

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

TRABAJO DE TITULACIÓN

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS DEL  
SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO  
(PRRSV) AISLADOS EN ECUADOR ENTRE 2017 Y 2019”

AUTOR: ROBERTO CLAUDIO BUSTILLOS HUILCA

TUTOR: DANIEL EDUAROD CHAVEZ VITERI, PhD.

JULIO 2023

# Caracterización molecular de los virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) aislados en Ecuador entre 2017 y 2019

Roberto Claudio Bustillos-Huilca<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad Agropecuaria, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Loja, Ecuador

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería, Maestría en Biología Computacional, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador

\* Autor de correspondencia: robertobustillos\_mvz@hotmail.com

## Resumen:

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) es el agente causal de una de las enfermedades infecciosas económicamente más importantes de la producción porcina en todo el mundo. La variación genética del PRRSV hace que el análisis epidemiológico y molecular de los virus circulantes sea muy importante para las actividades de vigilancia en un brote de la enfermedad. El monitoreo de los virus PRRS es necesario para explicar el origen de los virus encontrados, ya sea interna o externamente al país. No se ha publicado ningún estudio epidemiológico o molecular sobre los virus PRRS circulantes en el Ecuador. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es investigar los virus PRRS circulantes en el Ecuador en 2017, 2018 y 2019 a nivel molecular mediante la secuenciación de ORF5. Los resultados demuestran que las 9 cepas de PRRSV pertenecen a PRRSV-2, pero la diversidad entre cepas es alta, según la identidad de nucleótidos y los árboles filogenéticos. Las secuencias más similares a los virus de Ecuador provienen de virus presentes en Norte América y Perú. Esta información sugiere que el PRRSV ingresó en dos eventos independientes al país a través de múltiples fuentes y rutas de transmisión, lo que debe ser considerado para desarrollar estrategias de prevención y control, y así proteger la salud porcina del país.

## 1. Introducción

El PRRSV, conocido como síndrome respiratorio y reproductivo porcino, es una enfermedad que afecta a los cerdos domésticos en muchos países (Zhang & Yoo, 2015). Esta patología se caracteriza por producir abortos y nacimientos de lechones débiles, aumento de la mortalidad en lechones lactantes y destetados, y enfermedad respiratoria en lechones destetados y de engorde (Nodelijk, 2011). El síndrome es causado por el virus PRRS (PRRSV),

el mismo que puede agravar otras infecciones producidas por virus como el coronavirus respiratorio porcino y la *Influenza A*, o bacterias como *Streptococcus suis* (Nelsen et al., 1999). El PRRSV es un virus que posee un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo y pertenece a la familia Arteriviridae, género Porarterivirus (Adams et al., 2017). Se divide en dos genotipos: PRRSV-1 que es europeo, y PRRSV-2, que es americano (Meng et al., 1995).

La enfermedad de PRRS ocasiona altas pérdidas económicas en la industria porcina, además es prevalente en numerosos países que se dedican a la producción de carne de cerdo (Renken et al., 2021). En Europa, los países que están libres de la enfermedad son Australia, Nueva Zelanda, Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza (WOAH, 2023). En América del Sur, países como Argentina, Brasil y Paraguay nunca han notificado la enfermedad de PRRS a la Organización Mundial de Sanidad Animal, mientras que en Ecuador, Colombia, Perú, Bolivia, Venezuela y Uruguay el virus está presente (WOAH, 2023). El manejo y la erradicación del PRRSV presentan dificultades debido a las estrategias empleadas por el virus para interferir con el sistema inmunológico innato del huésped, su capacidad de generar infecciones persistentes y su propagación a través de diversas vías de transmisión. Además, existen dificultades para implementar medidas de control de la enfermedad, como la variación genética del PRRSV (Kapur et al., 1996), la compleja dinámica de los movimientos de cerdos entre granjas y los rigurosos estándares de bioseguridad, lo que hace que el análisis epidemiológico y molecular de este virus sea de gran importancia para monitorear los cambios de estos patógenos circulantes.

En Ecuador, en abril de 2017, se reportaron signos clínicos compatibles con PRRS en una granja porcina comercial ubicada en el km 11 vía Quevedo en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. El Laboratorio de Diagnóstico Veterinario oficial de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD), confirmó que las muestras recolectadas de la granja sospechosa eran positivas a PRRSV. Se realizó vigilancia activa en nueve fincas epidemiológicamente relacionadas, entre ellas dos fincas sospechosas que resultaron negativas a PCR. Toda la población porcina de la granja fue sacrificada, se aplicó un seguimiento de 30 días y una desinfección exhaustiva (OIE, 2017).

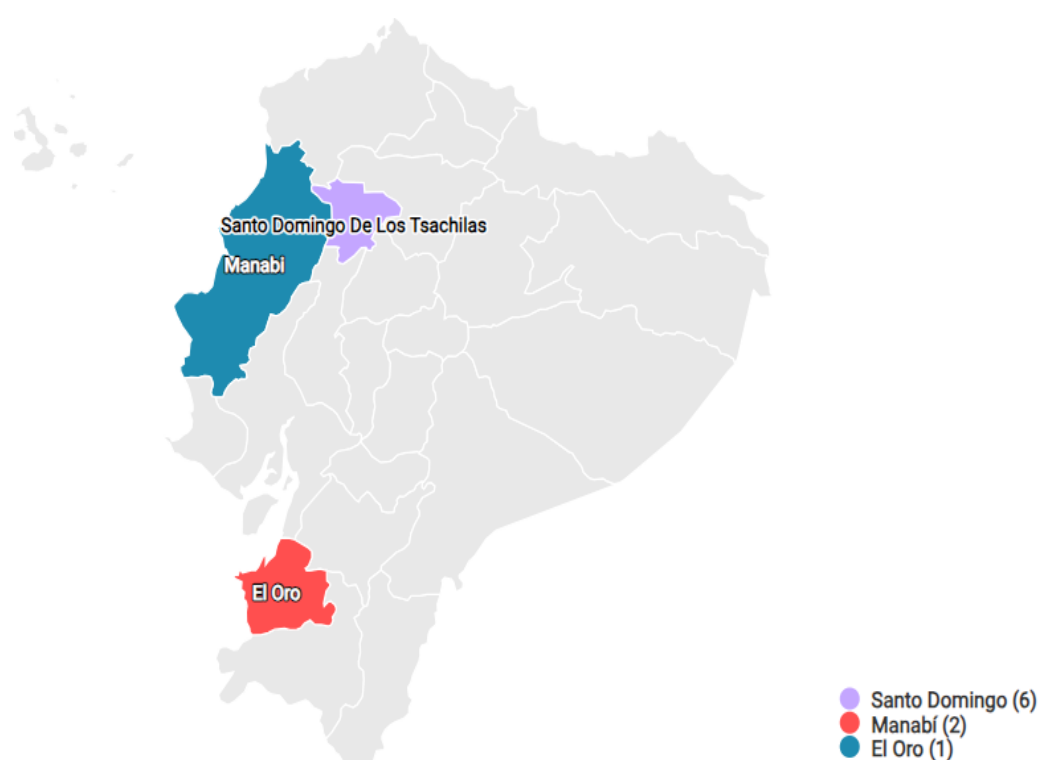
Desde la primera notificación oficial de PRRS en una granja porcina del Ecuador en 2017, no se ha publicado ningún estudio molecular sobre los virus PRRV en el país. Por tanto, en este trabajo se propuso investigar los virus PRRS circulantes en Ecuador entre 2017 y 2019

mediante técnicas moleculares, para esto se plantearon como objetivos específicos: i) tipificar los virus PRRV circulantes mediante la secuenciación ORF5, ii) comparar las secuencias obtenidas con secuencias originales de otros países latinoamericanos y disponibles en GenBank para investigar la relación genética.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Muestras

Se utilizaron nueve muestras de suero sanguíneo de animales con signos compatibles para PRRSV. Las muestras procedieron de tres granjas porcinas industriales ubicadas en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí y El Oro, fueron recolectadas por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) y analizadas por la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Central del Ecuador entre los años 2017 y 2019 (Figura 1).



**Figura 1.** Casos de PRRSV distribuidos en Ecuador entre 2017 y 2019

### 2.2. Secuenciación Viral

Las nueve muestras con signos compatibles para PRRSV resultaron positivas, las mismas fueron confirmadas por PCR en tiempo real y se enviaron al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Federal de Investigación para la Salud Animal de Alemania para detección viral y secuenciación ORF5. Se utilizó ORF5 porque codifica para una proteína de la membrana estructural del virus y tiene una alta tasa de sustitución genética (Alvarez et al., 2016). Para la secuenciación de nucleótidos de ARN, se amplificó el ORF5 utilizando una mezcla de primers siguiendo la metodología descrita por Wernike et al. (2012).

### 2.3. Análisis Filogenético

Se analizaron las secuencias ORF5 del virus de las muestras confirmadas en Ecuador durante los años 2017 y 2019 (Tabla 1). Además, para conocer el número de invasiones del virus al país, identificar la provincia donde ocurrió el primer ingreso y reconstruir la filogenia de los virus ecuatorianos secuenciados se recuperaron las secuencias virales de referencia genéticamente diversas de PRRSV de diferentes ubicaciones geográficas (América del Norte, América del Sur, Asia y Europa) del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Todas las secuencias se alinearon usando muscle del paquete msa (Bodenhofer et al., 2015). La filogenia se construyó utilizando el método Neighbor-Joining implementado en el paquete ape (Paradis et al., 2004). Las distancias evolutivas se calcularon empleando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo general de tiempo reversible del paquete phangorn (Schliep, 2011). Los árboles se dibujaron a escala con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. La cepa de referencia de PRRSV tipo 2 de EEUU (EF536003) se utilizó como grupo externo para comparar las puntuaciones de similitud. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa R versión 4.2.3.

**Tabla 1.** Información de los 9 aislamientos de PRRSV del Ecuador en este estudio

<b>Nombre de la cepa</b>	<b>Provincia</b>	<b>Año</b>
01-MANABI-ECU	Manabí	2018
02-MANABI-ECU	Manabí	2019
01-SANTO-DOMINGO-ECU	Santo Domingo de los Tsáchilas	2017
02-SANTO-DOMINGO-ECU	Santo Domingo de los Tsáchilas	2017
03-SANTO-DOMINGO-ECU	Santo Domingo de los Tsáchilas	2017

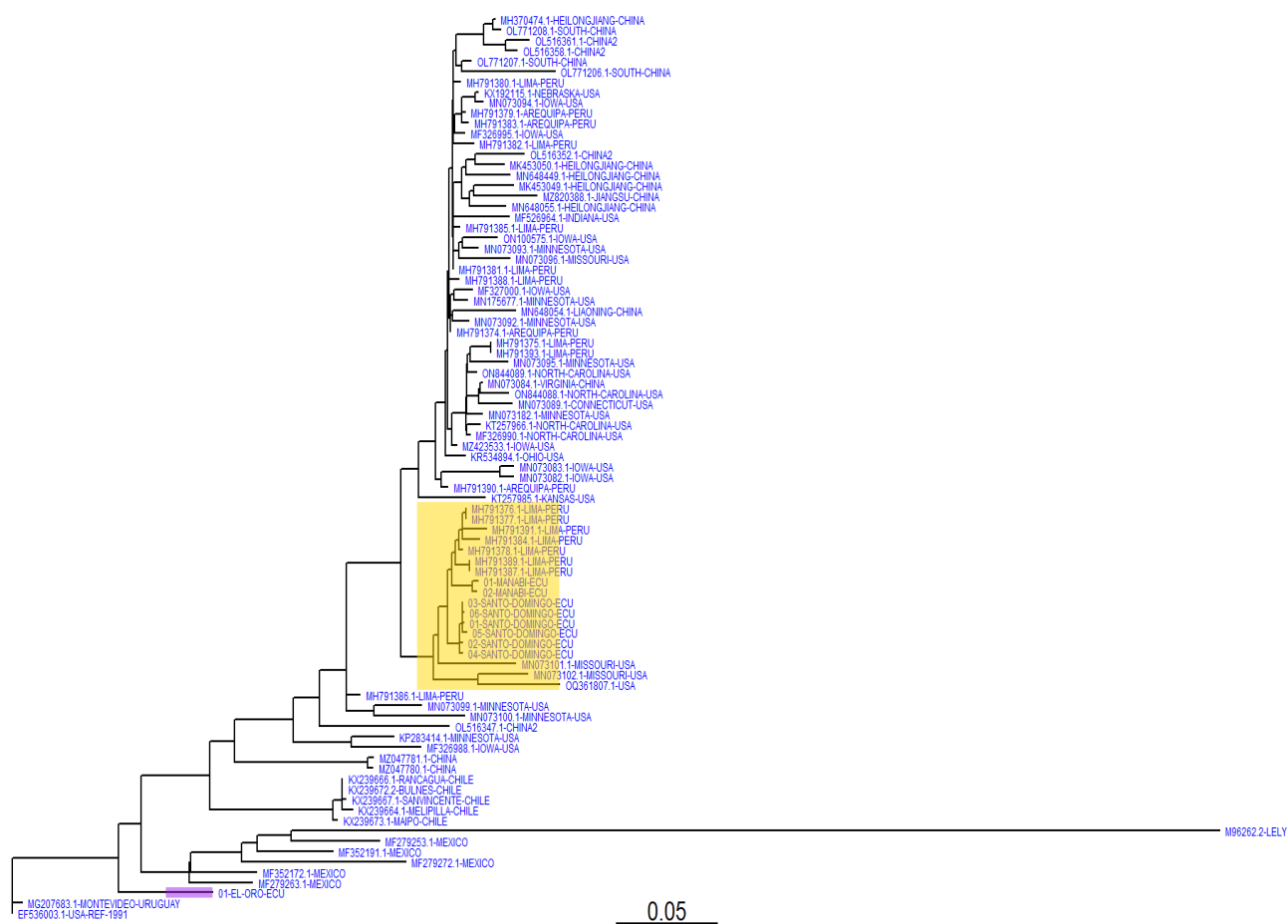
04-SANTO-DOMINGO-ECU	Santo Domingo de los Tsáchilas	2017
05-SANTO-DOMINGO-ECU	Santo Domingo de los Tsáchilas	2017
06-SANTO-DOMINGO-ECU	Santo Domingo de los Tsáchilas	2017
01-EL-ORO-ECU	El Oro	2018

### 3. Resultados

En el presente trabajo, se compararon las secuencias ORF5 de nueve virus, originados en diferentes provincias de Ecuador con las secuencias del GenBank, para determinar la diversidad genética de los virus PRRS. Todos los virus investigados pertenecen a PRRSV-2 (Figura 2), sin embargo no comparten un ancestro en común (parafiléticos). Ocho virus tuvieron una similitud de nucleótidos de 88.92 a 90.15 % con el virus de EEUU (GenBank EF536003), cepa de referencia de tipo 2; mientras que el virus restante tuvo una similitud de 92,87 %, por lo que los virus ecuatorianos parecen divergir de otras secuencias.

Por consiguiente, los aislamientos formaron dos grupos distintos en el árbol filogenético basado en las secuencias ORF5 (Figura 2). Dentro del primer grupo (virus coloreados en naranja) se observó poca diversidad genética entre las cepas ecuatorianas comparado con las cepas de Missouri, EEUU (MN073101) y Lima, Perú (MH791387), así por ejemplo, la identidad de nucleótidos entre las primeras y 01-SANTO-DOMINGO-ECU (97.06 %) y 01-MANABI-ECU (96.18 %) estaba por encima del 90 %, lo mismo ocurrió al comparar las secuencias con la cepa peruana, 01-SANTO-DOMINGO-ECU (98.18 %) y 01-MANABI-ECU (97.37 %). Las cepas de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí comprenden una nueva introducción del virus al país, pero independiente a la de El Oro; estas comparten un ancestro común con la cepa de Lima, Perú (MH791387), asimismo este clado de América del Sur comparte un ancestro con la secuencia de Missouri, EEUU (MN073101).

Con respecto al segundo grupo (virus coloreado en morado), se notó que la cepa de El Oro (01-EL-ORO-ECU) quedó sola en una rama del árbol, sin embargo, al compararla con la cepa mexicana (MF352172) que estaba más próxima, la similitud fue de 88.80 %. Aunque la secuencia de la provincia de El Oro comparte un ancestro común con varios linajes del continente Americano, su mayor similitud con el linaje de México podría sugerir que el ingreso del virus a la provincia de El Oro fue desde Norte América.



**Figura 2.** Análisis filogenético de las secuencias de PRRSV aisladas en Ecuador entre 2017 y 2019

#### 4. Discusión

En esta investigación se describe el primer estudio molecular sobre los virus ecuatorianos de PRRS desde su primera notificación oficial en el 2017, en una granja de cerdos de cría y engorde de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (OIE, 2017) hasta los casos confirmados en el 2018 y 2019 en las provincias de Manabí y El Oro. Los resultados demuestran que las nueve cepas de PRRSV procedentes de las provincias mencionadas pertenecen a PRRSV-2, además que estas cepas pertenecen a dos clados que son parafiléticos, demostrando una diversidad de linajes relativamente alta en Ecuador. La diversidad de linajes de los virus presentados sugiere que el PRRSV está en constante evolución para adaptarse a la inmunidad natural, así como a la adquirida por la vacuna (Morgan et al., 2013). En Ecuador no se administra la vacuna porque no es una enfermedad endémica, sin embargo, en caso de implementar un plan sanitario, es importante considerar las limitaciones o aspectos negativos de las vacunas disponibles actualmente (Nan et al., 2017).

Para los análisis moleculares de las muestras de PRRS se utilizaron las secuencias ORF5, este marco de lectura abierta junto con el ORF7 cubre aproximadamente el 7 % del genoma de PRRSV. El ORF5 es uno de los marcadores ideales para el análisis filogenético (Ramos et al., 2022) debido a que ha sido usado frecuentemente en estudios anteriores, además constituye una de las regiones más variables del genoma, contiene sitios antigénicos importantes para neutralizar anticuerpos y proporciona información evolutiva relevante del virus (Darwich et al., 2011; Shi et al., 2010). Aunque la secuenciación del genoma completo puede mejorar el entendimiento de como las nuevas mutaciones afectan la detección de anticuerpos de virus (Franzo et al., 2014), el ORF5 representa un recurso efectivo para la detección, identificación de cepas y vigilancia epidemiológica de PRRSV en las granjas locales.

Las secuencias analizadas de los virus ecuatorianos mostraron una similitud con la cepa de referencia de EEUU de 92.87 %, mientras que con otros norteamericanos y peruanos existió una identidad alta (>90 %) lo que permite inferir una relación estrecha y determinar el ingreso del virus al país. Estos resultados sugieren dos diferentes invasiones del virus a Ecuador. Una desde Norte América y una segunda invasión desde Lima, Perú. En este estudio no se usaron cepas de Europa, puesto que en este continente el virus es endémico y no se utiliza la secuenciación como una herramienta de vigilancia de rutina, por tanto no depositan sus secuencias en el GenBank (Carlsson et al., 2009). A pesar de no haber ingresado secuencias de Europa, estudios previos no muestran una relación con las de América del Sur. Por ejemplo, en Suiza en el 2012, se mostró una similitud alta con virus de referencia en Europa (Nathues et al., 2016). Por otro lado, rebrotes en América del Sur no sugieren una relación con linajes de Europa. Específicamente, en Chile que había erradicado la enfermedad y tuvo un brote en 2013 en una granja comercial, se evidenció una similitud elevada con virus de EEUU (Neira et al., 2017). Lo mismo sucedió con Uruguay y Perú, quienes tuvieron una similitud alta con los virus de EEUU (Ramos et al., 2022).

El presente estudio sugiere dos invasiones distintas en Ecuador. No obstante, la forma precisa de cómo se introdujo el PRRSV desde Perú o Norte América al Ecuador es desconocida. Una posibilidad es que hubo una transmisión indirecta de la cepa de América del Norte a través de países vecinos como Colombia y Perú, donde la enfermedad es endémica (WOAH, 2023) y porque algunos casos se ubicaron cerca de las fronteras del país. Otra alternativa puede ser una transmisión directa al importar animales vivos o semen con fines de mejoramiento genético o a través de las personas que pueden actuar como vehículos de transmisión del agente patógeno.

A pesar de que el país cuenta con estrictas normas sanitarias que restringen la importación ilegal de animales y productos biológicos (AGROCALIDAD, 2022), existe la probabilidad de importación o ingreso ilegal de productos porcinos y de materiales de riesgo.

Los casos reportados en el país han sido únicamente de granjas porcinas de tipo comercial, no se incluyó datos de granjas familiares ni tampoco de cerdos salvajes. Las investigaciones epidemiológicas de campo realizadas por AGROCALIDAD sugieren que la transmisión del PRRSV a las granjas familiares puede ocurrir muy probablemente como un desbordamiento de las granjas comerciales. Si se diera el evento, podría ser confirmado por un análisis filogenético de las secuencias virales de granjas comerciales y familiares. Los cerdos salvajes o asilvestrados también pueden representar una ruta alternativa de entrada y diseminación del PRRSV, no obstante, no se tienen datos de la presencia de estos ejemplares en las zonas cercanas donde se diagnosticaron los casos, solo se conoce la existencia de estos animales en las Islas Galápagos (Cruz et al., 2005). De todas formas, la propagación de la enfermedad dentro del país puede haber estado relacionada con el personal, el equipo, el transporte y el movimiento legal o ilegal de animales (Otake, Dee, Acvm, et al., 2002; Otake, Dee, Jacobson, et al., 2002).

Existen algunos países como Hungría y Chile en los que se ha logrado la erradicación del PRRS luego de la circulación viral endémica (Neira et al., 2017; Szabó et al., 2019). Por el contrario, la detección de múltiples eventos de introducción del PRRSV en el Ecuador demuestra que a pesar de las restricciones reforzadas por los servicios nacionales de salud animal, el sistema es vulnerable y las enfermedades animales no locales son una amenaza importante para la población porcina nacional. Un brote de PRRS puede significar pérdidas económicas significativas para la industria y recursos costosos desplegados por los servicios de salud animal para el control de enfermedades, como los reportados en el país en 2017 al sacrificar 469 cerdos (OIE, 2017). Por lo tanto, estos resultados pueden contribuir a mejorar la prevención y la preparación para próximos eventos sanitarios.

## **5. Conclusiones**

El genotipado del virus del PRRS (Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino) mediante estudios moleculares es una herramienta fundamental para evaluar la eficacia de las medidas de bioseguridad internas y externas, así como para obtener una mayor comprensión de la ecología de este virus. En el presente estudio, se ha caracterizado por primera vez la

invasión y diversidad del virus del PRRS en Ecuador. Los resultados filogenéticos permitieron identificar dos diferentes invasiones del PRRSV, una en la población porcina de El Oro, y otra invasión distinta en Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí. Estos resultados ayudarán a entender las rutas de invasión y así mejorar las estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Las secuencias de referencia más similares a los virus del PRRSV que han ingresado a Ecuador provienen de virus presentes de Norte América y Perú. Parece que la transmisión del virus se limita principalmente a granjas de tipo comercial, por su tipo de manejo. Esta información sugiere que el PRRSV puede estar siendo introducido a través de múltiples fuentes y rutas de transmisión. Es importante considerar estas observaciones al desarrollar estrategias de control y prevención para limitar la propagación del virus y proteger la salud porcina en el país.

## References

- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Mushegian, A. R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., Gorbalenya, A. E., & Davison, A. J. (2017). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology*, *162*(8), 2505–2538. <https://doi.org/10.1007/S00705-017-3358-5/TABLES/7>
- AGROCALIDAD. (2022). *Manual general de cuarentena animal*. <https://www.agrocalidad.gob.ec/>
- Alvarez, J., Valdes-Donoso, P., Tousignant, S., Alkhamis, M., Morrison, R., & Perez, A. (2016). Novel analytic tools for the study of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) in endemic settings: Lessons learned in the U.S. *Porcine Health Management*, *2*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40813-016-0019-0/FIGURES/1>
- Bodenhofer, U., Bonatesta, E., Horejš-Kainrath, C., & Hochreiter, S. (2015). msa: an R package for multiple sequence alignment. *Bioinformatics*, *31*(24), 3997–3999. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV494>
- Carlsson, U., Wallgren, P., Renström, L. H. M., Lindberg, A., Eriksson, H., Thorén, P., Eliasson-Selling, L., Lundeheim, N., Nörregard, E., Thörn, C., & Elvander, M. (2009). Emergence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Sweden: Detection, Response and Eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, *56*(4), 121–131. <https://doi.org/10.1111/J.1865-1682.2008.01065.X>
- Cruz, F., Josh Donlan, C., Campbell, K., & Carrion, V. (2005). Conservation action in the

- Galàpagos: feral pig (*Sus scrofa*) eradication from Santiago Island. *Biological Conservation*, 121(3), 473–478. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2004.05.018>
- Darwich, L., Gimeno, M., Sibila, M., Diaz, I., de la Torre, E., Dotti, S., Kuzemtseva, L., Martin, M., Pujols, J., & Mateu, E. (2011). Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains. *Veterinary Microbiology*, 150(1–2), 49–62. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2011.01.008>
- Franzo, G., Cecchinato, M., Martini, M., Ceglie, L., Gigli, A., & Drigo, M. (2014). Observation of high recombination occurrence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in field condition. *Virus Research*, 194, 159–166. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2014.08.005>
- Kapur, V., Elam, M. R., Pawlovich, T. M., & Murtaugh, M. P. (1996). Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *Journal of General Virology*, 77(6), 1271–1276. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-6-1271/CITE/REFWORKS>
- 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. *Archives of Virology*, 140(4), 745. <https://doi.org/10.1007/BF01309962>
- 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(AUG), 279100. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01635/BIBTEX>
- Nathues, C., Perler, L., Bruhn, S., Suter, D., Eichhorn, L., Hofmann, M., Nathues, H., Baechlein, C., Ritzmann, M., Palzer, A., Grossmann, K., Schüpbach-Regula, G., & Thür, B. (2016). An Outbreak of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Switzerland Following Import of Boar Semen. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(2), e251–e261. <https://doi.org/10.1111/TBED.12262>
- Neira, V., Brito, B., Mena, J., Culhane, M., Apel, M. I., Max, V., Perez, P., Moreno, V., Mathieu, C., Johow, M., Badia, C., Torremorell, M., Medina, R., & Ortega, R. (2017). Epidemiological investigations of the introduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chile, 2013-2015. *PLOS ONE*, 12(7), e0181569. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0181569>
- Nelsen, C. J., Murtaugh, M. P., & Faaberg, K. S. (1999). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Comparison: Divergent Evolution on Two Continents. *Journal of Virology*, 73(1), 270. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.270-280.1999>
- Nodelijk, G. (2011). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis: A review.

- [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/01652176.2002.9695128](http://Dx.Doi.Org/10.1080/01652176.2002.9695128), 24(2), 95–100.  
<https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695128>
- OIE, W. O. of A. H. (2017). *Porcine reproductive and respiratory syndrome, Review Report Ecuador*. <https://wahis.woah.org/#/event-management>
- Otake, S., Dee, S. A., Acvm, D., Rossow, K. D., Deen, J., Abvp, D., Soo Joo, H., Molitor, T. W., & Pijoan, C. (2002). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *Journal of Swine Health and Production*, 10(2), 59–65. <http://www.aasv.org/shap.html>.
- Otake, S., Dee, S. A., Jacobson, L., Torremorell, M., & Pijoan, C. (2002). Evaluation of aerosol transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus under controlled field conditions. *Veterinary Record*, 150(26), 804–808. <https://doi.org/10.1136/VR.150.26.804>
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289–290. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTG412>
- 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(7), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S00203-022-02976-W/METRICS>
- Renken, C., Nathues, C., Swam, H., Fiebig, K., Weiss, C., Eddicks, M., Ritzmann, M., & Nathues, H. (2021). Application of an economic calculator to determine the cost of porcine reproductive and respiratory syndrome at farm-level in 21 pig herds in Germany. *Porcine Health Management*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40813-020-00183-X/FIGURES/3>
- Schliep, K. P. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592–593. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ706>
- 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. *Virus Research*, 154(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2010.08.014>
- Szabó, I., Molnár, T., Nemes, I., Abonyi, T., Terjék, Z., & Bálint, Á. (2019). PRRSV eradication on large-scale fattening pig farms in Hungary between 2014 and 2019. *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(4), 529–542. <https://doi.org/10.1556/004.2019.052>
- Wernike, K., Hoffmann, B., Dauber, M., Lange, E., Schirrmeier, H., & Beer, M. (2012). Detection and Typing of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus by Multiplex Real-Time RT-PCR. *PLOS ONE*, 7(6), e38251. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0038251>
- WOAH, W. O. of A. H. (2023). *World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface*. <https://wahis.woah.org/#/home>
- Zhang, Q., & Yoo, D. (2015). PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Veterinary Microbiology*, 177(3–4), 229–241. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.04.002>

## Material Suplementario



**Figura 3.** Análisis filogenético de las secuencias de PRRSV aisladas en Ecuador entre 2017 y 2019, método de distancias

### Línea de Comandos para el análisis del presente trabajo

# Se cargan las librerías

library(Biostrings)

library(seqinr)

library(phangorn)

library(msa)

library(ape)

```

library(ggtree)
library(ggmsa)
library(pheatmap)

# Se establece el directorio de trabajo
setwd("D:/MAESTRIA_BIOLOGIA_COMPUTACIONAL/TITULACION")

# Se cargan los archivos con las secuencias de Ecuador (FASTA)
prokDNA <- readDNASTringSet("PRRSV_ALL.fasta")

# Se alinean las secuencias de ADN (análisis de alineamiento múltiple)
prokAligned <- msa(prokDNA,"Muscle")
class(prokAligned) <- "AAMultipleAlignment"
ggmsa(prokAligned, start = 15153, end = 15802)
ggmsa(prokAligned, start = 15153, end = 15802, char_width = 0.5, seq_name = T) +
geom_seqlogo() + geom_msaBar()

# Se observa la alineación de secuencias
print(prokAligned, show="complete")

# Se convierte la alineación al formato seqinr
prokAligned1 <- msaConvert(prokAligned, type = "seqinr::alignment")

# Se genera una matriz de distancia
prokdist <- dist.alignment(prokAligned1, "identity")

# Se observa la matriz de distancia
df_mat = data.matrix(prokdist)

# Se realizar un split de clusters basada en la matriz de distancias
pheatmap(df_mat,show_colnames =T,cutree_cols = 2,fontsize_row = 3,fontsize_col = 4)

# Se genera un árbol de Distancia Neighbor-Joining
prokTree <- nj(df_mat)

# Se enraiza el árbol filogenético utilizando el outgroup (grupo externo)
tree <- root(prokTree, outgroup="EF536003.1-USA-REF-1991",r=TRUE)

# Se grafica el árbol filogenético de distancias
p <- ggtree(tree) + geom_tiplab(size=1.6, color="blue")+
  geom_highlight(node=96, fill="gold")+
  geom_highlight(node=143, fill="orange")+
  geom_highlight(node=155, fill="purple")
p + geom_treescale()

# Se genera un árbol de máxima verosimilitud (mayor precisión)
prokAligned2 <- msaConvert(prokAligned, type = "phangorn::phyDat")
fit <- pml(prokTree, prokAligned2)

```

```
# Se mejora el árbol usando modelos de Sustitución con Particiones  
fitGTR <- optim.pml(fit, model = "GTR", rearrangement = "stochastic")  
# Se enraiza el árbol filogenético utilizando el nuevo ajuste y el outgroup (grupo externo)  
tree1 <- root(fitGTR$tree, outgroup="EF536003.1-USA-REF-1991",r=TRUE)  
  
# Se grafica el árbol filogenético de máxima verosimilitud  
p1 <- ggtree(tree1) + geom_tiplab(size=1.6, color="blue")+  
  geom_hilight(node=154, fill="gold")+  
  geom_hilight(node=80, fill="purple")  
p1 + geom_treescale()
```