

# Actualización de la circulación de PRRSV en Uruguay en el período de 2017-2019

Josefina Puig

*Tesina de Grado*

20 de noviembre de 2020

Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Orientadora: Dra. Natalia Ramos**

**Co-orientador: Dr. Juan Arbiza**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



SECCIÓN  
VIROLOGÍA  
FCIEN | UDELAR



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1. Descubrimiento e importancia a nivel mundial.....	5
2. Patogenia y cuadro clínico.....	6
3. Respuesta humoral contra PRRSV y vacunas disponibles.....	7
4. Características generales.....	8
4.1. Clasificación taxonómica y variabilidad genética.....	8
4.2. Organización genómica y estructural.....	9
5. Ciclo replicativo.....	12
5.1. Adsorción y penetración.....	12
5.2. Traducción, transcripción y replicación .....	12
5.3. Final del ciclo viral.....	15
6. PRRSV en Uruguay y Sudamérica .....	15
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
1. Obtención de muestras .....	18
2. Detección serológica de exposición a PRRSV (ELISA).....	18
3. Detección molecular de PRRSV.....	19
3.1.1. Extracción de ARN con Trizol® .....	19
3.1.2. Extracción de ARN con kit comercial (Zymo Research) .....	19
3.2. RT- <i>nested</i> -PCR.....	19
4. Secuenciación y análisis de secuencias.....	21
4.1. Análisis filogenético.....	21
5. Caracterización molecular de PRRSV.....	21
5.1. Diseño de cebadores.....	22
5.2. RT.....	22
5.3. <i>Nested</i> -PCR.....	22
6. Aislamiento por cultivo celular de cepas uruguayas.....	25
6.1. Células .....	25
6.2. Virus.....	25
6.3. Identificación viral.....	26
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>

1. Evaluación de la presencia de anticuerpos contra PRRSV en cerdo doméstico y jabalí.....	27
2. Detección molecular de PRRSV .....	28
2.1. Detección molecular de muestras de suero analizadas por ELISA.....	28
2.2. Detección molecular de muestras de órgano.....	28
3. Análisis filogenético.....	31
4. Caracterización molecular de PRRSV.....	32
4.1. Protocolo 1.....	33
4.2. Protocolo 2.....	33
4.3. Protocolo 3.....	33
4.4. Protocolo 4.....	35
5. Aislamiento en cultivos celulares de cepas uruguayas .....	35
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

---

*Betaarterivirus suis*, mejor conocido como virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés), es el agente etiológico causante de la enfermedad reproductiva y respiratoria porcina (PRRS, por sus siglas en inglés). Desde su emergencia hasta la actualidad, PRRS es considerada una de las enfermedades virales que más pérdidas económicas ha generado en la industria porcina, y es de carácter denunciante ante la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), lo que ha estimulado grandes esfuerzos para su control y erradicación.

La circulación de PRRSV en Uruguay fue reportada por primera vez en un estudio publicado en el año 2018 en el cual se aplicaron técnicas serológicas, moleculares y de aislamiento en cultivos celulares, sobre muestras de cerdos colectadas en el período 2010-2016. Los datos obtenidos evidenciaron la circulación de PRRSV en Uruguay al menos desde el año 2011, identificándose en todos los años del periodo 2011-2016 en animales de criaderos ubicados en Montevideo, Canelones, Soriano, Colonia y Salto. Este hallazgo dio lugar a su notificación obligatoria ante la OIE en el año 2017 y a una alerta sanitaria de esta enfermedad emergente en la región. Dado que ni Brasil ni Argentina, que comparten fronteras con Uruguay, han reportado la enfermedad, se hace necesario realizar más estudios para comprender el escenario epidemiológico, y para monitorear el estatus sanitario de esta virosis emergente, con el fin de evitar su dispersión en el país. Por estas razones, en el presente trabajo se realizó una actualización del estado de la circulación de PRRSV en Uruguay en el período de 2017 a 2019. Para ello, se evaluó la presencia de anticuerpos contra el virus mediante ensayos de ELISA en muestras de suero de cerdos colectadas en dicho período de distintos criaderos que presentaban sintomatología compatible con PRRS. A su vez, se buscó detectar el genoma viral mediante detección molecular por RT-nested-PCR, y por último, se tuvo como objetivo profundizar en la caracterización de las cepas circulantes en el país. Los resultados de este trabajo evidenciaron la circulación de anticuerpos contra el virus en el nuevo período estudiado y la presencia del genoma de PRRSV-2 en muestras de cerdo colectadas en el año 2017 y 2019. Si bien no se logró amplificar otra región del genoma viral que permita profundizar en la caracterización genética de PRRSV en Uruguay y debido a que probablemente esto pueda deberse en parte a una muy baja carga viral presente en la muestra de partida, se optimizó la adaptación de cepas de campo en cultivos celulares mediante pasajes sucesivos. Paralelamente, con el kit de ELISA empleado, que es considerado el ELISA de referencia para la identificación de granjas positivas para PRRSV, se procesaron 67 muestras de suero de archivo (2010-2016) observándose un porcentaje de seropositivos del 21%. A su vez, se realizó un trabajo preliminar sobre la circulación de anticuerpos contra PRRSV en muestras de jabalí provistas por la asociación de controladores de jabalí de Artigas. Los resultados obtenidos en este estudio, evidencian la circulación de PRRSV en Uruguay en el período de 2017 a 2019, y por lo tanto, aportan información importante para la implementación de medidas de contención de la enfermedad y dan lugar a nuevos estudios que brinden conocimiento sobre el escenario epidemiológico de PRRSV en Uruguay.

# INTRODUCCIÓN

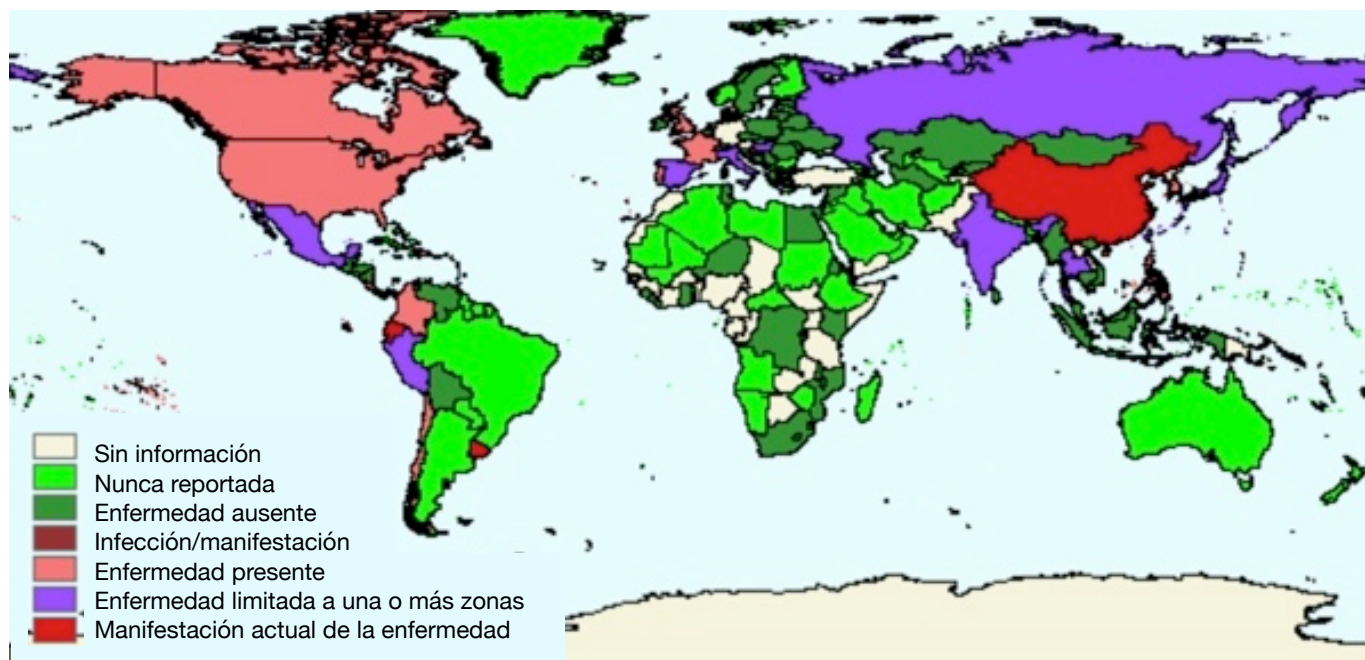
---

## 1. DESCUBRIMIENTO E IMPORTANCIA A NIVEL MUNDIAL

*Betaarterivirus suis*, mejor conocido como virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés), es el agente etiológico causante del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS, por sus siglas en inglés). Este síndrome fue descubierto por primera vez en los Estados Unidos (Carolina del Norte) en el año 1987, y en Europa (Münster, Alemania) en el año 1990. El agente etiológico responsable fue aislado por primera vez en 1991 en Holanda, y se le llamó Lelystad, por el instituto donde se realizó el aislamiento (Wensvoort et al., 1991). Un año más tarde, se aisló la cepa circulante en Estados Unidos, y se la llamó VR-2332 (Collins et al., 1992). En principio, se utilizaron varios nombres para describir la enfermedad, como enfermedad misteriosa porcina, o enfermedad de la oreja azul, hasta que el nombre síndrome reproductivo y respiratorio porcino fue adoptado en el primer congreso internacional sobre la enfermedad en Estados Unidos, en el año 1992. La primera evidencia de la circulación del virus proviene de estudios serológicos retrospectivos, que evidenciaron la presencia de anticuerpos en suero desde el año 1979 en Canadá (Carman, Sandford & Dea, 1995). En Estados Unidos, sin embargo, estudios retrospectivos no mostraron evidencia de infección hasta 1985. En Asia, el primer reporte de la circulación de PRRSV fue en Japón en 1988, pero la presencia de anticuerpos en suero fue evidenciada desde 1985 en un estudio retrospectivo en Corea del Sur (Shin et al., 1993; Zimmerman, Yoon, Wills & Swenson, 1997). Estos resultados sugieren que el PRRSV se encontraba circulando en cerdos domésticos durante varios años antes de su descubrimiento.

Desde su emergencia, el virus se volvió endémico a nivel global (figura 1), con brotes ocasionales más severos a lo largo de los años causantes de elevada mortalidad, principalmente en lechones, y actualmente se encuentra en la gran mayoría de los países que presentan un gran desarrollo de la industria porcina (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991; Shi et al., 2010). Existen numerosas rutas de introducción y transmisión de PRRSV identificadas, siendo las principales la introducción de animales infectados o vacunados, semen contaminado, y asociado a estas dos rutas, el mal manejo del período de cuarentena para la introducción de nuevos ejemplares, vehículos, trabajadores de los criaderos porcinos, aerosoles, insectos y utensilios contaminados en general (Mortensen et al., 2002).

A más de 25 años de su emergencia, PRRS aún es considerada una de las enfermedades virales que más pérdidas económicas ha causado en la industria porcina (Pileri & Mateu, 2016), y es de carácter denunciante ante la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) (Pileri & Mateu, 2016), lo que ha estimulado grandes esfuerzos para su control y erradicación. Hasta el momento, no se ha registrado que este virus pueda infectar humanos ni otros hospederos no porcinos, solo se ha encontrado en cerdo doméstico y jabalí (Kappes & Faaberg, 2015).



**Figura 1. Distribución geográfica de PRRS en 2017.** En la leyenda se indica con código de colores el estatus de la enfermedad en los distintos países. Estos datos corresponden a la distribución de PRRS en cerdos domésticos. Se eligió el 2017 por ser el año en el que se denunció la circulación del virus en Uruguay ante la OIE. Imagen extraída y adaptada de OIE World Animal Health Information System, 2020.

## 2. PATOGENIA Y CUADRO CLÍNICO DE PRRS

Los cerdos (tanto domésticos como salvajes) son los únicos hospederos naturales conocidos de PRRSV. Dentro de estos, presenta un tropismo muy restringido por células del linaje monocítico, donde los macrófagos alveolares porcinos (PAMs), presentes en pulmones, placenta y órganos linfoides, sirven como las células blanco principales para la infección (Lunney et al., 2016). También se ha reportado que el virus puede infectar células dendríticas (Loving, Brockmeier & Sacco, 2007). Replica principalmente en estos dos tipos celulares en pulmones y en el tracto respiratorio superior, resultando en viremia a las 6-12 horas post-infección (Lunney et al., 2016). Para el aislamiento viral, de las muchas líneas celulares probadas, solo la línea celular de riñón de mono verde africano (MA-104), y sus derivados, como MARC-145, son permisivas a la replicación de PRRSV *in vitro* (Kim et al., 1993; Lunney et al., 2016).

En cuanto a las manifestaciones clínicas, PRRS es una enfermedad emergente (Segalés & Mateu, 2012), de carácter multifactorial, lo que significa que su desarrollo y presentación clínica es dependiente de factores intrínsecos y extrínsecos del animal (como la edad, el estado inmune, la cepa viral circulante, co infección con otros patógenos, factores de manejo de la granja, etc.) (Segalés & Mateu, 2012). Por este motivo, puede existir una infección subclínica (OIE, 2008; Segalés & Mateu, 2012; Lunney et al., 2016), o como su nombre sugiere, provocar desórdenes reproductivos en cerdas (principalmente abortos, momias y lechones débiles), y neumonía y retraso en el crecimiento en lechones (Keffaber, 1989; Wensvoort et al., 1991; Shi et al., 2010). En un esquema general, la infección por PRRSV puede ser dividida en al menos tres estadios, cada uno único en cuanto a las características inmunológicas, virológicas y clínicas de la enfermedad. El primer estadio supone la infección aguda, durante la cual los pulmones sirven como los sitios preferenciales de infección, y se da la transmisión transplacentaria del virus de madres a fetos, que es más frecuente en el último estadio de la gestación, por aumento de receptores para el virus en los macrófagos de la placenta fetal (Lunney et al., 2016). Las manifestaciones en cerdas pueden ser letargia y falta de apetito, o, en el caso de cepas altamente patogénicas, puede presentarse un cuadro respiratorio evidente

(OIE, 2008). La enfermedad se esparce rápidamente en el criadero en el correr de 7 a 10 días (OIE, 2008) y la viremia en suero puede durar varias semanas a pesar de la presencia de anticuerpos circulantes. Durante el segundo estadio, de infección persistente, la replicación viral suele disminuir al punto que los cerdos ya no exhiben signos clínicos de enfermedad. En este estadio la replicación se localiza principalmente en órganos linfoides, incluyendo tonsila y nódulos linfáticos, pero no en el bazo (Rowland, Lawson, Rossow & Benfield, 2003). La replicación continua del virus en los nódulos linfáticos en este estadio significa que el contagio aún es posible, por la vía nasal-oral, y por medio del semen (Christopher-Hennings, Nelson, Althouse & Lunney, 2008; Lunney et al., 2016). Luego, en el tercer estadio, la replicación viral decae hasta que el virus desaparece del hospedero. La desaparición eventual del virus representa el último estadio de infección. No se sabe exactamente cuándo desaparece, pero la replicación puede mantenerse hasta 250 días después de la infección (Wills et al., 2003; Lunney et al., 2016). Por lo tanto, la replicación de PRRSV no establece un equilibrio estable, sino que declina gradualmente a lo largo del tiempo, siendo los órganos linfoides los últimos sitios de replicación viral. Sin embargo, como ya se mencionó, este virus también tiene la capacidad de generar infecciones persistentes (Allende et al., 2000; Lunney et al., 2016), lo que supone un mayor desafío para la erradicación y contención de la enfermedad.

La infección con PRRSV puede además promover la infección con otros patógenos oportunistas, y desencadenar un cuadro patológico complejo. Se ha evidenciado su interacción con otros virus y bacterias (OIE, 2008).

### **3. RESPUESTA HUMORAL CONTRA PRRSV Y VACUNAS DISPONIBLES**

PRRSV se caracteriza por su capacidad de evadir la respuesta inmune (tanto innata como adaptativa) del hospedero por diversos mecanismos, y por su gran variabilidad genética, lo que supone un gran desafío para la generación de vacunas efectivas (Lunney et al., 2016). Además, la inmunidad mediada por células y los títulos de anticuerpos neutralizantes son altamente variables dependiendo de la cepa del virus. En términos generales, la infección con PRRSV estimula la generación de anticuerpos en el hospedero a partir de los 7 a los 9 días post-infección, pero no existe evidencia de que esta respuesta suponga una protección en contra de la infección con el virus (Yoon, Joo, Goyal & Molitor, 1994; Lunney et al., 2016). Los anticuerpos neutralizantes para el virus en el suero aparecen típicamente después de los 28 días post-infección. Los ensayos comerciales para análisis de anticuerpos en suero, normalmente miden los anticuerpos contra la proteína N, debido a su aparición temprana en la infección y su corta duración en el suero (estos anticuerpos no son neutralizantes, y por ende, no se relacionan con la protección) (Lopez & Osorio, 2004). Estudios posteriores de ensayos de transferencia de suero han mostrado que los anticuerpos neutralizantes pueden transferir protección pasiva contra PRRSV, con la desventaja de que se requiere una transferencia de anticuerpos de alto título (Lopez et al., 2007).

Hasta el momento existen al menos 30 vacunas para PRRSV. Casi todas se basan en el virus atenuado, pero también existen basadas en el virus inactivado. Sin embargo, por la capacidad de evasión de la respuesta inmune y la gran diversidad genética del virus antes comentadas, estas vacunas tienen una eficacia limitada, y no confieren protección completa y/o universal (Types of vaccines against PRRS virus | PRRS Control, 2020). A pesar de esto, se ha visto que tienen efectos benéficos en cuanto a protección clínica, reducción de la proporción de cerdos virémicos, duración de la viremia, reducción de la tasa reproductiva viral y control de la diseminación en la población (Types of vaccines

against PRRS virus | PRRS Control, 2020) . Por ende, la vacunación es un pilar importante en el control de PRRS, pero su efectividad es dependiente de correctas medidas de bioseguridad y manejo, y de las características de la cepa viral circulante.

## 4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE PRRSV

### 4.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y VARIBILIDAD GENÉTICA

Según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, por sus siglas en inglés), PRRSV pertenece al orden *Nidovirales*, que comprende tres familias virales: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, y *Roniviridae*; todas ellas compuestas por virus envueltos de genoma ARN simple hebra de polaridad positiva. Dentro de este orden, forma parte de la familia *Arteriviridae*, junto con el virus elevador de lactato deshidrogenasa (LDV) de ratón, el virus de la artritis equina (EAV), y el virus de la fiebre hemorrágica simia (SHFV) (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1995; Kuhn et al., 2015). Los virus de la familia *Arteriviridae* cuentan con una ARN polimerasa ARN dependiente que no posee una actividad de corrección de pruebas, por lo que la tasa de mutación es extremadamente alta, del orden de  $10^{-2}$  sustituciones por sitio por año (s/s/a) (Forsberg, 2005). Como consecuencia, en cerdos infectados, PRRSV (al igual que todos los virus ARN) existe como una nube de variantes virales conocida como cuasiespecie, (resultado de las mutaciones generadas durante la replicación de la partícula parental) sujeta a variación, competencia y selección (Hanada et al., 2005).

Dentro de la familia *Arteriviridae*, se agrupa en el género *Betaarterivirus*, y dentro de este existen dos especies: *Betaarterivirus suid 1*, y *Betaarterivirus suid 2* (denominadas también PRRSV-1 y PRRSV-2, respectivamente) (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2020).

PRRSV se caracteriza por tener una variabilidad genética extremadamente alta. En principio, se había considerado a este virus una única especie con 2 genotipos: PRRSV-1, que surgió en Europa, y PRRSV-2, originario de América del Norte. Estos genotipos, sin embargo, han evolucionado de forma independiente en estas dos áreas, y difieren significativamente en cuanto a contenido genético y propiedades antigénicas. Comparten una identidad nucleotídica del 60-70% y una similitud aminoacídica del 50-80% en sus varios genes virales (Hanada et al., 2005; Shi et al., 2010). Para dar crédito a la divergencia entre genotipos, se ha propuesto la reorganización de PRRSV en dos especies en vez de genotipos (Rappe et al., 2016).

La variabilidad genética intraespecífica de ambas especies de PRRSV también es sorprendentemente alta (Shi et al., 2010). Dentro de PRRSV-1 encontramos cuatro subtipos, que se distinguen principalmente por el análisis filogenético de la secuencia de la región ORF5 (que codifica para la proteína más abundante de la envoltura viral, GP5), utilizada debido a su gran variabilidad. En cuanto a PRRSV-2, este se subdivide en nueve distintivos linajes hasta el momento, determinados por el análisis de la secuencia de la ORF5 (Shi et al., 2010). Se ha descrito que la variabilidad genética no es constante dentro del genoma viral (Shi et al., 2010), y dado que la ORF5 representa un porcentaje muy pequeño del genoma viral, es posible que en el futuro, esta clasificación cambie al considerar todo el genoma viral.



La gran diversidad genética de PRRSV no puede explicarse solo mediante eventos de mutación y selección, sino que también deben tenerse en cuenta los frecuentes eventos de recombinación que han sido observados para ambas especies. Los datos epidemiológicos sugieren que la divergencia entre las dos especies de PRRSV podría haberse dado en 1980. De ser así, las tasa de evolución del virus sería la más alta de todos los virus ARN (como se mencionó anteriormente, en el orden de  $10^{-2}$  s/s/a) (Forsberg, 2005). Sin embargo, una segunda hipótesis plantea que la divergencia podría haberse dado mucho antes que la emergencia, y ambas especies haber evolucionado de forma independiente en ambos continentes por un largo período de tiempo (Forsberg, 2005). Hasta la actualidad, la historia evolutiva de pre-emergente de este virus sigue siendo un misterio.

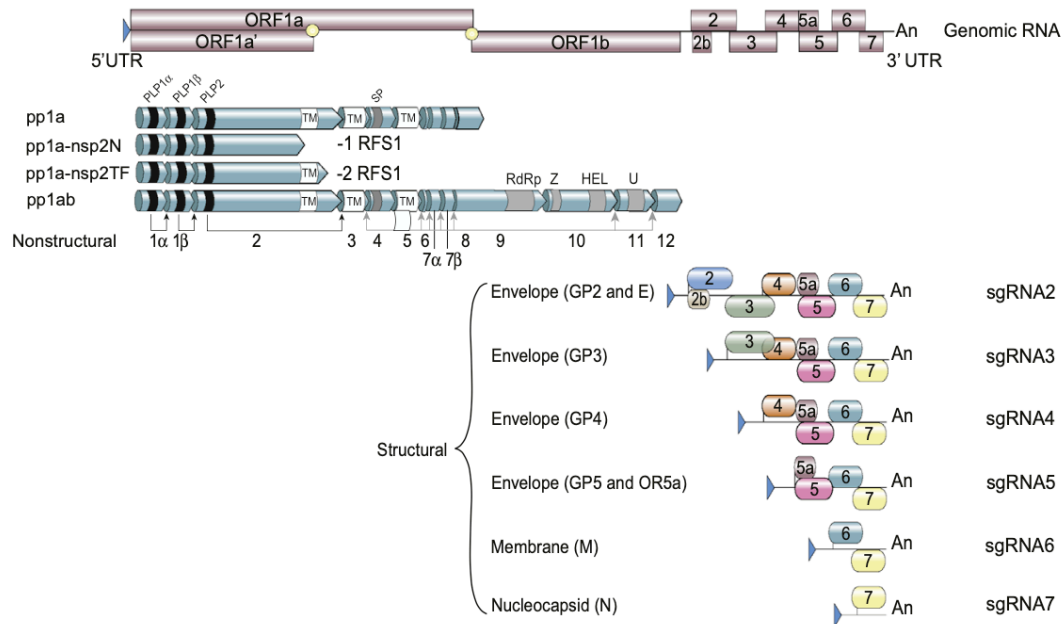
## 4.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y ESTRUCTURAL

PRRSV es un virus con genoma ARN simple hebra de polaridad positiva, cuyo tamaño varía entre 14.9 kb y 15.5 kb, y posee un capuchón en 5' y una cola poli A en 3' (Yun & Lee, 2013; Kappes & Faaberg, 2015). En el extremo 5' del genoma encontramos una región UTR, de tamaño variable en las distintas especies del virus (Yun Lee, 2013; Kappes & Faaberg, 2015). Enseguida corriente abajo de esta región hay dos largos marcos de lectura abiertos solapantes, ORF1a y b, que codifican para dos grandes poliproteínas no estructurales (pp1a y pp1ab respectivamente). Estos comparten un único sitio de inicio de la traducción, pero poseen dos cambios de marco de lectura ribosomal (RFS1 y RFS2, del inglés *ribosomal frame shift*) que cuando ocurren resultan en distintos productos proteicos más pequeños. Todas las poliproteínas generadas a partir de ORF1 van a ser clivadas por proteinasas virales para dar lugar a una gran cantidad de proteínas no estructurales, necesarias para la continuación del ciclo viral (entre ellas la ARN polimerasa ARN dependiente) (Kappes & Faaberg, 2015). El resto del genoma, hacia 3', contiene 8 genes relativamente pequeños (ORF2 a ORF7), que contienen secuencias que se solapan con los genes adyacentes tanto en 5' como en 3' (figura 2), con excepción de ORF4/ORF5 en PRRSV tipo 2 (Lunney et al., 2016). Estos genes codifican para las proteínas estructurales, a través de su transcripción en un set de 6 ARNs subgenómicos (sgRNAs, nombrados del 2 al 7, ver figura 2), que luego son traducidos en las proteínas correspondientes (van Marle et al., 1999). El primero, sgRNA 2 codifica para las proteínas GP2, y E; GP3 es codificada por sgRNA 3; sgRNA 4 codifica para GP4 (Das et al., 2011; Wissink et al., 2005); sgRNA 5 codifica para GP5 y ORF5a (Kappes & Faaberg, 2015). GP5 es la proteína más variable del virus, compartiendo solo un 51-55% de identidad entre las dos especies de PRRSV (Murtaugh, Elam & Kakach, 1995; Kapur, Elam, Pawlovich & Murtaugh, 1996). La proteína estructural M es codificada por el sgRNA 6 y por último, la proteína de nucleocápside N, es codificada por sgRNA 7 (figura 2) (Kappes & Faaberg, 2015).

Inmediatamente luego de la región ORF7 (a partir de la cual se genera sgRNA 7), se encuentra la región 3' UTR, seguida de la cola poli A (Kapur, Elam, Pawlovich and Murtaugh, 1996; Kappes & Faaberg, 2015) (figura 2).

La visualización de PRRSV mediante crio-electromicroscopía (crío-EM, figura 3) revela que los viriones son partículas envueltas, pleomórficas, de entre 50 a 74 nm de diámetro, (Dokland, 2010). La envoltura viral es claramente visible, y se discierne su superficie lisa, con leves perturbaciones consistentes con los ectodominios de las proteínas más abundantes de la envoltura, M y GP5 (Dokland, 2010). Por dentro de la envoltura se puede visualizar el core o nucleocápside viral, y su considerable separación con la

envoltura. El tamaño y forma del core imita el de la envoltura, y por ende, es variable y asimétrico (Dokland, 2010).

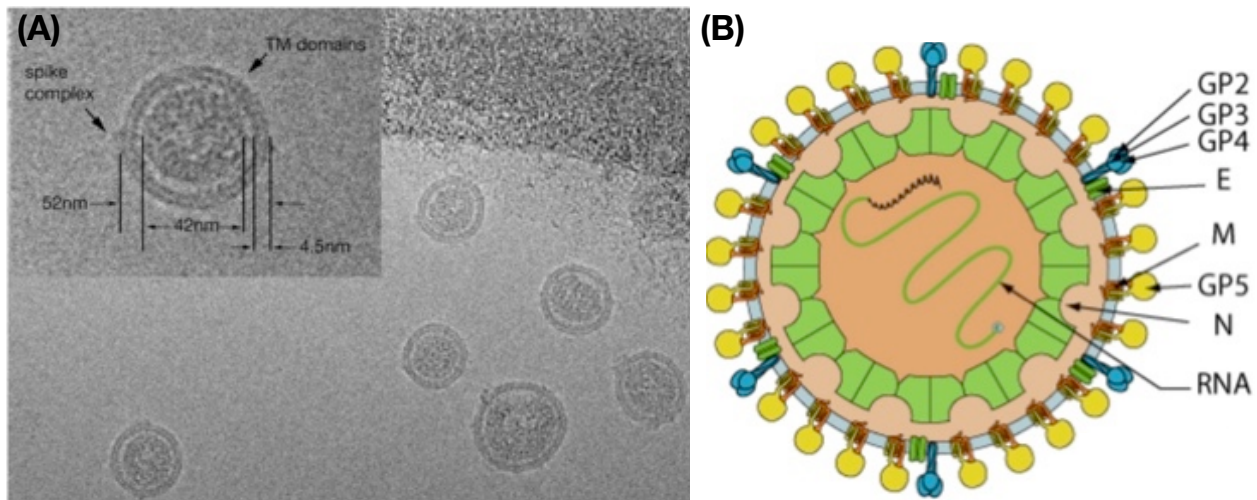


**Figura 2. Genoma de PRRSV, transcripción y traducción.** En los primeros ORFs (1a y b), se muestran los RFS con un círculo amarillo, y los productos proteicos debajo. Luego se muestran todos los otros ORFs, con sus regiones solapantes, sus ARNs subgenómicos intermedios por debajo, y sus respectivos productos proteicos. Imagen extraída de Kappes & Faaberg, 2015

La proteína M es la proteína de envoltura más conservada del virus, mientras que la proteína glicosilada GP5, es la más variable (Dokland, 2010). El rol principal de ambas proteínas probablemente sea estructural (por ejemplo, en imponer curvatura a la membrana viral durante el brotamiento). Sin embargo, estudios sugieren que GP5 podría también estar involucrada en el contacto inicial con la célula (Xia et al., 2009), y en la fusión de membranas con esta (Wissink et al., 2003, 2004, 2005 ; Dokland, 2010). Se presume que GP5 interactúa con el receptor celular de sialoadhesina para la entrada a células PAM (Delputte & Nauwynck, 2004). En cuanto a M, se ha observado que es una proteína de unión a heparina, y dado que heparán sulfato también es un receptor de PRRSV en PAM, se sugiere que M puede tener un rol potencial como ligando viral para heparán sulfato (Vanderheijden et al., 2003; Delputte & Nauwynck, 2004). GP5 y M forman heterodímeros que se ha demostrado, son indispensables para la formación de partículas virales y, posteriormente, para la infectividad viral al interactuar con los receptores celulares (Dokland, 2010).

Además de estas proteínas, la envoltura contiene otras proteínas minoritarias: GP2, GP3, GP4, todas ellas glicoproteínas, y la proteína E (no glicosilada) (Wu et al., 2001, 2005). GP2, GP3, y GP4 son incorporadas como complejos multiméricos a la envoltura, y al menos en PRRSV-1, se ha observado que E también forma parte de este complejo (Das et al., 2011; Wissink et al., 2005). Se ha encontrado que GP2 y GP4 funcionan como los receptores virales que contactan al receptor celular durante el ciclo replicativo (Das et al., 2011; Lunney et al., 2016). Además, se cree que E, también llamada 2b, forma un canal iónico oligomérico (Lee & Yoo, 2006), y se postula que podría estar involucrada en el

proceso de fusión viral y/o internalización (Dokland, 2010). Hay una última proteína estructural no glicosilada, ORF5a, que se ha encontrado crucial para la viabilidad viral, y es incorporada a la envoltura como un complejo multimérico, pero aún se sabe muy poco acerca de su función (Lunney et al., 2016).



**Figura 3. Estructura del virión de PRRSV.** (A) Crío-EM de varias partículas virales, donde a su vez se muestra una partícula viral típica, con dimensiones pertinentes indicadas. Figura extraída y adaptada de Dokland, 2010. (B) Esquema de la partícula viral, en el que se muestran las proteínas estructurales de la envoltura, por dentro, la nucleocápside, formada por la proteína N, que protege al genoma viral. Figura extraída y adaptada de Philippe Le Mercier, 2020.

Por dentro de la envoltura se encuentra la proteína N, que interactúa con el ARN para formar la nucleocápside del virus. Esta es la proteína viral más producida en células infectadas (Meulenberg et al., 1995; Dea et al., 2000), y es la más inmunogénica, pero como se mencionó anteriormente, los anticuerpos anti-N no son neutralizantes ni protectores.

La proteína N se divide en un dominio N-terminal de unión al ARN, y un dominio C-terminal de dimerización. Se encontró que esta proteína es incorporada a los viriones como dímeros unidos por puentes disulfuro en la región N-terminal (Mardassi, Massie & Dea, 1996; Wootton & Yoo, 2003), y no covalentemente en la región C-terminal (Dokland, 2010). Previamente se creía que la morfología de la nucleocápside era icosaédrica, pero varios estudios han demostrado que esto no es así, sino que la morfología se asemeja a una estructura helicoidal desorganizada (Dokland, 2010).

Como muchos virus ARN envueltos, PRRSV es considerado relativamente lábil en el ambiente, y es fácilmente inactivado mediante calor y sequía. En cuanto a la estabilidad térmica, puede resistir hasta 30 minutos a 56 °C, 3 horas a 2 días a 37 °C, y aproximadamente una semana en el rango de 4-21 °C (Bloemraad et al., 1994). En cuanto al pH, el virus pierde infectividad a un pH menor a 6 y mayor a 7,5. Pueden utilizarse diversos compuestos para lograr la completa inactivación del virus: yodo (0.0075%; 1 minuto), amonio cuaternario (0.0063%; 1 minuto) o hipoclorito de sodio (0.03%, 10 minutos). Además, es completamente inactivado por luz UV en 10 minutos (lo que puede ser útil en superficies y materiales en granjas) (Bloemraad et al., 1994; PRRS virus characteristics | PRRS Control, 2020). Este tipo de información es importante no solo para prevenir la dispersión de la enfermedad, sino también para el correcto almacenamiento de las muestras para análisis en un laboratorio.

## 5. CICLO REPLICATIVO

### 5.1 ADSORCIÓN Y PENETRACIÓN

El primer paso en el ciclo replicativo de PRRSV en macrófagos alveolares, parece ser la unión de baja afinidad del virus a heparán sulfato, aparentemente, mediante el complejo M-GP5 (Delputte, Vanderheijden, Nauwynck, & Paensaert, 2002; Delputte, Costers & Nauwynck, 2005; Dokland, 2010). Este paso no es absolutamente necesario para la infección, pero puede tener un rol importante en concentrar al virus en la superficie celular para la subsecuente unión de alta afinidad con el receptor celular por parte de las proteínas estructurales minoritarias (Dokland, 2010).

El inicio de una infección productiva, requiere del receptor celular CD163 de macrófagos alveolares porcinos. Durante la entrada de PRRSV a una célula hospedera susceptible, CD163 interactúa con las proteínas minoritarias de la envoltura, GP2 y GP4, y esta interacción desencadena la adsorción (Das et al., 2011).

Además de CD163, se han identificado varios receptores superficiales importantes para la unión e internalización de PRRSV, como heparán sulfato (HS), sialoadhesina (CD169), CD163, CD151 y vimentina. Estos receptores tienen roles significativos en distintas etapas del ciclo replicativo (figura 4) como la unión, internalización o desnudamiento (Shi et al., 2015). Sin embargo, se ha demostrado que solo CD163 es indispensable para la infección con PRRSV, tanto *in vivo* como *in vitro* (Nan et al., 2017). Acorde con esto, la expresión de CD163 en distintos tipos celulares, hace a estas células susceptibles a una infección por PRRSV (Calvert et al., 2007; Nan et al., 2017).

Además de todos estos receptores, la infección productiva también depende de proteasas que residen en el endosoma, incluyendo la cathepsina E, y una serín proteasa no identificada (Misinzo, Delputte & Nauwynck, 2008). El rol de estas proteasas probablemente sea clivar y liberar el péptido de fusión de las proteínas de envoltura, para iniciar la fusión de membranas (figura 4) (Misinzo, Delputte & Nauwynck, 2008; Dokland, 2010; Lunney et al., 2016).

### 5.2 TRADUCCIÓN, TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN

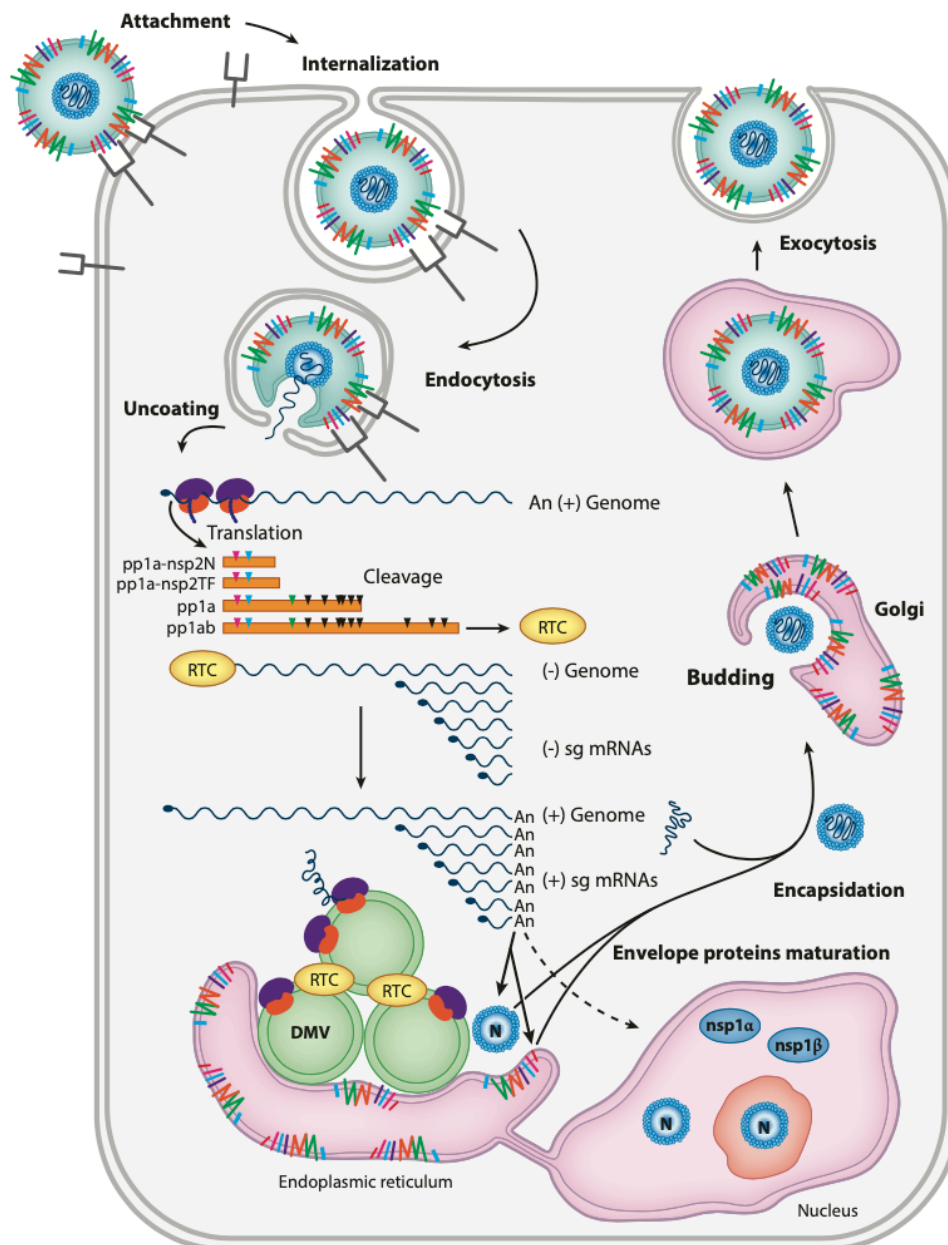
Estas etapas del ciclo replicativo de PRRSV se pueden resumir en cuatro eventos clave: rearreglo de las membranas del hospedero para formar complejos replicativos, traducción de las proteínas no estructurales, síntesis y expresión de ARN genómico y síntesis de ARNs subgenómicos para dar lugar a las proteínas estructurales (figura 4).

Se presume que todo el ciclo viral de la familia *Arteriviridae* es enteramente citoplasmático (ver figura 4), a pesar de que al menos dos proteínas virales tienen señales de localización nuclear (Lunney et al., 2016).

El primer paso luego del desnudamiento, es la traducción del genoma viral en dos grandes poliproteínas replicasas ya vistas: pp1a y pp1ab, que contienen todas las funciones requeridas para la síntesis de ARN viral (Molenkamp, van Tol & Rozier, 2000).

A pesar de la gran extensión de la región 5' UTR, se presume que la traducción procede por el proceso de escaneo convencional que realiza el ribosoma, y la traducción es cap dependiente. Los productos de ORF1, pp1a y pp1ab (figura 2), son procesados en al menos 16 proteínas (figura 3) no estructurales (nsp) (Snijder, Kikkert & Fang, 2013; Kappes & Faaberg, 2015; Lunney et al., 2016), por proteasas virales (que se autoclivan de la poliproteína). Dentro de estas proteínas procesadas, se encuentran las enzimas clave para la síntesis de ARN, como la ARN polimerasa ARN dependiente viral (RdRp o nsp9), y la ARN helicasa (nsp10). En conjunto con otras unidades accesorias, estas dos

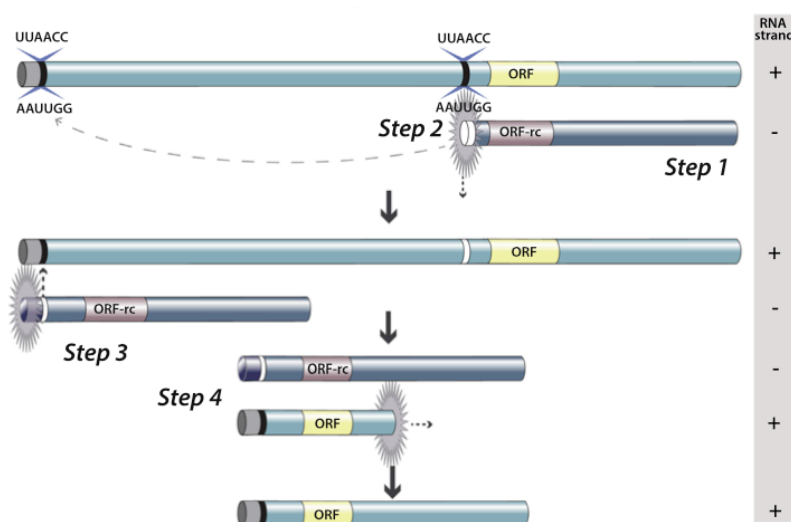
enzimas se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción viral asociado a membranas (RTC, ver figura 4) (Pedersen, van der Meer, Roos & Snijder, 1999; Fang et al., 2012), que media tanto la replicación viral, como la síntesis del conjunto de ARNs mensajeros subgenómicos, que van a dar lugar, luego de su traducción, a las proteínas estructurales.



**Figura 4. Ciclo replicativo de PRRSV.** Luego de la entrada por endocitosis mediada por receptor, y posterior desnudamiento, se da la traducción del genoma viral, que da lugar a las poliproteínas de replicación, que son clivadas por proteasas virales para dar lugar a al menos 16 proteínas no estructurales que luego son ensambladas en un complejo de replicación y transcripción. Este complejo, primero procede primero a la generación de un intermediario de ARN de polaridad negativa, para luego sintetizar el ARN genómico de polaridad positiva, y ARNs subgenómicos. Los ARN genómicos generados se empaquetan en nucleocápsides, que adquieren su envoltura por brotamiento a través de membranas intracelulares del aparato de Golgi. Los viriones generados son liberados de la célula mediante la vía de exocitosis. Imagen extraída de Lunney et al., 2016.

Se especula que los complejos membranosos que se encuentran asociados a los RTCs, son vesículas perinucleares de doble membrana (DMVs, ver figura 4), que se forman gracias a la acción de ciertas proteínas virales, codificadas en las poliproteínas no estructurales mencionadas anteriormente (Pedersen, van der Meer, Roos & Snijder, 1999; Fang et al., 2012).

Los pasos de transcripción y replicación se encuentran acoplados por la generación de un intermediario común. Tanto la replicación como la transcripción comienzan con la síntesis de la hebra complementaria al ARN genómico (o sea, de polaridad negativa, ver figura 5), por la RdRp. A partir de este punto, la hebra negativa puede ser utilizada para sintetizar su complementaria positiva, y dar lugar a nuevo ARN genómico (proceso de replicación), o puede ser utilizada como molde para la generación de los 6 sgRNAs que darán lugar a las proteínas estructurales una vez traducidos (Lunney et al., 2016; Kappes & Faaberg, 2015).



**Figura 5. Pasos para la generación de ARNs subgenómicos.** La síntesis inicia con la generación de una hebra negativa de ARN a partir del genoma viral. La interacción de la ARN polimerasa (representada con un disco) con TRS puede resultar en que se siga la síntesis de la hebra negativa, o en el caso de la síntesis de ARNs subgenómicos (Step 2), o disociación y reasociación (Step 3) en el TRS líder en 5', seguido de finalización de la síntesis del sgRNAs. Estos ARNs subgenómicos de polaridad negativa sirven como molde de síntesis de los de polaridad positiva (Step 4), necesarios para la traducción de las proteínas estructurales. Imagen extraída y adaptada de Kappes & Faaberg, 2015.

La transcripción de los sgRNAs es realizada por la RdRp en un proceso altamente ordenado, que acaba en un conjunto de ARNs que contienen en sus extremos tanto la región 5' UTR como la 3' UTR (incluida la cola poliA), y uno o más ORFs, pero no todo el genoma, hay un salto de varias regiones del genoma (y cabe aclarar que estos ARNs subgenómicos anidados nunca contienen la región de la ORF1a/b, ver figura 5) (Kappes & Faaberg, 2015). Esta transcripción discontinua procede a través de una fusión replicativa del 5' UTR del genoma viral a sitios corriente abajo hacia 3', mediante interacciones ARN-ARN de largo rango durante la síntesis de la hebra negativa (van Marle et al., 1999; Kappes & Faaberg, 2015). Específicamente, existe una secuencia regulatoria

transcripcional (TRS, por sus siglas en inglés) en o cerca del 5' de cada uno de los ORFs (del ORF2-7), que puede formar una interacción con una secuencia TRS conservada, ubicada en el extremo 3' del 5' UTR (UUAACC, ver Figura 5). La síntesis de los ARNs subgenómicos, entonces, comienza con la replicación de la hebra negativa del genoma viral, desde el extremo 3', y prosigue hasta que se encuentra una secuencia reguladora transcripcional (TRS) que actúa como señal que detiene la transcripción de la hebra negativa (Pasternak, Spaan & Snijder, 2004; Kappes & Faaberg, 2015) y en este punto pueden darse dos cosas: puede seguir la transcripción del resto del genoma, o se puede dar una disociación de la maquinaria replicativa, y reasociación en el 5' UTR del genoma viral (mediante interacción con otro TRS dentro de esta región). Si ocurre esto último, el resultado va a ser uno de los seis posibles ARNs subgenómicos (dependiendo de que TRS interno es utilizado, ver figuras 3 y 5) (van Marle et al., 1999; Pasternak, 2001; Pasternak, van den Born, Spaan & Snijder, 2003). Luego de formados los sgRNAs, serán traducidos en las proteínas estructurales del virus por la maquinaria celular.

Hasta hoy, no se sabe exactamente cómo la ARN polimerasa de PRRSV inicia la replicación, es decir, si realiza una síntesis de novo del ARN genómico o si utiliza un cebador (Kappes & Faaberg, 2015). Estudios en otros miembros de la familia *Arteriviridae* (en particular en EAV), sugieren que la RdRp de esta familia es catalíticamente activa sin necesidad de otros factores virales, y capaz de realizar síntesis de novo, aunque puede requerir de co factores virales o celulares para una replicación o transcripción eficiente. Sin embargo, no se ha logrado una investigación similar en PRRSV hasta la fecha (Beerens et al., 2007; Kappes & Faaberg, 2015). También se ha observado que ciertas estructuras secundarias dentro del genoma de PRRSV serían importantes reguladores tanto de la replicación como de la transcripción, como ocurre en muchos virus ARN (Beerens & Snijder et al., 2007).

### 5.3 FINAL DEL CICLO VIRAL

Al final del ciclo replicativo de PRRSV los ARN genómicos generados a partir del intermediario de polaridad negativa se empaquetan en nucleocápsides, que adquieren su envoltura por brotamiento a través de membranas del aparato de Golgi. Los viriones generados son liberados de la célula mediante la vía de exocitosis (es decir, egresan por brotamiento, no por lisis celular, ver figura 4) (Lunney et al., 2016).

## 6. PRRSV EN URUGUAY Y SUDAMÉRICA

En Sudamérica, los datos sobre la circulación del virus aún son escasos. Se han reportado casos de PRRSV en Bolivia, Chile, Colombia, Perú, Venezuela y Ecuador (OIE, 2020) como se muestra en la figura 6. Ni Brasil ni Argentina, que comparten fronteras con Uruguay, han reportado la presencia del virus (figura 6). En Chile, se reportó la presencia de PRRSV-2 en 1999, y luego de grandes esfuerzos, el país declaró la completa erradicación de la enfermedad. Sin embargo, en 2013 se detectó una nueva introducción de PRRSV-2 en el país (Neira et al., 2017). En Uruguay, el primer estudio realizado en el tema fue en el año 2000, y consistió en un estudio serológico que no reveló la circulación del virus en el país. Luego de esto, no hubo más información acerca del estado de la enfermedad en el país hasta una investigación en 2018 (Ramos et al., 2018), que reveló la presencia de anticuerpos anti-PRRSV, y la presencia del virus (mediante detección molecular y aislamiento en cultivo celular) en criaderos uruguayos, en distintos puntos geográficos del país. El estudio fue realizado con 23 muestras del período de 2010-2014 y 524 del período de 2014-2016 (Ramos et al., 2018). Hasta ese momento, no se había

reportado su circulación, y por ende, no existía un programa de vacunación activo para la enfermedad. Los resultados de ese trabajo suponen el primer reporte de la circulación de PRRSV-2 en Uruguay, y muestran no solo la amplia distribución geográfica del virus en el país hasta el 2016, sino que también sugieren que los cerdos en Uruguay han estado expuestos al agente infeccioso al menos desde 2011 (Ramos et al., 2018). Dado que ninguno de los países vecinos ha reportado brotes de PRRSV, estos resultados son aún más sorprendentes y han generado un cambio en el estatus sanitario del Uruguay respecto al virus ante la OIE. A partir de este reporte, se ha hecho legal la vacunación en país (con la vacuna inactivada) únicamente en caso de que la granja declare y confirme la circulación del virus (comunicación personal DMV Gustavo Castro).

En cuanto a la circulación de PRRSV en jabalí, se han encontrado anticuerpos para el virus en Estados Unidos y varios países de Europa, y ARN viral en Italia, Alemania, Lituania, y Eslovaquia (Vilcek, Molnar, Vlasakova & Jackova, 2015). Sin embargo, los datos de la circulación en esta especie son escasos a nivel mundial, y aún no se ha publicado ningún estudio en todo Sudamérica, lo que es sorprendente, ya que el jabalí actúa como reservorio del virus, y puede ser un importante vector de contagio a cerdos domésticos (Vilcek, Molnar, Vlasakova & Jackova, 2015). Además, al ser salvajes, estos animales pueden traspasar las fronteras, e introducir el virus en países libres de la enfermedad. En Uruguay, el jabalí se ha declarado plaga nacional (Ramos et al., 2017), y por ende, la probabilidad de interacción con cerdos domésticos aumenta, lo que puede implicar una importante fuente de infección si el virus se encuentra circulando en esta especie salvaje.



**Figura 6. Distribución de PRRS en América en 2019.**

Se muestra el estatus de la enfermedad teniendo en cuenta cerdos domésticos como salvajes, con código de colores indicado en la leyenda. Imagen extraída y adaptada de OIE World Animal Health Information System, 2020.



# OBJETIVOS

---

## General

Realizar un estudio serológico y molecular de la circulación de PRRSV en Uruguay desde 2017 a 2019.

## Específicos

- Evaluar la presencia de anticuerpos anti-PRRSV mediante ensayos serológicos de ELISA, utilizando el kit comercial de referencia.
- Detectar PRRSV a nivel molecular en muestras actuales provenientes de distintos puntos del país, a partir de casos con sintomatología sospechosa.
- Poner a punto un sistema de caracterización molecular que permita estudiar la variabilidad genética y realizar estudios filogenéticos de las cepas uruguayas.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras para la realización de este trabajo fueron provistas por veterinarios de distintos criaderos de cerdos del país, seleccionadas por ellos en base a casos clínicos sospechosos. Una vez recibidas las muestras, tanto de suero como de órgano, fueron guardadas a -80 °C hasta su procesamiento.

## 2. DETECCIÓN SEROLÓGICA DE EXPOSICIÓN A PRRSV (ELISA)

La detección de anticuerpos anti-PRRSV de 192 muestras de suero, 111 de cerdo doméstico con sintomatología compatible con PRRSV y 81 de jabalí, se hizo mediante ELISA (proviene del inglés "enzyme-linked immunosorbent assay"). De las 111 muestras de cerdo doméstico, 67 eran muestras de archivo del período de 2010-2016, y 44 del período de 2017-2019. Para el ensayo se utilizó el kit comercial IDEXX PRRS X3 Ab Test, por ser considerado el estándar a nivel mundial para PRRS (Biernacka, Podgórska, Tyszka & Stadejek, 2018) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el kit contiene una placa tapizada con un antígeno de PRRSV, a la cual se le añade una dilución 1/40 de la muestra, y los controles provistos en el kit (tanto negativo como positivo). La placa con el líquido añadido se incubaba durante 30 minutos para permitir la unión de anticuerpos anti-PRRSV al antígeno, luego se remueve el líquido de cada pocillo, y se lava la placa de 3 a 5 veces con una solución de lavado. Al terminar los lavados, se debe eliminar cualquier residuo de la solución de lavado, y una vez la placa esté seca, se adiciona el conjugado en cada pocillo (este se unirá a cualquier anticuerpo de cerdo fijado a los pocillos), y se incubaba por 30 minutos. Pasados los 30 minutos se realizan otros 3 a 5 lavados para eliminar el conjugado que no se unió, y luego se agrega un sustrato, que reaccionará con la peroxidasa de rábano acoplada al conjugado, dando como resultado una reacción colorimétrica, cuya absorbancia puede medirse con un espectrofotómetro. Luego de 15 minutos de incubación con el sustrato, se coloca una solución de frenado en la placa, y se procede a la medición de la absorbancia. El resultado del ensayo fue visualizado utilizando un espectrofotómetro (ThermoFisher Scientific), con un filtro de 620 nm. A partir de las absorbancias obtenidas con el aparato, se realizaron los cálculos de validación de los controles, y posteriormente los cálculos para interpretar los resultados de las muestras, siguiendo las fórmulas provistas por el kit (ver Cálculos).

### Cálculos

#### **Promedios controles:**

$$\text{Control negativo (CN)} = \frac{A_{620} \text{ CN1} + A_{620} \text{ CN2}}{2}$$

$$\text{Control positivo (CP)} = \frac{A_{620} \text{ CP1} + A_{620} \text{ CP2}}{2}$$

Criterio de validación del ensayo

$$\text{CP} - \text{CN} \geq 0.150$$

$$\text{CN} \leq 0.150$$

## Muestras:

$$\text{Cociente muestra/positivo (M/P)} = \frac{\text{M(A620)} - \text{CN}}{\text{CP} - \text{CN}}$$

Interpretación →

M/P < 0.40	Negativo
M/P ≥ 0.40	Positivo

### 3. DETECCIÓN MOLECULAR DE PRRSV

#### 3.1.1 Extracción de ARN con Trizol®

Se utilizó el método de Trizol® (ThermoFisher Scientific) para la extracción de ARN de muestras de órgano. Primero se cortó el órgano (seleccionado secciones de tamaño moderado de varias partes) mediante la utilización de un bisturí hasta obtener una pasta disgregada, y se depositó en un nuevo tubo estéril. Este tubo se sometió a ciclos de congelado y descongelado en nitrógeno líquido para liberar los virus de las células, y se homogeneizó en 150 µl de PBS 1X (siguiendo una relación 10% m/v) por vortex. El homogeneizado se centrifugó a 13400 revoluciones por minuto (rpm), durante 15 minutos a 4 °C, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo estéril. A este se le agregaron 850 µl de Trizol®, y se homogeneizó mediante vortex durante 15 segundos. Luego se agregó cloroformo (0.2 mL de cloroformo por mL de Trizol®), y se centrifugó a 13400 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo estéril libre de nucleasas, teniendo la precaución de no tocar la interfase, se le agregó isopropanol (0.5 mL por mL de Trizol®), se dejó reposar por 10 minutos, y luego se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos. Se descartó el alcohol (sobrenadante) de esta centrifugación, se lavó con etanol 70%, se dejó secar el pellet en estufa a 37 °C hasta que se volvió claro, casi transparente, y por último, se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas.

#### 3.1.2 Extracción de ARN con kit comercial (Zymo Research)

Para las extracciones de ARN con kit comercial, tanto de aislamientos en cultivo como de suero, se utilizó el kit Quick-DNA/RNA Pathogen Miniprep (Zymo Research), basado en columnas de afinidad para la extracción. En primer lugar, las muestras fueron centrifugadas a 16000 x g durante 5 minutos, y se colectaron 200 µl del sobrenadante en un nuevo tubo para comenzar la extracción (volumen máximo de muestra que admite el kit). A estos 200 µl de muestra se les agregó 2 µl de proteinasa K, luego 400 µl de Buffer Pathogen DNA/RNA y se transfirió todo el contenido a una columna de extracción. Luego de este paso, se siguieron las instrucciones del fabricante para los pasos de lavado y elución del ARN, que fue realizada en 50 µl de agua libre de nucleasas.

### 3.2 RT-NESTED-PCR

A partir del ARN extraído se procedió a la amplificación de un fragmento de la región ORF7 (región conservada del genoma viral). Para esta finalidad se utilizaron cebadores específicos para esta región, diseñados por Shin et al., 1997 y denominados PIRSEF-PIRSER y PIRSIF-PIRSIR (tabla 1).

#### 3.2.1 Retrotranscripción (RT)

Para la RT se utilizó en un principio la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific), y posteriormente se cambió a la enzima SuperScript™ II

Reverse Transcriptase (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific), debido a su mayor procesividad y menor tasa de error.

El protocolo para M-MLV consistió en la incubación de 5 µl de ARN con 2 µl del cebador reverso específico PIRSER (tabla 1) a una concentración de 10 µM y 3 µl de agua, a 70 °C durante 5 minutos, luego de los cuales se mantuvo la mezcla en hielo. En un volumen final de 10 µl se agregaron 4 µl de buffer de reacción 5X, 1 µl de dNTP's 10 mM, 1 µl de M-MLV (200 U/µl) y 3 µl de agua. Estos se adicionaron a la mezcla inicial conteniendo el ARN y se procedió a la incubación a 42 °C durante 60 minutos, y luego a 70 °C durante 15 minutos. El ADN copia (ADNc) resultante de esta reacción fue guardado a -20 °C hasta su utilización.

El protocolo para SuperScript™ II comenzó con la incubación de 5 µl de ARN con 2 µl del primer reverso específico PIRSER (tabla 1) a una concentración de 10 µM, 1 µl de dNTP's 10 mM y 4 µl de agua, a 68 °C durante 5 minutos, luego de los cuales se mantuvo la mezcla en hielo. En un volumen final de 8 µl se agregaron 4 µl de Buffer SuperScript 5X, 2 µl de DTT 0.1M, 1 µl de SuperScript™ II (200 U/µl) y 1 µl de agua, y se adicionaron a la mezcla inicial conteniendo el ARN. Luego se procedió a la incubación de la mezcla resultante a 42 °C durante 60 minutos, y posteriormente a 70 °C 15 minutos. El ADNc resultante de esta reacción fue guardado a -20 °C hasta su utilización.

### 3.2.2 *Nested-PCR*

A partir del ADNc resultante de la retrotranscripción, se procedió a la amplificación del fragmento de interés mediante *nested-PCR* (reacción en cadena de la polimerasa, anidada).

Para esta finalidad, se utilizó en un principio la enzima Taq™ DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences). La primera reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, en el que se agregó: 8 µl de ADNc (cuantificándolo previamente mediante Nanodrop, ThermoFisher Scientific), 2.5 µl de buffer de reacción 10X, 2.0 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µl de dNTP's 10 mM, 0.75 µl de cada cebador (PIRSEF y PIRSER 10 µM), 0.15 µl de la enzima Taq™ DNA Polymerase (5U/µl), y 10.35 µl de agua. Luego de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 10 minutos, la mezcla de reacción fue sometida a 40 ciclos de 94 °C for 30 segundos, 50 °C por 35 segundos, y 72 °C por 35 segundos, seguidos de un paso final de extensión de 10 minutos a 72 °C. La segunda reacción de PCR se realizó también en un volumen final de 25 µl, con las mismas proporciones y enzima que en la primera ronda, pero utilizando los cebadores internos PIRSIF y PIRSIR 10 µM. En este caso se utilizó 1 µl del ADNc generado de la primera reacción de PCR, por lo que se ajustó el agua a 17.35 µl. Luego de someter la mezcla de reacción a un paso de desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos, se realizaron 30 ciclos el mismo ciclado que en la primera ronda de PCR, seguidos de un paso de extensión a 72 °C por 10 minutos.

Posteriormente se cambió a la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific). La primera reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, en el que se agregó 2 µl de ADNc (también cuantificándolo previamente), 2.5 µl de buffer de reacción 10X, 1.0 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µl de dNTP's 10 mM, 0.75 µl de PIRSEF y PIRSER 10 µM, 0.15 µl de la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase (5 U/µl), y 17.35 µl de agua. Luego de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, la mezcla de reacción fue sometida a 35 ciclos de 94 °C for 30 segundos, 50 °C por 35 segundos, y 72 °C por 35 segundos. La segunda reacción de PCR se realizó también en

un volumen final de 25  $\mu$ l, con las mismas proporciones y enzima que en la primera ronda, pero utilizando los cebadores internos PIRSIF y PIRSIR 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ l del ADN generado de la primera reacción de PCR, por lo que se ajustó el agua a 18.35  $\mu$ l. Luego de someter la mezcla de reacción a un paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, se realizaron 30 ciclos el mismo ciclado que en la primera ronda de PCR.

Los productos de PCR de ambas rondas fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, 1.5 %, utilizando el intercalante comercial SYBR™ Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific), y luz UV para la visualización. Para identificar el tamaño de banda se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™.

#### **4. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

Una vez obtenidos los fragmentos de tamaño esperado, fueron enviados para purificar y secuenciar a la empresa Macrogen Corea. Una vez obtenidas las secuencias fueron analizadas con la herramienta de alineamiento BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en National Center for Biotechnology Information (NCBI) para determinar su identidad.

##### **4.1 Análisis Filogenético**

El análisis filogenético se realizó sobre las secuencias obtenidas (por el método de secuenciación Sanger) de Macrogen Corea para el fragmento de 208 pb de la ORF7 viral amplificado en la detección molecular. Lo primero que se hizo fue analizar la calidad de las secuencias obtenidas mediante el análisis del cromatograma, y eliminar las regiones de mala calidad. Luego se procedió a alinear las secuencias del cebador *forward* y *reverse* utilizando el programa MegaX (Nei et al., 2018) con el alienador *ClustalW*, y posteriormente se generó la secuencia consenso entre ellas. Una vez generadas las secuencias consenso, se realizó un BLAST® de estas, utilizando la base de datos de NCBI para obtener alineamientos de estas secuencias con otras de la ORF7 de PRRSV-2. Se seleccionaron y descargaron 57 alineamientos en base a el país de origen (se buscó tener 5 secuencias de cada país para los cuales había más de 5, e incluir todos los países en la selección). Un desafío que se encontró durante esta selección fue la escasa cantidad de secuencias de la ORF7 provenientes de latinoamérica. De los países latinoamericanos que tenían secuencias, la gran mayoría eran solo de la región ORF5, por lo que se incluyeron todas las que fueron encontradas para la ORF7 en el árbol. A partir de lo 57 alineamientos obtenidos, junto con las secuencias E2019 y P2017 se realizó un árbol filogenético con el software IQ-TREE (Chernomor et al., 2011) utilizando el método de *Maximum Likelihood*, con una prueba de *bootstrap* de 1000 réplicas. Se utilizó una secuencia de PRRSV-1 como grupo externo. El árbol fue visualizado utilizando el software FigTree (Rambaut et al., 2006).

#### **5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PRRSV**

Para la caracterización de PRRSV se buscó la amplificación de un fragmento de la región ORF5 del genoma viral (que codifica para la proteína GP5 y permite distinguir genotipos y subtipos). Se utilizó para la puesta a punto, dos muestras positivas detectadas en el trabajo de Ramos et al., 2018, y una nueva muestra positiva de órgano del año 2017 detectada durante este trabajo.

## 5.1 Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se utilizó el software DNASTAR®, utilizando como referencia la cepa de PRRSV-2, VR2385, por ser una de las más similares a nivel de la ORF7 a la cepa uruguaya. Brevemente, primero se realizó un alineamiento de varias secuencias de PRRSV-2 junto con la cepa elegida, para buscar las regiones más conservadas de la ORF5 viral. Luego de identificadas estas regiones, se buscó diseñar cebadores que se encontraran en estas, y a la vez permitieran amplificar idealmente toda la región codificante. Una vez identificados los posibles cebadores, se los evaluó en cuanto a contenido de GC, temperaturas de desnaturalización, distribución de GC en los extremos, formación de estructuras secundarias, longitud y formación de dímeros de cebadores, y se eligió el par que cumplió mejor con estas condiciones. También se utilizó la herramienta BLAST®, para evaluar si estos cebadores se unían a secuencias no pertenecientes al virus, o a otras regiones del genoma viral. Los cebadores elegidos se denominaron ORF5IF y ORF5IR (tabla 1).

## 5.2 RT

El protocolo comenzó con la incubación de 5 µl de ARN con 2 µl del cebador reverso específico ORF5ER, PIRSER o ORF5-7R (tabla 1), todos a una concentración de 10 µM (se probaron varias combinaciones de cebadores), 1 µl de dNTP's 10 mM y 4 µl de agua, a 68 °C durante 5 minutos, luego de los cuales se mantuvo la mezcla en hielo. El resto del protocolo es igual que el descrito en la sección 3.2.1, para la enzima SuperScript™ II.

## 5.3 Nested-PCR

A partir del ADNc generado, se probaron variantes del mismo protocolo general para lograr la amplificación de la región de interés, ya que no existía una técnica previamente puesta a punto.

Todos los cebadores utilizados (figura 7) en los distintos protocolos se encontraban a una concentración de 10 µM. La primera ronda de PCR se realizó a partir del ADNc generado en un volumen final de 50 µl, en el cual se agregaron 5 µl de ADNc, 5 µl de buffer de reacción 10X, 1 µl de dNTP's 10 mM, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.2 µl de Platinum™ Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific) y 1 µl de cada cebador y 32.3 µl de agua. Los ciclados fueron variables dependiendo de los juegos de cebadores utilizados. La segunda ronda de PCR también se realizó en un volumen final de 50 µl, y con las mismas proporciones de reactivos, pero utilizando entre 5 y 10 µl del ADN generado en la primera ronda (por lo que se debió ajustar el volumen de agua), y distintos juegos de cebadores dependiendo de los utilizados en la primera ronda (por ende, también distintos ciclados) (tabla 1).

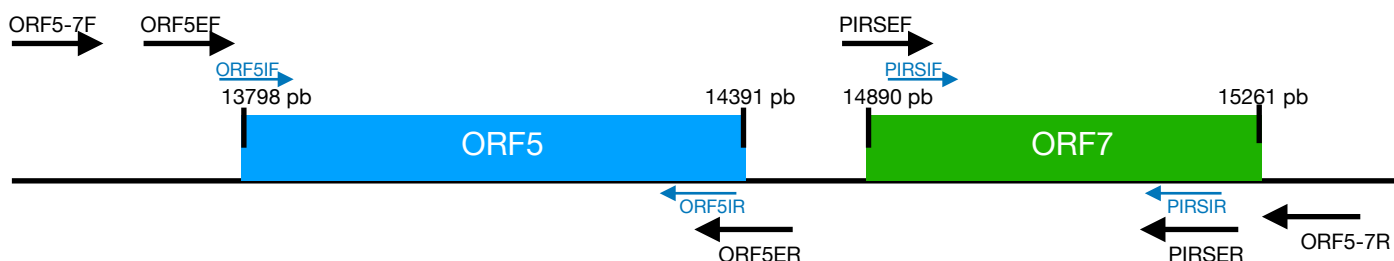
- Protocolo 1: ORF5EF y ORF5ER (tabla 1) para la primera reacción de PCR. La desnaturalización de esta mezcla de reacción se realizó a 94 °C durante 2 minutos, y luego se realizaron 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto 45 segundos. La segunda ronda de PCR a partir de esta reacción se realizó utilizando el juego de primers ORF5IF-ORF5IR (tabla 1) y se sometió a una desnaturalización a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30

segundos, 56 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto. Se espera obtener un fragmento de 800 pb en la primera ronda y de 597 pb en la segunda ronda.

- Protocolo 2: ORF5EF y PIRSER para la primera reacción de PCR. La desnaturalización de esta mezcla de reacción se realizó a 94 °C durante 2 minutos, y luego se realizaron 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto 45 segundos. La segunda ronda de PCR a partir de esta reacción se realizó utilizando el juego de primers ORF5EF-ORF5IR (*semi-nested*) y se sometió a una desnaturalización a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto. Se espera obtener un fragmento de 1517 pb en la primera ronda, y de 667 pb en la segunda ronda.
- Protocolo 3: ORF5-7F y ORF5-7R (tabla 1) para la primera reacción de PCR. La desnaturalización de esta mezcla de reacción se realizó a 94 °C durante 2 minutos, y luego se realizaron 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto 45 segundos. La segunda ronda de PCR a partir de esta reacción se realizó utilizando el juego de primers ORF5EF y PIRSER y se sometió a una desnaturalización a 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto 45 segundos. De la primera ronda se espera obtener una banda de 1726 pb, y de la segunda, una de 1517 pb.
- Protocolo 4: ORF5-7F y PIRSER para la primera reacción de PCR. La desnaturalización de esta mezcla de reacción se realizó a 94 °C durante 2 minutos, y luego se realizaron 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto 45 segundos. La segunda ronda de PCR a partir de esta reacción se realizó utilizando el juego de primers ORF5EF y ORF5ER y se sometió a una desnaturalización a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto 15 segundos. Se esperaba obtener un fragmento de 1634 pb en la primera ronda y uno de 720 pb en la segunda.

**Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección y caracterización.** Tm representa la temperatura de *melting* del cebador, y para determinar la posición del cebador en el genoma (en pares de bases), se utilizó como referencia una cepa de PRRSV-2, disponible en NCBI bajo el número MN642104.1. Para obtener la Tm de los cebadores, se utilizó el programa OligoEvaluator™ de Sigma-Aldrich®.

Cebador	Secuencia	Tm ( C°)	Posición en el genoma (pb)	Referencia
<b>PIRSEF</b>	5' ATGGCCAGCCAGTCAATC 3'	63.9	14933 a 14950	Shin et al., 1997
<b>PIRSER</b>	5' CGGATCAGGCGCACAGTAT 3'	66.2	15218 a 15236	Shin et al., 1997
<b>PIRSIF</b>	5' CCAGTCAATCAGCTGTGCCA 3'	67.6	14941 a 14960	Shin et al., 1997
<b>PIRSIR</b>	5' GCGCCTTGATTAAGGCGGT 3'	69.1	15130 a 15149	Shin et al., 1997
<b>ORF5EF</b>	5'GAGACCATGAGGTGGGCAAC 3'	66.9	13719 a 13738	Goldberg, Hahn, Scherba, & Weigel, 2000
<b>ORF5ER</b>	5' CGCCAARAGCACCTTTTG 3'	55.9	14510 a 14519	Goldberg, Hahn, Scherba, & Weigel, 2000
<b>ORF5IF</b>	5' ATGTTGGGGAARTGCTTGACC 3'	66.9	13789 a 13809	Este trabajo
<b>ORF5IR</b>	5' GACGACCCCATTGTCCGC 3'	70	14371 a 14386	Este trabajo
<b>ORF5-7F</b>	5' TTTGGCAATGTGTCAGGCATCGTG 3'	74.6	13593 a 13616	Martínez-Bautista et al., 2018
<b>ORF5-7R</b>	5' CCATTACCACACATTCTTCC 3'	64.1	15299 a 15319	Martínez-Bautista et al., 2018



**Figura 7. Ilustración de una región del genoma de PRRSV.** Se muestran las regiones codificantes de la ORF7 y ORF5, con las posiciones que ocupan en el genoma, y el sitio donde los juegos de cebadores utilizados para la detección y caracterización se unen. En azul se muestran los cebadores que solo fueron utilizados para la segunda ronda de PCR en cualquiera de los dos casos.



## 6. AISLAMIENTO POR CULTIVO CELULAR DE CEPAS URUGUAYAS

### 6.1 Células

Para la realización de ensayos de infección con PRRSV, se empleó la línea celular MARC-145. Para el crecimiento y propagación de la línea celular se utilizó el medio de cultivo DMEM (Capricorn Scientific), suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico 1X (anti-anti 100X, Gibco™), y se incubaron las células a 37 °C para su crecimiento.

Para el mantenimiento de la línea celular, primero se utilizó 1 mL de tripsina (Gibco™) para despegar las células del soporte, y una vez despegadas se agregó medio de cultivo, se transfirió un número determinado de células a un nuevo soporte con medio DMEM (suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico 1X), y se completó el resto del volumen del soporte con medio. De las células propagadas se guardó un stock en nitrógeno líquido para su posterior utilización.

### 6.2 Virus

Los virus utilizados provienen de aislamientos realizados en el trabajo de Ramos et al., 2018 a partir de una muestra positiva de suero del año 2014, proveniente de un animal de faena del departamento de Salto. A partir de estos aislamientos, se obtuvieron los inóculos para este trabajo a través de ciclos de congelado y descongelado con nitrógeno líquido (para romper las células y liberar los virus). También se buscó aislar una muestra positiva de órgano detectada durante este trabajo (P2017). Para preparar este último inóculo, se realizaron al menos tres ciclos de congelado y descongelado en nitrógeno, se homogeneizó con PBS 1X con una relación 10% m/v, se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para utilizarlo como inóculo.

#### 6.2.1 Infección

Para la infección de las células con PRRSV se utilizó un formato de placa, de 6 o 12 pocillos (dependiendo del ensayo). La preparación de la placa se realizó 24 horas antes de la infección, y consistió en un primer conteo de células (previamente despegadas con tripsina) para decidir el volumen de células a sembrar en cada pocillo (para esto se utilizó un microscopio óptico invertido y una cámara de Neubauer), para asegurar una monocapa confluyente a las 24 horas. Luego de realizar los cálculos, se sembró el volumen determinado de células en cada pocillo, y se suplementó el resto del volumen con medio DMEM (suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico). La placa se incubó a 37 °C hasta la infección (a las 24 horas). Para la infección, primero se removió el medio de cada pocillo, se lavó la monocapa con medio sin suero, y se volvió a remover. Luego se colocó el inóculo (500 µl para la placa de 6 pocillos, y 200 µl para la de 12), y se incubó a 37 °C con agitación cada 10 minutos por una hora. En todos los casos se incluyó un control negativo, en el que en vez de inóculo se agregó medio. Pasada la hora, se adicionó medio DMEM con 5% de suero fetal bovino y antibiótico 1X. En todas las infecciones, la placa se incubó en la estufa entre 3 y 6 días, observando el efecto citopático cada día.

En algunos casos se adicionó 0.8 % de metilcelulosa para lograr un medio semisólido, que permitiera limitar los sitios de replicación viral y permita, en teoría, visualizar focos celulares de mayor tamaño.

### 6.3 Identificación viral

### 6.3.1 Observación de efecto citopático

El efecto citopático de PRRSV se caracteriza por la formación de focos celulares, cúmulos de células infectadas superpuestas que se redondean como resultado de la replicación viral localizada. Para la observación del efecto citopático se utilizó un microscopio óptico invertido, y la observación se realizó a diario durante la infección comparando con el control negativo del ensayo.

### 6.3.2 RT-NESTED-PCR

Para confirmar la presencia del virus en las sucesivas infecciones, se recurrió a la detección molecular por RT-*nested*-PCR. Para esto, se realizó la extracción de ARN de acuerdo a la sección 3.1.2, una posterior retrotranscripción con la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific) siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.2.1 para esta enzima, y *nested*-PCR utilizando la enzima Taq™ DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences), siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.2. El producto obtenido fue enviado a secuenciar para confirmar la presencia de PRRSV.

# RESULTADOS

---

## 1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA PRRSV EN CERDO DOMÉSTICO Y JABALÍ

Se realizaron ensayos de ELISA para 111 muestras de suero de cerdo doméstico, 67 del período de 2010-2016 (muestras de archivo), y 44 del período de 2017-2019. El kit utilizado para estos ensayos fue elegido por ser considerado el estándar a nivel mundial, y presentar el mejor equilibrio entre especificidad y sensibilidad (Biernacka, Podgórska, Tyszka & Stadejek, 2018). Del periodo de 2010-2016 se obtuvieron 14 muestras seropositivas, y del periodo de 2017-2019, dos muestras seropositivas, una del año 2018, y otra del año 2019. Los resultados revelaron que todas las muestras seropositivas provenían de cerdos con sintomatología compatible con PRRSV, o de granjas con problemas reproductivos (tabla 2). Con respecto a las muestras de archivo, se procesaron algunas muestras del trabajo de Ramos et al., 2018, para comparar los resultados obtenidos al realizar los ensayos con diferentes kits, y también nuevas muestras no analizadas previamente. Los resultados revelaron leves diferencias en la seropositividad de las muestras entre ambos trabajos, mostrando el trabajo de Ramos et al., 2018 un mayor porcentaje de seropositividad en las muestras analizadas que este trabajo. Sin embargo, todas las muestras de archivo detectadas como seropositivas en este estudio, también fueron detectadas como seropositivas en el anterior.

En todas las muestras detectadas como positivas, de ambos períodos, se observó que el animal presentaba sintomatología compatible con PRRSV, o la granja presentaba problemas asociados a la circulación del virus. Dentro de la sintomatología observada, se destacaron los problemas reproductivos en cerdas, y el desmedro en lechones (tabla 2). En el último caso analizado, del año 2019, la sintomatología descrita en la granja coincidía perfectamente con el cuadro reproductivo completo asociado a infecciones sintomáticas con PRRSV.

Además, se realizó ELISA de 81 muestras de suero de jabalí recolectadas en el país. En este caso, se eligieron 40 muestras de una misma cacería de control en Artigas del año 2018, y otras 41 muestras al azar provenientes de Salto y Artigas, del período de 2017-2019, todas provistas por la asociación de controladores de jabalí de Artigas. De las 81 muestras analizadas, se encontró una seropositiva, proveniente de una hembra chica de la cacería del 2018 de Artigas.

**Tabla 2. Datos de muestras seropositivas para PRRSV.** Se muestran los datos de año de colección, animal del que se tomó la muestra, sintomatología, ubicación y resultado del ELISA de las muestras seropositivas con el kit comercial IDEXX PRRS X3 Ab Test. Con los mismos colores se identifican muestras provenientes del mismo momento y criadero.

Período de tiempo	Categoría de la muestra y año de colección	Sintomatología del animal o problema de la granja	Departamento	Positivo $\geq$ 0.40 con el kit comercial IDEXX
2010-2016	Madre 23.3.2011	Aborto	Montevideo	1.75
	Lechón 20.10.2011	Problema de aborto y desmedro en la granja	Flores	2.04
	Madre 23.11.2012	Aborto y tuvo momias	Canelones	2.14
	Lechón 28.8.2013	Desmedro y problemas respiratorios	Canelones	2.17
	Lechón 28.8.2013	Desmedro y problemas respiratorios	Canelones	1.34
	Lechón 28.8.2013	Desmedro y problemas respiratorios	Canelones	0.90
	Madre 5.11.2013	Mortalidad de lechones	Durazno	2.6
	Lechón 13.2.2014	Problema de aborto y desmedro en la granja	Canelones	0.69
	Lechón 13.2.2014	Problema de aborto y desmedro en la granja	Canelones	1.40
	Lechón 13.2.2014	Problema de aborto y desmedro en la granja	Canelones	0.40
	Lechón 13.2.2014	Problema de aborto y desmedro en la granja	Canelones	0.93
	Madre 23.3.2014	Aborto	Canelones	1.29
	Madre 23.3.2014	Aborto	Canelones	2.10
	Madre 23.3.2014	Aborto	Canelones	0.44
2017-2019	Madre 2018	Problemas reproductivos en la granja	Canelones	1.42
	Madre 2019	Problemas reproductivos en la granja : momias, bajo número de lechones al nacimiento, abortos, muertes en posdestete	Canelones	0.42

## 2. DETECCIÓN MOLECULAR DE PRRSV

### 2.1 Detección molecular de muestras de suero analizadas por ELISA

De las muestras seropositivas, se eligieron las dos del período de 2017-2019 (identificadas como E2018 y E2019), dos seronegativas del mismo criadero que E2019 pero de finales del año 2019, y la muestra seropositiva de jabalí para investigar la presencia de PRRSV en estas muestras por detección molecular. La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo 3.1.2, y la retrotranscripción con el estipulado para la enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific).

Luego de la retrotranscripción, se cuantificó el ADNc, y se eligió la concentración de partida para la PCR.

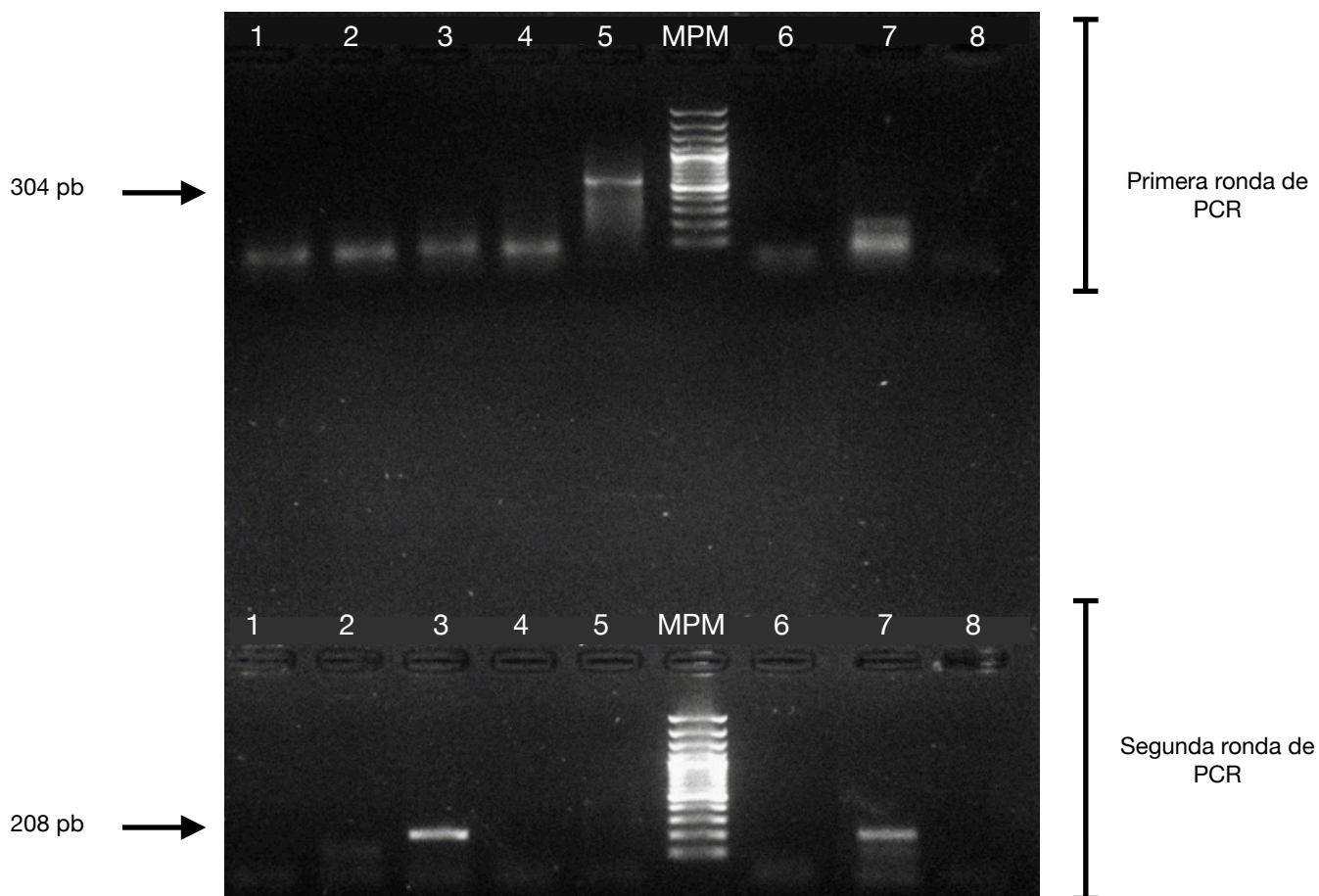
En este ensayo de *nested*-PCR, ninguna muestra amplificó en el primera ronda (ni el control positivo), lo que era de esperarse, ya que esta técnica se utiliza para aumentar la especificidad y sensibilidad de detección. Para descartar contaminaciones entre muestras y con el control positivo, se incluyeron dos controles negativos para este ensayo, y no se observó producto de amplificación en ninguno de ellos. En el control positivo se obtuvo un producto de amplificación del tamaño correcto (208 pb, ver figura 8), como se esperaba en la segunda ronda de PCR, y también hubo amplificación en una muestra seropositiva (figura 8), E2019, que fue enviada a secuenciar para confirmar la presencia del virus. El análisis informático (ver materiales y métodos, sección 4) reveló que la secuencia efectivamente era del fragmento esperado de la ORF7 viral, por lo que se confirmó la presencia del genoma de PRRSV.

La muestra seropositiva de jabalí presentó una banda de un tamaño no esperado en la primera ronda de PCR (se esperaba un fragmento de 304 pb, ver figura 8), que también fue enviada a secuenciar para descartar que se tratase de una secuencia del virus. El análisis informativo de la secuencia obtenida (ver materiales y métodos, sección 4) reveló que la banda observada en la muestra de jabalí resultó ser producto de amplificación inespecífica, y no una región del genoma viral.

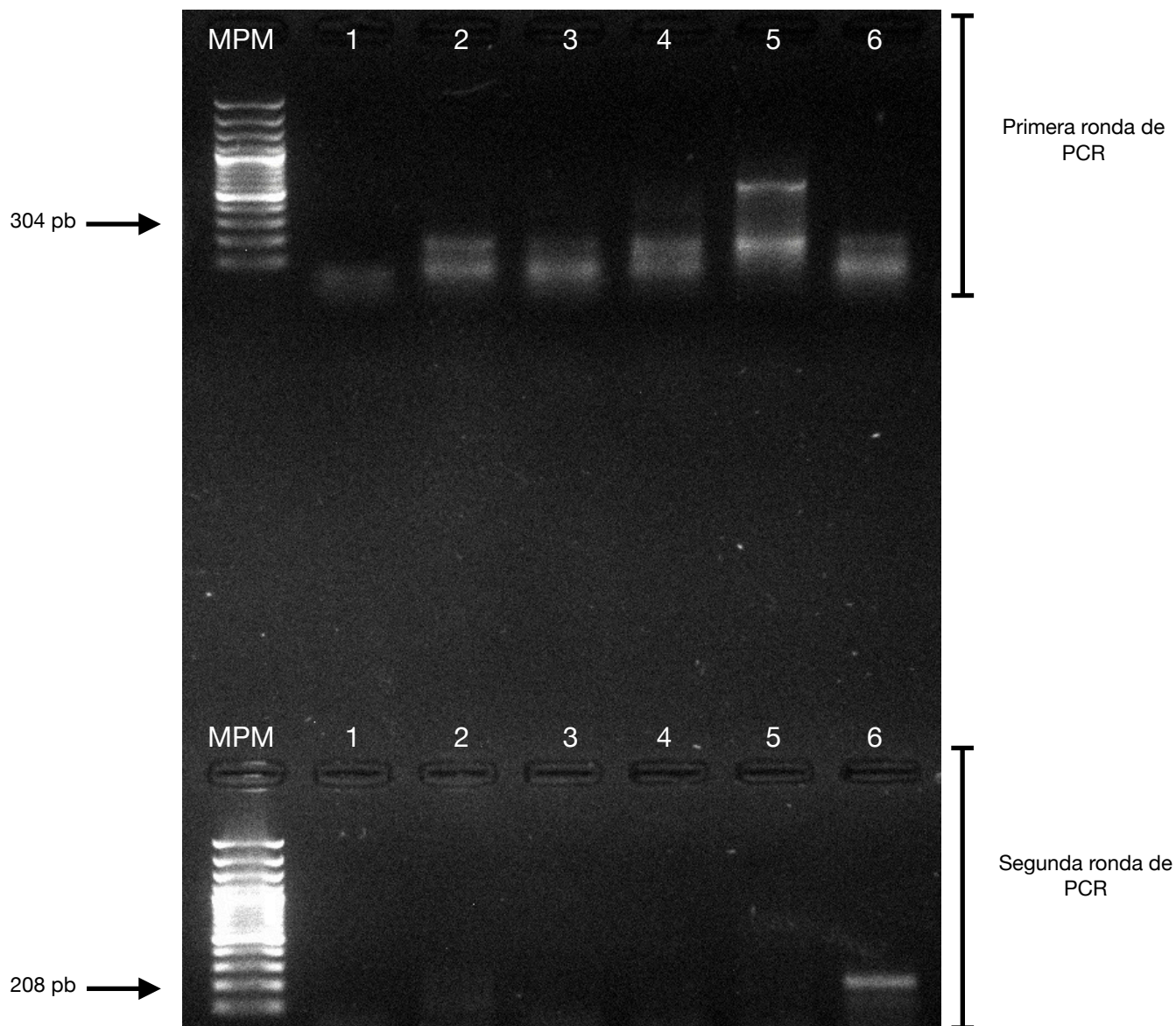
También se investigó la presencia del virus por detección molecular de otras 10 muestras seronegativas por ELISA, del mismo criadero y año que E2019, por presentar la sintomatología compatible con una infección por PRRSV. En el gel de electroforesis, no se observó amplificación del fragmento viral en ninguna de las muestras, por lo que se determinaron negativas para el virus.

## 2.2 Detección molecular de muestras de órgano

Para la detección molecular en muestras de órgano, se analizaron 7 muestras de órgano de cerdos con sintomatología clínica, (también por RT-*nested*-PCR, ver materiales y métodos, sección 3) una del año 2017, y 6 del año 2019. De las muestras analizadas, solo una fue positiva por PCR (figura 9), la muestra del año 2017 (P2017), de pulmón, proveniente de un lechón con problemas respiratorios de un criadero en el departamento de Rocha, que finalmente murió. La banda de tamaño esperado obtenida en la segunda ronda (figura 9) fue enviada a secuenciar, y se confirmó que efectivamente se trataba del fragmento esperado, mediante análisis informático de la secuencia obtenida (ver materiales y métodos, sección 4).



**Figura 8. Detección molecular de PRRSV a partir de muestras analizadas por ELISA.** Amplificación de un fragmento de 304 pb y posterior amplificación de uno de 208 pb de la región ORF7 viral por RT-nested-PCR. En los carriles de arriba se muestra la primera ronda de PCR, y en los de abajo la segunda. En los carriles 1 y 2 se encuentran las muestras seronegativas, en los 3 y 4 se encuentran E2019 y E2018 respectivamente, y en el carril 5 la muestra de jabalí. Los carriles 6 y 8 indican los controles negativos de ambas rondas (se incluyeron 2 en el ensayo), y el carril 7 indica el control positivo. MPM indica el marcador de peso molecular utilizado, marcador GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™). Con las flechas se indica la altura esperada de banda para cada ronda.

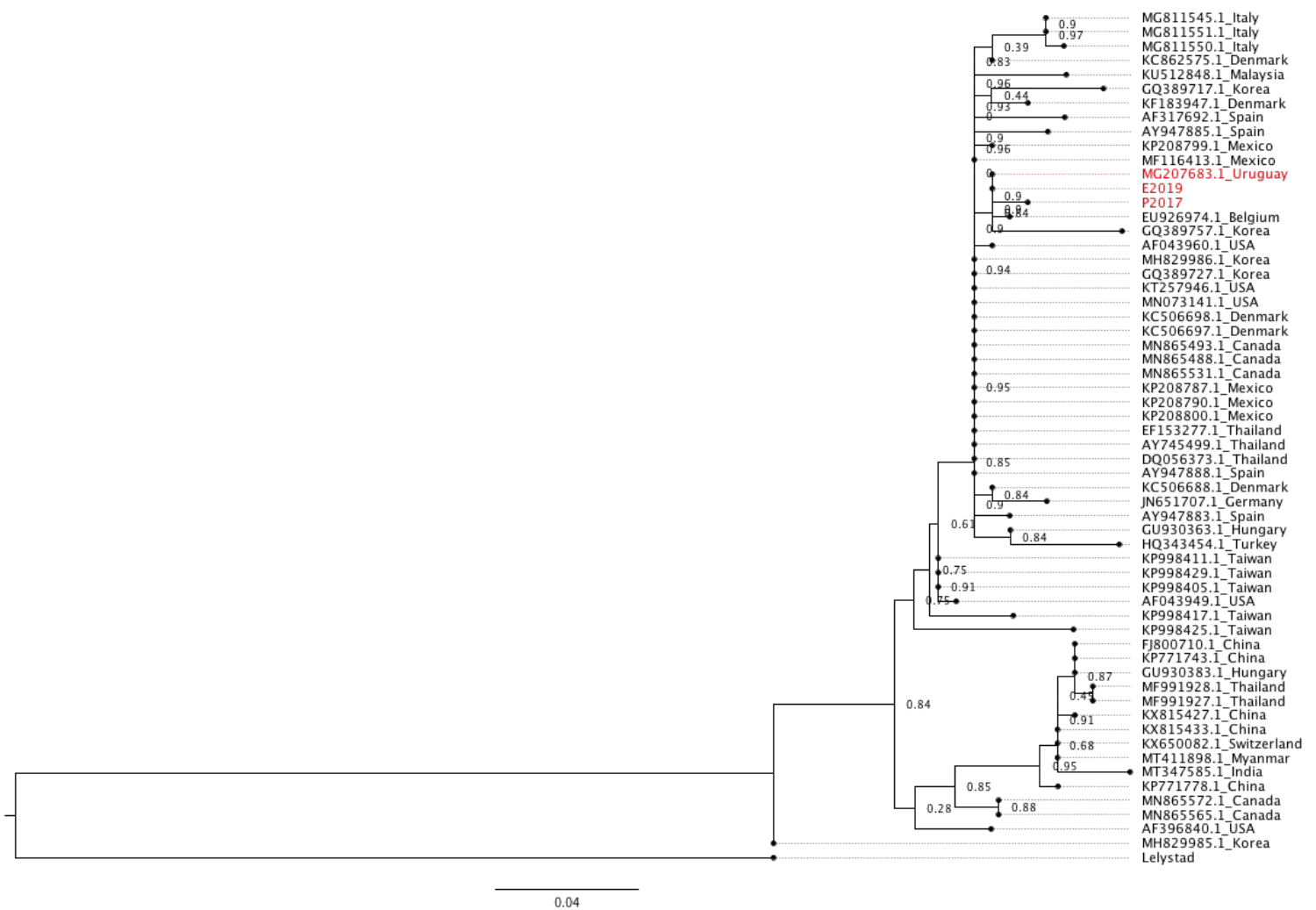


**Figura 9. Detección molecular de PRRSV en muestras de pulmón.** Electroforesis de la amplificación de un fragmento de 304 pb y posterior amplificación de uno de 208 pb de la región ORF7 viral por RT-nested-PCR. En los carriles 1, 2, 3, y 5 se encuentra la corrida de 4 muestras del año 2019. El carril 4 muestra el control negativo de la corrida. En el carril 6 se encuentra la muestra de 2017. MPM representa el marcador de peso molecular (marcador GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™). Con las flechas se indica la altura esperada de banda para cada ronda.

### 3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

A partir del fragmento de 208 pb de la ORF7 viral obtenido en la segunda ronda de la PCR de detección, se realizó un análisis filogenético para las secuencias obtenidas. Además de las muestras positivas detectadas (P2017 y E2019), se incluyó la secuencia de la cepa uruguaya obtenida en el trabajo de Ramos et al., 2018 (se utilizó solo una secuencia debido a que en este trabajo, los autores aclaran que todas las muestras positivas eran iguales a nivel de secuencia en la ORF7), y 57 secuencias de PRRSV-2 provenientes de distintas partes del mundo. Se utilizó una secuencia de PRRSV-1 como grupo externo.

En el árbol de la figura 10 se observa que las dos secuencias de PRRSV detectadas durante este trabajo se encuentran en el mismo grupo que la cepa uruguaya. Sin embargo, aunque E2019 y la cepa uruguaya son idénticas, se observa que hay distancia entre estas dos y P2017. Para analizar en detalle los cambios presentes en P2017, se recurrió al alineamiento, y se encontraron dos cambios de base, uno en la posición 77 (cambio de una C por una T) de la ORF7, y el otro en la posición 129 (cambio de una A por una G). En el primer caso, esta mutación cambia el aminoácido 26, de una leucina a una prolina, pero en el segundo caso, la mutación es sinónima (no cambia el aminoácido).



**Figura 10. Árbol filogenético construido por en base a un fragmento de 208 pb de la región ORF7.** Se incluyen secuencias de PRRSV-2 con su número de acceso de GenBank y país de origen. En rojo se muestran las muestras P2017 y E2019, junto con la cepa uruguaya. Lelystad hace referencia a la secuencia de PRRSV-1 utilizada como grupo externo para enraizar el árbol. Los números representan la fracción de réplicas de *bootstrap* que dan soporte al nodo.

#### 4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PRRSV

Para la caracterización de las cepas del virus circulantes en el país, se buscó poner a punto una técnica de caracterización molecular basada en PCR que permitiera amplificar



un fragmento del genoma viral más variable que el utilizado para la detección. Para los ensayos de puesta a punto se utilizaron muestras del trabajo de Ramos et al., 2018, y la muestra P2017 detectada como positiva durante este trabajo.

La región del genoma viral elegida para la caracterización molecular fue un fragmento de la ORF5, que por su variabilidad, permite distinguir entre genotipos y subtipos dentro de las dos especies virales.

Teniendo en cuenta que para la detección fue necesario realizar dos rondas de amplificación debido a que se comprobó que con la primera ronda de PCR no se obtenía producto de amplificación del gen ORF7, se concluyó que para la caracterización también serían necesarias dos rondas de PCR. Partiendo desde esta base, se probaron varios protocolos, con condiciones y cebadores diferentes (ver materiales y métodos, sección 5) para lograr la caracterización. En todos los casos se utilizó el mismo protocolo de retrotranscripción como partida, pero con diferentes cebadores (ver materiales y métodos, 5.2). Los programas de ciclado fueron ajustados en cada protocolo utilizando como criterio las características de los cebadores a utilizar (contenido de GC y temperatura de desnaturalización) y el tamaño de los fragmentos a amplificar.

#### 4.1 Protocolo 1:

El primer protocolo utilizado se realizó sobre P2017. Partió de la retrotranscripción con el cebador ORF5ER, y fue llevado a cabo con el par de cebadores ORF5EF-ORF5ER y posteriormente el par ORF5IF-ORF5IR (tabla 1). Se esperaba obtener un fragmento de 800 pb en la primera ronda y de 597 pb en la segunda ronda. No hubo amplificación en ninguna las dos rondas, lo que puede deberse a que el cebador ORF5ER no es suficientemente complementario a las secuencias circulantes en Uruguay, debido a la gran variabilidad del virus. Teniendo esto en cuenta, se optó por otra estrategia: en ensayos futuros utilizar el cebador PIRSER para la retrotranscripción y primera ronda de PCR, que ya se había confirmado que generaba un producto de amplificación en los ensayos de detección.

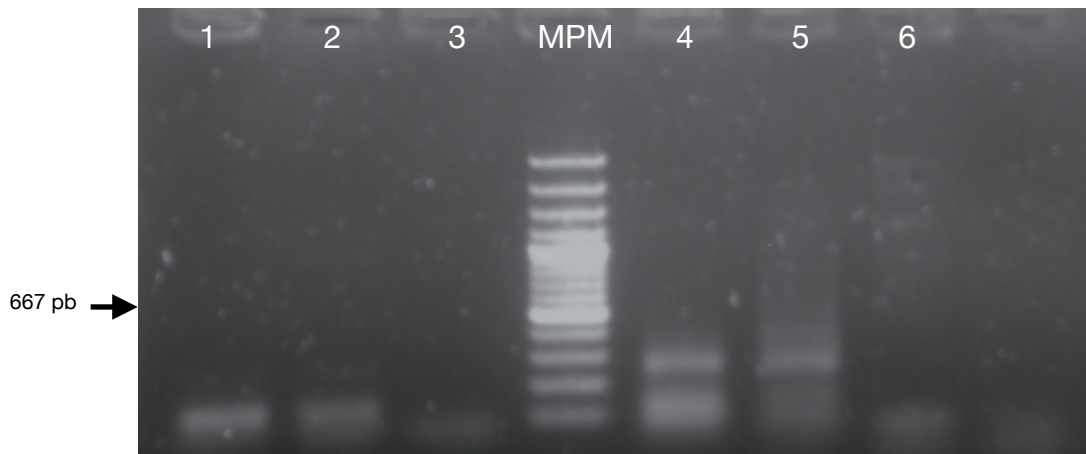
#### 4.2 Protocolo 2:

El segundo protocolo utilizado, partió de la retrotranscripción con el cebador PIRSER, y fue llevado a cabo con el par de cebadores ORF5EF-PIRSER y posteriormente el par ORF5EF-ORF5IR (tabla 1) con las condiciones detalladas en materiales y métodos (5.3, protocolo 2). En principio se probó solo con la muestra P2017 mencionada anteriormente. Se esperaba un fragmento de 1517 pb en la primera ronda, y de 667 pb en la segunda ronda. La electroforesis reveló que no hubo amplificación de los fragmentos buscados, por lo que se probó el mismo protocolo, pero haciendo una dilución de la primera ronda 1/10 para la segunda corrida, con el fin de descartar inhibición por cantidad de ADN de partida. En este caso tampoco hubo amplificación (ver figura 11), Luego se decidió incluir las dos muestras detectadas positivas durante el trabajo de Ramos et al., 2018 (denominadas R1 y R2), pero las bandas obtenidas no se encontraban a la altura esperada (ver figura 11), por lo que se concluyó que se debían buscar protocolos alternativos para lograr este objetivo.

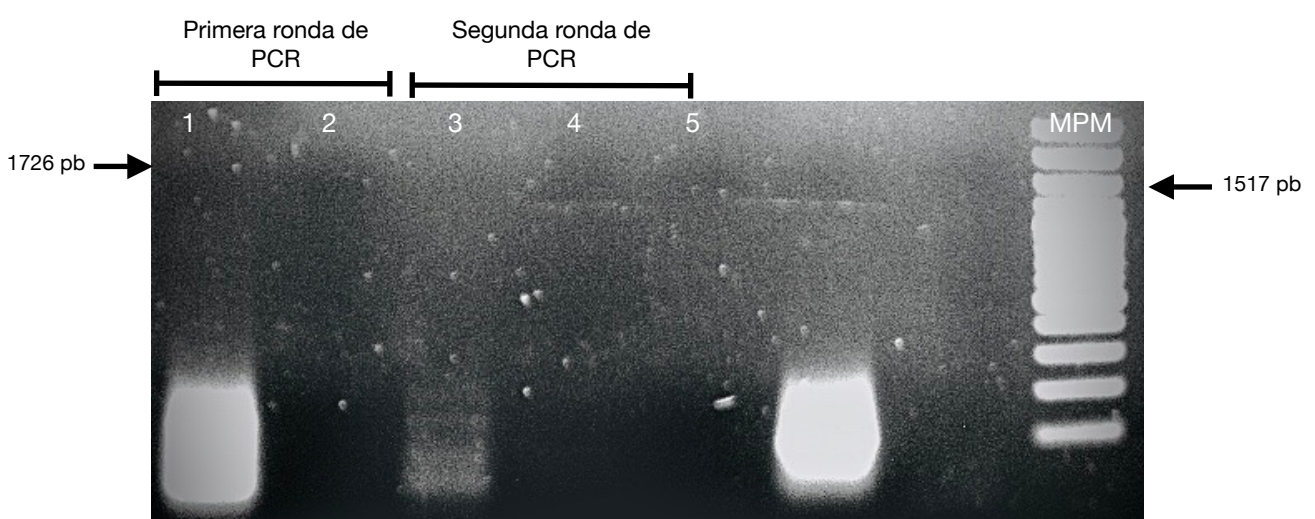
#### 4.3 Protocolo 3:

Dado que no se pudo amplificar la región de interés con las distintas variantes del protocolo anterior, se decidió utilizar un nuevo juego de cebadores, y condiciones asociadas (ver materiales y métodos, sección 5.3, protocolo 3), basándose en bibliografía

sobre la caracterización del virus. Para este protocolo, la retrotranscripción se hizo con el cebador ORF5-7R, la primera ronda de PCR con el juego de cebadores ORF5-7F y ORF5-7R (tabla 1), y la segunda ronda con el juego ORF5EF-PIRSER (tabla 1). De la primera ronda se esperaba una banda de 1726 pb, y de la segunda, una de 1517 pb. Para la segunda ronda de este protocolo, se decidió partir tanto del ADN generado en la primera ronda sin modificaciones, como de una dilución 1/10. No hubo amplificación en ninguna de las dos rondas (figura 12).



**Figura 11. Segunda ronda del protocolo 2 de las muestras de 2017 y de Ramos et al., 2018.** En los carriles 1 y 2 se corrió la segunda ronda de la muestra 2017, y de la dilución 1/10 de la primera ronda, respectivamente. En el carril 3 se muestra el control negativo de la corrida. MPM hace referencia al marcador de peso molecular (marcador GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™). En los carriles 4 y 5, se corrió la segunda ronda de las muestras R1 y R2 respectivamente, y en el carril 6 el control negativo de este ensayo. Con la flecha se muestra la altura y tamaño de banda esperados. Las bandas de R1 y R2 no están a la altura esperada, son de aproximadamente 290 pb.



**Figura 12. Protocolo 3 para la muestra P2017.** A la izquierda, en el carril 1 se muestra la primera ronda de PCR para la muestra de 2017, con su respectivo control negativo en el carril 2. A la derecha, en el carril 3, se muestra la segunda ronda de PCR para la muestra de 2017, en el 4 la segunda ronda de PCR de la dilución 1/10 de la primera ronda y en el carril 5, el control negativo de la segunda ronda. MPM representa el marcador de peso molecular utilizado (marcador GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™). En ninguna de las dos rondas se observan las bandas esperadas, marcadas con una flecha (1726 pb y 1517 pb respectivamente).

#### 4.4 Protocolo 4:

Al ver que ninguna de las variantes de los protocolos anteriores funcionaba, se probó una última estrategia que combinaba parte de las anteriores. Se partió de la retrotranscripción de las 3 muestras (P2017, R1 y R2) con el cebador PIRSER, y se utilizaron los cebadores ORF5-7F y PIRSER para la primera ronda (se esperaba obtener un fragmento de 1643 pb). Para la segunda ronda, se probó partir del ADN puro de las tres muestras de la primera ronda, pero también de una dilución 1/10 de cada una, y se realizó con el juego de cebadores ORF5EF-ORF5ER (se esperaba un fragmento de 720 pb). El gel de electroforesis no reveló amplificación de ningún tipo en ninguna de las dos rondas.

### 5. AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES DE CEPAS URUGUAYAS

Dado que no se pudo lograr la caracterización molecular, se vio la necesidad de recurrir a otro abordaje que permitiera caracterizar el virus, por lo que se recurrió al aislamiento en cultivo celular para aumentar la cantidad de partículas virales de manera suficiente para continuar con los estudios de caracterización, ya sea probando los mismos protocolos aplicados en esta tesina u otros abordajes como la secuenciación masiva (que idealmente permitiría conocer la identidad de todo el genoma viral).

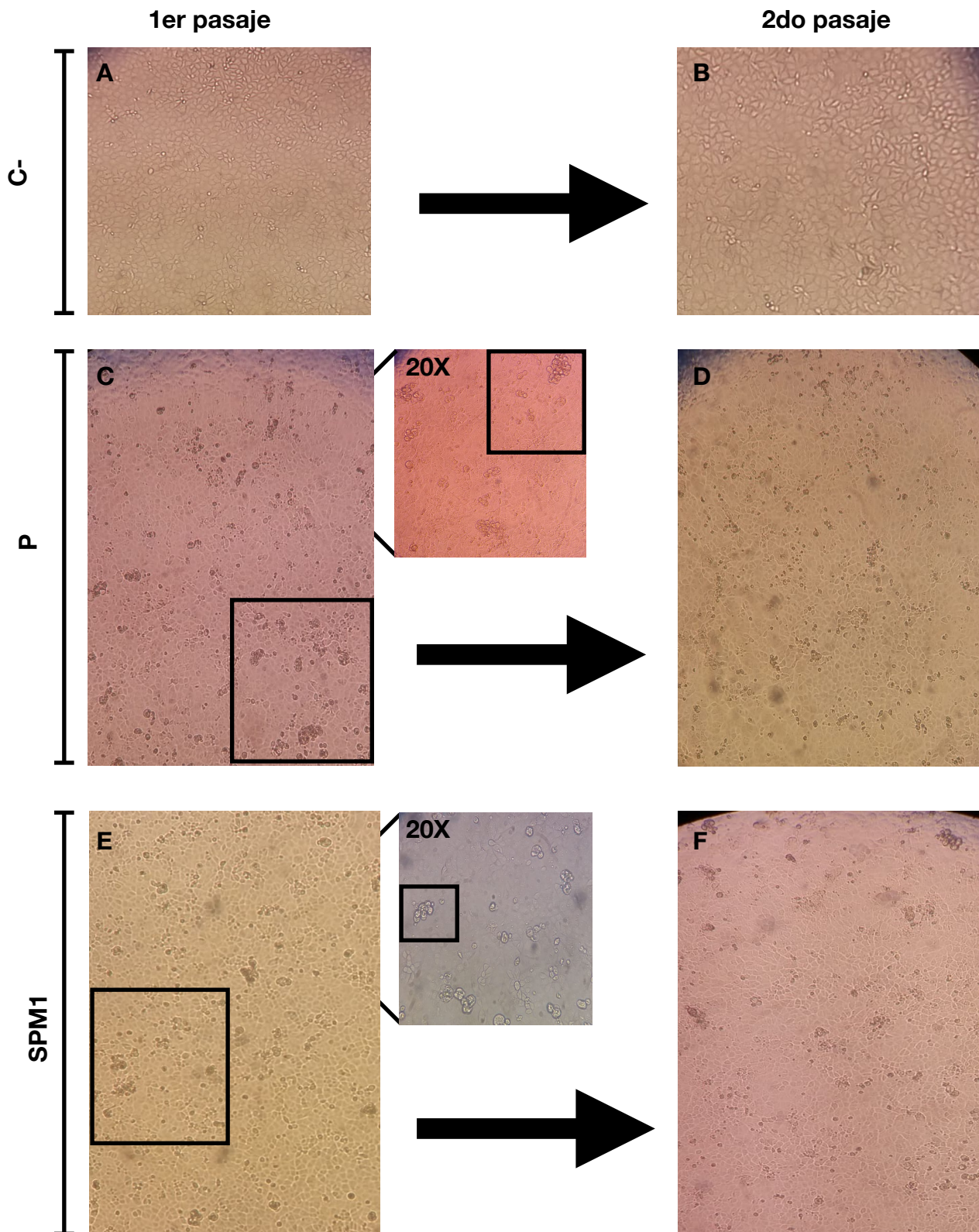
Para los ensayos de infección se utilizó la línea celular MARC-145, siguiendo los protocolos detallados en la sección 6 de materiales y métodos. Para generar los inóculos, se utilizaron distintos aislamientos realizados en el trabajo de Ramos et al., 2018 a partir de una muestra de suero positiva del año 2014. Se eligió un aislamiento del virus en macrófagos alveolares porcinos (denominado P, con dos pasajes en macrófagos alveolares), el sobrenadante de un aislamiento viral con un pasaje en PAM y otro en MARC-145 (denominado SPM1), proveniente del aislamiento en el cual se hizo inmunofluorescencia en el trabajo de Ramos et al., 2018, y por último, se buscó aislar P2017, detectada durante este trabajo. De P se realizaron 3 pasajes adicionales en cultivo celular, y de SPM1 y P2017 se realizaron 2. En la mayoría de los pocillos se observó un efecto citopático dominado por pequeños focos celulares, y finalmente la infección fue levantada a los tres días, cuando se observó un efecto citopático más evidente en cuanto al tamaño de los focos en algunos de ellos (figura 13). En la tercera infección de P, no se observó un efecto citopático diferente que en las primeras dos infecciones (por ejemplo, mayor cantidad de focos, que puedan sugerir una mayor replicación viral).

A partir de estos resultados, se recurrió a la técnica de RT-*nested*-PCR (materiales y métodos, sección 6.3.2) para confirmar la presencia de PRRSV en estas infecciones. En esta PCR se incluyeron los tres pasajes sucesivos del inóculo P, y los dos de SPM1. En el gel de electroforesis (figura 14) se observa que los controles negativos no mostraron amplificación. En la segunda ronda, existe una banda marcada a la altura esperada en el segundo pasaje de P (figura 14). En el resto de los aislamientos hay una banda tenue a la altura correcta (aunque con bandeo inespecífico), excepto el primer pasaje de P (lo cual puede explicarse por una baja carga viral, producto de la baja cantidad de pasajes). Sorprendentemente, en la primera ronda de PCR, aunque se observa amplificación inespecífica, se identifica una banda a la altura esperada para todos los aislamientos. Si bien se requiere confirmar mediante secuenciación que el producto de amplificación sea el esperado para la primera ronda, este resultado es coherente, ya que se espera una mayor carga viral en muestras provenientes del aislamiento viral en comparación con las

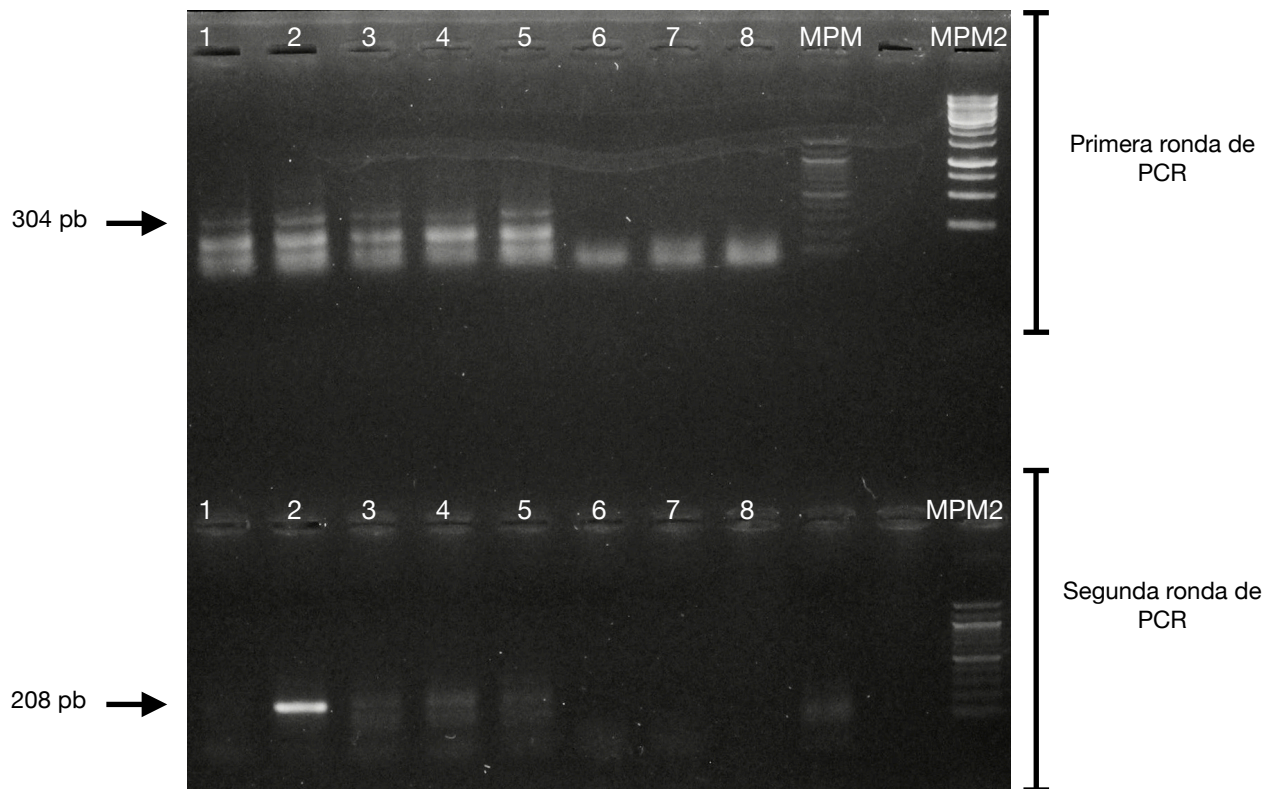
muestras originales de pulmón y suero analizadas anteriormente (figura 8 y 9). La banda del segundo pasaje de P obtenida en la segunda ronda, fue enviada a secuenciar para confirmar la presencia del virus en la muestra. El resultado de la secuenciación confirmó que se trataba del fragmento viral esperado (Anexo, figura S1). Una vez obtenida esta secuencia, se realizó un alineamiento con la secuencia de la muestra original de partida (muestra de animal de faena del 2014, ver materiales y métodos, sección 6.2), y este reveló que no hubo cambios genéticos.

También se buscó aislar la muestra positiva P2017 detectada durante este trabajo. A los dos días de realizada la infección, se observó un efecto distinto que en el resto de las infecciones realizadas hasta el momento, por lo que se planteó que podría tratarse de un efecto tóxico. Sin embargo, se ha observado un efecto similar (formación de sincitios, ver figura 15) en algunos aislamientos de PRRSV (Yan et al., 2015), por lo que se decidió realizar un segundo pasaje en células. Además, en esta infección se incluyó un inóculo de la dilución 1/10 de P2017, para evaluar si el efecto posiblemente tóxico observado se veía disminuido. En el segundo pasaje, el efecto observado fue muy diferente que en el primero (figura 15), lo que apoya la hipótesis de que el primero se debía a un efecto tóxico. En concordancia con este resultado, si se observó un efecto similar al primero en la dilución, por lo cual finalmente se concluyó que se trató de un efecto tóxico (figura 15). Sin embargo, para evaluar si la replicación viral se había dado más allá de estas observaciones, se recurrió a un ensayo de RT-nested-PCR (materiales y métodos, sección 6.3.2). La electroforesis reveló que no hubo replicación viral significativa en ninguna de las condiciones.

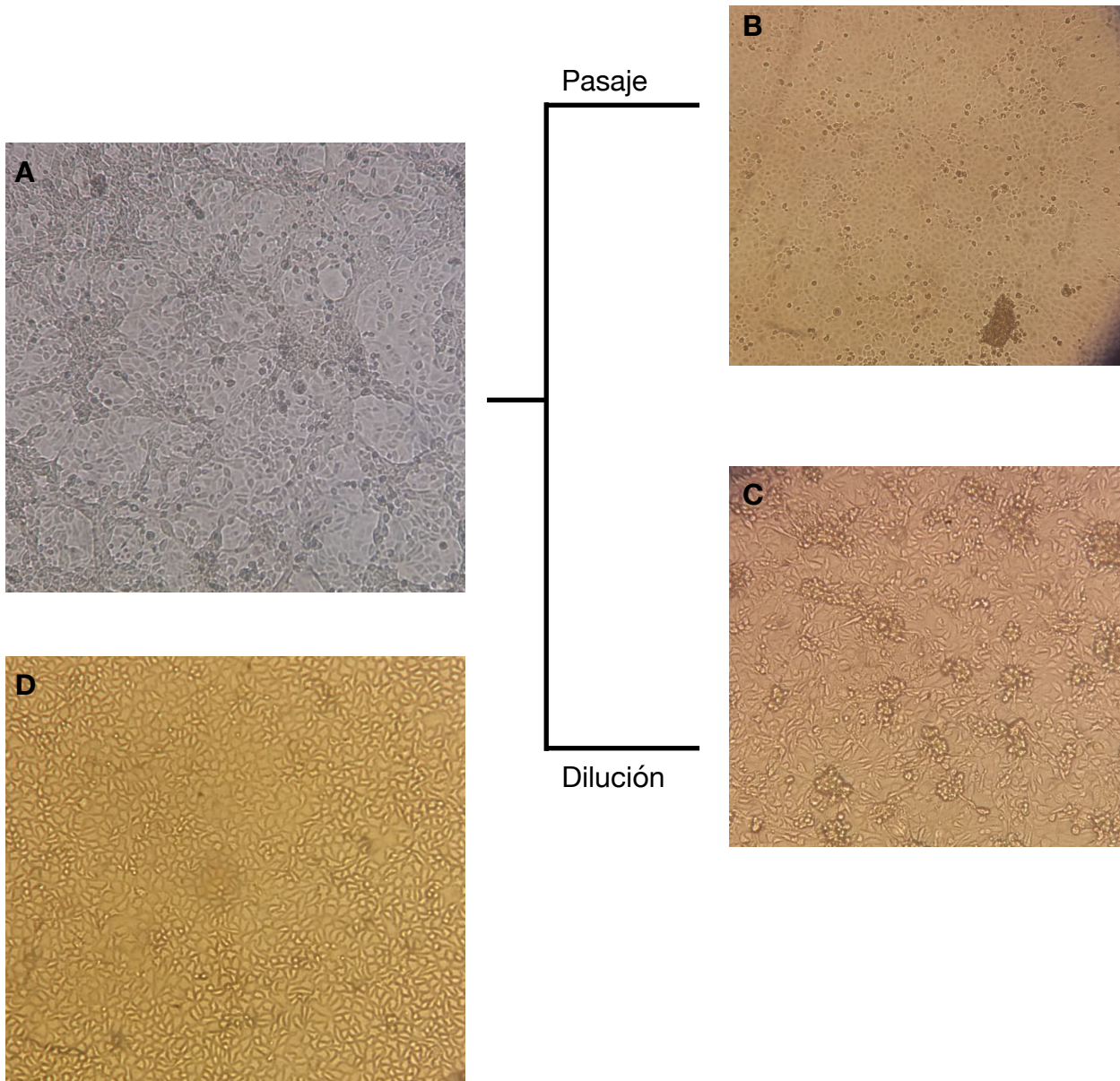
Debido a que el efecto citopático de PRRSV fue difícil de evidenciar para el observador durante todas las infecciones, se realizó una cuarta infección a partir del último pasaje de SMP1, pero utilizando además un medio semisólido (ver materiales y métodos, sección 6.2.1), para evaluar si era posible restringir los sitios de replicación viral en el cultivo, y como resultado, obtener focos celulares de mayor tamaño, que sean más evidentes al visualizarse con el microscopio. Setenta y dos horas post infección, en los pocillos sin medio semisólido, no se evidenció un efecto citopático más evidente que en pasajes anteriores, pero en los pocillos con medio semisólido, se observó un cierto aumento en el tamaño de los focos celulares (figura 16).



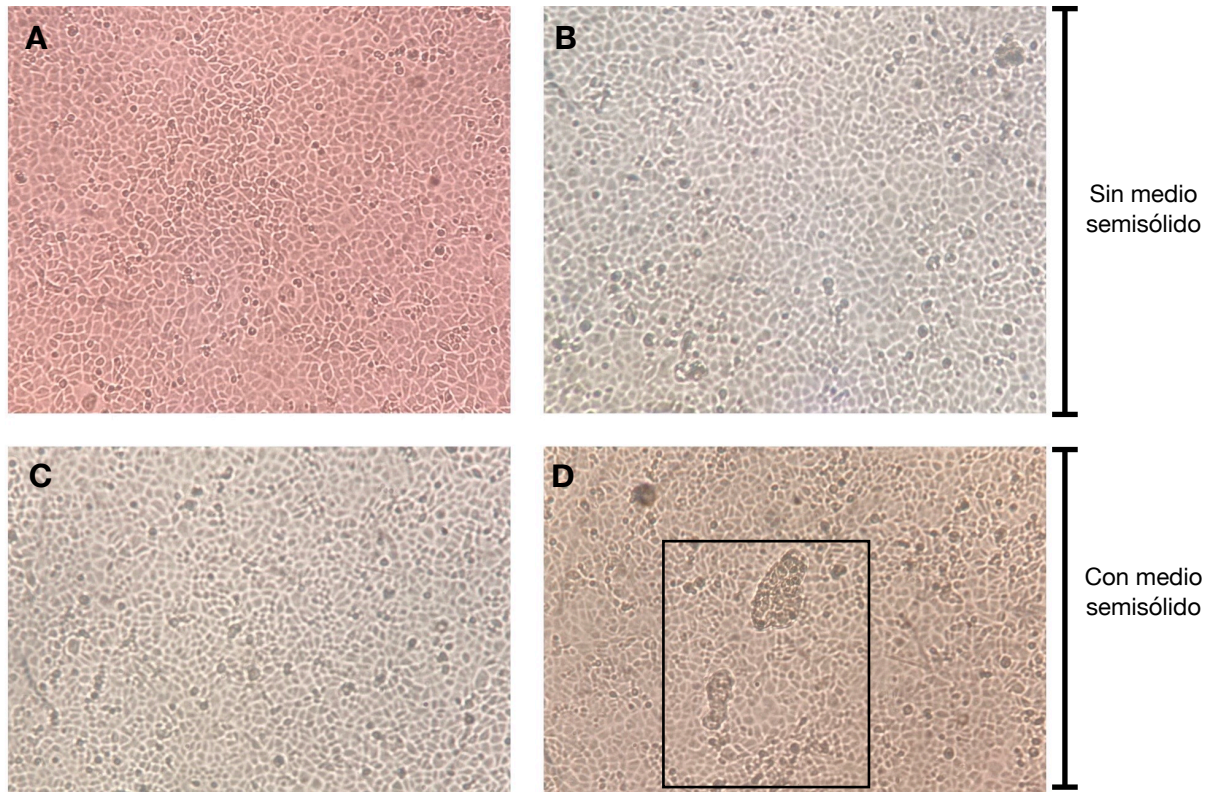
**Figura 13. Primera y segunda infección de P y SPM1.** En el primer panel se muestra el control negativo del primer (A) y segundo (B) pasaje a un aumento de 10X. C muestra el primer pasaje de P a un aumento de 10X y 20X, y D su segundo pasaje a un aumento de 10X. E (a un aumento de 10X y 20X) y F corresponden al primer y segundo pasaje de SPM1 respectivamente. Con los recuadros negros se muestran algunos ejemplos del efecto citopático de PRRSV (focos de células redondeadas).



**Figura 14. PCR de detección de las infecciones de P y SPM1.** Amplificación de un fragmento de la región ORF7 viral. Los carriles 1, 2 y 3 hacen referencia los primeros 3 pasajes de P, en ese orden. Los carriles 4 y 5 corresponden al primer y segundo pasaje de SPM1 respectivamente. MPM es el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™ y MPM2 al marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific™. 6 y 7 representan los dos controles negativos incluidos, y 8 un control solo del agua utilizada durante el ensayo.



**Figura 15. Primera y segunda infección de P2017.** En la figura A se muestra la primera infección de P2017, con un efecto similar a sincitios. La figura B representa el segundo pasaje de la muestra en la línea celular, y la figura C, una infección nueva utilizando como inóculo una dilución 1/10 de P2017. En la figura D se muestra el control negativo de la primera infección. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un aumento de 10X.



**Figura 16. Última infección: efecto citopático 72 horas post infección con PRRSV.** En el panel de arriba se muestra la infección sin medio semisólido (B), y su respectivo control negativo (A), y en la de abajo se muestra la infección con medio semi sólido (D) y su respectivo control negativo (C). En el recuadro se resaltan dos aglomeraciones de células que pueden ser un efecto citopático de PRRSV.



## DISCUSIÓN

---

Desde su emergencia a finales de la década de los 80, PRRS se ha caracterizado por ser una de las enfermedades porcinas más devastadoras, generando infecciones crónicas ampliamente distribuidas y mayormente incontroladas por las vacunas actualmente disponibles (Cafruny et al., 2006 ; Kappes & Faaberg, 2015). Esto se debe a la marcada heterogeneidad genética y antigénica del virus, además de sus estrategias de evasión del sistema inmune (Hu & Zhang, 2013). Como resultado, es considerada como una de las enfermedades virales que más pérdidas económicas genera en la industria porcina, y es de carácter denunciante ante la OIE. Además, gracias a la globalización, y consecuente movilización masiva de comida y animales, ha aumentado considerablemente el riesgo de brotes virales epidémicos (Pileri & Mateu, 2016). Por todas estas razones, se hace necesario realizar estudios de detección y caracterización de las cepas circulantes del virus *Betaarterivirus suid* para prevenir los contagios y contener las infecciones en su lugar de origen. Existen numerosas rutas de introducción y transmisión de PRRSV identificadas, siendo las principales la introducción de animales infectados o vacunados, semen contaminado, y asociado a estas dos rutas anteriores, el mal manejo del período de cuarentena para la introducción de nuevos ejemplares, así como también vehículos, trabajadores de los criaderos porcinos, aerosoles, insectos y utensilios contaminados en general (Mortensen et al., 2002).

En Sudamérica, existen pocos estudios epidemiológicos de la circulación de PRRSV, y concretamente en Uruguay, el primer trabajo realizado en el tema data del 2000, donde se realizó un estudio serológico que no mostró evidencia alguna de la presencia del virus en el país. Luego de esto, no hubo más información en el tema, hasta la publicación de un estudio en 2018 que evidenció la exposición de cerdos domésticos uruguayos al virus al menos desde el año 2011 (Ramos et al., 2018). En cuanto a la introducción del virus al país, el estudio de Ramos et al., 2018 sugiere que puede ser producto de la movilización de animales infectados y la comercialización de semen o a la importación de cerdos a Uruguay desde otros países. Desde 2007, Uruguay ha importado animales o semen desde Brasil, España y los Países Bajos, y en estos últimos dos países se han reportado brotes de PRRSV-2 (Brasil nunca ha reportado la presencia del virus). Argentina, que comparte fronteras con Uruguay y Brasil, nunca ha reportado la presencia de la enfermedad, por lo que Ramos et al., 2018 especula que es más probable que la introducción de PRRSV-2 en Uruguay se deba al comercio internacional, y no a transmisión entre fronteras y subsecuente dispersión (Ramos et al., 2018). Para poder entender mejor el escenario epidemiológico de PRRSV en Uruguay, es necesario realizar una vigilancia continua, y caracterización de las cepas circulantes del virus.

En el presente trabajo, se realizó una actualización de la circulación de PRRSV en Uruguay en el período de 2017 a 2019, con la finalidad de mantener un registro de la situación actual de la enfermedad en el país, y comprender mejor el escenario epidemiológico de este virus en Uruguay.

En primera instancia, los ensayos serológicos realizados en muestras de archivo de cerdo desde 2010 a 2016 reafirmaron los resultados obtenidos en Ramos et al., 2018, y la comparación de los resultados reveló leves diferencias en la seropositividad, que confirman los sesgos generados por los diferentes kits, pero la coherencia de los resultados se mantiene, por lo que se reafirma la activa circulación del virus en el período de 2010-2016 en distintas regiones del país. Además, durante este trabajo se incluyeron muestras de archivo del período en cuestión no analizadas hasta el momento, y el

resultado de este análisis evidenció una mayor seropositividad que lo previamente anticipado por Ramos et al., 2018 en el período de 2010 a 2016. Estos resultados también evidenciaron la presencia de anticuerpos anti-PRRSV en el período de 2017-2019, en una muestra del año 2018 y una del año 2019, ambas provenientes de animales con sintomatología asociada al virus. Por más de que la seropositividad de este período es menor que en el anterior, no se puede concluir que se deba a una menor circulación del virus, ya que las muestras analizadas durante el segundo período, además de ser menor cantidad, provienen de una menor cantidad de criaderos, por lo que no es una representación fiable de la situación en todo el país. Sin embargo, se puede especular que desde la denuncia de la circulación del virus en el país en julio de 2017, existe una mayor consciencia acerca de la enfermedad en estos criaderos analizados, y se estén tomando medidas para evitar la propagación, ya que cuando se analizaron varios animales del mismo criadero y momento, no se encontró más de uno positivo. Cabe aclarar, que dentro de estas posibles medidas adoptadas por los criadores, no se incluye la vacunación (que generaría sesgos en la seropositividad), antes de realizar los estudios, se comprobó que ninguno de estos criaderos analizados, habían implementado un plan de vacunación.

Los ensayos serológicos realizados en muestras de suero de jabalí, se hicieron con la finalidad de evaluar una posible transmisión de PRRSV entre especies porcinas, lo cual es muy importante para la región, debido a que el jabalí circula libremente entre las fronteras, y podría ser un importante vector de contagio para los países vecinos, Brasil y Argentina, que han reportado estar libres de PRRS. Además, no hay estudios realizados en Latinoamérica sobre la circulación de PRRSV en esta especie. Los resultados de este ELISA revelaron 1 muestra seropositiva en 81 muestras analizadas, proveniente de una hembra cazada en Artigas el 22 de julio de 2018 (es una muestra en 40 de esta misma fecha). Sin embargo, el porcentaje de seropositividad en este caso, se encuentra dentro del porcentaje de falsos positivos del kit, por lo que no se puede concluir que el virus se encuentre efectivamente circulando. Para estudiar esto, se debería analizar una mayor cantidad de muestras, de diversos puntos del país, prestando particular atención a los puntos cercanos a criaderos de cerdo doméstico, donde el contacto entre las dos especies es más estrecho.

Para evaluar la presencia del virus en las muestras de cerdo seropositivas por ELISA de 2018 y 2019, y en la de jabalí, se recurrió a la detección molecular de PRRSV por amplificación de un fragmento de la ORF7 mediante la técnica de *RT-nested-PCR*. De las dos muestras de cerdo, una de ellas fue positiva, confirmado por secuenciación (E2019, ver resultados, sección 1.1), y la de jabalí mostró una banda a una altura no esperada (ver figura 7) que resultó ser amplificación inespecífica, confirmado por secuenciación. Con respecto a las muestras de cerdo, este resultado permitió confirmar (por secuenciación) la circulación activa del virus en Uruguay hasta el año 2019. Este tipo de resultados de seguimiento del estatus de la circulación del virus permiten tomar medidas tempranas para evitar la diseminación de la infección, y minimizar las pérdidas.

Además de la muestras E2018 y E2019, se analizaron otras 10 muestras de suero del mismo criadero y mismo año para PRRSV por *RT-nested-PCR*, ya que los individuos analizados podrían estar infectados y ser seronegativos, por encontrarse en la etapa temprana de infección, donde hay una alta carga viral en el suero, pero aún no hay suficientes anticuerpos circulando (Yoon, Joo, Goyal & Molitor, 1994; Lunney et al., 2016). Todas resultaron negativas (ver figura 8), lo que dio indicios de que la infección estaría, en principio, contenida. La hipótesis que se planteó es que tal vez la cepa circulante encontrada en E2019 no sería muy virulenta, y por esa razón, no se observaría una

evidente diseminación. Esto se condice con los resultados de ELISA. Sin embargo, se debería analizar una cantidad de muestras mucho mayor de estos dos años, de puntos más diversos para sacar conclusiones a partir de esta especulación, lo cual es un desafío, ya que la obtención de muestras supone un cuello de botella en este estudio, se depende de la voluntad de los criadores de ceder muestras para el análisis. También se analizaron muestras de órgano del período 2017-2019, y se encontró una muestra de pulmón positiva del año 2017, proveniente del departamento de Rocha. Este es el primer caso encontrado en este departamento.

De las muestras detectadas como positivas, se hizo un estudio filogenético de la ORF7, y se vio que E2019 era 100% idéntica a la cepa uruguaya, y por más de que la región analizada del genoma es la más conservada, siendo PRRSV un virus con una tasa de mutación tan alta, sería coherente que hubiese acumulado cambios con respecto a la cepa uruguaya. Este fenómeno puede ser explicado por una circulación acotada de la cepa en el país, lo que apoya la hipótesis de que tal vez no sea muy virulenta. Esto también puede deberse a una baja circulación del virus, por la toma de medidas de contención en los criaderos, producto de la denuncia de la circulación del virus ante la OIE, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, la muestra P2017 mostró dos cambios con respecto a estas dos últimas, uno sinónimo y otro no sinónimo. Esto podría deberse a que en 2017, existía una mayor circulación del virus (por ser el mismo año de la denuncia ante la OIE), y las medidas de contención la fueron acotando con los años. Para poder dar apoyo a estas hipótesis, es necesario realizar estudios filogenéticos con una región menos conservada del genoma viral, como la región ORF5, que evidencie de forma significativa y comparable la divergencia evolutiva. Por ende, se buscó la amplificación de la región ORF5 del genoma viral por RT-*nested*-PCR o RT-*seminested*-PCR. Este abordaje supuso un desafío mayor a lo previsto, ya que no se logró amplificar el fragmento deseado con ninguna de las variantes de la técnica probadas. Primero se utilizaron cebadores diseñados para esta fin por Goldberg et al., 2000 (ver tabla 1), y dado que para la detección fue necesaria la implementación de *nested*-PCR (al no observar amplificación en la primera ronda), se concluyó que se requeriría de esta técnica también para la caracterización. Para este fin, se diseñaron cebadores internos a los anteriormente mencionados (para la segunda ronda de amplificación) durante este trabajo. Las condiciones de la reacción para ambas rondas de PCR se eligieron en cuanto a los cebadores utilizados, y las características del fragmento de interés. Cuando este abordaje no funcionó, se plantearon dos hipótesis para explicarlo: en primer lugar se planteó que los cebadores no lograran unirse correctamente a la región ORF5 y por eso no se logró la amplificación, ya fuese por presencia de una estructura secundaria difícil de desnaturalizar, o por falta de complementariedad de los cebadores con las cepas circulantes en el país; y en segundo lugar se planteó la posibilidad de que fuera un problema de baja carga viral en las muestras, que no permitiera una amplificación suficiente para visualizar una banda en la electroforesis. Para poner a prueba la primera hipótesis, se recurrió a cambiar las condiciones del ciclado (extender el tiempo de desnaturalización) por un lado, y por otro, utilizar nuevos cebadores y condiciones de ciclado obtenidos del artículo Martínez-Bautista et al., 2018, donde se logró la amplificación del fragmento de interés de la ORF5 en PRRSV tipo 2. También se consideró que podría haber un problema con la muestra positiva utilizada para la caracterización (muestra P2017), por más de que en la detección amplificara correctamente, por lo que se decidió incluir además otras dos muestras positivas detectadas previamente a este trabajo. Cuando ninguna de estas alternativas funcionó en ninguna de las muestras, se recurrió a una técnica mixta entre las dos anteriores, utilizando combinaciones de cebadores de las dos alternativas utilizadas (ver resultados, sección 3.4). Esta técnica tampoco logró la amplificación, y dado que las muestras

analizadas por Martínez-Bautista et al., 2018, podrían diferir significativamente de las circulantes en Uruguay, debido a la alta tasa de mutación del virus, y a las diferencias observadas para P2017, E2019 y la cepa uruguaya a nivel de la ORF7, no se pudo descartar la hipótesis de los cebadores fuesen inespecíficos para la región de interés. Teniendo esto en cuenta, y sumando además la hipótesis de la baja carga viral, se decidió delinear el resto de la investigación en torno alternativas para lograr la caracterización del virus, y se llegó a la conclusión que el mejor abordaje implicaba su aislamiento por cultivo celular con el fin de obtener suficiente carga viral como punto de partida. Teniendo en cuenta que el método de caracterización molecular implementado en este trabajo no funcionó, y no se pudieron descartar ninguna de las dos hipótesis, en vez de utilizar este abordaje, se planificó realizar estos ensayos en cultivo para luego preparar las muestras resultantes, de alta carga viral, para secuenciación masiva con la técnica de la compañía Illumina de lecturas cortas y gran profundidad (Sequencing | Key methods and uses, 2020). Esta tecnología de secuenciación permite obtener lecturas de las secuencias de todo el genoma viral, por lo que permitirá caracterizar todo el genoma del virus, y además, analizar las variantes de estos genomas, (producto de mutaciones), es decir, estudiar la diversidad de la cuasiespecie.

Se hicieron cuatro infecciones sucesivas de muestras con distintas características, y se buscó identificar un efecto citopático, utilizando como referencia de comparación un control negativo de infección (sometido a las mismas condiciones que las monocapas infectadas, excepto al virus). Algunas de las muestras utilizadas para la inoculación mostraban efectos citopáticos más evidentes al observador que otras (ver figura 13), y en estas últimas, el efecto no necesariamente se volvía más evidente en pasajes posteriores, por ende, fue necesario recurrir a un método de detección para confirmar su presencia. En este caso, se realizó un ensayo de detección molecular pasada la tercera infección, para evaluar si el virus efectivamente había replicado a lo largo de todos los pasajes sucesivos. La detección molecular reveló la presencia del virus en el segundo pasaje de P, y se vio una banda tenue a la altura esperada en la segunda ronda para el tercer pasaje de P y todos los de SPM1, pero no en el primer pasaje de P (lo que puede deberse a una baja carga viral, debido al bajo número de pasajes). Lo interesante de este resultado, es que por más de que existe amplificación inespecífica en la primera ronda, hay una banda a la altura esperada (304 pb) para todas las muestras analizadas, algo que no se había visto para ninguna de las muestras analizadas en los ensayos de detección (figura 14). Esto apoya la hipótesis de la baja carga viral en las muestras de partida, ya que al aumentar la carga viral, se ve una amplificación en la primera ronda. En cuanto a la segunda ronda de PCR, se especula que las bandas tenues obtenidas pueden deberse a que se está partiendo de mucho ADN de la primera ronda, lo cual puede estar inhibiendo la segunda. En este caso se hizo así porque se utilizó el mismo protocolo que en la detección molecular de muestras de suero y órgano, para lograr resultados comparables. La secuencia obtenida del segundo pasaje de P se comparó con la secuencia de la muestra original de partida utilizada para los aislamientos para evaluar si hubo cambios a lo largo de los pasajes. Debido a que este virus tiene la tasa de mutación más alta, podría acumular cambios a lo largo de los pasajes que lo distanciaran de la secuencia original, pero en este caso, no se vieron cambios entre estas dos secuencias analizadas. Esto puede deberse a que efectivamente, el virus no cambió significativamente a lo largo de los pasajes, pero también puede ser producto del sesgo en la región analizada (ORF7, que como ya se mencionó, es la región más conservada del genoma viral).

En el futuro, teniendo estos resultados en cuenta, se podría realizar una purificación de la banda obtenida en la primera ronda (figura 14) y enviarla a secuenciar, para confirmar si se trata del fragmento viral esperado. Además, se podría buscar poner a punto la técnica

específicamente para la detección de muestras derivadas de amplificación en cultivo celular, utilizando menos ADN de la primera ronda como partida de la segunda, y tal vez subiendo la temperatura de *annealing* de los cebadores, para reducir el bandeo inespecífico observado en la primera ronda de PCR (ver figura 14).

Teniendo este resultado en mente, se preparó una cuarta infección a partir de la tercera de SPM1, añadiendo además, un medio semisólido en uno de los pocillos de infección, con el fin de probar si se lograba un efecto citopático más localizado, que resultara más evidente. En la infección sin medio semisólido, no se observó un efecto citopático evidente en comparación con infecciones anteriores, contrario a lo que se esperaba (se esperaba que cuanto mayor cantidad de infecciones, más replicaría el virus, lo que resultaría en un mayor efecto citopático). En el medio semi sólido, sin embargo, se logró la localización de focos de infección, por lo que se concluyó que este abordaje podría ser utilizado en futuras infecciones para un análisis más claro del efecto del virus en las células.

En cuanto a las hipótesis de la baja carga viral en las muestras, un abordaje factible para analizar el comportamiento replicativo del virus, sería cuantificar el número de copias del genoma viral en los distintos pasajes de un mismo inóculo, para investigar si existe un aumento significativo de la carga viral a mayor el pasaje. Además, para evaluar si los aislamientos obtenidos por cultivo son factibles para la secuenciación, también se deberá recurrir a una técnica que permita la cuantificación de la carga viral, como la PCR en tiempo real, cuantitativa, que permite cuantificar el número de copias del genoma viral que se encuentran en la muestra analizada. También se podría volver a intentar la caracterización molecular a partir de los aislamientos generados para evaluar si efectivamente no funcionó por la baja carga viral de las muestras de partida.

Por tanto, en este trabajo se evidenció la exposición de cerdos domésticos y salvajes uruguayos a PRRSV, se detectó la presencia de la especie PRRSV-2 en el Uruguay en el período de 2017 a 2019, y se realizaron ensayos de caracterización en cultivo, que permitirán realizar la caracterización molecular de la cepa de PRRSV-2 circulante en el país. Los resultados obtenidos en este estudio, además, brindan información crucial para que los criadores puedan ajustar medidas de manejo sanitario, y se tome conciencia de la importancia del monitoreo molecular, y además, dan lugar a nuevos estudios que brinden claridad sobre el escenario epidemiológico de PRRSV en Uruguay.

## CONCLUSIONES

---

- Los ensayos de ELISA confirmaron la circulación de PRRSV durante el período de 2010 a 2016, y revelaron que continuó circulando en el período de 2017 a 2019. Todas las muestras seropositivas provenían de animales o granjas que presentaban sintomatología compatible con el virus.
- Se logró detectar la presencia del virus en una muestra seropositiva por ELISA del año 2019 por RT-*nested*-PCR.
- Se detectó como positiva también por RT-*nested*-PCR una muestra de pulmón del año 2017 con sintomatología compatible con el virus.

- El análisis filogenético reveló cambios a nivel de la ORF7 entre la muestra positiva detectada de 2017, y la cepa uruguaya. La muestra positiva detectada en 2019 era 100% idéntica a la cepa uruguaya.
- No se logró la caracterización molecular del virus por RT-*nested*-PCR, pero sí su aislamiento por cultivo celular, confirmado por detección molecular y secuenciación de un fragmento de la ORF7.

## PERSPECTIVAS

---

- Obtener mayor cantidad de muestras, no solo de animales con sintomatología asociada al virus, que den robustez a futuros ensayos.
- Realizar una mayor cantidad de ensayos de ELISA en muestras de suero de cerdo representativas de distintos puntos del país, desde el 2017 en adelante, para tener una imagen más clara de la situación epidemiológica actual del Uruguay.
- Realizar una mayor cantidad de ensayos de ELISA en muestras de jabalí desde 2010 en adelante, para evaluar en detalle la presencia y prevalencia de PRRSV en esta especie.
- Poner a punto una técnica de detección de PRRSV por PCR en tiempo real, que permita cuantificar la carga viral en las muestras analizadas, ya sean producto de aislamientos en cultivo o muestras de suero u órgano.
- Realizar ensayos de inmunofluorescencia para confirmar la presencia de PRRSV en los focos observados en las infecciones con medio semisólido, para confirmar que estos son producto de efecto citopático.
- Realizar la caracterización del genoma completo de PRRSV-2 por secuenciación masiva.
- Utilizar los aislamientos de cultivo celular para volver a probar la caracterización molecular por RT-*nested*-PCR, de modo de poder poner a prueba la hipótesis de la baja carga viral en las muestras analizadas en este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Allende, R., Laegreid, W., Kutish, G., Galeota, J., Wills, R. and Osorio, F., 2000. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Description of Persistence in Individual Pigs upon Experimental Infection. *Journal of Virology*, 74(22), pp.10834-10837.

Beerens, N. and Snijder, E., 2007. An RNA Pseudoknot in the 3' End of the Arterivirus Genome Has a Critical Role in Regulating Viral RNA Synthesis. *Journal of Virology*, 81(17), pp.9426-9436.

Beerens, N., Selisko, B., Ricagno, S., Imbert, I., van der Zanden, L., Snijder, E. and Canard, B., 2007. De Novo Initiation of RNA Synthesis by the Arterivirus RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Virology*, 81(16), pp.8384-8395.

Biernacka, K., Podgórska, K., Tyszka, A. and Stadejek, T., 2018. Comparison of six commercial ELISAs for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in field serum samples. *Research in Veterinary Science*, 121, pp.40-45.

Bloemraad, M., de Kluijver, E., Petersen, A., Burkhardt, G. and Wensvoort, G., 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Veterinary Microbiology*, 42(4), pp.361-371.

Cafruny, W., Duman, R., Wong, G., Said, S., Ward-Demo, P., Rowland, R. and Nelson, E., 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection. *Virology Journal*, 3(1), p.90.

Calvert, J., Slade, D., Shields, S., Jolie, R., Mannan, R., Ankenbauer, R. and Welch, S., 2007. CD163 Expression Confers Susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *Journal of Virology*, 81(14), pp.7371-7379.

Carman, S., Sanford, S.E., Dea, S., 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario— 1978 to 1982. *The Canadian Veterinary Journal*, 36(12), pp.776-777.

Chernomor, O., Minh, B., Schmidt, H., Schrepf, D., von Haeseler, A., Woodhams, M., Hoang, D. and Lanfear, R., 2011. *IQ-TREE*.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Althouse, G. and Lunney, J., 2008. Comparative antiviral and proviral factors in semen and vaccines for preventing viral dissemination from the male reproductive tract and semen. *Animal Health Research Reviews*, 9(1), pp.59-69.

Collins, J., Benfield, D., Christianson, W., Harris, L., Hennings, J., Shaw, D., Goyal, S., McCullough, S., Morrison, R., Joo, H., Gorcyca, D. and Chladek, D., 1992. Isolation of Swine Infertility and Respiratory Syndrome Virus (Isolate ATCC VR-2332) in North America and Experimental Reproduction of the Disease in Gnotobiotic Pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), pp.117-126.

Conzelmann, K.K., Visser, N., Van Woensel, P., Thiel, H.J., 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 193(1), pp.329–339.

Das, P.B., Vu, H.L., Dinh, P.X., Cooney, J.L., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2011. Glycosylation of minor envelope glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infectious virus recovery, receptor interaction, and immune response. *Virology*, 410(2), pp.385–394.

Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D., 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of virology*, 145(4), pp. 659–688.

Delputte, P.L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J., Paensaert, M.B., 2002. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparin like receptor on porcine alveolar macrophages. *Journal of Virology*, 76(9), pp.4312–4320.

Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2004. Porcine Arterivirus Infection of Alveolar Macrophages Is Mediated by Sialic Acid on the Virus. *Journal of Virology*, 78(15), pp. 8094-101.

Delputte, P.L., Costers, S., Nauwynck, H.J., 2005. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulfate and sialoadhesin. *The Journal of general virology*, 86(5), pp.1441–1445.

Dokland, T., 2010. The structural biology of PRRSV. *Virus Research*, 154(1-2), pp. 86–97.

Fang, Y., Treffers, E.E., Li, Y., Tas, A., Sun, Z., van der Meer, Y., de Ru, A.H., van Veelen, P.A., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Firth, A.E., 2012. Efficient-2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), pp.E2920–E2928.

Forsberg, R., 2005. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Molecular biology and evolution*, 22 (11), pp. 2131–2134.



Goldberg, T., Hahn, E., Scherba, G. and Weigel, R., 2000. Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *Journal of General Virology*, 81(1), pp.171-179.

Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., & Gojobori, T., 2005. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Molecular biology and evolution*, 22(4), pp.1024–1031.

Hu, J. and Zhang, C., 2013. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vaccines: Current Status and Strategies to a Universal Vaccine. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(2), pp.109-120.

Illumina.com. 2020. *Sequencing | Key Methods And Uses*. [online] Disponible en: <<https://www.illumina.com/techniques/sequencing.html>> [Accedido el 14 de septiembre de 2020].

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2020. *International Committee On Taxonomy Of Viruses (ICTV)*. [online] Disponible en: <[https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=201851833](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201851833)> [Accedido el 12 julio de 2020].

Kappes, M.A., and Faaberg, K.S., 2015. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, 479-480, 475–486.

Kapur, V., Elam, M., Pawlovich, T. and Murtaugh, M., 1996. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *Journal of General Virology*, 77(6), pp.1271-1276.

Keffaber, K., 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *American association of swine practitioners newsletter*, 1(2), pp. 1–9.

Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L., 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of virology*, 133(3-4), pp.477–83.

Kuhn, J., Lauck, M., Bailey, A., Shchetinin, A., Vishnevskaya, T., Bào, Y., Ng, T., LeBreton, M., Schneider, B., Gillis, A., Tamoufe, U., Dikko, J., Takuo, J., Kondov, N., Coffey, L., Wolfe, N., Delwart, E., Clawson, A., Postnikova, E., Bollinger, L., Lackemeyer, M., Radoshitzky, S., Palacios, G., Wada, J., Shevtsova, Z., Jahrling, P., Lapin, B., Deriabin, P., Dunowska, M., Alkhovsky, S., Rogers, J., Friedrich, T., O'Connor, D. and Goldberg, T., 2015. Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. *Archives of Virology*, 161(3), pp.755-768.

Lee, C., Yoo, D., 2006. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology*, 355(1), pp.30-43.

Lopez, O.J., Osorio F.A., 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(3), pp.155-63.

Lopez, O.J., Oliveira, M.F., Garcia, E.A., Kwon, B.J., Doster, A., Osorio, F.A., 2007. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clinical and vaccine immunology*, 4(3), pp. 269-275.

Loving, C.L., Brockmeier, S.L., Sacco, R.E., 2007. Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology*, 120(2), pp.217-29.

Lunney, J., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B. and Renukaradhya, G., 2016. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), pp. 129-154.

Mardassi, H., Massie, B., Dea, S., 1996. Intracellular synthesis, processing and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 221(1), pp 98-112.

Martínez-Bautista, N., Sciutto-Conde, E., Cervantes-Torres, J., Segura-Velázquez, R., Mercado García, M., Ramírez-Mendoza, H., Trujillo Ortega, M., Delgadillo Alvarez, J., Castillo-Juárez, H. and Sanchez-Betancourt, J., 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), pp.993-1008.

Meulenbergh, J.J., Petersen-den Besten, A., De Kluyverer, E.P., Moormann, R.J., Schaaper, W.M., Wenswoort, G., 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, 206(1), pp.155-163.

Misinzo, G.M., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Involvement of proteases in porcine reproductive and respiratory syndrome virus uncoating upon internalization in primary macrophages. *Veterinary research*, 39(6), p.55.

Molenkamp, R., van Tol, H., Rozier, B.C.D., 2000. The arterivirus replicase is the only viral protein required for genome replication and subgenomic mRNA transcription. *Journal of general virology*, 81(10), pp.2491-2496.

Mortensen, S., Stryhn, H., Søgaaard, R., Boklund, A., Stärk, K., Christensen, J. and

- Willeberg, P., 2002. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Preventive Veterinary Medicine*, 53(1-2), pp.83-101.
- Murtaugh, M., Elam, M., Kakach, L., 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Archives of Virology*, 140(8), pp.1451-1460.
- Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y. and Zhou, E., 2017. Improved Vaccine Against PRRSV: Current Progress And Future Perspective. *Frontiers in microbiology*, 8, p.1635.
- Nei, M., Kumar, S., Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. and Peterson, N., 2018. *MEGA*. Pennsylvania State University.
- Neira, V., Brito, B., Mena, J., Culhane, M., Apel, M., Max, V., Perez, P., Moreno, V., Mathieu, C., Johow, M., Badia, C., Torremorell, M., Medina, R. and Ortega, R., 2017. Epidemiological investigations of the introduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chile, 2013-2015. *PLOS ONE*, 12(7), p.e0181569.
- OIE, 2008. *Report Of The OIE Ad Hoc Group On Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome*. Appendices IV and V. [online] Paris. Disponible en: <[https://www.oie.int/fileadmin/home/eng/our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/prrs\\_guide\\_web\\_bulletin.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/home/eng/our_scientific_expertise/docs/pdf/prrs_guide_web_bulletin.pdf)> [Accedido el 1ero de noviembre de 2020].
- OIE, 2020. *World Animal Health Information Database Interface*. [online] Disponible en: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Porcine-reproductive-and-respiratory-syndrome/> [Accedido el 28 de septiembre de 2020].
- Oie.int. 2020. *OIE World Animal Health Information System*. [online] Disponible en: <[https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/DiseaseinformationDiseasedistributionmapindexnewlangendisease\\_type\\_hidden=&disease\\_id\\_hidden=&selected\\_disease\\_name\\_hidden=&disease\\_type=0&disease\\_id\\_terrestrial=76&species\\_t=0&disease\\_id\\_aquatic=-999&species\\_a=0&sta\\_method=semesterly&selected\\_start\\_year=2019&selected\\_report\\_period=2&selected\\_start\\_month=1&date\\_submit=OK](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/DiseaseinformationDiseasedistributionmapindexnewlangendisease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=76&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2019&selected_report_period=2&selected_start_month=1&date_submit=OK)> [Accedido el 26 de septiembre de 2020].
- Pasternak, A., 2001. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *The EMBO Journal*, 20(24), pp.7220-7228.
- Pasternak, A.O., van den Born, E., Spaan, W.J., Snijder, E.J., 2003. The stability of the duplex between sense and antisense transcription-regulating sequences is a crucial factor in arterivirus subgenomic mRNA synthesis. *Journal of virology*, 77(2), pp.1175-1183.
- Pasternak, A.O., Spaan, W.J., Snijder, E.J., 2004. Regulation of relative abundance of

arterivirus subgenomic mRNAs. *Journal of virology*, 78(15), pp.8102–8113.

Pedersen, K.W., van der Meer, Y., Roos, N., Snijder, E.J., 1999. Open reading frame 1a encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex. *Journal of virology*, 73, pp.2016-2026.

Philippe Le Mercier, P., 2020. Betaarterivirus ~ Viralzone Page. [online] Viralzone.expasy.org. Disponible en: <<https://viralzone.expasy.org/7776>> [Accedido el 26 de septiembre de 2020].

Pileri, E. and Mateu, E., 2016. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary Research*, 47(1).

PRRSControl. 2020. *PRRS Virus Characteristics | PRRS Control*. [online] Disponible en: <<https://www.prrscontrol.com/the-prrs-virus/physical-and-chemical-characteristics/>> [Accedido el 26 de septiembre de 2020].

PRRSControl. 2020. *Types Of Vaccines Against PRRS Virus | PRRS Control*. [online] Disponible en: <<https://www.prrscontrol.com/vaccinology/types-of-vaccines-against-prrs/>> [Accedido el 27 de septiembre de 2020].

Rambaut, A., 2006. *Figtree*.

Ramos, N., Porley, D., Mirazo, S., Castro, G., Cabrera, K., Lozano, A. and Arbiza, J., 2017. Molecular study of Porcine Circovirus type 2 in wild boars and domestic pigs in Uruguay from 2010 to 2014: Predominance of recombinant circulating strains. *Gene*, 637, pp.230-238.

Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Cabrera, K., Osorio, F. and Arbiza, J., 2018. First-time detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in Uruguay. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), pp.352-356.

Rappe, J. C., García-Nicolás, O., Flückiger, F., Thür, B., Hofmann, M. A., Summerfield, A., & Ruggli, N., 2016. Heterogeneous antigenic properties of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid. *Veterinary research*, 47(1), p.117.

Rowland, R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D.A., 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Veterinary Microbiology*, 96(3), pp.219–35.

Segalés, J. and Mateu, E., 2012. One World, One Health: The Threat of Emerging and Re-Emerging Viral Infections of Pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59, pp.1-2.

Shi, C., Liu, Y., Ding, Y., Zhang, Y., Zhang, J., 2015. PRRSV receptors and their roles in virus infection. *Archives of Microbiology*, 197(4), 503–512.

Shi, M., Lam, T. T.-Y., Hon, C.-C., Hui, R. K.-H., Faaberg, K. S., Wennblom, T., Leung, F., 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Research*, 154(1-2), 7–17.

Shin, J., Torrison, J., Choi, C., Gonzalez, S., Crabo, B. and Molitor, T., 1997. Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. *Veterinary Microbiology*, 55(1-4), pp.337-346.

Shin, J.H., Kang, Y.B., Kim, Y.J., Yeom, S.H., Kweon, C.H., Lee, W.Y., Jean, Y.H., Hwang, E.K., Rhee, J.C., An, S.H., Cho, I.S., Oh, J.S., Joo, H.S., Choi, C.S., Molitor, T.W., 1993. Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. I. Detection of indirect fluorescent antibodies. *RDA Journal of Agricultural Science*, 35(2), pp.572-576.

Snijder, E.J., Kikkert, M., Fang, Y., 2013. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *Journal of general virology*, 94, pp. 2141–2163.

Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H.J., 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *Journal of virology*, 77(15), pp.8207–8215.

van Marle, G., Dobbe, J.C., Gultyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J., Snijder, E.J., 1999. Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21), pp.12056-12061.

Vilcek, S., Molnar, L., Vlasakova, M. and Jackova, A., 2015. The first detection of PRRSV in wild boars in Slovakia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 128(1-2), pp.31-33.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M., ter Laak, E. A., Bloemraad, M., de Kluyver, E. P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., & Wagenaar, F., 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The veterinary quarterly*, 13(3), pp. 121–130.

Wills, R.W., Doster, A.R., Galeota, J.A., Sur, J.H., Osorio, F.A., 2003. Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), pp.58–62.

Wissink, E., van Wijk, H., Kroese, M., Weiland, E., Meulenber, J., Rottier, P. and van Rijn, P., 2003. The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *Journal of General Virology*, 84(6), pp.1535-1543.

Wissink, E., Kroese, M., Maneschijn-Bonsing, J., Meulenber, J., van Rijn, P., Rijsewijk, F. and Rottier, P., 2004. Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production. *Journal of General Virology*, 85(12), pp.3715-3723.

Wissink, E., Kroese, M., van Wijk, H., Rijsewijk, F., Meulenber, J. and Rottier, P., 2005. Envelope Protein Requirements for the Assembly of Infectious Virions of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Virology*, 79(19), pp.12495-12506.

Wu, W., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R., Christopher-Hennings, J. and Nelson, E., 2001. A 10-kDa Structural Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Encoded by ORF2b. *Virology*, 287(1), pp.183-191.

Wu, W.H., Fang, Y., Rowland, R.R., Lawson, S.R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K.J., Nelson, E.A., 2005. The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Research*, 114(1-2), pp.177–181.

Xia, P. A., Dang, Z. G., Qiu, H., Fan, X., Zhou, B., Cui, B. A., & Chen, P. Y., 2009. Function of PRRSV GP5 envelope protein by using pseudotyped virus. *Veterinary Microbiology*, 138(3-4), 297–303.

Yan, Y., Xin, A., Liu, Q., Huang, H., Shao, Z., Zang, Y., Chen, L., Sun, Y. and Gao, H., 2015. Induction of ROS generation and NF- $\kappa$ B activation in MARC-145 cells by a novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Southwest of China isolate. *BMC Veterinary Research*, 11(1), p.232.

Yoon I.J., Joo H.S., Goyal S.M., Molitor T.W., 1994. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 6(3), pp.289–292.

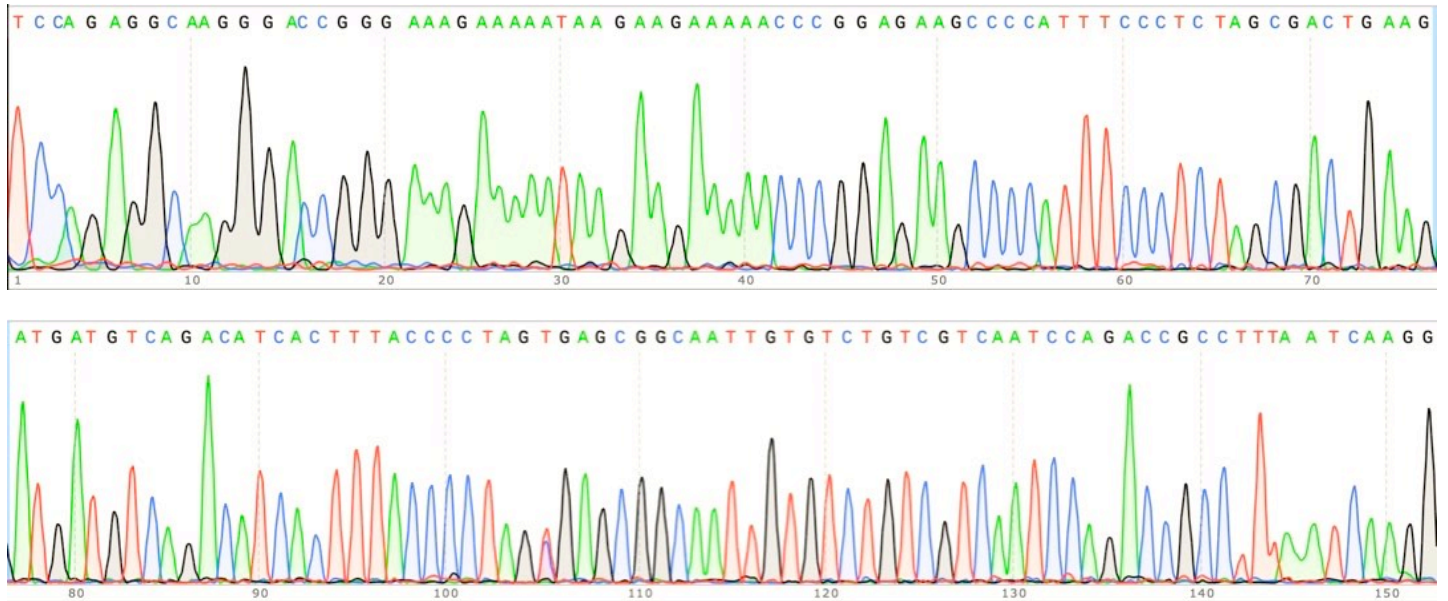
Yun, S.I., Lee, Y.M., 2013. Overview: replication of porcine reproductive and respiratory

syndrome virus. *Journal of microbiology*, 51(6), pp.711–723.

Zimmerman, J., Yoon, K., Wills, R. and Swenson, S., 1997. General overview of PRRSV: A perspective from the United States. *Veterinary Microbiology*, 55(1-4), pp.187-196.

# ANEXO

---



**Figura S1. Cromatograma de la secuencia del segundo pasaje de P por cultivo celular.** Se muestra el fragmento de la ORF7 secuenciado de la segunda ronda de PCR. La secuencia tiene un tamaño de 152 pb debido a que se debió eliminar el principio y el final por baja calidad en la secuenciación.