

## Caracterización molecular del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) del gen de la nucleocápside ORF 7 en granjas porcinas de Lima, Perú

### Molecular characterization of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) of the nucleocapsid gene ORF 7 in pig farms in Lima, Perú

Rony Cotaquispe Nalvarte<sup>1,3</sup>, Edgard De la Cruz Vásquez<sup>1</sup>, Edwin Quispe Cerón<sup>2</sup>, Nicholas Sitaras<sup>1</sup>, Jennifer Toskano Hurtado<sup>1</sup>

#### RESUMEN

Las especies *Betaarterivirus suid 1* y *Betaarterivirus suid 2* del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) ocasionan brotes severos debido a recombinaciones genéticas con alto riesgo epidemiológico, lo cual requiere de una rápida identificación para una eficiente vigilancia epidemiológica molecular. Los objetivos del estudio fueron el análisis del gen que sintetiza las proteínas de la nucleocápside (ORF 7), así como determinar las relaciones filogenéticas con cebadores específicos. Se realizó la caracterización molecular y se identificaron 24 aislados positivos de la especie *Betaarterivirus suid 2*. Se genotipificaron 10 aislados relacionando 8 de ellos al linaje 1: sublinaje 1.5 con la variante representativa NADC34 y 2 al linaje 5: sublinaje 5.1 con la variante representativa RespPRRS\_MLV. Además, se realizó el test de homología molecular con el programa DNAMAN a los 10 aislados, obteniéndose 99% (8) y 87% (2) de similitud con la variante NADC34 confirmando lo antes mencionado. La relación filogenética con los aislados reportados y los resultados obtenidos indican que al menos 10 pertenecieron a la especie *Betaarterivirus suid 2* mediante el gen de la nucleocápside (ORF 7) con los cebadores propios de la investigación y se confirmó la relación parental de 8 aislados con el linaje 1: sublinaje 1.5 y 2 aislados con el linaje 5: sublinaje 5.1 de la especie *Betaarterivirus suid 2*.

**Palabras clave:** gen de la nucleocápside, marco de lectura abierto 7, *Betaarterivirus suid 1*, *Betaarterivirus suid 2*, NADC34, RespPRRS\_MLV

<sup>1</sup> Corporación Montana S.A., Lima, Perú

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Mayor San Marcos, Lima, Perú

<sup>3</sup> E-mail: r.cotaquispe.n@gmail.com

Recibido: 30 de noviembre de 2021

Aceptado para publicación: 25 de octubre de 2022

Publicado: 22 de diciembre de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

## ABSTRACT

The *Betaarterivirus suid 1* and *Betaarterivirus suid 2* species of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus cause severe outbreaks due to genetic recombination with high epidemiological risk, which requires rapid identification for efficient molecular epidemiological surveillance. The objectives of the study were the analysis of the gene that synthesizes the nucleocapsid proteins (ORF 7), as well as to determine the phylogenetic relationships with specific primers. Molecular characterization was performed and 24 positive isolates of the *Betaarterivirus suid 2* species were identified. Ten isolates were genotyped, relating 8 of them to lineage 1: sublineage 1.5 with the representative variant NADC34 and 2 to lineage 5: sublineage 5.1 with the representative variant RespPRRS\_MLV. In addition, the molecular homology test was performed with the DNAMAN program on the 10 isolates, obtaining 99% (8) and 87% (2) of similarity with the NADC34 variant, confirming the aforementioned. The phylogenetic relationship with the reported isolates and the results obtained indicate that at least 10 belonged to the *Betaarterivirus suid 2* species through the nucleocapsid gene (ORF 7) with the research's own primers and the parental relationship of 8 isolates with lineage 1: sublineage 1.5 and 2 isolated with lineage 5: sublineage 5.1 of the species *Betaarterivirus suid 2*.

**Key words:** nucleocapsid gene, open reading frame 7, *Betaarterivirus suid 1*, *Betaarterivirus suid 2*, NADC34, RespPRRS\_MLV

## INTRODUCCIÓN

El virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) fue descrito por primera vez en 1987 en los Estados Unidos de Norteamérica y en 1991 en Europa. Desde entonces es reportado como endémico en la mayoría de los países (Keffaber, 1989; Hill, 1990; Wensvoort *et al.*, 1991) y en la actualidad sigue siendo un problema permanente para la economía y salud de las granjas porcinas (Meng *et al.*, 2000; Jackova *et al.*, 2012; Castillo y Ramírez, 2021). La severidad de la infectividad del virus se debe a un genoma representado por una molécula de RNA lineal simple de aproximadamente 15 kb, con polaridad positiva (Brinton *et al.*, 2021). El virus es parte de la familia Arteriviridae, subfamilia Variarterivirinae, género *Betaarterivirus* y subgéneros *Ampobarte-virus* y *Eurpobartevirus*. Se reconocen dos especies con base a las pruebas antigénicas, pruebas moleculares y relaciones filogenéticas: la

especie europea (*Betaarterivirus suid 1*) y la americana (*Betaarterivirus suid 2*) con aproximadamente 60% de similitud (Nelsen *et al.*, 1999; Brinton *et al.*, 2021).

Los genes del virus constan de 10 marcos de lectura abiertos: ORF 1a, ORF 1b, ORF 2a, ORF 2b, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 5a, ORF 6, ORF 7 (Wootton *et al.*, 2000; Snijder *et al.*, 2013). Los genes que corresponden al ORF1a y 1b se traducen en dos grandes poliproteínas no estructurales: *pp1a* y *pp1ab*, mientras que los genes de la ORF 2 al 6 sintetizan las proteínas del recubrimiento viral y el gen de la ORF 7 sintetiza las proteínas de la nucleocápside, siendo además la proteína viral más abundante en la célula afectada (Snijder y Meulenberg, 1998; Snijder *et al.*, 2013).

El marco de lectura abierto ORF 7 corresponde a genes que sintetizan las proteínas de la nucleocápside (gen N), siendo un objetivo importante en la detección viral por

PCR (Inoue *et al.*, 2007; Castillo y Ramírez, 2021). Según los autores Nelsen *et al.* (1999) y Kang *et al.* (2004), el gen ORF 7 es la región más conservada, lo que permite dar un acercamiento a la detección y la caracterización filogenética de la mayoría de las variantes del virus. Además, las investigaciones de Kang *et al.* (2004) señalaron que las relaciones filogenéticas derivadas de los genes ORF 7 se parecen más a las relaciones derivadas de los genomas completos de las dos especies del virus. Por lo tanto, la ORF 7 podría considerarse el marcador molecular más útil para revelar las relaciones genéticas del virus entre sus variantes genéticas. Según estos antecedentes, se planteó un diseño de diagnóstico comparativo para evaluar las especies del virus, ya que se busca mejorar el diagnóstico rápido de esta enfermedad, y para ello es necesario identificar las especies presentes en el país, proporcionando una referencia científica para la prevención, la detección y el control mediante vacunas. El presente estudio tuvo, por lo tanto, como objetivos proporcionar un análisis de la variación del gen ORF 7 que sintetiza las proteínas de nucleocápside y demostrar las relaciones filogenéticas entre aislados peruanos con las especies norteamericana y europeas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

Se trabajó con 85 muestras colectadas entre 2018 a 2020 provenientes de cerdos con aparentes signos clínicos de PRRS de granjas de la provincia de Lima, Perú. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos vacutainer sin heparina para separar el suero y transportadas en cajas hermetizadas con hielo seco al laboratorio IMBios de Montana, Lima. Las muestras fueron centrifugadas en el equipo Orto Alresa modelo Consul 21 a 2.800 x g por 5 min para extraer el suero, que fue trasvasado en tubos de 1.5 ml y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

### Extracción y Cuantificación de RNA

El RNA viral fue extraído siguiendo el manual de extracción del innuPREP virus DNA/RNA kit de Analytik Jena (Alemania). Se agregó 200 µl de muestras de suero o 200 µl de vacuna inactivada de tipo 2 (americano) cepa Nebraska Prime Pac® PRRS o 200 µl de vacuna inactivada tipo 1 (europeo) cepa VP-046 SUIPRABAC® PRRS en tubos de 1.5 ml. Luego, se adicionó 200 µl de CBV, 20 µl de proteinasa K, 1 µl del control interno de extracción (IDEXX) y 20 µl de mezcla de transporte (*Carrier*). Se homogenizo e incubó a 70 °C por 10 min. Luego se adicionó 400 µl de SBS y se mezcló, para luego transferir 650 µl del homogenizado a una columna de filtración de 2 ml. Se centrifugó a 10 000 x g por 1 min y se descartó el filtrado. Se procedió a los lavados adicionando 500 µl tampón de lavado HS y 650 µl tampón de lavado LS. En ambos casos se centrifugó a 10 000 x g por 1 min y se descartó el contenido por filtración. Finalmente se adicionó 60 µl de agua libre de RNasa precalentado y se dejó incubar por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8000 x g por 1 min. Se recuperó el RNA viral resuspendido.

La pureza se verificó mediante cuantificación utilizando el espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ (BioTek), siendo la ratio A260/A280 de lectura similar a 2, 0 en la mayoría de las muestras. El ARN fue almacenado a -80 °C hasta su análisis. El ensayo de detección por RT-qPCR y RT-PCR convencional de las muestras de suero se realizó en conjunto para validar los resultados obtenidos.

### RT-qPCR (IDEXX) para Detectar Especies de *Betaarterivirus suid 1* y *2*

Las muestras de suero de campo fueron analizadas siguiendo el manual del RealPCR\* NA PRRS Type 1 and Type 2 Multiplex RNA Test (IDEXX), usado para la detección y diferenciación del tipo 1 (europeo) y el tipo 2 (norteamericano) del ARN

del virus del PRRS, proporcionando un método específico y de alta sensibilidad para la detección del ARN vírico mediante el gen Nsp2. La amplificación se realizó en el termociclador *Applied Biosystems™ Fast 7500 & 7500 Real-Time PCR*. Se preparó la mezcla de PCR con 20 µl indicado en el manual para los reactivos: 10 µl NA PRRS Types 1-2 RNA Mix y 10 µl de la mezcla maestra RNA MMx. Luego se dispensó 20 µl de la mezcla de PCR en los pocillos de la placa de 96 de *Applied Biosystems™ Mustang Purple™ Dye Spectral Calibration Plate for Multiplex qPCR, Fast 96-well* y 5 µl de ARN muestra o 5 µl de control positivo o 5 µl control negativo o 5 µl blanco H<sub>2</sub>O en cada tubo diferente para las muestras y controles. Se obtuvo un volumen final por reacción de 25 µl y se configuró el termociclador con los parámetros de los fluoróforos siguientes: PRRS tipo 1(EU) sonda FAM™, PRRS tipo 2(NA) canal Cy5, control interno de muestra (ISC) canal HEX™ y referencia pasiva ROX™. Los ciclos estándar de IDXX Real PCR fueron 1 ciclo de transcripción inversa (RT) de 50 °C por 15 min, 1 ciclo de desnaturalización de 95 °C por 1 min y 45 ciclos de amplificación de 95 °C por 15 s y 60 °C por 30 s.

#### **RT-PCR Convencional *in house* del gen ORF 7 Transcripción Reversa (ADNc)**

El RNA extraído fue sometido a una retrotranscripción para la síntesis de ADNc utilizando el Termociclador Biometra TOne de Analytik Jena, siguiendo las instrucciones del Kit-OneScript® Hot cDNA Synthesis ABM®. La reacción tuvo dos fases de reacción: la primera mezcla tuvo un volumen final de 14.5 µl conteniendo 5 µl ARN viral a 40 ng/µl, 1 µl de cebadores Ramdon o reversos específicos, 1 µl de dNTPs a 10 mM y 7.5 µl agua libre de RNasa. La mezcla se precalentó a 65 °C por 5 min y se incubó en hielo por 1 min. Luego se centrifugó brevemente por 1 min. La segunda mezcla se preparó con un volumen final de 5.5 µl conteniendo 4 µl de tampón RT a 5X, 0.5 µl RNaseOFF Ribonuclease inhibitor a 40 U/µl

y 1 µl OneScrip RTase a 200 U/µl. Luego se agregó la mezcla 2 en 1 y se homogenizó mediante centrifugación. Se realizó la síntesis de ADNc utilizando las siguientes condiciones de amplificación, con un tratamiento previo para los cebadores ramdon de 25 °C por 10 min (obviando para reversos específicos). Luego se incubaron las mezclas de reacción a 42 °C por 50 min. Se realizó la parada de reacción a 85 °C por 5 min. El ADNc se transportó en hielo y se almacenó a -80 °C.

#### **PCR Convencional del Gen ORF 7**

Los ADNc fueron amplificados en el Termociclador Biometra TOne de Analytik Jena. La reacción tuvo un volumen final de 20 µl conteniendo 3 µl de ADNc a 40 ng/µl, 10 µl mezcla maestra de 2X PCR HotStart ABM®, 5 µl de agua libre de nucleasas (ABM®) y 1 µl de cada cebador SKC-F-5' CAGCCAGTCAATCARCTGTG-3'; SKC-R-5' TCGCCCTAATTGAATAGGTG-3' a 10 pmol/µl. Estos cebadores fueron extraídos de los trabajos de Balka *et al.* (2008), quienes lo diseñaron de una parte gen ORF 7 de la nucleocápside y la región 3' no codificante para detectar secuencias europeas, así como secuencias estadounidenses en caso estén presentes en muestras clínicas. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de denaturación inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 45 ciclos de 94 °C por 45 s de denaturación, 60 °C por 30 s de alineamiento y 72 °C por 60 s de extensión, seguido de un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. El tamaño del fragmento flanquea las regiones 14 658 al 15 050 bp en Lelystad (M96262) y 14 937 al 15 364 bp en la cepa de referencia estadounidense VR 2332 (NC\_001961) según Balka *et al.* (2008).

Los cebadores fueron diseñados manualmente a partir de una región conservada del gen ORF 7 de la nucleocápside, mediante un alineamiento múltiple de secuencias depositadas en el Gen Bank para ambas especies del virus y sintetizados por la empresa MacroGen Inc (Corea del Sur). Se validaron según los parámetros de sensibilidad, espe-

cificidad, límite de detección, repetitividad y robustez. La amplificación fue realizada en el Termociclador Biometra TOne (Analytik Jena). La reacción tuvo un volumen final de 20 µl conteniendo 3 µl de ADNc a 40 ng/µl, 10 µl mezcla maestra de 2X PCR HotStart ABM®, 5 µl de agua libre de nucleasas (ABM®) y 1 µl de cada cebador SKJ-F 5'-GGACCGGGGA AGAAGAACAA-3' y SKJ-R 5'-AGTGCCGTTCACTCATT-3' a 10 pmol/µl. Las condiciones de amplificado fueron: un ciclo de denaturación inicial a 94 °C durante 5 min seguido de 45 ciclos de 94 °C por 45 s de denaturación, 52 °C por 60 s de alineamiento y 72 °C por 45 s de extensión, y una extensión final a 72 °C por 10 min. Como producto final se obtuvo un fragmento de 327 bp que flanquean los 14 519 al 14 842 kb del gen ORF 7.

### Electroforesis, Purificación y Secuenciamiento

Los productos de PCR fueron revelados mediante cámara de electroforesis horizontal CS Cleaver Scientific multiSUB™ Choice con geles de agarosa de grado molecular SCLAG500 Cleaver Scientific al 1%, utilizando Fluorescent Dye-DNA/Safe-Green™ ABM®, ladder 100bp Opti-DNA Marker 50 bp–1.5 kb ABM® y visualizados en un fotodocumentador UVP UV *solo touch* de Analytik Jena. Los trozos del gel con el amplificado de tamaño esperado fueron concentrados con el kit de purificación de ácidos nucleicos innuPREP (Analytik Jena). Los productos purificados fueron seleccionados aleatoriamente debido a la necesidad de la información y enviados en dos bloques. Las primeras 14 secuencias de los cebadores de referencia y los 10 últimos diseñados en laboratorio. Se envió ambas hebras al servicio proveído por la empresa MacroGen Inc. (Corea del Sur) mediante BigDye v3.1 Sequencing Terminator kit (Life Technologies) y un analizador genético ABI 3137 XL (Life Technologies).

### Análisis Filogenético del Gen ORF 7

Los 24 (14-SKC y 10-SKJ) cromatogramas secuenciados se analizaron por separado utilizando el paquete de secuencia Chromas Lite® V. 2.6.6 y unida a las 41 secuencias de referencia del GenBank: MF326985.1; GQ857656.1; FJ349261.1; AY588319.1; DQ489311.1; GQ461593.1; EF484033.1; AY032626.1; EF635006.1; KF611905.1; KF287140.1; JQ715697.1; EU939312.1; GQ374442.1; JQ663556.1; HQ315837.1; FJ889130.1; JX512910.2; JQ663545.1; JF802085.1; GU047345.1; EU076704.1; AY366525.1; KC862567.1; AF325691.1; DQ473474.1; AB288356.1; JN660150.1; EU807840.1; AF184212.1; DQ176019.1; AF331831.1; AF176348.2; U87392.3; EF536003.1; AF066183.4; DQ988080.1; AY424271.1; AF494042.1; EF112445.1; EU262603.1; AY032626.1.

Con esta información se fabricaron los árboles filogenéticos mediante análisis de sustitución nucleotídica con el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Kimura 2-parámetros. Los valores Bootstrap se calcularon utilizando 1000 réplicas de alineación, la búsqueda heurística se obtuvo aplicando Nearest-Neighbour-Interchange (BioNJ). Hubo un total de 317 y 426 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en DNAMAN v. 10 y MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). El análisis de homología de nucleotídicas y aminoácidas (14-SKC y 10-SKJ) fueron comparadas con la variante de referencia NADC34 de la especie *Betaarterivirus suid 2* mediante el programa DNAMAN v. 10.0 (Wang, 2016).

## RESULTADOS

Las 85 muestras de suero fueron testeadas utilizando las dos metodologías de diagnóstico. En la primera se empleó un kit comercial, utilizando el gen Nsp2 del virus

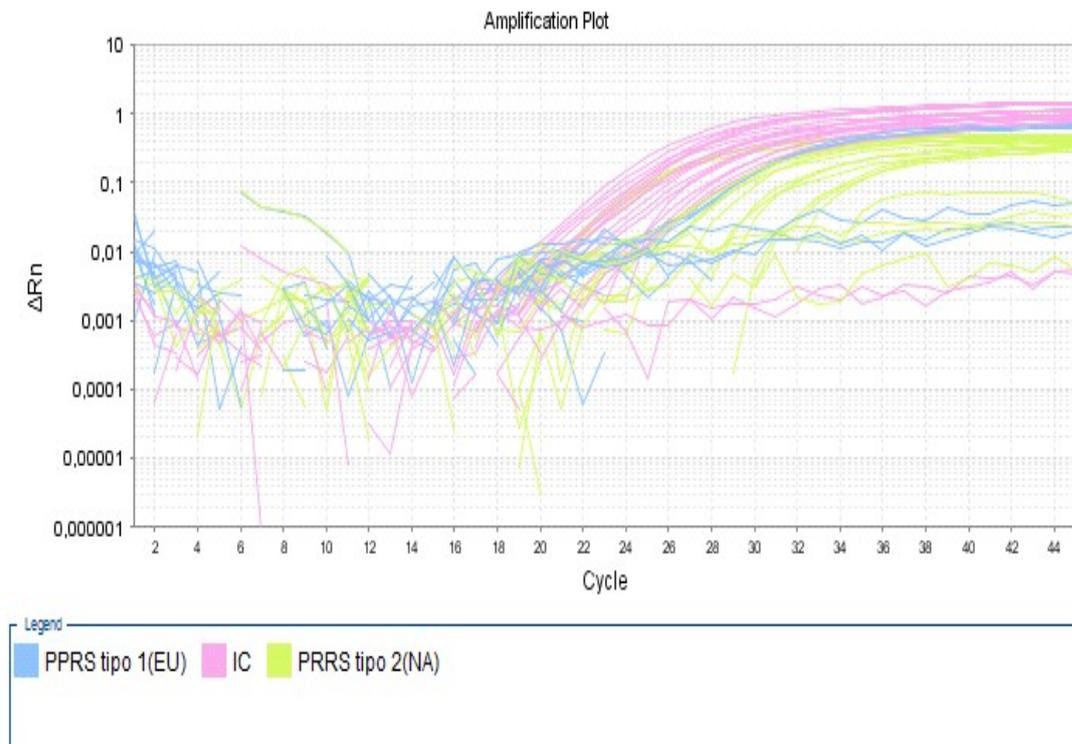


Figura 1. Análisis de RT-qPCR IDEXX de las especies de *Betaarterivirus suid 1* y *Betaarterivirus suid 2* (duplicado). (a) control positivo (CP kit): *Betaarterivirus suid 1* (FAM™-celeste) y *Betaarterivirus suid 2* (Cy5-verde); (b) 6 muestras RNA campo: *Betaarterivirus suid 2* (Cy5-verde); (c) control negativo (H<sub>2</sub>O grado molecular): ruido sin fluorescencia (azul y verde); (c) control interno muestra (ISC kit): RNA endógeno (HEX™-rosado). Las curvas de amplificación con valores Ct d»28 de vPPRS

como referencia para la detección de las especies *Betaarterivirus suid 1* y *Betaarterivirus suid 2*. Se identificaron 24 aislados con un Ctd»28. Todas las muestras identificadas fueron de la especie *Betaarterivirus suid 2* (Figura 1, Cuadro 1).

### RT-PCR Convencional *in house* del gen ORF 7

El segundo diagnóstico se se realizó mediante un kit *in house* con cebadores para el gen ORF 7 de la nucleocápside. Ambos se usaron para tipificar las muestras de suero. Se logró la amplificación del gen identificando 10 positivos con tamaños específicos de 327 pb con los cebadores diseñados y 14 po-

sitivos 427 pb con los cebadores de referencia (Figura 2).

### Análisis Filogenético del Gen ORF 7

Las genealogías construidas con el gen ORF 7 mediante sustitución nucleotídica utilizando máxima verisimilitud se muestran en las Figuras 3 y 4. Para la genealogía de los cebadores SKC se empleó un alineamiento múltiple de secuencias, tanto de las especies *Betaarterivirus suid 1* (cuadrado guinda), *Betaarterivirus suid 2* (rombo azul) y las cepas peruanas de la presente investigación (círculo rojo) según se indica en la Figura 3. Se obtuvieron tres linajes y se identificaron dos subespecies y cuatro grupos (Figura 3).

Cuadro 1. Resultados de la identificación molecular de 24 aislados del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (vPRRS) en muestras de sangre de cerdos de la región de Lima, Perú

cDNA	RT-PCR pb	RT-qPCR kit <sup>1</sup>	Homología NADC34® (%)		Genotipificación
			Nucleótido	Aminoácido	
1	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
2	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
3	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
4	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
5	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
6	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
7	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
8	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
9	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
10	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
11	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
12	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
13	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
14	Skc/427	Betaarvirus suid 2	89	11	
15	Skj/327	Betaarvirus suid 2	100	98	Linaje 1, sublinaje 1.5
16	Skj/327	Betaarvirus suid 2	100	98	Linaje 1, sublinaje 1.5
17	Skj/327	Betaarvirus suid 2	100	98	Linaje 1, sublinaje 1.5
18	Skj/327	Betaarvirus suid 2	87	88	Linaje 1, sublinaje 5.1
19	Skj/327	Betaarvirus suid 2	87	88	Linaje 1, sublinaje 5.1
20	Skj/327	Betaarvirus suid 2	99	98	Linaje 1, sublinaje 1.5
21	Skj/327	Betaarvirus suid 2	99	98	Linaje 1, sublinaje 1.5
22	Skj/327	Betaarvirus suid 2	99	98	Linaje 1, sublinaje 1.5
23	Skj/327	Betaarvirus suid 2	99	98	Linaje 1, sublinaje 1.5
24	Skj/327	Betaarvirus suid 2	98	98	Linaje 1, sublinaje 1.5

<sup>1</sup> RT-qPCR utilizando termociclador de Applied Biosystems 7500. Los valores Ct fueron  $\leq 28$  ciclos según control interno muestra (CSI)

<sup>2</sup> Porcentaje de homología a vPRRS utilizando las secuencias nucleótidos y aminoácidos mediante el programa DNAMAN

Se observa la exclusión del clado perteneciente a los 14 aislados del estudio, debido a que estos cebadores contienen una región codificante 3' amplificada, por ello solo es eficaz para el diagnóstico. La región de amplificación flanquea 14 658 al 15 060 bp en los genotipos americanos, demostrando la eficacia para el diagnóstico de *Betaarterivirus suid 2* con el tamaño reportado para las especies de origen europeo según la referencia de estos cebadores.

La genealogía de los cebadores diseñados muestran unos valores Bootstrapping de 100% para un alineamiento múltiple dando como resultado dos especies bien definidas. Las especies de *Betaarterivirus suid 1*, *Betaarterivirus suid 2* según se indica en la Figura 4. Además, los clados que agrupan a los tres linajes representativos 1, 5 y 8 muestran valores aceptables de Bootstrapping, indicando una relación bien definida para la inferencia parental de la especie *Betaarteri-*

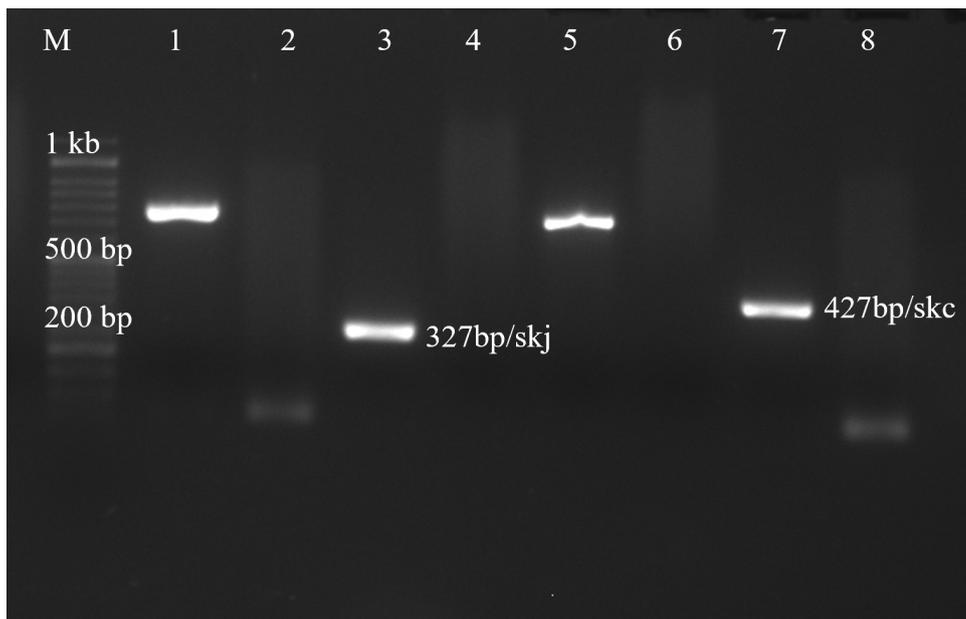


Figura 2. RT-PCR convencional *in house* de los genes ORF 7 y ORF 5 diseñados en laboratorio. Línea 1 y 5 (GP5-SKA): ADNc muestra positiva de campo PRRS; Línea 2, 4, 6 y 8 (bronquitis aviar): controles negativos de ADNc de IBV; Línea 3 (ORF 7-SKJ): ADNc muestra positiva campo PRRS; Línea 7 (ORF 7-SKC): ADNc muestra positiva campo PRRS; Línea M (ladder): 100 bp Plus Opti-DNA Marker ABM® 50 bp–1.5 kb

*virus suid 2*. Los aislados comparten relación del linaje 1: sublinaje 1.5 de la especie *Betaarterivirus suid 2* con la variante representativa NADC34 según las ramificaciones internas con valores Bootstrapping de 99%. Sin embargo, los valores de soporte para las ramas internas de los aislados 18 y 19 permite dar un acercamiento al linaje 5: sublinaje 5.1 con la variante representativa norteamericana RespPRRS<sub>-</sub>MLV. Esta variante es una cepa de principal foco de prevalencia en Estados Unidos y es comúnmente utilizada como cepas vacunales.

En la Figura 4 se observa la clasificación de los linajes 1, 5 y 8, ubicando a las cepas estudiadas en los sublinajes 1.5 y 5.1. El análisis de homología demostró que los 14 primeros aislados con los cebadores de referencia tuvieron un porcentaje de identidad

nucleotídica de 89% (aminoacídica de 11%) y los 10 últimos aislados un porcentaje de 87% (2) y 99% (8) de identidad nucleotídica, con la cepa de referencia de la especie *Betaarterivirus suid 2* (Cuadro 1).

## DISCUSIÓN

La enfermedad viral en cerdos desde su detección a finales de la década de los 90 sigue causando pérdidas considerables en la economía porcina (Castillo y Ramírez, 2021). Los esfuerzos de las entidades encargadas de evaluar la prevalencia del virus a nivel nacional han sido insuficientes. Se han reportado infecciones en cerdos de edades tempranas mediante métodos serológicos y moleculares como RT-PCR anidada y RFLP (Ramírez *et al.*, 2013, 2019; Calcina *et al.*,

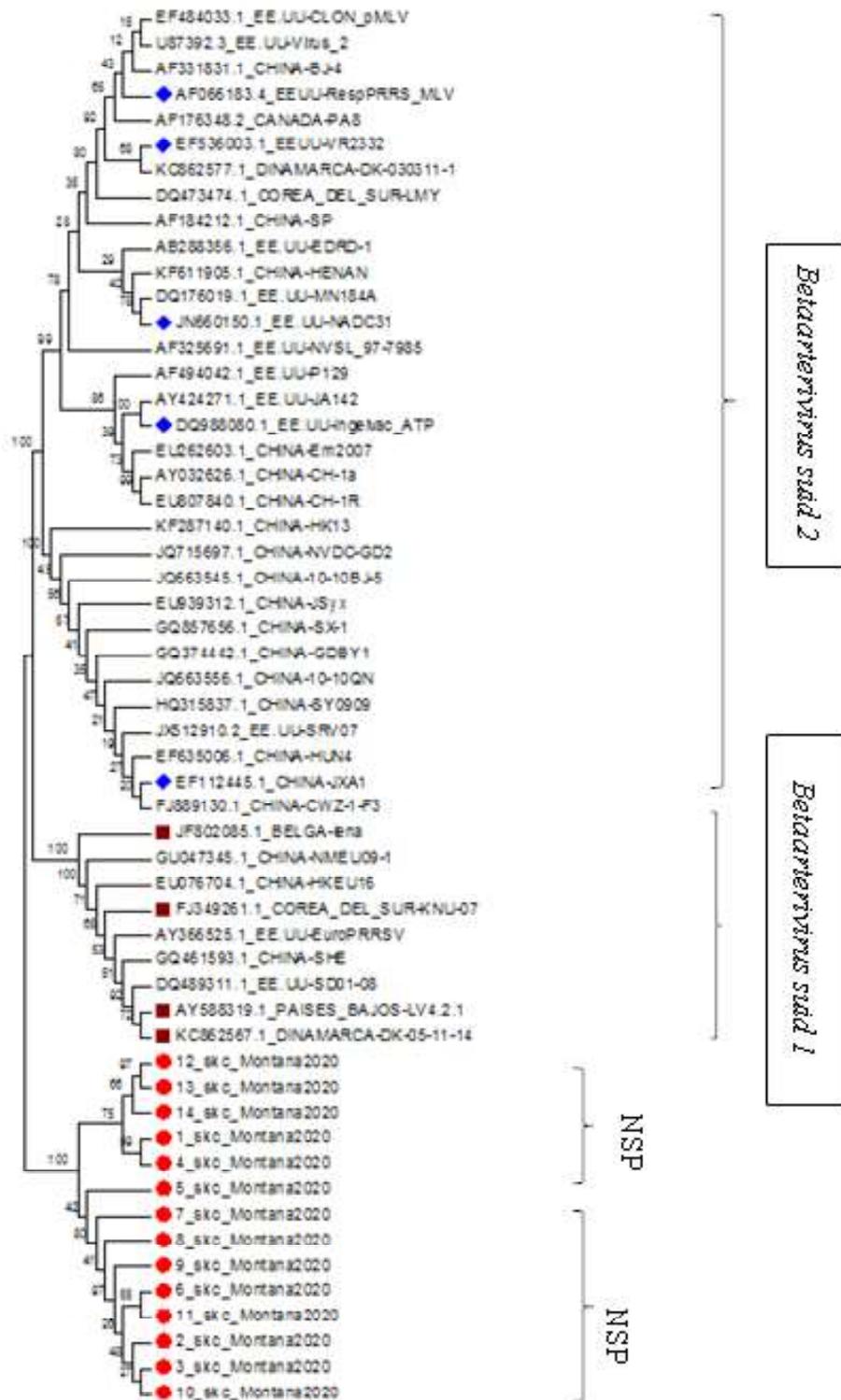


Figura 3. El árbol filogenético de las especies de *Betaarterivirus suid 1* y *Betaarterivirus suid 2* con los cebadores de referencia. Se utilizó sustitución nucleotídica mediante máxima verosimilitud aplicando (BioNJ) con el modelo de Kimura-2-parámetros, se empleó un Bootstrapping de 1000 réplicas de alineación y los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6

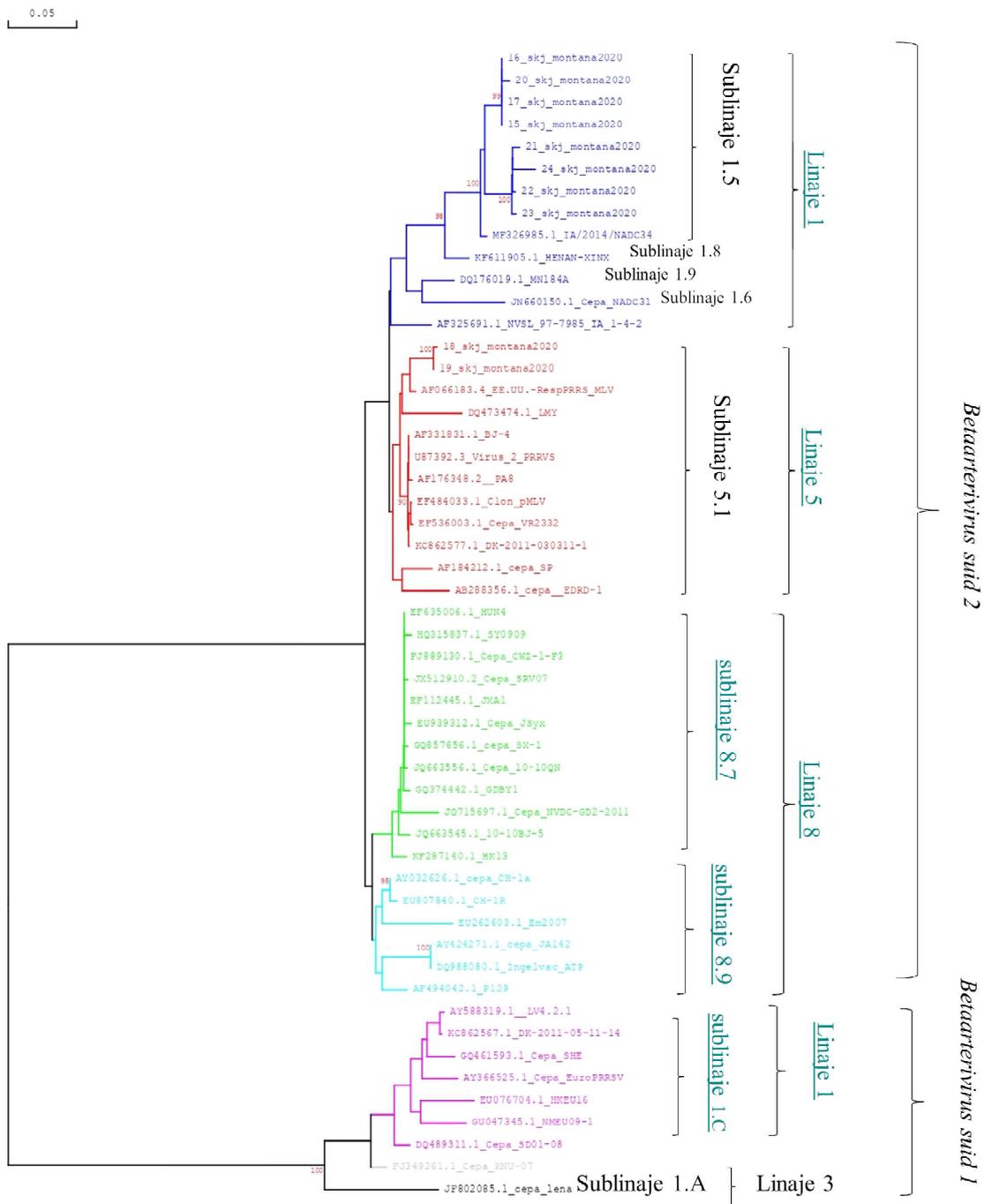


Figura 4. El árbol filogenético de las especies *Betaarterivirus suid 1* y *Betaarterivirus suid 2* con el cebador SKJ. Se utilizó sustitución nucleotídica mediante máxima verosimilitud aplicando (BioNJ) con el modelo de Kimura-2-parámetros. Se empleó un Bootstrapping de 1000 réplicas de alineación y los análisis evolutivos se realizaron en DNAMAN 10

2014); no obstante, en una revisión reciente de Castillo y Ramírez (2021) se menciona que aún no está claro el panorama sobre la realidad y la vigilancia epidemiológica molecular de las especies del virus, así como de las posibles variantes existentes en el país. Ante esto, se realizaron los dos ensayos conjuntos del presente estudio mediante un kit comercial de RT-qPCR y un diseño *in house* de RT-PCR convencional evaluando 85 muestras de granjas porcinas de Lima.

Se validaron dos cebadores estandarizados para el diagnóstico mediante el gen ORF 7 de la nucleocápside demostrando una buena detección para vPRRS; sin embargo, el cebador de referencia no permite diferenciar entre las especies y es ineficiente para las relaciones filogenéticas, lo que solo sería útil para el diagnóstico. Estos resultados concuerdan con el estudio de Balka *et al.* (2008), ya que solo fue utilizado para identificar PRRS. Sin embargo, en esta investigación se utilizó como estándar de diagnóstico para los cebadores diseñados y corroborar la ineficacia para la filogenia que no es mencionada por dichos investigadores. Por otro lado, el cebador diseñado para este estudio muestra, además de la buena detección, una mejor inferencia filogenética, ya que ubica a ocho de los aislados en el linaje 1 sublinaje 1.5 de la cepa representativa NADC34. Estos mismos resultados fueron evidenciados en los aislados tipificados como NADC34 con 99% de identidad nucleotídica por Ramírez *et al.* (2019), donde obtuvieron 15 genotipos 1-7-4 por RFLP. Además, es importante resaltar que Van Geelen *et al.* (2018) mencionan que este genotipo es derivado de NADC31 perteneciente al linaje 1: sublinaje 1.6.

Los datos de la inferencia filogenética con los cebadores diseñados determinaron que los 10 aislados están en estrecha relación con las variantes NADC34 y RespPRRS\_MLV de la especie *Betaarterivirus suid 2*; formando los linajes 1: sublinaje 1.5 y linaje 5: sublinaje 5.1. Asimismo,

los resultados muestran a las cepas 18 y 19 dentro del linaje 5 representada por la variante RespPRRS\_MLV. La principal relevancia de los hallazgos del presente estudio se basa en la identificación de las variantes patogénicas en sueros, una de ellas es la variante NADC3, que ya ha sido reportada, y la variante RespPRRS\_MLV con foco de prevalencia en Norteamérica.

La principal preocupación es la capacidad de recombinación de las cepas de campo con las cepas vacunales, ya que una característica importante del virus es su gran variabilidad (Brockmeier *et al.*, 2012). Esto dificulta el desarrollo de vacunas efectivas, ya sean muertas o vivas por el alto riesgo de reversión hacia cepas más patógenas (Zhang *et al.*, 2018). Por ello hay la posibilidad que los aislados 18 y 19 sean producto de cerdos inmunizados con la cepa vacunal RespPRRS\_MLV. Sin embargo, ya sea de una u otra manera, la realidad es muy preocupante porque la confirmación de la prevalencia de la variante NADC34 podría causar una recombinación con esta cepa vacunal (Zhang *et al.*, 2018). Este hallazgo deberá ser corroborado en futuras investigaciones. Es importante indicar que los aislados de vPRRS reportados en Chile y Uruguay difieren de los aislados identificadas en Perú (Ramírez *et al.*, 2019), y que los análisis de secuencia del ORF7 de las cepas uruguayas revelaron una estrecha relación del virus con la cepa histórica VR2385 de vPRRS (Ramos *et al.*, 2018).

Los ensayos de vigilancia molecular en los dos años del estudio no reportan la presencia de la especie *Betaarterivirus suid 1* en las granjas porcinas de Lima, a diferencia de lo indicado por Ramírez *et al.* (2013). Por otro lado, para poder descartar los falsos positivos en las pruebas RT-PCR anidada se debe realizar una vigilancia más exhaustiva con técnicas más sensibles, ya que la prevalencia de este virus es alta en lugares donde son identificados (Dietze *et al.*, 2011; López *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

- Se identificaron 24 aislados de la especie *Betaarterivirus suid 2* mediante el gen Nsp 2 del test comercial, sin lograr aislar *Betaarterivirus suid 1* en las granjas de Lima.
- Se demuestra la especificidad de una RT-PCR convencional *in house* con los cebadores diseñados en laboratorio para detección y análisis filogenéticos del gen ORF 7.
- La genotipificación de los primeros 14 aislados del gen ORF 7 de los cebadores SKC sirven para realizar el diagnóstico y se comprueba que no son útiles para análisis filogenéticos.
- Se genotipificaron 10 aislados de *Betaarterivirus suid 2* con los cebadores SKJ del gen ORF 7, estando 8 de ellos relacionados al linaje 1: sublinaje 1.5 con la variante representativa NADC34 y 2 al linaje 5: sublinaje 1.5 con la variante representativa RespPRRS\_MLV.
- Se identificó un 99% de homología nucleotídica (8) y 87% (2) con la variante de referencia NADC34 por con el programa DNAMAN 10.

## LITERATURA CITADA

1. **Balka G, Hornyák A, Bálint A, Kiss I, Kecskeméti S, Bakonyi T, Rusvai, M. 2008.** Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet Microbiol* 127: 128-135. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.08.001
2. **Brinton MA, Gulyaeva AA, Balasuriya U, Dunowska M, Faaberg KS, Goldberg T, Leung F, et al. 2021.** ICTV virus taxonomy profile: *Arteriviridae* 2021. *J Gen Virol* 102(8): 001632. doi: 10.1099/jgv.0.001632
3. **Brockmeier SL, Loving CL, Vorwald AC, Kehrlí ME, Jr Baker RB, Nicholson TL, Lager KM, et al. 2012.** Genomic sequence and virulence comparison of four Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains. *Virus Res* 169: 212-221. doi: 10.1016/j.virusres.2012.07.030
4. **Calcina IJ, Rivera GH, Ramírez VM, More BJ, Arroyo HG, Acosta CF, Manchego SA. 2014.** Cinética de anticuerpos contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino durante las etapas de recría, engorde y acabado en una granja de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 25: 88-94.
5. **Castillo EA, Ramírez VM. 2021.** Síndrome reproductivo y respiratorio porcino: una revisión del agente etiológico y su influencia en el comportamiento actual de la enfermedad. *Rev Inv Vet Perú* 32: e19645. doi: 10.15381/rivep.v32i1.19645
6. **Dietze K, Pinto J, Wainwright S, Hamilton C. 2011.** Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): virulence jumps and persistent circulation in Southeast Asia. [Internet]. Disponible en: <https://www.fao.org/publications/card/en/c/cbf65f1e-a9d4-5cd7-8262-64db6caa9829/>
7. **Hill H. 1990.** Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome). In: *Proc Mystery Swine Disease Committee Meeting*. Denver, Colorado, USA.
8. **Inoue R, Tsukahara T, Sunaba C, Itoh M, Ushida K. 2007.** Simple and rapid detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus from pig whole blood using filter paper. *J Virol Methods* 141: 102-106. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.11.030
9. **Jackova A, Vlasakova M, Leskova V, Vilcek S. 2012.** Identification of a new unusual length polymorphism of the nucleocapsid protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes* 45: 590-592. doi: 10.1007/s11262-012-0797-7
10. **Kang SY, Yun SI, Park HS, Park CK, Choi HS, Lee YM. 2004.** Molecular characterization of PL97-1, the first Korean isolate of the porcine reproduc-

- tive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 104:165-179. doi: 10.1016/j.virusres.2004.04.003
11. **Keffaber KK. 1989.** Reproduction failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract Newsl* 1: 1-9.
  12. **López SM, Alonso RA, Mendieta H, Vázquez JC. 2015.** Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS). Revisión. *Rev Mex Cienc Pecuarias* 6(1): 69-89.
  13. **Meng XJ. 2000.** Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 74: 309-329. doi: 10.1016/s0378-1135(00)00196-6
  14. **Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. 1999.** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 73: 270-280. doi: 10.1128/JVI.73.1.270-280.1999
  15. **Ramírez VM, Rivera GH, Manchego SA, More BJ, Chiok CKL. 2013.** Aislamiento y genotipificación del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VPRRS) en granjas seropositivas de las provincias de Lima y Arequipa, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 24: 222-232. doi: 10.15381/rivep.v24i2.2512
  16. **Ramírez M, Bauermann FV, Navarro D, Rojas M, Manchego A, Nelson EA, Diel DG, Rivera H. 2019.** Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) 1-7-4-type strains in Peru. *Transbound Emerg Dis* 66: 1107-1113. doi: 10.1111/tbed.13134
  17. **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. *Transbound Emerg Dis* 65: 352-356. doi: 10.1111/tbed.12813
  18. **Snijder EJ, Kikkert M, Fang Y. 2013.** Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J Gen Virol* 94: 2141-2163. doi: 10.1099/vir.0.056341-0
  19. **Snijder EJ, Meulenberg JJ. 1998.** The molecular biology of arteriviruses. *J Gen virol* 79: 961-979. doi: 10.1099/0022-1317-79-5-961
  20. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
  21. **van Geelen A, Anderson TK, Lager KM, Das PB, Otis NJ, Montiel NA, Miller LC, et al. 2018.** Porcine reproductive and respiratory disease virus: evolution and recombination yields distinct ORF5 RFLP 1-7-4 viruses with individual pathogenicity. *Virology* 513: 168-179. doi: 10.1016/j.virol.2017.10.002
  22. **Wootton S, Yoo D, Rogan D. 2000.** Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch Virol* 145: 2297-2323. doi: 10.1007/s007050070022
  23. **Wang W. 2016.** The molecular detection of *Corynespora cassiicola* on cucumber by PCR assay using DNAMAN software and NCBI. In: *IFIP Adv Inf Commun Technol* 479. doi: 10.1007/978-3-319-48354-2\_26
  24. **Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, et al. 1991.** Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 13: 121-130.
  25. **Zhang H, Xia M, Wang W, Ju D, Cao L, Wu B, Wang X, et al. 2018.** An attenuated highly pathogenic Chinese PRRS viral vaccine confers cross protection to pigs against challenge with the emerging PRRSV NADC30-Like Strain. *Virol Sin* 33: 153-161. doi: 10.1007/s12250-018-0027-0