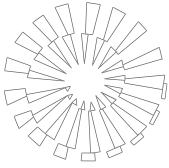


Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia



Vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): writing a history

Lilián Flores-Mendoza* Jesús Hernández*

Abstract

The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) constitutes one of the most serious problems of the pig industry in the world. It affects pigs of all ages and causes reproductive and respiratory disorders that create great economic losses. These increase due to the rapid spread of the disease and the inefficiency of the commercial vaccines. Modified live and killed vaccines are the two types of commercial vaccines currently available on the market for American and European strains. Although these vaccines can reduce disease symptoms and viremia, they do not prevent infection in any way and cross-presentation is variable against heterologous virus. Furthermore, it has been reported that the vaccine's virus can spread to other susceptible animals. For these reason, many studies focused on the development of new vaccines that include different vectors for the development of DNA vaccines by evaluating various structural proteins. The use of PRRSV infectious clones, as well as the construction of viral chimeras between the vaccine virus and highly infectious virus have also been evaluated. All these strategies have failed to develop an effective vaccine against PRRSV; therefore it remains as a major challenge.

Key words: PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME, PRRSV, VACCINES.

Resumen

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) constituye uno de los problemas más grandes de la industria porcina. Afecta a cerdos de todas las edades, causa problemas reproductivos y respiratorios que generan pérdidas económicas millonarias. Éstas van en aumento debido a la rápida diseminación del virus y a la poca eficiencia de las vacunas comerciales para su tratamiento. Actualmente existen dos tipos de vacunas contra el PRRSV: una utiliza el virus atenuado y otra el virus inactivado. Existen en el mercado ambos tipos, tanto para cepas americanas como europeas. Aun cuando dichas vacunas disminuyen los síntomas de la enfermedad y la viremia, no evitan la infección y la protección cruzada es variable frente a virus heterólogos. Además, se ha informado que el virus vacunal puede diseminarse a otros animales susceptibles. Por esta razón muchos estudios se han orientado al desarrollo de nuevas vacunas que incluyen diferentes vectores para el desarrollo de vacunas de ADN evaluando varias proteínas estructurales. También se ha evaluado el empleo de clones infecciosos de PRRSV, así como la construcción de quimeras virales entre el virus vacunal y un virus altamente infeccioso. Todas estas estrategias no han logrado desarrollar una vacuna eficaz contra el PRRSV, por lo que dicho propósito sigue siendo un reto muy importante.

Palabras clave: VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO, PRRS, VACUNAS.

Recibido el 23 de abril de 2009 y aceptado el 25 de enero de 2010.

*Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Carretera a la Victoria, Km 0.6, Hermosillo, Sonora, 83000, México, Teléfono y Fax: (662) 289-24-00, ext. 294, Correo electrónico: jhdez@ciad.mx

Introduction

The porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a disease distributed in the majority of pork meat producing countries, where millionaire economic losses are generated. For example, United States of America, Canada and Japan have recorded, as contaminated with this disease, more than 50% of their herds.¹⁻³ Nowadays, only Norway and Sweden are disease free.⁴ In Mexico, an approximate number of losses has not been recorded; nevertheless, some studies show that these fluctuate from 250 to 500 dollars per sow.⁵ Combined with annual losses caused by PRRS, recent acute outbreaks of highly pathogenic strains, which increase these numbers, have been described. In 2006, China Animal Disease Control Center (CADC) informed of a PRRS outbreak that affected 2 120 000 pigs with a 20% mortality.⁶ These numbers show a very difficult panorama for the porcine industry due to the PRRS; in this context, new control and prevention strategies for the disease have been tried in the past years.

In regard to PRRS disease, important advances have been made in fields like epidemiology, transmission, clinical characteristics, etc.^{7,8} Another widely studied aspect is the causal agent, the virus of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). In relation to the latter, its structure, susceptible cells and cellular infection mechanism is known.⁹⁻¹⁴ Nevertheless, important aspects such as evasion from the immune system by the virus and efficient vaccines to eliminate or prevent the disease have not been cleared, in spite of researches performed to this moment.¹⁵

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus generalities

The PRRSV belongs to the Arteriviridae (*Arterivirus* genus, Nidovirales order). It is a virus involved with a simple chain RNA genome, positive polarity of approximately 15 Kb.¹⁶ The genome of the PRRSV is formed on the extreme 5' of a short untranslated region (UTR) followed by nine open reading frames (ORF) called ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 and ORF7.¹⁷⁻¹⁹ The ORF1a and ORF1b approximately constituted 75% of the genome size and encodes to a polyprotein with RNA polymerase activity (pp1a) and also the polyprotein 1ab, product of a change in the reading frame during the nearby translation at extreme 3' of ORF1a.²⁰ The ORF 2a and 3-7 encode for structural glycoproteins (GP) 2a, GP3, GP4, GP5 and non glycosylated proteins 2b, the membrane M protein and the nucleocapsid N. Also, in the extreme 3' of the genome there is an untranslated region followed by a poly A tail.^{17,18,21}

Introducción

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es una enfermedad distribuida en la mayoría de los países productores de carne de cerdo, donde genera millonarias pérdidas económicas. Por ejemplo, Estados Unidos de América, Canadá y Japón han registrado más de 50% de sus hatos contaminados con esa enfermedad.¹⁻³ Actualmente, sólo Noruega y Suecia permanecen libres de la enfermedad.⁴ En México no se ha registrado una cifra aproximada de pérdidas; sin embargo, algunos estudios muestran que éstas varían de 250 a 500 dólares por hembra.⁵ Aunadas a las pérdidas anuales causadas por el PRRS, recientemente se han descrito brotes agudos con cepas altamente patogénicas que incrementan estas cifras. En 2006 la organización China Animal Disease Control Center (CADC) informó de un brote de PRRS que afectó a 2 120 000 cerdos con mortalidad de 20%.⁶ Estas cifras presentan un panorama muy difícil para la industria porcícola a causa del PRRS; en este contexto, en los últimos años se ha tratado de desarrollar nuevas estrategias para el control y prevención de la enfermedad.

En lo que respecta a la enfermedad de PRRS se han logrado muchos avances en campos como la epidemiología, transmisión, características clínicas, etc.^{7,8} Otro aspecto estudiado ampliamente es el agente causal, el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). Respecto de este último, se conoce su estructura, las células susceptibles y el mecanismo de infección celular.⁹⁻¹⁴ Sin embargo, no se han logrado esclarecer aspectos importantes como la evasión del sistema inmune por el virus y el desarrollo de vacunas eficientes para eliminar o prevenir la enfermedad, a pesar de las investigaciones realizadas hasta el momento.¹⁵

Generalidades del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

El PRRSV pertenece a la familia Arteriviridae (género *Arterivirus*, orden Nidovirales). Se trata de un virus envuelto con un genoma de ARN de cadena sencilla, polaridad positiva de aproximadamente 15 Kb.¹⁶ El genoma del PRRSV se compone en el extremo 5' de una región corta no traducida (UTR, por sus siglas en inglés, *untranslated region*) seguida de nueve marcos de lectura abierta (ORF) llamados ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 y ORF7.¹⁷⁻¹⁹ Los ORF1a y ORF1b constituyen aproximadamente 75% del tamaño del genoma y codifican a una poliproteína con actividad de ARN polimerasa (pp1a) y también la poliproteína 1ab, producto de un cambio en el marco de lectura durante la traducción cercana al extremo

The ORF2 contains an intern reading frame which encodes for a non glycosylated protein known as 2b. The presence of this protein has been identified on infected cells, as well as an anti-2b response on PRRSV infected pigs.¹⁹ Recently, it has been demonstrated that protein 2b is an integral component of the PRRS virion.²² The GP3 is the most glycosylated protein of the PRRSV with seven sites of N-glycosylation.²³ This has been detected in the virion of some European strains; nevertheless, in American strains, its presence is still questioned.²⁴⁻²⁶ On the other hand, GP4 has four N-glycosylation sites and anti-GP4 neutralizing antibodies (NA) have been identified; however, these are less effective than the induced by GP5.²⁷

The GP5 is a glycosylated transmembrane protein that can be divided in several domains: a signal peptide, an ectodomain (with a variable number of glycosylation potential sites), a transmembrane region and an endodomain.^{11,23} Two epitopes have been detected in the ectodomain that induce the production of antibodies, of which only one type is neutralizing. These epitopes are called A and B (the B epitope is the neutralizing).²⁸ This last, is conserved between the PRRSV isolates; nevertheless, it is not immunodominant, in contrast to A epitope, which is immunodominant and hypervariable. These epitopes are found separated by seven amino acids. PRRSV infected pigs mainly develop non neutralizing antibodies against A epitope and later on (four weeks approximately) NA against B epitope appear. In such context, A epitope functions as virus decoy, momentarily distracting the neutralizing response.²⁹ It has been observed that GP5 forms heterodimers with M protein in viral particles.³⁰ These heterodimers have also been related to the cellular infection for their bound to heparan sulfate and sialoadhesin molecules, mainly in macrophages.^{31,32} On the other hand, N protein encoded by ORF7 constitutes between 20%-40% of the virion proteinic content.^{20,30} These protein contains 26% of basic residues in the N terminal extreme, which can facilitate its interaction with the RNA-genome.²³

An important trait of PRRSV is its high genetic variability. Based on its genetic difference, PRRSV isolates can be divided in: European genotype (Lelystad virus prototype) and American genotype (VR-2332 virus prototype). These genotypes have a similitude of nucleotides of 55% to 70% when compared to all the genome.^{33,34} It has been reported that in American isolates there is greater genetic diversity, in contrast to the Europeans, which are highly genetically related.³⁵ The genes which show greater variability rate are ORF5, ORF3 and ORF4, while genes of ORF2, ORF6, and ORF7 are the most conserved.³³

PRRSV M protein is the most conserved, with

3' del ORF1a.²⁰ Los ORF 2a y 3-7 codifican para las glicoproteínas estructurales (GP) 2a, GP3, GP4, GP5 y las proteínas no glicosiladas 2b, la proteína M de membrana y la N de la nucleocápside. También en el extremo 3' del genoma hay una región no traducida seguida de una cola de poli A.^{17,18,21}

El ORF2 contiene un marco de lectura interno que codifica para una proteína no glicosilada conocida como 2b. Se ha identificado la presencia de esta proteína en células infectadas, así como una respuesta anti-2b en cerdos infectados con PRRSV.¹⁹ Recientemente se demostró que la proteína 2b es un componente integral del virión del PRRS.²² La GP3 es la proteína más glicosilada del PRRSV con siete sitios de N-glicosilación.²³ Ésta ha sido detectada en el virión de algunas cepas europeas; sin embargo, en cepas americanas su presencia aún se cuestiona.²⁴⁻²⁶ Por su parte, la GP4 tiene cuatro sitios de N-glicosilación y se han identificado anticuerpos neutralizantes (AN) anti-GP4; sin embargo, éstos son menos efectivos que los inducidos por GP5.²⁷

La GP5 es una proteína transmembranal glicosilada que se puede dividir en varios dominios: un péptido señal, un ectodominio (con un número variable de sitios potenciales de glicosilación), una región transmembranal y un endodominio.^{11,23} En el ectodominio se han detectado dos epítopes que inducen la producción de anticuerpos, de los cuales sólo un tipo es neutralizante. Estos epítopes se denominan A y B (el epítope B es el neutralizante).²⁸ Este último es conservado entre los aislamientos de PRRS; sin embargo, no es inmunodominante, contrario al epítope A, el cual es inmunodominante e hipervariable. Estos epítopes se encuentran separados por siete aminoácidos. Los cerdos infectados con PRRSV primeramente desarrollan anticuerpos no neutralizantes contra el epítope A y tiempo después (cuatro semanas aproximadamente) aparecen los AN contra el epítope B. En tal contexto, el epítope A funciona como señuelo del virus, distrayendo de manera momentánea la respuesta neutralizante.²⁹ Se ha observado que la GP5 forma heterodímeros con la proteína M en las partículas virales.³⁰ Estos heterodímeros también se han relacionado con la infección celular por su unión a moléculas de heparán sulfato y sialoadesina, principalmente en macrófagos.^{31,32} Por su parte, la proteína N codificada por el ORF7 constituye entre 20%-40 % del contenido proteínico del virión.^{20,30} Esta proteína contiene 26% de residuos básicos en el extremo N terminal, lo cual puede facilitar su interacción con el ARN del genoma.²³

Una característica importante del PRRSV es su alta variabilidad genética. En base a sus diferencias genéticas, los aislados del PRRSV pueden dividirse en: genotipo europeo (prototipo virus Lelystad) y

a similitud de 94% and 100% at amino acid level, within the same genotype (European or American). Nevertheless, between both genotypes there is only a 63% of amino acid identity.³³ On the opposite extreme, GP5 is the most heterogeneous protein, with 88%-99% of amino acid identity between strains from the same continent, and 52%-53% of identity between genotypes.³³ In regard to non structural proteins (nsp), encoded by ORF1a and ORF1b, there are recent publications that show that nsp2 shows a high variability region (in amino acid positions 324 to 814) only with 40% similitud in amino acids between European and American genotypes, which represents the gene with greater PRRSV variability rate.³⁶

The high PRRSV genetic variability complicates the development of an effective immune response between heterogeneous strains in reinfection. It constitutes one of the main limits in vaccine development, since it has been observed that after vaccination there is no 100% crossed protection between heterologous strains. One of the most representative cases of this problem presented itself in Denmark, in 1996, where a vaccine based on an attenuated virus from the American strain VR2332 was administered and later an outbreak of PRRSV was observed with atypical characteristics. When the sequence of these viruses was analyzed, the identity was of 99.3% and 99.5% with regard to the American VR2332 and the vaccine prototype.³⁷ This result indicated that the vaccine developed an outbreak with PRRSV and introduced the American genotype to the country. Nowadays, it is considered that in Denmark at least 40% of the farms are contaminated with American and European strains.³⁸

Immune response against PRRSV

The pig's immune response against PRRSV is very complex and two important aspects must be considered that influence this: high virus variability and variability in the response of infected pigs. When the latter result with PRRSV infection, they induce immunity capable of protecting in reinfections against homologous viruses, and induce prolonged viremias and persistent infections.³⁹ These characteristics give a panorama of the complex interaction between PRRSV and the pig's defense against the virus. There are questions on the events that initiate immunity during the infection, as well as the role played by antibodies and T cells. Also, the molecular and cellular mechanisms involved in regulation, induction and maturation of the immune response are not clear. Besides, there is still to clarify the consequences of the PRRSV genetic variability, as well as the genetic variation of the different pig populations against PRRSV in the immune response.³⁹

The initial resistance present against PRRSV mainly

genotipo americano (prototipo virus VR-2332). Estos genotipos tienen una similitud de nucleótidos de 55% a 70% cuando se compara todo el genoma.^{33,34} Se ha informado que en los aislados americanos existe mayor diversidad genética, en comparación con los europeos, que se encuentran genéticamente muy relacionados.³⁵ Los genes que presentan mayor tasa de variabilidad son ORF5, ORF3 y ORF4, mientras que los genes de ORF2, ORF6 y ORF7 son los más conservados.³³

La proteína M del PRRSV es la más conservada, con similitud de 94% y 100% a nivel de aminoácidos, dentro del mismo genotipo (europeo o americano). Sin embargo, entre ambos genotipos sólo hay 63% de identidad de aminoácidos.³³ En el extremo opuesto, la GP5 es la proteína más heterogénea, con 88%-99% de identidad de aminoácidos entre cepas del mismo continente, y 52%-55% de identidad entre genotipos.³³ En lo que respecta a las proteínas no estructurales (nsp, por sus siglas en inglés), codificadas por el ORF1a y ORF1b, hay publicaciones recientes que muestran que la nsp2 presenta una región de alta variabilidad (en las posiciones de aminoácidos 324 a 814) solamente con 40% de similitud de aminoácidos entre genotipos europeos y americanos, lo que representa el gen con la mayor tasa de variabilidad del PRRSV.³⁶

La alta variabilidad genética del PRRSV complica el desarrollo de una respuesta inmune efectiva entre las cepas heterólogas en reinfección. Constituye una de las principales limitantes en el desarrollo de vacunas, pues se ha observado que tras la vacunación no existe protección cruzada de 100% entre cepas heterólogas. Uno de los casos más representativos de este problema se presentó en Dinamarca, en 1996, donde se aplicó la vacuna a base de un virus atenuado de la cepa americana VR2332, y posteriormente se observó un brote de PRRSV con características atípicas. Cuando se analizó la secuencia de estos virus, la identidad fue de 99.3% y 99.5%, respecto al prototipo americano VR2332 y al vacunal.³⁷ Este resultado indicó que la vacuna desarrolló un brote con el PRRSV e introdujo el genotipo americano al país. Actualmente se considera que en Dinamarca al menos 40% de las granjas están contaminadas con las cepas americana y europea.³⁸

Respuesta inmune frente al PRRS

La respuesta inmune del cerdo frente al PRRSV es muy compleja y se deben considerar dos aspectos importantes que influyen en ella: alta variabilidad del virus y variabilidad en la respuesta de los cerdos infectados. Cuando estos últimos resultan con infección por el PRRSV inducen una inmunidad capaz de proteger en reinfecciones contra virus homólogos, e induce viremias prolongadas e infecciones persistentes.³⁹ Estas características dan un panorama de la compleja

depends of the antiviral response of the infected cells and the innate immune system in the first days before the development of the adaptive response. The virus takes advantage against the pig by evading in certain degree the innate response. First, PRRSV infects and replicates itself in some cells that participate in the innate response, such as macrophages and dendritic cells, important in the development of an adequate innate or adaptive immune response.^{13,14,40} Another important characteristic of the innate system against viruses is the production of type I (α/β), which induces a great quantity of antiviral proteins, such as protein kinase R, 2'-5' oligoadenylate synthetase, adenosine-deaminase RNA specific, and myxoma protein (MxGTPase), which inhibits viral replication and viral protein synthesis.⁴¹ The PRRSV achieves to inhibit type I IFN expression *in vivo* as well as *in vitro*,^{42,43} but the exogenous administration of IFN- α inhibits the virus replication and favors humoral response.⁴⁴

In regard to pro-inflammatory cytokines, like IFN- α , TNF- α and IL-1 β , which are important in the beginning of an inflammatory response, the infection by PRRSV inhibits the mRNA expression of these cytokines.⁴²⁻⁴⁵ Experiments *in vitro* using alveolar macrophages stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) and infected with PRRSV, showed a decrease in the mRNA of TNF- α .⁴⁴ While experiments *in vivo* are not able to detect this cytokine (TNF- α) in fluids obtained from bronchoalveolar washes.⁴² Likewise, it has been observed that IFN- α is capable of inhibiting PRRSV replication in alveolar macrophages cultures; nevertheless, the expression of this cytokine in bronchoalveolar washes was minimum.^{43,45} For the aforementioned, it is understood that the virus achieves, somehow, to modulate the production of IFN- α in the macrophages to assure its replication in these and another cells. It has been thought that this modulation might be at transcription level⁴⁶ although other studies also suggest that this takes place by inhibiting the antiviral protein synthesis;⁴⁷ nevertheless, it is necessary to perform research to determine the level where the PRRSV actuates during IFN type I inhibition. It has been shown that by infecting mononuclear cells with PRRSV the IL-10 is induced,⁴⁸ which is an anti-inflammatory cytokine that allows to inhibit the IL-1 and TNF- α expression, and besides participates in regulatory T cells differentiation.⁴⁹ The lack of an inflammatory response and weak or null antiviral response (induced by the IFN type I) creates an unfavorable microenvironment in the development of the adaptive response.

The humoral response against PRRSV has been widely evaluated. In infected pigs' serum, IgM anti-PRRSV antibodies can be found between days five and six post-infection (PI); nevertheless, after two or

interacción entre el PRRSV y la defensa de los cerdos al virus. Existen interrogantes sobre los eventos que inician la inmunidad durante la infección, así como del papel que desempeñan tanto los anticuerpos como las células T. Tampoco están claros los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la regulación, inducción y maduración de la respuesta inmune. Además, aún faltan por esclarecer las consecuencias de la variabilidad genética del PRRSV, así como la variación genética de las diferentes poblaciones de cerdos frente al PRRSV en la respuesta inmune.³⁹

La resistencia inicial que se presenta frente al PRRSV depende principalmente de la respuesta antiviral de las células infectadas y del sistema inmune innato en los primeros días antes del desarrollo de la respuesta adaptativa. El virus toma ventaja frente al cerdo al evadir en cierto grado la respuesta innata. Primeramente, el PRRSV infecta y se replica en algunas células que participan en la respuesta innata, como macrófagos y células dendríticas, importantes en el desarrollo de una respuesta inmune adecuada tanto innata como adaptativa.^{13,14,40} Otra característica importante del sistema innato frente a los virus es la producción de IFN tipo I (α/β), el cual induce la síntesis de una gran cantidad de proteínas antivirales, como es el caso de la proteína cinasa R, 2'-5' oligoadenilato-sintetasa, la adenosina-deaminasa específica de ARN, y de la proteína de mixoma (MxGTPasa), que inhiben la replicación viral y síntesis de proteínas virales.⁴¹ El PRRSV logra inhibir la expresión del IFN tipo I tanto *in vivo* como *in vitro*,^{42,43} pero la administración del IFN- α exógena inhibe la replicación del virus y favorece la respuesta humoral.⁴⁴

En lo que respecta al perfil de citocinas proinflamatorias, como el IFN- α , TNF- α e IL-1 β , que son importantes en el inicio de una respuesta inflamatoria, la infección por el PRRSV inhibe la expresión de ARNm de estas citocinas.⁴²⁻⁴⁵ En experimentos *in vitro* utilizando macrófagos alveolares estimulados con acetato de forbol mirístico (PMA, por su siglas en inglés) e infectados con PRRSV, se observó una disminución en la expresión de ARNm de TNF- α .⁴⁴ Mientras que los experimentos *in vivo* no logran detectar esta citocina (TNF- α) en los fluidos obtenidos de lavados broncoalveolares.⁴² Asimismo, se ha observado que el IFN- α es capaz de inhibir la replicación del PRRSV en cultivos de macrófagos alveolares; sin embargo, la expresión de esta citocina en lavados broncoalveolares fue mínima.^{43,45} Por lo anterior, se entiende que el virus logra, de alguna manera, modular la producción de INF- α en los macrófagos para asegurar su replicación en éstas y otras células. Se ha pensado que esta modulación puede ser a nivel de transcripción⁴⁶ aunque otros estudios también sugieren que ésta se lleva a cabo al inhibir

three weeks they are undetectable.⁵²⁻⁵² Later on, IgG antibodies are detected between days seven and tenth PI, with increase between second and fourth week.^{51,52} The levels of these antibodies are detectable up to 300 days PI at low levels.⁵³ The anti-PRRSV antibodies of the IgA type are detected from the fourteenth days PI with a maximum at 25 days until they disappear at one month, approximately.^{51,54} It has been reported that the AN appear at the third week PI,^{51,54} nevertheless, there are studies that show the presence of AN on the second week PI (day 9).⁵² This early response is present in some of the evaluated pigs; nevertheless, at the third week all pigs show AN. These differences in the presence of AN are due to the variability in the response of the pigs to the PRRSV; in fact, in pigs from other studies it is not possible to detect significant levels of AN during all the assay.^{51,53} Nevertheless, the AN that are produced can stay with low titers for prolonged periods.^{51,52}

The first anti-PRRSV antibodies are directed against N protein during the first week PI.^{51,53} Recently, it has been reported evidences of antibodies directed against several linear epitopes (formed by consecutive amino acid residues included in the same peptidic fragment) and of conformation (constituted by amino acids that, although far from protein primary sequence, they approach when this bends to form its tridimensional structure) of the nsp2 protein in the first PI week, and the response was stronger than the one directed to N protein.⁵⁵⁻⁵⁸ In the first PI weeks, antibodies against N protein have no neutralizing effect. These antibodies have been related with PRRSV dissemination in macrophages, through a phenomenon known as Antibody Dependent Enhancement or ADE.⁵⁹ Although non neutralizing antibodies against GP5 exist, AN can also be found, these are the ones mainly related with virus neutralization for both genotypes. These AN can be detected early in some cases from day nine PI; nevertheless, they generally are present from day 28 PI.⁵² AN against GP4, M protein and GP3 in lesser degree have also been detected.^{27,51,52,59}

The AN participation in the protection against PRRSV has been widely evaluated, and certain controversy exists in regard to its participation in protection against PRRSV. There are groups who describe that these do not participate in the virus control, since it was possible to isolate the virus from blood of pigs that showed a high AN titer. On the contrary, with an undetectable AN titer it was possible to resolve the viremia.⁶⁰ Nevertheless, other groups have shown that the passive transference of AN to pregnant sows infected with PRRSV is capable of blocking transplacental infection.⁶¹ In other words, the AN are not necessary for the viremia resolution, they are important to avoid infection.

The cellular response can be evaluated through the

la síntesis de proteínas antivirales;⁴⁷ sin embargo, es necesario realizar investigaciones para determinar el nivel al que actúa el PRRSV durante la inhibición del IFN tipo I. Se ha demostrado que al infectar células mononucleares con el PRRSV se induce la expresión de IL-10,⁴⁸ la cual es una citocina antiinflamatoria que logra inhibir la expresión de la IL-1 y el TNF- α , y además participa en la diferenciación de células T reguladoras.⁴⁹ La falta de una respuesta inflamatoria y la débil o nula respuesta antiviral (inducida por los IFN tipo I) crea un microambiente desfavorable en el desarrollo de la respuesta adaptativa.

La respuesta humoral frente al PRRSV se ha evaluado ampliamente. En suero de cerdos infectados se pueden encontrar anticuerpos IgM anti-PRRSV entre los días cinco y siete posinfección (PI); sin embargo, después de dos o tres semanas son indetectables.⁵⁰⁻⁵² Posteriormente se detectan anticuerpos IgG entre los días siete y diez PI, con incremento entre la segunda y cuarta semanas.^{51, 52} Los niveles de estos anticuerpos son detectables hasta 300 días PI a niveles bajos.⁵³ Los anticuerpos anti-PRRSV del tipo IgA son detectados a partir de los 14 días PI con máximo a los 25 días hasta que desaparecen al mes, aproximadamente.^{51,52} Se ha informado que los AN aparecen a partir de la tercera semana PI;^{51, 54} sin embargo, existen estudios que muestran la presencia de AN en la segunda semana PI (día 9).⁵² Esta respuesta temprana se presenta en algunos de los cerdos evaluados; sin embargo, a la tercera semana todos los cerdos muestran AN. Estas diferencias en la presencia de AN se debe a la variabilidad en la respuesta de los cerdos al PRRSV; de hecho, en algunos cerdos de otros estudios no es posible detectar niveles significativos de AN durante todo el ensayo.^{51,53} Sin embargo, los AN que se producen pueden permanecer durante periodos prolongados pero con títulos bajos.^{51, 52}

Los primeros anticuerpos anti-PRRSV se dirigen contra la proteína N durante la primera semana PI.^{51,53} Recientemente se ha informado de evidencias de anticuerpos dirigidos contra varios epítopes lineares (formados por residuos de aminoácidos consecutivos incluidos en un mismo fragmento peptídico) y de conformación (constituidos por aminoácidos que, aunque están alejados en la secuencia primaria de la proteína, se aproximan cuando ésta se pliega para formar su estructura tridimensional) de la proteína nsp2 en la primera semana PI, y la respuesta fue más fuerte que la dirigida a la proteína N.⁵⁵⁻⁵⁸ Los anticuerpos contra la proteína N en las primeras semanas PI no tienen un efecto neutralizante. Estos anticuerpos se han relacionado con la diseminación del PRRSV en macrófagos, a través de un fenómeno conocido como incremento de la infección dependiente de anticuerpos (*Antibody Dependent Enhancement*, ADE, por sus siglas

production of IFN- γ or IFN- γ production cells. In the cellular response induced by PRRSV both aspects have been evaluated.

The response of specific T cells against PRRSV, analyzed by mononuclear cell proliferation, appears in the fourth week PI with a maximum at the seventh week and a decline between the ninth and 11th week.⁶² Nevertheless, other studies show that this response is detected in a weak to moderate way from the second week PI, and increases on week four PI.⁶³ This differences might be due to the virus strain used or the pig's variability response, which allowed to classify the response in three levels: low, intermediate and high. In both cases, the IFN- γ secretory T cells phenotype in response to the PRRSV seems to consist of CD4⁺CD8⁺ memory lymphocytes and CD4⁺ cooperators.^{64,65}

The INF- γ expression was evaluated at transcript level in lymph node cells, lung and peripheral blood of PRRSV infected pigs. In all cases there was significant mRNA expression of IFN- γ ; nevertheless, the IFN- γ produced is not sufficient or it is not effective in the virus elimination since it was also detected in these lymph and tissues.⁶⁶ When analyzing the specific IFN- γ producing cells against PRRSV (through ELISpot assays) in blood of infected pigs, a low specific producing cell number was observed, between 50-100 cells for each 1×10^6 cells in the first PI week; it was only possible to detect a greater number of cells during reinfection (400 for each 1×10^6).⁶⁷ Nevertheless, other work groups, such as the one of Ronald *et al.*,⁶⁸ observed a significant IFN- γ production in serum at two weeks PI. They attribute this early production of IFN- γ to several factors, among them, the activation of NK cells (which, up to the moment, have not been evaluated in PRRSV infection), to the strain used and to a lymphocyte polyclonal activation that would lead to a decrease in the availability of cells capable to respond.⁶⁸

The role of cell mediated immunity in the PRRSV elimination is not totally defined; however, it is important in the complete virus elimination, since the humoral response by itself is not capable to eliminate this last.

Vaccines against PRRSV

How do vaccines work: basic fundamentals for an ideal vaccine

By definition, vaccines are products formed with a complete microorganism, attenuated or dead, or fractions of itself, capable of inducing a protective and lasting immune response to such microorganism. Its function is to prevent and control future infections.⁶⁹ To manage this, they must unchain a protective immune response and must be innocuous, that is,

en inglés).⁵⁹ A pesar de que existen anticuerpos no neutralizantes contra la GP5, también se pueden encontrar AN, éstos son los que se han relacionado principalmente con la neutralización del virus para ambos genotipos. Estos AN pueden ser detectados en algunos casos de manera temprana a partir del día 9 PI; sin embargo, generalmente se presentan a partir del día 28 PI.⁵² También se han detectado AN contra GP4, proteína M y en menor grado contra GP3.^{27,51,52,59}

La participación de los AN en la protección contra el PRRSV se ha evaluado ampliamente, y existe cierta controversia respecto de su participación en la protección contra el PRRSV. Hay grupos que describen que éstos no participan en el control del virus, debido a que en cerdos que presentan un título elevado de AN fue posible aislar el virus de sangre. En el caso contrario, con un título indetectable de AN se logró resolver la viremia.⁶⁰ Sin embargo, otros grupos han demostrado que la transferencia pasiva de AN a cerdas gestantes infectadas con PRRSV es capaz de bloquear la infección trasplacentaria.⁶¹ En otras palabras, los AN no son necesarios para la resolución de la viremia, son importantes para evitar la infección.

La respuesta celular se puede evaluar mediante la producción de IFN- γ o células productoras de IFN- γ . En la respuesta celular inducida por el PRRSV se han evaluado ambos aspectos.

La respuesta de células T específicas contra el PRRSV, analizadas mediante la proliferación de células mononucleares, aparece en la cuarta semana PI con un máximo a la semana siete y un declive entre las semanas 9 y 11.⁶² Sin embargo, otros estudios muestran que esta respuesta se detecta de manera débil a moderada a partir de la segunda semana PI, y se incrementa en la semana cuatro PI.⁶³ Estas diferencias pueden deberse a la cepa del virus utilizada o a la variabilidad en la respuesta de los cerdos, que permitió clasificar la respuesta en tres niveles: bajo, intermedio y alto. En ambos casos, el fenotipo de células T secretoras de IFN- γ en respuesta al PRRSV parece consistir de linfocitos CD4⁺CD8⁺ de memoria y CD4⁺ cooperadoras.^{64,65}

La expresión de INF- γ se evaluó a nivel de transcritos en células de ganglios linfáticos, pulmón y sangre periférica de cerdos infectados con PRRSV. En todos los casos hubo expresión significativa de ARNm del IFN- γ ; sin embargo, el IFN- γ producido no es suficiente o no es efectivo en la eliminación del virus debido a que también fue posible detectarlo en estos ganglios y tejidos.⁶⁶ Al analizar las células productoras de IFN- γ específicas contra PRRSV (a través de ensayos de ELISpot) en sangre de cerdos infectados, se observó un número bajo de células productoras específicas, entre 50-100 células por cada 1×10^6 células en la primera semana PI; sólo fue posible detectar un

incapable of unchaining an adverse reaction.^{68,70} To prevent and control a disease, vaccines have to efficiently stimulate the immune system and induce an immunologic memory.⁷⁰ Vaccine classifications can be done by taking into account the technology used in their design and production.⁶⁹

Classic vaccines can be inactive vaccines, attenuated vaccines or subunit vaccines. The first are constituted by complete microorganisms or inactivated by physical and chemical means. Attenuated vaccines are formed by microorganisms whose virulence has been reduced using diverse methods such as successive passes in culture medium, by chemical methods, recombination, etc. Subunit vaccines contain a mixture of antigenic fractions, be it lipopolysaccharides, purified proteins or synthesized, ribosomic extracts, etc. These types of vaccines are used when the responsible components of the microorganism pathogenicity are known.⁶⁹ The advances in molecular biology have allowed the development of new vaccines that use genetic manipulation, synthetic peptides, anti-idiotypic vaccines (antibodies that reproduce an antigen morphology).⁷¹

Attenuated vaccines against PRRSV

The most used vaccine against PRRSV uses modified live virus (MLV), attenuated by multiple passage in cellular culture. In the case of the PRRSV, the attenuated vaccines are more efficient than the inactivated since they induce greater cellular and humoral response; nevertheless, this response is insufficient to completely protect against heterologous viruses.^{72,73}

The vaccination of pigs using attenuated vaccine of American or European type stimulates the cellular response.^{65,73,74} Nevertheless, the proportion of IFN- γ production cells is very low (specially with European strains) and its very slow development if compared to other attenuated vaccines like the Aujeszky virus, in which the production of INF- γ producing cells is two to four times greater after vaccination.^{65,73,74} Therefore, it is stated that vaccination using attenuated virus is not completely efficient, since the cellular response measured by INF- γ production cells evolves from day 28 to 42, in a moderate but significant proportion.⁷⁴ In regard to the humoral response induced by attenuated virus vaccine, the non neutralizing antibodies appear in early stages of the infection and stay up to 96 weeks PI.⁷⁵ The AN only appear in some vaccinated animals;⁶⁵ nevertheless, some authors detected AN after challenging vaccinated pigs.⁷⁶

In spite of the aforementioned, several experiments have shown that the use of MLV vaccine significantly reduces lesions and clinical signs in front of the challenge with PRRSV homologous strains. Besides,

número mayor de células durante una reinfección (400 por cada 1×10^6).⁶⁷ Sin embargo, otros grupos de trabajo, como el de Ronald *et al.*, observaron una producción significativa de IFN- γ en suero a las dos semanas PI. Ellos atribuyen esta producción temprana de IFN- γ a varios factores, entre ellos a la activación de células NK (las cuales hasta el momento no han sido evaluadas en la infección con PRRSV), a la cepa utilizada y a una activación policlonal de linfocitos, lo cual llevaría a una reducción en la disponibilidad de células capaces de responder.⁶⁸

El papel de la inmunidad mediada por células en la eliminación del PRRSV no está totalmente definida; sin embargo, es importante en la eliminación completa del virus, pues la respuesta humoral sola no es capaz de eliminar a este último.

Vacunas contra el PRRSV

Cómo funcionan las vacunas: fundamentos básicos para una vacuna ideal

Por definición, las vacunas son productos formados con un microorganismo completo, atenuado o muerto, o fracciones de él, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera a dicho microorganismo. Su función es prevenir y controlar futuras infecciones.⁶⁹ Para lograrlo, deben desencadenar una respuesta inmune protectora y además ser inocuas, es decir, incapaces de desencadenar una reacción adversa.^{69,70} Para que las vacunas puedan prevenir o controlar una enfermedad, tienen que estimular eficazmente el sistema inmunitario e inducir una memoria inmunológica.⁷⁰ Se puede hacer una clasificación de las vacunas teniendo en cuenta la tecnología empleada en su diseño y producción.⁶⁹

Las vacunas clásicas pueden ser vacunas inactivadas, vacunas atenuadas o vacunas de subunidades. Las primeras están compuestas por microorganismos completos o inactivados por medios físicos y químicos. Las vacunas atenuadas están formadas por microorganismos cuya virulencia se ha reducido utilizando diversos métodos como pases sucesivos en medios de cultivo, por métodos químicos, recombinação, etc. Las vacunas de subunidades contienen un preparado de fracciones antigénicas, ya sean lipopolisacáridos, proteínas purificadas o sintetizadas, extractos ribosómicos, etc. Este tipo de vacunas se emplea cuando se conocen los componentes responsables de la patogenicidad de un microorganismo.⁶⁹ Los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas vacunas que utilizan la manipulación genética, péptidos sintéticos, vacunas antiidiotipo (anticuerpos que reproducen la morfología de un antígeno).⁷¹

it shows a decrease in the proportion of infected pigs in a persistent way and in the viral excretion period using homologous strains of the vaccinal virus.^{72,77} Nevertheless, it is clear that the vaccine does not prevent reinfection with homologous strains, it only reduces the disease signs. In front of heterologous strains, the same scenery is present but the protection is lower. An important problem in regard to the security of this vaccine is the fact that in some cases, attenuated viruses can revert to virulent and cause propagation of the virus in the pig population.³⁷

Inactivated vaccines

The main advantage of inactivated vaccines is the weakness in the majority of attenuated vaccines, one of these is that they cannot revert into virulent, since they use dead virus. After vaccination it is not possible, at any moment, to detect viral RNA in blood or tissue samples.⁷⁸ Some authors have managed certain degree of protection in field.^{79,80} Nevertheless, recent studies that use more precise techniques have obtained null response against PRRSV. Nilubol *et al.*,⁷⁹ and Zuchermann *et al.*,⁷⁴ did not find significant increase of IFN- γ producing cells against PRRSV in American and European strains, respectively, even after challenging vaccinated pigs.

Inactivated vaccines of American strains are not capable of inducing a humoral response; that is, they are not capable of stimulating AN production.⁶⁵ Even when an increase of antibodies after the challenge is observed, these do not neutralize.⁷⁸ Nevertheless, inactivated vaccines of European strains induce a slight AN production, although this last is not reflected in the viremia decrease nor in the viral charge in tissue.⁷⁴

Field alternative vaccines

Commercial vaccines have been used in great number of farms with controversial results, which could be due to little homology between strains (vaccinal and of the farm), since cross protection is limited.⁸¹ In the presence of this scenario, control strategies have been implemented in farms, based on the use of viremic sera during acclimatization of sows, breeding stock or simple contact of sick animals with animals pretended to be immunized.⁸²⁻⁸⁴ Shibata *et al.*,⁸⁵ showed that the exposition to field virus that circulated in the farm, prevented the disease clinical signs and observed a decrease of infection titers, as well as its length when integrating these animals with the rest.^{84,86} This strategy is still being used and helps control reinfection dissemination in the farm. Nevertheless, this exposition method entails some risks; for example, the serum used for acclimatization can contain some other pathogen;

Vacunas atenuadas contra el PRRSV

La vacuna más utilizada contra el PRRSV utiliza virus vivo modificado (MLV, por sus siglas en inglés), atenuado por pasaje múltiple en cultivo celular. En el caso del PRRSV, las vacunas atenuadas son más eficientes que las inactivadas debido a que inducen mayor respuesta celular y humoral; sin embargo, esta respuesta es insuficiente para proteger completamente contra la infección frente a virus heterólogos.^{72,73}

La vacunación de cerdos utilizando vacuna atenuada de tipo americano o europeo estimula la respuesta celular.^{65,73,74} Sin embargo, la proporción de células productoras de IFN- γ es muy baja (especialmente en cepas europeas) y su desarrollo muy lento si se compara con otras vacunas atenuadas como la del virus de Aujeszky, en la que la producción de células productoras de INF- γ es de dos a cuatro veces mayor después de la vacunación.^{65,73,74} Por lo anterior, se afirma que la vacunación utilizando virus atenuados no es del todo eficiente, pues la respuesta celular medida por células productoras de INF- γ tiene una evolución a partir del día 28 hasta el 42, en una proporción moderada pero significativa.⁷⁴ En lo que respecta a la respuesta humoral que induce la vacuna de virus atenuado, los anticuerpos no neutralizantes aparecen en etapas tempranas de la infección y permanecen hasta por 96 semanas PI.⁷⁵ Los AN sólo aparecen en algunos animales vacunados;⁶⁵ sin embargo, algunos autores detectaron AN después de desafiar a cerdos vacunados.⁷⁶

A pesar de lo anterior, varios experimentos han demostrado que el uso de la vacuna MLV reduce significativamente las lesiones y signos clínicos frente al desafío con cepas homólogas de PRRSV. Además, muestra una reducción en la proporción de cerdos infectados en forma persistente y en el tiempo de excreción viral utilizando cepas homólogas del virus vacunal.^{72,77} Sin embargo, es claro que la vacuna no previene la reinfección con cepas homólogas, sólo disminuye los signos de la enfermedad. Frente a cepas heterólogas, se presenta el mismo escenario pero la protección es menor. Un problema importante relacionado con la seguridad de esta vacuna es el hecho de que en algunos casos, los virus atenuados pueden revertirse a virulencia y ocasionar la propagación del virus en la población porcina.³⁷

Vacunas inactivadas

La principal ventaja de las vacunas inactivadas es la debilidad de la mayoría de vacunas atenuadas, una de ellas es que no pueden revertir a la virulencia, pues utilizan virus muerto. Después de la vacunación no es posible, en ningún momento, detectar ARN viral en

therefore, the place where the acclimatization is taking place should be far enough to prevent reinfection in the farm or introduction of new strains.⁸⁶

Conventional vaccine improvements

In the majority of cases the conferred protection by conventional vaccines is not effective in the prevention of the infection. For this reason, new alternatives have been developed to improve induced response by vaccines. Basically, the objective has been to increase cellular response, AN production and, besides, boost the response among heterologous strains. One of the strategies used to improve conventional vaccines consists of administration of recombinant cytokines as adjuvants.

Cytokines that are important for cellular response development have been used, as in the case of the interleukin-12 (IL-12) and IFN- α .⁸⁷ The IL-12 induces the differentiation of virgin T lymphocytes to Th1 lymphocytes and it has been proven that IFN- α induces an antiviral state in cells. When IL-12 is used as adjuvant there is a significant increase in IFN- γ production cells; however, the AN development is null.^{73,76} Evaluating IFN- α it was observed that its behavior was similar to IL-12, since it induces only cellular response increase; nevertheless, it was temporary.^{65,73,76} In both cases IFN- γ increase does not reflect in viremia or symptomatology decrease.

Foss *et al.*⁸⁸ tested IL-1, IL-6 and cholera toxin as adjuvant, since they are inflammatory response induction agents in pigs and important in antigen presentation; however, only the cholera toxin resulted a good adjuvant. The cholera toxin induced the specific AN production against ORF5, but it did not stimulate cellular response. Another strategy used are the oligodeoxynucleotides, these are synthetic polymers with sequences rich in nucleotides, cytokine and guanidine that are used as immunostimulants.^{89,90} This adjuvant induced AN production, as well as slight increase in IFN- γ production cells. Also, reduction in some of the disease's signs was observed, such as respiratory failure.

Several attempts have been carried out to evaluate the response between heterologous strains to decrease the effect due to the great PRRSV genetic variability. The attenuated and inactive vaccine combination has been used. Nevertheless, there were no satisfactory results since there was effector T cell decrease and humoral response suppression.⁹¹

Charerntantanakul *et al.*⁷⁶ used attenuated vaccines and evaluated the immune response to ORF5 peptides of several strains, because of the importance of GP5 in the AN induction. However, this addition did not induce clinical improvement, cellular response slightly

muestras de sangre o tejidos.⁷⁸ Algunos autores han logrado cierto grado de protección en campo.^{79,80} Sin embargo, estudios más recientes que utilizan técnicas más precisas han obtenido respuesta nula frente al PRRSV. Nilubol *et al.*⁷⁸ y Zuckermann *et al.*,⁷⁴ en cepas americanas y europeas, respectivamente, no encontraron incremento significativo en células productoras de IFN- γ contra PRRSV, incluso después de desafiar a cerdos vacunados.

Las vacunas inactivadas de cepas americanas no son capaces de inducir una respuesta humoral; es decir, no son capaces de estimular la producción de AN.⁶⁵ Aun cuando se observa un aumento de anticuerpos después del desafío, éstos no neutralizan.⁷⁸ Sin embargo, las vacunas inactivadas de cepas europeas inducen una ligera producción de AN, aunque esto último no se refleja ni en la disminución de la viremia ni en la carga viral en tejidos.⁷⁴

Alternativas de vacunas en campo

Las vacunas comerciales se han utilizado en gran número de granjas con resultados controversiales, lo cual puede deberse a la poca homología entre cepas (vacunal y de la granja), pues la protección cruzada es limitada.⁸¹ Ante este escenario se han instrumentado estrategias de control en las granjas, que se basan en el uso de sueros virémicos durante la aclimatación de las cerdas, en el pie de cría o en el simple contacto de animales enfermos con los animales que se pretende inmunizar.⁸²⁻⁸⁴ Shibata *et al.*⁸⁵ mostraron que la exposición al virus de campo que circulaba en la granja, prevenía los signos clínicos de la enfermedad y observó disminución en los títulos de infección, así como su duración al integrar estos animales inmunizados con el resto.^{84,86} Esta estrategia se sigue utilizando y ayuda a controlar la diseminación de reinfección en la granja. Sin embargo, este método de exposición conlleva algunos riesgos; por ejemplo, el suero utilizado para la aclimatación puede contener algún otro patógeno, por lo que el lugar donde se lleva a cabo la aclimatación debe estar lo suficientemente lejos para prevenir reinfecciones en la granja o la introducción de nuevas cepas.⁸⁶

Mejoras a las vacunas convencionales

En la mayoría de los casos la protección conferida por las vacunas convencionales no es eficaz en la prevención de la infección. Por esta razón se han desarrollado nuevas alternativas para mejorar la respuesta inducida por las vacunas. Básicamente se ha buscado aumentar la respuesta celular, la producción de AN y, además, fomentar la respuesta entre las cepas heterólogas. Una de las estrategias utilizadas para mejorar las vacunas

increased without increasing antibody production. In spite of all implementations of attenuated or dead vaccines there has been no adequate adjuvant or strategy to promote PRRSV infection prevention; therefore, a new vaccine generation with greater efficacy and safeness to control PRRS is necessary.

New generation vaccines: an alternative for PRRSV

Several expression systems of PRRSV antigens including bacteria,^{62,92,93} baculovirus,⁹⁴ DNA vaccines,^{95,96} adenovirus^{97,98} and the recombinant modified vaccinia virus Ankara (rMVA)⁹⁹ have been assessed, in search of an alternative to improve the immune response against PRRSV or to be used as vaccines. Bacteria such as *Salmonella typhimurium* and the Calmette-Guerin bacillus (CGB) of *Mycobacterium bovis* have been used as vectors in the GP5 and M protein expression of PRRSV, using mice as a study model.^{93,100} In the case where CGB, only the GP5 expression was achieved after removing the first 30 glycoprotein hydrophobic residues. The GP5 and the M protein were expressed in the *Mycobacterium* membrane and anti-GP5 and M protein antibodies were detected. PRRSV specific IFN- γ production cells in splenocytes were also detected. However, the response in pigs could vary.¹⁰¹ When a *S. typhimurium* attenuated strain was used to evaluate the response of PRRSV to GP5, a plasmid which encoded GP5, contained in *S. typhimurium* strains, was used. Nevertheless, in this case, the use of *S. typhimurium* as expression vector did not mark any difference in regard to the use of nude DNA (plasmid which contains the region that encodes GP5), resulting an almost null humoral and cellular immune response in both cases.¹⁰⁰

The use of viruses as expression vectors for GP5 and M protein of PRRSV in pigs has also been evaluated. The sequence of GP5 in PRV (pseudorabies virus, cause of Aujeszky's disease), as expression vector, was inserted and a double vaccine against Aujeszky virus and GP5-PRRSV. This vaccine decreased lesions in lung caused by the virus in infected pigs; nevertheless, there were no AN levels.^{102,103} In contrast to these results, when the baculovirus (expressing the GP5-M heterodimer) was used in a murine model, a high titer of AN anti-GP5 and IFN- γ production cells were detected. However, the production of IFN- γ was not specific of PRRSV since the baculovirus that did not contain the GP5-M heterodimer used as control, it induced a similar level of IFN- γ production cells.¹⁰⁴ The avian poxvirus has also been utilized as expression vector for PRRSV directed to the GP3/GP5 heterodimer and including as adjuvant the porcine IL-18 in the plasmid.¹⁰⁵ The avian poxvirus potential as vaccine against PRRSV offers encouraging

convencionales consiste en la administración de citocinas recombinantes como adyuvantes.

Se han utilizado citocinas que son importantes en el desarrollo de la respuesta celular, es el caso de la interleucina-12 (IL-12) y el IFN- α .⁸⁷ La IL-12 induce la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos Th1 y se ha comprobado que el IFN- α induce un estado antiviral en las células. Cuando se utiliza la IL-12 como adyuvante existe un aumento significativo en las células productoras de IFN- γ ; sin embargo, el desarrollo de AN es nulo.^{73,76} Al evaluar el IFN- α , se observó que su comportamiento fue similar al de IL-12, ya que induce sólo aumento de la respuesta celular; sin embargo, éste fue temporal.^{65,73,76} En ambos casos el aumento de IFN- γ no se refleja en disminución de la viremia o en la sintomatología.

Foss *et al.*⁸⁸ probaron la IL-1, IL-6 y la toxina del cólera como adyuvantes, debido a que son agentes de inducción de la respuesta inflamatoria en cerdos e importantes en la presentación de antígenos; sin embargo, sólo la toxina del cólera resultó buen adyuvante. La toxina del cólera indujo la producción de AN específicos contra ORF5, pero no estimuló la respuesta celular. Otra estrategia utilizada son los oligodeoxinucleótidos, éstos son polímeros sintéticos con secuencias ricas en los nucleótidos citocina y guanidina, que se utilizan como inmunoestimuladores.^{89,90} Este adyuvante indujo la producción de AN, así como ligero aumento en las células producto de IFN- γ . Incluso, se observó reducción en algunos de los signos de la enfermedad, como insuficiencia respiratoria.

Se han llevado a cabo varios intentos para evaluar la respuesta entre cepas heterólogas para disminuir el efecto debido a la gran variabilidad genética del PRRSV. Se han utilizado la combinación de vacunas atenuadas e inactivadas. Sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios pues hubo disminución de las células T efectoras y supresión de la respuesta humoral.⁹¹

Charerntantanakul *et al.*⁷⁶ utilizaron vacunas atenuadas y evaluaron la respuesta inmune a péptidos de ORF5 de varias cepas, por la importancia de la GP5 en la inducción de AN. Sin embargo, esta adición no indujo mejoría clínica, aumentó ligeramente la respuesta celular sin incrementar la producción de anticuerpos. A pesar de todas las instrumentaciones de vacunas atenuadas o muertas, no se ha encontrado un adyuvante o estrategia adecuada para promover la prevención de la infección por el PRRSV; por tanto, es necesaria una nueva generación de vacunas con mayor seguridad y eficacia protectora para controlar el PRRS.

results.¹⁰⁶ Using this model in pigs, a decrease of the viral charge in lungs and some ganglia was observed, low AN titers were detected during the first PI weeks that significantly increased at 56 days PI. Increase of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes was also observed and in spite of finding a great number of IFN- γ production cells, an increase of IFN- γ was quantified by ELISA in serum.¹⁰⁵ Besides using avian poxvirus, a recombinant modified poxvirus was used, known as Ankara virus, which is an excellent expression system as vaccine.⁹⁹ In this case, the GP5/M protein heterodimer expressed in the murine model. AN were obtained in the third week PI, but with a very low titer; in the seventh week PI, AN titer increased. This system induced slight and late IFN- γ production in mice, which was detected from day 30 PI and kept up until day 90.⁹⁹

Adenoviruses (Ad5) are excellent systems for the expression of interest genes in the development of vaccines.¹⁰⁷ Therefore, they have also been used in the design of vaccines against PRRSV. Some of the structures that have been evaluated include: Ad5 expressing GP5, M protein and its combination (GP5-M). The structure that expressed the GP5-M heterodimer induced a greater AN titer and greater anti-PRRSV-specific lymphocyte proliferation.⁹⁸ Later, other structures were tested evaluating the GP combinations that induce the production of AN, GP3-GP5, GP4-GP5 and GP3-GP4-GP5.¹⁰⁸ In the development of AN, GP5 was a common denominator as well as in the majority of the structures that are not Ad5, due to its immunogenic importance. AN against all structures were observed; nevertheless, it was not possible to determine to which GP they were directed, due to the lack of recombinant proteins of its specificity (GP3, GP4 and GP5). These antibodies were detected at day 14 PI, as well as the PRRSV-specific lymphocyte proliferation for all structures.¹⁰⁸ One of the advantages of the Ad5 system over the other utilized systems consists of the expression carried out in eucaryotic cells, which makes that the protein conformation be similar to that of the virus, facilitating the exposition of the neutralizing epitopes. However, for the case of GP5 the "natural" epitope may not be exposed, because the virion forms a heterodimer with the M protein. This response is observed if Ad5 that express GP3 and Gp4 are compared, when the structure is co-administered with GP5 and there is no increase in this response.¹⁰⁸

Besides the vectors used for the PRRSV protein expression, DNA vaccines have been recently used. What distinguishes these vaccines from others is the expression of their physical nature. DNA vaccines are constituted of a DNA plasmid that encodes for some protein or interest fraction and are not infectious.¹⁰⁹ DNA vaccines have some characteristics that give them certain advantages over the conventional ones, among

Vacunas de nueva generación: una alternativa para PRRSV

Se han evaluado varios sistemas de expresión de antígenos de PRRSV incluyendo bacterias,^{62,92,93} baculovirus,⁹⁴ vacunas de ADN,^{95,96} adenovirus^{97,98} y el sistema del virus de Ankara (MVA, por sus siglas en inglés)⁹⁹ en busca de una alternativa para mejorar la respuesta inmune contra el PRRSV o para utilizarse como vacunas. Se han utilizado bacterias como *Salmonella typhimurium* y el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) de *Mycobacterium bovis* como vectores en la expresión de la GP5 y la proteína M del PRRSV, utilizando ratones como modelo de estudio.^{93,100} En el caso donde se utiliza el BCG, sólo se logró la expresión de GP5 después de remover los primeros 30 residuos hidrofóbicos de la glicoproteína. La GP5 y la proteína M se expresaron en la membrana de *Mycobacterium* y se detectaron anticuerpos anti-GP5 y proteína M, también se detectaron células productoras de IFN- γ específicas del PRRSV en esplenocitos. Sin embargo, la respuesta en cerdos podría variar.¹⁰¹ Cuando se utilizó una cepa atenuada de *S. typhimurium* para evaluar la respuesta a la GP5 del PRRSV, se utilizó un plásmido que codificaba a la GP5, contenido en cepas de *S. typhimurium*. Sin embargo, en este caso la utilización de *S. typhimurium* como vector de expresión no marcó ninguna diferencia respecto a la utilización de ADN desnudo (plásmido que contiene la región que codifica a la GP5), resultando en ambos casos en una respuesta humoral y celular prácticamente nulas.¹⁰⁰

También se ha evaluado el uso de virus como vectores de expresión para las proteínas GP5 y M del PRRSV en cerdos. Al virus de la seudorrabia (PRV, por sus siglas en inglés, causante de la enfermedad de Aujeszky) como vector de expresión, se le insertó la secuencia de la GP5 en el PRV y se obtuvo una vacuna doble dirigida al virus de Aujeszky y GP5-PRRSV. Esta vacuna redujo los daños causados por el virus en pulmón en cerdos infectados; sin embargo, no se detectaron niveles de AN.^{102,103} En contraste con estos resultados, cuando se utilizó el baculovirus (expresando el heterodímero GP5-M) en un modelo murino, se detectó un título alto de AN anti-GP5 y células productoras de IFN- γ . Sin embargo, la producción de IFN- γ no fue específica del PRRSV pues el baculovirus que no contenía el heterodímero GP5-M usado como testigo, indujo un nivel de células productoras de IFN- γ similar.¹⁰⁴ El virus de la viruela aviar también se ha utilizado como vector de expresión para PRRSV dirigido al heterodímero GP3/GP5 e incluyendo como adyuvante la IL-18 porcina en el plásmido.¹⁰⁵ El potencial del virus de la viruela aviar como vacuna para PRRSV ofrece resultados alentadores.¹⁰⁶ Utilizando este modelo en cerdos se observó una reducción de la carga viral en

them: production facility, low cost, heat stable, etc.¹¹⁰ DNA vaccines have demonstrated to induce serum antibodies and a strong response of cooperator and cytotoxic T cells against several antigens: viruses, bacteria, parasites and some tumors.

In DNA vaccines against PRRSV, all of the PRRSV ORF in different plasmids have been evaluated.^{95,96,111,112} Barfoed *et al.*¹¹² characterized the contribution of each viral protein in the development of a protective response. Only one antibody response was found in pigs vaccinated with the plasmid that contained ORF7 after the challenge with a PRRSV homologous strain; however, this is the most immunogenic protein of the virus and to which antibodies are created in the initial stage of the infection.⁵³ Also, antibodies directed to Nsp2 and GP4 post-inoculation were observed; nevertheless, after challenging the pigs with a PRRSV strain non specific response was observed.¹¹² One of a probable reasons for the lack of response to GP2, GP3, GP5 and GP6 vaccination, could have been due to the inoculation strategy (gene gun bombardment and the plasmid covered by gold particles), besides, at no moment, the viral protein expression in the pig was evaluated.¹¹² These results coincide with the ones of other authors for the case of N protein (plasmid with ORF7); however, they did find seroneutralization response to GP5 and GP6.⁹⁵

Since the majority of the AN are directed to GP5, DNA vaccines against the GP5 of the virus have been tested; but these do not produce AN, which confirms the importance of the protein conformation.¹¹¹ The aforementioned has been proven while developing new vaccines by the use of vectors, such as the adenovirus that express the GP5 and develop AN, although its development is weak and slow.^{97,113} Besides these results, it was demonstrated that GP5 formed dimers with M protein in the viral particles;³² therefore, some research has been directed to the development of DNA vaccines that express this heterodimer (GP5-M protein).^{96,99,114,115} The results obtained with these vaccines show that there is greater AN production than by individually using GP5 or M protein. The use of this heterodimer develops a similar response to the one described before with the use of baculovirus, pseudorabies, adenovirus, etc., which consists of AN production that slowly and weakly develops at the sixth week.^{95,97,101,116} On the other hand, the response of specific T cells is high, but develops between the sixth and eighth weeks PI.¹¹⁴

The GP5 of the American strain contains two epitopes in the N terminal extreme that produce antibodies; nevertheless, only one of them is neutralizing, while the other one functions as decoy that causes a decrease, which is observed in the response to the infection by native PRRSV and vaccines.

pulmones y algunos ganglios, se detectaron títulos bajos de AN durante las primeras semanas PI, que aumentaron de manera significativa a los 56 días PI. También se observó aumento de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, y a pesar de encontrarse un gran número de células productoras de IFN- γ se cuantificó un aumento de IFN- γ por ELISA en suero.¹⁰⁵ Además del virus de la viruela aviar se utilizó un virus recombinante de viruela modificado, conocido como virus de Ankara, el cual es un excelente sistema de expresión como vacuna.⁹⁹ En este caso se expresó el heterodímero GP5/proteína M en modelo murino. Se obtuvieron AN a partir de la tercera semana posinoculación, pero con un título muy bajo, en la séptima semana posinoculación aumentó el título de AN. Este sistema indujo en los ratones ligera y tardía producción de IFN- γ , que se detectó a partir del día 30 posinoculación y se mantuvo hasta el día 90.⁹⁹

Los adenovirus (Ad5) son excelentes sistemas para la expresión de genes de interés en el desarrollo de vacunas.¹⁰⁷ Por ello también se han utilizado en el diseño de vacunas contra el PRRSV. Algunas de las construcciones que se han evaluado incluyen el Ad5 expresando GP5, la proteína M y su combinación (GP5-M). El constructo que expresaba el heterodímero GP5-M indujo un título mayor de AN y mayor proliferación de linfocitos específicos anti-PRRSV.⁹⁸ Posteriormente se probaron otros constructos evaluando las combinaciones de las GP que inducen la producción de AN, GP3-GP5, GP4-GP5 y GP3-GP4-GP5.¹⁰⁸ En el desarrollo de AN, la GP5 fue un común denominador al igual que en la mayoría de las construcciones que no son de Ad5, debido a su importancia inmunogénica. Se observaron AN contra todos los constructos; sin embargo, no fue posible determinar hacia qué GP eran dirigidos, debido a la falta de proteínas recombinantes de su especificidad (GP3, GP4 y GP5). Estos anticuerpos fueron detectados a partir de los 14 días PI, al igual que la proliferación de linfocitos PRRSV específicos para todos los constructos.¹⁰⁸ Una de las ventajas del sistema de Ad5 sobre los otros sistemas utilizados consiste en que la expresión se lleva a cabo en células eucarióticas, lo cual hace que la conformación de la proteína sea similar a la del virus, facilitando la exposición de los epítopes neutralizantes. Sin embargo, para el caso de la GP5 el epítipo "natural" pudiera no estar expuesto, debido a que el virión forma un heterodímero con la proteína M. Esta respuesta se observa si se compara la de los Ad5 que expresan GP3 y GP4, cuando se coadministra el constructo con la GP5 y no hay ningún aumento en esta respuesta.¹⁰⁸

Además de los vectores usados para la expresión de las proteínas del PRRSV, recientemente se han utilizado las vacunas de ADN. Lo que distingue a estas vacunas de otras es la expresión de su naturaleza física.

Fang *et al.*¹¹⁷ determined if the decoy epitope effect can be decreased or eliminated, with this purpose an amino acid sequence known as PADRE (Pan DR helper T cell epitope) was inserted between the neutralizing epitope and the decoy. This consists of the amino acids: AKFVAAWTLKAA,¹¹⁸ and favors AN response and IFN- γ production.^{119,121} The results of Fang *et al.*¹¹⁷ show that in mice, AN production is greater and faster with the DNA vaccine, where the GP5 sequence contains the PADRE sequence, compared to the one GP5 has without modifications. Nevertheless, these results can be due to the function of the PADRE sequence as adjuvant and not for the interruption of the decoy epitope in the GP5 sequence.¹¹⁷

In order to improve the response of DNA vaccines, the administration of cytokines has also been studied. IL-2 and IFN- γ have been used for their importance in cellular proliferation and lymphocyte activity. Xue *et al.*¹²² found that the administration of these cytokines as adjuvants in DNA vaccines that encode for ORF5 and ORF7, protect the pig from PRRSV characteristic lung lesions. Decrease in certain degree of virus replication was also observed. However, these results are partial since the protector effect was only in 33% of the animals when IL-2 was used and in 66% of the animals with IFN- γ . Rompato *et al.*¹²³ studied the effect of IL-2 and IL-4 on the development of the induced immune response by a DNA vaccine that encodes ORF7, using the pHCMV expression vector. The results show that IL-2 induces a specific cellular response, while IL-4 seems to have a suppressive effect in this type of responses. These data also suggest that ORF7 can participate in the decrease of viral charge of the infected animals with PRRSV; this last coincides with other authors.¹²²

An alternative to improve DNA vaccines against PRRSV is the procedure and presentation of the antigen through the ubiquitin conjugation with GP5 in a plasmid. In this case, the expressed protein joined with ubiquitin was directed to the proteasome to be degraded, thus, procedure and presentation are favored, since the degraded antigens by this route facilitate its presentation via MHC I, and allow cellular response. Hou *et al.*¹²⁴ determined the immune response of vaccinated pigs with a plasmid that expressed the conjugated GP5 to the swine ubiquitin. IFN- γ expression increase, viral charge decrease in blood after pigs' challenge and decrease in the number and severity of lung lesions of the challenged pigs was observed, in regard to the controls (vaccine without the conjugation to ubiquitin and the GP5 free plasmid and ubiquitin). Nevertheless, the antibody response was null, probably because of the rapid intracellular degradation of the ubiquitin-GP5 protein, without leaving enough protein level for the interaction with B lymphocytes.

Recently, a new strategy in the development

Las vacunas de ADN están compuestas de un plásmido de ADN que codifica para alguna proteína o fracción de interés y no son infecciosas.¹⁰⁹ Las vacunas de ADN tienen algunas características que les confieren ciertas ventajas frente a las convencionales, entre ellas la facilidad de producción, bajo costo, estables al calor, etc.¹¹⁰ Las vacunas de ADN han demostrado inducir anticuerpos séricos y una fuerte respuesta de células T cooperadoras y citotóxicas contra varios antígenos: virus, bacterias, parásitos y algunos tumores.

En vacunas de ADN contra el PRRSV se han evaluado todos los ORF del PRRSV en distintos plásmidos.^{95,96,111,112} Barfoed *et al.*¹¹² caracterizaron la contribución de cada proteína viral en el desarrollo de una respuesta protectora. Sólo se encontró una respuesta de anticuerpos en los cerdos vacunados con el plásmido que contenía el ORF7 después del desafío con una cepa homóloga del PRRSV; sin embargo, esta es la proteína más inmunogénica del virus y contra la cual se crean anticuerpos en la etapa inicial de la infección.⁵³ También se observaron anticuerpos dirigidos a Nsp2 y GP4 tras la inoculación; sin embargo, después de retar a los cerdos con una cepa del PRRSV no se observó ninguna respuesta específica.¹¹² Una de las razones probables para la falta de respuesta ante la vacunación con GP2, GP3, GP5 y GP6, pudo ser la estrategia de inoculación (pistola de genes y el plásmido cubierto de partículas de oro), además en ningún momento se evaluó la expresión de las proteínas virales en el cerdo.¹¹² Estos resultados coinciden con los de otros autores para el caso de la proteína N (plásmido con ORF7); sin embargo, ellos sí encontraron respuesta en la sueroneutralización para la GP5 y GP6.⁹⁵

Debido a que los AN van dirigidos en su mayoría a la GP5, se han probado vacunas de ADN contra la GP5 del virus; pero éstas no producen AN, lo que confirma la importancia de la conformación de esta proteína.¹¹¹ Lo anterior se ha comprobado al desarrollar nuevas vacunas mediante el uso de vectores, como el adenovirus, que expresan la GP5 y desarrollan AN, aunque su desarrollo es débil y lento.^{97,113} Además de estos resultados, se demostró que la GP5 formaba dímeros con la proteína M en las partículas virales,³² por lo que se han dirigido algunas investigaciones al desarrollo de vacunas de ADN que expresan este heterodímero (GP5-proteína M).^{96,99,114,115} Los resultados obtenidos con estas vacunas muestran que existe mayor producción de AN que cuando se utiliza la GP5 o la proteína M individualmente. El uso de este heterodímero desarrolla una respuesta similar a la descrita antes con el uso del baculovirus, seudorrabia, adenovirus, etc., que consiste en la producción de AN, la cual se desarrolla de manera lenta y débil a partir de la sexta semana.^{95,97,101,116} Por otra parte, la respuesta de

of vaccines surged, based on the viral genome manipulation to introduce specific modifications to create genetically modified mutant viruses: infectious clones. The development of these is described as the complementary DNA formation from the virus, under a promoter control.¹²⁵ The importance of the infectious clones in the development of a vaccine against PRRSV lies on the fact of directing specific changes in PRRSV and determining the participation of a specific protein or an amino acid in the infection, receptor union, etc. Up to date, American and European prototype infectious clones are on hand. Punctual modifications in the necessary sites to form the GP5-M protein heterodimer have been evaluated. It was found that the N protein 23 cysteine is indispensable to form a homodimer, which is closely related with the PRRSV infectivity, mutations in the GP5 neutralizing epitope, producing infectious incapable strains.¹²⁵ Also, with this technology chimeric viruses have been developed, which widen the knowledge of the important factors for virulence, attenuation, pathogenicity and immunogenicity. Wang *et al.*¹²⁶ used a highly pathogenic PRRSV strain (MN184 isolate) and a vaccinal virus (from modified live virus), to develop chimeric viruses. One of these contained ORF1a and 1b from the vaccine strain and the structural proteins of the pathogen strain and vice versa. These chimeric viruses were used as vaccines and after the PRRSV challenge, lung lesions decreased, the development of AN showed a more opportunistic and slightly higher increase than the original strains.¹²⁶

Conclusion

The presence of PRRSV brought a great problem for the porcine industry, due to the great economic losses it causes. As consequence of the last, the development of vaccines and field virus control strategies have been studied. Up to date, two vaccines that include attenuated and inactive virus are commercialized. Although these vaccines have been widely used in field, the studies carried out analyzing the immune response, show that these are inefficient to prevent the infection. However, some farms have had good results in the control of the disease; nevertheless, the commercial vaccine of PRRSV modified live virus, while using it in farms, has introduced new viral strains. Such was the case in Denmark, in 1996, since the virus while being only attenuated can cause infection in pigs. The lack of PRRSV control in the majority of the infected farms has led to the development of alternative strategies for the control of the disease. However, these strategies, even when they help to control the disease, do not resolve the entire problem. Therefore, new vaccine prototypes were created that include: DNA vaccines, different systems of PRRSV antigen expression, development

células T específicas es alta, pero se desarrolla entre la sexta y octava semanas PI.¹¹⁴

La GP5 de la cepa americana contiene dos epítopes en el extremo N terminal que producen anticuerpos; sin embargo, sólo uno de ellos es neutralizante, mientras que el otro funciona como señuelo que provoca la reducción de AN, lo cual se observa en la respuesta a la infección por PRRSV nativa y en vacunas. Fang *et al.*¹¹⁷ determinaron si el efecto del epítipo señuelo puede ser reducido o eliminado, con este propósito se insertó, entre el epítipo neutralizante y el señuelo, una secuencia de aminoácidos conocida como PADRE (*Pan DR helper T cell epitope*). Ésta consta de los aminoácidos: AKFVAAWTLKAA,¹¹⁸ y favorece la respuesta de AN y producción de IFN- γ .¹¹⁹⁻¹²¹ Los resultados de Fang *et al.*¹¹⁷ muestran que en ratones, la producción de AN es mayor y más rápida con la vacuna de ADN, en donde la secuencia de la GP5 contiene la secuencia PADRE, comparada con la que tiene la GP5 sin modificaciones. Sin embargo, estos resultados pueden deberse a la función de la secuencia PADRE como adyuvante y no por la interrupción del epítipo señuelo en la secuencia de la GP5.¹¹⁷

Para mejorar la respuesta de las vacunas de ADN también se ha estudiado la administración de citocinas. Se ha utilizado IL-2 e IFN- γ por su importancia en la proliferación celular y la actividad de los linfocitos. Xue *et al.*¹²² encontraron que la administración de estas citocinas como adyuvantes en vacunas de ADN que codifican para ORF5 y ORF7, protegen al cerdo de las lesiones pulmonares características de PRRSV. También se observó reducción en cierto grado de la replicación del virus. Sin embargo, estos resultados son parciales debido a que el efecto protector fue sólo en 33% de los animales cuando se utilizó la IL-2 y en 66% de los animales con el IFN- γ . Rompató *et al.*¹²³ estudiaron el efecto de la IL-2 e IL-4 en el desarrollo de la respuesta inmune inducida por una vacuna de ADN que codifica ORF7, utilizando el vector de expresión pCMV. Los resultados demuestran que la IL-2 induce una respuesta celular específica, mientras que IL-4 parece tener un efecto supresor en este tipo de respuestas. Estos datos también sugieren que ORF7 puede participar en la reducción de la carga viral de los animales infectados con PRRSV, esto último coincide con otros autores.¹²²

Una alternativa para mejorar las vacunas de ADN contra PRRSV es el procesamiento y presentación de antígenos a través de la conjugación de la ubiquitina con la GP5 en un plásmido. En este caso la proteína expresada junto a la ubiquitina se dirigió al proteosoma para ser degradada, con lo que se favorece el procesamiento y la presentación, pues los antígenos degradados por esta vía facilitan su presentación vía MHC I, y permiten la repuesta

of infectious clones, etc. All these strategies have contributed to the knowledge of different antigens that induce a high AN titer, as well as a significant number of IFN- γ production cells; also, the epitopes that favor these responses have also been located. Nevertheless, in spite of the obtained improvements there is still no new vaccine against PRRSV that allows an optimal response against the virus. For this reason, new strategies must be explored, either in the use of new vectors as in the viral strains, the proteins or peptides involved, as response, with the objective to develop a more efficacious and safe vaccine.

Acknowledgements

This work was supported by the Fondos Sectoriales SEP-Conacyt, project number 82850.

Referencias

1. NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. Prevalence of PRRS virus on the united state. Centers of Epidemiology and Animal Health. United States Department of agriculture: Animal health inspection service. Fort Collins, Colorado, United States of America: Center for Epidemiology and Animal health, [serial online] 1995 [cited:2004 June 10] Available from: <http://aphisweb.aphis.usda.gov/ceah/cahm/swine/sw95pr2.htm>.
2. HURNIK D. The prevalence of transmissible gastroenteritis virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies on Prince Edward Island. The 16th Veterinary Society Congress;2000 september 17-20; Melbourne Australia. Melbourne (Australia): International Pig Veterinary Society 2000:71.
3. YAHARA Y, YAMAGUCHI T, WENSON M. Porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan a field force survey in 45 farms. The 16th Veterinary Society Congress;2000 September 17-20; Melbourne Australia. Melbourne (Australia): International Pig Veterinary Society, 2000:74.
4. ZIMMERMAN J, STEVENSON G, DEE S.A. The 1998 PRRS compendium. 1998:1-128.
5. CARREÓN NR, RAMIREZ MH, MERCADO GC, SOTO M. Detección de anticuerpos contra el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio de Cerdos en diferentes estados de la República Mexicana. Memorias XXXIV Congreso Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; 1999 Julio 28-31; Mérida (Yucatán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Veterinarios especialista en Cerdos, 1999:168-169.
6. TIAN K, YU X, ZHAO T, FENG Y, CAO Z, WANG C *et al*. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. PLoS ONE 2007;2:e526.
7. CHO JG, DEE SA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Theriogenology 2006;66:655-662.

celular. Hou *et al.*¹²⁴ determinaron la respuesta inmune de cerdos vacunados con un plásmido que expresaba la GP5 conjugada a la ubiquitina porcina. Se observó aumento en la expresión IFN- γ , disminución de la carga viral en sangre después del desafío de cerdos y disminución en el número y severidad de lesiones en pulmón de los cerdos desafiados, respecto de los testigos (vacuna sin la conjugación a ubiquitina y el del plásmido libre de GP5 y ubiquitina). Sin embargo, la respuesta de anticuerpos fue nula, probablemente debido a la rápida degradación intracelular de la proteína ubiquitina-GP5, sin dejar un nivel de proteína suficiente para la interacción con linfocitos B.

Recientemente surgió una nueva estrategia en el desarrollo de vacunas, basada en la manipulación del genoma viral para introducir modificaciones específicas para crear virus mutantes genéticamente modificados: clonas infecciosas. El desarrollo de éstas se describe como la formación de ADN complementario a partir del virus, bajo el control de un promotor.¹²⁵ La importancia de las clonas infecciosas en el desarrollo de una vacuna contra el PRRSV radica en el hecho de dirigir cambios específicos en el PRRSV y con ello determinar la participación de alguna proteína o de algún aminoácido específicos en la infección, unión a receptores, etc. Actualmente se cuenta con clonas infecciosas de prototipo americano y europeo. Se han evaluado modificaciones puntuales en los sitios necesarios para formar el heterodímero GP5-proteína M, se encontró que la cisteína 23 de la proteína N es indispensable para formar un homodímero, el cual está estrechamente ligado a la infectividad del PRRSV, mutaciones en el epítipo neutralizante de GP5, produciendo cepas sin capacidad de infección.¹²⁵ Además, con esta tecnología se han desarrollado virus quiméricos que amplían el conocimiento de los factores importantes para la virulencia, atenuación, patogenicidad e inmunogenicidad. Wang *et al.*¹²⁶ utilizaron una cepa altamente patógena del PRRSV (aislado MN184) y un virus vacunal (a base de virus vivo modificado), para desarrollar virus quiméricos. Uno de éstos contenía ORF1a y 1b de la cepa vacunal y las proteínas estructurales de la cepa patógena y viceversa. Se utilizaron estos virus quiméricos como vacunas y después del reto con PRRSV, disminuyeron las lesiones en los pulmones, el desarrollo de los AN presentó un incremento más oportuno y ligeramente mayor que en las cepas originales.¹²⁶

Conclusiones

La aparición del PRRSV trajo consigo un gran problema para la industria porcina debido a las cuantiosas pérdidas económicas que causa. Como consecuencia de lo anterior se ha trabajado en el desarrollo de

8. PRIETO C, CASTRO JM. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 2005;63:1-16.
9. 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;145:659-688.
10. DELPUTTE PL, NAUWYNCK HJ. Porcine arterivirus entry in macrophages: heparan sulfate-mediated attachment, sialoadhesin-mediated internalization, and a cell-specific factor mediating virus disassembly and genome release. *Adv Exp Med Biol* 2006;581:247-252.
11. BALASURIYA UB, MACLACHLAN NJ. The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:107-129.
12. SUAREZ P. Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet Res* 2000;31:47-55.
13. WANG X, EATON M, MAYER M, LI H, HE D, NELSON E *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol* 2007;152:289-303.
14. FLORES-MENDOZA L, SILVA-CAMPA E, RESENDIZ M, OSORIO FA, HERNANDEZ J. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:720-725.
15. MATEU E, DIAZ I. The challenge of PRRS immunology. *Vet J* 2008;177:345-351.
16. CAVANAGH D. NIDOVIRALES: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 1997;142:629-642.
17. MEULENBERG JJ, DE MEIJER EJ, MOORMANN RJ. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J Gen Virol* 1993;74:1697-1701.
18. SNIJDER EJ, MEULENBERG JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 1998;79:961-979.
19. WU WH, FANG Y, FARWELL R, STEFFEN-BIEN M, ROWLAND RR, CHRISTOPHER-HENNINGS J *et al.* A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 2001;287:183-191.
20. MEULENBERG JJ. PRRSV, the virus. *Vet Res* 2000;31:11-21.
21. ABEJI, CHE W, YOSHIZUMI M, HUANG Q, GLASSMAN M, OHTA S *et al.* Bcr in vascular smooth muscle cells involvement of Ras and Raf-1 activation by Bcr. *Ann NY Acad Sci* 2001;947:341-343.
22. WU WH, FANG Y, ROWLAND RR, LAWSON SR, CHRISTOPHER-HENNINGS J, YOON KJ *et al.* The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Res* 2005;114:177-181.
23. MEULENBERG JJ, PETERSEN-DEN BESTEN A, DE KLUYVER EP, MOORMANN RJ, SCHAAPER WM, WENSVOORT G. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 1995;206:155-163.
24. MARDASSI H, GONIN P, GAGNON CA, MASSIE B, DEA S. A subset of porcine reproductive and respiratory

vacunas y estrategias de control del virus en el campo. Actualmente se comercializan dos vacunas que involucran virus atenuado e inactivado. Aunque estas vacunas han sido ampliamente utilizadas en el campo, los estudios realizados analizando la respuesta inmune, muestran que éstas son ineficientes para prevenir la infección. Sin embargo, en algunas granjas han tenido buenos resultados en el control de la enfermedad; no obstante la vacuna comercial de virus vivo modificado PRRSV al utilizarse en granjas ha introducido nuevas cepas de virus. Tal fue el caso en Dinamarca, en 1996, pues el virus al estar sólo atenuado puede provocar infección en los cerdos. La falta de control del PRRSV en la mayoría de las granjas infectadas ha provocado que se desarrollen estrategias alternas para el control de la enfermedad. Sin embargo, estas estrategias, aun cuando ayudan en el control de la enfermedad no resuelven el problema de raíz. Por ello se crearon nuevos prototipos de vacunas que incluyen vacunas de ADN, diferentes sistemas de expresión de antígenos de PRRSV, desarrollo de clonas infecciosas, etc. Todas estas estrategias han contribuido al conocimiento de distintos antígenos que inducen un título alto de AN, así como un número significativo de células productoras de IFN- γ ; también se han localizado los epítopes que favorecen estas respuestas. Sin embargo, a pesar de los adelantos logrados aún no se cuenta con una nueva vacuna contra el PRRSV que logre una respuesta óptima contra el virus. Por esta razón deben explorarse nuevas estrategias, tanto en el uso de nuevos vectores como en las cepas del virus, las proteínas o péptidos involucrados, como respuesta, con la finalidad de desarrollar una vacuna más eficaz y segura.

Agradecimientos

Este trabajo recibió el apoyo de Fondos Sectoriales SEP-Conacyt, proyecto número 82850.

syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol* 1998;72:6298-6306.

25. VAN NIEUWSTADT AP, MEULENBERG JJ, VAN ESSEN-ZANBERGEN A, PETERSEN-DEN BESTEN A, BENDE RJ, MOORMANN RJ *et al.* Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J Virol* 1996;70:4767-4772.
26. GONIN P, MARDASSI H, GAGNON CA, MASSIE B, DEA S. A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 1998;143:1927-1940.
27. WEILAND E, WIECZOREK-KROHMER M, KOHL D, CONZELMANN KK, WEILAND F. Monoclonal

- antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet Microbiol* 1999;66:171-186.
28. OSTROWSKI M, GALEOTA JA, JAR AM, PLATT KB, OSORIO FA, LOPEZ OJ. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 2002;76:4241-4250.
 29. PLAGEMANN PG. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res* 2004;102:225-230.
 30. MARDASSI H, MASSIE B, DEA S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 1996;221:98-112.
 31. VANDERHEIJDEN N, DELPUTTE PL, FAVOREEL HW, VANDEKERCKHOVE J, VAN DAMME J, VAN WOENSEL PA *et al.* Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 2003;77:8207-8215.
 32. DELPUTTE PL, VANDERHEIJDEN N, NAUWYNCK HJ, PENSAERT MB. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 2002;76:4312-4320.
 33. MURTAUGH MP, ELAM MR, KAKACH LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol* 1995;140:1451-1460.
 34. WENSVOORT G, TERPSTRA C, POL JM, TER LAEK EA, BLOEMRAAD M, DE KLUYVER EP *et al.* Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 1991;13:121-130.
 35. KAPUR V, ELAM MR, PAWLOVICH TM, MURTAUGH MP. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J Gen Virol* 1996;77:1271-1276.
 36. ALLENDE R, LEWIS TL, LU Z, ROCK DL, KUTISH GF, ALI A *et al.* North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* 1999;80:307-315.
 37. BOTNER A, STRANDBYGAARD B, SORENSEN KJ, HAVE P, MADSEN KG, MADSEN ES *et al.* Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec* 1997;141:497-499.
 38. MADSEN KG, HANSEN CM, MADSEN ES, STRANDBYGAARD B, BOTNER A, SORENSEN KJ. Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds. *Arch Virol* 1998;143:1683-1700.
 39. MURTAUGH MP, XIAO Z, ZUCKERMANN F. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol* 2002;15:533-547.
 40. COSTERS S, DELPUTTE PL, NAUWYNCK HJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages contain no detectable levels of viral proteins in their plasma membrane and are protected against antibody-dependent, complement-mediated cell lysis. *J Gen Virol* 2006;87:2341-2351.
 41. VICEK J, SEN G. Interferons and other cytokines . In: FIELDS B, KNIPE D, HOWLEY P, editors. *Fields' Virology*. 3rd ed. Vol. 13. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:375-400.
 42. VAN REETH K, LABARQUE G, NAUWYNCK H, PENSAERT M. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res Vet Sci* 1999;67:47-52.
 43. ALBINA E, CARRAT C, CHARLEY B. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:485-490.
 44. LOPEZ-FUERTE L, CAMPOS E, DOMENECH N, EZQUERRA A, CASTRO JM, DOMINGUEZ J *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. *Virus Res* 2000; 69:41-46.
 45. CHOI C, CHO WS, KIM B, CHAE C. Expression of Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *J Comp Pathol* 2002;127:106-113.
 46. MILLER LC, LAEGREID WW, BONO JL, CHITKOMCKOWN CG, FOX JM. Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. *Arch Virol* 2004;149:2453-2463.
 47. LEE SM, SCHOMMER SK, KLEIBOEKER SB. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in *in vitro* interferon phenotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:217-31.
 48. SURADHAT S, THANAWONGNUWECH R, POOVORAWAN Y. Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2003;84:453-459.
 49. MCGUIRK P, MCCANN C, MILLS KH. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 2002;195:221-231.
 50. JOO HS, PARK BK, DEE SA, PIJOAN C. Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome syndrome virus. *Vet Microbiol* 1997;55:303-307.
 51. LOEMBA HD, MOUNIR S, MARDASSI H, ARCHAMBAULT D, DEA S. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 1996;141:751-761.
 52. YOON KJ, ZIMMERMAN JJ, SWENSON SL, MCGINLEY MJ, EERNISSE KA, BREVIK A *et al.* Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:305-312.

53. NELSON EA, CHRISTOPHER-HENNINGS J, BENFIELD DA. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest* 1994;6:410-15.
54. ALBINA E, PIRIOU L, HUTET E, CARIOLET R, L'HOSPITALIER R. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol* 1998;61:49-66.
55. DE LIMA M. Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 2006;353:410-421.
56. JOHNSON W, ROOF M, VAUGHN E, CHRISTOPHER-HENNINGS J, JOHNSON CR, MURTAUGH MP. Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:233-247.
57. JOHNSON CR, YU W, MURTAUGH MP. Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J General Virol* 2007;88:1184-1195.
58. OLEKSIEWICZ MB, BOTNER A, TOFT P, NORMANN P, STORGAARD T. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J Virol* 2001;75:3277-3290.
59. CANCEL-TIRADO SM, EVANS RB, YOON KJ. Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:249-262.
60. VEZINA SA, LOEMBA H, FOURNIER M, DEA S, ARCHAMBAULT D. Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 1996;60:94-99.
61. OSORIO FA, GALEOTA JA, NELSON E, BRODERSEN B, DOSTER A, WILLS R *et al.* Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology* 2002;302:9-20.
62. BAUTISTA EM, MOLITOR TW. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol* 1997;10:83-94.
63. XIAO Z, BATISTA L, DEE S, HALBUR P, MURTAUGH MP. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol* 2004;78:5923-5933.
64. LOPEZ FUERTES L, DOMENECH N, ALVAREZ B, EZQUERRA A, DOMINGUEZ J, CASTRO JM *et al.* Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res* 1999;64:33-42.
65. 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.
66. ROWLAND RR, ROBINSON B, STEFANICK J, KIM TS, GUANGHUA L, LAWSON SR *et al.* Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interferon-gamma and recovery of virus replication with 2-aminopurine. *Arch Virol* 2001;146:539-555.
67. MEIER W, WHEELER J, HUSMANN RJ. Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus. *Vet Res* 2000;31:41.
68. RONALD D, WESLEY KML, MARCUS E, KEHRLI JR. Infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus stimulates an early gamma interferon responses in the serum of pigs. *J Canadian Vet Res* 2006;70:176-182.
69. LÓPEZ M, PARDO R., VEGA M. Vacunas de nueva generación. *Genoma Esp, Salud Hum* 2004;7:12-15.
70. ROGAN D, BABIUK LA. Novel vaccines from biotechnology. *Rev Sci Tech* 2005;24:159-174.
71. ZHENG CF, BROWNLIE R, HUANG DY, BABIUK LA, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURKS. Intercellular trafficking of the major tegument protein VP22 of bovine herpesvirus-1 and its application to improve a DNA vaccine. *Arch Virol* 2006;151:985-993.
72. CANO JP, DEE SA, MURTAUGH MP, TRINCADO CA, PIJOAN CB. Effect of vaccination with a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am J Vet Res* 2007;68:565-571.
73. ROYAEE AR, HUSMANN RJ, DAWSON HD, CALZADANOVA G, SCHNITZLEIN WM, ZUCKERMANN FA *et al.* Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:199-216.
74. ZUCKERMANN FA, GARCIA EA, LUQUE ID, CHRISTOPHER-HENNINGS J, DOSTER A, BRITO M *et al.* Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol* 2007;123:69-85.
75. YOON KJ, WU LL, ZIMMERMAN JJ, HILL HT, PLATT KB. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol* 1996;9:51-63.
76. CHARERNTANTANAKUL W, PLATT R, JOHNSON W, ROOF M, VAUGHN E, ROTH JA. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;109:99-115.
77. NODELIJK G, DE JONG MC, VAN LEENGOED LA, WENSVOORT G, POL JM, STEVERINK PJ *et al.* A quantitative assessment of the effectiveness of PRRSV vaccination in pigs under experimental conditions. *Vaccine* 2001;19:3636-3644.
78. NILUBOLD, PLATT KB, HALBUR PG, TORREMORELL M, HARRIS DL. The effect of a killed porcine

- reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol* 2004;102:11-18.
79. CHRISTOPHER-HENNINGS J, NELSON EA, HINES RJ, NELSON JK, SWENSON SL, ZIMMERMAN JJ *et al.* Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:456-464.
 80. PLANA-DURAN J, BASTONS M, URNIZA A, VAYREDA M, VILA X, MANE H. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1997;55:361-370.
 81. MENG XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 2000;74:309-329.
 82. DEE SA, JOO HS, POLSON DD, PARK BK, PIJOAN C, MOLITOR TW *et al.* Evaluation of the effects of nursery depopulation on the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the productivity of 34 farms. *Vet Rec* 1997;140:247-248.
 83. DEE SA, JOO H. Strategies to control PRRS: a summary of field and research experiences. *Vet Microbiol* 1997;55:347-353.
 84. FANO E, OLEA L, PIJOAN C. Eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by serum inoculation of naive gilts. *Can J Vet Res* 2005;69:71-74.
 85. SHIBATA I, MORI M, YAZAWA S. Experimental reinfection with homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus in SPF pigs. *J Vet Med Sci* 2000;62:105-108.
 86. BATISTAL, PIJOAN C, TORREMOREL M. Experimental injection of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) during acclimatation. *Swine Health Prod* 2002;10:147-150.
 87. ORANGE JS, BIRON CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol* 1996;156:1138-1142.
 88. FOSS DL, ZILLIOX MJ, MEIER W, ZUCKERMANN F, MURTAUGH MP. Adjuvant danger signals increase the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol* 2002;15:557-566.
 89. LINGHUA Z, XINGSHAN T, YONG G, FENGZHEN Z. Effects of CpG ODN on CD4+ and CD8+ T subpopulations in the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine. *Vaccine* 2006;24:1874-1879.
 90. ZHANG YJ, STEIN DA, FAN SM, WANG KY, KROEKER AD, MENG XJ *et al.* Suppression of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by morpholino antisense oligomers. *Vet Microbiol* 2006;117:117-129.
 91. MENGELING WL, VORWALD AC, LAGER KM, BROCKMEIER SL. Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am J Vet Res* 1996;57:834-839.
 92. JIANG Y, FANG L, XIAO S, ZHANG H, PAN Y, LUO R *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of recombinant pseudorabies virus expressing the two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2007;25:547-560.
 93. BASTOS RG, DELLAGOSTIN OA, BARLETTA RG, DOSTER AR, NELSON E, OSORIO FA. Construction and immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2002;21:21-29.
 94. MEULENBERG JJ, BENDE RJ, POL JM, WENSVOORT G, MOORMANN RJ. Nucleocapsid protein N of Lelystad virus: expression by recombinant baculovirus, immunological properties, and suitability for detection of serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:652-656.
 95. KWANG J, ZUCKERMANN F, ROSS G, YANG S, OSORIO F, LIU W *et al.* Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res Vet Sci* 1999;67:199-201.
 96. JIANG Y, XIAO S, FANG L, YU X, SONG Y, NIU C *et al.* DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* 2006;24:2869-2879.
 97. GAGNON CA, LACHAPPELLE G, LANGELIER Y, MASSIE B, DEA S. Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Arch Virol* 2003;148:951-972.
 98. JIANG W, JIANG P, LI Y, TANG J, WANG X, MA S. Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;113:169-180.
 99. ZHENG Q, CHEN D, LI P, BI Z, CAO R, ZHOU B *et al.* Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes* 2007;35:585-595.
 100. JIANG P, JIANG W, LI Y, WU S, XU J. Humoral immune response induced by oral administration of *S. typhimurium* containing a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:321-328.
 101. BASTOS RG, DELLAGOSTIN OA, BARLETTA RG, DOSTER AR, NELSON E, ZUCKERMANN F *et al.* Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2004;22:467-474.
 102. TIAN ZJ, QIU HJ, NI JQ, ZHOU YJ, CAI XH, ZHOU GH *et al.* Construction and characterization of a

- recombinant pseudorabies virus expressing porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5. *Yi Chuan Xue Bao* 2005;32:1248-1255.
103. QIU HJ, TIAN ZJ, TONG GZ, ZHOU YJ, NI JQ, LUO YZ *et al.* Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;106:309-319.
 104. WANG S, FANG L, FAN H, JIANG Y, PAN Y, LUO R *et al.* Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2007;25:8220-8227.
 105. SHEN G, JIN N, MA M, JIN K, ZHENG M, ZHUANG T *et al.* Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine* 2007;25:4193-4202.
 106. ZHENG M, JIN N, ZHANG H, JIN M, LU H, MA M *et al.* Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods* 2006;136:230-237.
 107. AMBROVIC A, ADAM M, MONTEIL M, PAULIN D, ELOIT M. Efficacy of replication-defective adenovirus- vectored vaccines: protection following intramuscular injection is linked to promoter efficiency in muscle representative cells. *Virology* 1997;238:327-335.
 108. JIANG W, JIANG P, WANG X, LI Y, DU Y. Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus. *Virus Res* 2008;136:50-57.
 109. ULMER JB. Influenza DNA vaccines. *Vaccine* 2002;20 (Suppl 2):S74-76.
 110. SASAKI S, TAKESHITA F, XIN KQ, ISHII N, OKUDA K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 2003;31:243-254.
 111. PIRZADEH B, DEA S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 1998;79:989-999.
 112. BARFOED AM, BLIXENKRONE-MOLLER M, JENSEN MH, BOTNER A, KAMSTRUP S. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine* 2004;22:3628-3641.
 113. GAGNON CA, MARDASSI H, GONIN P, MASSIE, B, DEA S. Adenovirus expression of ORFs 3, 5 and 7 products of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Proceedings of the 78th Conference for Research Workers in Animal Diseases*, 1997 Nov 10-11: Chicago, USA. Iowa, USA: Iowa State Press, 1997:57.
 114. JIANG YB, FANG LR, XIAO SB, XIE TT, CHEN HC. Expression of GP5-M fusion protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and establishment of ELISA diagnose based on the recombinant fusion protein. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2005;21:259-264.
 115. MA Y, JIANG YB, XIAO SB, FANG LR, CHEN HC. Co-expressed GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus can form heterodimers. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2006;46:639-643.
 116. PLANA DURAN J, CLIMENT I, SARRASECA J, URNIZA A, CORTES E, VELA C *et al.* Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* 1997;14:19-29.
 117. FANG L, JIANG Y, XIAO S, NIU C, ZHANG H, CHEN H. Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes* 2006;32:5-11.
 118. ALEXANDER J, SIDNEY J, SOUTHWOOD S, RUPPERT J, OSEROFF C, MAEWAL A *et al.* Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. *Immunity* 1994;7:751-61.
 119. ALEXANDER J, DEL GUERCIO MF, FRAME B, MAEWAL A, SETTE A, NAHM MH *et al.* Development of experimental carbohydrate-conjugate vaccines composed of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides and the universal helper T-lymphocyte epitope (PADRE). *Vaccine* 2004;22:2362-2367.
 120. ALEXANDER J, DEL GUERCIO MF, MAEWAL A, QIAO L, FIKES J, CHESNUT RW *et al.* Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses. *J Immunol* 2000;164:1625-1633.
 121. DEL GUERCIO MF, ALEXANDER J, KUBO RT, ARRHENIUS T, MAEWAL A, APPELLA E *et al.* Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses *in vivo*. *Vaccine* 1997;15:441-448.
 122. XUE Q, ZHAO YG, ZHOU YJ, QIU HJ, WANG YF, WU DL *et al.* Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFN γ . *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:291-298.
 123. ROMPATO G, LING E, CHEN Z, VAN KRUININGEN H, GARMENDIA AE. Positive inductive effect of IL-2 on virus-specific cellular responses elicited by a PRRSV-ORF7 DNA vaccine in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;109:151-160.
 124. HOU YH, CHEN J, TONG GZ, TIAN ZJ, ZHOU YJ, LI GX *et al.* A recombinant plasmid co-expressing swine ubiquitin and the GP5 encoding-gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces protective immunity in piglets. *Vaccine* 2008;26:1438-1449.
 125. YOO D, WELCH SK, LEE C, CALVERT JG. Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102:143-154.
 126. WANG Y, LIANG Y, HAN J, BURKHART KM, VAUGHN EM, ROOF MB *et al.* Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain MN184 using chimeric construction with vaccine sequence. *Virology* 2008;371:418-429.