

El potencial diagnóstico de PRRSV usando proteína N recombinante de virus nativos de México

The diagnostic potential of PRRS using recombinant N protein from viruses native to Mexico

Mariana Bereth Minor-Pérez¹, Sara Elisa Herrera-Rodríguez^{1*}, Abel Gutiérrez-Ortega² y Zahaed Evangelista-Martínez¹

¹ Subsede Sureste, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Mérida, Yucatán, México.

² Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, México.

* Autor de correspondencia: Sara Elisa Herrera-Rodríguez, sherrera@ciatej.edu.mx

Palabras clave:

Síndrome del virus respiratorio reproductivo porcino, ELISA, nucleocápside, inmunodiagnóstico, antígeno recombinante

Keywords:

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, ELISA, nucleocapsid, immunodiagnosis, recombinant antigen

Resumen

El PRRSV es un virus que causa graves afectaciones para la industria porcícola. Dada su alta variabilidad a nivel genómico, su diagnóstico puede verse obstaculizado usando técnicas de inmunodiagnóstico o moleculares comunes. En el presente trabajo se buscó determinar la presencia de anticuerpos contra el PRRSV en sueros de cerdos. Se utilizaron los resultados de ELISA en un análisis por curva ROC, construida a partir de 20 sueros control de cerdos de engorda, 10 sueros control positivo y 10 sueros control negativos, y 6 sueros sin clasificar. El ensayo de ELISA se basó en el uso como antígeno de una proteína recombinante de nucleocápside de PRRSV. Los resultados del análisis ROC mostraron que el antígeno S20N recombinante logró clasificar de manera sensible y específica los sueros de animales con infección natural de los de animales inmunizados, así como diagnosticar la enfermedad en sueros sin clasificar.

Abstract

PRRSV is a virus that causes serious damage to the swine industry, and given its high genomic variability, its diagnosis can be hindered using common immunodiagnostic or molecular techniques. In the present study, we sought to determine the presence of antibodies against PRRSV in pig sera. The results of ELISA were used in a ROC curve analysis, built from 20 control sera from fattening pigs, 10 naturally infected and 10 uninfected, and 6 unclassified sera. The ELISA assay was based on the use of a recombinant PRRSV nucleocapsid protein as the antigen. The results of the ROC analysis showed that the recombinant S20N antigen was able to sensitively and specifically classify sera from naturally infected animals from those from immunized animals, as well as diagnose the disease in unclassified sera.

Recibido: 24 de marzo 2025

Revisado: 21 de abril 2025

Aceptado: 02 de junio 2025

Publicado: 21 de enero 2025



Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia CC BY-NC-SA 4.0. Para ver una copia de esta licencia visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Introducción

El Virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés) es la enfermedad con mayor impacto económico en la industria porcícola en Estados Unidos, donde se estima que las pérdidas anuales ascendieron a 1.2 billones de dólares en el transcurso de la última década (Growing Losses from PRRS Cost Pork Producers \$1.2 Billion per Year, New Study Shows - News Service, 2024). Mientras que en México, un cálculo del 2016 estableció una pérdida anual de 3,057.12 pesos por hembra (Cruz, 2016). En México, el 50% de la producción porcícola corresponde a granjas tecnificadas que, para su clasificación como tal, requieren un mínimo de 500 vientres (SENASICA, 2021). El virus fue aislado inicialmente en Países bajos en 1991, aunque se había descrito con anterioridad como la “enfermedad misteriosa del cerdo”. En el periodo 2019-2020 México fue el país con más reportes de la enfermedad, aunque no hubo muertes a causa de ella (Panorama Internacional del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, 2022).

Parte de la problemática al momento de contener el virus es su alto nivel de diversidad genética, que ha causado una distinción entre dos prototipos de PRRSV distintos, cuya identidad genómica es de tan solo 60%: El PRRSV-1, representado por la cepa europea Lelystad, y el prototipo PRRSV-2, representado por la cepa americana VR-2332. El genoma del virus consta de un RNA de cadena sencilla de polaridad positiva 15 kb divididas en 11 marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés), que codifican 16 proteínas no estructurales y 8 estructurales; entre estas últimas se cataloga la proteína de nucleocápside (N), producto del ORF7. Esta proteína es altamente inmunogénica y la más expresada durante la infección viral (Yajie Zheng et al., 2024), además de que es posible detectarla a partir de 7 días post infección y tras varios meses. Sus propiedades inmunogénicas y su alto nivel de conservación en la secuencia del virus han hecho que el diagnóstico del PRRSV esté comúnmente basado en la proteína N, ya sea por inmunoensayo (ELISA, IFA) o por biología molecular (RT-qPCR) (Pan et al., 2023; Yajie Zheng et al., 2024).

El primer uso de una proteína N recombinante de PRRSV en inmunoensayo fue en 1997 (Denac et al., 1997), y actualmente es utilizada en la gran mayoría de kits comerciales para diagnóstico por ELISA, una técnica basada en la interacción antígeno-anticuerpo que se da durante la infección viral, y que se basa en el uso de muestras biológicas como suero o tejidos para diagnosticar una posible infección en los animales, según su carga de anticuerpos (ELISA indirecto). Las técnicas de ELISA en especial han destacado por ser más amigables en un sentido técnico, ya que no requieren de instalaciones o equipo especializado para realizarse, a diferencia de las técnicas de PCR que además se ven limitadas por la estabilidad y manejo de las muestras. Las técnicas de inmunohistoquímica,



por su parte, requieren condiciones estrictas de esterilidad, mayores conocimientos técnicos y también un procesamiento rápido de las muestras, por lo que no es común que se utilicen para la detección del PRRSV en granjas. Muchos de los kits basados en inmunodiagnóstico, aunque logran diagnosticar PRRSV-1 y PRRSV-2, tienen ciertas dificultades para distinguir entre anticuerpos generados por la vacunación del animal o por una infección real, por lo que suelen ser más usados principalmente para monitorear la respuesta inmune del cerdo tras ser vacunado (Pan et al., 2023).

En México, el análisis de cepas circulantes de PRRSV arrojó algo de luz sobre las diferencias que hay entre las cepas locales y una cepa prototipo como VR-2332. Se estableció que en el país el tipo predominante es el PRRSV-2, y en general, los antígenos expresados a partir de la proteína N de las cepas nativas son distintos a aquellos que se generan tras una exposición a las vacunas contra PRRSV, lo que en consecuencia causa resultados variados al momento de diagnosticar la enfermedad con los kits de ELISA disponibles comercialmente. Además, el uso de vacunas de virus vivos modificados (MLV, por sus siglas en inglés) causa interferencias con el diagnóstico (Martínez-Bautista et al., 2018). Con este panorama se hace énfasis en la necesidad existente de actualizar y refinar el diagnóstico de la enfermedad, con un enfoque localizado a una región que sea capaz de distinguir con mayor precisión las infecciones por virus nativos de la respuesta inmune tras la vacunación. Aunque el objetivo del presente trabajo no fue dilucidar los mecanismos que llevan a esta distinción entre cepas nativas y cepas vacunales, el contexto teórico sugiere que las diferencias en la conformación de los epítomos antigénicos de una infección natural, podrían ser la causa de que la unión antígeno-anticuerpo, esencial para la prueba de ELISA, no se establezca si el animal cuyo suero será utilizado como anticuerpo primario únicamente ha estado expuesto a cepas vacunales.

A lo largo del presente proyecto se utilizó una proteína de nucleocápside recombinante expresada a partir de la secuencia ORF7 de una cepa nativa de PRRSV obtenida de una granja en México como antígeno para la técnica de ELISA indirecto, el cual permitió detectar anticuerpos contra el PRRSV en sueros de cerdos seropositivos, logrando también diferenciar entre una infección verdadera y la respuesta inmune típica de la vacunación.

Materiales y Métodos

Obtención del antígeno

El antígeno denominado S20N se obtuvo por medio de la clonación y posterior expresión del fragmento ORF7 de RNA de una cepa nativa de PRRSV-2. Fue expresado en un sistema *E. coli* BL21 utilizando un plásmido pET-28a(+), al que se



le insertó un fragmento de 292 pares de bases, correspondiente a ORF7, según el protocolo descrito por Zapata y colaboradores en 2021 (Zapata-Cuellar et al., 2021) con una temperatura de inducción de 20 °C. La proteína se expresó en la fracción soluble y fue purificada por medio de cromatografía de afinidad con imidazol.

Sueros control e incógnita

Se utilizaron 26 sueros distintos provenientes de animales de engorda de distintas granjas porcícolas en México, agrupados y codificados como se describe en la Tabla 1:

Tabla 1. Relación de sueros utilizados como anticuerpo primario en el ELISA

Sueros positivos control	Sueros negativos control	Sueros incógnita
10 sueros, numerados 1-10	10 sueros: A6, A7, A8, A9, A10, A12, A13, A14, A15, A16.	C2, C3, C4, S2, NAV, CAD

Fuente: propia

Los sueros denominados positivos y negativos se utilizaron como controles para el análisis estadístico de la prueba de ELISA. Su carga viral se verificó por medio de PCR en un laboratorio externo, mientras que los sueros con resultado desconocido fueron usados para su diagnóstico en el presente protocolo.

ELISA indirecto

El antígeno S20N se diluyó a una concentración de 1.97 ng/ μ L con buffer de carbonatos 0.05 M pH 9.6 (Sigma, C3041-50CAP) y se fijó a la placa colocando un volumen de 100 μ L por cada pozo, y dejando en incubación a 4 °C durante toda la noche. Previo al paso de bloqueo, la placa se lavó 3 veces con 200 μ L de PBS-T (Tampón fosfato salino-Tween 0.5%), con agitación suave y manteniendo la solución de lavado 1 minuto por cada lavado. El bloqueo se realizó con 100 μ L de leche descremada al 5%, incubando por 1 hora a temperatura ambiente preparada el mismo día; tras el bloqueo, la placa se volvió a lavar usando las condiciones ya descritas. Los sueros (anticuerpo primario) se añadieron en una dilución 1:2000 con PBS-T, colocando 100 μ L de suero diluido por cada pozo, en triplicados, y se incubaron nuevamente por 1 hora a temperatura ambiente. Adicionalmente, se colocaron 2 controles negativos con el fin de descartar cualquier reacción cruzada que pudiese dar un resultado falso positivo. Tras la reacción con el anticuerpo primario, la placa se lavó 4 veces para incubarse con 100 μ L de anticuerpo secundario (Sigma, Anti-Pig IgG (Whole Molecule)-Peroxidase Antibody Produced in Rabbit Cat. A5670) diluido (1:20,000). Nuevamente, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora,



tiempo tras el cual se lavó 5 veces con la solución de lavado. Se aplicaron 100 μ L de sustrato (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA, Merck cat. T0440) atemperado a cada pozo. La placa se mantuvo protegida de la luz por 5 minutos para permitir el desarrollo del color por la reacción del sustrato con el anticuerpo secundario. Sin lavar la placa ni retirar el sustrato, se detuvo la reacción con el mismo volumen (100 μ L) de solución de paro (H_2SO_4 1N) y se procedió a la lectura por espectrofotometría a 450 nm.

Análisis estadístico

Se obtuvieron los datos de medias y desviación estándar de las absorbancias obtenidas para todas las muestras (excluyendo controles de arginina y PBS) utilizando el software SPSS versión 28, condensando los triplicados a un solo valor, lo que sirvió para representar gráficamente los resultados obtenidos.

Los valores de obtenidos de los sueros positivos control (numerados 1-10) y los sueros negativos control (A6, A7, A8, A9, A10, A12, A13, A14, A15, A16) se utilizaron para la construcción de una curva de eficacia diagnóstica (ROC, por sus siglas en inglés). Ya que este análisis requiere de valores binarios, a los sueros positivos control se les asignó el valor 0; y a los sueros negativos control, el valor 1. Este análisis también permitió obtener el punto de corte y el área bajo la curva. El punto de corte es el valor mínimo en el que se considerará que una respuesta se puede clasificar dentro de la variable de estado, es decir, la categoría considerada positiva. Al establecer un punto de corte, basándose en los sueros de diagnóstico conocido, fue posible determinar qué sueros incógnita se podrían clasificar como positivos o negativos. Mientras que el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) es un indicador de la calidad del clasificador. Un valor más cercano a 1 se interpreta como una alta sensibilidad y especificidad del clasificador, lo que significa que tiene la capacidad de diferenciar correctamente los individuos sanos y los enfermos. La sensibilidad y especificidad también ayudan a determinar el punto de corte, ya que se debe elegir aquel que permita tener una sensibilidad y especificidad lo más cercanas a 1 que sea posible. La selección del punto de corte dependerá del objetivo propuesto para el clasificador.

Al haber obtenido el punto de corte, las medias de las absorbancias de los sueros control y los sueros incógnita, con sus respectivas desviaciones estándar, se graficaron en el software GraphPad Prism Versión 8.0.1, con el fin de determinar si las desviaciones entre sueros positivos y negativos se traslapaban, y si alguno de los sueros positivos tenía valores por debajo del punto de corte y viceversa.



Resultados y Discusión

La curva y el análisis ROC se construyeron con los valores de las lecturas a OD₄₅₀ de los sueros con resultado previo de positivos y negativos a PCR. Se obtuvo un AUC = 1. Según los conceptos de sensibilidad y especificidad, el clasificador puede diagnosticar la enfermedad en los animales sin riesgo de errar por falsos positivo. El punto de corte, calculado en 0.567, corresponde al punto en el que la sensibilidad (eje y) tiene un valor de 1; y la 1-especificidad (eje x), un valor de 0. En resumen, se encuentra en el punto de la curva más cercano al ángulo superior izquierdo del gráfico, como se observa en el Gráfico 1.

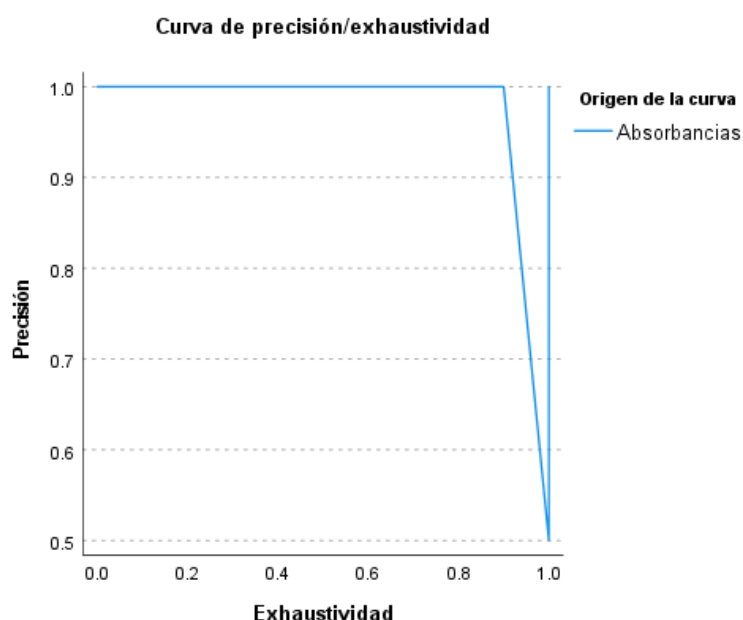


Gráfico 1. Curva ROC de absorbancias de los controles positivo y negativo. En el eje y se representa la sensibilidad; en el eje x, su complementario, 1-especificidad. La línea de referencia representa un clasificador completamente al azar, con AUC = 0.5

Fuente: propia. Generado en SPSS, versión 28

En la Tabla 2 se presentan los resultados de absorbancia de las muestras incógnita. A partir del punto de corte obtenido de los valores de los sueros denominados control, se determinó que 4 de las 6 muestras son seropositivas: C2, C3, C4, NAV, mientras que S2 y CAD tuvieron absorbancias promedio inferiores al punto de corte 0.567 (como se observa en la Tabla 3), por lo que se consideraron negativos a anticuerpos contra PRRSV.

**Tabla 2.** Análisis ROC de los sueros control positivos y sueros control negativos

Área bajo la curva ROC				
Variables de resultados de prueba: V1				
95% de intervalo de confianza asintótico				
Área	Desv. Error ^a	Significación asintótica ^b	Límite inferior	Límite superior
1.000	.000	.000	1.000	1.000

a. Bajo el supuesto de distribución exponencial binegativo
b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Fuente: propia. Obtenido en SPSS versión 28**Tabla 3.** Estadísticos descriptivos de los seis sueros incógnita. Analizado con el software SPSS versión 28

Muestra	Media	Desviación estándar
C2	0.823	0.018
C3	3.704	0.045
C4	3.38	0.053
S2	0.319	0.005
NAV	1.667	0.093
CAD	0.444	0.023

Fuente: propia

El punto de corte, las medias y las desviaciones estándar se utilizaron para construir un el Gráfico 2, en el que se pudo confirmar que las desviaciones estándar de los controles positivos y negativos no se traslapan, lo que sustenta la precisión del clasificador al momento de diagnosticar los sueros. Los resultados obtenidos concuerdan con la propuesta presentada por Martínez-Bautista en 2017, en el que se sugiere que los anticuerpos producidos como respuesta a una infección por virus nativos de México tienen diferencias relevantes en relación a las cepas vacunales, lo que puede entorpecer el diagnóstico (Martínez-Bautista et al., 2018). Adicionalmente, se ha confirmado que un cambio en la secuencia de aminoácidos de un antígeno puede tener como consecuencia que el reconocimiento del anticuerpo por el antígeno se vea bloqueado por completo (Colman, 1994) y las secuencias de cepas de PRRSV presentes en México, entre las que se encuentra la utilizada para la producción del antígeno S20N, presentan cambios como sustituciones o eliminaciones dentro de su secuencia de aminoácidos, sin excepción (Martínez-Bautista et al., 2018).

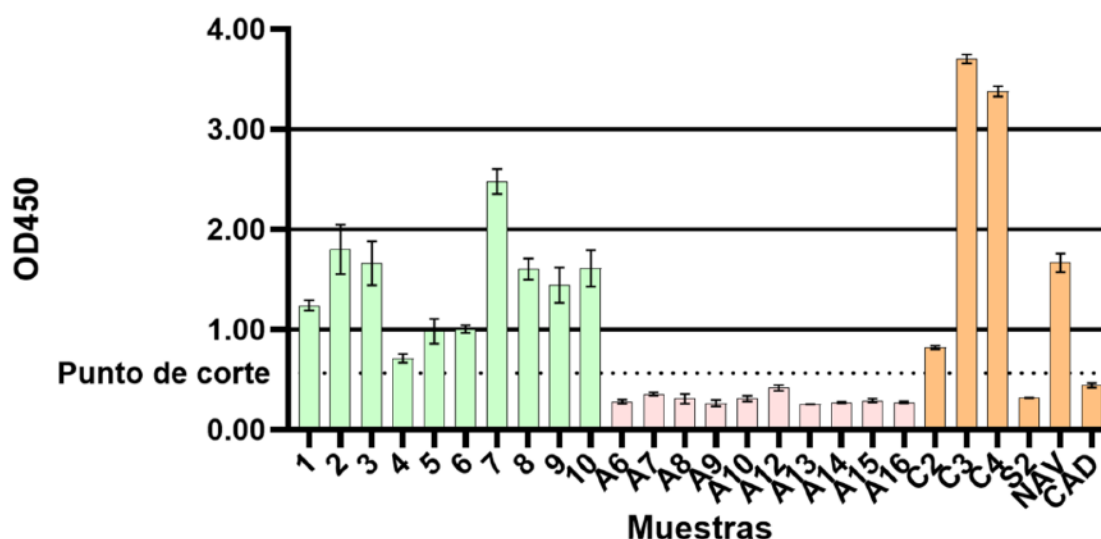


Gráfico 2. Gráfico de barras de las absorbancias con desviación estándar. Con una línea punteada se señala el punto de corte. Las muestras codificadas 1-10 corresponden a sueros control positivos; las muestras codificadas A6-A16 corresponden a sueros control negativos. C2, C3, C4, S2, NAV y CAD son los códigos de los sueros incógnita que se diagnosticaron
Fuente: propia. Elaborado en GraphPad Prism, versión 8.0.1

En la actualidad, el diagnóstico de PRRSV en México generalmente se realiza por técnicas de RT-PCR en tiempo real, o por kits comerciales de ELISA; sin embargo, son pocos los esfuerzos para actualizar las opciones de diagnóstico disponibles en el país, a pesar de que, a nivel mundial, somos el país que más infecciones presenta anualmente.

A nivel internacional ha habido actualizaciones hacia las técnicas de ELISA, principalmente para lograr detectar el PRRSV-1 y PRRSV-2, utilizando anticuerpos monoclonales obtenidos tanto de la proteína N, como de proteínas no estructurales como Nsp2 y Nsp4. El uso de estas proteínas alternativas son una propuesta interesante para el diagnóstico, ya que no causan una respuesta de anticuerpos tras la vacunación con virus inactivos, debido a que solo se expresan durante los ciclos de replicación, pero sí durante la infección natural, lo que permite la detección por una técnica ELISA que no emitirá una señal por los anticuerpos post vacunación (Cong et al., 2013; Fu et al., 2024). Otro ejemplo de una proteína no estructural utilizada para el diagnóstico por ELISA es Nsp9 que, al igual que Nsp2 y Nsp4, no genera anticuerpos en el huésped, y se ha utilizado como antígeno para detectar la infección y los anticuerpos generados por otras vacunas tipo MLV, y diferenciarla de la respuesta de anticuerpos generada por la cepa vacunal MLV TJM-F92, a partir de cuya secuencia se expresó Nsp2 (Wang et al., 2018). Un protocolo similar al presente se desarrolló en 2020, en el que se expresó una proteína N recombinante de un virus obtenido de tejido de un animal infectado, con el objetivo de utilizarlo



como antígeno para ELISA indirecto e implementar una encuesta serológica en la India. En este ensayo, que incluyó una optimización de las concentraciones de antígeno y anticuerpos primario y secundario, se utilizaron 62.5 ng/pozo de antígeno, sueros en dilución 1:8 y dilución 1:10,000 de anticuerpo secundario conjugado (Kashyap et al., 2020). En Asia, los esfuerzos por encontrar una técnica que detecte ambos prototipos de PRRSV cobra relevancia al saber que ambos prototipos están presentes en la región, y es común que más de un tipo de PRRSV coexista en una misma granja (Li et al., 2024).

En México, a pesar de que las cepas circulantes en las granjas son variadas, hasta ahora no se han detectado cepas de PRRSV-1, y pertenecen específicamente a los linajes 1, 5, y predominantemente, 8, del PRRSV-2 (Martínez-Bautista et al., 2018). Es por esto que en México las técnicas de diagnóstico se beneficiarían de una actualización con enfoque local, y en el caso del ELISA, de generar nuevos métodos que no se vean entorpecidos por la presencia de anticuerpos obtenidos por la inmunización, que está muy presente en las granjas del país.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron determinar que la proteína recombinante de nucleocápside S20N es un antígeno útil para la inmunodetección de PRRSV en sueros de cerdos de granja. El análisis estadístico de los resultados obtenidos estableció que el protocolo propuesto da lugar a un clasificador perfecto, en el que la presencia de anticuerpos por infección por PRRSV puede ser detectada sin resultados falsos positivos, ni falsos negativos. A pesar de los resultados alentadores, se requiere una mayor cantidad de muestras para complementar y validar los resultados obtenidos, al igual que compararlos con algún kit de ELISA disponible comercialmente o con una técnica de diagnóstico por biología molecular.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de cualquier relación comercial o financiera que pudiera interpretarse como un potencial conflicto de interés.

Financiamiento

El presente trabajo fue realizado con apoyo del proyecto “Desarrollo de un prototipo con inmunoglobulinas (IgYs) de tipo aviar (forma líquida) contra el virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino” 9255-2021, y financiado por el fondo INCIDE-COECYTJAL.



Referencias

- Colman, P. M. (1994). Effects of amino acid sequence changes on antibody-antigen interactions. *Research in Immunology*, 145(1), 33-36. [https://doi.org/10.1016/S0923-2494\(94\)80039-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2494(94)80039-1)
- Cong, Y., Huang, Z., Sun, Y., Ran, W., Zhu, L., Yang, G., Ding, X., Yang, Z., Huang, X., Wang, C., & Ding, Z. (2013). Development and application of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to differentiate antibodies against live and inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 444(1), 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.027>
- Cruz, J. A. (2016). *Evaluación del impacto económico del virus de PRRS en granjas porcinas en México*. <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000739467/3/0739467.pdf>
- Denac, H., Moser, C., Tratschin, J. D., & Hofmann, M. A. (1997). An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen. *Journal of Virological Methods*, 65(2), 169-181. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)02186-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)02186-1)
- Fu, C., Shao, Q., Zhang, L., Cui, X., Chen, T., Tian, C., Qian, F., Chu, X., Li, Y., Yang, P., Hou, Y., & Xiao, Y. (2024). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody to a dominant epitope in non-structural protein 4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Immunological Methods*, 530, 113697. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2024.113697>
- Gobierno de México-Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural-Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2022). *Panorama Internacional del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino*. Recuperado de https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2022/agosto/00011PAIPRRS04012022_e1c3bf38-f35f-4d5e-8b6d-3bd8c6c64063_e1c3bf38-f35f-4d5e-8b6d-3bd8c6c64063.pdf
- Gobierno de México-Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural-Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2021). *Análisis de posibles impactos económicos por Fiebre Porcina Africana en las zonas porcinas de México*. Recuperado de https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2022/mayo/An%C3%A1lisisdeposiblesimpactosecon%C3%B3micosporFiebrePorcinaAfricanaenlaszonasporc%C3%ADcolasdeM%C3%A9xico_227c42cc-d52f-4895-adff-ebf55b487b5b.pdf
- Iowa State University. (2024). *Growing losses from PRRS cost pork producers \$1.2 billion per year, new study shows*—News Service. <https://www.news.iastate.edu/news/growing-losses-prrs-cost-pork-producers-12-billion-year-new-study-shows>



- Kashyap, S. P., Hiremath, J., Vinutha, S., Patil, S. S., Suresh, K. P., Roy, P., & Hemadri, D. (2020). Development of recombinant nucleocapsid protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for sero-survey of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary World*, 13(12), 2587. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2587-2595>
- Li, C., Zhao, J., Li, W., Xu, H., Gong, B., Sun, Q., Guo, Z., Li, J., Xiang, L., Tang, Y., Leng, C., Wang, Q., Peng, J., Zhou, G., Liu, H., An, T., Cai, X., Tian, Z.-J., & Zhang, H. (2024). Prevalence and genetic evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in commercial fattening pig farms in China. *Porcine Health Management*, 10(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40813-024-00356-y>
- Martínez-Bautista, N. R., Sciutto-Conde, E., Cervantes-Torres, J., Segura-Velázquez, R., Mercado García, M. C., Ramírez-Mendoza, H., Trujillo Ortega, M. E., Delgadillo Alvarez, J., Castillo-Juárez, H., & Sanchez-Betancourt, J. I. (2018). Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and the frequency of wild-type PRRS virus in México. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(4), 993-1008. <https://doi.org/10.1111/tbed.12831>
- Pan, J., Zeng, M., Zhao, M., & Huang, L. (2023). Research Progress on the detection methods of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1097905. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1097905>
- Wang, X. X., Wang, F. X., Li, Z. G., Wen, Y. J., Wang, X., Song, N., & Wu, H. (2018). Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to differentiate antibodies against wild-type porcine reproductive and respiratory syndrome from the vaccine strain TJM-F92 based on a recombinant Nsp2 protein. *Journal of Virological Methods*, 251, 151-154. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.001>
- Zheng, Y., Li, G., Luo, Q., Sha, H., Zhang, H., Wang, R., Kong, W., Liao, J. & Zhao, M. (2024). Research progress on the N protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1391697, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1391697>
- Zapata-Cuellar, L., Gaona-Bernal, J., Manuel-Cabrera, C. A., Martínez-Velázquez, M., Sánchez-Hernández, C., Elizondo-Quiroga, D., Camacho-Villegas, T. A., & Gutiérrez-Ortega, A. (2021). Development of a Platform for Noncovalent Coupling of Full Antigens to Tobacco Etch Virus-Like Particles by Means of Coiled-Coil Oligomerization Motifs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(15), 4436. <https://doi.org/10.3390/molecules26154436>

