

Análisis genético del gen ORF5 de virus de PRRS aislados en México desde 2009 a 2015
Galiote, A^{*}, Lucio-de Esesarte, E., Merino, E., Mendoza, MA, Martínez, D., Munguía, J., Morales, J.A.
Investigación Aplicada S.A. De C.V.
agaliote@grupoidisa.com

Introducción

El virus del síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo (PRRSv) pertenece a la familia *Arteriviridae*. El genoma del PRRSv está formado por una cadena simple de RNA de sentido positivo, el tamaño de su genoma es de aproximadamente 15 kb¹. La región 3' del genoma codifica para 4 glucoproteínas asociadas a la membrana (GP2, GP3, GP4 y GP5), 2 proteínas no glucosiladas de membrana (E y M) y la proteína de la nucleocápside. La región 5' no traducible (5' UTR) incluye un tallo loop que es un elemento estructural clave para la replicación del virus de PRRS y síntesis de mRNA subgenómico².

El PRRSv puede ser clasificado en dos genotipos: tipo 1 (Europeo), que comprende a la mayoría de cepas europeas y está representado por la cepa Lelystad; y el tipo 2 (Norteamérica), que comprende cepas de América del norte y está representada por la cepa prototipo VR-2332. Aunque inducen los mismos signos de la enfermedad, ambos genotipos son muy diferentes genética y antigénicamente^{1,3}.

Debido a la naturaleza de la polimerasa del virus, existe gran variabilidad entre las cepas del PRRSv, por lo que la tipificación genética es un método útil para el diagnóstico y el control de la enfermedad. El diagnóstico por tipificación genética se hace mediante secuenciación; actualmente, el fragmento más utilizado es el ORF5, el gen que codifica para la glucoproteína GP5. Ésta es la proteína principal que se encuentra en la membrana del virus, es un glucoproteína de aproximadamente 200 aminoácidos, con un peso molecular aparente de 26 kDa².

Para obtener un mejor entendimiento de la relación genética y evolutiva del virus de PRRS, en el presente trabajo se analizaron 12 muestras de virus PRRS aislados en México durante 2009 a 2015. Los análisis se basaron en la secuencia del gen ORF5 y se compararon con secuencias de referencia Americano y Europeo.

Finalmente, se analizó la secuencia de aminoácidos de la proteína GP5, para identificar los epítopes asociados con la neutralización del virus. En el genotipo americano, se han identificado al menos 2 epítopes que inducen neutralización de otros virus de PRRS². En el presente trabajo identificamos que una cepa ya modificó su secuencia de aminoácidos, lo cual

podría sugerir que ya no podría ser neutralizada por anticuerpos inducidos por vacunas vivas modificadas basadas en el genotipo Norteamericano.

Materiales y métodos

Propagación de virus: Los virus fueron obtenidos a partir de muestras de suero de cerdos que presentaron síntomas de PRRS. Se analizaron muestras provenientes de Sonora, Jalisco y Puebla. Se confirmó la presencia del PRRSv mediante prueba de PCR en tiempo real. Los virus fueron propagados en células MARC-145; brevemente: un cultivo de 24 horas de células MARC-145 fue infectado con virus PRRS en medio RPMI 5% FBS, e incubado durante 96 horas a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron sometidas a proceso de congelado y descongelado para la liberación de los viriones, enseguida se centrifugó a 2000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

Secuenciación de virus: Se tomaron 200ul de muestra y se realizó la extracción utilizando el kit de Quiagen (QIAamp Viral RNA). Se realizó prueba de RT-PCR anidado con primers específicos para el gen ORF5. La amplificación se realizó utilizando el enzima SuperScript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HiFi. Las condiciones de amplificación del primer amplicón fueron 50°C por 30 min, 94°C por 2min, 30 ciclos (94°C por 15 seg, 52°C--30 seg, 72°C--30 seg), 72°C--3 min. Este amplicón se utilizó como molde para amplificar nuevamente bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 min, 30 ciclos (94°C por 15 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 30 seg), 72°C por 3 min. El producto de PCR fue cargado en gel de agarosa y se realizó la electroforesis a voltaje de 120. El producto de PCR fue purificado y secuenciado.

Análisis genético: Las secuencias del gen ORF5 fueron alineadas (Clustal W) utilizando el programa bioinformático Geneious 8.0. Se utilizó el programa MEGA 6.0 para realizar el árbol filogenético utilizando el método Neighbour-Joining con el modelo maximum composite likelihood; se utilizó un bootstrap de 500 replicas para el análisis del árbol.

La secuencia de nucleótidos fue traducida a aminoácidos utilizando el software Geneious 8.0 y fue alineado para identificar los epítopes neutralizantes de GP5.

Resultados y discusión

Se analizaron 12 cepas de campo aisladas entre 2009 y 2015, y se compararon con la cepa de referencia VR-2332 (genotipo de PRRS americano) y la cepa vacunal MLV (ID:AF066183).

En la figura 1, se presenta en árbol filogenético generado. Es posible observar que existen dos grupos. El grupo 1 incluye 7 cepas. En el grupo 2 se ubican 5 muestras de campo y la cepa VR2332. El porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos entre las cepas de campo varía desde el 81.2 al 99.7%. Este resultado indica que algunas cepas están relacionadas entre sí, pero otras mantienen diferencias genéticas considerables y podrían considerarse como divergentes.

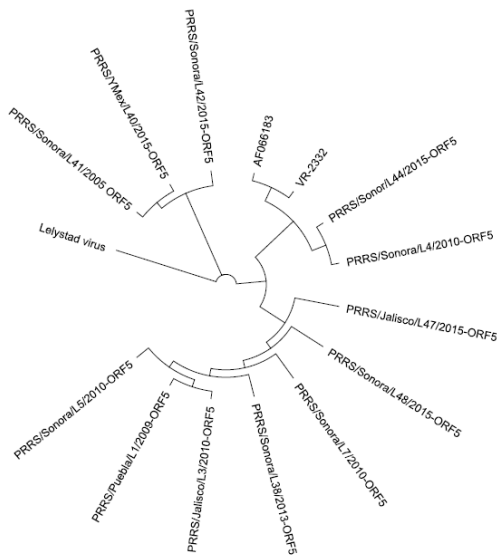


Figura 1. Árbol filogenético de cepas de virus de PRRS aisladas en México entre 2009 y 2015. Se señalan las cepas de referencia, genotipo americano VR-2332, del genotipo europeo Lelystad y la cepa vacunal MLV (ID:AF066183)

El grupo 1 podría dividirse en 2 subgrupos. El subgrupo 1.1 (L1, L3, L5, L7, L38 y L48) tiene un porcentaje de identidad de entre 92.7 y 99.7%. Las cepas que están más relacionadas son L1, L3 y L5 (porcentaje de identidad mayor a 95%). La cepa PRRS/Sonora/L48/2015-ORF5 tiene un porcentaje de identidad entre 92.7 a 95% con su grupo (cepas L1, L3, L5, L7 y L38) y por lo tanto se considera que no está relacionado genéticamente con dichas cepas. Es importante señalar que la cepa L48 pertenece a un aislamiento del año 2015, mientras que el resto ya son aislamientos del año 2009, 2010 y 2013. Este indica que sigue habiendo evolución de los virus.

Dentro de este mismo grupo se incluye al subgrupo 1.2 que está integrado únicamente por la cepa PRRS/Jalisco/L47/2015-ORF5, y tiene un porcentaje de identidad con las cepas del subgrupo 1.1 entre 83.1 y 85.7. Por lo tanto, se considera que la cepa L47, aislada en 2015, no se encuentra relacionada genéticamente con el resto del grupo y es probable que siga evolucionando de manera diferente al resto. El alineamiento de la cepa L47 con otras cepas reportadas en el NCBI indica que esta cepa tiene una identidad del 86% con cepas reportadas en 2006 por la universidad de Minnesota (ID: DQ477512, EU755900, EU556153). Esto indica que La cepa L47 es divergente y se encuentra muy alejada de todas las cepas reportadas en NCBI. Es probable que las vacunas vivas modificadas no generen protección contra la cepa L47 debido a su divergencia.

La similitud entre las cepas del grupo 2 (L4, L40, L41, L42, L44) es de 85.1- 92.5%. Es un grupo muy diferente y podría asumirse que estas cepas no están relacionadas genéticamente. Es posible identificar 3 subgrupos dentro de este grupo. El subgrupo 2.1 está integrado por las cepas L4 y L44 con porcentaje de identidad de 92.5%, indicando que estas cepas están relacionadas genéticamente; es importante señalar que L4 es un aislamiento del 2010 y L44 es e 2015. El subgrupo 2.2 está integrado por las cepas L40 y L41, que tienen un porcentaje de identidad de 88.1%. El subgrupo 2.3 está integrado por la cepa L42. Las tres cepas fueron aisladas en 2015.

Ostrowski⁴ y colaboradores (2002) identificaron dos epítopes en GP5 que inducen neutralización de virus de PRRS. De acuerdo con los resultados obtenidos (figura 2), el epítipo A (aa27 a 30) no muestra ningún cambio. Sin embargo, en la secuencia del epítipo B de la cepa L40, se identificó una mutación de H38→N38. Esta mutación podría llevar a una falla en la respuesta inmunológica generada por una vacuna basada en el genotipo Norteamericano. Para confirmar esta hipótesis es necesario realizar otros ensayos, como pruebas de neutralización, con la cepa L40 aislada en México en 2015.

De acuerdo con estos resultados, y a la variabilidad de los virus de PRRS reportados en NCBI, se identifica la necesidad de actualizar y modificar las vacunas vivas para que generen una protección contra las nuevas cepas de campo. En este sentido se ha reportado que algunos virus de PRRS generan protectotipo; es decir, protección cruzada contra otros virus. De esta forma, los anticuerpos generados neutralizan de manera eficiente a los virus de campo⁵.

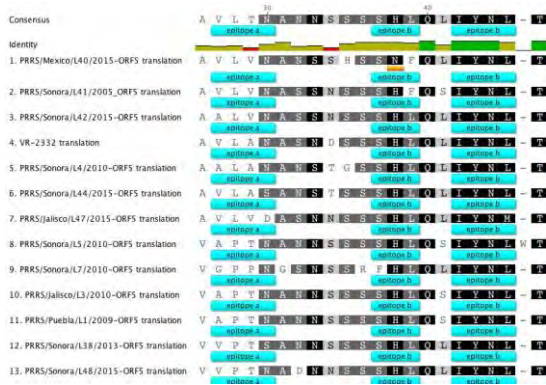


Figura 2. Alineamiento de aminoácidos de cepas de campo. Se muestra la ubicación del epítipo A y de la región del epítipo b de para proteína GP5. La cepa L40 presenta mutación H38→N38.

Conclusiones

En resumen, se concluye que las cepas aisladas en México siguen perteneciendo al genotipo Norteamericano (VR2332), con porcentajes de identidad entre 84.7 a 91.4%. A nivel de nucleótidos, es posible identificar dos grupos, donde el grupo 2 se compone principalmente por cepas del 2015. Sin embargo, dentro del grupo 1, la cepa L47 presenta diferencias del 89% con las cepas aquí analizadas y aún con las reportadas en NCBI. Lo anterior sugiere que esta cepa no está relacionada genéticamente con ninguna otra cepa y que podría escapar de la protección inducida por las vacunas vivas modificadas que se utilizan actualmente. De acuerdo con lo anterior, es importante considerar esta cepa para la generación de vacunas autógenas para aplicarse en esa zona geográfica, Jalisco.

Por otro lado a nivel de aminoácidos, la cepa L40 presenta una mutación en el epítipo B que es importante para reconocimiento de anticuerpos neutralizantes del virus, de tal manera que los anticuerpos inducidos por vacunas basadas en la cepa VR-2332 podrían no neutralizarlo eficientemente.

Finalmente, dado que no se obtiene un control eficiente por medio de la vacunación, debido a la gran variabilidad del virus, es necesario poner en práctica otras alternativas de protección que puedan brindar coberturas más amplias, acordes a las poblaciones circulantes.

Referencias bibliográficas

1. Shi *et al.*, (2010). *Journal of Virology*. 84(17): 8700-8711.
2. Yin *et al.* (2012). *Plosone*. 7(3)e33756.

3. Wernike *et al.* (2012). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. XX(X): 1–12.
4. Ostrowski *et al.* (2002). *Journal of Virology*. 76(9):4241-4250.
5. Martínez-Lobo *et al.* (2011) *Vaccine*. 29(40):6928-6940.