



SECUENCIACIÓN DE CEPAS DE VIRUS PRRS EN ESPAÑA

E. Mateu, D. Vidal, M. Martín

*Departamento de Sanidad y Anatomía
Centro de Investigación en Sanidad Animal (CRESA)
Universidad Autónoma de Barcelona*

INTRODUCCIÓN

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VPRRS) es una de las principales causas de pérdidas económicas en las explotaciones porcinas españolas. Este virus fue descrito por primera vez en 1991 por investigadores holandeses (Wensvoort et al., 1991) y posteriormente se clasificó dentro del género *Arteriviridae* juntamente, con el virus de la arteritis vírica equina (Meulenbergh et al., 1994). El virus posee una envuelta lipídica y su genoma se organiza en ocho tramas de lectura abierta (ORF) que se designan como 1a, 1b y 2-7 (figura 1). La ORF1 codifica la polimerasa vírica y es probablemente el gen más conservado en todas las cepas. Las ORF2, ORF3 y ORF4 codifican para diversas proteínas menores de la envuelta. Diversos estudios indican que la ORF3 puede acumular un gran número de mutaciones "neutras", es decir que no afectan sustancialmente ni a la viabilidad de los viriones ni a la virulencia de la cepa, pero que pueden servir como marcadores genéticos del virus (Forsberg et al., 2001) y permiten datarlo. Por su parte, la ORF5 codifica para la proteína principal de la envuelta (GP5) y, por lo que se sabe, la mayor variabilidad genética se presenta en esta parte del genoma. Este hecho es particularmente importante puesto que la neutralización del virus depende de la elaboración de anticuerpos frente a la GP5. La ORF6 codifica para la proteína M, que presenta poca variación y la ORF7 codifica la proteína de la nucleocápside que aunque induce intensamente la producción de anticuerpos, parece tener un papel escaso en la protección.

DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE VPRRS EN EUROPA

Desde los primeros estudios moleculares del VPRRS, se describió la existencia de dos genotipos

distintos del virus, uno europeo y otro americano, que presentaban una similitud en sus secuencias entre el 55% y el 79% dependiendo de la ORF examinada (Meulenbergh et al., 1997). El origen de estos dos genotipos continúa siendo incierto pero se ha sugerido que

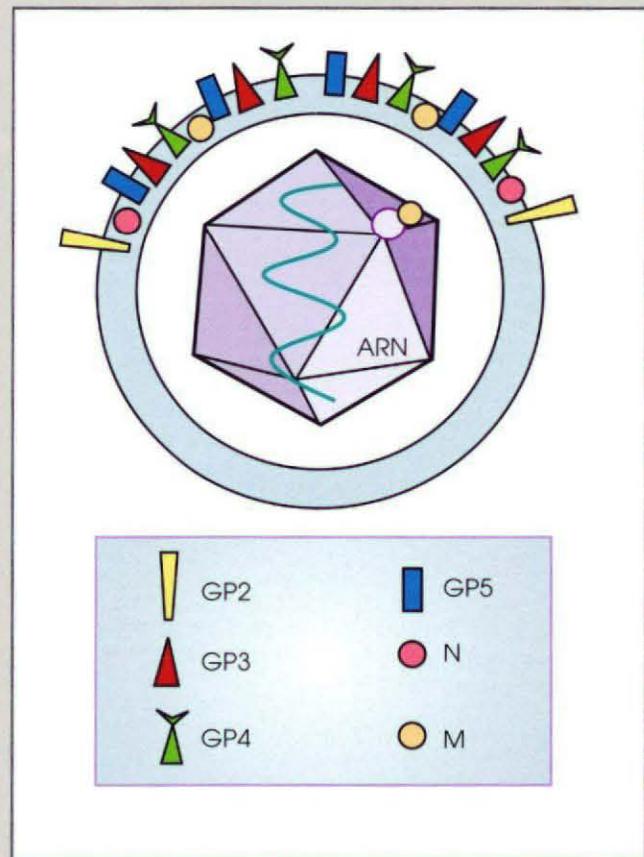


Figura 1. Esquema del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Los diferentes símbolos representan las proteínas del virus.



pueden derivar de un virus ancestral que se diseminó de forma más o menos simultánea entre las poblaciones de cerdos de Europa y Estados Unidos (Forsberg, et al., 2001).

Dentro de un genotipo determinado, cuando se llevan a cabo estudios de secuenciación, se observa que la variación genética entre cepas puede ser considerable. Inicialmente, se creía que esta diversidad era grande entre las cepas de tipo americano y mucho menor en las cepas de tipo europeo. Hoy en día, los datos publicados demuestran que la variación genética de las cepas europeas es, si no superior, al menos igual a la de las cepas americanas. Basándose en las secuencias de la ORF5 del virus, Stadejek et al. (2002) han demostrado la existencia de cepas europeas que difieren en un 30% de la de Lelystad, considerada la referencia para este genotipo. Por otra parte, Forsberg et al. (2002) han señalado la probable existencia de variantes del virus que están distribuidas en Europa siguiendo un patrón más o menos geográfico.

En el caso particular de España, la diversidad de las cepas existentes es manifiesta y, posiblemente, ha ido aumentando a medida que ha pasado más tiempo desde la primera introducción del virus en España. En 1996, Suárez et al. analizaron las secuencias de la ORF5 de diferentes aislados españoles de VPRRS y determinaron que la similitud nucleotídica de los aislados españoles con el virus de Lelystad oscilaba entre el 87,1% y el 99,2% aunque, mayoritariamente, las cepas estaban bastante próximas a la secuencia del virus de referencia. Un nuevo estudio basado en las secuencias de la ORF5 de aislados de 2000 a 2002 (Mateu et al., 2003) ha mostrado que la mayoría de cepas que se detectan en la actualidad en España, están por debajo del 90% de similitud con relación a la cepa de Lelystad. La inclusión de nuevos aislados obtenidos durante 2002 y 2003 confirman esta idea (Mateu et al., datos sin publicar) (**figura 2**).

¿QUÉ INFORMACIÓN NOS DA LA SECUENCIACIÓN?

La secuenciación consiste en determinar con precisión cuál es el código genético de una parte o todo el genoma de un aislado. Esta información nos puede permitir:

- Determinar el parentesco de un aislado en relación a otros.
- Caracterizar una cepa concreta.
- Estudiar las variaciones que pueden haberse producido en regiones críticas del virus.

Por el contrario, con la secuenciación no es posible predecir:

- La virulencia de la cepa.
- Qué vacuna va a funcionar mejor en ese caso.

Veamos en detalle las posibilidades que nos brinda la secuenciación a través de diferentes ejemplos. Supongamos que en una granja infectada, pero en la que hacía tiempo que no se presentaban problemas serios de PRRS, se produce un brote de la enfermedad. Estamos preocupados por que pueda haberse introducido una nueva cepa.

Remitimos muestras de cerdas y lechones al laboratorio y, tras el análisis por PCR de la ORF5 (la parte más variable del virus), resulta que las cerdas de primer parto son positivas. Realizamos la secuenciación de los aislados y los comparamos con secuencias anteriores que teníamos de nuestra explotación. Los resultados pueden ser los siguientes:

- Los aislados recientes y los antiguos poseen una elevada homología (por ejemplo, homología 99%): podemos asumir con bastante seguridad que la cepa de nuestra explotación sigue siendo la misma o muy parecida a la que teníamos.
- Los aislados difieren sustancialmente (por ejemplo, homología 90%). Podemos asumir que se ha introducido una nueva cepa en la explotación.

Como decíamos anteriormente, otra utilidad de la secuenciación es caracterizar una cepa concreta. Tomemos como ejemplo una cepa española actual y una cepa de virus de Lelystad y analicemos la ORF5. A partir de su secuencia, podemos predecir como será la proteína que codifican.

En la cepa de Lelystad, conocemos que la ORF5 contiene uno de los epítomos críticos para la neutralización del virus. Este epítopo se sitúa en la parte de la GP5 próxima al extremo N-terminal de la proteína y presenta dos lugares potenciales de glicosilación (NxT). Estas glicosilaciones son importantes porque pueden enmascarar el reconocimiento antigénico del virus (**figura 3**).

Si comparamos la secuencia del virus de Lelystad con la de un aislado español de 2003, podemos ver que en la parte crítica del epítopo se introduce un punto adicional de glicosilación, lo que podría sugerir una mayor dificultad para que el virus fuese neutralizado por la respuesta de anticuerpos elaborada por el animal (**figura 4**).

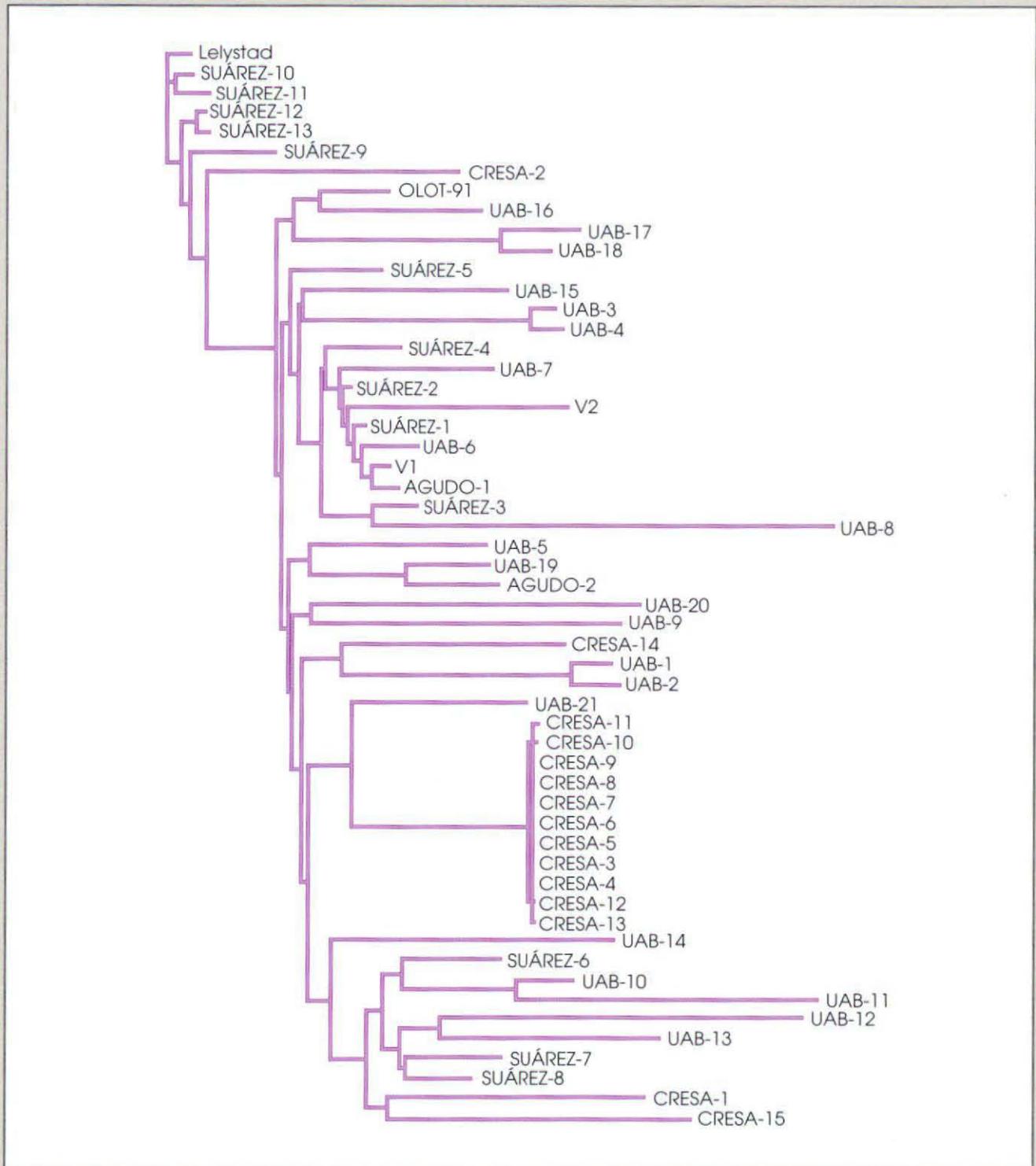


Figura 2. Árbol filogenético construido con 55 secuencias de la ORF5 de cepas españolas del VPRRS. Lelystad: virus de Lelystad; Suárez-n: secuencias españolas descritas por Suárez et al. (1996); UAB-n: secuencias españolas (2000-02) descritas por Mateu et al. (2003); CRESA-n: cepas españolas detectadas en 2003; Olot-91: primer aislado español; V-n: vacunas elaboradas con cepas españolas; Agudo-n: secuencias de cepas detectadas en brotes de PRRS agudo en España.

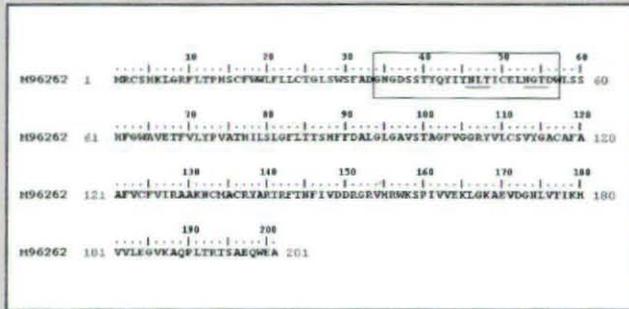


Figura 3. Glicoproteína 5 del VPRRS (cepa Lelystad) deducida a partir de su secuencia nucleotídica. La caja muestra el epítipo de neutralización de la proteína. La parte subrayada de la secuencia marca los puntos de glicosilación.

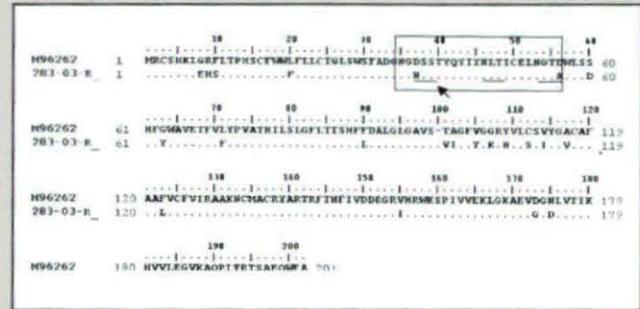


Figura 4. Comparación de la cepa de Lelystad (predicción de la GP5) con un aislado español de 2003. La flecha indica la aparición de un punto adicional de glicosilación.

A pesar de estas posibilidades, la secuenciación no nos permite determinar qué cepas son más virulentas que otras ni qué vacuna va a funcionar mejor en un caso concreto. Esto es debido a que, hoy por hoy, desconocemos cuáles son los factores que determinan la virulencia y poseemos poca información sobre la respuesta inmunitaria frente al virus.

Perspectivas de futuro

Es esperable que en los próximos años se conozcan los mecanismos de virulencia del virus PRRS. A través de este conocimiento, la secuenciación posiblemente podrá aportar información adicional sobre la virulencia de distintas cepas y la adecuación de nuevas vacunas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FORSBERG R, OLEKSIWICZ MB, PETERSEN AM, HEIN J, BOTNER A., STORGAARD T. (2001). A molecular clock dates the common ancestor of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus at more than 10 years before the emergence of disease. *Virology* 289: 174-79.
2. FORSBERG R, STORGAARD T, NIELSEN HS, OLEKSIWICZ MB, CORDIOLI P, SALA G, HEIN J, BOTNER A. (2002). The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology* 299: 38-47.
3. MATEU E, MARTÍN M, VIDAL D. (2003). Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain. *J Gen Virol* 84: 529-34.
4. MEULENBERG JJ, HULST MM, DE MEIJER EJ, MOONEN PL, DEN BESTEN A, DE KLUYVER EP, WENSVOORT G., MOORMANN RJ. (1994). Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising lactate dehydrogenase-evading virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus. *Arch Virol Suppl* 9: 441-8.
5. MEULENBERG JJ, PETERSEN DEN BESTEN A, DE KLUYVER E, VAN NIEUWSTADT A, WENSVOORT G, MOORMANN RJ. (1997). Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 55: 197-202.
6. SUÁREZ P, ZARDOYA R, MARTÍN MJ, PRIETO C, DOPAZO J, SOLANA A, CASTRO JM. (1996). Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res* 42: 159-65.
7. STADEJEK T, STANKEVICIUS A, STORGAARD T, OLEKSIWICZ MB, BELAK S, DREW TW, PEJSAK Z. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J Gen Virol* 83: 1861-73.
8. WENSVOORT G, TERPSTRA C, POL JM, TER LAAK EA, BLOEMRAAD M, DE KLUYVER EP, KRAGTEN C, VAN BUITEN L, DEN BESTEN A, WAGENAAR F, et al. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Quat* 13: 121-30.