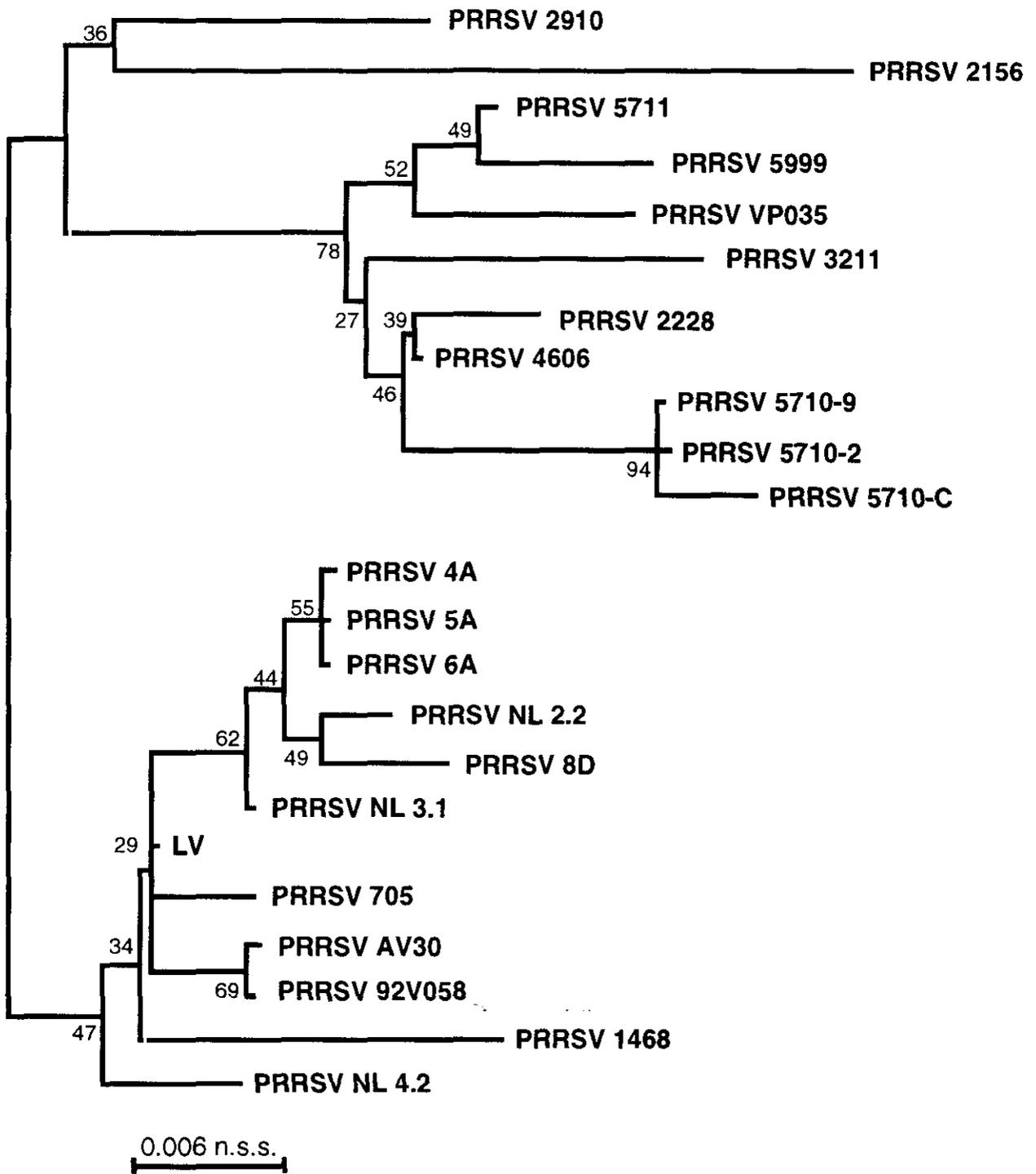


Figura 36.- Arbol filogenético resultante del análisis de las secuencias obtenidas dentro de la ORF-7 de diversas cepas europeas del PRRSV.

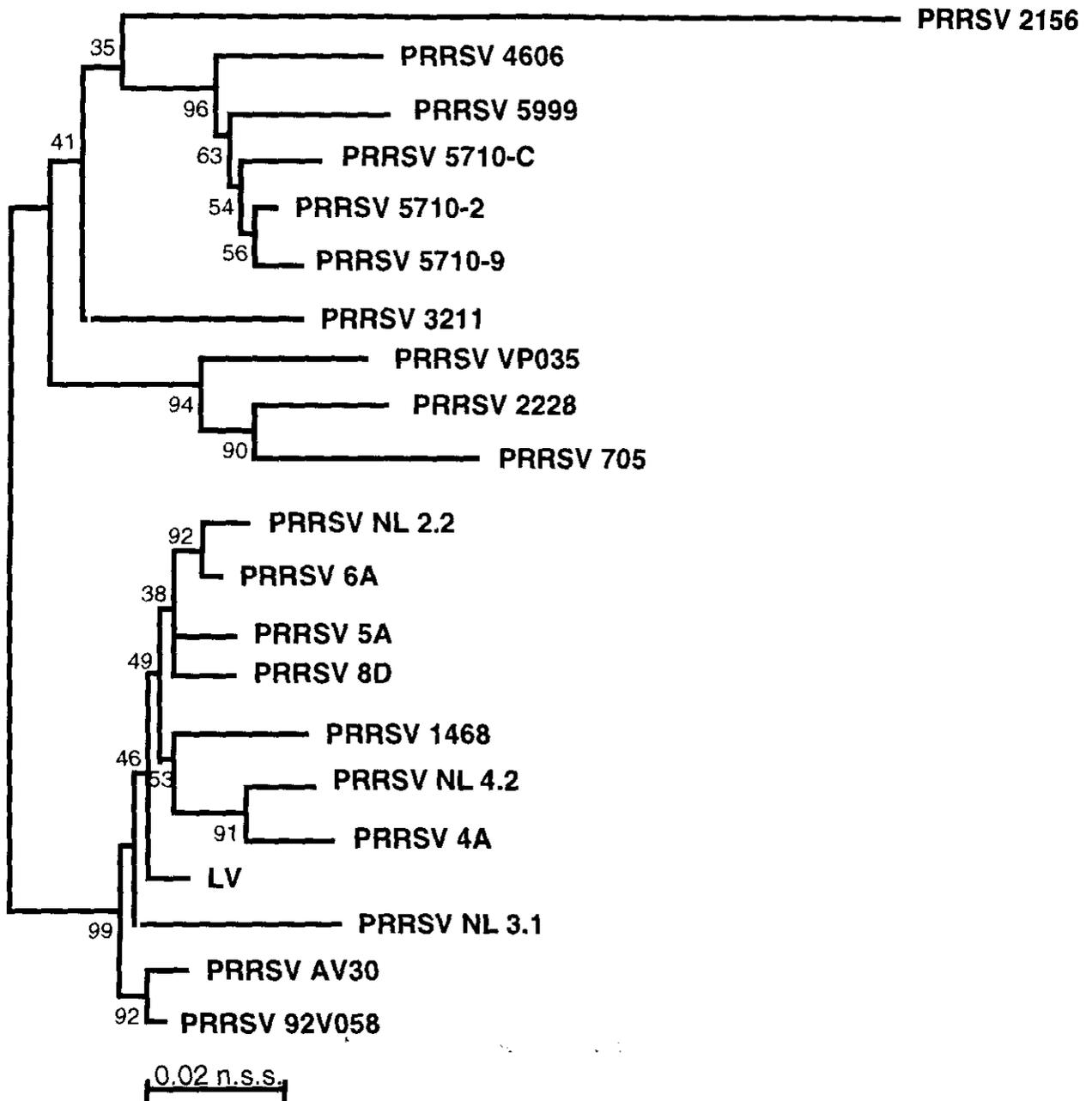


Figura 37.- Arbol filogenético resultante del análisis de las secuencias obtenidas dentro de la ORF-5 de diversas cepas europeas del PRRSV.

V. DISCUSSION

Desde el aislamiento por primera vez del PRRSV, varias técnicas de diagnóstico se han desarrollado para la determinación serológica de la enfermedad, pudiendo utilizarse también para la detección directa del virus mediante la inoculación de la muestra sospechosa en cultivos de MAP. De entre las que se han desarrollado destacan el IPMA y la IFI. Ambas presentan inconvenientes considerables requiriendo en ambos casos el aislamiento del PRRSV en cultivos celulares, lo que conlleva diferencias de susceptibilidad según la cepa vírica, por lo que se requiere con frecuencia dar pases ciegos antes de conseguir un título vírico adecuado para aplicar las técnicas anteriores (Yoon y cols, 1992). Se han descrito cepas que únicamente crecen en cultivos primarios de macrófagos alveolares porcinos y otras que lo hacen exclusivamente en la línea celular CL2621 (Bautista y cols, 1992). Lo mismo ocurre con la línea MA-104, requiriendo también dar pases ciegos para conseguir la multiplicación del virus, con lo que a la subjetividad intrínseca de éstas técnicas y a no ser susceptibles de automatización con fines diagnósticos a gran escala, se añade la dependencia continua de MAP con el elevado riesgo de contaminación que eso supone y su amplia heterogenicidad ya que se han detectado diferencias considerables en la susceptibilidad frente al virus dependiendo del lote de macrófagos, lo que hace necesario el análisis de los mismos previamente a su uso (Botner, 1995).

En contraposición a lo expuesto la PCR es una técnica que además de ser altamente específica y sensible, actualmente es susceptible de automatizarse con los equipos que posibilitan la realización de múltiples reacciones en placas. Por otra parte, es indiscutible la ventaja que supone el posibilitar la detección directa del virus sin necesidad de su aislamiento en cultivos celulares, sean de macrófagos o líneas celulares. Además, con esta técnica se obviarían prácticamente todos los inconvenientes expuestos anteriormente.

Por todo lo anteriormente expuesto y ya que en 1992 Plagemann había especulado sobre la similitud del agente causal del PRRS con los virus LDV, EAV y el SHFV, siendo por ello probablemente un virus ARN de cadena positiva y poliadenilado en su extremo 3', decidimos

encaminar nuestro trabajo a intentar obtener algún fragmento de la secuencia vírica que posteriormente nos fuera de utilidad en la detección del PRRSV por PCR. A este respecto, y ante la posibilidad de que el virus fuera poliadenilado realizamos, tomando como sustrato macrófagos infectados con el virus, extracciones de ARN y síntesis de ADN complementario utilizando un oligo con múltiples timidinas, para posteriormente realizar PCR usando como cebador reverso el oligo de timidinas y como directo una mezcla de oligos al azar. Es indudable que dicho planteamiento presentaba muchas dificultades, más teniendo en cuenta que todos los mensajeros eucariotas son poliadenilados, con lo cual podíamos amplificar cualquiera de los mensajeros de la propia célula. De este modo obtuvimos una débil banda que posteriormente fue sometida a amplificaciones sucesivas hasta obtener una banda nítida de unos 300 pares de bases. Con el fin de saber si esa secuencia era específica de nuestro virus, el ADN amplificado fue marcado con fósforo radiactivo y enfrentado en paralelo mediante la técnica de Dot-Blot a extractos de MAP no infectados e infectados. Como resultado obtuvimos que la secuencia obtenida no parecía ser específica de nuestro virus, hecho que fue posteriormente corroborado mediante la secuenciación y determinación de las similitudes posibles con todas las secuencias existentes en el Gene-Bank, en las que también se encontraban la secuencia completa del EAV, y la hasta entonces conocida del LDV.

Otra estrategia que nos planteamos inicialmente para conocer parte de la secuencia de nuestro virus era comparar las secuencias conocidas de los dos virus citados y diseñar cebadores degenerados con el fin de utilizarlos frente al PRRSV. Sin embargo, la publicación de la secuencia íntegra del LV facilitó la realización de nuestros trabajos posteriores (Meuleberg y cols, 1993).

Dado que nuestro primer objetivo era el desarrollo de una técnica de PCR para la detección del PRRSV debíamos diseñar cebadores dentro de la secuencia vírica. Debido a que nuestro virus era un ARN, era muy probable que tuviera una mayor tasa de variabilidad genómica con respecto a los virus ADN. Este hecho ha sido atribuido a dos causas

principales; a que los virus ARN tienen tiempos de replicación más cortos, y a que las tasas de corrección de pruebas de las ARN polimerasas en relación a las ADN polimerasas son mucho menores (Steinhauer y cols, 1987). Así, mientras que en los virus ARN los errores de replicación son del orden de 1 en 10^4 bases/ciclo de replicación, en los virus ADN son del orden de 1 en 10^9 , debido a la mayor fidelidad de las ADN polimerasas (Webster y cols, 1992). Como ejemplo, las tasas de variación de la secuencia en virus ARNs como Influenza, Poliovirus y el virus de la Estomatitis vesicular se han estimado en 10^{-4} nucleótidos por ciclo de replicación (Parvin y cols, 1986). Por todo lo expuesto, si queríamos que nuestra técnica fuera capaz de detectar distintos aislados víricos debíamos seleccionar una zona lo más conservada posible dentro del genoma vírico para el diseño de nuestros cebadores. En este sentido, se ha demostrado que en la mayoría de los virus ARN estudiados las zonas que codifican la ARN polimerasa y la proteína de la nucleocápsida son generalmente más estables que las que codifican para el resto de las proteínas víricas (Domingo y cols, 1988).

Por esta razón, diseñamos los cebadores con fines diagnósticos en la región interna de la ORF-7, que codifica la nucleocápsida vírica. La amplificación realizada tomando como sustrato muestras que contenían un aislado vírico español (cepa 5710), produjo consistentemente una única banda que no apareció cuando como sustrato se utilizaron macrófagos alveolares porcinos no infectados. Incluso cuando se disminuyó la temperatura de anillamiento a 30°C no se obtuvieron bandas adicionales. Tampoco se logró la amplificación cuando se usaron como sustrato de la reacción muestras de sobrenadantes de cultivos celulares infectados con otros virus involucrados en trastornos respiratorios y/o reproductores del cerdo, con lo que nuestra técnica resultó ser altamente específica, hecho que también había sido previamente corroborado por la comparación directa de la secuencia de nuestros cebadores con el resto de secuencias conocidas del Gene-Bank. Además, la secuenciación del producto amplificado y comparación con la secuencia del LV publicada previamente (Meulenberg y cols, 1993) confirmaba la especificidad del producto amplificado. Por todo lo

expuesto, parece improbable la obtención de falsos positivos a partir de muestras enviadas para la detección rutinaria de cerdos infectados con PRRSV pero que pudieran estar afectados por agentes víricos que pudieran causar sintomatología similar como PPV, ADV, TGE, Influenza etc.

Por otra parte, la técnica también se mostró altamente sensible como se confirmó al conseguir amplificar hasta 6,7 DI₅₀CT/ml tomando como sustrato cultivos de MAP infectados con el PRRSV. Sensibilidad que descendió a 100 DI₅₀CT/ml en muestras clínicas obtenidas de la infección experimental de cerdos como se puso de manifiesto en los apartados de resultados (1.21 y 1.2.3). Esta disminución en aproximadamente 2 logaritmos probablemente se deba a la mayor presencia en las muestras de campo de enzimas y otros contaminantes que faciliten una mayor degradación del ARN vírico.

Paralelamente al desarrollo por nosotros de la técnica de PCR para el diagnóstico de la enfermedad, otro grupo propuso otra técnica de PCR frente a la misma (Van Woensel y cols, 1994), en dicho trabajo, los autores diseñaron cebadores en el interior de la ORF-6 vírica detectando 30 unidades infectivas en cultivo de tejido o esperma, afirmando que la detección del virus en esperma por PCR es 10 veces más sensible que en cultivo de tejidos. En estudios realizados por nosotros en que semen de verraco se mezcló con el virus a diferentes DI₅₀CT, y las muestras se procesaron para RT-PCR, la sensibilidad alcanzada era aproximadamente la encontrada en muestras biológicas. Esta disminución en un logaritmo de nuestros resultados con respecto a los del mencionado grupo tienen su explicación en que si bien en nuestro caso los productos de PCR eran corridos en geles de agarosa al 1.5 % y visualizados directamente previa tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV, el grupo holandés transfieren los productos de PCR a membranas de nylon, revelando con un reactivo químico. A efectos prácticos consideramos que ello encarece considerablemente el costo de la reacción, lo hace poco aplicativo y requiere un mayor gasto de tiempo. Estamos de acuerdo en señalar la importancia de la PCR en el diagnóstico de verracos eliminadores del virus via semen, ya que el

mismo es tóxico en cultivos celulares, de ahí la mayor sensibilidad detectada con respecto a los mismos. Además la PCR permite la detección del virus en muestras en que el virus esté inactivado e incapaz de multiplicarse en cultivo celular.

Actualmente hemos modificado las condiciones de extracción de ARN, mediante fenolizaciones sucesivas y precipitación con isopropanol, de modo que ésta es más rápida al eliminarse la inicial ultracentrifugación (datos no mostrados)

Si como ya se ha expuesto, nuestro primer objetivo fue dar solución a la continua dependencia de MAP en el diagnóstico etiológico de la enfermedad, nuestro segundo objetivo fue el lograr la expresión "in vitro" y obtención lo más pura posible de la proteína vírica que migraba a la altura de 24-26 KD en geles de poliacrilamida. En este sentido, se había señalado la existencia de tres proteínas víricas visualizables por inmunodetección en membranas de nitrocelulosa de 15, 19 y 24-25 KD (Benfield, 1992). Para otros autores existe una cuarta proteína que migra a la altura de 42 KD, que probablemente sea una forma altamente glicosilada de la proteína de peso molecular 24-26 KD (Mardassi y cols, 1994). El motivo de querer expresar esta proteína fue que dicha proteína era supuestamente una proteína glicosilada, y probablemente creíamos que tendría valor como futuro inmunógeno, ya que frecuentemente las glicoproteínas estructurales víricas son de gran interés en la inducción de respuestas protectoras por el hospedador. Al comienzo de nuestro trabajo se sabía que esta proteína, por comparación con los virus LDV y EAV, probablemente sería una proteína de membrana glicosilada, sin embargo, desconocíamos cual era la zona de lectura abierta vírica que la codificaba. Finalmente tres hechos hicieron que nos decantáramos por la ORF-5. En primer lugar, sabíamos que el nuevo virus mostraba gran similitud, entre otros, con el virus de la EAV. En un trabajo previo (de Vries y cols, 1992), se había señalado que este virus equino poseía cuatro proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápsida de 14 KD (N), y tres proteínas de membrana, una no glicosilada de 16 KD (M), y dos proteínas de membrana glicosiladas (Gs y GI) de 25 y 30 a 42 KD, proteínas que eran

codificadas respectivamente por las zonas de lectura abierta 7, 6, 2 y 5.

En segundo lugar, se estudiaron (tabla 18) los pesos moleculares estimados de las proteínas codificadas por las diferentes ORFs víricas (Meulenberg y cols, 1993):

ORF	Número de aminoácidos	Peso molecular estimado del producto no modificado (kDa)	Sitios potenciales de glicosilación
1a	2396	260.0	3
1b	1463	161.8	3
2	249	28.4	2
3	265	30.6	7
4	183	20.0	4
5	201	22.4	2
6	173	18.9	2
7	128	13.8	1

Tabla 18.- Características de las ORFs del LV (Meulenberg, 1993)

Se sabía, por lo tanto, que las zonas de lectura 1a y 1b codificaban la polimerasa vírica, y la ORF 7 probablemente la nucleocápsida, hecho que coincidía con lo reseñado para el EAV. Las ORFs 2-6 codificaban, probablemente, proteínas asociadas a membrana. Si nuestra proteína debía tener un peso molecular aproximado de 24-26 KD, las proteínas codificadas por las ORFs 2 y 3 excedían ya ese tamaño suponiendo que no sufrieran alguna modificación post-traducciona que disminuyera el mismo. La ORF-6 por su peso molecular y comparación con el EAV, probablemente codificara la proteína de 19 KD no glicosilada (a cuyo peso molecular se ajustaba correctamente). Por otra parte las ORFs 4 y 5 tenían pesos moleculares estimados de 20 y 22.4 KD, que con la glicosilación aumentarían, siendo por ello las ORFs más teóricamente candidatas a codificar la proteína buscada.

En tercer y último lugar decidimos con la ayuda de un programa informático (Mac-Prot), realizar el perfil hidrofóbico e hidrofílico de las proteínas codificadas por las ORFs anteriormente citadas, obteniendo por los métodos de Kyte & Doolite y Hoop & Woods, los perfiles que se indican en las figuras 38 y 39 respectivamente.

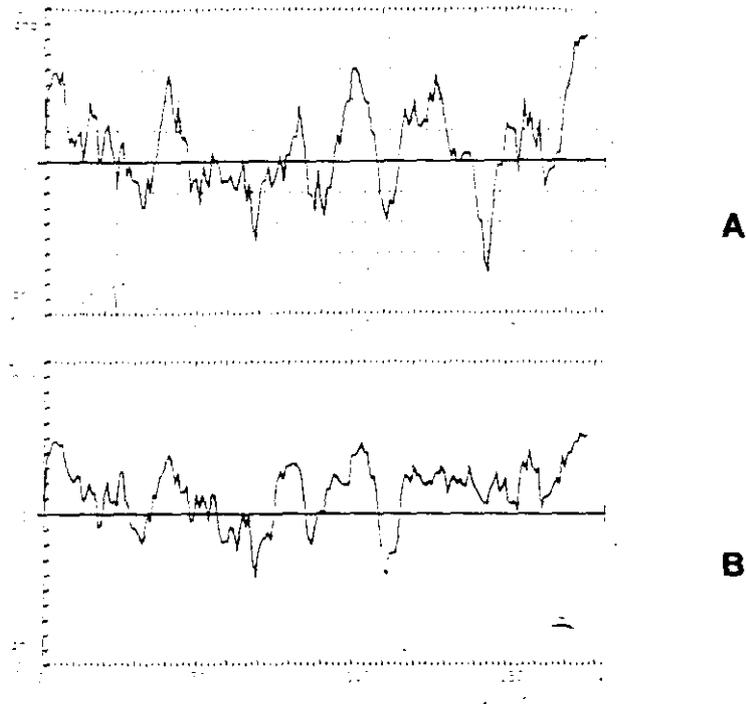


Figura 38.- Patrones de hidrofobicidad e hidroficidad correspondiente a la proteína codificada por la ORF-4 del PRRSV. **A:** Método de Kyte & Doolite. **B:** Método de Hopp & Woods.

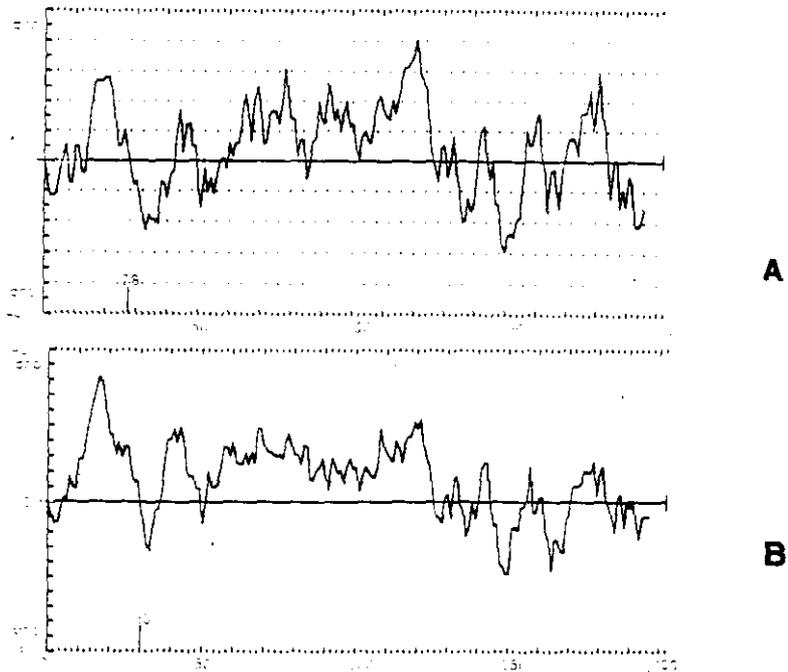


Figura 39.- Patrones de hidrofobicidad e hidroficidad correspondiente a la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV. **A:** Método de Kyte & Doolite. **B:** Método de Hopp & Woods.

Si bien ambas proteínas presentan una zona hidrofóbica en su extremo amino-terminal que pudiera deberse a la presencia de un péptido señal de anclaje a membrana, en la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV éste era más evidente.

Por todo lo expuesto decidimos empezar a trabajar de un modo "empírico" con la ORF-5 del PRRSV con el fin de descubrir si esa ORF podría codificar la proteína que migra a la altura de 25 KD en geles de poliacrilamida, proteína que con posterioridad se denominó proteína E.

La estrategia a seguir para el clonaje de la ORF-5 del PRRSV, como ya se describió, fue la amplificación por PCR de la totalidad de dicha ORF para su posterior clonaje en un vector plasmídico como ya se había realizado ampliamente con objeto de clonar varios genes víricos (Sanz y cols, 1994). Si bien otros autores utilizan para la amplificación cebadores que incluyen dianas de restricción idóneas o compatibles con las existentes en los plásmidos en los que quieren introducir los fragmentos (Lo y cols, 1992), nosotros utilizamos el pGEM-T, vector cortado con una enzima de restricción que produce extremos romos y al que se le ha añadido un residuo de dT que permite el clonaje directo de cualquier producto de PCR aprovechando la propiedad que tiene la Taq polimerasa de añadir un residuo de dAdenosina en el extremo 3' de algunas de las moléculas amplificadas (Clark y cols, 1988).

En este sentido, y tomando como sustrato MAP infectados, fueron amplificadas y clonadas inicialmente en el plásmido pGEM-T un total de cinco ORF-5 procedentes de aislados de campo españoles (aislados 2228, 2910, 3211, 4606 y 5710). Debido a que en dicho vector la secuencia a clonar quedaba bajo el promotor del bacteriófago T7, se utilizaron las ORFs 5 correspondientes a las cepas 4606 y 5710 para un primer estudio de expresión usando un sistema de expresión en células eucariotas (Cos-1) mediante infección con el virus vacuna-T7 y transfección con dichos plásmidos, sistema que ha sido utilizado ampliamente para la expresión transitoria de genes víricos (Sanz, 1995).

En ningún caso, como se citó, se obtuvo reconocimiento inmunológico de la proteína debido a la existencia de dos ATGs previos en el polilinker de dicho plásmido que no estaban en fase con el ATG iniciador de dicha proteína. Se sabe que en la transcripción en eucariotas, en la mayoría de las ocasiones (95 %), el ATG situado más al extremo 5' del ARN mensajero es el que actúa como inicio de la misma (Stormo G.D, 199). Además, en el caso de la cepa 5710, como se detectó por secuenciación manual usando el oligo M13 universal, no existía el ATG iniciador que debiera haber sido incorporado con el cebador de ida. Una posible explicación a este hecho pudiera ser la existencia de cebadores incompletos en la mezcla de reacción no completándose la síntesis de los 28 nucleótidos en el cebador en cuestión. Este razonamiento se ve soportado por el hecho de que la síntesis de los mismos se realiza en dirección 3' a 5'. Este clón fue posteriormente cambiado por otro de la misma cepa en el que se comprobó la presencia del ATG iniciador.

Solucionado el problema anterior mediante eliminación de los dos ATGs existentes en el polilinker, la expresión transitoria mediante el uso del plásmido que contenía la ORF-5 de la cepa 4606 mostró, tras separar los extractos en geles de poliacrilamida, transferencia a sueros de nylon y enfrentar a un suero control positivo y a otro negativo, la existencia de una banda de reconocimiento a la altura aproximada de 25 KD que coincidía exactamente con la existente en la muestra correspondiente al semipurificado vírico. De este modo, quedaba confirmado que la ORF-5 del PRRSV codificaba la proteína de 25 KD como fue posteriormente corroborado (Meulenber, 1995). Sin embargo, en ningún caso utilizando el suero control positivo (dicho suero había sido producido inmunizando animales frente a la cepa española 5710) que usamos para todos nuestros experimentos conseguimos el reconocimiento inmunológico de la proteína descrita por varios autores que migra a la altura de 19 KD. Por el contrario, el reconocimiento de la proteína de 15 KD, atribuible a la nucleocápsida vírica, fue muy intenso, de hecho se ha señalado que la proteína de 15 KD es la más inmunogénica (Yoon y cols, 1995). Ha sido señalado por

algunos autores la falta de reconocimiento frente a la proteína de 19 KD bajo condiciones reductoras mediante el uso de un suero hiperinmune homólogo de conejo, así como el reconocimiento predominante de la proteína de 15 KD frente al resto de las proteínas víricas (Mardassi y cols, 1994).

La similitud existente entre el PRRSV, el EAV, y el hecho de que se haya comprobado por medio de anticuerpos monoclonales sintetizados frente a la proteína G1 del mismo virus, codificada por su ORF-5, que ésta es la responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a la enfermedad, o lo que es lo mismo, su capacidad de inducir la síntesis de anticuerpos que "in vitro" consiguen neutralizar el virus (Dereght y cols, 1994), nos hizo especular que posiblemente la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV pueda jugar también un papel importante en la infectividad del virus pudiendo funcionar en la unión a receptores celulares y /o en la penetración del virus en el citoplasma de la célula. Esta suposición vendría abalada porque algunos investigadores han señalado la existencia, en ocasiones, de una correlación entre la aparición de anticuerpos neutralizantes frente a la enfermedad y la detección por inmunoblot de anticuerpos frente a la proteína de 25-26 KD (Nelson y cols, 1994). Anticuerpos neutralizantes que en el caso del PRRS son de aparición tardía y de poca persistencia. El hecho de que los anticuerpos frente a las proteínas de 15 y 19 KD se produzcan de forma más temprana y la detección sea más fuerte ha sido atribuido a un posible mayor porcentaje de ambas en el virión o a un mayor poder inmunógeno de las mismas (Nelson y cols, 1994).

Una vez comprobada la expresión de la proteína, decidimos el clonar la ORF-5 del PRRSV en un nuevo vector, el pRSET con el fin de facilitar la purificación posterior de la misma. En este sentido se seleccionó el pRSET-A, que posibilitaba el clonaje en fase de nuestros insertos, transpasándose las ORFs correspondientes a las cinco cepas señaladas del pGEM al nuevo plásmido. Los experimentos de expresión transitoria en células Cos-1 infectadas con el virus vacuna-T7 y transfectadas con los plásmidos correspondientes a cada una de las

cepas, demostraron el reconocimiento por nuestro suero control de la totalidad de las proteínas codificadas por las ORFs-5 de los distintos aislados españoles. Esto nos llevó a la conclusión preliminar de que si bien podrían existir diferencias en secuencia de unos aislados a otros, como posteriormente se señalará, éstas no afectaban en gran manera al reconocimiento inmunológico por parte de un suero policlonal sintetizado frente a una de ella. Mas aun, la proteína E correspondiente a la cepa 5999 era reconocida mucho más intensamente que la 5710, hecho que se repitió en varias ocasiones, quizás debido a una mayor expresión de la misma. Aunque las ORFs-5 reconocidas por el suero control positivo provienen todos de aislamientos producidos entre 1991 y 1992 en Cataluña y Navarra éste hecho abre, al menos, un resultado esperanzador al uso de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV en el diagnóstico de la enfermedad o como inmunógeno en un futuro próximo.

Dado los bajos niveles de detección observados tras la expresión inicial en células Cos-1, decidimos la expresión de la proteína codificada por la ORF-5 vírica en un sistema procariota, lo que posee tanto ventajas; presumiblemente los niveles de expresión son mayores y con bajo coste de producción, como inconvenientes; ausencia de modificaciones postraduccionales como la ya señalada glicosilación de la proteína posibilitando la síntesis de proteínas en su estado nativo (Wrann y cols, 1992). Para ello, la cepa bacteriana BL21(DE3)pLysS fue transformada con los plásmidos pRSET-A a los que se les insertó las ORF-5 de las diferentes cepas. Las bacterias, que poseen el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el promotor LacUV5 inducible por IPTG, fueron inducidas para que el gen de la ORF-5 del PRRSV empezara a transcribirse. Cuando los extractos totales fueron recogidos, corridos en geles de poliacrilamida y enfrentadas al suero control positivo, sin embargo, no encontramos reconocimiento inmunológico de la proteína. Nos planteamos por ello que quizás por alguna razón no se estuviera expresando la proteína en procariotas para comprobar esta hipótesis, realizamos el marcaje radiactivo de las bacterias sin inducción y a diferentes tiempos post-inducción incorporando muestras con rifampicina que actúa inhibiendo la síntesis de las proteínas

bacterianas con lo que se evidencia en sobremanera la síntesis de la proteína bajo el promotor plasmídico de la ARN polimerasa del fago T7. Como se desprende de los resultados presentados (capítulo 2.3), tomando diferentes colonias apareció contantemente una banda proteica a la altura de aproximada de 24 KD, que no existía cuando las bacterias eran transformadas con plásmido sin inserto. Sin embargo, la expresión era diferente de unas colonias a otras aunque todas ellas fueron procesadas a la misma densidad óptica de 0.5, mas aun, se observó un retraso en el crecimiento muy significativo en relación a las bacterias transformadas con plásmido sin inserto. Todo esto nos llevó a sospechar que nuestro inserto podría ser tóxico para la bacteria, de hecho existen en la bibliografía amplias referencias a proteínas víricas que son tóxicas durante su expresión en sistemas bacterianos (Lama y cols, 1992), recomendándose en este caso la transformación del plásmido que contiene el gen tóxico en la cepa bacteriana utilizada, la BL21(DE3)pLysS. El hecho de que la lisina sintetizada por el plásmido pLys S sea un inhibidor de los niveles basales de la ARN polimerasa del fago T7, hace que se minimice la transcripción del gen tóxico que pudiera producirse incluso en ausencia del inductor IPTG (Studier y cols, 1990). Otra forma de minimizar la toxicidad de un gen es disminuir la temperatura de crecimiento a 30 °C. En nuestro caso, aunque se producía una mejora en el tiempo necesario para obtener la densidad óptica requerida, el retraso con respecto a las bacterias controles era notorio. Una posible respuesta era que el gen al ser tan tóxico para las bacterias hiciera que estas se liberaran del plásmido, sin embargo, cuando se plaqueaban paralelamente los cultivos en placas de LB y placas de LB con Ampicilina no se observó una disminución significativa en el número de colonias observadas en éstas últimas. Al ser nuestra proteína supuestamente una proteína asociada a membrana, se ha descrito que en muchas ocasiones éstas son tóxicas para bacterias porque se produce una interacción de la proteína sintetizada con la membrana bacteriana con la desorganización de la misma. Por ello, nos planteamos una posible estrategia basada en la eliminación del supuesto péptido señal, con lo cual debíamos cambiar la posición de la secuencia codificante de la cola de histidinas al extremo carboxi-terminal para posibilitar la purificación posterior. Finalmente, el

hecho de que cuando dichos extractos se procesaban para Western-Blot no se detectara reconocimiento inmunológico, o en muy poca medida, de la proteína que habíamos comprobado previamente por marcaje radiactivo su síntesis, hizo que abandonáramos los sistemas de expresión procariotas. Como ya se citó, las bacterias no son capaces de realizar una serie de modificaciones post-traduccionales que si tienen lugar en los sistemas eucariotas, los resultados obtenidos nos llevan a especular que éstas son, en gran medida, las responsables de la inducción de respuesta inmune por parte de la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV, quizás la ya comprobada glicosilación (Meulenberg, 1995).

Por todo ello, decidimos regresar a la expresión en sistemas eucariotas, y para ello debíamos incrementar los niveles de expresión hasta ahora obtenidos. En este sentido decidimos dos aproximaciones, por una parte mutagenizar el plásmido pRSET con el fin de adecuarlo más a sistemas eucariotas, y por otra parte la síntesis de un virus vacunal recombinante que llevara inserto la ORF-5 del PRRSV.

Es evidente que los mecanismos de iniciación son bastante diferentes en procariotas con respecto a eucariotas, donde en el extremo 3' de la subunidad 18s de su ARN ribosómico no existe la secuencia complementaria a la región de Shine-Dalgarno (Stormo y cols, 199). En eucariotas, los ribosomas requieren previamente la unión al extremo 5' de los mensajeros que poseen generalmente una estructura de tipo "cap". Debido a que tanto el codón de iniciación ATG como las secuencias flanqueantes al mismo sirven como señal de parada a la subunidad 40 del ribosoma en eucariotas para que se una a la región no codificante 5' de los ARNs e inicie la traducción (Kozak, 1986), pensamos que quizás la presentada por las proteínas expresadas a partir de las secuencias clonadas en el pRSET, un plásmido diseñado inicialmente para su utilización en sistemas procariotas, no era la adecuada para la expresión de la proteína en células animales. El estudio de la región no codificante del extremo 5' de 699 ARN mensajeros de vertebrados mostró la existencia de una secuencia más o menos consenso para la iniciación de la traducción en eucariotas

(Kozak, 1987). En este estudio se observó que en un 46 % de los ARN mensajeros testados, aparecía una guanina en posición +4 con respecto a la adenina del codón de iniciación; en un 55 % una citosina en posición -1; en un 97 % una base púrica en posición -3, siendo más frecuente (61%) que esta fuera una adenina; en el 53 % aparecía en posición -4 la citosina y en el 44 % era una guanina la base que ocupaba la posición -6. Por todo ello, decidimos mutagenizar el pRSET-A con el fin de que presentara estas cinco posiciones no presentes en el plásmido original con la intención, de hacer por ello mas eficiente la traducción de nuestra proteína en eucariotas.

El protocolo seguido fue descrito por Deng y Nickoloff (1992), basado en el anillamiento inicial de dos cebadores, el de selección y el de mutagénesis. Si bien la casa suministradora aconseja el empleo de ámbos en la misma concentración (100 ng), los resultados obtenidos en una primera aproximación no fueron fructuosos. Con posterioridad repetimos el experimento pero incluyendo 10 veces más concentración del plásmido a mutagenizar que del plásmido de selección. Esto produjo una mayor eficiencia en la obtención del plásmido final mutagenizado. Los malos resultados iniciales posiblemente se debieran al alto número de mutaciones a introducir, concretamente cinco cambios de bases, y a muy poca distancia entre si. La expresión de la proteína clonada en el nuevo vector mutagenizado, no produjo, en contra de lo esperado, un considerable aumento en los niveles de expresión de la misma, en contraposición a otros experimentos que demostraron la contribución sobre todo de los nucleótidos en las posiciones -1 y -6 mediante su cambio por mutagénesis dirigida (Kozak, 1986;1987).

Como siguiente aproximación para intentar incrementar los niveles de expresión obtenidos, se decidió la síntesis de un virus vacuna recombinante, al que se le incorporó la secuencia de la ORF-5 de la cepa 5999 del PRRSV en unión con la secuencia codificante del tag de histidinas, quedando todo ello bajo el control del promotor del bacteriófago T7 requiriendo, por ello, para su expresión la coinfección con el virus vTF7-3 que constitutivamente expresaba la ARN polimerasa de T7. El virus vacuna es un virus perteneciente a la familia de los

Poxvirus que posee un sistema transcripcional que permite la síntesis de ARN mensajeros funcionales que son poliadenilados, metilados y "capeados" (Moss y cols, 1990).

A pesar de que mediante el uso del virus vTF7-3 en conjunción con un plásmido en que la proteína a clonar esté bajo el promotor de T7 en células eucariotas se sintetizan elevados niveles de ARN del producto en cuestión, pudiendo alcanzar del 10 al 30 % de todos los ARN existentes en el citoplasma de la célula infectada y transfectada, se ha descrito que la formación de la estructura "cap" no es muy eficiente, de modo que únicamente de un 5 % a un 10 % de los ARNs sintetizados son "capeados" y metilados restringiéndose, por ello, la cantidad de proteína final sintetizada (Elroy-Stein y cols, 1989). El hecho de que los ARNs de los picornavirus, a diferencia de los ARN mensajeros celulares, no posean estructuras tipo cap, poseyendo en cambio una extensa región que no se traduce (UTR) que posibilita la unión a ribosoma independiente de cap (Elroy-Stein y cols, 1989), ha posibilitado el desarrollo de vectores como el utilizado por nosotros, el pTM-1, en el cual la UTR del virus de la encefalomiocarditis se sitúa detrás del promotor de T7, con incrementos en expresión de 4 o 5 veces los originales (Moss, 1990). El uso de este vector que posibilitó a su vez la síntesis del virus vacuna recombinante (vvPR-5) al poseer las zonas de recombinación homóloga con el virus vacuna salvaje, dió como resultado niveles de expresión en células Cos-1 superiores a los obtenidos hasta el momento, posibilitando la detección de la proteína mediante tinción por azul de Comassie, aunque a muy bajos niveles. Otra ventaja adicional fue el poder haber suprimido el uso de lipofectina en nuestros experimentos, lo que encarecía considerablemente el proceso.

El hecho de que la expresión de la proteína en células eucariotas doblemente infectadas (vTF7-3/VVPR-5) iba acompañado de un incremento en el número de células muertas en el sobrenadante en comparación con cultivos únicamente infectados con vTF7-3 hizo que emprendiéramos estudios para ver si ese efecto se debía a muerte celular por apoptosis (capítulo 2.5 de resultados), en este sentido ya

habiamos comprobado que la expresión de dicha proteína resultaba tóxica para bacterias. El fenómeno de apoptosis ligado a la infección por virus no es nuevo ya que muchos agentes víricos son capaces de producirlo como el virus Sindbis (Levine y cols, 1993), el herpesvirus bovino (Griebel y cols, 1990), o incluso el virus de la inmunodeficiencia humana (Laurent-Crawford y cols, 1991). Sin embargo, más desconocidos son los genes de los mismos capaces de codificar proteínas que actúan induciendo o previniendo dicho efecto. El hecho de que la proteína E del PRRSV sea capaz de producir apoptosis nos hace especular que la misma bien sola o acompañada por otras puede contribuir a la patogénesis del PRRSV. A este respecto nuestros estudios demuestran que aunque las dos líneas celulares utilizadas, una proveniente de una línea epitelial de riñón de mono y la otra de un neuroblastoma murino, son susceptibles al efecto apoptótico de la proteína E, sin embargo, en la línea neural el efecto se producía a tiempos más tempranos (9 horas en relación a 24 horas pi), lo que sugiere una mayor sensibilidad de la línea neural, no sabemos si ligada al diferente origen celular o a la diferente especie animal. De otra parte el efecto apoptótico, a diferencia del obtenido mediante la expresión de otros genes víricos, no fue susceptible de reversión mediante la expresión del proto-oncogén bcl-2 (Levine y cols, 1993), lo que puede atribuirse a que la vía de inducción de apoptosis es diferente a la regulada por dicha proteína o a que la regulación se ejerce a niveles más tardíos. Es indudable, que el hecho de que la proteína codificada por la ORF-5 sea capaz de producir apoptosis abre un nuevo campo de investigación que debe ir dirigido a saber, mediante la realización de mutantes, en que aminoácidos de la proteína radica dicha actividad y si cambios nucleotídicos en la misma en cepas de campo del PRRSV pudieran estar asociados a la aparición de cepas no patógenas o menos patógenas como se está observando en las explotaciones porcinas.

El siguiente objetivo a lograr era la purificación de la proteína así sintetizada. Para ello realizamos coinfecciones en células Cos-1 de ambos virus (vTF7-3/vvPR-5) a multiplicidad de infección 10, ya que ha sido la estimada con otras proteínas para la obtención de los mayores

niveles de expresión con este sistema (Fuerst y cols, 1987). Además, para la purificación de la proteína, utilizamos una resina de níquel-acetonitrilo, por la cual poseen afinidad las 6 histidinas presentes en la región amino-terminal de la proteína de fusión sintetizada. Varias proteínas han sido purificadas con la ayuda de este sistema fundamentalmente las expresadas en bacterias (Rose y cols, 1989; Gentz y cols, 1989), aunque algunas también sintetizadas en células animales (Janknecht y cols, 1991), y bajo condiciones desnaturalizantes o no.

Para nuestros intereses era muy interesante obtener una proteína con una conformación lo más nativa posible con la intención de obtener un antígeno de gran valor para la obtención de anticuerpos, por ello evitamos el uso de agentes desnaturalizantes como hidrocloreuro de guanidina. Sin embargo, el hecho de que únicamente tras su uso a concentraciones de 1M o superiores consiguiéramos su adhesión a la resina, nos hizo sospechar que la conformación que adoptaba la proteína de fusión en su síntesis hacía que la región de las histidinas no se encontrara accesible, por lo que al menos se requería un cierto grado de desnaturalización para hacer factible su purificación. Por esta misma razón y ya que la proteína permanecía fuertemente adherida a la resina, preferimos dejarla pegada para su uso como inmunógeno antes que separarla por procedimientos más drásticos que pudieran modificar más su conformación. En este sentido, el "tag" de histidinas, según especificaciones de la casa comercial suministradora, es poco o pobremente inmunógeno, y el uso de la resina como soporte quizás estimulara la inmunidad a nivel local. Además la presencia de la diana de reconocimiento de una enteroquinasa cerca al tag de histidinas, facilitaría en caso de que fuera necesario la liberación de la proteína del "tag" de histidinas.

Aunque conseguimos que la proteína en cuestión fuera la mayoritaria, sin embargo, siempre permanecieron otras proteínas de origen celular unidas a la resina. En este sentido, se ha señalado previamente que a diferencia de células bacterianas, en células de mamífero son abundantes las proteínas que contienen histidinas y por

ello tienden también a unirse a la columna de níquel aceto-nitrilo. Todo lo expuesto indica que el sistema, que es de gran utilidad para purificación de proteínas expresadas en bacterias, no es tan idóneo para la purificación de productos sintetizados en eucariotas. En un estudio realizado con objeto de purificar un factor de transcripción celular mediante su expresión en un virus vacunal recombinante en forma de proteína de fusión con un "tag" de histidinas y posterior purificación (Janknecht y cols, 1991), los autores, bajo condiciones no desnaturizantes, obtuvieron la proteína en cuestión prácticamente en pureza. No obstante, cuando la lisis de la suspensión celular se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes (con adición de hidrocloreuro de guanidina al tampón de lisis), no consiguieron obtenerla pura, debiendo someter a la proteína a un paso de purificación posterior mediante cromatografía en fase reversa.

La inoculación de ratones con la resina a la que se adhería la proteína, no indujo respuesta de anticuerpos frente a la misma detectables por Western-Blot tras varias inoculaciones con adjuvante de Freund. Tampoco se observó actividad neutralizante, ni detección de la proteína por la técnica de IPMA. Sin embargo, cuando los mismos se emplearon en inmunofluorescencia frente a cultivos de células MA-104 inoculadas con el virus, se observó la detección de la misma en forma granular con localización citoplasmática y preminentemente perinuclear. El hecho de que por Western-blot no se detectara la proteína puede sugerir que los sueros obtenidos no fueran capaces de reconocer la proteína tras el tratamiento desnaturizante a que se someten las muestras. Meulemberg y cols (1993) tras expresión de la ORF-5 del PRRSV en células eucariotas y realizar IPMA frente a las mismas con un policlonal ya había descrito la falta de reconocimiento de dicha ORF por esa técnica. Quizás el reconocimiento de la proteína por inmunofluorescencia, y la falta de reconocimiento por IPMA se deba a que en el primer caso las células fueron fijadas con metanol, con lo que se permeabiliza la membrana citoplasmática, mientras que en el segundo caso la fijación se realiza con paraformaldehído al 4%.

La localización de la proteína E del PRRSV en el citoplasma de las células en que se realiza su expresión no sólo se visualizó mediante el uso de los sueros provenientes de los ratones inmunizados, también con el uso del anticuerpo monoclonal que reconoce el péptido próximo al "tag" de histidinas se observó fluorescencia perinuclear y citoplasmática con posible asociación al aparato de Golgi. Meulenberg y cols (1995) señalaron que durante el proceso de maduración posiblemente la proteína E del PRRSV se transportara a través del aparato de Golgi donde tendrían lugar las modificaciones Golgi-específicas (entre ellas la glicosilación de la misma). En ningún caso observamos por fluorescencia mediante el uso de los anticuerpos señalados la localización de la proteína E en membrana citoplasmática. No obstante, desconocemos si el hecho de que la proteína se sintetice como proteína de fusión con un "tag" de histidinas pudiera alterar su localización real en células infectadas con el virus.

Otras posibles hipótesis que puedan explicar la falta de reconocimiento por Western-Blot de la proteína son el que la dosis inoculada fuera escasa para inducir respuesta frente a la misma, o un posible efecto negativo en la inducción de la respuesta inmune por el uso de un adyuvante oleoso. En este último sentido existe en el mercado español una vacuna inactivada en adyuvante oleoso habiéndose descrito la no inducción de anticuerpos frente a la enfermedad con la misma pareciendo, no obstante, conferir protección a los animales inmunizados. Este hecho ha sido sugerido también por otros autores ya que la producción de anticuerpos frente al PRRSV puede no ser necesariamente protectora e incluso se ha especulado un posible efecto estimulante de la infección por los mismos (Choi y cols, 1992). Si esto fuera cierto, se tendrían que medir otros parámetros, de tipo celular, para evaluar de forma correcta la inducción o no de protección por el virus y/o las proteínas sintetizadas por ingeniería genética.

Recientemente otro grupo ha realizado una aproximación similar a la nuestra para la purificación de la ORF-3 del PRRSV. Así, han clonado por PCR la secuencia que codifica la parte hidrofílica de la misma, eliminando el supuesto péptido señal, y han construido un Baculovirus

recombinante en el cual la proteína se expresa como proteína de fusión con un "tag" de histidinas (Katz y cols, 1995). La proteína así obtenida fue también utilizada para la inmunización de conejos previa unión a avridina como adjuvante. Desconocemos en dicho estudio la pureza con que se obtuvo dicha proteína o la dosis de proteína suministrada por conejo. El suero obtenido en los conejos inoculados no fue reactivo por Western-blot ni por inmunoprecipitación con la proteína vírica obtenida a partir de viriones purificados. Sólo se obtuvo por Western-blot, no así por inmunoprecipitación, un reconocimiento difuso en células infectadas con el LV, resultado que han atribuido a la aparición de epítomos reactivos y linealizados de una proteína no estructural del virus que sólo fueron detectados bajo las condiciones desnaturalizantes del inmunoblot.

A pesar de que el síndrome causado por el PRRSV parecía ser similar en EE.UU y europa, ya desde un principio existían diferentes hechos que abalaban la existencia de diferencias entre aislados víricos de ámbos continentes. Su diferente comportamiento serológico (Bautista, 1993), tropismo celular (Wensvoort, 1992), o diferencias en la detección de los mismos por anticuerpos monoclonales (Nelson, 1993). Esta conclusión también se ha observado a nivel de secuenciación de ácidos nucleicos, así dentro de las ORFs 5, 6 y 7 de aislados europeos y de EE.UU se han señalado similitudes del 54 %, 78 % y 58 % exclusivamente (Meng, 1994), con frecuentes inserciones y deleciones. Todo lo anteriormente expuesto ha hecho que algunos autores consideraran la existencia de dos genotipos diferentes, constituidos por las cepas europeas y norte americanas respectivamente. Por el contrario, los aislados europeos de PRRSV parecen estar altamente conservados entre ellos (Meng, 1995).

Con el fin de estudiar en profundidad la variabilidad existente entre cepas europeas del PRRSV realizamos la secuenciación de dos zonas del virus, una supuestamente más conservada, la ORF-7 y otra probablemente más variable, la ORF-5. El análisis de las secuencias obtenidas dentro del gen que codifica la nucleocápsida vírica indicaron que esta región es altamente conservada entre los aislados europeos

con porcentajes de similitud nucleotídica que oscilaban del 94.1-99.6 % entre cepas aisladas de diferentes países. Esta no excesivamente alta tasa de variabilidad en esta región parece esencial para la estabilidad del virus. El hecho de que la totalidad de las cepas europeas fueran susceptibles de ser amplificadas por los primers diseñados, justifica y apoya aún más el uso de los mismos con fines diagnósticos.

Dentro de la ORF-5, la proximidad genética entre aislados fue menor, con similitudes que variaban del 87.1 al 99.2 % entre cepas de diferentes países. No se observaron inserciones ni deleciones de nucleótidos entre las cepas europeas examinadas.

En relación a la traducción a proteínas, dentro de la ORF-7 la mayoría de las sustituciones nucleotídicas se realizaron en la tercera base, siendo por ello mutaciones que no produjeron cambios aminoacídicos. De hecho, los porcentajes de identidad aminoacídica en esta región vírica entre aislados de diferentes países oscilaron del 95.3 % al 100 %. En la ORF-5 los cambios fueron menos conservados alcanzándose similitudes de únicamente el 88 %.

En referencia a la evolución del virus tras su pase en MAP, o su adaptación a cultivo celular en un clón receptivo de la línea MA-104, se observó que tras 7 pases en macrófagos pulmonares, los porcentajes de similitud nucleotídica encontrados variaron del 100% para la ORF-7 al 99.2 % en la ORF-5. Comparando la variabilidad encontrada en la cepa 5710 adaptada a cultivo celular en relación a los pases 2 y 9 en macrófagos, se observaron porcentajes de similitud del 99.6 % para la ORF-7 y del 98.5 % para la ORF-5. Con respecto a la conversión a aminoácidos, se observó un máximo de 5 sustituciones (97.2% de identidad) entre la cepa adaptada a cultivo y el pase segundo en macrófagos alveolares porcinos, con una única sustitución aminoacídica dentro de la ORF-7 entre cepas crecidas en macrófagos y la adaptada a cultivo celular (99.6 % de identidad).

La cepa VP035 poseía importancia desde el punto de vista epidemiológico, porque había sido aislada de un brote agudo de la

enfermedad en la misma granja donde cuatro años antes se había dado un brote agudo por la cepa 5710. La similitud nucleotídica entre ambas es del 98.8 % para la ORF-7 en su pase segundo en macrófagos alveolares porcinos y del 98.4 % en el noveno. Con respecto a la ORF-5 variaba de 92.9 % al comparar con el pase 2 al 92.5 % de similitud en el pase 9, por lo que "a priori" no parece que provengan del mismo origen, pareciendo tratarse, mas bien, de una reinfección con una nueva cepa. Sin embargo, el hecho de que en 7 pases en macrófagos la cepa 5710 variase un 1.5% tampoco descarta totalmente la hipótesis del origen común.

Los resultados obtenidos nos permitieron la elaboración de sendos árboles filogenéticos dentro de las zonas analizadas. Dentro de la ORF-5 destaca la existencia de dos ramas bien diferenciadas, una de ellas agruparía a las cepas francesas, holandesas y belgas a su vez agrupadas en una "sub-rama". Sorprendentemente, un aislado español, el denominado 1468 se agrupa con las cepas holandesas y francesas, esto puede sugerir que dicho aislado provenia de la importación de cerdos de Holanda o Francia, o aunque más discutible por la barrera geográfica que suponen los pirineos, via aerógena de territorio francés. En este sentido, se ha admitido que el virus puede difundir via aerógena a una distancia aproximada de 20 Kms (De Jong y cols, 1991). La otra rama incluye al resto de las cepas españolas. La cepa VP035 muestra una mayor proximidad genética con las cepas 2228 y 705 que con la 5710. El aislado italiano (PRRSV 2156) difiere considerablemente de cualquiera de las otras cepas evaluadas, pudiendosele considerar un linaje separado.

Con respecto al árbol filogenético obtenido con las secuencias de la ORF-7, aunque no se soporta estadísticamente, debido probablemente al bajo número de mutaciones observados en las secuencias, también se observa la mayor diversidad de la cepa 2156, y la agrupación de cepas del norte de europa en relación a las de los países del sur del continente.

De los estudios realizados podemos concluir en la menor tasa de variabilidad entre aislados europeos con respecto a la descrita entre aislados europeos y norte americanos, el que dicha variabilidad es mayor en determinadas regiones del genóma vírico que en otras como ya ha sido descrito en otros virus ARN (Domingo y cols 1986) y que aunque de modo ligero, dentro del mismo continente europeo, se tienden a observar agrupaciones en la proximidad genética entre aislados de países cercanos. Posiblemente determinadas barreras geográficas puedan funcionar como determinantes para la diferenciación de diferentes variantes víricas.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1.- Se ha puesto a punto una técnica de PCR para el diagnóstico del PRRSV mediante el uso de cebadores dentro de la ORF-7 del virus. Dicha técnica se muestra altamente sensible y específica.
- 2.- Se ha clonado la ORF-5 del PRRSV y se ha expresado la proteína codificada por la misma tanto en *E. coli* como en células eucariotas.
- 3.- La expresión de la proteína codificada por la ORF-5 resulta tóxica para *E. coli*, existiendo poco o ningún reconocimiento de la misma por el suero sanguíneo de un animal infectado experimentalmente con el PRRSV.
- 4.- Los niveles de expresión obtenidos tras la transfección en células eucariotas de plásmidos que contienen la ORF-5 del PRRSV, e infección simultánea con el virus vTF7-3, fueron escasos. La modificación de la zona de unión a ribosomas con el fin de hacerlos más idóneos a sistemas eucariotas, no produjo un aumento considerable en los rendimientos de proteína obtenidos.
- 5.- El PRRSV produce apoptosis tanto en cultivos primarios de MAP como en la línea celular MA-104.
- 6.- En este proceso estaría involucrada, al menos, la proteína codificada por la ORF-5 del PRRSV que es capaz de producir apoptosis en líneas celulares de diversos orígenes. La apoptosis inducida por la proteína E del PRRSV no es inhibida por la expresión del proto-oncogén bcl-2.
- 7.- Se ha purificado parcialmente la proteína codificada por la ORF-5 tras su expresión en células eucariotas mediante la síntesis de un virus vacunal recombinante que expresa dicha proteína en forma de proteína de fusión con un "tag" de histidinas. Dicho sistema requiere la coinfección con el virus vTF7-3.
- 8.- El suero de ratones inoculados con dicha proteína, si bien no produjo reconocimiento de la misma por Western-blot, ni actividad neutralizante, permitió el reconocimiento de la misma por Inmunofluorescencia en el citoplasma de las células infectadas con tendencia a localizarse en la región perinuclear.

9.- El estudio de la variabilidad existente en cepas europeas dentro de dos ORFs del PRRSV indican una menor diversidad antigénica entre países de proximidad geográfica con respecto a otros situados en lugares más lejanos. Dentro del mismo país se observa una menor variabilidad con respecto a cepas de otros países.

VII. BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- Albina, E; Leforban, Y; Baron, T; Plana Durán; J; Vannier, P. (1992). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Ann Rech Vet; 23, 167-176.

- Anelli, J. (1990). The impact of SIRS on international Trade. American Assoc Swine Pract News; 4, 49.

- Anelli, J. (1992). Swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) in North America. American Assoc Swine Pract News. 4; 28-29.

- Bane, D.P; Hall, W.F. (1990). Fumonisin as a predisposing factor for Mystery Swine Disease. Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Conserv Inst. 1 ; 77-79.

- Bane D.P; Neumann, E.J; Hall, W.F; Harlin, K.S; Slife, R.L. (1992). Relationship between fumonisin contamination of feed and mystery swine disease-a case-control study. Mycopathologia; 117, 121-124.

- Bautista, E.M; Goyal, S.M; Yoon, I.J; Joo, H.S. (1992). Comparison of swine alveolar macrophages and cell line 2621 for the detection of SIRS virus and its antibody. In Proceedings of International Symposium on SIRS/PRRS/PEARS. Minnesota, p 26.

- Benfield, D.A; Nelson, E; Collins, J.E; Harris, L; Goyal, S. M; Robinson, D; Christianson, W.T; Morrison, R.B; Garcyca, D; Chladek, D. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J Vet Diagn Invest; 4, 127-133.

- Benfield, D; Harris, L; Nelson, E; Christopher-Hennigs, J; Collins, J; Chladek, D; Christianson, W; Morrison, R; Garcyca. (1992). Properties of SIRS virus isolate ATCC VR-2332 in the United States and preliminary characterization of a monoclonal antibody to this virus. American Assoc Swine Pract News; 4, 19-21.

- Birnboim, H.C; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acid res; 7, 1512-1513.

- Blackburn, P.W; Meredith, M.J; Robertson, I.B; Wensvoort, G; Albina, E. (1992). Telephone conference (2nd) on "blue-eared pig disease" (PRRS), London unit for Veterinary continuing education.

Bibliografía

- Blaha, T. (1992). Epidemiological investigations into PEARs in Germany: consequences in fattening pigs. Proceedings of the 12th congress international pig veterinary society. The Netherlands 1, 126.
- Bolin, C; Casselles, J. (1990). Reproductive Failure in swine associated with Leptospira interrogans serovar bratislava infection. Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Conserv Inst. 1 ; 73-75.
- Botner, A. (1995). Diagnosis of PRRS. In: Proceedings of the Second International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, August 9-10, Copenhagen, Denmark, p 113.
- Bournsnel, M.E.G; Brown, T.D.K; Foulds, I.J; Green, P.F; Tomley, F.M; Binns, M.M. (1987). Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. J. Gen. Virol; **68**, 57-77.
- Brinton-Darnell, M; Collins, J.K; Plagemann, P.G.W. (1975). Lactic dehydrogenase-elevating virus replication, maturation and viral RNA synthesis in primary mouse macrophage cultures. J Virol; **65**, 187-195.
- Busse, F.W; Alt, M; Janthur, I; Neumann, W; Schoss, A.P. (1992). Epidemic studies of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARs) in lower sasonry on Germany. Proceedings of the 12th congress international pig veterinary society. The Netherlands 1, 115.
- Chen, Z; Faaberg, K; Plagemann, P.G.W. (1994). Detection of negative-stranded subgenomic RNAs but not of free leader in LDV-infected macrophages. Vir Res; **34**, 167-177.
- Christianson, WT; Collins, J.E; Benfield, D.A; Harris, L; Gorcyca, D.E; Chladek, D.W; Robinson, R.B; Joo, H.S. (1992). Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) in sows. Am J Vet Res, **53**, 485-488.
- Christianson, WT; Choi, H.S; Collins, J.E; Molitor, T.W; Morrison, R.B; Joo, H.S. (1993). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. Can J Vet Res;

Bibliografía

- Christopher-Hennings, J; Nelson, E.A; Benfield, D.A. (1992). Evaluation of the antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS) by indirect fluorescent antibody (IFA), virus neutralization (VN) and immunoblotting. *73 Con Res Work Ani Dis. Chicago. 11/9-10; 166.*

- Choi, C.S; Christianson, W; Gustafson, K; Molitor, T.W. (1992). Antibody dependent enhancement of PRRS virus replication. *73 Con Res Work Ani Dis. Chicago. 11/9-10; 65.*

- Chomczynsky, P.Y; Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Bioche: 162, 156-159.*

- Clark, J.M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nuc. Acid. Res.: 16, 9677-9686.*

- Clarke, P.G.H. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol: 181, 195-213.*

- Collins, J.E; Benfield, D.A; Christianson, W.T. (1991). Swine infertility and respiratory syndrome (mystery swine disease). *Proc Minn Swine Conf Vet 1: 200-205.*

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

- Conley, E.C; Saunders, J.R. (1984). Recombination-dependent recirculation of linearized pBR322 plasmid DNA following transformation of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet: 194, 211.*

- Conzelmann, K; Visser, N; Van Woensel, P; Thiel, H. (1993). Molecular characterization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus, a member of the Arteritis virus group. *Virology: 193, 329-339.*

- Coutelier, J.P; van Roost, E; Lambotte, P; van Snick, K. (1986). The murine antibody response to lactato-dehydrogenase elevating virus. *J Gen Vir: 67, 1099-1108.*

Bibliografia

- Crawford, T.B; Henson, J.B. (1973). Proc. Int. Conf. Equine Infect. Dis., 3rd, Paris, 1972, 282-302.
- Cromwijk, W. (1991). The new pig disease-further observations in Dutch herds. European Comm Seminar on the New Pig Disease. Brussels. 4; 29-30
- Daniels, E.K. (1990). Chlamydia proteins founds in swine reproduction failure cases. Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Conserv Inst. 1 ; 80-81.
- Dea, S; Bilodeau, R; Athanaseous, R; Sauvageau, R.A; Martineau, G.P. (1992). PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. Vet Rec; 130, 167.
- Dea, S; Bilodeau, R; Athanaseous, R; Sauvageau, R; Martineau, G.P. (1992). PRRS in Quebec: virologic and pathologic aspects. American Assoc Swine Pract News; 4, 2-7.
- Dee, S.A. (1993-a). An effort to eradicate PRRS. Swine practitioner May, 18-20.
- Dee, S.A; Morrison, R.B; Joo, H.S (1993-b). Eradicating porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus using two-site production and nursery depopulation. Swine Health and Production; 1, 20-23.
- deen Boon, J.A; Snijer, E.J; Chirnside, E.D; de Vries, A.A.F; Horzinek, M.C; Spaan, W.J.M. (1991). Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronavirus like superfamily. J Virol; 65, 2910-2920.
- Deng, W.P; Nickoloff, J.A. (1992). Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. Anal. Biochem; 200, 81.
- Deregt, D; de Vries, A; Raamsman, M; Elmgren, L.D; Rottier, P. (1994). Monoclonal antibodies to equine arteritis virus protein identify the GL protein as a target for virus neutralization. J. Gen. Virol; 75, 2439-2444.
- De Jong, M. F; Cromwijk, W; Van Veld, P. The new pig disease: epidemiology and production losses in the Netherlands (1991). European Comm Seminar on the New Pig Disease. 4 29-31.

- de Jong, M.F; Veld, P; Cromvijk, W. (1991). The epidemiology of PRRS in the Netherlands. Proc Meet PRRS. The new pig dis; Comm Eur Commun 2: 2-7.
- de Vries, A.A.F; Chirniside, E.D; Bredenbeck, P.J; Gravestain, L.A; Horzinek, M.C; Spaan, W.J.M. (1990). All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. Nucleic Acids Res; 18, 3241-3249.
- Dial, G. D; Hull, R.D; Olson, C.L; Hill, H.T; Erickson, G.A. (1990). Implications and Needs of the North American Swine Industry. Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Conserv Inst. 1 ; 3-6.
- Doll, E.R; Bryans, J.T; McCollum, W.H; Crow, M.E.W. (1957). An outbreak of abortion caused by equine arteritis virus. Cornell Vet; 47, 3-41.
- Domingo, E; Holland, J.J. Ahlquist, P. (1988). RNA genetics, vol 3. Variability of RNA genomes. CRC Press. Boca Ratón.
- Done, S; Lanz, I; Paton, D; Brown, I; Higgins, R; Hannam, D. (1992). Comparatie pathology of viral respiratory infections in pigs. American Assoc Swine Pract News; 4, 26-27.
- Earl, P.L; Moss, B. (1992). Current Protocols in Molecular Biology. Edited by Ausubel, F; Brent, R; Kingston, R; Moore, D; Siedman, J.G; Smith, J; Struhl, K. Greene Publishing associates and Wiley-Interscience. Cap 16.
- Edwards, S; Robertson, I.B; Willesmith, J; Ryan, J; Kilner, C; Paton, D; Drew, T; Brown, I; Sands, J. (1992). PRRS (Blue-eared pig disease) in Great Britain. American Assoc Swine Pract News. 4: 32-36.
- Efron, B. (1982).The jackknife, the bootstrap and another resampling plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia.
- Elazhary, Y; Weber, J; Bikour, H; Morin, M; Girad, C. (1991). Mystery swine disease in Canada. Vet Rec; 129, 495-496.
- Elroy-Stein, O; Fuerst, T; Moss, B. (1989). Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the

Bibliografía

performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa; 86, 6126-6130.

- Erickson, G.A. (1990). Mystery Swine Disease: Other Potential Etiologies. Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Consev Inst. 1 ; 82-87.

- Fuerst, T; Earl, P; Moss, B. (1987). Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. Mol. Cell. Bio; 7, 2538-2544.

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution; 39, 783-791.

- Gentz, R; Chen, C; Rosen, C. (1989). Bioassay for trans-activation using purified human immunodeficiency virus tat-encoded protein; Trans-activation requires mRNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 86, 821-824.

- Godeny; E.K; Speicher, D.W; Brinton, M.A. (1990). Map localization of lactate dehydrogenase elevating virus (LDV) capsid protein (VP-1) gene. Virology; 177, 768-771.

- Godeny, E.K; Chen, L; Kumar, S.N; Koonin, E.V; Brinton, M.A. (1993). Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of lactate dehydrogenase elevating virus (LDV). Virology; 194, 585-596.

- Goovaerts, D; Visser, N. (1992). Vascular lesions in pigs infected with PRRS. 12 Int Pig Vet Soc. The Hague. 8/17-20; 129.

- Gorcyca, D; Schlesinger, K; Chladek, D.W; Behan, W; Polson, D.D; Roff, M; Doitchenoff, D. (1995). RespPRRS; a new tool for the prevention and control of PRRS in pigs. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners. 26th Annual Meeting, 1-22.

- Graham, R.C; Lundholm, U; Karnovsiky, M.J. (1965). Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. J Histoche Cytoche; 13, 150-152.

- Gravell, M; London, W.T; Rodriguez, M; Palmer, A.E; Hamilton, R.S. (1980). Simian haemorrhagic fever (SHF): new virus isolate from a chronically infected patas monkey. J Gen Virol; 51, 99-106.

Bibliografia

- Gravell, M; London, W.T; Leon, M.E; Palmer, A.E; Hamiltono, R.S. (1986). Proc Soc Exp Biol Med, 181, 112-119.
- Griebel, P.J; Ohmann, H:B; Lawman, M.J.P; Babiuk, L.A. (1990). The interaction between bovine herpesvirus type 1 and activated bovine T lymphocytes. J Gen Virol; 7, 369-377.
- Halbur, P.G, Andrews, J.J; Huffman, E.L; Paul, P.S, Meng, X, Niyo, Y. Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. J Vet Diagn Invest; 6, 254-257.
- Hanahan, D. (1987). Studies on transformation of E. coli with plasmid. J. Mol. Biol; 166, 557-561.
- Harlow, E; Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Harty, J.T; Chan, S.P.K; Plagemann, O.G.W. (1987). Characteristics of monoclonal antibodies to the lactate dehydrogenase-elevating virus. Intervirology; 27, 53-60.
- Harry, T.O; McCollum, W.H. (1981). Stability of viability and immunizing potency of lyophilized, modified equine arteritis live-virus vaccine. Am J Vet Res; 42, 1501-1505.
- Hill, H. (1990). Overview and history of mystery swine disease (swine infertility and respiratory syndrome virus). In: Proc. mystery swine disease comitee meeting. Denver, October, 6, 1990. Livestock conservation institute. Madison, 29-31.
- Hoefling, D.C. (1990). Pathology and pathogenesis of mystery disease. MSD Com Mtg. Denver; Livestock Conservation Institute. 10; 50-51.
- Hooper, S.A; White, M.E; Twiddy, N. (1992). An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pigs herds in Great Britain. Vet Med; 131, 140-144.

Bibliografia

- Hooper, C.C; Van Alstine, W.G; Stevenson, G.W; Kanitz, C.L. (1994). Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. J Vet Diagn Invest; 6, 13-15.

- Horzinek M.C; van Wielink, P.S; Ellens, D.J. (1975). Purification and electron microscopy of lactic dehydrogenase virus of mice. J Gen Vir; 26, 217-226.

- Houge, G; Robaye, B; Eikhom, T.S; Golstein, J; Mellgren, G; Gjertsen, B.T; Lanotte, M; Doskeland, S.O. (1995). Fine mapping of 28S rRNA sites specifically cleaved in cells undergoing apoptosis. Mol Cel Biol; 15, 2051-2062.

- Hyllseth, B. (1969). A plaque assay of equine arteritis virus in BHK-21 cells. Arch Gesmte Virusforsh, 28, 26-33.

- Hyllseth, B. (1970). Neutralization of equine arteritis virus: enhancing effect of guinea pig serum. Arch Gesmte Virusforsh, 322: 337-347.

- Hyllseth, B. (1973). Buoyant density studies on equine arteritis virus. Arch Gesmte Virusforsh, 30, 97-104.

- Janknecht, R; Martynoff, G; Lou, J; Hipskind, R.A; Nordheim, A; Stunnenberg, H.G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 88, 8972-8976.

- Jensen, M.H. (1981). Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine diarrhea virus in porcine serum. Acta Ver Scand; 22, 85-98.

- Joo, H:S; Christianson, B; Kim, H. (1990). Encephalomyocarditis virus as a potential cause for mystery swine disease. Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Conserv Inst. 1 ; 62-66.

- Jukes, TH., Cantor, CR. (1969). Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) Mamalian protein metabolism. Academic Press, New York, p 21.

- Katz, J.B; Shafer, A; Eernisse, K.A; Landgraf, J.G; Nelson, E. A. (1995). Antigenic differences between european and american isolates of porcine reproductive and respiratory virus syndrome (PRRS) virus are encoded by

the carboxyterminal portion of viral open reading frame 3. Vet Microbiol; **44**, 65-76.

- Keffaber, K.K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract Nexsl*. 1: 1-10.

- Keffaber, K.K; Stevenson, G.W; van Alstine, W.G; Kanitz, C.L; Harris, L; Gorcyca, D; Schlesinger, K; Schultz, R; Chladek, D.W; Morrison, R. SIRS virus infectin in nursery/grower pigs. (1992). In; Proceedings of International symposium on SIRS/PRRS/PEARS, Minnesota, p 30.

- Kim, H. S; Kwang, J; Yoon, I.J; Joo, H.S; Frey, M.L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory virus syndrome (PRRS) virus in a homogenous subpopulation of MA-104 cell line. Arch Virol; **133**, 477-483.

- Komijn, R.E. (1991). The possible effect of weather conditions on the spread of the new disease. *Proc Meet PRRS -the New Pig Dis, Comm Eur Commun* 2: 28-31.

- Kozak, M. (1987). An analysis of 5' encoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nuc. Acid. Res; **20**, 8125-8132.

- Kroll, D.J; Abdel-Malek, H; Marcell, T; Simpson, S; Chen, C; Gutierrez-Hartmann, A; Lustbader, J.W; Hoeffler, J.P. (1993). A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification and selective detection. DNA and Cell Biology; **12**, 441-453.

- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (1994). MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. Comput Appl Biosci; **10**, 189-191.

- Kuo, L; Harty, J.T; Erickson, L; Palmer, G.A; Plagemann, P.G.W. (1991). A nested set of eight RNAs is formed in macrophages infected with lactate-dehydrogenase elevating virus. J Virol; **65**, 5118-5123.

- Laemmli, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature; **227**, 680-685.

Bibliografía

- Laurent-Crawford, A.G; Krust, B; Muller, S; Riviere, Y; Rey-Cuille, M.A; Bechet, J.M; Montagnier, L; Hovanessain, A.B. (1991). The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. Virology; 185, 829-839.
- León-Monzón, M.E; Hamilton, R.S; Gutensohn, O; London, W.T; Gravell, M. (1991). Enviado a publicar.
- Levine, B; Huang, Q; Isaacs J.T; Reed, J.C; Griffin, D.E; Harwick, J.M. (1993). Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. Nature; 361, 739-742.
- Lo, S; Biasolo, M.A; Dehni, G; Palú, G; Haseltine, W.A. (1992). Inhibition of replication of HIV-1 by retrovirus vectors expressing tat-antisense and anti-tat ribozyme RNA. Virology; 190, 176-183.
- Loula, T. Mystery pig disease. (1991). Agri-Practice; 12, 23-34.
- Loula, T. United states seedstock industry results. (1992). American Assoc Swine Pract News. 4; 45-46.
- Loula, T. (1995). Weaning early for higher health. Pig international; 25, 31-32.
- Maniatis, T; Fritsch, E.F; Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Magar, R; Larochelle, R; Robinson, Y; Dubuc, C. (1993). Immunochemical Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Using Colloidal Gold. Can J Vet Res, 57, 300-304.
- Mardassi, H; Athanassious, R; Mounir, S; Dea, S. (1994). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Can J Vet Res; 58, 55-64.
- McCollum, W.H; Doll, E.R; Wilson, J.C; Johnson, C.B. (1961). Propagation of equine arteritis virus in monolayer culture of equine kidney. Am J Vet Res; 22, 731-735.

Bibliografia

- McCollum, W.H; Doll, E.R; Wilson, J.C; Cheatham, J. (1962). Isolation and propagation of equine arteritis virus in monolayer cell cultures of rabbit kidney. Cornell Vet; 52, 452-458.
- McCollum, W.H; Prickett, M.E; Bryans, J.T. (1971). Temporal distribution of EAV in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. Res Vet Sci; 2, 459-464.
- McCollum, W.H. (1976). Studies of passive immunity in foals to equine viral arteritis. Vet Microbiol; 1, 45-50.
- McCollum, W.H. (1986). Responses of horses vaccinated with avirulent modified-live equine arteritis virus propagated in the E. Derm (NBL-6) cell line to nasal inoculation with virulent virus. Am J Vet Res, 47, 1931-1934.
- Meng, X.J; Paul, P.S; Halbur, P.G; Lum, M.A. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF-6) and N (ORF-7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. Arch Virol; 140, 745-755.
- Mengeling, W.L; Lager, K.M. (1990). Mystery pig disease: evidence and considerations for its etiology. Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Conserv Inst. 1 ; 88-90.
- Meredith, M.J. (1991). "Blue-eared" disease epidemic. Pig news and information; 12, 363.
- Meredith, M.J. (1992). Review of porcine reproductive and respiratory syndrome. Pig disease information centre, University of Cambridge. Cambridge. England.
- Meredith, M.J. (1995). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. Pig Disease Information Centre, p 11.
- Meulenbergh, J.J.M; Hulst, M; de Meijer, E; Moonen, P; den Besten, A; Kluyver, E; Wensvoort, G; Moormann, R. (1993). Lelystad virus, the causative agent of Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology; 192, 62-72.

Bibliografia

- Meulenbergh, J.J.M; de Meijer, E.J; Moormann, R.J.M. Characterization of the gene products of ORF 2 to 7 of Lelystad virus (LV). In: IX International congress of virology. Glasgow - Scotland. 8-13 August of 1993.
- Meulenbergh, J.J.M; den Besten, A; de Kluyver, E; Moormann, R; Schaaper, W; Wensvoort, G. (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. Virology; 206, 155-163.
- Michaelides, M.C; Schlesinger, S. (1973). Structural proteins of lactic dehydrogenase virus. Virology; 55, 211-217.
- Molitor, T; Leitner, G; Choi, C; Risdahl, J; Roscoe, K; Collins, J. (1992). Modulation of host immune response by SIRS virus. American Assoc Swine Pract News; 4, 27-28.
- Moore, C; Bilodeau, R; Wiseman, B. (1990). Clinical aspects and consequences of mystery swine disease in nursery and grow-finish pigs. Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Conserv Inst. 1 ; 41-49.
- Morin, M; Girar, C; El Azhary, Y; Fajardo, R; Drolet, R; Lagace, A. (1990). Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs; a newly recognized disease. Can. Vet. J; 31, 837-839.
- Morin, M; Robinson; Y. (1991). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Quebec. Vet Rec; 129, 367-368.
- Morin, M; Robinson; Y. (1992). Causes of Mystery swine disease. Can Vet J; 33, 6.
- Morrison, R.B; Collins, J.E; Harris, L; Christianson, W; Benfield, D.A; Chladek, D.W; Gorcyca, D.E and Joo, H.S. (1992). Serologic evidence incriminating an unidentified virus as the cause of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). J Vet Diagn Invest; 4, 186-188.
- Moss. B; Elroy-Stein, O; Mizukami, T; Alexander, W.A.; Fuerst, T.R. (1990). New mammalian expression vectors. Nature; 348: 91-92.
- Mumford; J. (1985). Preparing for equine arteritis. Equine Vet J; 17, 6-11.

Bibliografia

- Nelson, E.A; Christopher-Hennings, J; Drew, T; Wensvoort, G; Collins, J.E; Benfield, D.A. (1993). Differentiation of U.S and European isolates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Monoclonal antibodies. J Clin Microbiol; 31, 3184-3189.
- Nelson, E.A; Christopher-Hennings, J; Benfield, D.A. (1994). Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. J. Vet. Diagn. Invest; 6, 410-415.
- Nielsen, T.L; Have, P; Hoff-Jorgesen, R; Heisel, C; Baekbo, P; Borner, A. (1995). Examination of PRRS-virus-shedding in semen from vaccinated and non-vaccinated boars. In: Proceedings of the Second International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, August 9-10, Copenhagen, Denmark, p 26.
- Onyekaba, C.O; Harty, J.T; Even, C; Hu, B; Plageman, P.G.W. (1989-I). Persistent infection of mice by lactate dehydrogenase elevating virus: effects of immunosuppression on virus replication and antiviral immune response. Vir Res; 14, 297-316.
- Onyekaba, C.O; Harty, J.T; Plagemann, P.G.W. (1989-II). Extensive cytocidal replication of lactate dehydrogenase-elevating virus in cultured peritoneal macrophages from 1-2 week old mice. Vir Res; 14, 327-338.
- Ohrlinger V.H; Ahl, R; Haas, B; Mettenleiter, T.C; Rziha, H.J; Straub, O.C; Weiland, F. (1991). PRRS laboratory studies at Tubingen and other German laboratories. European Comm Seminar on PRRS. Brussels.11; 4-5.
- Ohrlinger, V. (1992). PRRS/Blue ear disease/ SIRS monthly newsletter. Meredith, M, Ed. Pig Dis Info Center, Cambridge, Dec 1992.
- Ohrlinger, V; Haas, B; Sallmüller, A; Beyer, J; Teuffert, J; Visser, N; Weiland, F. (1992). In vivo and in vitro studies on the immunobiology of PRRS. International symposium on Swine Infertility and Respiratory Syndrome, St Paul, Minnesota.
- Parvin, J.D; Moscona, A; Pan, W.T; Leider, J.M; Palese, P. (1986). Measurement of the mutation rates of animal viruses; Influenza A virus and poliovirus type I. J. Virol; 59, 377-383.
- Paton, D.J; Brown, I.H; Edward, S. (1991). Blue disease of pigs. Vet Rec;

29, 617.

- Paton, D.J; Drew, T.W; Brown, I.H; Edwards, S; Done, S.H. (1992). Laboratory diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Pig Veterinary Journal; 29, 188-192.

- Pesch, S; Heinen, E; Schmeer, N; Ohrlinger, V.F. Antigenic variations between different PRRSV isolates. In: Proceedings of the Second International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, August 9-10, Copenhagen, Denmark, p 7.

- Plageman, P. (1992). LDV, EAV and SHF: A new group of positive-stranded RNA viruses. American Assoc Swine Pract News; 4, 8-15.

- Plageman, P; Moenning, V. (1992). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: A new group of positive-strand RNA viruses. Adv Vir Res; 41, 99-192.

- Plana Durán, J.A; Vayreda, M; Vilarrasa, J; Bastons, M; Pourquet, L; Urniza, A. (1992). Enfermedad reproductiva y respiratoria de la cerda (Mystery pig disease). Resumen de los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo sobre esta enfermedad. Med Vet; 9, 407-411.

- Plana Durán, J; Climant, I; Urniza, A; Casal, I. (1995). In: Proceedings of the Second International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, August 9-10, Copenhagen, Denmark, p 49.

- Pol, J:M:A; van Dijk; J.E; Wensvoort, G; Terpstra, C. (1991). Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimental induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). Vet Q; 13, 137-143.

- Pol, J; Wagenaar, F; Broekhuijsen-Davies, J; Wensvoort, G. (1992) The morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. The Hague.12 Int Pig Vet Soc; 8/17-20, 127.

- Polson, D:D; Marsh, W.E; Dial, G.D. (1990). Mystery swine disease. Proc Mystery Dis Comm Meet Lifest Conserv Inst; 1, 8-28.

Bibliografía

- Ramos, J; Pujols, J; Domingo, M; Miller, M; Roseel, R; Badiola, I; Perez de Rozas, A; Majo, N; San Gabriel, A. (1992). Experimental infection of weaner pigs with PRRS. American Assoc Swine Pract News; 4, 25.
- Reotutar, R. (1989). Swine reproductive failure syndrome mystifies scientists. JAVMA; 195, 425-428.
- Riley, V; Lilly, F; Huerto, E; Bardell, D. (1960). Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasms. Science; 132, 545-547.
- Riley, V; Spackman, D.H; Santisteban, G.A; Dalldorf, G; Hellstron, I; Hellstron, K.E; Lance, E.M; Rowson, K.e.K; Mahy, B.W.J; Alexander, P; Stock, C.C; Sjögren, H.D; Hollander, V.P; Capps, W.I. (1978). The LDH virus; an interfering biological contaminant. Science; 200, 124-126.
- Robertson, I.B. (1991). The epidemiology of PRRS in the United Kingdom European Comm Seminar on PRRS. 11/ 4-5 Brussels.
- Rowson, K.E.K; Mahy, B.W.J. (1985). Lactate dehydrogenase-elevating virus. J Gen Vir; 66, 2297-2312.
- Rossow, F; Bautista, E; Goyal, S; Murtaugh, M; Molitor, T; Morriuson, R; Benfield, D; Collins, J. (1992). The effect of pig age on clinical disease and immunopathogenesis of SIRS virus infection. American Assoc Swine Pract News. 4; 26.
- Sagripanti, J.L. (1985). Polyadenylic acid sequences in the genomic RNA of the Togavirus of simian haemorrhagic fever. Virology; 145, 350-355.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.
- Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning; a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Sanz, M.A; Perez, L; Carrasco, L. (1994). Semliki forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in *Escherichia coli* cells. J. Biol. Chem; 269, 12106-12110.

Bibliografia

- Sanz, A; Miguet, J.G; Cortes, E; Sarraseca, J; Climent, G; Plana Duran, J; Casal, I. (1995). Development of Diagnostic Assays for Antibodies to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus using Monoclonal Antibodies and a Recombinant Antigen. In: Proceedings of the Second International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, August 9-10, Copenhagen, Denmark, p 17.
- Skalka, M.J; Matyasova, J; Cejkova, M. (1976). DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissue degrades in vivo into regular fragments. FEBS Lett; 72, 271-274.
- Snijer, E.J; Horzyker, M:C; Spaan, W.J.M. (1990). A 3' coterminal nested set of independently transcribed mRNAs is generated during Berne virus replication. J Virol; 64, 331-338.
- Spaan, W.J.M; Cavanagh, D; Horzinek, m.C. (1988). Coronaviruses: Structure and genome expression. J Gen Virol; 69, 2939-2952.
- Spaan, W.J.M; den Boon, J.A; Bredenbeck, P.J; Chimsie, E.D; Noten, A.F.H; Snijder, E.J; de Vries, A.A.F; Horzinek, M.C. (1990). In "New Aspects of Positive Strand RNA viruses" (M.A Brinton and F. X Heinz, eds.), 12-19. A., Soc. Microbiol., Washington, D.C.
- Steinhauer, D.A; Holland, J.J. (1987). Rapid evolution of RNA viruses. Ann. Rev. Microbiol; 41, 409-433.
- Stockhofe-Zurwieden, N; Navarro, J.A; Pohlenz, J. (1992). Placental alterations in sows from herds with PEARS: light and electron-microscopic findings. 12th Int Pig Vet Soc; 8, 17-20. The Hage, p 128.
- Stormo. G.D. (199). Identifying coding sequences. In: Nucleic acid and protein sequence analysis a practical approach. Edited by M.J. Bishop and C.J Rawlings. IRL Press. Oxford.
- Studier, W; Rosenberg, A.H; Dunn, J.J; Dubendorf, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods in Enzymology; 185, 60-89.
- Stueckmann, J.A; Ritzi, D.M; Holth, M; Smith, M.S; Swart; W.J; Cafruny, A; Plagemann, P.G.M. (1982). Replication of lactate dehydrogenase-elevating

virus in macrophages. 1. Evidence for cytocidal replication. J Gen Virol; 59, 245-262.

- Swenson, S.L; Hill, H.T; Zimmerman, J; Evans, L.E; Wills, R; McGinley, M.J; Brevik, A; Ciszewsky, D. (1993). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in experimentally infected boars; isolation from semen. Key trends in Anm Health. August.

- Swenson, S.L; Hill, H.T; Zimmerman, J; Evans, L.E; Landgrf, J.G; Wills, R; Sanderson, T.P; McGinley, M.J; Brevik, A; Ciszewsky D; Merwin, L.F. (1995). Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. JAVMA; 204, 1943-1948.

- Terpstra, C; Wensvoort, G; Pol, J.M.A. (1991). Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. Vet Q; 13, 131-136.

- Terpstra, C; Wensvoort, G; Van Leengoed, LAMG (1992). Persistence of Lelystad virus in herds affected by porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. 12 Int Pig Vet Soc. 8/17-20. The Hague, p 118.

- Thacker, B. (1992). Serological surveys in a herd before, during and after an outbreak of SIRS. International symposium on Swine Infertility and Respiratory Syndrome, St Paul, Minnesota.

- Timoney, P.J; McCollum, W.H; Roberts, A.W; Murphy, T.W. (1986). Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. Res Vet Sci; 41, 279-280.

- van Berlo, M.F; Horzinek, M.C; van der Zeijst, B.A.M. (1980). Temperature-sensitive mutants of equine arteritis virus. J Gen Virol; 49, 97-104.

- van Berlo, M.F; Horzinek, M.C; van der Zeijst, B.A.M. (1982). Equine arteritis virus infected cells contain six polyadenylated virus-specific RNAs. Virology; 118, 345-352.

- van Berlo, M.F; Rottier, P.J.M; Horzinek, M.C; van der Zeijst. (1986). Intracellular equine arteritis virus (EAV)-specific RNAs contain common sequences. Virology; 152, 492-496.

Bibliografia

- van Woensel, P; van der Wouw; Viser, N. (1994). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the polymerase chain reaction. J. Virol. Meth; 47, 273-278.

- van der Zeijst, B. A.M; Horzinek, M.C; Moenning, V. (1975). The genome of equine arteritis virus RNA. J. Gen. Virol; 54, 213-217.

- Vogel, J; Kramer, M; Teuffert, J; Kramer, S. (1991). PRRS-epidemiological and economic analyses in Germany. In; Proceedings of the Seminar on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, November 1991, Brussels, European Commission (DGVI), p 49-51.

- Webster, R.G; Bean, W.J; Gorman, O.T; Chambers, T.M; Kawaoka, Y; (1992). Evolution an ecology of influenza A viruses. Microbiol. Reviews; 56, 152-179.

- Wensvoort, G; Terpstra, C; Boonstra, M; Bloemraad, M; van Zaane, D. (1986). Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. Vet Microbiol; 12, 101-108.

- Wensvoort, G; Terpstra, C; Pol, J.M.P; ter Laak, E.A; Bloemraad, M; de Kluiver, E.P; Kragten, C; van Buiten, L; den Besten, A; Wagenaar, F; Broejkhuijsen, J.M; Moonen, P.L.J.M; Zetstra, T; de Boer, E.A; Tibben, H.J; de Jong, M.F; van't Veld, P; Groenland, G.J.R; van Gennep, J.A; Voets, M. Th; Verheijden, J.H.M; Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Q; 13, 121-130.

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

- Wensvoort, G. (1995). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. In: Proceedings of the Second International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, August 9-10, Copenhagen, Denmark, p 1.

- Westaway, E.G; Brinton, M.A; Gaidamovich, S.Y; Horzinek, M.C; Igarashi, A; kääriäinen, L; Lvov, D.K; Porterfield, J.S; Russel, P.K; Trent, D.W. (1985). Togaviridae. Intervirology; 24, 183-192.

Bibliografía

- White, M. (1991). Letter to the editor. Vet Rec; 128, 574.
- Wilson, J.C; Doll, E.R; McCollum, W.H; Cheatham, J. (1962). Propagation of equine arteritis virus previously adapted to cell cultures of equine kidney in monolayer cultures of hamster kidney. Cornell Vet, 52, 200-205.
- Wills, R; Zimmerman, J; Yoon, S; Swenson, McGinley, M; Hill, H; Platt, K. (1995). Portails of exist of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. In: Proceedings of the Second International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, August 9-10, Copenhagen, Denmark, p 43.
- Wood, O; Tauraso, N.M; Liebhaver, H. (1970). Electron microscopic study of tissue cultures infected with simian haemorrhagic fever virus. J. Gen. Virol; 7, 129-136.
- Wrann, M; Scheiner, W; Wasserbauer, E. (1992). Use of mammalian cell cultures in biotechnology. En: Biotechnology-Focus 3. Editado por RK Finn y P Prëve. Hanser Publishers, New York. 393-413.
- Yeager, M; Prieve, T; Collins, J; Christopher-Hennings, J; Nelson, E; Benfield, D. (1993). Evidence for the transmission of porcines reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. Swine Health and production. 15, 7-9.
- Yoon, J; Joo, H.S; Christianson, W.T; Kim, H.S; Collins, J.E; Morrison, R.B; Dial, G.D. (1992). An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibodies to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. J Vet Diagn Invest; 4, 144-147.
- Yoon, J; Joo, H.S; Goyal, S.M; Molitor, T. (1994). A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome in swine sera. J. Vet. Diagn. Invest; 6, 289-292.
- Yoon, J; Zimmerman, M; McGinley, M; Eernisse, K; Swenson, S; Frey, M; Platt, K. (1995). Comparison of the performance of ELISA to other serologic assays. In: Proceedings of the Second International Symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, August 9-10, Copenhagen, Denmark, p 16.

Bibliografia

- Zimmerman, J; Sanderson, T; Eerbisse, K.A; Hill, H.T; Frey, M.L. (1992). Transmission of SIRS virus from commigled penmates under experimental conditions. International symposium on Swine Infertility and Respiratory Syndrome, St Paul, Minnesota.
- Zimmerman, J; Yoon, K.Y; Pirtle, E.C; Samnderson, T.J; Hill, H.T; Wills, R.W. (1993). Susceptibility of our avian species to PRRS virus. Proceedings of the Livestock Conservation institute's Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Committee. 11-12.