

Aislamiento y caracterización del gen ORF5 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) en México

Isolation and characterization of the gene ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in Mexico

María José Macías* Gloria Yépez-Plascencia** Fernando Osorio*** Araceli Pinelli-Saavedra*
Julio Reyes-Leyva† Jesús Hernández‡

Abstract

The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) represents a major menace to the national and international porcine industry. The virus genetics and antigenic properties, as well as its capacity to modulate the immune system, have made it difficult to control this virus. In Mexico, as in the rest of world, the disease produces important economic losses in the porcine industry. This study describes the isolation and characterization of PRRS virus obtained from pigs of a farm located in Sonora, Mexico. The isolated virus was identified by nested RT-PCR of the ORF-6 gene, and by cytopathic effect in MARC-145 cells. The isolated virus was inoculated in negative pigs which became viremic and produced antibodies and mononuclear cell (MNC) response after inoculation. In order to establish the genotype of the isolated virus, the sequence of the gene ORF-5 was determined, and it was 88% and 87 % similar to the American virus (VR-2332) and the modified live virus (MLV) vaccine, respectively. These studies are basic for the development of strategies oriented to control this disease in Mexico.

Key words: VIRUS, PRRSV, SWINE, ISOLATED, ORF-5, GENETIC SEQUENCE, RT-PCR.

Resumen

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) representa una amenaza de la industria porcina nacional e internacional. Sus propiedades genéticas, antigénicas y su capacidad para modular el sistema inmune, son algunas características que han dificultado su control. Tanto en México como en el mundo, los problemas asociados con esta enfermedad generan cuantiosas pérdidas a la industria porcícola. Este estudio describe el aislamiento y caracterización de dicho virus obtenido a partir de muestras de suero de cerdos de una granja ubicada en Sonora, México. El virus aislado se identificó mediante una RT-PCR anidada del gen ORF-6 y por el efecto citopático en células MARC-145. El virus aislado se inoculó en cerdos negativos, los cuales presentaron viremia y respuesta de anticuerpos y células mononucleares (CMN) después de la inoculación. Para determinar el genotipo del virus aislado, se determinó la secuencia del gen ORF-5, la cual fue 88% y 87% similar al virus de referencia americano (VR-2332) y al virus vivo modificado vacunal (MLV), respectivamente. Estos estudios son esenciales para desarrollar estrategias encaminadas al control de la enfermedad en México.

Palabras clave: VIRUS, PRRSV, CERDOS, AISLAMIENTO, ORF-5, SECUENCIACIÓN GENÉTICA, RT-PCR.

Recibido el 7 de marzo de 2005 y aceptado el 5 de septiembre de 2005.

*Laboratorio de Inmunología, Departamento de Nutrición y Salud Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Km 0.6 Carretera a la Victoria, Hermosillo, Sonora, México. Apartado postal 1735, CP 83000, Tel. (662) 289-2400 Ext. 294, Fax (662) 280-0094.

**Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Km. 0.6 Carretera a la Victoria, Hermosillo, Sonora, México. Apartado postal 1735, CP 83000, Tel. (662) 289-2400 Ext. 294, Fax (662) 280-0094.

***Departamento de Veterinaria y Ciencias Biomédicas, Universidad de Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68582-0905, EUA.

†Laboratorio de Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social: Hospital General de Zona número 5, Carretera Atlixco-Metepec, 74360 Metepec, Puebla, México.

‡Departamento de Nutrición y Alimentos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Km 0.6 Carretera a la Victoria, Hermosillo, Sonora, México. Apartado postal 1735, CP 83000, Tel. (662) 289-2400 Ext. 294, Fax (662) 280-0094. Correo electrónico: jhdez@cascabel.ciad.mx

Introduction

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the most important infectious diseases due to the economic impact it has on the porcine industry at the national and international levels.¹ This disease is caused by a positive chain RNA virus of the Arteriviridae family. Within this family the following viruses are found: equine viral arteritis, lactic dehydrogenase virus of mice and hemorrhagic disease virus of monkeys. These viruses are characterized by their highly genetic and antigenic variability, macrophage-monocytes infection and persistent infections and immune system modulation.² Pigs of all ages are affected by the virus causing respiratory, reproductive problems and high mortality, especially when it associates with other diseases.

PRRS virus has six structural proteins, four glycoproteins (GP2, GP3, GP4 and GP5), one membrane protein (M) and one nucleocapsid protein (N). GP2 and GP3 have low antigenicity, while GP4 and GP5 are involved in the induction of neutralizing antibodies.³ GP5 is also in charge of cell receptor recognition in target cells and induces apoptosis.⁴ N protein is the smallest one of all and induces a high antibody production without evident protection activity.³ M protein is the most conserved, since it does not exhibit genetic diversity; apparently it has an important role in the assembling and liberation of new viral particles.⁴⁻⁶

PRRS virus genome is 15 kb with seven open read frames (ORF). ORF genes 1a and 1b, located on the 5' end, occupy 80% of the genome and codify for replicase and proteins involved in replication and transcription of viral RNA. ORFs 2-5 codify for GP2, GP3, GP4 and GP5 and ORF 6 and ORF 7, for M protein and nucleocapsid (N), respectively.² Several studies around the world show PRRS virus has ample genetic variability. Analysis of this virus isolated in Europe and America has derived into the identification of two main reference serotypes: European and American. Comparison of their nucleotide sequences reveals 55% to 80% identity between them. Analysis of different strains of one same serotype shows significant heterogeneity that varies according to the analyzed protein.⁷ ORF 6 is the most conserved gene among the American strains (100% identity at nucleotide level); among the American and European ones there is between 70% and 81% identity. ORF 7 is the second most conserved gene, from 95% to 100% and from 57% to 59% identity between American strains and between American and European strains, respectively. ORF 5 is the gene with most variability, from 88% to 97% identity between American strains and from 51% to

Introducción

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una de las enfermedades infecciosas más importantes por el impacto económico que tiene en la industria porcina en los ámbitos nacional e internacional.¹ Esta enfermedad es causada por un virus de ARN de cadena positiva, de la familia Arteriviridae, dentro de la cual se encuentran el virus de la arteritis viral equina, el virus de la deshidrogenasa láctica del ratón y el virus de la enfermedad hemorrágica del simio. Estos virus se caracterizan por tener alta variabilidad genética y antigénica, infectar monocitos-macrófagos e inducir infecciones persistentes y modular el sistema inmune.² El virus afecta cerdos de todas las edades, provoca problemas respiratorios, reproductivos y elevada tasa de mortalidad, especialmente cuando se asocia con otras enfermedades.

El virus PRRS posee seis proteínas estructurales, cuatro glicoproteínas (GP2, GP3, GP4 y GP5), una proteína de membrana (M) y una proteína de nucleocápside (N). La GP2 y la GP3 son poco antigénicas; en cambio, la GP4 y la GP5 están involucradas en la inducción de anticuerpos neutralizantes.³ Además, la GP5 se encarga de reconocer el receptor celular en las células blanco e inducir apoptosis.⁴ La proteína N es la más pequeña de todas e induce elevada producción de anticuerpos sin actividad protectora evidente.³ La proteína M es la más conservada, ya que no presenta diversidad genética; se sugiere que juega un papel importante en el ensamble y liberación de nuevas partículas virales.⁴⁻⁶

El genoma del virus PRRS es de 15 kb con siete marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés). Los genes de los ORF 1a y 1b, localizados en el extremo 5', ocupan el 80% del genoma y codifican para la replicasa y proteínas involucradas en la replicación y transcripción del ARN viral. Los ORF 2-5 codifican para la GP2, GP3, GP4 y GP5 y el ORF 6 y ORF 7, para la proteína M y la nucleocápside (N), respectivamente.² Diversos estudios alrededor del mundo demuestran amplia variabilidad genética del virus del PRRS. El análisis de este virus aislado en Europa y América ha llevado a la designación de dos serotipos principales de referencia: europeo y americano. La comparación de sus secuencias de nucleótidos revela una identidad del 55% al 80% entre ellas. El análisis de diferentes cepas de un mismo serotipo muestra heterogeneidad significativa que varía según la proteína analizada.⁷ El ORF 6 es el gen más conservado entre las cepas americanas (100% de identidad a nivel de nucleótidos); entre las americanas y europeas hay entre 70% y 81% de

59% between American and European strains.⁸ These percentages show the genetic variability that there is between American and European serotypes of PRRS virus.

In Mexico, Lara *et al.*⁹ described the ORF 7 sequence among five PRRS virus isolates and compared them to the American reference strain VR2332. Results revealed a 94.01%-94.39% identity with the American strain and 97.38%-99.93% between isolates. In another study, Batista *et al.*,¹⁰ analyzed ORF 7 genes from 33 field samples from Sonora (n = 13) and Puebla (n = 6), and reported a larger diversity than what was found by Lara *et al.*⁹ In relation to ORF 5 gene diversity of PRRS virus in Mexico, there are no published studies. This study describes the isolation of PRRS virus in Mexico and characterization of its ORF 5 gene.

Material and methods

Cells and samples

MARC-145 cells were used, grown in 25 cm²* bottles using DMEM** culture medium complemented with 10% of bovine fetal serum (BFS),*** 100 UI/mL de penicillin, 100 µg/mL of streptomycin and 50 µg/mL gentamicin.† Sera were obtained from a farm located in Hermosillo, Sonora, Mexico, where the disease had been reported. For viral isolation, 500 µL were inoculated of a mix of positive sera in cells and incubated 1 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere with 95% relative humidity. After viral absorption, the supernatant was removed, cells were washed with culture medium, and new medium with 5% BFS was added. Cells were incubated three to five days until cytopathic effect became evident.

RNA extraction

Viral RNA was extracted from 300 µL of the positive sera mix using QIAamp,‡ columns following supplier's specifications and stored at -70° C until use.

Reverse transcription (RT)

SuperScript™* set was used for RT following supplier's specifications with certain modifications. Five µL of total RNA, 0.5 mM of a mix of deoxynucleotide triphosphate and 1 µL (20 µM) of the ORF 6 or ORF 5 reverse primer in separate reactions. Reaction was taken to 10 µL volume with water-DEPC and incubated at 65°C for 5 min to carry out denaturing. After that, RT buffer solution was added [20 mM Tris HCl (pH 8.4), 50 mM KCl], 5 mM MgCl₂, 0.01 M DTT and 2 U RNase OUT™ inhibitor. The mix was

identidad. El ORF 7 es el segundo gen más conservado, de 95% a 100% y de 57% a 59% de identidad entre cepas americanas y entre cepas americanas y europeas, respectivamente. El gen con mayor variabilidad es el ORF 5, de 88% a 97% de identidad entre cepas americanas, y de 51% a 59% entre cepas americanas y europeas.⁸ Estos porcentajes demuestran la variabilidad genética que existe entre los serotipos americanos y europeos del virus del PRRS.

En México, Lara *et al.*⁹ describieron la secuencia del ORF 7 entre cinco aislamientos del virus del PRRS y lo compararon con la cepa de referencia americana VR2332. Los resultados revelaron una identidad de 94.01%-94.39% con la cepa americana, y de 97.38%-99.93% entre los aislamientos. En otro estudio, Batista *et al.*,¹⁰ tras analizar el gen del ORF 7 de 33 muestras de granjas de Sonora (n = 13) y Puebla (n = 6), notificaron una diversidad mayor a la encontrada por Lara *et al.*⁹ En cuanto a la diversidad del gen ORF 5 del virus PRRS en México, no existen estudios publicados. Este trabajo describe el aislamiento del virus PRRS en México y la caracterización de su gen ORF 5.

Material y métodos

Células y muestras

Se utilizaron células MARC-145 que fueron cultivadas en botellas de 25 cm²* usando medio de cultivo DMEM** complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB),*** 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycina y 50 µg/mL de gentamicina.† Los sueros se obtuvieron de una granja ubicada en Hermosillo, Sonora, México, en donde se había registrado la enfermedad. Para el aislamiento viral, se inocularon 500 µL de una mezcla de sueros positivos en las células y se incubaron por 1 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Después de la absorción viral, se retiró el sobrenadante, las células se lavaron con medio de cultivo y se adicionó medio nuevo con 5% de SFB. Las células se incubaron de tres a cinco días hasta que el efecto citopático fue evidente.

Extracción del ARN

El ARN viral se extrajo a partir de 300 µL de la mezcla de sueros positivos utilizando columnas QIAamp,‡

* Corning Glass Works, Corning, NY, USA.

**Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA.

*** Sigma Chemical.

†Sigma Chemical.

‡Qiagen.

incubated at 42°C for 2 min and 2.5 U SuperScript™ II RT enzyme were added. After that, it was incubated at 42°C for 50 min. To end the reaction, the mix was incubated at 70°C for 15 min and maintained on ice. One µL RNase H (2 U/µL) was added and incubated for 20 min at 37°C to eliminate RNA. cDNA was stored at -20°C until used.

Polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR

Amplification reactions were carried out in 50 µL final volume that contained: 5 µL of each cDNA sample, 1 µL of each primer, PCR buffer [10 mM Tris HCl, 50 mM KCl (pH 8.3)], 3 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTP and 0.25 U Taq DNA recombinant polymerase enzyme.** Amplifications were performed in a GeneAmpR*** thermocycler with the following temperatures: in the case of ORF 5, an initial cycle of 94°C for 3 min, 33 cycles of 94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min, and a final extension of 72°C for 10 min. The conditions described above were used in the case of nested ORF 5, ORF 6 and nested ORF 6, with the exception of aligning temperatures that were 62°C, 65°C and 61.7°C, respectively.

Five µL of PCR product was taken for nested PCR and the methodology described above was followed. The final products were analyzed in a 1.2% agarose gel using 20 µL of each PCR product with 4 µL 6x loading buffer and as molecular weight marker 1 kb plus DNA Ladder.† Electrophoresis was run with 1X TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0) and gels were stained with ethidium bromide (1 µg/µL), and visualized by UV* ray transilluminator and photographed with a digital camera.**

Nucleotide sequence analysis

One-hundred µL of gene ORF 5 PCR product were purified with GFX™*** columns and nucleotide sequence was determined with di-deoxynucleotide¹¹ method in the University of Arizona (GATC). The sequence that was obtained was aligned with the sequence of the American, European and vaccination strains using the CLUSTAL W 1.812 algorithm.

Antibody determination

To establish the presence of anti-PRRS antibodies, a commercial kit† was used following the supplier's recommendations. To consider a sample as positive it should have a value of S/P ≥ 0.4.

siguiendo las especificaciones del proveedor, y se almacenó a -70° C hasta su uso.

Transcripción reversa (RT)

Para la RT se utilizó el paquete SuperScript™* siguiendo las especificaciones del proveedor, con algunas modificaciones. Se utilizaron 5 µL de ARN total, 0.5 mM de una mezcla de trifosfato deoxinucleótido y 1 µL (20 µM) del iniciador antisentido del ORF 6 u ORF 5 en reacciones separadas. La reacción se llevó a un volumen de 10 µL con agua-DEPC y se incubó a 65°C por 5 min para la desnaturalización. Posteriormente se agregó solución amortiguadora RT [20 mM Tris HCl (pH 8.4), 50 mM KCl], 5 mM de MgCl₂, 0.01 M de DTT y 2 U de inhibidor RNasa OUT™. La mezcla se incubó a 42°C por 2 min y se agregaron 2.5 U de la enzima SuperScript™ II RT. Posteriormente, se incubó a 42°C por 50 min. Para terminar la reacción, la mezcla se incubó a 70°C por 15 min y se mantuvo en hielo. Se agregó 1 µL de RNasa H (2 U/µL) y se incubó por 20 min a 37°C para eliminar el ARN. El cDNA fue almacenado a -20° C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR anidada

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL que contenía: 5 µL de cada muestra de cDNA, 1 µL de cada iniciador, amortiguador de PCR [10 mM Tris HCl, 50 mM KCl (pH 8.3)], 3 mM de MgCl₂, 0.8 mM de dNTP y 0.25 U de la enzima Taq DNA polimerasa recombinante.** Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmpR*** con las siguientes temperaturas: en el caso del ORF 5, un ciclo inicial de 94°C por 3 min, 33 ciclos de 94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min, y una extensión final de 72°C por 10 min. En el caso del ORF 5 anidado, ORF 6 y ORF 6 anidado se utilizaron las condiciones ya descritas, con excepción de las temperaturas de alineación, que fueron de 62°C, 65°C y 61.7°C, respectivamente.

Para la PCR anidada se tomaron 5 µL del producto de la PCR y se siguió la metodología descrita anteriormente. Los productos finales se analizaron en un gel de agarosa al 1.2%, utilizando 20 µL de cada producto de PCR con 4 µL de amortiguador de carga 6X y como marcador de peso molecular 1 kb más ADN Ladder.† El corrimiento electroforético

*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA.

** Invitrogen Life Technologies.

***Applied Biosystems.

†Invitrogen Life Technologies.

Mononuclear cells proliferation (MNC)

Samples of blood were taken to obtain MNC using Ficoll-Hypaque gradients, as has been previously described.¹³ Proliferation assays were performed in triplicate in 96-well microculture plates to which 100 μ L of a MNC suspension (2.5×10^6 cells/mL) were added. Cells were stimulated with viral antigen (supernatant of infected cells diluted 1:100) and an antigen control (supernatant of non-infected cells diluted 1:100) during five days. Cells were adjusted to a final volume of 200 μ L/well with RPMI-1640 medium complemented with 10% bovine fetal serum. Eighteen hours before harvesting cells, they were marked with 0.5 Ci (37 MKbq-radioactivity) tritiated thymidine (3HdTr) per well. Incorporation of 3HdTR to cell DNA was determined in a beta radiation counter† (BECKMAN) and results were expressed in counts per minute (cpm) that were proportional to 3HdTR incorporation. Cells without virus and virus control were maintained as control.

Results

PRRS virus isolation

Serum samples were obtained (n = 5) from a farm close to Hermosillo, Sonora, Mexico, that had reported PRRS. Samples were collected from five to six months-old piglets that had enlarged inguinal ganglions. To determine virus presence, the serum samples were mixed and this combination was analyzed by nested RT-PCR of ORF 6 gene. Results demonstrated that the mix amplified a 150 bp product, which indicated the presence of PRRS virus. After that the PRRS virus was isolated inoculating the mix into MARC-145 cells. After three days, inoculated cells began looking round and formed clusters, which is a characteristic of the virus. Presence of this virus was confirmed by indirect immunofluorescence, with anti-protein N monoclonal antibody and by RT-PCR in infected cells (data not shown). Isolated virus was identified as H-VA.

Pig infection with isolated PRRS virus

Once the PRRS virus was isolated it was inoculated into healthy pigs (n = 3) free from anti-PRRS antibodies and serum negative to nested RT-PCR of the ORF 6 gene. Serum and mononuclear cells (MNC) samples were taken before and after infection, to determine the effect of the inoculation of pigs. Pigs inoculated with the isolated virus had viremia from the first week to the fourth week of infection, when evaluation was performed (Table 1). Also, the pigs had a response

se realizó con amortiguador TAE IX (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 μ g/ μ [L]), se visualizaron en un transiluminador de luz UV* y se fotografiaron con una cámara digital.**

Análisis de las secuencias nucleotídicas

Cien μ L de los productos de PCR del gen ORF 5 se purificaron con columnas GFX™*** y la secuencia nucleotídica se determinó con el método de dideoxininucleótidos¹¹ en la Universidad de Arizona (GATC, por sus siglas en inglés). La secuencia obtenida se alineó con la secuencia de la cepa americana, europea y vacunal utilizando el algoritmo CLUSTAL W 1.812

Determinación de anticuerpos

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-PRRS se utilizó un paquete comercial† siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para considerar una muestra positiva deberá tener un valor S/P \geq 0.4.

Proliferación de células mononucleares (CMN)

Se obtuvieron CMN a partir de muestras de sangre periférica utilizando gradientes de Ficoll-Hypaque, como se describió previamente.¹³ Los ensayos de proliferación se realizaron por triplicado en placas de microcultivo de 96 pozos a los cuales se adicionaron 100 μ L de una suspensión de CMN (2.5×10^6 células/mL). Las células se estimularon con antígeno viral (sobrenadante de células infectadas diluido 1:100) y un testigo de antígeno (sobrenadante de células sin infectar diluido 1:100) durante cinco días. Las células se ajustaron a un volumen final de 200 L/pozo con medio RPMI-1640 complementado con 10% de suero fetal bovino. Dieciocho horas antes de cosechar las células, se marcaron con 0.5 Ci (37 MKbq-actividad radiactiva) de timidina tritiada (3HdTr) por pozo. La incorporación de 3HdTR al ADN de las células se determinó en un contador de radiación beta‡ (BECKMAN) y los resultados se expresaron en cuentas por minuto (cpm), que fueron proporcionales a la incorporación de la 3HdTR. Se mantuvieron células sin virus y control de virus como testigo.

*TFX-35M, Gibco, BRL, Life technologies, Gaithersburg MD, USA.

**Olympus.

***Pharmacia.

†IDEXX.

‡Beckman

Cuadro 1**VIREMIA Y RESPUESTA DE ANTICUERPOS****VIREMIA AND ANTIBODY RESPONSE**

	<i>Week 1</i>	<i>Week 2</i>	<i>Week 3</i>	<i>Week 4</i>
Viremia	+	+	+	+
Antibody response	0	0.5 ± 0.07	0.8 ± 0.07	1.2 ± 0.05

After pigs were infected (n = 3), viremia was determined by nested RT-PCR of ORF-6 gene and antibody response using IDEXX package. Antibody titers express the mean media ± standard deviation of three pigs S/P value.

of specific antibodies for PRRS virus from the second week of infection (SP > 0.4), that increased each week (Table 1). Additionally, proliferating response induced in MNC in the infected pigs was evaluated. Prior reports show that MNC response of PRRS infected pigs is detected from the fourth week of infection.¹⁴ In agreement with these findings, four weeks after infection, MNCs of inoculated pigs, were stimulated *in vitro* with the virus used for infection. Results show that MNC proliferated in presence of the virus *in vitro*. On the other hand, cells without stimulation or virus control did not proliferate; which shows that the isolated virus stimulated the immune system of pigs and these were capable of developing a specific response to an antigenic stimulus (Figure 1).

Genetic characteristics of ORF 5 gene of PRRS virus

Once the PRRS virus was identified, isolated, inoculated into pigs and the infection was reproduced, the ORF-5 gene was characterized, since it is one of the most variable genes of the virus. Nested RT-PCR of ORF-5 gene was performed from the same sample used to inoculate pigs, and a 603 bp product was amplified, then purified and sequenced. The obtained sequence was 603 bp, as has been reported for American type PRRS virus,¹⁵⁻¹⁸ since European type PRRS virus is 606 bp.¹⁹ To compare the sequence that was obtained with the American reference and vaccination virus (Ingelvac®PRRS MLV), CLUSTAL W program was used (Figure 2).¹² Analysis revealed a similarity percentage of 88% and 87%, respectively. After the nucleotide sequence was obtained, the amino acid sequence was deduced and alignment was performed with the American reference strain and vaccine (Figure 3). The sequence that was obtained corresponds to 200 amino acids, which is different from the European origin virus that has 201 amino

Resultados

Aislamiento del virus PRRS

Se obtuvieron muestras de suero (n = 5) de una granja cercana a Hermosillo, Sonora, México, que presentaba antecedentes del PRRS. Las muestras se recolectaron de lechones de entre cinco y seis semanas de edad, los cuales presentaban aumento en el tamaño de los ganglios inguinales. Para determinar la presencia del virus, las muestras de suero se mezclaron y esta combinación se analizó por RT-PCR anidada del gen ORF 6. Los resultados muestran que la mezcla amplificó un producto de 150 pb, lo que demostró la presencia del virus PRRS. Posteriormente, el virus PRRS se aisló inoculando la mezcla en células MARC-145. Después de tres días, las células inoculadas empezaron a redondearse y agruparse en forma de racimos, ello es un efecto característico del virus. La presencia de este último se confirmó mediante inmunofluorescencia indirecta, con un anticuerpo monoclonal antiproteína N, y por RT-PCR en las células infectadas (datos no mostrados). El virus aislado se identificó como H-VA.

Infección de cerdos con el virus PRRS aislado

Una vez aislado el virus PRRS, se inoculó en cerdos sanos (n = 3) y libres de anticuerpos anti-PRRS y negativos en suero a la RT-PCR anidada del gen ORF 6. Para determinar el efecto del inóculo en los cerdos se tomaron muestras de suero y células mononucleares (CMN) antes y después de la infección. Se observó que los cerdos inoculados con el virus aislado presentaron viremia a partir de la primera semana y hasta la cuarta semana de infección, cuando se realizó la evaluación (Cuadro 1). Además, los cerdos presentaron una

*Beckman.

acids. The analysis indicated identity percentage of 88% and 87% in relation to the American reference strain and vaccine respectively. Changes to the nucleotide sequence were distributed all along the gene. Nevertheless, when the amino acid deduced sequence was analyzed a region of greater variation was detected between residues 19 to 39.

Discussion

PRRS is responsible for the most important disease that is affecting pigs today. It has been difficult to control, due to its genetic and antigenic characteristics, its capacity to induce persistent infection and modulate the immune response.^{14,20} In relation to its genetic properties, studies performed up until now, have described a European genotype and an American one, that in ORF 5 gene share approximately 55% identity.⁴ Within the American genotype, some studies describe that the ORF 5 gene of the virus presents an homology that varies between 80% to 100%. Contrary to what could be concluded, in relation to the American or European genotype being continent exclusive, the American genotype has been described in Europe and Asia, as well as the European genotype has been described in America.²¹ This situation has been explained due to pig and semen mobilization that occurs nowadays.

In Mexico, the disease was described soon after it was identified worldwide. Since then, the attacks by this disease have been considerable, according to what Basto *et al.*²² reported. In an effort to understand how the virus develops in Mexico, Batista *et al.*¹⁰ described the characteristics of PRRS ORF 7 gene of Sonora and Puebla. In this study, the presence of the virus was detected by RT-PCR and the ORF 7 gene sequence was determined directly from PCR products. Results demonstrate that ORF 7 has between 88% and 100% identity with the American reference virus.

respuesta de anticuerpos específicos al virus PRRS a partir de la segunda semana de infección ($SP > 0.4$), la cual se incrementó cada semana (Cuadro 1). De manera adicional, se evaluó la respuesta proliferante inducida en las CMN de los cerdos infectados. Los informes previos muestran que la respuesta de CMN en cerdos infectados con PRRS se detecta a partir de la cuarta semana de infección.¹⁴ De acuerdo con estos antecedentes, cuatro semanas después de la infección, las CMN de los cerdos inoculados se estimularon *in vitro* con el virus utilizado para la infección. Los resultados muestran que las CMN proliferaron en presencia del virus *in vitro*. Por el contrario, células sin estímulo o con un control de virus no proliferaron, lo que demuestra que el virus aislado estimuló el sistema inmune de los cerdos y éstos fueron capaces de desarrollar una respuesta específica ante el estímulo antigénico (Figura 1).

Características genéticas del gen ORF 5 del virus PRRS

Una vez que el virus PRRS fue identificado, aislado, inoculado en cerdos y reproducida la infección, se procedió a caracterizar el gen ORF-5, ya que es uno de los genes de mayor variabilidad del virus. Se realizó una RT-PCR anidada del gen del ORF-5 a partir de la misma muestra utilizada para inocular los cerdos, y se amplificó un producto de 603 pb, el cual se purificó y secuenció. La secuencia obtenida fue de 603 pb, como se ha informado para virus PRRS de tipo americano,¹⁵⁻¹⁸ ya que el virus PRRS tipo europeo es de 606 pb.¹⁹ Para comparar la secuencia obtenida con las de los virus de referencia americana y vacunal (Ingelvac®PRRS MLV), se utilizó el programa CLUSTAL W (Figura 2).¹² El análisis reveló un porcentaje de similitud de 88% y 87%, respectivamente. Después de que se obtuvo la secuencia

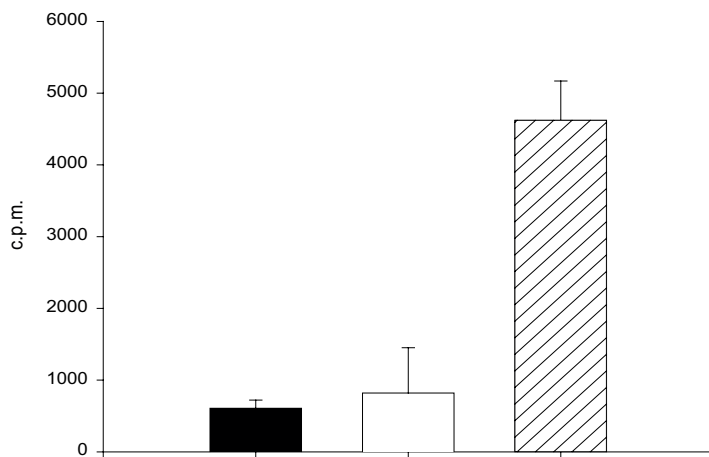


Figura 1. Proliferación de CMN. Se obtuvieron CMN cuatro semanas después de la infección y se estimularon con virus (barra rayada), control de virus (barra blanca) o sin estímulo (barra negra). Los resultados representan las cuentas por minuto (cpm) promedio desviación estándar de tres cerdos.

Figure 1. MNC proliferation. Four weeks after infection MNC were obtained and stimulated with virus (stripped bar), virus control (white bar) or without stimulation (black bar). Results represent average counts per min (cpm) standard deviation of three pigs.

```

*   20   *   40   *   60
VR-2332 : ..... : 60
Vaccine : .....A..... : 60
H-VA : .....G.....C...TA..G.....A... : 60
      ATGTTGGAGAAATGCTTGACCGGGCTGTTGCTCGCGATTGCTTCTTTGTGGTGTATC

*   80   *  100   *  120
VR-2332 : ..... : 120
Vaccine : ..... : 120
H-VA : .....G.....T.....A.GG.A.....T..T.T... : 120
      GTGCCGTTCTGTTTTGCTGTGCTCGCCAACGCCAGCAACGACAGCAGCTCCCATCTACAG

*  140   *  160   *  180
VR-2332 : ..... : 180
Vaccine : ..... : 180
H-VA : T.....T.....C.....A....G..A..A..... : 180
      CTGATTACAACCTTGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTAGCTAACAAATTT

*  200   *  220   *  240
VR-2332 : ..... : 240
Vaccine : ..... : 240
H-VA : .....A.C.....T....C....G.....T..... : 240
      GATTGGGCAGTGGAGAGTTTTGTCTATCTTTCCCGTTTTGACTCACATTGTCTCCTATGGT

*  260   *  280   *  300
VR-2332 : ..... : 300
Vaccine : ..... : 300
H-VA : ..A...C.....T.....A...G.C.G..T..... : 300
      GCCCTCACTACCAGCCATTTCTTGACACAGTCGCTTTAGTCACTGTGTCTACCGCCGGG

*  320   *  340   *  360
VR-2332 : ..... : 360
Vaccine : ..... : 360
H-VA : ..TA.....T.G.....T.....A..... : 360
      TTTGTTACGGGCGGTATGTCCTAAGTAGCATCTACGCGGTCTGTGCCCTGGCTGCGTTG

*  380   *  400   *  420
VR-2332 : ..... : 420
Vaccine : ..... : 420
H-VA : GT.....A...C..A....G....C.....T.A..C..T... : 420
      ACTTGCTTCGTCATTAGGTTTGCAAAGAATTGCATGTCTGGCGCTACGCGTGTACCAGA

*  440   *  460   *  480
VR-2332 : ..... : 480
Vaccine : .....G..... : 480
H-VA : ..C.....C...A...C..... : 480
      TATACCAACTTTCTTCTGGACACTAAGGGCAGACTCTATCGTTGGCGGTGCGCTGTCATC

*  500   *  520   *  540
VR-2332 : ..... : 540
Vaccine : ..... : 540
H-VA : .....G.A.T..G.....C.....T..T.A...A..... : 540
      ATAGAGAAAAGGGGCAAAGTTGAGGTCTGAAGGTCTATCTGATCGACCTCAAAAAGATTGTG

*  560   *  580   *  600
VR-2332 : ..... : 600
Vaccine : ..... : 600
H-VA : .....T...T.....A...G.....C.T. : 600
      CTTGATGGTTCGTGGCAACCCCTATAACCAGAGTTTACGCGGAACAATGGGGTGCCTCT

VR-2332 : ... : 603
Vaccine : ... : 603
H-VA : ... : 603
      TAG

```

Figura 2. Alineamiento de secuencia nucleotídicas del gen ORF 5. La secuencia obtenida del virus PRRS H-VA se alineó con el virus de referencia americana (VR2332) y el virus vacunal (Ingelvac®PRRS MLV) utilizando el programa CLUSTAL W 1.8.¹²

Figure 2. Nucleotide alignment sequence ORF 5 gene. PRRS H-VA virus sequence that was obtained, was aligned with American reference virus (VR2332) and vaccine virus (Ingelvac®PRRS MLV) using CLUSTAL W 1.8 program.¹²

The ORF 5 gene has 603 base pairs, that codify a protein (GP5) of 201 amino acids.^{16,23} Protein GP5 is in charge of cell receptor recognition to induce apoptosis² and neutralizing antibodies that are important in disease control.^{3,5,24} Differently from other genes of PRRS virus, ORF 5 is the one that has more variability due to mutations and recombinations.²⁵ These mutations are found mainly

de nucleótidos, se dedujo la secuencia de aminoácidos y se realizó el alineamiento con la cepa de referencia americana y la vacuna (Figura 3). La secuencia obtenida corresponde a 200 aminoácidos, a diferencia del virus de origen europeo que presenta 201 aminoácidos. El análisis mostró un porcentaje de identidad de 88% y 87% con respecto a la cepa de referencia americana y la vacuna, respectivamente.


```

      *   20   *   40   *   60
VR-2332 : ..... : 62
Vaccine : .....Q..... : 62
H-VA : ..G.....L.....Y....W....V..NG....F.....E..K.... : 62
      MLEKCLTAGCCSRLLSLWCIVPFCFAVLANASNISSSHLLQLIYNLTLCELNGTDWLANKFDW

      *   80   *  100   *  120
VR-2332 : ..... : 124
Vaccine : ..... : 124
H-VA : .....G.....Y.....V... : 124
      AVESFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDTVALVTVSTAGFVHGRYVLSSIYAVCALAALTCFV

      *  140   *  160   *  180
VR-2332 : ..... : 186
Vaccine : .....G..... : 186
H-VA : .....S.....G..... : 186
      IRFAKNCMSWRYACTRYTNFLDGTKRGLYRWRSPVHIEKRGKVEVEGHLIDLKRVVLDGSVA

      *   200
VR-2332 : .....- : 200
Vaccine : .....- : 200
H-VA : .....A.....L- : 200
      TPITRVSAEQWGRP

```

Figura 3. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GP5. A partir de la secuencia de nucleótidos del virus PRRS H-VA, virus de referencia americana (VR2332) y vacunal (Ingelvac®PRRS MLV), se dedujo la secuencia de aminoácidos utilizando el programa GenDoc y se realizó un alineamiento con el programa CLUSTAL W 1.8.¹²

Figure 3. Alignment of the amino acid sequence deduced for GP5 protein. Amino acid sequence was deduced from PRRS H-VA virus nucleotide sequence, American reference virus (VR2332) and vaccine (Ingelvac®PRRS MLV), using GenDoc program and an alignment was performed with CLUSTAL W 1.8 program.¹²

in ectodomain GP5 protein, which is the supposedly key to the induction of neutralizing antibodies.^{5,27} In agreement with the results obtained during this study, mutations of PRRS virus isolated in Mexico are found in the ectodomain of GP5 protein. This means that changes in regions potentially immunogenic would alter antibody recognition of heterologous virus. Taking into consideration the nucleotide sequence, PRRS virus isolated in this study is grouped within the American genotype; nevertheless, the possibility of finding in Mexico some European genotype virus, as it has happened in the United States should not be discarded.²¹ The identity percentages between the PRRS virus isolated in this study and the reference American and vaccine virus reveal a high variability, as has been reported in other parts of the world.²⁶⁻²⁸

A characteristic of pigs infected with PRRS is a prolonged viremia.²⁹ As has been shown in this study, it is possible to find viremic pigs up to four weeks after infection. In the case of infected boars, the presence of virus in semen has been detected up to more than 100 days.²⁹ Besides the prolonged viremia and persistence, an important characteristic of PRRS virus is the immune response modulation.³⁰ Using a commercial kit, the antibody response was determined from the second week of infection on. According to other authors,³ this type of response does not have any protecting activity. The protecting response to

Los cambios en la secuencia de nucleótidos se encuentran distribuidos a lo largo del gen. Sin embargo, cuando se analiza la secuencia deducida de aminoácidos, se aprecia que la región de mayor variación se encuentra entre los residuos 19 a 39.

Discusión

El virus PRRS es responsable de la enfermedad más importante que afecta a los cerdos en la actualidad. Sus características genéticas, antigénicas, su capacidad para inducir infección persistente y modular la respuesta inmune, han hecho que sea difícil de controlar.^{14,20} En cuanto a sus propiedades genéticas, los estudios realizados a la fecha han descrito un genotipo europeo y otro americano, que en el gen del ORF 5 comparten alrededor del 55% de identidad.⁴ Dentro del genotipo americano, algunos trabajos describen que el gen ORF 5 del virus presenta una homología que varía de 80% a 100%. Contrario a lo que podría pensarse, en relación a que el genotipo americano o el europeo eran exclusivos de cada continente, se han descrito virus de genotipo americano en Europa y Asia, así como virus de genotipo europeo en América.²¹ Lo anterior se ha explicado por el flujo de cerdos y semen que existe en la actualidad.

En México, la enfermedad se describió poco tiempo

PRRS is mediated by neutralizing antibodies that are found after four weeks of infection.³ This delay in neutralizing antibody response is also a characteristic of MNC. Results obtained in other studies and in this one establish that MNC of PRRS infected pigs have capacity to proliferate *in vitro* until the fourth week.¹⁹ In the same manner, presence of gamma-interferon producing cells seems to be modified during infection with PRRS virus.^{30,31}

Results obtained in this study present, for the first time in Mexico, the isolation and characterization of ORF 5 gene of PRRS virus. From the isolated virus, experimental infection was reproduced in pigs, as was demonstrated by viremia, antibody response and T lymphocytes. Different from other studies,¹⁰ in this study virus was isolated and ORF-5 sequence of the gene was obtained. This will allow more PRRS virus isolations to obtain a more ample characterization of it in Mexico.

Acknowledgements

This project was financed by the Ministry of Public Education and National Science and Technology council of Mexico, project 43602.

Referencias

1. Blaha T. The "colorful" epidemiology of PRRS. *Vet Rec* 2000; 31:77-83.
2. Benfield DA, Collins JE, Dee SA, Halburg PG, Joo HS, Larger KM, *et al.* The porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Swine Diseases*. Iowa: Iowa State University Press, 1999.
3. Lopez OJ, Osorio FA. Role of neutralizing antibodies in PRRS protective immunity. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102:155-163.
4. Meulenberg J J. PRRSV, the virus. *Vet Res* 2000; 31:11-21.
5. Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, Lopez OJ. Identification of neutralizing and non-neutralizing epitopes in the porcine and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 2002; 76:4241-4250.
6. Snijder EJ, Meulenberg JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 1998; 79:961-979.
7. Oleksiewicz MB, Botner A, Madsen KG, Storgaard T. Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet Microbiol* 1998; 64:7-22.
8. Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 1999; 73:270-80.
9. Lara PJH, Díaz EEF, Rodríguez IS, Macías M, Moreno Y, Ramírez R, *et al.* Aislamiento del virus de PRRS en el altiplano mexicano parte I. *Memorias del XXXVI Con-*

después de su identificación en el mundo. Desde entonces, los embates de la enfermedad han sido considerables, según lo informa Basto *et al.*²² En un intento por entender cómo se desarrolla el virus en México, Batista *et al.*¹⁰ describieron las características del gen del ORF 7 de virus PRRS de Sonora y Puebla. En este trabajo se detectó la presencia del virus mediante RT-PCR y se determinó la secuencia del gen ORF 7 directamente de los productos de PCR. Sus resultados muestran que el ORF 7 presenta entre 88% y 100% de identidad con el virus de referencia americano.

El gen ORF 5 presenta 603 pares de bases, las cuales codifican una proteína (GP5) de 201 aminoácidos.^{16,23} La proteína GP5 se encarga de reconocer el receptor celular en las células, inducir apoptosis² y anticuerpos neutralizantes importantes en el control de la enfermedad.^{3,5,24} A diferencia de otros genes del virus PRRS, el ORF 5 es el que presenta la mayor variabilidad debido a mutaciones y recombinaciones.²⁵ Estas mutaciones se encuentran principalmente en el ectodominio de la proteína GP5, la cual se supone es clave para la inducción de anticuerpos neutralizantes.^{5,27} De acuerdo con los resultados obtenidos por este estudio, las mutaciones del virus PRRS aislado en México se encuentran en el ectodominio de la proteína GP5. Esto supone que los cambios en las regiones potencialmente inmunogénicas alteraría el reconocimiento de anticuerpos frente a virus heterólogos. De acuerdo con la secuencia de nucleótidos, el virus PRRS aislado en este estudio se agrupa dentro del genotipo americano; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de encontrar en México algún virus de genotipo europeo, como ha ocurrido en Estados Unidos.²¹ Los porcentajes de identidad entre el virus PRRS aislado en este estudio y los virus de referencia americana y vacunal, revelan una alta variabilidad, como se ha informado en otras partes del mundo.²⁶⁻²⁸

Una característica de los cerdos infectados con PRRS es la viremia tan prolongada que presenta.²⁹ Como se ha demostrado en este estudio, es posible encontrar cerdos virémicos hasta cuatro semanas después de la infección. Para el caso de sementales infectados, se ha descrito la presencia del virus en semen hasta por más de 100 días.²⁹ Además de la viremia prolongada y persistencia del virus PRRS, una característica importante es la modulación de la respuesta inmune.³⁰ Utilizando un paquete comercial, se determinó una respuesta de anticuerpos a partir de la segunda semana de infección. De acuerdo con otros autores,³ este tipo de respuesta no tiene ninguna actividad protectora. La respuesta protectora a PRRS está mediada por los anticuerpos neutralizantes, los cuales se aprecian después de cuatro semanas de

- greso Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 2001 julio 25-29; Juriquilla, (Querétaro), México. México (DF): Comité editorial: Herradora LM, Haro TM, Olea PR, Ayala FR, López MJ, Herrera GR; 2001: 65.
10. Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico. *J Swine Health Prod* 2004; 12:170-175.
 11. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1992; 24:104-8.
 12. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 1994; 22:4673-4680.
 13. Hernandez J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramirez H, Hernandez-Jauregui P, Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 64:367-381.
 14. Meier W, Wheeler J, Husmann R, Osorio F, Zuckermann F. Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus. *Vet Rec* 2000; 31: 41.
 15. Andreyev VG, Wesley RD, Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol* 1997; 142:993-1001.
 16. Indik S, Valíček L, Klein D, Klánová J. Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2000; 81:2497-2502.
 17. Key FK, Haqshenas G, Guenette KD, Swenson SL, Toth TE, Meng, X. Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF 5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Microbiol* 2001; 83:249-263.
 18. Thanawongnuwech R, Amosin A, Tatsanakit A, Damrongwatanapokin S. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet Microbiol* 2004; 101:9-21.
 19. Meulenber JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, de Kluyver EP, *et al.* Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 1993; 192:62-72.
 20. Molitor T, Bautista E, Choi C. Immunity to PRRSV: Double-edged sword. *Vet Microbiol* 1997; 55:265-276.
 21. Wasilk A, Callahan JD, Christopher-Hennings J, Gay TA, Fang Y, Dammen M, *et al.* Detection of U.S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4453-61.
 22. Basto G, Williams JJ, Alzina A, Pech V. Determinación de marranas de autorreemplazo seropositivas a PRRS

infección.³ Este retraso en la respuesta de anticuerpos neutralizantes también es característica de la respuesta de CMN. De acuerdo con los resultados aquí obtenidos e informes previos, hasta la cuarta semana en las CMN de los cerdos infectados con PRRS tienen la capacidad de proliferar *in vitro*.¹⁹ De igual manera, la presencia de células productoras de interferón-gamma parece modificarse durante la infección con el virus PRRS.^{30,31}

Los resultados obtenidos en este estudio presentan por primera vez el aislamiento y caracterización del gen del ORF 5 del virus PRRS en México. A partir del virus aislado se logró reproducir la infección experimental en cerdos, como lo muestran los resultados de viremia, respuesta de anticuerpos y de linfocitos T. A diferencia de otros trabajos,¹⁰ en este estudio se aisló el virus y se obtuvo la secuencia del gen ORF-5. Esto último permitirá el aislar más virus PRRS y obtener una caracterización más amplia de éste en México.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Secretaría de Educación Pública y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, proyecto 43602.

-
- en una granja del estado de Yucatán. *Tec Pecu Mex* 2004; 42:295-301.
23. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 2000; 145:659-668.
 24. Wissink EH, van Wijk HA, Kroese MV, Weiland E, Meulenber JJ, Rottier PJ, *et al.* The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J Gen Virol* 2003; 84:1535-43.
 25. Yuan S, Nelsen CJ, Murtaugh MP, Schmitt BJ, Fasberg KS. Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 1999; 61:87-98.
 26. Mateu E, Martin M, Vidal D. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. *J Gen Virol* 2003; 84:529-534.
 27. Goldberg T, Hahn E, Weigel R, Scherba G. Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J Gen Virol* 2000; 81:171-179.
 28. Rowland RR, Steffen M, Ackerman T, Benfield D. The Evolution of Porcine and Respiratory Syndrome Virus: Quasispecies and Emergence of a virus Subpopulation during Infection of Pigs with VR-2332. *Virology* 1999; 259:262-266.

29. Christopher-Hennings J, Holler LD, Benfield DA, Nelson EA. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13:133-142.
30. Meier WA, Galeota J, Osorio FA, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Zuckermann FA. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 2003; 309:18-31.
31. Batista L, Pijoan C, Dee S, Olin M, Molitor T, Joo HS, *et al.* Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res* 2004; 68:267-273.