



SECCIÓN
VIROLOGÍA
FCIEN | UDELAR



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

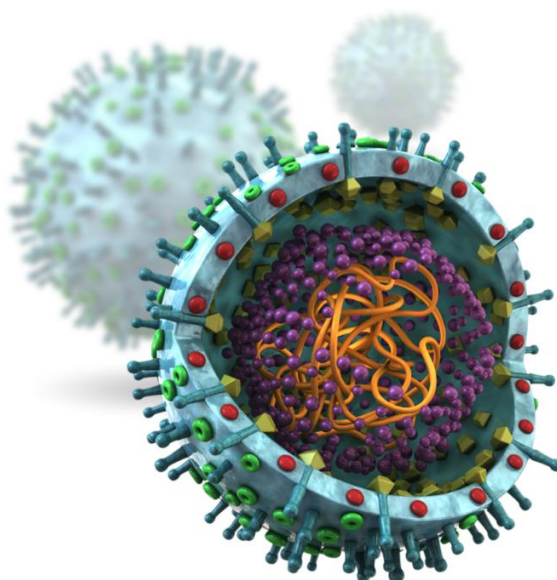


UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesina de Grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Implementación de una técnica de RT-qPCR con sonda TaqMan para la detección de PRRSV a partir de diferentes matrices



María Belén Bargas Ferreira

Noviembre, 2023

Orientadora: Natalia Ramos

Co-orientadora: Gabriela Betancour

AGRADECIMIENTOS

A Nati por acompañarme de manera incondicional en mis primeros pasos de la vida académica. Además de compartir su conocimiento y tiempo conmigo, me brindó una total confianza y seguridad. Su compañía sigue siendo fundamental para mi desarrollo académico y personal, estoy completamente agradecida.

A Gabi, por su acompañamiento en esta tesina y siempre estar apoyando y logrando sacar lo mejor en todos los sentidos.

A los integrantes de la Sección Virología, Adri, Sandra, Mabe y Juan, les agradezco por abrirme las puertas del laboratorio y estar presentes en el proceso. En especial, a Lu y a Santi que me hicieron los días más lindos.

A mi familia, mi mamá, mi papá, mis hermanos Santi y Emi, y a mi abuela Susana. Gracias eternas por confiar en mí, alegrarse con mis logros y motivarme como nadie en esta vida. Son la razón de mi inspiración para luchar y esforzarme por mis objetivos.

A Lu, mi amiga de la vida, quien siempre me saca una sonrisa y ha estado a mi lado sin pensarlo, alegrándose en las buenas y dando para adelante en las no tan buenas.

A mis amigos que me acompañaron a lo largo de toda la carrera: Romi, Cami, Lu, Joaquín, Pola, Sancho, Marta, Facu, Ordoqui, Giuli, Marcel, Belu, Isa y Nico, les agradezco por siempre estar presentes. Me llevo los más lindos recuerdos, con un sinfín de experiencias, no solo de la vida académica, sino también de compañía, apoyo y momentos hermosos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ARN	Ácido ribonucleico
Crio-EM	Crio-microscopía electrónica
CT	Cycle threshold (umbral de ciclos)
dNTP's	Desoxirribonucleótidos 5'-triforfatados
kb	Kilobase
MgCl ₂	cloruro de magnesio
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
<i>Nested</i> PCR	PCR anidada
nt	Nucleótidos
°C	Grados Celsius
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
ORF	Open Reading frame (Marco abierto de lectura)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRRS	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	Real time PCR con RT acoplada
sgRNA	ARNs subgenómicos
T _m	Temperatura de fusión
pb	Pares de bases
UV	Ultravioleta
μL	Microlitros
μM	Micromolar

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 EMERGENCIA DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO	7
1.2 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN Y GENOMA VIRAL	8
1.3 TAXONOMÍA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA	11
1.4 CICLO VIRAL	13
1.5 INFECCIÓN Y TRANSMISIÓN	16
1.6 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DE PRRSV	17
1.6.1 ESTUDIOS DE PRRSV EN URUGUAY	17
1.6.2 ESTUDIOS DE PRRSV EN LA REGIÓN	18
1.6.3 ESTUDIOS DE PRRSV EN JABALÍ	18
1.7 TÉCNICA DE RT-qPCR CON Sonda TAQMAN Y SU APLICACIÓN PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE PRRSV	19
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 RT-qPCR CON Sonda TAQMAN	22
4.1.1 CEBADORES Y Sonda	22
4.1.2 PROTOCOLO DE LA RT-qPCR CON Sonda TAQMAN	23
4.1.3 CONTROLES POSITIVOS	24
4.2 PROCESAMIENTO DE LAS DIFERENTES MATRICES	24
4.2.1 CERDO DOMÉSTICO	24
4.2.2 JABALÍ	25
4.3 DETECCIÓN SEROLÓGICA	26
4.4 EXTRACCIÓN DE ARN CON KIT COMERCIAL	28
4.5 RT-NESTED PCR	28
4.5.1 PROTOCOLO DE LA RT PARA LA REGIÓN ORF7	29
4.5.2 PROTOCOLO DE LA PRIMERA REACCIÓN DE PCR PARA LA REGIÓN ORF7	29
4.5.3 PROTOCOLO DE LA SEGUNDA REACCIÓN DE PCR PARA LA REGIÓN ORF7 ...	30
4.5.4 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	30
4.5.5 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS	31

4.6	RT-qPCR CON Sonda TaqMan a partir de las diferentes matrices	31
5.	RESULTADOS	32
5.1	Puesta a punto de la RT-qPCR	32
5.2	Resultados de la detección serológica	37
5.3	RT-nested PCR	38
5.3.1	Detección molecular en muestras de cerdos	38
5.3.2	Detección molecular en muestras de jabalí	41
5.4	Análisis de las secuencias obtenidas	41
5.5	RT-qPCR en las diferentes matrices	43
5.5.1	RT-qPCR en cerdos	43
5.5.2	RT-qPCR en jabalí	45
6.	DISCUSIÓN	47
7.	CONCLUSIONES	52
8.	PERSPECTIVAS	53
9.	BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), causado por el virus del PRRS (PRRSV), es una enfermedad de gran importancia económica que ha impactado significativamente en la producción porcina a nivel mundial durante más de tres décadas. En Uruguay, el virus fue reportado por primera vez en un estudio realizado en la Sección Virología de Facultad de Ciencias y publicado en 2018, donde se evidenció que PRRSV-2 circulaba en el país desde al menos el año 2011. Este hallazgo generó una alerta sanitaria y despertó un interés significativo en comprender el escenario epidemiológico regional y desarrollar herramientas para el monitoreo del estatus sanitario de PRRSV-2 en el país. En el presente trabajo, el objetivo principal fue implementar una técnica de RT-qPCR con sonda TaqMan para la detección de PRRSV en Uruguay. Hasta el momento para estudiar la circulación de este virus, ha sido utilizada en nuestro laboratorio la técnica RT-*Nested* PCR, que si bien es una herramienta sensible, es laboriosa y consume mucho tiempo. La puesta a punto de la RT-qPCR implicó el diseño adecuado de los cebadores y la sonda, utilizando como controles positivos muestras de ARN identificadas previamente como positivas por nuestro grupo de investigación. Esto nos ha proporcionado una herramienta adicional, sensible y rápida para la detección de PRRSV en diversas muestras biológicas. La implementación de la técnica de RT-qPCR en diferentes matrices ha desprendido resultados alentadores, demostrando sobre todo que es una buena herramienta de detección molecular del virus en muestras de saliva. Esto será de gran utilidad para futuros estudios epidemiológicos y para el monitoreo viral en granjas. Por otro lado, en este trabajo se realizó por primera vez la detección molecular, no solo en saliva de cerdo, sino también en muestras de jabalíes de nuestro país. Además, la obtención de secuencias del virus a partir de estas muestras, ha proporcionado información sobre la especie y el potencial linaje al que pertenecen los virus identificados. Los resultados obtenidos subrayan la importancia de monitorear el virus y conocer sus características genéticas, tanto en la población salvaje como doméstica, para establecer una adecuada estrategia de control y prevención.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EMERGENCIA DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) provoca fallas en la capacidad reproductiva y dificultad respiratoria en porcinos de diferentes edades (revisado en Zhou et al., 2021). Las hembras preñadas son especialmente vulnerables a sufrir fallas reproductivas, manifestándose a través de abortos, muerte fetal y partos prematuros. Además, existe la posibilidad de que los lechones nazcan infectados de manera congénita, lo que incrementa significativamente el riesgo de mortalidad antes del destete. Los síntomas clásicos del PRRS que afectan al sistema respiratorio pueden variar en cuanto a su intensidad, abarcando distintos niveles de gravedad. Estos síntomas pueden afectar especialmente a los cerdos recién nacidos o en crecimiento generando desde una enfermedad moderada hasta una forma clínica severa (revisado en Lunney et al., 2016).

Este síndrome fue inicialmente identificado en el año 1987 en Estados Unidos y posteriormente en Alemania en el año 1990 (Wensvoort et al., 1991). Al tratarse de una enfermedad desconocida hasta entonces, se le denominó como "enfermedad misteriosa" o "enfermedad de la oreja azul" (Carman et al., 1995). El agente que causa esta enfermedad multifactorial es el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés), que fue aislado por primera vez en el año 1991 en Holanda, donde recibió el nombre de "Lelystad" (Wensvoort et al., 1991). En 1992, fue aislado en Estados Unidos y denominado "VR-2332" (Collins et al., 1992). En el transcurso de este mismo año, en el primer congreso internacional sobre esta enfermedad, realizado en Estados Unidos, fue descrita con el nombre de "síndrome respiratorio y reproductivo porcino" (Carman et al., 1995).

Las primeras evidencias del virus remontan a finales de los años 70 y principios de los años 80. Estudios serológicos retrospectivos, permitieron detectar anticuerpos contra el virus en sueros canadienses obtenidos en 1979 (Carman et al., 1995) y en Estados Unidos, no se registró la circulación del virus hasta 1985 (Zimmerman et al., 1997). Por otro lado, se encontraron anticuerpos contra PRRSV en sueros de Corea del Sur en 1985 y se reportó la presencia del virus en Japón en 1988 (Shin et al., 1993). Estos hallazgos demuestran que PRRSV se propagó a diversas partes del mundo antes de su descubrimiento.

En la actualidad, PRRSV tiene un impacto en el ámbito económico, ocasionando consecuencias significativas a nivel mundial en la industria porcina (Shi et al., 2010). Pasadas tres décadas desde su descubrimiento, esta enfermedad viral se considera una de las más perjudiciales y de las que genera mayores pérdidas económicas en esta industria. Además, es importante destacar que PRRSV es un patógeno de notificación obligatoria ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) (Pileri & Mateu, 2016). Dado el considerable impacto global de PRRSV, resulta crucial generar información y herramientas que permitan su erradicación o, en su defecto, un control efectivo. En relación a la información disponible, se ha observado la presencia de PRRSV en cerdos domésticos y jabalíes, y no se ha registrado infección de este virus en organismos no porcinos. Esto resalta la especificidad de PRRSV hacia los porcinos y la importancia de enfocar los esfuerzos en el control y prevención de la enfermedad en este sector (Kappes & Faaberg, 2015).

1.2 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN Y GENOMA VIRAL

A través de la técnica de crio-microscopía electrónica (crío-EM) se visualizó que los viriones son partículas envueltas y pleomórficas que presentan un diámetro de entre 50 y 74 nm, con un valor promedio de 54 nm y solo unas pocas partículas superan los 60 nm

(Dokland, 2010). En la superficie externa, PRRSV presenta una envoltura con perturbaciones causadas por las proteínas más abundantes, denominadas M y GP5. Además de la envoltura viral, presenta una nucleocápside de un diámetro promedio de 39 nm y, al igual que la envoltura, exhibe un tamaño y una forma variable y asimétrica (Figura 1) (Dokland, 2010; Spilman et al., 2009).

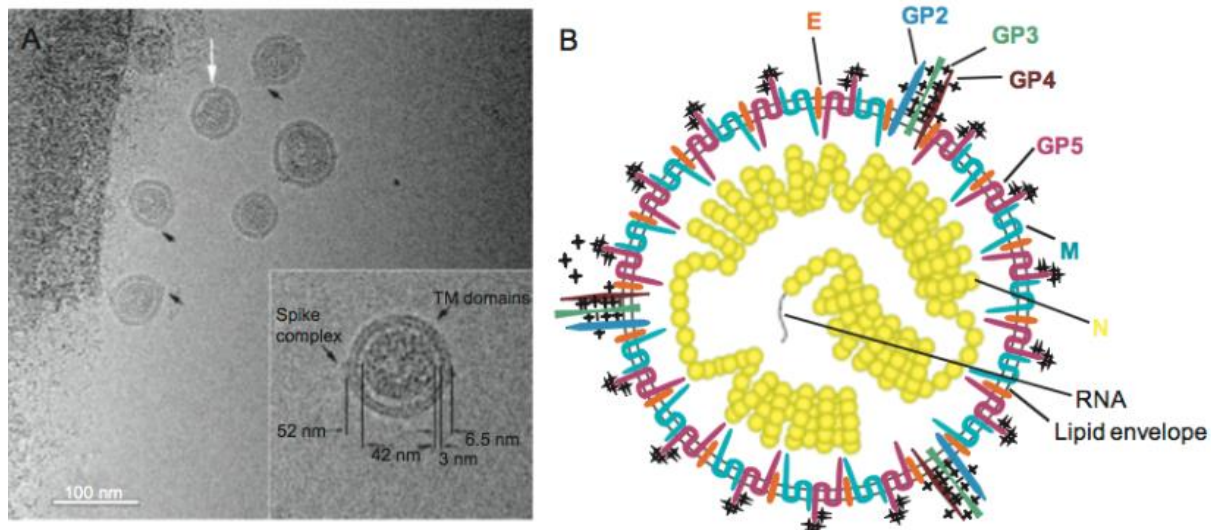


Figura 1. Estructura de los viriones. (A) Crio-EM de partículas de PRRSV donde la flecha blanca apunta a una partícula con un núcleo rectangular y las flechas negras indican características sobresalientes que se cree que corresponden a complejos de proteínas menores de la cubierta. El recuadro representa una sola partícula típica de PRRSV con las dimensiones indicadas. (B) Representación esquemática de la partícula, mostrando las proteínas estructurales de la envoltura y la proteína N de la nucleocápside. Imagen extraída de Spilman et al., 2009.

En lo que respecta a su organización genómica, PRRSV presenta un genoma de ARN de simple hebra de polaridad positiva y el tamaño del genoma oscila entre 14,9 kb y 15,5 kb (Kappes & Faaberg, 2015). El extremo 5' contiene una caperuza y el extremo 3' presenta una cola poli A, y regiones no codificantes conocidas como UTR (del inglés “untranslated región”), 5' UTR y 3' UTR, respectivamente (Kappes & Faaberg, 2015). El 5' UTR presenta variaciones que difieren entre las cepas de PRRSV (Yun & Lee, 2013). En dirección 3' corriente abajo, se encuentran dos marcos de lectura abiertos (ORFs) solapados, llamados ORF1a y ORF1b,

que abarcan aproximadamente tres cuartas partes del genoma viral. Estos ORFs codifican poliproteínas no estructurales involucradas en la replicación viral, denominadas pp1a y pp1ab. La poliproteína pp1a codifica para 10 proteínas no estructurales (nsp1 α , nsp1 β , nsp2, nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp7 α , nsp7 β y nsp8) y pp1ab da como resultado 4 proteínas no estructurales (nsp9, nsp10, nsp11 y nsp12). Estas poliproteínas comparten un sitio de inicio de traducción único, pero presentan cambios en el marco de lectura ribosomal (RFS1 y RFS2), lo que resulta en la producción de productos proteicos más pequeños (revisado en Kappes & Faaberg, 2015; revisado en Lunney et al., 2016).

Hacia el extremo 3'UTR se encuentran los restantes 8 ORFs, que son significativamente más pequeños que los ORFs anteriormente mencionados, y codifican para proteínas estructurales (Kappes & Faaberg, 2015). Por un lado, ORF2 a y b se traducen en una glicoproteína denominada GP2 y una proteína de envoltura no glicosilada (E), ORF3 codifica para GP3 y ORF4 codifica para GP4, ambas glicoproteínas. Por otro lado, ORF5a codifica la proteína ORF5a, una pequeña proteína no glicosilada y ORF5 codifica para la glicoproteína GP5. En cuanto a ORF6 codifica para la proteína de membrana (M). Finalmente, la proteína de la nucleocápside (N) es codificada por ORF7 (Figura 2) (Kappes & Faaberg, 2015) y dado al carácter altamente conservado de N se la utiliza para la detección molecular (Amonsin et al., 2009).

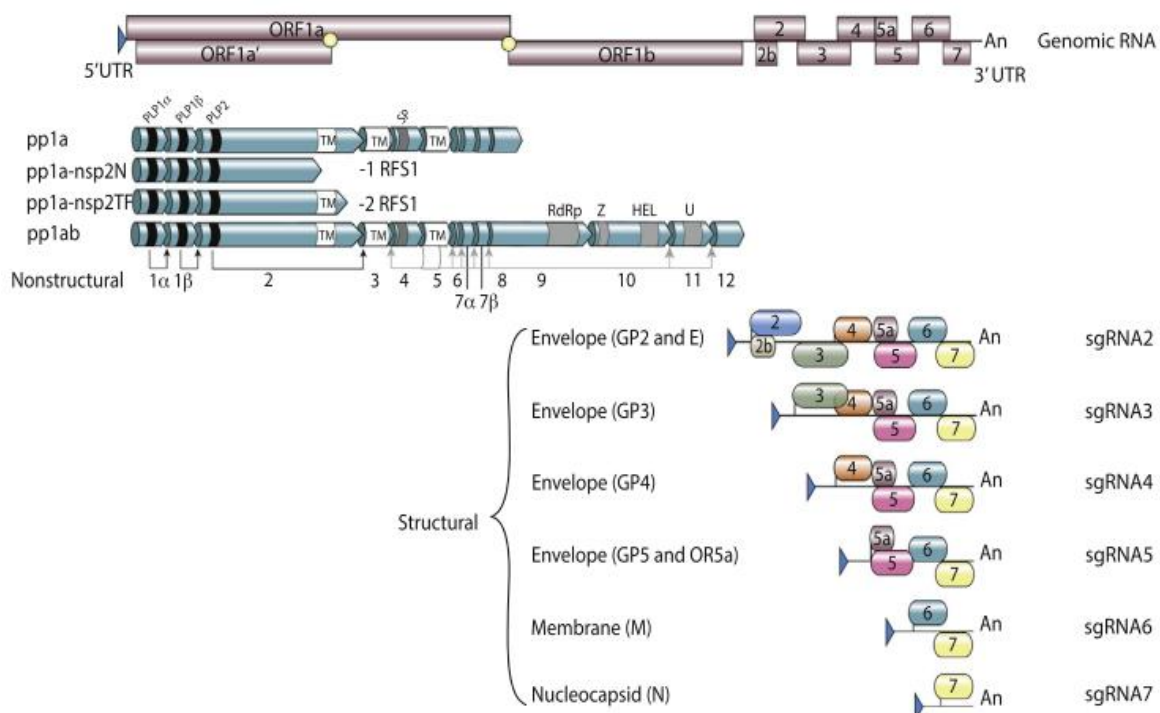


Figura 2. Estructura del genoma del PRRSV. Los primeros tres cuartos del genoma corresponden a los ORF1a y ORF1b que produce 4 poliproteínas (pp1a, pp1a-nsp2N, pp1a-nsp2TF, pp1ab). A continuación, se representan los ORFs subsiguientes (del ORF2 al ORF7) que codifican para proteínas estructurales a partir de la transcripción de 6 ARNs subgenómicos (sgRNA) que se traducen en las proteínas correspondientes. Adaptado de Kappes & Faaberg (2015).

1.3 TAXONOMÍA Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

PRRSV pertenece al orden *Nidovirales* y a la familia *Arteriviridae*. Esta familia está compuesta por el virus de la arteritis equina (EAV), el virus de la fiebre hemorrágica de simios (SHFV) y el virus elevador de lactato deshidrogenasa (LDV) del ratón (Brinton et al., 2021). Según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), pertenece al género *Betaarterivirus*, dividido en dos especies conocidas como tipo 1 y tipo 2 (PRRSV-1 y PRRSV-2, respectivamente). Estas especies han sido formalmente denominadas *Betaarterivirus suid 1* y *Betaarterivirus suid 2* (ICTV, 2023). El PRRSV-1 fue descubierto por primera vez en

Europa y PRRSV-2 fue identificado originalmente en Estados Unidos, por lo tanto, ambas especies virales también son conocidas como el tipo europeo y el tipo americano, representados por las cepas Lelystad y VR-2332, respectivamente (Meng et al., 1995). En la actualidad, ambas especies tienen una distribución global y son muy diferentes a nivel genético, comparten una identidad nucleotídica que se encuentra entre el 55 y el 70% e incluso, presentan diferentes serotipos. Sin embargo, la organización genómica es similar, los años de emergencia son similares y los síntomas que producen son semejantes (Tong et al., 2007).

La variabilidad genética de ambas especies permite que el virus pueda adaptarse a la inmunidad presente y emerger como nuevas variantes que pueden causar nuevos brotes (Morgan et al., 2013). La continua evolución de este virus se debe a la tasa de mutación y a los eventos de recombinación que presenta PRRSV. La tasa de sustitución nucleotídica del virus es extremadamente alta, oscila entre $4,7 \times 10^{-2}$ y $9,8 \times 10^{-2}$ sustituciones/sitio/año (Hanada et al., 2005). La tasa de recombinación mediante el mecanismo de *copy-choice* genera eventos de recombinación frecuentes (Forsberg, 2005). El conjunto de las altas tasas de recombinación y mutación provoca una gran diversidad en las cepas de PRRSV (Kappes & Faaberg, 2015).

Los estudios filogenéticos han revelado diferencias en las secuencias entre las especies, especialmente en la región ORF5. Esta región muestra una alta diversidad genética y se utiliza para los estudios de caracterización molecular tanto para diferenciar las especies como para detectar la diversidad intra-especie (Gao et al., 2017). Según el análisis de estas secuencias, dentro de las cepas de PRRSV-1 pueden identificarse 4 linajes (Fang et al., 2007) y dentro de las cepas de PRRSV-2 existe una diversidad genética aún mayor, con 9 linajes distintivos denominados L1-L9 (Shi et al., 2010).

1.4 CICLO VIRAL

Los porcinos son el único hospedero natural conocido de PRRSV y presentan un tropismo muy restringido hacia las células del linaje monocítico (revisado en Lunney et al., 2016). Además, se ha observado que las células dendríticas también pueden ser susceptibles a la infección por PRRSV, lo que sugiere su posible papel en la propagación y patogénesis del virus. Estos hallazgos demuestran la especificidad de PRRSV hacia ciertos tipos de células del sistema inmunológico porcino (revisado en Lunney et al., 2016).

El primer paso en la infección se da por la unión de PRRSV a receptores en la superficie de células específicas. Se ha demostrado que el complejo M-GP5 del virus cumple un papel importante en la unión inicial del virus al sulfato de heparán en la superficie celular (Delputte et al., 2005). Esta unión de baja afinidad puede ayudar a concentrar el virus en la superficie celular para facilitar la posterior unión a un receptor de mayor afinidad (Dokland, 2010). Para dar inicio a una infección productiva debe estar presente el receptor celular CD163, el cual es indispensable para la infección viral de PRRSV tanto *in vitro* como *in vivo* (Das et al., 2011; Nan., 2017). Este receptor interacciona con las proteínas estructurales (GP2 y GP4), generando el comienzo de la adsorción (Das et al., 2011). Sumado a CD163, otros receptores superficiales o factores de adhesión pueden actuar en la unión e internalización de PRRSV, estos son: sialoadhesina (CD169), heparán sulfato (HS), vimentina y CD151 (Shi et al., 2015).

Así, el virus es internalizado en la célula hospedera por un proceso de endocitosis mediado por receptor. Una vez dentro de la célula, el genoma del virus se libera en el citoplasma, donde se encuentra disponible para interactuar con los componentes celulares. El genoma viral de ARN de cadena positiva es reconocido por la maquinaria celular y utilizado como base para la síntesis de proteínas virales (revisado en Lunney et al., 2016).

El genoma de PRRSV se traduce en poliproteínas precursoras que posteriormente son procesadas mediante la acción de proteasas virales y celulares (Molenkamp, Van Tol & Rozier, 2000). Entre las proteínas generadas se van a procesar al menos 16 proteínas no estructurales que son las encargadas de replicar el ARN viral. Las proteínas se ensamblan y forman un complejo de replicación y transcripción viral implicado en la síntesis de ARN genómico y de ARNs subgenómicos (sgRNAs, por sus siglas en inglés). Esto ocurre en sitios de replicación formados por membranas del retículo endoplásmico (Fang et al., 2012). Una vez que los sgRNAs son generados y traducidos, forman las proteínas estructurales, que están implicadas en el ensamblaje de los nuevos viriones. Estas proteínas también desempeñan un papel importante en la interacción con el sistema inmunitario del hospedero, ya sea evadiendo o suprimiendo la respuesta inmunitaria (Meng., 2000).

Una vez que las proteínas estructurales del virus han sido sintetizadas, se lleva a cabo el ensamblaje de las partículas virales en el aparato de Golgi o en el lumen del retículo endoplasmático liso. Las partículas virales maduras se liberan de la célula hospedera mediante la vía de exocitosis (Figura 3) (revisado en Lunney et al., 2016).

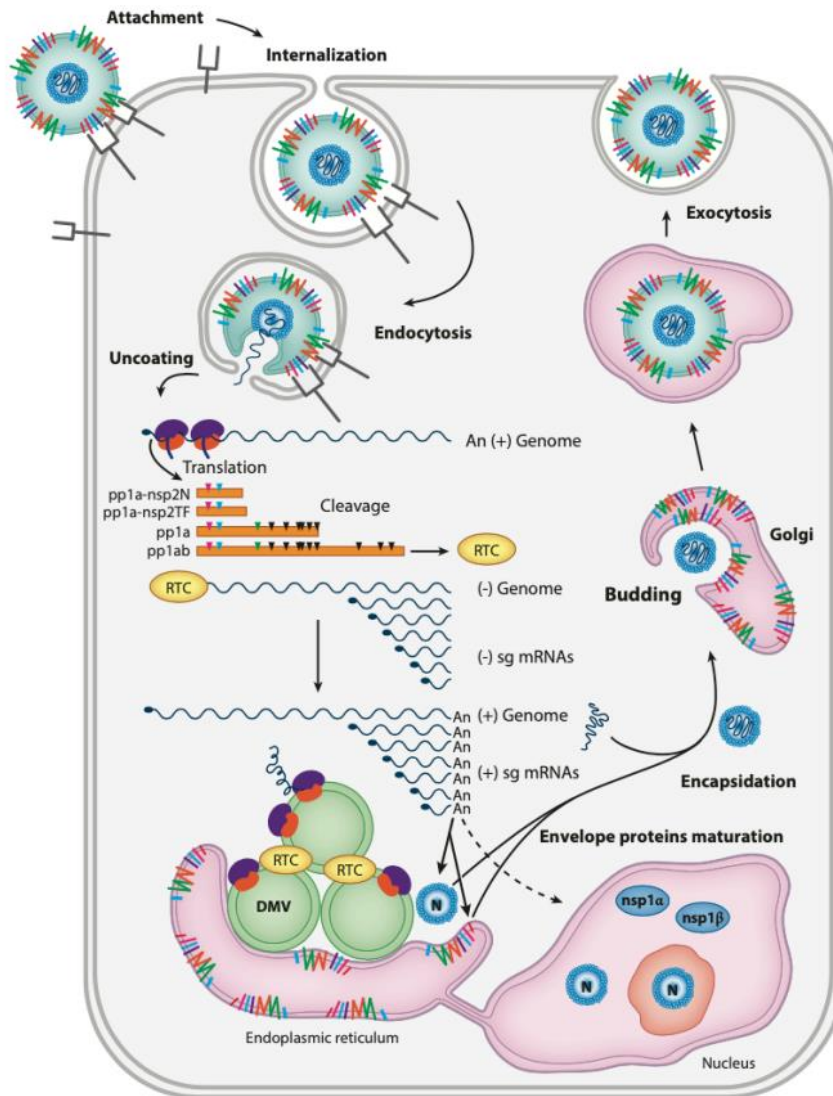


Figura 3. Ciclo replicativo de PRRSV. Después de la entrada por endocitosis mediada por receptores y posterior desnudamiento, se da la traducción del genoma que produce poliproteínas de replicación. Estas poliproteínas son clivadas por proteinasas internas virales para generar al menos 16 proteínas no estructurales, que se ensamblan en un complejo de replicación y transcripción (RTC). El RTC primero participa en la síntesis de ARN de cadena negativa para luego producir ARN genómico de cadena positiva y ARNs subgenómicos. Los ARN se empaquetan en nucleocápsides que quedan envueltas por la brotación de membranas intracelulares del aparato de Golgi. Los nuevos viriones se liberan de la célula mediante exocitosis. Imagen extraída de Lunney et al., 2016.

1.5 INFECCIÓN Y TRANSMISIÓN

La infección de PRRSV se divide en varias etapas, que incluyen una fase de infección aguda, una fase de persistencia y, una fase de extinción. Estas etapas presentan características distintas que afectan la respuesta inmunológica, y la manifestación clínica de la enfermedad (revisado en Lunney et al., 2016).

En la infección aguda, los pulmones son los sitios preferenciales para la infección y en esta etapa ocurre la transmisión transplacentaria (revisado en Lunney et al., 2016). La infección se produce tanto en pulmones como en el tracto respiratorio superior, lo que resulta en viremia luego de 6-12 horas pasada la infección. La viremia puede ser detectada hasta varias semanas post infección (revisado en Lunney et al., 2016).

En cuanto a la infección persistente, es una característica epidemiológica importante en los virus de la familia *Arteriviridae* (Allende et al., 2000). Durante esta etapa los animales no presentan signos de infección y la replicación se produce preferentemente en órganos linfoides, como las amígdalas y los ganglios linfáticos (revisado en Lunney et al., 2016). En relación a la detección de ARN viral, hay estudios que detectaron el virus en sueros hasta 250 días después de la infección (Wills et al., 2003).

Por último, en cuanto a la etapa de extinción, la replicación viral disminuye gradualmente hasta llegar a la extinción total del virus. Hasta el momento, no se sabe con exactitud cuando esto ocurre, pero la mayoría eliminan completamente el virus entre los 3 y 4 meses pasada la infección (revisado en Lunney et al., 2016).

Por otro lado, PRRSV presenta varias vías de transmisión, sin embargo, la ruta predominante se basa en el contacto directo entre animales sanos y enfermos. Este contacto puede ser a través de fluidos nasales, orales, vaginales, heces y semen (Rossow, 1998; Zhou

et al., 2021). Además, se puede producir una transmisión de tipo vertical que ocurre en el último trimestre de embarazo a través de la placenta afectando de esta manera al feto (revisado en Lunney et al., 2016). Esta forma de transmisión no depende de la virulencia de PRRSV, lo que significa que tanto las cepas de alta como baja virulencia pueden pasar la placenta con la misma eficiencia (revisado en Lunney et al., 2016). Como consecuencia de esta transmisión, pueden producirse muertes fetales, cerdos débiles o infectados que aparentan estar sanos (revisado en Lunney et al., 2016).

1.6 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DE PRRSV

1.6.1 ESTUDIOS DE PRRSV EN URUGUAY

En Uruguay, se han realizado diversos estudios sobre la circulación de PRRSV-2 que han contribuido a la comprensión de la situación epidemiológica de este virus en el país. En el año 2018, se publicó el primer estudio sobre la presencia de este virus en Uruguay (Ramos et al., 2018). Este estudio identificó la presencia de anticuerpos anti-PRRSV y se detectó el virus mediante diferentes técnicas (aislamiento en cultivo celular y detección molecular). A su vez, los ensayos serológicos evidenciaron que el virus circulaba en nuestro país desde al menos el año 2011 (Ramos et al., 2018). Para la detección molecular de PRRSV se utilizó la técnica de retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa anidada (*nested-PCR*). La técnica fue puesta a punto en la Sección Virología de Facultad de Ciencias por integrantes de nuestro equipo de trabajo. Con el fin de seguir monitoreando el escenario epidemiológico de PRRSV en Uruguay, se llevó a cabo una actualización del estado de su circulación en el período de 2017 a 2019 (Puig, 2020). Los virus identificados mediante el análisis del ORF7 resultaron estar estrechamente relacionados con cepas del linaje 5. Posteriormente, se realizaron estudios que evidenciaron la presencia de PRRSV-2 del linaje

1, el cual fue caracterizado tanto mediante el análisis de ORF7 como de ORF5 (Ramos et al., 2022).

El descubrimiento de la presencia de PRRSV en Uruguay tuvo un impacto significativo en la región y condujo a su declaración ante la Organización Mundial de Sanidad Animal en 2017. Es de vital importancia seguir estudiando y proporcionando información para la detección, control y contención de esta enfermedad porcina. Por lo tanto, es crucial avanzar en el desarrollo de metodologías sensibles y rápidas para la identificación de PRRSV y seguir contribuyendo al conocimiento científico en este campo.

1.6.2 ESTUDIOS DE PRRSV EN LA REGIÓN

Los datos sobre la circulación del virus en Sudamérica son escasos. Se ha reportado la presencia de PRRSV en Bolivia, Chile, Colombia, Perú, Venezuela, Ecuador y Uruguay. Actualmente, en Argentina y Brasil no han reportado la presencia del virus (OIE, WAHIS 2023).

1.6.3 ESTUDIOS DE PRRSV EN JABALÍ

En cuanto a la transmisión de PRRSV en jabalíes, se detectaron anticuerpos contra el virus en EE. UU. y varios países europeos (Vilcek et al., 2015). La detección del ARN viral fue reportada en Italia (Bonilauri et al., 2006), Alemania (Reiner et al., 2009), Lituania (Stankevicius et al., 2015) y Eslovaquia (Vilcek et al., 2015). Sin embargo, existen pocos datos sobre la distribución global de esta especie y en la actualidad no hay estudios publicados en Sudamérica. En particular, los jabalíes se han identificado como reservorios de otros virus, como los que causan la peste porcina clásica y la enfermedad de Aujeszky (Albina et al., 2000), por lo tanto, deben considerarse una fuente importante de infecciones virales para los cerdos domésticos dada su posible interacción. En Uruguay, según el Decreto N° 96/004 sobre Sanidad Animal y la Inclusión de Plaga Nacional (17 de marzo de 2004), los jabalíes

han sido declarados plaga nacional en el año 1982, por lo que hay libertad de caza. En relación a la detección de PRRSV en jabalí en nuestro país, se realizó un estudio serológico preliminar donde se reportó la circulación de anticuerpos contra PRRSV en el periodo de 2017 a 2019 (Puig, 2020). En dicho trabajo, se analizaron 81 muestras de sueros de jabalí por ELISA (del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y se encontró 1 seropositiva (Puig, 2020). Dados los antecedentes y la escasez de datos, es relevante profundizar con estudios en este hospedero de PRRSV.

1.7 TÉCNICA DE RT-qPCR CON SONDA TAQMAN Y SU APLICACIÓN PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE PRRSV

Se implementará en este trabajo la técnica de retrotranscripción seguida de una PCR en tiempo real (RT-qPCR), que nos brinda información sobre la presencia o ausencia de PRRSV. Para la implementación, se usará una sonda de hidrólisis, denominada sonda TaqMan. Esta sonda de ácido nucleico se hibrida de forma específica a una secuencia del producto de amplificación. En el extremo 5' de la sonda está unido un fluorocromo reportero que presenta su emisión apagada (o quencheada) por una segunda molécula unida al extremo 3' que actúa como desactivadora de la fluorescencia (*quencher*), esta molécula absorbe la emisión de la molécula reportera pero no emite fluorescencia. Cuando la sonda está intacta no hay emisión del fluorocromo. En cambio, cuando ocurre la amplificación y hay actividad 5' a 3' exonucleasa de la polimerasa, se produce la degradación de la sonda. Como consecuencia, se separan el *quencher* y el fluorocromo, generando emisión de fluorescencia (Figura 4). Observando la fluorescencia podemos detectar la presencia del fragmento que se está amplificando (Navarro

et al., 2015). Para utilizar la técnica de RT-qPCR con TaqMan es relevante realizar un correcto diseño de la sonda para una mejor eficiencia de reacción.

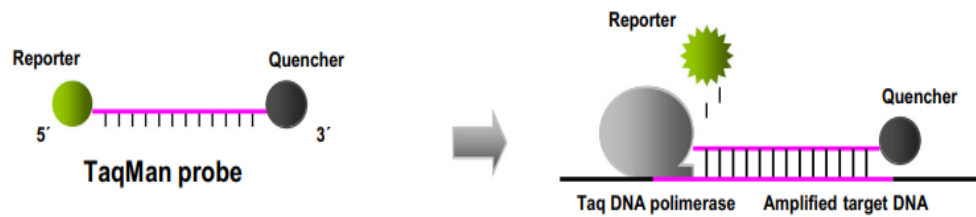


Figura 4. Estructura y mecanismo de la sonda TaqMan. La sonda TaqMan consta de un oligonucleótido al cual se le ha unido un fluoróforo en su extremo 5' mediante una unión covalente, y un *quencher* en el extremo 3'. Durante el proceso de amplificación, la enzima Taq DNA polimerasa muestra actividad exonucleasa 5', lo que lleva al clivaje de la sonda y, como resultado, se produce fluorescencia. Imagen extraída de Navarro et al., 2015.

La RT-qPCR es utilizada y considerada efectiva para la detección viral. Esta técnica ha demostrado ser sensible y específica en la identificación molecular de PRRSV en muestras de porcinos. A su vez, proporciona resultados rápidos, lo que la convierte en una buena elección para el diagnóstico y monitoreo de esta enfermedad en cerdos y jabalíes (Balka et al., 2009; Egli et al., 2001). Hay varios estudios en los que aplican esta técnica para la detección del virus, amplificando particularmente la región ORF7 (Lurchachaiwong et al., 2008; Shi et al., 2016; Chen et al., 2021).

Además, tiene como ventaja que es posible acoplar el proceso de retrotranscripción, amplificación y detección en un mismo paso, disminuyendo los márgenes de contaminación y errores por manipulación. Esta técnica no es utilizada actualmente en nuestro laboratorio para la detección de PRRSV, por lo que se pretenderá ponerla a punto para implementarla en diferentes matrices.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La RT-qPCR es una técnica sensible y rápida para la detección de PRRSV, permitirá sustituir la técnica utilizada en el laboratorio actualmente (RT-*Nested* PCR) proporcionando resultados más rápidos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Este trabajo tiene como objetivo poner a punto una técnica de RT-qPCR con sonda TaqMan para la detección de PRRSV-2 y aplicar la herramienta optimizada en diferentes matrices, por lo que se usarán muestras pertenecientes a cerdos domésticos y jabalíes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar los cebadores y la sonda para la detección de PRRSV con la técnica de RT-qPCR.
2. Optimizar la técnica de RT-qPCR (presencia/ausencia) utilizando muestras positivas anteriormente identificadas en el laboratorio por RT-*nested* PCR.
3. Aplicar la RT-*nested* PCR en las muestras de diferente naturaleza (órgano, saliva, materia fecal y sangre) provenientes de cerdos y jabalíes.
4. Implementar la herramienta de RT-qPCR previamente optimizada en las muestras y comparar los resultados obtenidos por ambas metodologías.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 RT-qPCR CON SONDA TAQMAN

4.1.1 CEBADORES Y SONDA

Para la técnica de RT-qPCR se diseñaron y mandaron a sintetizar los cebadores y la sonda al servicio de MacroGen (Corea). Para el diseño, se llevó a cabo un alineamiento utilizando la herramienta ClustalW del programa MEGA (por sus siglas en inglés, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Este alineamiento se realizó utilizando secuencias de referencia de PRRSV-2 de la región ORF7, así como secuencias previamente identificadas en nuestro laboratorio, las cuales fueron obtenidas de la base de datos de NCBI (por sus siglas en inglés, *National Center for Biotechnology Information*). Este análisis permitió identificar las regiones conservadas en los diferentes linajes del virus para diseñar los cebadores específicos y la sonda. La sonda, por su parte, se diseñó para ubicarse dentro de la región a amplificar y que hibride con una zona altamente conservada, lo que aumenta la especificidad de la detección y reduce la posibilidad de resultados falsos negativos.

Se tuvo en cuenta que los cebadores cumplan con ciertos requisitos y consideraciones para potenciar su eficiencia y especificidad. Para el análisis de los cebadores elegidos se utilizó el programa *Multiple Primer Analyzer Thermo Fisher scientific*. En primer lugar, se observó que presenten una longitud adecuada, entre 18 y 24 pares de bases (pb). Además, se analizó la temperatura de fusión o de *melting* (T_m) y se estableció un rango de temperatura entre 52 y 69°C para los cebadores, asegurando además que ambos tuvieran valores de T_m similares. Por otro lado, el análisis también implicó la identificación de la probabilidad de formación de dímeros o estructuras secundarias que pudieran afectar la eficiencia de la

reacción. Adicionalmente, se observó el contenido de G/C de los cebadores y se buscó que estuviera dentro del rango del 50- 60%. También se utilizó la herramienta BLAST (por sus siglas en inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*), para evaluar si estos cebadores se unían inespecíficamente a otras regiones del genoma viral o a otras secuencias no virales. Se los denominó ORF7F y ORF7R.

Por otro lado, la sonda TaqMan utilizada en este trabajo, denominada ORF7S, fue diseñada con una doble marca. En el extremo 5' de la sonda se incorporó el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3' de la sonda se utilizó BHQ1 (por sus siglas en inglés, *Black Hole Quencher 1*). Al diseñar la sonda se tuvo en cuenta que presente una longitud entre 20 a 30 pb, una T_m de 5 a 10 °C más alta que la de los cebadores y que presentarán un contenido de GC entre el 50 y 65 %. Por último, es recomendable que la secuencia no finalice con una G en el extremo 5' para evitar la extinción del fluoróforo 5'.

4.1.2 PROTOCOLO DE LA RT-qPCR CON SONDA TAQMAN

Se utilizó 10 µl del mix de reacción 2x *SensiFAST Probe Hi-ROX One-Step* (Bioline Meridian Bioscience™), 0.8 µl de cada cebador (ORF7F y ORF7R) 10µM, 0.2 µl de sonda (ORF7S) 10µM, 0.2 µl de enzima de retrotranscripción, 0.4 µl de inhibidor de ARNasa RiboSafe (10 U/µl), 3.6 µl de agua y 4 µl de ARN. El ciclado consistió en una etapa de incubación a 48°C durante 20 minutos, seguida de una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos y a continuación, se realizaron 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y una etapa a 60°C durante 1 minuto. Se utilizó un termociclador *Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System*.

La visualización de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el *software* StepOne™ v2.3. Para el análisis de los resultados, se tomó en cuenta el valor del umbral de ciclos o *cycle threshold* (denominado CT, por sus siglas en inglés) que corresponde al ciclo

en el que la señal fluorescente supera el umbral, indicando un resultado positivo. Este parámetro se utilizó para caracterizar las muestras como positivas o negativas para la presencia del ARN de PRRSV. En todas las pruebas que se realizaron en este trabajo se utilizó el umbral o *threshold* automático dado por el programa.

4.1.3 CONTROLES POSITIVOS

En una primera instancia, el protocolo fue probado con controles positivos que derivan de diferentes muestras de tejido pulmonar de cerdos con síntomas respiratorios previamente por nuestro grupo de investigación, denominados P2020.1 y P2020.2 (Ramos et al., 2022). A su vez, se utilizó un plásmido disponible en el laboratorio que contiene la región a amplificar, denominado pJet - PRRSV.

4.2 PROCESAMIENTO DE LAS DIFERENTES MATRICES

4.2.1 CERDO DOMÉSTICO

Las muestras de cerdo utilizadas en este estudio fueron obtenidas de casos clínicos asociados a sintomatologías compatibles con una infección por PRRSV o de cerdos asintomáticos de una granja. Se recibieron un total de 52 muestras, proporcionadas por veterinarios en el periodo 2021-2022, que incluyeron: placenta (n=1), feto (n=1), saliva (5), suero (n= 40) y materia fecal (n=5). Las diferentes muestras se procesaron con distintos protocolos.

Para la obtención de las muestras de saliva, se empleó una metodología novedosa y poco invasiva para los animales, que consistió en colocar una cuerda de algodón al alcance de los animales, permitiendo que estos depositaran su saliva en la misma al masticarla. La

cuerda se escurrió y se obtuvo la muestra de saliva. Posteriormente, se centrifugó a 2000 RPM durante 30 minutos, y se recolectó el sobrenadante resultante.

Las muestras de materia fecal se entregaron al laboratorio en hisopos sumergidos en un medio de conservación denominado DNA/RNA *shield* (ZymoResearch). Para su procesamiento, se homogeneizó la muestra en el hisopo con el *shield* (ZymoResearch) y se transfirió a un tubo estéril. En el caso de las muestras de órganos (placenta y feto), se procedió a la disgregación manual utilizando un bisturí y el contenido disgregado se transfirió a un tubo estéril con DNA/RNA *shield* (ZymoResearch). En cuanto a las muestras de suero, la sangre se recolectó en tubos sin anticoagulante y se centrifugaron a 5000 RPM durante 5 minutos para obtener el sobrenadante.

Las muestras se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta el momento de la extracción del ARN (ver punto 4.4). En el caso de las muestras de suero, primeramente, se realizó un tamizaje por ELISA (ver punto 4.3) y luego se seleccionaron 4 muestras para hacer extracción de ARN y detección molecular (ver puntos 4.4, 4.5 y 4.6)

4.2.2 JABALÍ

Por otro lado, se incluyeron en este trabajo 184 muestras de suero de jabalí de vida libre abatidos por cazadores en los departamentos de Artigas (n=91), Maldonado (n=25), Salto y Paysandú (n=68) en el periodo 2017-2020 (cedidas por el Dr. Santiago Mirazo). Se hizo el *screening* de anticuerpos y posteriormente, a las que dieron positivo por ELISA (ver punto 4.3) se le realizó extracción de ARN y detección molecular (ver puntos 4.4, 4.5 y 4.6).

4.3 DETECCIÓN SEROLÓGICA

Los ensayos de ELISA se llevaron a cabo utilizando el kit comercial IDEXX PRRS X3 Ab Test, siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante. Esta es una técnica inmunológica empleada para la detección de anticuerpos específicos contra el virus PRRSV en muestras de suero. Para ello, se utilizó una placa que contiene pocillos sensibilizados con un antígeno de PRRSV. Se añadieron las muestras de suero y los controles (positivos y negativos) suministrados por el kit en los pocillos de la placa. Si hay anticuerpos anti-PRRSV presentes en la muestra de suero, se unirán a los antígenos, por lo que se incubó la placa durante un período de 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con una solución de lavado, se secó la placa y se le agregó a cada pocillo un conjugado que posee acoplada a la peroxidasa de rábano, el cual se incubó durante 30 minutos. A continuación, se lavó 5 veces la placa para eliminar el conjugado libre. Para finalizar, se añadió un sustrato que reacciona con la peroxidasa de rábano, y se lo dejó incubar por 15 minutos. Pasados los 15 minutos, se agregó una solución de frenado y se procedió a medir la absorbancia con un espectrofotómetro ThermoFisher Scientific equipado con un filtro de 620 nm. Los resultados se compararon con controles incluidos en el kit y se estableció un valor umbral para determinar si las muestras son positivas o negativas.

Las lecturas de absorbancia obtenidas se utilizaron para interpretar los resultados de acuerdo con las fórmulas y criterios de validación del ensayo proporcionados en el manual del kit.

Cálculos

- Promedio del control negativo y positivo

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A (620) + CN2 A (620)}{2}$$

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A (620) + CP2 A (620)}{2}$$

- Validación del ensayo

$$CP\bar{x} - CN\bar{x} \geq \bar{0}.150$$

$$CNx \leq \bar{0}.150$$

- Cociente muestra/positivo (M/P) para determinar presencia de anticuerpos contra PRRSV

$$M/P = \frac{M(A620) - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

- Interpretación de las muestras

$$M/P < 0.40 \text{ Es negativo}$$

$$M/P \geq 0.40 \text{ Es positivo}$$

4.4 EXTRACCIÓN DE ARN CON KIT COMERCIAL

Luego del procesamiento que se les aplicó a las diferentes muestras que llegaron al laboratorio (detallada en el punto 4.2), se procedió a realizar la extracción de ARN con kit comercial dependiendo de la muestra a tratar. Por un lado, para la extracción del material genético de saliva, suero y materia fecal se utilizó el kit comercial Quick-DNA/RNA Viral Kit (ZymoResearch). A partir de los 200 µl de muestra se le agregó 400 µl de Viral DNA/RNA Buffer. La mezcla se transfirió a una columna de extracción y se siguieron las instrucciones del fabricante para los lavados y elución del material genético. El ARN se eluyó en 50 µl de agua libre de nucleasas. Por otro lado, para la extracción del ARN presente en los órganos (placenta y feto) se utilizó el kit comercial Quick-DNA-RNA *Pathogen Miniprep Kit* (ZymoResearch). Para llevar a cabo esta extracción, se tomó una cantidad de 200 µl de muestra, se le agregaron 2 µl de proteinasa K y 400 µl de Buffer Pathogen DNA/RNA. La mezcla resultante se transfirió a una columna de extracción y se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante del kit para los lavados y la elución de material genético. El ARN se eluyó utilizando 50 µl de agua libre de nucleasas.

4.5 RT-NESTED PCR

La técnica de retrotranscripción (RT) se utilizó para obtener el ADN copia (ADNc). La amplificación del fragmento de interés a partir del ADNc obtenido se realizó mediante *nested* PCR. Para esta técnica se utilizaron dos pares de cebadores: el primer par (PIRSEF/PIRSER) amplificó una región de 304 pb mientras que en la segunda ronda de amplificación se emplearon cebadores internos (PIRSIF/PIRSIR) específicos para amplificar un fragmento de 208 pb. Al utilizar un segundo juego de cebadores en la segunda ronda, se reduce la

posibilidad de obtener productos inespecíficos, lo que mejora la detección del fragmento de interés en las muestras analizadas. En este trabajo se utilizaron los cebadores diseñados por Shin et al., 1997. El protocolo fue puesto a punto en el laboratorio y utilizado en los trabajos Ramos et al 2018, 2022 y Puig, 2020. Para llevar a cabo los ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación del material genético se utilizó un termociclador de *Applied Biosystems*.

4.5.1 PROTOCOLO DE LA RT PARA LA REGIÓN ORF7

Para obtener el ADNc se utilizó la enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase de Invitrogen™ (*ThermoFisher Scientific*). Esta enzima disponible en el laboratorio se seleccionó debido a su menor tasa de error y mayor procesividad. En cuanto al procedimiento, se partió de 2.5 µl de ARN y se agregó 0.5 µl del cebador PIRSER 10 µM, 0.5 µl de dNTP's 10 mM y 2.5 µl de agua. Esta mezcla se incubó en el termociclador durante 5 minutos a 65 °C y luego se enfrió en hielo. A continuación, se agregaron 2 µl de Buffer SuperScript™ 5X, 1 µl de DTT 0.1 M, 0.5 µl de *ARNasa out* y 0.5 µl de SuperScript™ II (200 U/µl) al mix anterior. La mezcla completa se incubó en el termociclador durante 60 minutos a 42 °C y finalmente durante 15 minutos a 70 °C. El ADNc obtenido fue almacenado a -20 °C para su posterior análisis molecular.

4.5.2 PROTOCOLO DE LA PRIMERA REACCIÓN DE PCR PARA LA REGIÓN ORF7

Para la primera ronda de amplificación se utilizó un mix con 2.5 µl Taq Buffer 10X con KCl, 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.5 µl de dNTP's 10 mM, 0.75 µl de cada cebador (PIRSER y PIRSEF 10 µM), 0.15 µl la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase (5 U/µl), 13.35 µl de agua ultrapura y 5 µl de ADNc. El ciclado consistió en una desnaturalización a 94°C por 5 minutos,

seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 35 segundos y 72°C por 35 segundos, por último, una etapa de 72°C por 10 minutos.

4.5.3 PROTOCOLO DE LA SEGUNDA REACCIÓN DE PCR PARA LA REGIÓN ORF7

A partir de 1 µl del producto de la primera reacción se realizó la segunda ronda de PCR, en este protocolo se utilizó un mix con 2.5 µl de Taq Buffer 10X con KCL, 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.5 µl de dNTP's 10 mM, 0.75 µl de cada cebador (PIRSIR y PIRSIF 10 µM), 0.15 µl la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase (5 U/µl) y 17.35 µl de agua ultrapura. Con respecto al ciclado, la desnaturalización fue de 94°C por 5 minutos, luego 37 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 35 segundos y 72°C por 35 segundos, para finalizar 72°C por 10 minutos.

4.5.4 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Para visualizar los productos generados mediante la *nested* PCR, se tomaron 5 µL de cada producto de PCR y se sembraron en geles de agarosa al 1.5% preparados en TAE 1X. Los geles fueron teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen™). Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™). Posteriormente, los geles fueron expuestos a luz ultravioleta (UV) y se capturaron imágenes utilizando el software Carestream, diseñado para imágenes de biología molecular. Este proceso permitió visualizar y analizar los patrones de bandas en los geles, lo que facilitó la determinación de los tamaños de los fragmentos amplificados.

4.5.5 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Los productos de PCR donde se observó un amplicón de un tamaño esperado de 208 pb en el gel de electroforesis, se enviraron a purificar y secuenciar a MacroGen (Corea) con los cebadores de la segunda ronda de amplificación, PIRSIR y PIRSIF. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el Software BioEdit v7.2.5. De esta manera, se obtuvieron las secuencias consenso para cada muestra secuenciada y se compararon con secuencias de la base de datos de NCBI-GenBank utilizando la herramienta BLAST. Por último, se creó un archivo con las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la RT-*Nested* PCR en este trabajo, así como muestras uruguayas previamente detectadas y cepas de referencia de diferentes linajes. Para llevar a cabo el alineamiento de las diferentes secuencias, se empleó la herramienta ClustalW del programa MEGA. El árbol filogenético se construyó utilizando el método de *Maximum Likelihood* con una prueba de bootstrap de 1000 réplicas para evaluar la confiabilidad de las ramas del árbol. Además, se utilizó una secuencia de PRRSV-1 como grupo externo en el análisis filogenético.

4.6 RT-qPCR CON SONDA TAQMAN A PARTIR DE LAS DIFERENTES MATRICES

Por último, se llevó a cabo la detección de PRRSV mediante la herramienta de RT-qPCR en las diversas matrices, que incluían muestras de feto, placenta, saliva, suero y materia fecal de cerdos, así como muestras de suero de jabalí. Estas muestras fueron previamente sometidas a extracción de ARN y a la técnica de RT-*Nested* PCR. El protocolo utilizado para la RT-qPCR fue el mismo que se puso a punto inicialmente con las muestras positivas, tal como se detalló en el punto 4.1.2.

5. RESULTADOS

5.1 PUESTA A PUNTO DE LA RT-qPCR

Durante el proceso de optimización de la RT-qPCR, se tuvieron en cuenta varios parámetros para el diseño de los cebadores y la sonda TaqMan. Los cebadores elegidos ORF7F y ORF7R presentan longitudes de 21 y 18 pb, respectivamente. Asimismo, ORF7F presenta un contenido de guanina/citosina (G/C) del 57%, mientras que ORF7R exhibe un contenido de G/C del 61%. La secuencia, posición en la que hibridan con el genoma y las T_m de los cebadores se muestra en la Tabla 1. El tamaño del amplicón resultante es de 113 pb, una longitud que se ubica dentro del intervalo óptimo aconsejado, que comprende entre 50 y 150 pb. Por otra parte, se diseñó una sonda con una longitud de 22 pb y un contenido de G/C del 68%. Además, la T_m es 6.5°C más alta que la de los cebadores (Tabla 1), lo que contribuye a la estabilidad y especificidad de la reacción de amplificación y, por último, la sonda no finaliza con una G en su extremo 5'.

Tabla 1. Cebadores y sonda diseñados para RT-qPCR. En esta tabla se presentan las características de los cebadores y la sonda diseñados y sintetizados para la RT-qPCR. Se incluye la T_m y la posición correspondiente en el genoma, expresada en pb. Para determinar la posición se utilizó una cepa de referencia de PRRSV-2 con el número de acceso NC_038291.1, disponible en la base de datos del NCBI.

CEBADORES Y SONDA	SECUENCIA 5' → 3'	TM (°C)	POSICIÓN EN EL GENOMA (PB)
Cebador Forward ORF7F	CCAGTCAATCAGCTGTGCCAG	68.6	14939 - 14960
Cebador Reverse ORF7R	AAATGGGGCTTCTCCGGG	68.6	15034 -15052
Sonda ORF7S	FAM-CCAGTCCAGAGGCAAGGGACCG-BHQ1	75.1	14989 -15011

En una primera etapa, se evaluó la eficacia de los cebadores y la sonda utilizando muestras de ARN positivas por RT-*nested* PCR. Además, se empleó un plásmido como parte del proceso de optimización de la técnica. La confirmación de que los cebadores y la sonda funcionan adecuadamente con estos controles respalda la posibilidad de que la RT-qPCR es capaz de detectar correctamente la presencia o ausencia del virus.

La curva de amplificación que se observa en la figura 5 muestra los resultados al utilizar un control positivo de ARN (P2020.1) y un control negativo (H2O libre de ARNasas). Esta representación gráfica ilustra la capacidad de la RT-qPCR para discernir entre muestras que contienen el material genético del virus y aquellas que no lo contienen. Por otro lado, en la figura 6 se exhiben los resultados obtenidos al aplicar la técnica con un plásmido y con un control positivo de ARN (P2020.2). Cabe resaltar, que ambos tipos de controles pertenecen a virus de linajes distintos (L5 y L1, respectivamente).

Los valores de CT de las muestras de ARN positivas, el plásmido y el control negativo se observan en las tablas 2 y 3.

Es relevante destacar que el plásmido no es un buen control positivo para un virus ARN como PRRSV, porque al ser de ADN no se estaría contemplando el paso de la retrotranscripción. Además, el plásmido tiene una concentración mayor en comparación al que presentan las muestras, esto da lugar a un aumento en la amplificación provocando un CT más bajo que el CT que puede presentar una muestra (Figura 6, Tabla 3). Esto puede generar a su vez problemas de contaminación durante el procedimiento. Por este motivo, para el análisis posterior de las diferentes matrices se utilizaron únicamente como controles positivos de la técnica muestras derivadas de tejido pulmonar de cerdos infectados con PRRSV. Es importante aclarar que los controles de ARN utilizados en los diferentes ensayos de esta tesina provienen de muestras de animales diferentes, aunque de la misma granja.

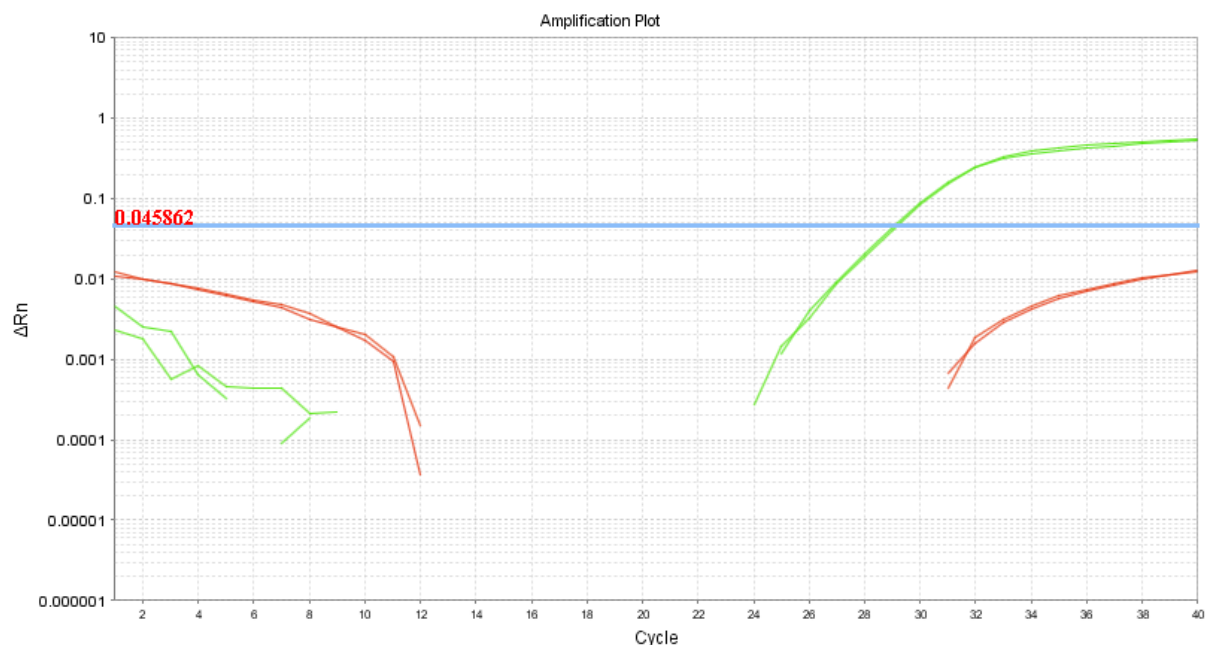


Figura 5. Curva de amplificación de un control positivo (muestra de ARN positiva para PRRSV por RT-Nested PCR) que muestra la emisión de fluorescencia en función del número de ciclos. Se observa el control positivo de ARN (P2020.1) en verde y el control negativo en rojo.

Tabla 2. Resultados de RT-qPCR en controles positivo y negativo. Se observa el nombre de la muestra analizada, el color correspondiente en el gráfico y el valor promedio del CT obtenido a partir de las réplicas realizadas.

Muestra	Color en el grafico	CT promedio
P2020.1 (Muestra de ARN, control positivo)	Verde	28
Control negativo	Rojo	No detectable

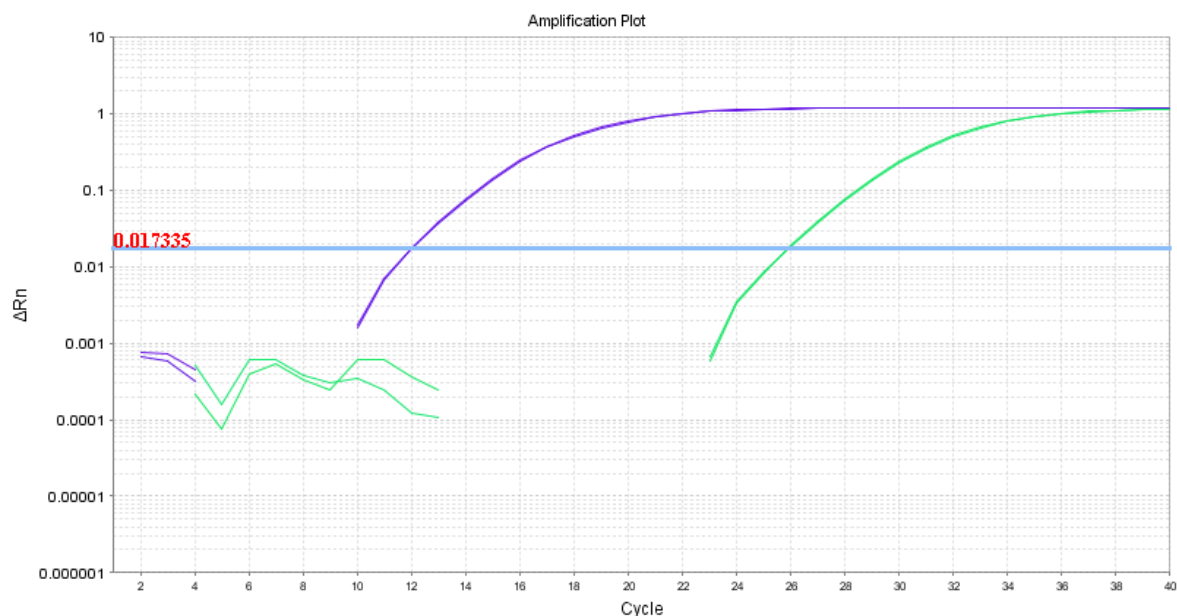


Figura 6. Curva de amplificación de un plásmido y de un control positivo de ARN que muestra la emisión de fluorescencia en función del número de ciclos. El plásmido está representado en color azul y el control positivo de ARN (P2020.2) en verde.

Tabla 3. Resultados de la detección del plásmido y un control positivo de ARN. Se muestra el nombre de la muestra analizada, el color correspondiente en el gráfico y el valor promedio del CT obtenido a partir de las réplicas realizadas.

Muestra	Color en el grafico	CT promedio
pJet – PRRSV (Plásmido, control positivo)	Azul	12
P2020.2 (Muestra de ARN, control positivo)	Verde	25

5.2 RESULTADOS DE LA DETECCIÓN SEROLÓGICA

Se llevó a cabo un análisis de la presencia de anticuerpos contra PRRSV en cerdos y jabalíes con el propósito de realizar un tamizaje y evitar la detección molecular en todos los sueros. Como resultado de esta evaluación, se seleccionaron 8 muestras (4 de cerdo y 4 de jabalí) para continuar con las demás técnicas.

En una primera instancia, se evaluó la presencia de anticuerpos contra PRRSV en cerdos. Se analizaron 40 muestras de sueros de las cuales todos fueron seronegativas, dado que ninguna era igual o mayor a 0.40 (ver punto 4.3). Se eligieron 4 de las que tuvieron un valor cercano a 0,40 para detección molecular (ver punto 5.3.1.3)

Por otro lado, se estudiaron 184 muestras de jabalí de los departamentos de Artigas, Maldonado y Paysandú-Salto y se obtuvieron 4 muestras seropositivas en Paysandú-Salto denominadas 634, 636B, 640 y 639. Los valores correspondientes a cada muestra seropositiva se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las muestras seropositivas de Jabalí. Se observan los datos de las muestras evaluadas, se considera positivo cuando el resultado es ≥ 0.40 por convención del kit comercial IDEXX.

Nombre de la muestra	Departamento	Positivo ≥ 0.40
634	Paysandú-Salto	0.451
636 B	Paysandú-Salto	0.477
640	Paysandú-Salto	0.440
639	Paysandú-Salto	0.405

5.3 RT-NESTED PCR

5.3.1 DETECCIÓN MOLECULAR EN MUESTRAS DE CERDOS

5.3.1.1 Caso inicial de aborto en una granja: análisis de muestra de feto y placenta

Inicialmente, se realizó la RT-Nested PCR en muestras de feto y placenta obtenidas a partir de un caso particular donde se había identificado un aborto en una cerda. En el carril 2 se visualiza el resultado de la muestra de feto donde se obtuvo una amplificación de un fragmento de 208 pb, que corresponde al tamaño esperado (Figura 7).

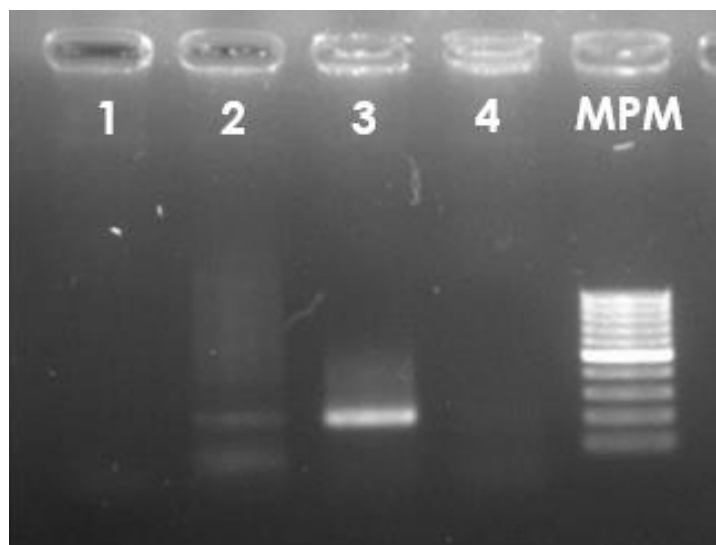


Figura 7. Detección molecular de PRRSV a partir de órganos por RT-nested PCR.

Se muestra el resultado de la segunda ronda de PCR donde se amplificó un fragmento de 208 pb perteneciente a la región ORF7 viral. Las muestras analizadas se indican con su respectiva enumeración. En el carril 1 se visualiza el resultado de la muestra de placenta y en el 2, el resultado de la muestra proveniente del feto. En el carril 3 indica el control positivo (P2020.2) y 4 el control negativo. El marcador de peso molecular, MPM, fue de 100 pb.

5.3.1.2 Salivas de madres y cría asociados temporalmente al caso inicial de aborto

En este trabajo se empleó una metodología sumamente innovadora para la recolección de muestras de saliva (Figura 8), que se destaca por ser un procedimiento no invasivo para los animales y que nos brinda información a nivel poblacional al momento de monitorear una infección viral en una granja.

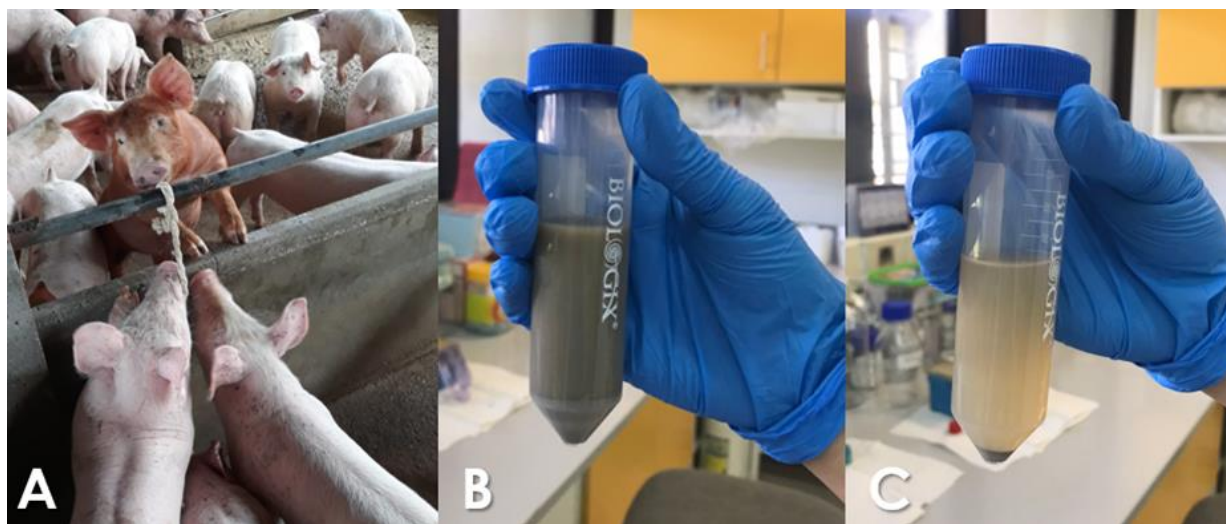


Figura 8. Obtención de saliva mediante cuerdas de algodón. (A) Se observa la cuerda de algodón que se expone a los animales, permitiendo que depositen su saliva en ella. (B) Una vez depositada la saliva en la cuerda se traspasa el material a un tubo falcon para posteriormente centrifugarla. (C) Una vez centrifugada se obtiene el sobrenadante con una reducción de material no deseado para lograr una extracción de ARN de buena calidad.

Justamente, debido al caso puntual de aborto de una cerda, luego se evaluó la presencia del virus a nivel poblacional en la granja y es por ello que fueron enviadas a nuestro laboratorio muestras de saliva de madres y de lechones de cría al mes de que ocurrió el caso de aborto. En el carril 2 se observa el resultado proveniente de la saliva de las madres, donde se logró amplificar un fragmento de 208 pb, observándose una banda muy tenue en el gel de agarosa (Figura 9).

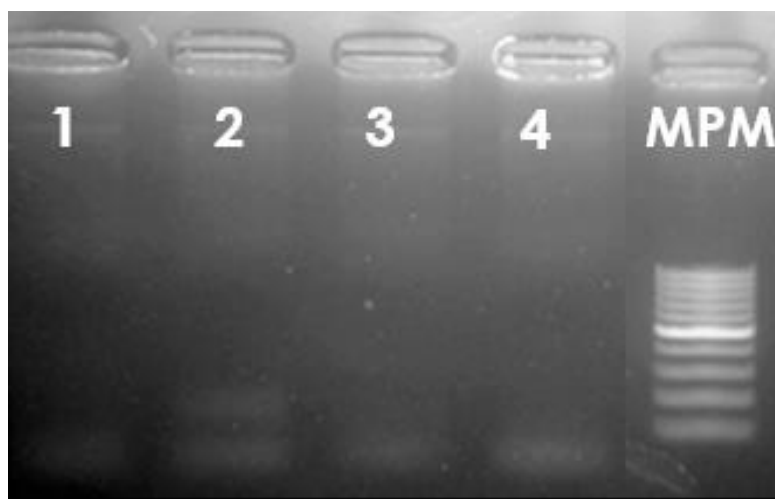


Figura 9. Detección molecular de PRRSV a partir de muestras de salivas por RT-*nested* PCR. Electroforesis en gel de agarosa del resultado de la segunda ronda de PCR donde se amplificó un fragmento de 208 pb de la región ORF7 viral por RT-*nested* PCR. Carril 1: saliva de recría; carril 2: saliva de madres; Carriles 3 y 4: controles negativos de ambas rondas de PCR y MPM: marcador de peso molecular, de 100 pb.

5.3.1.3 Materias fecales, sueros y salivas obtenidos de la misma granja un año posterior al caso inicial

Luego del caso inicial y del monitoreo en muestras de saliva, se continuó tiempo después con la evaluación el estatus sanitario de la granja en relación a la presencia de PRRSV. Para esto, fueron tomadas muestras de distintas matrices un año después del caso puntual de aborto. Las muestras de materia fecal (n=5), suero (n=4) y saliva (n=3, lechones de destete y engorde) resultaron negativas con la técnica de RT-*nested* PCR aplicada.

5.3.2 DETECCIÓN MOLECULAR EN MUESTRAS DE JABALÍ

Se analizaron por RT-*nested* PCR las 4 muestras de jabalí seropositivas por ELISA (ver punto 5.2). Se obtuvo un amplicón del tamaño esperado en 2 de las 4 muestras, en particular, se observa la amplificación en los carriles 1 y 2, resultado de la muestra 636 B y 634, respectivamente (Figura 10).

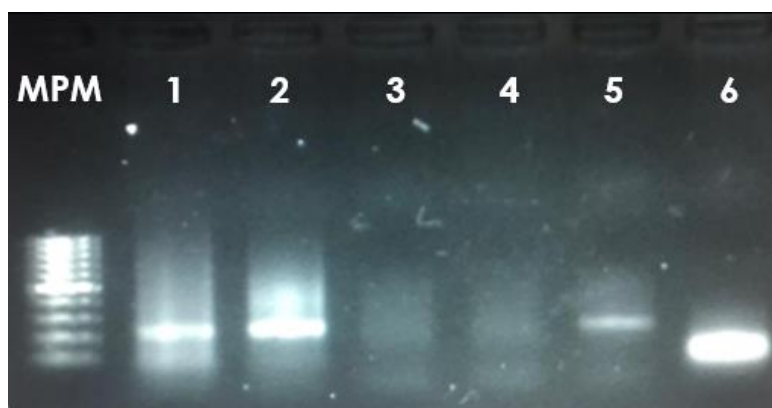


Figura 10. Detección molecular de PRRSV a partir de las muestras de jabalí analizadas previamente por ELISA. Electroforesis del resultado de la segunda ronda de PCR donde se amplificó un fragmento de 208 pb de la región ORF7 viral por RT-*nested* PCR. El carril 1 corresponde a la muestra 636 B, el 2 a la muestra 634, el 3 a la muestra 640 y el 4 a la muestra 639. En el carril 5 se observa el control positivo de ARN (P2020.2) y en el 6 el negativo. El marcador de peso molecular, MPM, fue de 100 pb.

5.4 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Los productos de amplificación de la RT-*Nested* PCR de cerdo y jabalí se mandaron a secuenciar a Macrogen (Corea). En el caso de la única muestra de saliva de las madres que había presentado una banda del peso molecular esperado (ver figura 8), no presentó concentración suficiente para mandar a secuenciar. Las tres secuencias obtenidas en este

trabajo, una muestra de cerdo (feto) y dos muestras de jabalí (636 B y 634), se analizaron mediante BLAST y se pudo confirmar que corresponden a PRRSV-2. Posteriormente, se realizó un análisis filogenético y se observó que las muestras obtenidas de jabalí mostraron una mayor similitud con las muestras del linaje 5, mientras que la muestra de feto presentó una mayor relación con las secuencias del linaje 1 (Figura 11). Para confirmar el linaje de los virus identificados se debería estudiar la región ORF5.

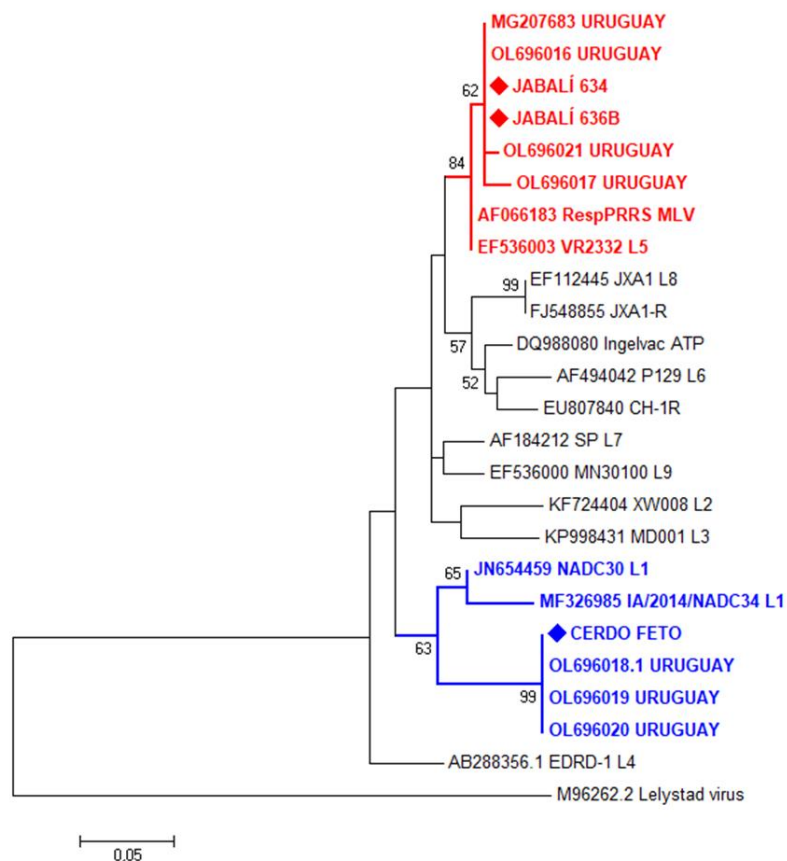


Figura 11. Análisis filogenético a partir de un fragmento de 208 pb de la región ORF7. Se observan las tres secuencias de PRRSV detectadas en este estudio. Las dos secuencias de jabalí (JABALÍ 634 y JABALÍ 636B) están estrechamente relacionada con el L5 (marcado en rojo) y, por otro lado, la secuencia obtenida del feto (CERDO FETO) está relacionada con el L1 (marcado en azul). El grupo externo utilizado es una secuencia de PRRSV-1.

5.5 RT-qPCR EN LAS DIFERENTES MATRICES

5.5.1 RT-qPCR EN CERDOS

Como se mencionó previamente, se llevó a cabo la detección de PRRSV mediante la técnica de RT-*Nested* PCR en las muestras de feto y placenta. Los resultados revelaron la presencia del virus en el feto, pero no se logró detectar en la placenta. La aplicación de la técnica de RT-qPCR en las mismas muestras confirmó la presencia de PRRSV exclusivamente en el feto (Figura 12) con un CT de 25 (Tabla 5).

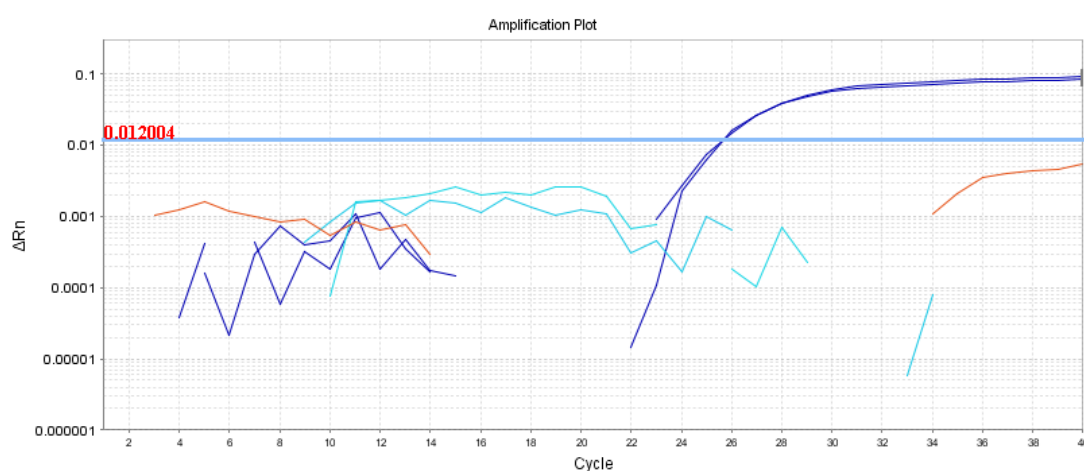


Figura 12. Amplificación por RT-qPCR de feto y placenta. Ensayo donde se analizó el feto y la placenta previamente estudiados mediante la RT-*Nested* PCR. En azul se muestra el resultado para la muestra de feto, en celeste el de la placenta y en rojo el control negativo.

Tabla 5. Resultado de la RT-qPCR de las muestras de feto y placenta. Se muestra el nombre de la muestra analizada junto con el valor del CT promedio desprendido de las réplicas realizadas.

Muestra	Color en el gráfico	CT promedio
Feto	Azul	25
Placenta	Celeste	No detectable
Control negativo	Rojo	No detectable

Por otro lado, se procedió al análisis de la muestra de saliva de las madres y las crías mediante RT-qPCR después de detectar la amplificación por la RT-Nested PCR en la saliva de las madres. Los resultados revelaron que tanto la saliva de las madres como la de las crías superaron el umbral de detección (Figura 13), produciendo un valor de CT de 28 para la saliva de las madres y 32 para las crías (Tabla 6).

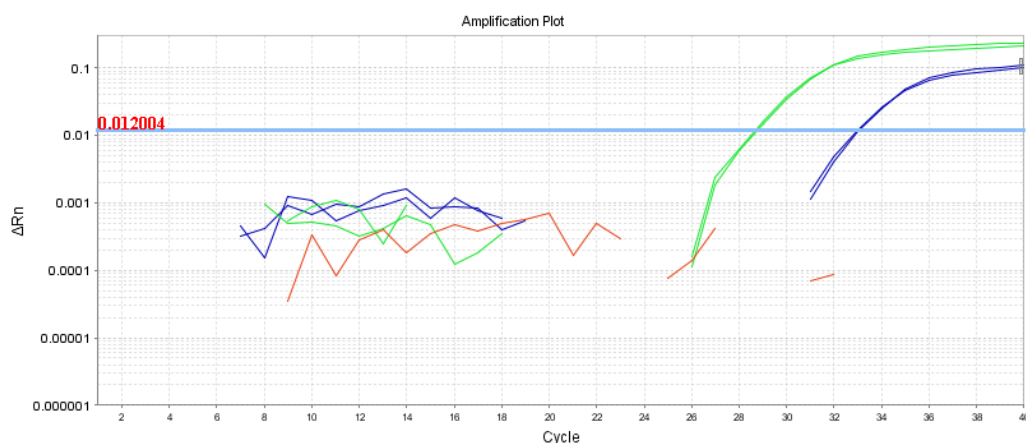


Figura 13. Gráfico de la RT-qPCR proveniente de la saliva de madre y de cría.

La saliva de la madre está representada en color verde, en azul se encuentra la saliva de la cría y en rojo el control negativo.

Tabla 6. Resultado de la RT-qPCR en muestras de saliva. Se muestra el nombre de la muestra analizada junto con el valor del CT promedio desprendido de las réplicas realizadas.

Muestra	Color en el gráfico	CT promedio
Saliva madre	Verde	28
Saliva cría	Azul	32
Control negativo	Rojo	No detectable

Las muestras negativas por RT-nested PCR, materias fecales (n=5), sueros (n=4) y salivas (n=3, lechones de destete y engorde), también resultaron negativas con la técnica de RT-qPCR.

5.5.2 RT-qPCR EN JABALÍ

Se analizaron mediante RT-Nested PCR las 4 muestras que habían resultado seropositivas en la prueba ELISA. Por esta técnica, se obtuvo un amplicón del tamaño esperado en 2 de las 4 las muestras (636 B y 634). Al utilizar RT-qPCR, 3 de las 4 muestras superaron el umbral de detección (363 B, 634 y 640) (Figura 14), con un valor de CT de 31 para la muestra 636 B, 34 para la muestra 634 y 35 para la muestra 640 (Tabla 7).

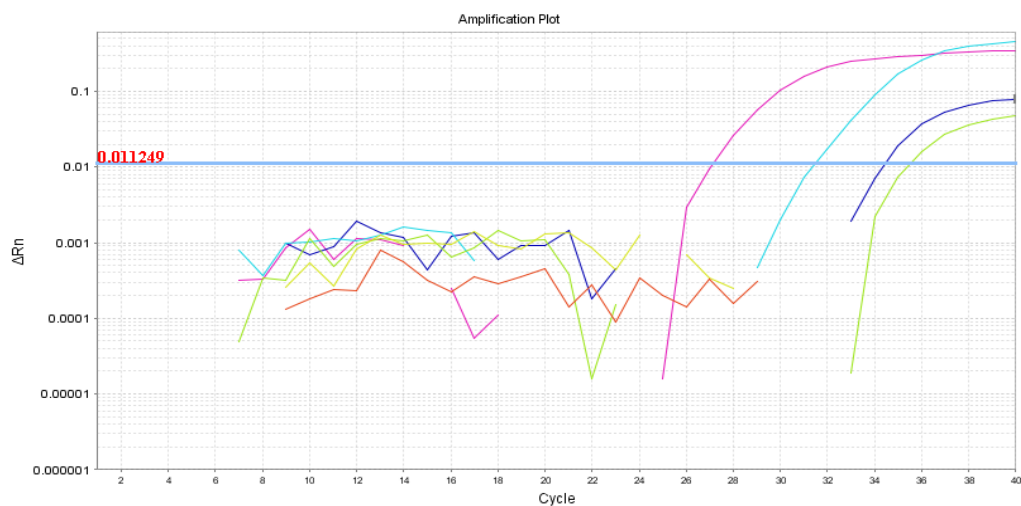


Figura 14. Gráfico de la RT-qPCR de las muestras de la jabalí. La muestra 636 B está representada con el color celeste, la 634 en color azul, la 640 en color verde y la 639 en color amarillo. Además, se agregó el control positivo de ARN (P2020.1) representado en color violeta y el control negativo está en color rojo.

Tabla 7. Resultado de la RT-qPCR en muestras de jabalí. Se muestra el nombre de la muestra analizada junto con el valor del CT.

Muestra	Color en el grafico	CT
636 B	Celeste	31
634	Azul	34
640	Verde	35
639	Amarillo	No detectable
P2020.1 (Muestra de ARN, control positivo)	Violeta	27
Control negativo	Rojo	No detectable

6. DISCUSIÓN

PRRSV es un virus que genera importantes consecuencias para la industria porcina a nivel global y es de carácter denunciante ante la OMSA. Entre sus particularidades, causa grandes pérdidas económicas al desencadenar enfermedades respiratorias y reproductivas en los porcinos, que se traducen en una disminución de la productividad y un aumento en las tasas de mortalidad y morbilidad en los animales (Kappes & Faaberg, 2015). Es necesario generar herramientas para detectar el virus que funcionen de forma sensible y a su vez poder obtener rápidos resultados. Para lograr este propósito en este trabajo se implementó la técnica de RT-qPCR que busca sustituir la herramienta utilizada actualmente en nuestro laboratorio para la detección de PRRSV, la RT-*nested* PCR (Ramos et al., 2018, 2022; Puig., 2020).

En una primera etapa, se puso a punto la técnica utilizando muestras de órganos previamente evaluadas por nuestro equipo y un plásmido como punto de referencia. Esto nos permitió confirmar la eficacia del protocolo, los cebadores y la sonda utilizados. No obstante, la detección del virus en muestras de órganos tanto con la RT-*nested* PCR como con la RT-qPCR se presentó como un desafío, especialmente debido a la complejidad de trabajar con este tipo de matriz. Los órganos, por su naturaleza, contienen una variedad de componentes biológicos que pueden interferir con la detección del virus. Para obtener un ácido nucleico de mayor pureza, optamos por emplear un kit de extracción comercial. Estos kits permiten reducir la presencia de inhibidores generando resultados más precisos y confiables. Es importante destacar que en el transcurso de este estudio nos enfrentamos a la necesidad de repetir las extracciones en las muestras procedentes de órganos, sobre todo de aquellas utilizadas como

controles positivos. A pesar de utilizar la misma muestra, ocurrieron situaciones en las que no logramos detectar el virus nuevamente (resultados no mostrados).

Es fundamental estandarizar el proceso de detección en este tipo de matriz. Esto podría incluir la implementación de una extracción a partir de un peso conocido de muestra, el uso del espectrofotómetro NanoDrop™ disponible en la Facultad de Ciencias para cuantificar y evaluar la pureza del ARN extraído, y la adición de un control interno para monitorizar la calidad de la extracción. Otra opción sería utilizar ARN sintético con una concentración conocida como control positivo en lugar del control que utilizamos actualmente (muestra proveniente de pulmón). Esto se debe a que existen factores que pueden degradar la muestra utilizada, como el proceso de congelación y descongelación al trabajar con esta matriz.

En esta tesina se trabajó con muestras de cerdos de una granja tomadas durante el periodo 2021-2022. Se inició el estudio con muestras que provenían de un episodio puntual de aborto, donde fueron proporcionadas en su momento muestras de feto y placenta de la madre. En una primera etapa, se aplicó la técnica de RT-*nested* PCR a ambas muestras, y se obtuvo un fragmento de tamaño esperado en la muestra de feto. Esta muestra se envió para su secuenciación al servicio de MacroGen (Corea), y se confirmó que se trataba de PRRSV-2, específicamente del linaje 1 según el análisis preliminar basado en ORF7. Un mes después del caso inicial y sin presentarse nuevos episodios de aborto, fueron recolectadas muestras de saliva de las madres y las recrias presentes en la misma granja, con el fin de realizar un monitoreo poblacional. Al analizar estas muestras utilizando la misma técnica, se observó la presencia de un amplicón de 208 pb en una de las muestras de saliva de las madres, aunque muy débil, por lo que su baja concentración impidió su secuenciación y por tanto, su confirmación.

Posteriormente, a pesar de no observarse sintomatología asociada a PRRSV, con el objetivo de evaluar el estatus sanitario de la granja tiempo después, se tomaron muestras de saliva, materia fecal y suero de animales de distintas categorías. Inicialmente, se aplicó la técnica de ELISA a 40 muestras de sueros y no se identificaron anticuerpos contra el virus en los animales testeados. Luego, se seleccionaron para la detección molecular 4 muestras que presentaron un valor cercano a 0.40 (valor umbral del kit, ver punto 5.2) , ya que los animales podrían tener carga viral pero aún no haber desarrollado anticuerpos o incluso estar en una fase de infección persistente en donde los anticuerpos se vuelven indetectables (revisado en Lunney et al., 2016). Sin embargo, estas muestras también dieron resultados negativos cuando se analizaron con la técnica de RT-*nested* PCR. Además, se sometieron a la misma técnica las demás muestras (saliva y materia fecal), y todas resultaron ser negativas.

Posteriormente, se aplicó la técnica de RT-qPCR en estas diferentes matrices. Los resultados con la herramienta optimizada en este trabajo revelaron la presencia de PRRSV en el feto, en la saliva de las madres, e incluso en la saliva de las recrias (que no se había logrado detectar por RT-*nested* PCR). Además, las muestras de materia fecal, sangre y saliva tomadas un año después del caso de aborto, que habían resultado negativas en la RT-*nested* PCR, también resultaron negativas en la RT-qPCR. Estos hallazgos sugieren que la infección por PRRSV fue un evento puntual que, con el tiempo, se resolvió y no se propagó a otros animales. Esto se respalda por la falta de detección del virus en las matrices analizadas a lo largo del tiempo.

Es relevante resaltar la aplicación del análisis de muestras de saliva mediante un enfoque no invasivo. La utilización de esta matriz se presenta como una opción favorable, ya que permite llevar a cabo un estudio a nivel poblacional sin interferir en el bienestar de los animales. Dados los resultados se puede inferir que esta metodología posibilitó la obtención de ARN de alta calidad. Mediante la centrifugación de las muestras, se logró eliminar las

impurezas que podrían interferir en el proceso de detección (Figura 8). En cuanto a la implementación de la técnica de RT-qPCR se observó que condujo a la identificación de un mayor número de casos positivos en comparación con la RT-*nested* PCR y por primera vez en nuestro país se logró la detección molecular de este virus en salivas de cerdo.

En el proceso de análisis de las muestras de jabalí (2017-2020), comenzamos con pruebas serológicas que condujeron a la identificación de 4 muestras con resultados seropositivos. Hasta ese momento, la información disponible en la región acerca de la presencia del virus en jabalíes se limitaba a 1 sola muestra seropositiva detectada en el estudio de Puig en 2020. Al detectar anticuerpos anti-PRRSV en jabalí podríamos evaluar y generar foco en la transmisión del virus entre especies porcinas ya que los jabalíes circulan libremente y podrían llegar a ser un vector de contagio.

En este estudio, se procedió a la detección molecular de las 4 muestras seropositivas. Al aplicar la técnica de RT-*nested* PCR a estas muestras, se logró obtener un amplicón del tamaño esperado en 2 de las 4 muestras sometidas a análisis. Estas muestras se enviaron para su secuenciación al servicio de Macrogen (Corea), y su posterior análisis filogenético indicó que se trataban de muestras que, al igual que las de cerdo, resultaron ser PRRSV-2, pero en este caso, del linaje 5 según el análisis preliminar de ORF7. La aplicación de la técnica de RT-qPCR a las muestras amplió el número de resultados positivos, ya que se detectó la presencia de PRRSV en 3 de las 4 muestras. En este caso, no fue posible llevar a cabo el protocolo con las réplicas necesarias de cada una de las muestras, lo que plantea la necesidad de repetir el estudio en el futuro para asegurar la reproducibilidad. Un logro destacado es que por primera vez se realizó un análisis de la presencia de PRRSV en jabalíes que abarcó desde la detección serológica hasta la detección molecular. Además, se realizó un análisis filogenético que proporciona información valiosa sobre la especie y el posible linaje presente en la población de jabalíes en Uruguay.

Tanto para jabalí como para cerdos la implementación de la RT-qPCR desprendió resultados relevantes. Además de ser una técnica sensible, que permitió detectar un mayor número de casos, sobre todo, resultó ser mucho más rápida que la RT-*nested* PCR. Sin embargo, esta última sigue siendo una herramienta valiosa en términos de obtener información sobre los linajes circulantes. Aunque hay que destacar que para profundizar en la caracterización genética de este virus se debe estudiar la región ORF5 y así poder confirmar estos linajes. Por lo expuesto, ambas técnicas son importantes para monitorear el estatus sanitario de las granjas y tomar conocimiento de las cepas de PRRSV que circulan en los animales de nuestro país para poder general un posible control y prevención de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

- Se puso punto una técnica de RT-qPCR con sonda TaqMan, que resultó ser menos laboriosa y más rápida que la técnica de RT-*nested* PCR.
- Este trabajo permitió generar en el laboratorio una herramienta adicional, rápida y sensible para la detección de PRRSV en diversas matrices biológicas (órgano, suero y saliva).
- Fue la primera vez que se lleva a cabo la detección molecular de PRRSV en muestras de jabalíes y en salivas de cerdos en Uruguay.
- Se lograron obtener secuencias del virus por RT-*nested* PCR, lo que proporciona información sobre la especie y el potencial linaje al que pertenecen los virus identificados.

8. PERSPECTIVAS

- Estandarizar la extracción en muestras de órganos para mejorar la reproducibilidad en la detección molecular.
- Incorporar alternativas de control positivo: utilizar ARN sintético con una concentración conocida.
- Optimizar una técnica de RT-qPCR que permita la cuantificación de la carga viral en las muestras.
- Emplear la RT-qPCR en futuros estudios epidemiológicos y en el monitoreo constante de granjas para identificar la presencia y propagación del virus.
- Caracterizar los virus circulantes mediante la amplificación de región ORF5.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Albina E, Mesplede A, Chenut G, Le Potier MF, Bourbao G, Le Gal S, Leforban Y. (2000) A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet Microbiol.* 2000;77:43–57. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00255-8
- Allende, R., Laegreid, W., Kutish, G., Galeota, J., Wills, R., & Osorio, F. (2000). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Description of Persistence in Individual Pigs upon Experimental Infection. *Journal of Virology*, 74(22), 10834-10837.
- Amonsin, A., Kedkovid, R., Puranaveja, S., Wongyanin, P., Suradhat, S., & Thanawongnuwech, R. (2009). Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes). *Virol J*, 6, 143. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-143>
- Balka, G., Hornyák, A., Bálint, A., Benyeda, Z., & Rusvai, M. (2009). Development of a one-step real-time quantitative PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods*, 158(1-2), 41-45. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.01.014>
- Bonilauri, P., Merialdi, G., Dottori, M., & Barbieri, I. (2006). Presence of PRRSV in Wild Boar in Italy. *Veterinary Record*, 158(3), 107-108. doi: 10.1136/vr.158.3.107-a
- Brinton, M. A., Gulyaeva, A. A., Balasuriya, U. B. R., Dunowska, M., Faaberg, K. S., Goldberg, T., Leung, F. C. C., Nauwynck, H. J., Snijder, E. J., Stadejek, T., & Gorbalenya, A. E.

- (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Arteriviridae 2021. *J Gen Virol*, 102(8), 001632. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001632>
- 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. *Can Vet J*, 36(12), 776-777. PMID: 8748450; PMCID: PMC1687075
- Chen, Y., Shi, K., Liu, H., Yin, Y., Zhao, J., Long, F., Lu, W., & Si, H. (2021). Development of a multiplex qRT-PCR assay for detection of African swine fever virus, classical swine fever virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Science*, 22(6), e87. <https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e87>
- Collins, J. E., Benfield, D. A., Christianson, W. T., Harris, L., Hennings, J. C., Shaw, D. P., Goyal, S. M., Mccullough, S., Morrison, R. B., Joo, H. S., Gorcyca, D., & 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. In *J Vet Diagn Invest* (Vol. 4).
- 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), 385-394. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.002>
- 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), 1441-1445.
- Dokland, T. (2010). The structural biology of PRRSV. In *Virus Research* (Vol. 154, Issues 1–2, pp. 86–97). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.029>

- Egli, C., Thü, B., Liu, L., & Hofmann, M. A. (2001). Quantitative TaqMan® RT-PCR for the detection and differentiation of European and North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In *Journal of Virological Methods* (Vol. 98). www.elsevier.com/locate/jviromet
- Fang, Y., Kim, D., Ropp, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., & Rowland, R. (2004). Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Research*, 100(2), 229-35. doi:10.1016/j.virusres.2003.12.026
- Fang, Y., Schneider, P., Zhang, W., Faaberg, K., Nelson, E., & Rowland, R. (2007). Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: analysis of isolates collected between 1999 and 2004. *Archives of Virology*, 52(5), 1009-17. doi:10.1007/s00705-007-0936-y
- Forsberg, R. (2005). Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Molecular Biology and Evolution*, 22(11), 2131–2134. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi208>
- Gao, J.-C., Xiong, J.-Y., Ye, C., Chang, X.-B., Guo, J.-C., Jiang, C.-G., Zhang, G.-H., Tian, Z.-J., Cai, X.-H., Tong, G.-Z., & An, T.-Q. (2017). Genotypic and geographical distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in mainland China in 1996–2016. *Veterinary Microbiology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.003>
- 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), 1024–1031. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi089>

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2023). Recuperado de <https://ictv.global/report/chapter/arteriviridae/arteriviridae/betaarterivirus>
- Kappes, M. A., & Faaberg, K. S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. In *Virology* (Vols. 479–480, pp. 475–486). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>
- Lunney, J. K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., & Renukaradhya, G. J. (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system. In *Annual Review of Animal Biosciences* (Vol. 4, pp. 129–154). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111025>
- Lurchachaiwong, W., Payungporn, S., Srisatidnarakul, U., Mungkundar, C., Theamboonlers, A., & Poovorawan, Y. (2008). Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1), 55-80. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02259.x
- Meng, X. T. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 74(4), 309-329. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00196-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00196-6)
- Meng, X.-J., Paul, P. S., Halbur, P. G., & Lum, M. A. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch Virol*, 140.

- 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), 2491-2496
- Morgan, S. B., Graham, S. P., Salguero, F. J., Sánchez Córdón, P. J., Mokhtar, H., Rebel, J. M. J., Weesendorp, E., Bodman-Smith, K. B., Steinbach, F., & Frossard, J. P. (2013). Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. *Veterinary Microbiology*, 163(1-2), 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.024>
- Nan, Y., Wu, C., Gu, G., Sun, W., Zhang, Y. J., & Zhou, E. M. (2017). Improved Vaccine against PRRSV: Current Progress and Future Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01635>
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 439, pp. 231–250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- OIE. (2023). World Animal Health Information System. Retrieved from OIE: <http://www.oie.int>
- Pileri, E., & Mateu, E. (2016). Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. In *Veterinary Research* (Vol. 47, Issue 1, pp. 1–13). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0391-4>
- Puig, J. (2020). Actualización de la circulación de PRRSV en Uruguay en el período de 2017-2019 (Tesina de grado). Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Ramos, N., Betancour, G., Puig, J., & Arbiza, J. (2022). An update on genetic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 (PRRSV-2) in South

- America: identification of ORF5 sequences of lineage 1A, 1C and 1G. *Archives of Microbiology*, 204(4), 367. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02976-w>
- Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Cabrera, K., Osorio, F., & Arbiza, J. (2018). First-time detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in Uruguay. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 352-356. <https://doi.org/10.1111/tbed.12813>
- Reiner, G., Fresen, C., Bronnert, S., & Willems, H. (2009). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in wild boars. *Veterinary Microbiology*, 136, 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.023>
- Rossow, K. D. (1998). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. In *Veterinary Pathology* (Vol. 35, Issue 1, pp. 1–20). American College of Veterinary Pathologists Inc. <https://doi.org/10.1177/030098589803500101>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1088-1>
- Shi, M., Lam, T. T. Y., Hon, C. C., Hui, R. K. H., Faaberg, K. S., Wennblom, T., Murtaugh, M. P., Stadejek, T., & Leung, F. C. C. (2010). Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. In *Virus Research* (Vol. 154, Issues 1–2, pp. 7–17). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.014>
- Shi, M., Lam, T., Hon, C., Murtaugh, M., Davies, P., Hui, R., . . . Leung, F. (2010). Phylogeny based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Journal of Virology*, 84(17), 8700-11. doi:10.1128/JVI.02551-09

- Shi, X., Liu, X., Wang, Q., Das, A., Ma, G., Xu, L., Sun, Q., Peddireddi, L., Jia, W., Liu, Y., Anderson, G., Bai, J., & Shi, J. (2016). A multiplex real-time PCR panel assay for simultaneous detection and differentiation of 12 common swine viruses. *Journal of Virological Methods*, 236, 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.005>
- 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), 572-576.
- Spilman, M. S., Welbon, C., Nelson, E., & Dokland, T. (2009). Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Organization of the nucleocapsid. *Journal of General Virology*, 90(3), 527–535. <https://doi.org/10.1099/vir.0.007674-0>
- Stankevicius, A., Buitkuvienė, J., Sutkienė, V., Spancernienė, U., Pamparienė, I., Pautienius, A., Zymantiene, J. (2015). Detection and molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Lithuanian wild boar populations. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1). <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0232-5>
- Tong, G., Zhou, Y., Hao, X., Tian, Z., An, T., & Qiu, H. (2007). Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1434-1436. <https://doi.org/10.3201/eid1309.070399>
- Vilcek, S., Molnar, L., Vlasakova, M., & Jackova, A. (2015). The first detection of PRASV in wild boars in Slovakia. *Berl Munch Tierarzt Wochenschr*, 128(1-2), 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), 121–130. <https://doi.org/10.1080/01652176.1991.9694296>
- 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), 58–62. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.58-62.2003>
- Yun, S.-I., & Lee, Y.-M. (2013). Overview: Replication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Department of Animal, Dairy, and Veterinary Sciences, Utah Science Technology and Research, College of Agriculture and Applied Sciences, Utah State University, Logan, UT 84322-4815, USA.
- Zhou, L., Ge, X., & Yang, H. (2021). Porcine reproductive and respiratory syndrome modified live virus vaccine: A “leaky” vaccine with debatable efficacy and safety. In *Vaccines* (Vol. 9, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040362>
- Zimmerman, J. J., Yoon, K. J., Wills, R. W., & Swenson, S. L. (1997). General overview of PRRSV: a perspective from the United States. *Vet Microbiol*, 55(1-4), 187-196. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(96\)01330-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(96)01330-2)