



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR
PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA
DIARREA EPIDÉMICA PORCINA Y SU
EVALUACIÓN EN MUESTRAS CLÍNICAS
OBTENIDAS EN UN BROTE DE DIARREA EN UNA
GRANJA PORCINA DE CICLO COMPLETO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

ERIKA NAYELLI HERNÁNDEZ VILLEGAS

ASESORAS:

**DRA. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA.
DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA.**



Ciudad de México, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi papá, mamá, hermano y hermanas, que día con día me enseñaron el camino que me ha llevado a ser quien soy ahora y sin duda alguna no cambiaría nada ni a nadie.

A ti, que aunque no estés conmigo yo te siento cerca. Gracias por siempre apoyarme en todo, desde los más mínimos detalles hasta las decisiones más complejas. Gracias por ser mi cómplice, mi consejero, gracias por enseñarme a pensar diferente y atreverme a hacer lo que soñé, a sonreír todos los días, a disfrutar la vida y a verla desde otro punto de vista.

Sabes que sin ti nada de esto hubiera sido posible, no tengo nada más que decirte por que ya lo sabes todo, simplemente muchísimas gracias. Eres más que un recuerdo, eres lo mejor que me pudo pasar, y acuérdate que: si te pierdes yo te busco... si tu saltas yo también.

A todos y cada uno de mis amigos (amigas del CCH, amigos, amigas de la licenciatura), sin olvidar a los del laboratorio, que pasamos de ser compañeros de escuela y trabajo, luchando por el mismo sueño, a ser una segunda familia (de guacamayas) muchas gracias.

A mis maestros, gracias por compartir su conocimiento conmigo y por sembrar en mi esa semilla de curiosidad y hambre de saber más.

Finalmente debo reconocer y agradecer a mis lugares favoritos de estudio sin ellos seguramente nada de esto sería igual, así como a mi banda favorita Café Tacvba que siempre me acompaño con una canción en cada momento.

AGRADECIMIENTOS

Gracias por el apoyo proporcionado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con el proyecto “Modulación de la concentración de proteínas de fase aguda en cerdos inmunizados con aislados mexicanos del virus de la diarrea epidémica porcina y su asociación con la variación antigénica”, clave del proyecto IN220515.

A la Dra. María Elena Trujillo Ortega y al M. en C. Rolando Beltrán Figueroa por haberme dado la oportunidad de conocerlos, trabajar con ustedes y compartir conmigo su conocimiento y experiencia. Muchas gracias por apoyarme en todo, hasta el final de este proceso.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva Gracias por confiar en mí y por transmitirme esa emoción y satisfacción que da la ciencia, que aunque siempre me ha gustado, no me atrevía a reconocerla como mi verdadera vocación. Sé que me falta mucho camino por recorrer y mucho conocimiento que adquirir, pero para eso me seguiré preparando.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Epidemiología.....	2
1.2. Situación de la Diarrea Epidémica Porcina en México.....	5
1.3. Agente etiológico.....	8
1.4. Replicación viral.....	12
1.5. Características físicas del agente.....	14
1.6. Forma de transmisión.....	15
1.7. Descripción de la enfermedad de la Diarrea Epidémica Porcina.....	15
1.8. Signos clínicos y lesiones.....	17
1.9. Diagnóstico.....	19
1.10. Prevención y vacunación.....	22
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIALES Y METODOS	25
5.1. Muestras de campo.....	25
5.2. Propagación del virus.....	27
5.3. Células.....	27
5.4. Medio de cultivo.....	27

5.5. Extracción de RNA.....	28
5.6. Cuantificación de RNA.....	28
5.7. RT-PCR.....	28
5.7.1. Oligonucleótidos.....	28
5.7.2. Condiciones de amplificación.....	29
6. RESULTADOS	31
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	43
9. ANEXO DE MATERIALES Y REACTIVOS	44
10. REFERENCIAS	45

Lista de abreviaturas

μl. Microlitro

μM. Micromolar

3'UTR. Región 3' no codificante

5'UTR. Región 5' no codificante

6 días. 1 lechón muerto de 6 días de edad

APHIS. The United States Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Service

APN. aminopeptidasa N

C-1-1 a C-1-5. Lechones de una camada de 6 horas de nacidos

C-2-1 a C-2-5. Lechones de 24-36 horas de nacidos

cDNA. DNA complementario

CEIEPP. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina

CPM. Confederación de Porcicultores Mexicanos

DEP. Diarrea epidémica porcina

DMEM. Dulbecco'S Modification Of Eagle'S Medium

DNA. Ácido desoxirribonucleico

dNTP. Deoxinucleósido trifosfato

E. proteína de envoltura

ELISA. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

Engorda 1 y 2. Cerdos en engorda los cuales presentaban diarrea

FeCoV. Coronavirus felino

FMVZ. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

GET. Gastroenteritis Transmisible Porcina

HcoV-229E. Coronavirus humano 229E

IASA. Laboratorio de Investigación Aplicada SA de CV.

KCl. Cloruro de potasio

M. Proteína de membrana

N. Proteína de nucleocapside

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal

OPORPA. Organización de Porcicultores del país

ORF. Marcos abiertos de lectura

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

PDCoV. Deltacoronavirus porcino

Pp. Poliproteínas

RIP 1 y 2. Lechones muertos de 36-48 horas de edad

RNA. Ácido ribonucleico

RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa con Transcriptasa Reversa

S. Proteína spike

S1. Dominio 1 de la proteína S

S2. Dominio 2 de la proteína S

SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

TAE. Tris- acetato EDTA

Tris-CHI. Tris ácido clorhídrico

UM. Universidad de Minnesota

UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México

USDA. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

UTR. Regiones no traducidas

VDEP. Virus de la diarrea epidémica porcina

Vero. Línea celular de riñón de mono verde africano

VGET. Virus de la gastroenteritis transmisible

RESUMEN

HERNÁNDEZ VILLEGAS ERIKA NAYELLI. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA Y SU EVALUACIÓN EN MUESTRAS CLÍNICAS OBTENIDAS EN UN BROTE DE DIARREA EN UNA GRANJA PORCINA DE CICLO COMPLETO (BAJO LA DIRECCIÓN DE: DRA. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA Y DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA).

La enfermedad de la Diarrea Epidémica Porcina afecta a cerdos de todas las edades, ocasionando un alto porcentaje de mortalidad en lechones, de hasta un 100%. Provoca vómito, diarrea y atrofia de las vellosidades intestinales. En el 2013 el virus llegó a Estados Unidos, Canadá y México, ocasionando el alza en los precios de venta de cerdo en pie y canal, aunado a grandes pérdidas económicas. El diagnóstico se realiza de forma integral y diferencial, ya que se puede llegar a confundir con otras afecciones gastrointestinales causadas por diversos agentes etiológicos. En el presente estudio se estandarizó una técnica de RT-PCR para el diagnóstico del VDEP. Se analizaron muestras de pulmón, intestino delgado, contenido gástrico, estómago y heces de dos camadas de una granja del Estado de México y muestras de cerdos de finalización de dos rastros de Veracruz. Para el análisis de las muestras se utilizaron oligonucleótidos reportados en la literatura para amplificar segmentos del gen S (spike) y M (membrana) del VDEP. El control positivo fue cuantificado para conocer la mínima cantidad de RNA necesaria para la técnica, dando como resultado que se necesita para la amplificación del segmento del gen S, una concentración mínima de 0.09 ng/ μ l y para el gen M 0.9 ng/ μ l. Los resultados del análisis de las muestras fueron muy diversos comparados entre ambos oligonucleótidos utilizados. Se obtuvieron resultados positivos al virus en muestras de pulmón, lo que propone que el virus no solo se encuentra en células intestinales.

1. INTRODUCCIÓN

La Diarrea Epidémica Porcina (DEP) es una enfermedad de origen viral causada por el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP). Forma parte del síndrome diarreico de los lechones, por esta razón es fácil confundirla con otras enfermedades causadas por otros agentes etiológicos, por ejemplo: el virus de la Gastroenteritis Transmisible Porcina (GET), Circovirus Porcino Tipo 2, Rotavirus Tipo A, Deltacoronavirus porcino, *Salmonella spp.*, entre otros. Es por esta razón, la importancia de identificar el agente causal rápidamente, a fin de permitir que los productores lleven a cabo las acciones adecuadas de bioseguridad en las granjas e implementar medidas preventivas y de control para evitar su diseminación (Zhao *et al.*, 2013, Song *et al.*, 2006, Ben Salem *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2001, Ishikawa *et al.*, 1997, Kweon *et al.*, 1999, Huang *et al.*, 2013, Song y Park, 2012, Jung y Saif, 2015, Zhao *et al.*, 2014).

1.1. Epidemiología

La DEP se observó por primera vez en cerdos lactantes en Reino Unido en el año de 1971. Posteriormente, se confirmó que el agente causal de la enfermedad era un virus, el cual fue identificado en 1978 en Bélgica y fue clasificado dentro de la familia *Coronaviridae*. Durante los años 70's a los 90's el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (VDEP) ocasionó grandes pérdidas económicas en diferentes países de Europa, en donde los brotes eran poco frecuentes, pero el virus continuó extendiéndose y persistiendo de forma endémica en las granjas porcinas.

Existen diferentes reportes serológicos realizados en granjas porcinas que muestran una baja a moderada prevalencia en cerdos de Europa y los brotes son esporádicos en ciertas regiones,

presentándose de 1989-1991 en los Países Bajos, Hungría 1995, Inglaterra en 1998 e Italia en 2005-2006 (Chen *et al.*, 2014, Jung y Saif, 2015, Wang *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2010, Shibata *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 2013).

En Asia, el primer caso reportado de DEP se presentó en Japón en 1982, en Corea del Sur en 1993, aunque algunos estudios retrospectivos indican que el virus está presente desde 1987 en esta región, en Corea del Sur el virus es endémico después de la aplicación de vacunas para controlar el brote. En Tailandia se reportó el primer caso en el año 2008 (Chen *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2010, Shibata *et al.*, 2000, Ishikawa *et al.*, 1997).

En China no se conoce con exactitud el año en que comenzó a circular el virus, pero se sabe que en octubre del año 2010 al 2012 se registró una alta incidencia de casos de DEP, convirtiéndose en poco tiempo en una epizootia, el análisis genético del virus demostró la presencia de una variante del virus la cual fue genéticamente diferente a la cepa vacunal aplicada en brotes de la enfermedad anteriormente. Esta nueva variante afectó a cerdos de todas las edades, y provocó una alta morbilidad y mortalidad de casi el 100% en lechones, lo que trajo consigo altas pérdidas económicas en granjas y un aumento considerable en el precio de la carne y subproductos del cerdo (Jung *et al.*, 2015b, Zhao *et al.*, 2013, Song *et al.*, 2006).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), confirmó el primer caso positivo al diagnóstico del VDEP el 17 de mayo del 2013 en Iowa. El 28 de septiembre del mismo año se confirmaron 679 casos positivos a este virus, de un total de 1750 muestras, lo que equivale a un 38.8% de muestras positivas en las diferentes etapas productivas. La cepa identificada durante el brote inicial en 2013 estaba estrechamente relacionada genéticamente

a la cepa China reportada en el brote del 2010 al 2012 (Chen *et al.*, 2014, Jung y Saif, 2015, Huang *et al.*, 2013, USDA, 2014).

La enfermedad de la DEP no forma parte de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). No obstante, y de acuerdo con las obligaciones de notificación de los Países Miembros que figuran en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE, específicamente en el Artículo 1.1.4, relativo a las enfermedades emergentes, se ha registrado un aumento en el número de declaraciones de la enfermedad recibidas y que son transmitidas a través del Sistema Mundial de Información Sanitaria de la OIE (OIE, 2014).

En los Estados Unidos de América, el secretario del USDA, Tom Vilsack, emitió una Orden Federal, el 5 de junio del 2014, en la cual se requiere la notificación de enfermedades porcinas provocadas por coronavirus entéricos incluyendo el VDEP y el Deltacoronavirus porcino (PDCoV), para desarrollar e implementar un plan de manejo razonable para abordar el virus detectado y evitar su propagación.

Con base en los datos de la semana que finalizó el 19 de diciembre del 2015, el informe indica 105 casos positivos al VDEP de los 651 reportes (16.1% positivo). Son 35 estados los que reportan al menos un caso confirmado positivo de PEDV desde el inicio del brote en 2013 en dicho país. El informe también incluye información sobre los casos presentados para el deltacoronavirus porcino (PDCoV), el cual representa una gran amenaza para la industria porcina (AASV, 2015).

Nueve meses después del primer reporte del VDEP en Estados Unidos (mayo 2013), se presentó en Canadá el primer caso positivo a este virus, en enero del 2014, en el suroeste de Ontario, donde se aplicaron medidas inmediatas de control del brote (AASV, 2015).

No se presentaron informes oficiales del VDEP en México; sin embargo, en 2013, el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario (St. Paul, MN, EE.UU.) de la Universidad de Minnesota (UM) analizó muestras procedentes de México y las encontró positivas al VDEP (CDC, 2014).

1.2. Situación de la Diarrea Epidémica Porcina en México

En México, el laboratorio de Investigación Aplicada SA de CV (IASA), confirmó el primer caso positivo de DEP a través de un ensayo inmunocromatográfico el 30 de julio del 2013. Las muestras fueron colectadas en el Bajío mexicano (Degollado, Jalisco y La Piedad Michoacán). El 8 de agosto del mismo año se emitió un diagnóstico confirmatorio por medio de la técnica de RT-PCR en la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (BMEditores, 2014).

En el mes de febrero de 2014 se detectó la presencia de la enfermedad en los estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California, Colima, Distrito Federal, Guerrero, Puebla, Veracruz, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa y Sonora (SAGARPA, 2014, SENASICA, 2014).

Entre los meses de agosto de 2013 a mayo de 2014, fueron analizadas 2,309 muestras por la prueba de RT-PCR en tiempo real en 19 entidades federativas del país. Del total de las muestras sobre casos notificados previamente como sospechosos, únicamente el 30% resultaron positivas a diarrea epidémica porcina (alrededor de 770 casos, de un total de 16 millones de animales) y el 70% negativas a la prueba diagnóstica (SENASICA, 2014).

Reportes de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), muestran que el VDEP se detectó en el país durante los meses de abril y mayo del 2013. A la fecha, la enfermedad presenta una incidencia menor al 1%, respecto al inventario nacional de 16 millones de cabezas de ganado porcino (SAGARPA, 2014).

El banco Rabobank International aseguró que la enfermedad ha tenido un impacto del 60% en el inventario de hembras en Estados Unidos, mientras que en México estimó una pérdida en la producción de carne de cerdo de aproximadamente 9.7% (Porcicultura, 2014). Las pérdidas económicas en México se deben directamente a la elevada mortalidad generada y a que los costos de producción se incrementaron por la aplicación de una mayor bioseguridad en la mayoría de las granjas porcinas.

En nuestro país, al inicio del año 2013 el precio por kilogramo de cerdo en pie fue de \$24.20 y en canal de \$48.00, mientras que para marzo del mismo año, el precio disminuyó a \$17.00 y \$33.00 por kg respectivamente. Al término del mes de abril, el precio aumentó a \$18.50 por kg de cerdo en pie y \$36.00 kg de cerdo en canal. Para finales del mismo año; de octubre a diciembre, el precio por kilogramo de cerdo en pie aumentó de \$22.00 a \$24.70 por Kg y en canal de \$44.00 a \$49.00 Kg.

En septiembre de 2014 el precio de cerdo en pie fue de \$26.00 kg y en canal de \$50.00 kg, lo que muestra un aumento considerable en el precio de la carne de cerdo debido al impacto recibido en la industria porcina por la presencia de la DEP. Este aumento es de aproximadamente el 60%, comparado con el mes de marzo del año anterior cuando se presentó el brote de la enfermedad en los Estados Unidos (Unión Ganadera Regional de Jalisco, 2014).

A fin de evitar que la producción porcícola nacional se vea afectada por el VDEP, la SAGARPA, a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, (Senasica), en coordinación con la Organización de Porcicultores del país (OPORPA) y la Confederación de Porcicultores Mexicanos (CPM), realizan reuniones para analizar cuadros diarreicos atípicos que se presentan en granjas porcinas en diferentes entidades del país. Así mismo, se integró un Grupo Técnico de Sanidad Porcina para dar seguimiento a las medidas de prevención, control e información sobre este padecimiento (SAGARPA, 2014).

El Senasica compartió a la Organización Mundial de Salud Animal (OIE, por sus siglas en francés) un reporte respecto a la situación de la enfermedad de la DEP a nivel nacional, y las acciones que se realizan para atenderla.

La OIE acordó que todos los países integrados a este organismo reporten la existencia o no de la DEP en sus unidades de producción, con el fin de avanzar en los esfuerzos internacionales para hacer frente a esta enfermedad, que afecta únicamente a los lechones y no tiene efectos en la salud humana (SENASICA, 2014).

El Senasica, a través del área de vigilancia epidemiológica desarrolló una *Guía Rápida* para la vigilancia e investigación epidemiológica del virus de la diarrea epidémica porcina, en la cual se incluyen conceptos básicos para aplicar medidas dentro y fuera de las unidades de producción, con el fin de informar a los productores sobre esta enfermedad (SENASICA, 2014).

Actualmente existen vacunas, que han cubierto con éxito los estudios de bioseguridad y que están en espera de su certificación por la USDA. Algunos países como Japón, Corea del Sur

y China ya han probado su eficacia, sin embargo, en México aún no están aprobadas para su aplicación (USDA, 2014).

1.3. Agente etiológico

El virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*, género *Alphacoronavirus*. Es envuelto y pleomórfico, de cadena sencilla en sentido positivo, posee un genoma de RNA no segmentado de aproximadamente 28 kb, 5'cap - 3'cola de poli Adenina. Tiene un diámetro de 95 nm a 190 nm, incluyendo las proyecciones, las cuales son de 18 nm de longitud aproximadamente (Song yPark, 2012, Wang *et al.*, 2014, Jung *et al.*, 2015b, Chen *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2013, Song *et al.*, 2006, Ujike y Taguchi, 2015).

En los extremos 5' y 3' contiene cinco regiones no traducidas (UTR) y se conocen siete marcos abiertos de lectura (ORF2-6) que codifican para cuatro proteínas estructurales; spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocapside (N) y tres no estructurales; el gen de la polimerasa, el cual consta de dos grandes ORFs, que ocupan dos tercios del genoma completo; ORF1a y ORF1b. El gen ORF3 es un gen accesorio (Song y Park, 2012, Jung *et al.*, 2015b, Lee *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2013, Ujike y Taguchi, 2015).

El genoma se organiza en orden de 5'replicasa (1a/1b)-S-ORF3-E-M-N-3'. En el extremo 5'se encuentran el ORF1a y ORF1b, ocupando dos tercios del genoma y codifican para dos poliproteínas (pp1a y pp1ab) y para la polimerasa viral (Chen *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2012, Ujike y Taguchi, 2015).

En el extremo 3' proximal, un tercio del genoma codifica para las cuatro proteínas estructurales; la proteína spike (S) de un peso de 150-220 kDa, proteína de envoltura (E) de

7 kDa, proteína de membrana (M) de 20-30 kDa y proteína de nucleocapside (N) de 58 kDa. El ORF3a está localizado entre los genes estructurales, codifica una proteína accesoria, la cual se sugiere que es un factor de virulencia (Lee *et al.*, 2010, Song yPark, 2012, Wang *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2014, Ujike y Taguchi, 2015). Posee peplómeros glicosilados; proteína S, P1, E, M y una no glicosilada proteína N de unión a RNA (Song y Park, 2012, Ujike y Taguchi, 2015) ver la figura 1.

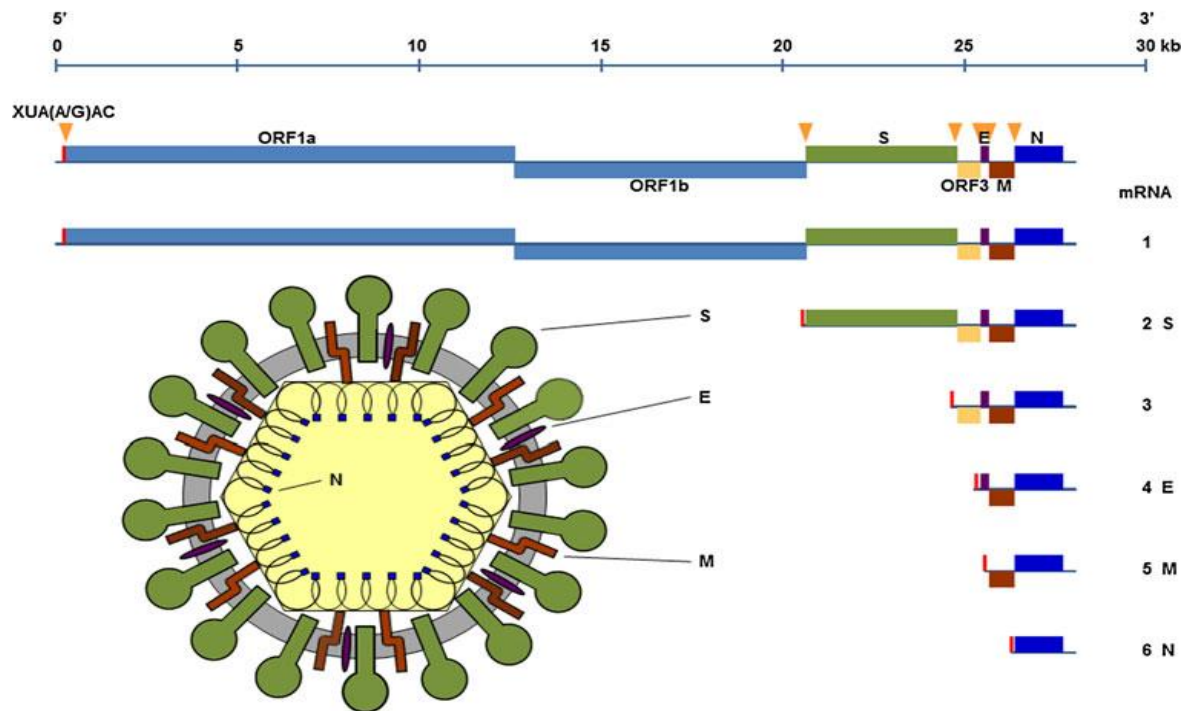


FIGURA 1. Representación esquemática del genoma del VDEP, basado en la cepa CV777 (número de acceso GenBank, AF353511) (Song yPark, 2012).

Entre las proteínas virales estructurales, la proteína S es el mayor antígeno viral, es crítica para la regulación de la interacción con glicoproteínas específicas de los receptores de la célula huésped para mediar la entrada viral y para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Esta proteína es también asociada con el crecimiento y la adaptación *in vitro*, así como la atenuación de la virulencia del VDEP *in vivo*. Es por eso que la glicoproteína S es considerada

como un objetivo primario para el desarrollo de una vacuna efectiva contra el VDEP. (Song y Park, 2012, Jung *et al.*, 2015b, Ren y Li, 2011).

La proteína S del VDEP es una glicoproteína de tipo 1, está compuesta por 1,383 aminoácidos (aa), contiene un péptido señal de 1-18 aa, así como epítomos neutralizantes (499-638, 748-755, 764-771 y 1368-1374 aa), un dominio transmembranal de 1334-1356 aa y un dominio citoplasmático corto. Esta proteína puede dividirse en dos dominios; S1 (1-789aa) y S2 (790-1,383 aa) de acuerdo a la homología con proteínas S de otros coronavirus (Song y Park, 2012, Ujike y Taguchi, 2015).

El dominio S1 es el sitio de unión entre el virión y la membrana celular mediante la interacción de los receptores celulares, iniciando así la infección. La unión con el receptor probablemente induce cambios conformacionales en la glicoproteína S, exponiendo así, el péptido de fusión de la región S2 y activando la fusión de membranas (ViralZone, 2015, Fields *et al.*, 2007).

Al igual que otros coronavirus, la proteína S del VDEP es un peplómero de glicoproteína (antígeno de superficie) en la superficie viral, este juega un rol de pivote en la regulación de las interacciones con glicoproteínas específicas con el receptor de la célula huésped para mediar la entrada viral y simular la inducción de anticuerpos neutralizantes en el hospedero natural (Song y Park, 2012, Ujike y Taguchi, 2015).

Se ha demostrado que esta proteína participa en la unión al receptor en la célula, también es el principal objetivo de anticuerpos neutralizantes. Estudios demuestran que es un blanco para el desarrollo de una vacuna contra este virus (Lee *et al.*, 2010, Ribes *et al.*, 2011, Yin *et al.*, 2007).

Estudios adicionales de esta estructura son esenciales para comprender la relación genética entre el estatus epidemiológico del virus de campo y la diversidad de aislados del VDEP, y

la asociación entre mutaciones genéticas y función viral (Song y Park, 2012, Jung y Saif, 2015).

La proteína M es una proteína transmembranal, es el componente más abundante de la envoltura, juega un papel relevante en el ensamblaje del virus por la interacción con la proteína S y N. Abarca una triple membrana estructural de la glicoproteína con un dominio corto de amino-terminal en el exterior del virus y un dominio largo de carboxi-terminal dentro (Song y Park, 2012, Ujike y Taguchi, 2015, Ren y Li, 2011).

Esta proteína no solo juega un rol importante en el proceso de ensamblaje viral, sino que también induce anticuerpos que neutralizan el virus en presencia del complemento, así como la inducción del interferón α (INF α) (Song y Park, 2012, Ren y Li, 2011).

La coexpresión de las proteínas M y E permiten la formación de pseudopartículas exhibidas para la actividad interferogénica similar a la de los viriones completos. Es por eso que la investigación adicional en la glicoproteína M debería incrementar nuestra comprensión de la relación genética entre aislados del virus de la DEP y la situación epidémica del VDEP de campo (Song y Park, 2012, Ujike y Taguchi, 2015).

La proteína N se une al RNA del virión y provee una estructura básica para la nucleocápside, forma una ribonucleoproteína helicoidal, es una fosfoproteína esencialmente asociada con la transcripción del genoma viral, formación del núcleo y el montaje del virus. Es una proteína conservada y por esta razón puede ser usada como blanco específico en el diagnóstico temprano de la infección por VDEP. Los epitopos de la proteína N son importantes en la inducción de la inmunidad mediada por células (Song y Park, 2012, Ujike y Taguchi, 2015, Ren y Li, 2011).

Se ha reportado que la aminopeptidasa N (APN) es el receptor del virus de la gastroenteritis transmisible (VGET), coronavirus humano 229E (HcoV-229E) y coronavirus felino (FeCoV), todos estos pertenecen al grupo 1 de los coronavirus al igual que el VDEP (Song y Park, 2012, Jung *et al.*, 2015b).

El gen accesorio ORF3 se cree que influye en la virulencia, en algunos experimentos la adaptación del virus al cultivo celular se ha usado para alterar este gen y así reducir la virulencia como es el caso con el VGET (Song y Park, 2012).

La diferenciación de los genes ORF3 entre los virus altamente adaptados a cultivos celulares y los virus de campo podría ser un marcador para la adaptación de cultivo celular y la atenuación del virus de campo, por lo tanto las medidas de la variación en el gen ORF3 podría ser una herramienta valiosa en estudios de epidemiología molecular de la PEDV (Song y Park, 2012).

1.4. Replicación viral

La unión del virus a los receptores (APN) de la célula huésped se lleva a cabo por la proteína S viral en el dominio S1, en conjunto con un correceptor de azúcar. La entrada del virus es mediada por el dominio S2, que con ayuda de acidificación del medio y la presencia de enzimas proteolíticas (tripsina) induce la fusión de membranas y liberación del genoma viral al citoplasma de la célula (ViralZone, 2015, Fehr y Perlman, 2015).

Este proceso es seguido de la síntesis del gen de la poliproteína replicasa para la traducción del RNA genómico viral. (Ujike y Taguchi, 2015).

La replicación viral ocurre en el retículo endoplásmico, donde se sintetiza RNA de doble cadena a partir de RNA genómico de cadena sencilla. El RNA genómico de cadena doble es

transcrito y replicado, dando lugar a RNA mensajero viral y nuevo RNA genómico de cadena sencilla (Fehr y Perlman, 2015).

Se lleva a cabo la traducción de la síntesis de proteínas estructurales codificadas por el ARN mensajero subgenómico, las proteínas S, E, M son traducidas e insertadas en el retículo endoplásmico, y posteriormente son llevadas al compartimiento intermedio retículo endoplásmico-Golgi. El genoma viral es encapsidado por la proteína N y las proteínas estructurales del compartimiento, formando así viriones maduros.

Seguido del ensamblaje, los viriones son transportados a la superficie de la célula por vesículas y liberadas por exocitosis (Ujike y Taguchi, 2015, Fehr y Perlman, 2015) ver la figura 2.

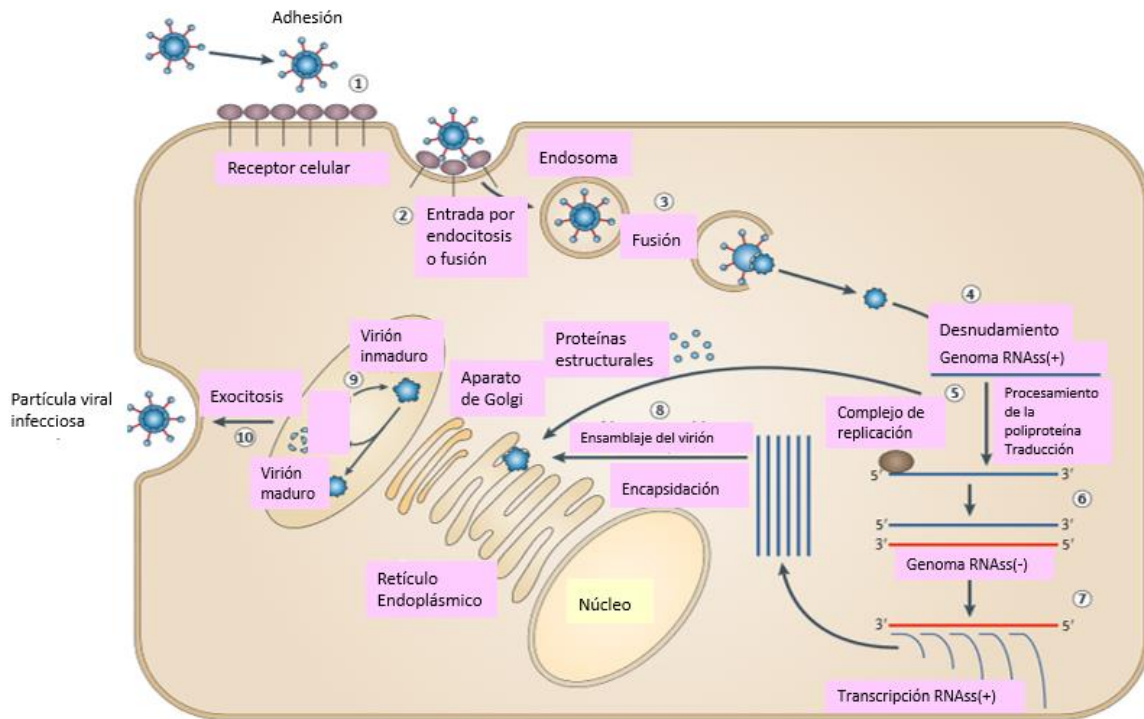


Figura 2. Representación esquemática de la replicación viral de un virus RNA⁺ (Suthar *et al.*, 2013).

Existen múltiples estudios donde reportan el aislamiento del VDEP en cultivo celular utilizando la línea celular Vero (riñón de mono verde africano) y medio de cultivo adicionado con tripsina. El efecto citopático observado se caracteriza por fusión celular, formación de sincitios, vacuolización y desprendimiento celular (Chen *et al.*, 2014, Hofmann y Wyler, 1988, Shibata *et al.*, 2000, Kusanagi *et al.*, 1992, Kweon *et al.*, 1999).

1.5. Características físicas del agente

Se conoce que después de la incubación del virus en cultivo celular dejándolo a una temperatura de 4°C en un rango de pH de 3 a 10 por 6 horas, el VDEP muestra de baja a moderada infectividad residual, mientras que a 37°C por 6 horas retiene infectividad solo entre los rangos de pH de 5 a 8.5, pero el virus es totalmente inactivado a un pH menor a 4 y mayor a 9 (Song y Park, 2012).

El VDEP es sensible al éter y cloroformo, tiene una densidad en sacarosa de 1.18 g/ml, es relativamente estable a una temperatura de 4-50°C. El virión se inactiva a una temperatura de 60°C. De acuerdo con la OIE el virus sobrevive al menos 28 días en el estiércol a 4°C; 7 días a 25°C en alimentos secos contaminados con material fecal; hasta 14 días a 25°C en piensos húmedos y, por lo menos, 28 días en una mezcla de alimentos húmedos a 25°C (Song y Park, 2012, Jung y Saif, 2015, USDA, 2014, OIE, 2014).

Estos datos nos indican que el VDEP es inactivado por desinfectantes ácidos o alcalinos; agentes oxidantes, cloro, compuestos fenólicos, formalina al 1%, anhídrido de sodio al 4%, formaldehído y glutaraldehído, solventes lipídicos, yodóforos en ácido fosfórico al 1% e hidróxido de sodio al 2%, así como detergentes no iónicos. Aplicados a ciertos periodos de temperaturas mayores a 37°C (Lee *et al.*, 2010, Jung y Saif, 2015, OIE, 2014).

1.6. Forma de transmisión

La forma de transmisión del VDEP es directa, oral-fecal entre los cerdos infectados; o bien indirecta por fómites contaminados con diarrea, heces o vómito, tales como camiones de transporte y piensos, son las principales fuentes de contaminación del virus.

Otros posibles reservorios del VDEP incluyen a los transportistas, cerdos mayores con infección asintomática, en los cuales la enfermedad se presentó de forma subclínica. Se sugiere también transmisión aérea, ya que de acuerdo con algunos estudios se ha llegado a identificar partículas infecciosas del virus, así como material genético hasta 10 millas alrededor de granjas infectadas (Kim *et al.*, 2007, Jung y Saif, 2015, OIE, 2014).

Jung y colaboradores en el 2015, reportaron del 23-41% de RNA del VDEP en muestras de leche de cerdas lactantes afectadas con el virus, sugiriendo que la leche de cerdas afectadas podría ser una ruta de transmisión vertical del VDEP (Jung y Saif, 2015).

El periodo de incubación del virus en lechones es de 3 a 4 días y el periodo infectivo puede durar entre 6 y 35 días después de la aparición de los primeros signos de enfermedad (OIE, 2014, USDA, 2014).

1.7. Descripción de la enfermedad de la Diarrea Epidémica Porcina

El VDEP causa enteritis aguda en cerdos de todas las edades, induce baja en el apetito y peso en cerdos adultos, y a menudo es fatal para los lechones recién nacidos (Shirato *et al.*, 2011).

La morbilidad y la mortalidad en los lechones recién nacidos infectados con menos de 5 días de edad, es del 100% a causa de la diarrea severa y deshidratación. Sin embargo, la mortalidad en los lechones infectados mayores a 10 días es menor del 10%. Conforme

aumenta la edad de los animales disminuye la mortalidad de un 1 a 3% en cerdos en engorda (Kim y Chae, 2000, USDA, 2014).

Es una enfermedad entérica devastadora, los brotes son esporádicos, causando una enteritis severa (Chen *et al.*, 2014). Es altamente contagiosa en cerdos de todas las edades, provoca destrucción de los enterocitos y atrofia de las vellosidades del intestino delgado (Chen *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2010, USDA, 2014).

El VDEP se trasmite de forma oral-fecal, y provoca una mortalidad de hasta un 100% en cerdos menores de dos semanas de edad (Kim *et al.*, 2001, Zhao *et al.*, 2013). Los signos clínicos y las lesiones de la DEP son indistinguibles con la enfermedad causada por el virus de la Gastroenteritis Transmisible porcina. Principalmente estos virus se caracterizan por producir en los cerdos una enteritis aguda, diarrea acuosa, deshidratación, vómito, destrucción y atrofia de las vellosidades del intestino delgado así como una alta mortalidad sobre todo en los cerdos neonatos, como signo secundario se produce una acidosis metabólica. Los signos clínicos dependen de la historia de la granja, si hubo una exposición previa, la inmunidad desarrollada en los cerdos y el estatus endémico de la granja, región y área afectada (Chen *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2010, Song *et al.*, 2006, USDA, 2014).

La infección viral en el intestino de los cerdos provoca diarrea y signos clínicos típicos de una enfermedad entérica, con la diferencia de que no responde al tratamiento con antibióticos (Song *et al.*, 2006).

La diarrea inducida por el VDEP es la consecuencia de la mala absorción provocada por la pérdida masiva de los enterocitos infectados con el virus. Estas células infectadas al ser

examinadas por microscopia electrónica, muestran pérdida en la densidad de los electrones del citoplasma celular y rápida degeneración de las mitocondrias resultando en la pérdida del transporte de energía necesaria para la absorción (Jung y Saif, 2015).

Cambios estructurales y una leve vacuolización es observada en las células epiteliales de la región del colon, interfieren con la reabsorción vital del agua y electrolitos, la deshidratación es exacerbada por el vómito el cual es también producido por la infección del virus.

En los estudios histológicos se observa atrofia de las vellosidades intestinales y fusión de enterocitos, lo que nos indica un claro efecto citopático debido a la replicación del VDEP. Estos cambios en el tejido comprometen la digestión y absorción intestinal. La destrucción o daño a las células por el VDEP puede inducir la atrofia de vellosidades y fusión celular, lo que disminuye el área de absorción de la superficie intestinal, resultando en la mala digestión y mala absorción intestinal, diarrea severa y deshidratación, hasta llegar a la muerte del lechón (Kim y Chae, 2000).

1.8. Signos clínicos y lesiones

Estudios preliminares realizados por Jung *et al.*, (2015b), comprueban que al igual que en la infección aguda por el VGET en donde se observa en los lechones hipercalcemia y acidosis, en lechones inoculados con el VDEP. Un día después del comienzo de la diarrea acuosa aguda, muestran hipernatremia, hipercalcemia e hipercloruremia, pero bajos niveles de calcio y bicarbonato.

Debido a que la integridad intestinal es alterada por la infección con el virus, hay una pérdida de agua en el lumen del intestino por una alta presión osmótica causada por la infección del

VDEP, así como por la absorción de las bacterias que causan co-infecciones intestinales (Jung y Saif, 2015).

Las lesiones macroscópicas se limitan solo al tracto gastrointestinal, se caracterizan por adelgazamiento de las paredes intestinales, observándose transparentes, desde el duodeno hasta el colon, con la acumulación de grandes cantidades de líquido amarillento en el lumen intestinal. El estómago está lleno de leche cuajada, posiblemente debido a la reducción del peristaltismo intestinal. La congestión de los vasos mesentéricos se detecta con frecuencia, y la linfonodos mesentéricos son edematosos. A pesar de la diarrea grave persistente, cerdos infectados presentan de baja a moderado apetito de 3-5 días después de la aparición de la diarrea (Jung y Saif, 2015, Jung *et al.*, 2015a).

De acuerdo con artículos publicados por Ducatelle *et al.*, (1981, 1982), Jung *et al.*, (2014), las lesiones histológicas presentes en lechones infectados experimentalmente son; enteritis atrófica severa y vacuolización leve de las células epiteliales superficiales y edema subepitelial en el ciego y el colon.

La microscopia electrónica demuestra que algunos lechones infectados presentan cambios ultraestructurales en las células epiteliales del colon, pero con falta de lesiones histológicas (Ducatelle *et al.*, 1982). Durante la infección aguda, se muestran enterocitos vacuolados y exfoliación celular masiva en las vellosidades del yeyuno. Se observan vellosidades atrofiadas con frecuencia fusionadas y cubiertas con un degenerado epitelio aplanado (Jung y Saif, 2015).

La infiltración de células inflamatorias es evidente en la lámina propia, no se observan lesiones en el bazo, hígado, pulmón, riñón, y linfonodos mesentéricos de los lechones infectados experimentalmente por vía oral y / o por vía intranasal (Ducatelle *et al.*, 1981).

Durante el período de incubación, es decir, antes de la aparición de los signos clínicos, los cerdos infectados exhiben longitudes vellosidades normales pero con enterocitos vacuolados sometidos a necrosis (Ducatelle *et al.*, 1981). Por 1-3 días después de la aparición de la diarrea, los cerdos infectados exhiben acortamiento severo de las vellosidades intestinales (Jung *et al.*, 2014). Lechones con 84 a 120 horas después de la aparición de los signos clínicos presentan de moderada a grave atrofia de las vellosidades, indicativa de una necrosis celular continua (Jung y Saif, 2015).

1.9. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección en lechones con el VDEP es un diagnóstico integral, puede estar basado en los signos clínicos y lesiones histopatológicas observadas en los cerdos infectados. Sin embargo, en la mayoría de las enfermedades intestinales de lechones se pueden llegar a confundir varios agentes etiológicos, ya que producen signos clínicos similares que coinciden con la enfermedad. Es por esta razón que se recomienda solicitar un diagnóstico diferencial de laboratorio de los agentes causantes de diarreas en lechones (Kim *et al.*, 2007, Ben Salem *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2001).

La enfermedad de la diarrea epidémica porcina causa grandes pérdidas económicas en las granjas porcinas, es por ello la importancia de llegar a un diagnóstico oportuno para poder tomar medidas adecuadas en la unidad de producción y con ello reducir la morbilidad y mortalidad de los animales. El diagnóstico etiológico es integral para las gastroenteritis de origen viral, consiste en la detección del virus; ya sea por aislamiento viral, inmunohistoquímica y microscopia electrónica, estas son técnicas convencionales para la detección del virus de la diarrea epidémica porcina, gastroenteritis transmisible y rotavirus tipo A.

También se utiliza la detección de anticuerpos contra el virus; ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) de captura y más recientemente la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se basa en la amplificación de secuencias específicas del DNA, por medio de la utilización de secuencias cortas de oligonucleótidos sintéticos llamados primers, cebadores o iniciadores, que se hibridan de forma específica con cada una de las cadenas de DNA, previamente desnaturalizadas, llamadas moldes o templados. Para el estudio de los virus con genoma RNA se desarrolló la RT-PCR la cual añade un paso previo de retrotranscripción antes de la realización de la PCR. Tanto la PCR como la RT-PCR han demostrado alta sensibilidad y especificidad. La RT-PCR múltiple, es una variante que permite la detección simultánea de varios agentes etiológicos en una sola reacción, es sensible, rápida y específica (Kim *et al.*, 2001, Song *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2013, Jung *et al.*, 2003).

La RT-PCR es una técnica para la amplificación de moléculas de ARN, usada ampliamente en biología molecular, microbiología, genética, investigación clínica y el diagnóstico de patógenos en el área de medicina veterinaria. Esta técnica se basa en la síntesis de DNA complementario (cDNA), el cual sirve como molde para la reacción de PCR, donde se sintetiza de manera exponencial un fragmento de ADN determinado por un par de iniciadores o cebadores, a partir de RNA con la ayuda de una enzima Transcriptasa Reversa (RT, enzima que poseen los retrovirus para convertir su genoma de RNA en moléculas de DNA).

Para llevar a cabo la reacción se necesitan ciertos reactivos:

- Enzima Transcriptasa Reversa, utilizada para sintetizar moléculas de DNA a partir de RNA.

- Enzima DNA polimerasa termoestable, la más usada es la *Taq polimerasa*, la función natural de la polimerasa consiste en replicar el DNA, adiciona nucleótidos en la reacción, los cuales son complementarios de la base en la posición correspondiente de la cadena templado, así se sintetiza una cadena simple de DNA, complementaria y alineada a cada "primer".
- Un par de oligonucleótidos (iniciadores, primers, cebadores) específicos para la región que se desea amplificar, los cuales están compuestos por secuencias de oligonucleótidos sintéticos cortos, de aproximadamente 20 nucleótidos, estos deben ser diferentes entre sí y deben ser complementarios al segmento que se desea amplificar.
- Deoxinucleósido trifosfato (dNTPs), estos son los nucleótidos que la DNA polimerasa incorpora en la reacción, y estos se van uniendo al extremo del iniciador.
- Buffer, el cual contiene cationes divalentes libres (Mg^{2+} , Mn^{2+}) que actúan como cofactores de la DNA polimerasa, también cationes monovalentes (KCl), así como Tris-HCl para ajustar el pH de la reacción.
- Templado DNA, este contiene la secuencia blanco a la que va dirigida la reacción.

También se necesita de un termociclador, el cual aumenta y disminuye la temperatura según sea necesario en cada paso.

Los pasos de la RT-PCR son:

- Retrotranscripción: se utiliza una enzima retrotranscriptasa inversa, la cual a partir de RNA hace una copia de DNA complementario.

- Desnaturalización. Se lleva a cabo a 95°C, donde las dobles cadenas de ADN se abren formando cadenas sencillas.
- Alineamiento. Se lleva a cabo de 40-60°C, donde se forman y se rompen los puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN, quedando así los iniciadores alineados a la secuencia blanco. Aquí es donde se une la *Taq polimerasa* y comienza a copiar de 5'-3'.
- Extensión. Se lleva a cabo a 72°C, la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad, continúa la síntesis de fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos ya alineados.

Estos se repiten de 30-40 ciclos, donde se siguen produciendo un gran número de copias, hasta que se agotan los reactivos o la enzima pierde actividad. Mediante esta técnica se amplifican miles de copias de DNA del fragmento de DNA limitado por los oligonucleótidos. Los fragmentos de DNA así obtenidos se pueden identificar por visualización de bandas en geles de agarosa (Sambrook, 2001).

1.10. Prevención y vacunación

Debido a que aún no hay vacunas totalmente aprobadas contra VDEP en la mayoría de los países donde se ha presentado un brote, una práctica comúnmente aplicada en granjas a modo de prevención es el uso de “feedback” o “licuados” el cual consiste en la maceración del intestino delgado, contenido gástrico y diarrea de los cerdos que presentan signos clínicos de la DEP en las primeras 6 a 12 horas. Se utiliza exclusivamente un paquete intestinal o diarrea de lechones con signología clínica. En Estados Unidos se recomienda un paquete intestinal para 10 cerdas. En México se ha empleado un paquete para 50 cerdas, considerando la

elevada carga viral del contenido intestinal. El intestino debe ser cortado en trozos pequeños y molido en una suspensión de agua destilada fría y leche descremada, evitando la exposición al sol y a desinfectantes (Goede y Morrison, 2015, USDA, 2014).

El “feedback” se administra individualmente verificando que la dosis administrada sea ingerida en su totalidad. Puede aplicarse con alimento como vehículo o bien directamente en el hocico de la cerda. Se debe evitar el uso de desinfectantes en las naves de gestación durante los días de administración del “feedback” solo se emplea limpieza mecánica. El “feedback” se administra por 5 a 7 días, o bien hasta presentar signología. Se debe incluir la ingesta de “feedback” a machos celadores y hembras de reemplazo que estén programadas para ingreso al hato reproductor en los siguientes 4 meses. La confirmación del éxito en la administración del “feedback” lo da el hecho de que entre un 70% y un 90% de las cerdas hayan presentado vómito, diarrea o anorexia (Goede y Morrison, 2015, USDA, 2014, Porcicultura, 2014).

En Estados Unidos la USDA a través del The United States Department of Agriculture’s Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) asignó el 16 de junio y el 8 de septiembre del 2014 (respectivamente) a los laboratorios Harrisvaccines, Inc. y Zoetis licencias condicionales para la comercialización y uso de sus vacunas contra el VDEP (APHIS, 2015, Zoetis, 2015).

Se estima que las pérdidas económicas anuales en los Estados Unidos a causa del VDEP van de los \$ 900 millones a \$ 1.8 billones de dólares. Esta es una de las principales razones que nos llevan a pensar en la creación de eficientes herramientas de diagnóstico para el VDEP, así como medidas de prevención y tratamiento adecuadas.

2. JUSTIFICACIÓN

La diarrea epidémica porcina es una enfermedad entérica que afecta en mayor medida a lechones lactantes, provocando diarrea acuosa grave, vómito, deshidratación, atrofia de las vellosidades intestinales, seguido de una mala absorción intestinal hasta llegar a la muerte del lechón. La morbilidad va de un 90 a 100% y mortalidad de un 70 a 100% en las granjas porcinas. Provocando así grandes pérdidas económicas en la industria porcina en los países donde se han presentado los brotes.

Los signos clínicos y la diarrea severa manifestados por la enfermedad se pueden llegar a confundir con otros agentes etiológicos (virus, bacterias, parásitos) que causan signos clínicos similares a los de la diarrea epidémica porcina.

Por lo anterior, resalta la importancia de la implementación de una técnica molecular fácil, rápida, sensible y específica como la RT-PCR para el diagnóstico oportuno y eficaz de la diarrea epidémica porcina.

El diagnóstico oportuno permite la implementación de medidas de control y tratamientos correctos de acuerdo al tipo de agente etiológico causante del brote de diarrea en lechones.

3. HIPÓTESIS

Será posible detectar el genoma viral del VDEP asociado al brote de diarreas en lechones de la granja del Estado de México registrado en el 2014 por medio del uso de oligonucleótidos específicos mediante la técnica de RT-PCR estandarizada.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar la técnica del RT-PCR para el diagnóstico molecular del virus de la diarrea epidémica porcina.

Objetivo particular

Propagar el virus de la DEP en línea celular.

Estandarizar la técnica de RT-PCR que amplifica un segmento del gen S del virus de la DEP.

Estandarizar la técnica de RT-PCR que amplifica un segmento del gen M del virus de la DEP.

Determinar la concentración mínima de RNA que se puede amplificar mediante las reacciones de RT-PCR (S y M).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

5.1. Muestras de campo

Las muestras utilizadas fueron colectadas durante un brote de diarrea en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estuvieron conformadas por pulmón, contenido gástrico, estómago; provenientes de 5 lechones de una camada de 6 horas de nacidos (C-1-1 a C-1-5) los cuales presentaban signología clínica inicial a la enfermedad, así como 5 lechones de 24-36 horas de nacidos (C-

2-1 a C-2-5) con signología avanzada de la enfermedad, 1 lechón muerto de 6 días de edad (6 días), 2 lechones muertos de 36-48 horas de edad (RIP 1 y 2), intestino delgado de la primera camada de 6 horas de nacidos (C-1-1 a C-1-5), 1 lechón de 6 días de edad (6 días) y 2 lechones muertos de 36-48 horas de edad (RIP 1 y 2), así como heces de todos los animales antes mencionados y 2 cerdos en engorda los cuales presentaban diarrea (engorda 1 y 2). El listado de las muestras utilizadas se describe en el cuadro 1.

Cuadro 1. Muestras de la granja

	<i>Pulmón</i>	<i>Contenido gástrico</i>	<i>Estómago</i>	<i>Intestino delgado</i>	<i>Hisopos rectales</i>
<i>C-1-1</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>C-1-2</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>C-1-3</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>C-1-4</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>C-1-5</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>C-2-1</i>	✓	✓	✓		✓
<i>C-2-2</i>	✓	✓	✓		✓
<i>C-2-3</i>	✓	✓	✓		✓
<i>C-2-4</i>	✓	✓	✓		✓
<i>C-2-5</i>	✓	✓	✓		✓
<i>6 días</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>RIP 1</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>RIP 2</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Engorda 1</i>					✓
<i>Engorda 2</i>					✓

También se procesaron muestras provenientes del estado de Veracruz, las cuales fueron colectadas en dos rastros municipales en noviembre del año 2015. Las muestras correspondían a cerdos de finalización (un total de 58 muestras). Del rastro número uno se colectaron 16 muestras de intestino delgado y 12 de estómago, del rastro número dos se obtuvieron 11 muestras de pulmón, 3 de intestino delgado y 16 muestras de heces.

5.2. Propagación del virus

Para la estandarización de las condiciones de la técnica de RT-PCR en punto final se utilizó como control positivo una muestra de contenido gástrico de un lechón de la camada de 6 horas de nacido, esta muestra fue positiva al virus de la diarrea epidémica porcina ya que fue secuenciada y registrada en GenBank con el número de acceso KM044331 durante un experimento alterno realizado por un grupo de trabajo del laboratorio de virología. La muestra se inoculó en cultivo celular para la replicación viral siguiendo el protocolo descrito por Hofmann y Wyler, (1988).

5.3. Células

Para la obtención del control positivo a partir de la muestra de campo utilizamos la línea celular Vero ATCC® CCL-81™ (riñón de mono verde africano).

5.4. Medio de cultivo

El medio de cultivo para el crecimiento y mantenimiento de las células utilizado fue Dulbecco'S Modification Of Eagle'S Medium (DMEM), suplementado con 4.5 g/l de L-Glutamina y piruvato, sin bicarbonato de sodio (número de catálogo 50-003-PB, marca Cellgro). Adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino (Grado USDA, número de catálogo 35-010-CV, marca Cellgro/Corning).

El medio de infección utilizado fue el mismo solo que sin suero fetal bovino y adicionado con 10µg de Tripsina Difco™ Trypsin 250 (número de catálogo 215240).

5.5. Extracción de RNA

Del control positivo aislado en cultivo celular y de las muestras de campo se tomó 500µl de cada una de estas. En el caso de los órganos (pulmón, intestino delgado y estómago) se cortaron las muestras en trozos pequeños y se maceraron agregando 1 ml de medio de cultivo Dulbecco 'S Modification Of Eagle 'S Medium (DMEM) para homogeneizarlas.

Posteriormente se realizó la extracción del RNA viral con TRIzol[®] Reagent (Invitrogen Cat. No. 15596-018), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante ajustado a la cantidad de muestra utilizada (Rio *et al.*, 2010).

5.6. Cuantificación del RNA

Se cuantificaron todas las muestras de campo y el aislado del virus (control positivo) con el Espectrofotómetro NanoDrop[™] Lite, realizando dos mediciones y calculando un promedio de la cantidad de RNA presente (viral y celular).

5.7. RT-PCR

Para realizar la reacción de RT-PCR se utilizó el kit comercial OneStep QIAGEN[®] (número de catálogo 210212), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, ajustándolo a un volumen final de reacción de 12.5 µl.

5.7.1. Oligonucleótidos

Se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Kim *et al.*, (2001) para amplificar un segmento del gen S, así como los reportados por Li *et al.*, (2012) para amplificar para el gen M, los cuales se muestran en el cuadro 2. Ambos fueron diseñados para la identificación del virus de DEP con la técnica de RT-PCR punto final en una sola reacción.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados.

<i>Oligonucleotidos</i>	<i>Secuencia (5' - 3')</i>	<i>Posición en gen</i>	<i>Tamaño fragmento</i>
<i>SF</i>	TTCTGAGTCACGAACAGCCA	1,466-1,485	651 pb
<i>SR</i>	CATATGCAGCCTGCTCTGAA	2,097-2,116	
<i>MF</i>	AGTCTTACATGCGAATTGACC	25,545-25,565	765 pb
<i>MR</i>	AGCTGACAGAAGCCATAAAGT	26,289-26309	

5.7.2. Condiciones de amplificación

Para las condiciones de amplificación se utilizó el Termociclador Eppendorf Mastercycler con las temperaturas mostradas en el cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones de amplificación.

<i>T°</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Acción</i>
<i>50°C</i>	1 minuto	Pre calentamiento
<i>50°C</i>	30 minutos	Retrotranscripción
<i>95°C</i>	15 minutos	Inactivación de RT y activación de la Taq Polimerasa.
<i>94°C</i>	2 minutos	Desnaturalización
<i>55°C</i>	30 segundos	Alineación
<i>72°C</i>	90 segundos	Extensión
		35 ciclos
<i>72°C</i>	10 minutos	Extensión final

Los productos de la RT-PCR fueron visualizadas en un gel de agarosa al 2% (anexo N° 1), utilizando el buffer de carga (anexo N° 2) y marcador de peso molecular de 100 bp (anexo N° 3), en una cámara de electroforesis horizontal a 90 volts durante 40 minutos. Finalmente el gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio (anexo N° 4) y fue visualizado en el transiluminador 3UV™ Benchtop Transilluminator UVP. Por último se almacenaron los productos sobrantes de la reacción a -20°C.

6. Resultados

Obtención del control positivo

Del total de las 62 muestras colectadas durante el brote de diarrea en lechones en la granja porcina, la muestra seleccionada de contenido gástrico fue inoculada en la línea celular Vero (para su replicación viral y propagación en tres pasos) fue utilizada como control positivo para la estandarización de la técnica.

Se confirmó la replicación viral por la observación del efecto citopático producido por el virus en la línea celular, el cual fue la formación de sincitios; característico de los coronavirus (Figura 3).

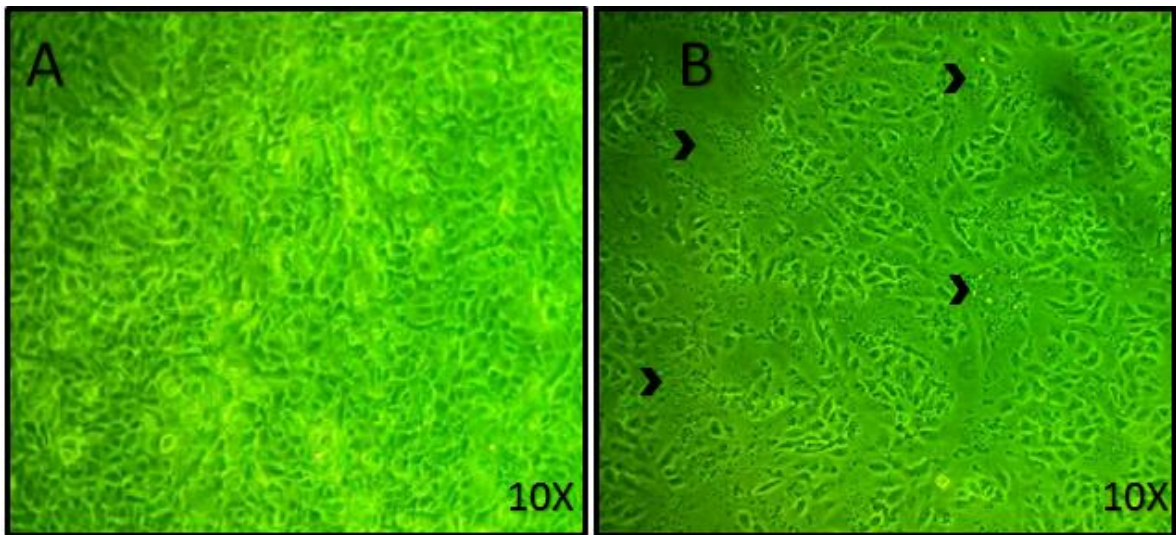


FIGURA 3. Cultivo en la línea celular VERO. La imagen A pertenece al control negativo de células, mientras que la B son células infectadas con el VDEP, observe los sincitios señalados.

Cuantificación de RNA

La cuantificación del control positivo del VDEP, propagado en cultivo celular, dió como resultado una concentración de 933.7 ng/ μ l de RNA. En base a este resultado se decidió utilizar volúmenes de 1, 2 y 3 μ l del control positivo (con concentraciones de 933.7 ng,

1867.4 ng y 2,801.1 ng respectivamente) y 5 diluciones decuples de este para determinar la mínima concentración necesaria a utilizar como control positivo en la técnica de RT-PCR.

Los productos de la amplificación de las diferentes concentraciones y diluciones se muestran en la figura 4.

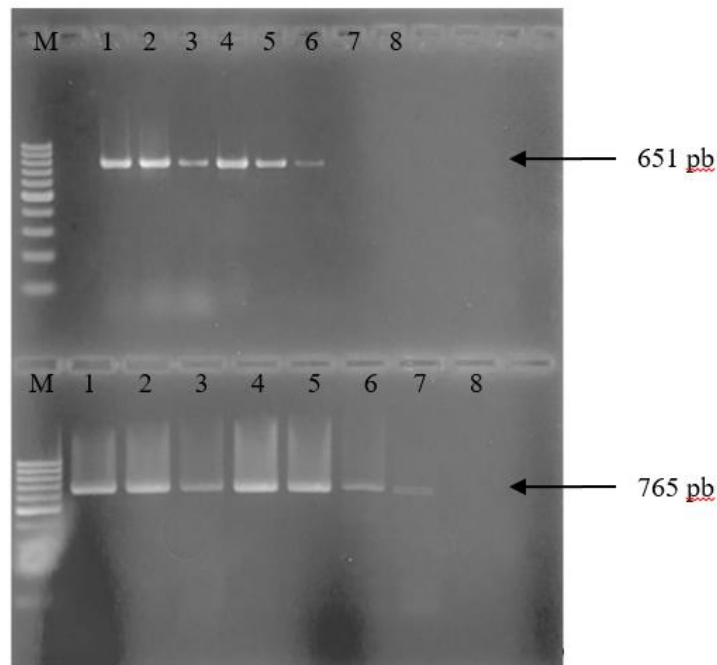


Figura 4. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Amplificación del control positivo con los dos pares de oligonucleótidos usados, arriba el gen M y abajo gen S. **Carril 1.** Marcador de peso molecular 100 pb, **carril 2.** utilizando 1 μ l de templado (933.7) ng/ μ l, **carril 3.** utilizando 2 μ l de templado (1,867.4) ng/ μ l, **carril 4.** 3 μ l (2,801.1) ng/ μ l, **carril 5.** dilución 1/10= 93.3 ng/ μ l, **carril 6.** dilución 1/100= 9.3 ng/ μ l, **carril 7.** dilución 1/1000= 0.9 ng/ μ l, **carril 8.** dilución 1/10,000= 0.09 ng/ μ l, **carril 9.** dilución 1/100,000= 0.009 ng/ μ l. En el carril 7 se sigue observando el amplicon del gen S.

En la parte superior se observan los resultados obtenidos con los oligonucleótidos que amplifican el segmento del gen M, mientras que en la parte inferior se muestran los resultados de la amplificación del gen S. Estos resultados indican que al utilizar una cantidad óptima de 2 μ l del control positivo (concentración de 1,867.4 ng) se puede llegar a apreciar un amplicon bien definido sin que se inhiba la reacción de RT-PCR.

En la dilución 1/10,000 (concentración de 0.09 ng/μl) la reacción sigue siendo positiva al VDEP utilizando los oligonucleótidos diseñados para amplificar el segmento del gen S, mientras que para el gen M a esta concentración el amplicon se deja de observar.

Estos resultados sugieren que la técnica de RT-PCR estandarizada para la amplificación de un segmento del gen S del virus de la DEP tiene un límite de detección una concentración mínima de 0.09 ng/μl y para el gen M 0.9 ng/μl.

Resultados de las muestras de la granja porcina de ciclo completo con brote de diarrea

Las 62 muestras de la granja con brote de diarreas fueron analizadas, se cuantificaron por espectrofotometría (NanoDrop™ Lite), los resultados se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Cuantificación de RNA de las muestras de la granja con brote de diarrea.

	<i>Pulmón</i>	<i>Contenido gástrico</i>	<i>Estómago</i>	<i>Intestino delgado</i>	<i>Hisopos rectales</i>
	ng/μl	ng/μl	ng/μl	ng/μl	ng/μl
<i>C-1-1</i>	107.4	100.2	315.9	1106.0	11.0
<i>C-1-2</i>	99.7	543.2	185.8	1373.1	10.5
<i>C-1-3</i>	55.4	355.9	431.3	994.3	52.6
<i>C-1-4</i>	136.9	202.4	252.7	808.3	12.1
<i>C-1-5</i>	77.1	139.4	394.2	849.2	42.7
<i>C-2-1</i>	50.7	327.9	951.9	NA	18.0
<i>C-2-2</i>	368.5	233.6	231.3	NA	17.2
<i>C-2-3</i>	124	41.6	307.2	NA	45.1
<i>C-2-4</i>	114.6	1292.6	149.4	NA	55.8
<i>C-2-5</i>	70.7	206.1	427.6	NA	37.7
<i>6 días</i>	95.3	85.3	317.1	1836.4	17.8
<i>RIP 1</i>	467.9	1.8	217.1	971	83.1
<i>RIP 2</i>	214.2	117.1	715.8	453	57.7
<i>Engorda 1</i>	NA	NA	NA	NA	75.8
<i>Engorda 2</i>	NA	NA	NA	NA	74.8

Las muestras que contienen una mayor concentración de RNA corresponden a intestino delgado al comparlas con las de hisopos rectales, en las camadas de lechones recién nacidos (signología inicial y avanzada de la enfermedad). Las demás muestras presentan una

concentración similar, con excepción de la muestra RIP 1 (lechón de 36-48 horas edad) de contenido gástrico, la cual es menor significativamente.

Como criterio indicador de muestras positivas al virus de la diarrea epidémica porcina se tomó el tamaño de amplicon del segmento del gen S y del gen M de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados para la técnica.

Las muestras positivas al VDEP con la técnica de RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos para amplificar el segmento del gen S fueron 32. Lo que representa el 51.61% del total de las muestras, mientras que para el segmento del gen M, 33 muestras del total de las 62 analizadas, resultaron positivas al virus de la DEP, lo que representa el 53.22%.

Del total de las 32 muestras positivas amplificadas con el segmento del gen S, 13 pertenecían a contenido gástrico (20.96%), 9 a pulmón (14.51%), 5 a intestino delgado (8.06%), 4 a estómago (6.45%) y 1 muestra de hisopo rectal (1.61%).

Por otro lado, las 33 muestras positivas amplificadas con el segmento del gen M, 12 pertenecían a contenido gástrico (19.35%), 9 a estómago (14.51%), 7 a pulmón (11.29%), 4 a intestino delgado (6.45%) y 1 muestra de hisopo rectal (1.61%).

Los resultados de todas las muestras analizadas (amplificando ambos genes) se muestran en el cuadro 5, donde se marcan con el mismo color las muestras en donde se obtuvo el mismo resultado con los genes S y M.

Cuadro 5. Resultados de la RT-PCR

	<i>Pulmón</i>		<i>Contenido gástrico</i>		<i>Estómago</i>		<i>Intestino delgado</i>		<i>Hisopos rectales</i>	
	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
<i>C-1-1</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>C-1-2</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>C-1-3</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>C-1-4</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>C-1-5</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>C-2-1</i>	+	+	+	+	-	+	NA	NA	-	-
<i>C-2-2</i>	-	-	+	+	-	+	NA	NA	-	-
<i>C-2-3</i>	+	+	+	+	+	-	NA	NA	-	-
<i>C-2-4</i>	+	-	+	+	+	+	NA	NA	-	-
<i>C-2-5</i>	+	+	+	+	+	-	NA	NA	-	-
<i>6 días</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>RIP 1</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>RIP 2</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Engorda 1</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-
<i>Engorda 2</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-

En los cuadros anteriores se pueden apreciar las concentraciones de RNA obtenidas con la cuantificación de las muestras y su relación con los resultados de la amplificación de los segmentos de los genes específicos.

Los resultados obtenidos indican que ambos genes M y S pueden ser utilizados para el diagnóstico, sin embargo, se encuentran diferencias en cuanto al origen de las muestras, ya que para las de contenido gástrico fue posible amplificar ambos segmentos, con la diferencia de la muestra RIP 1, la cual resultó negativa con el gen M. Esto no sucedió así con las muestras de estómago, donde no coincidieron los resultados obtenidos los dos genes, dando mejores resultados los amplificados con el gen M. Los resultados negativos de las muestras de hisopos rectales coinciden con las bajas concentraciones de RNA en las muestras procesadas.

Con el presente estudio se logró identificar mediante RT-PCR la presencia del virus causante del brote de diarreas en cerdos de la granja, no solo en muestras de intestino delgado y contenido gástrico, la cual para esta técnica mostró ser la muestra más adecuada para la

detección del virus, sino también la presencia del VDEP en pulmón, lo que propone que el virus no solo se encuentra en células intestinales.

En la figura 5 se aprecian los resultados de las muestras de contenido gástrico obtenidos con la técnica de RT-PCR. Los amplificados del gen S y los amplificados del gen M muestran una gran similitud excepto con la muestra de RIP 1. Estos datos indican que estas muestras son las ideales para detectar el VDEP por medio de esta técnica.

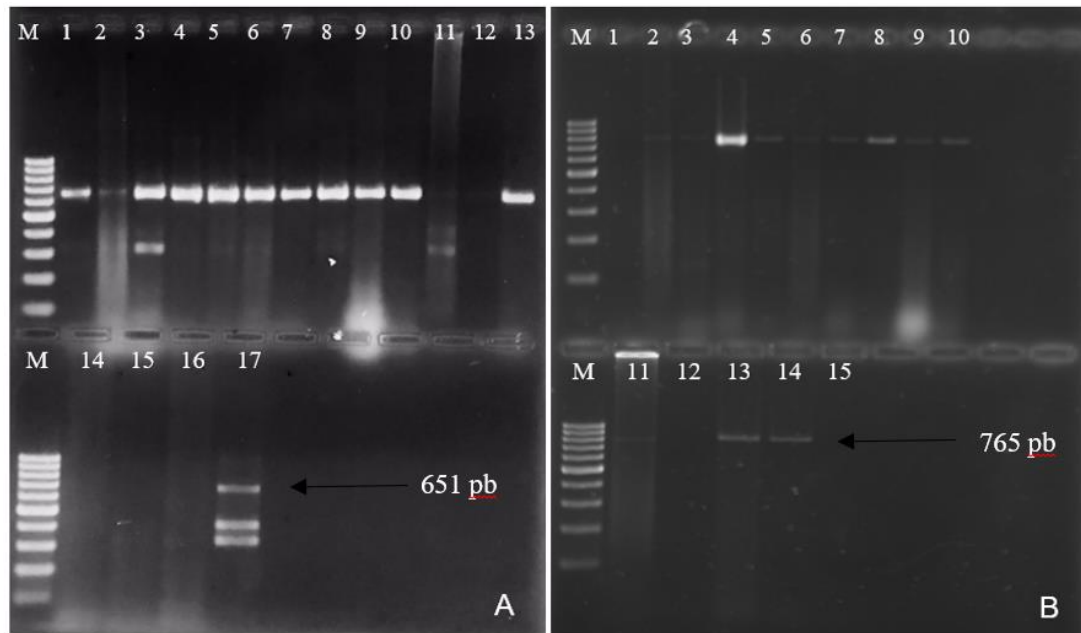


Figura 5. Se muestran los resultados de las muestras de contenido gástrico obtenidos con la técnica de RT-PCR, de lado izquierdo se observan los amplificados del gen S (la M es el marcador de peso molecular de 100 pb, carril 1-13 contenido gástrico positivo, en la parte de abajo, carril 16 y 17 se aprecia el control negativo y positivo respectivamente). De lado derecho se muestran los amplificados del gen M (la M es el marcador de peso molecular 100 pb, carril 1-13 muestras de contenido gástrico, carril 14 y 15 control positivo y negativo respectivamente).

Resultados de las muestras analizadas del estado de Veracruz

La cuantificación del total de las 58 muestras obtenidas en los dos rastros del estado de Veracruz se muestra en el cuadro 5. Se puede observar la diferencia entre las cantidades de RNA presente en los diferentes tipos de muestras analizadas, hay concentraciones desde 61.3

7. Discusión

La Diarrea Epidémica Porcina (DEP) es una enfermedad entérica de origen viral, la cual forma parte del síndrome diarreico de los lechones. Los signos clínicos y la diarrea severa manifestados por la enfermedad se pueden llegar a confundir con otros agentes etiológicos (virus, bacterias, parásitos) que causan signos similares a los de la diarrea epidémica porcina, la morbilidad va de un 90 a 100% y mortalidad de un 70 a 100%. La amplia distribución del virus de la DEP, no solo en Asia y Europa, sino también en los Estados Unidos, Canadá y México ha traído a la industria porcina grandes pérdidas económicas y bajas en la producción de la carne de cerdo.

El diagnóstico oportuno permite la implementación de medidas preventivas y tratamientos correctos de acuerdo al tipo de agente etiológico causante de diarrea en lechones. Es por esta razón que resalta la importancia de la implementación de una técnica molecular fácil, rápida, sensible y específica como la RT-PCR para el diagnóstico oportuno y eficaz de la diarrea epidémica porcina.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de RT-PCR punto final, la cual permitió identificar al virus de la diarrea epidémica porcina en muestras colectadas durante un brote de diarrea en maternidad y engorda de una granja de cerdos. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede decir que se acepta la hipótesis propuesta al inicio del estudio.

La base del diagnóstico viral es la detección del virus o de sus componentes. El aislamiento del virus era la técnica estándar de oro, sin embargo el diagnóstico virológico basado en el aislamiento viral para detectar el VDEP es difícil, ya que hasta el año de 1988 Hofmann y Wyler fueron capaces de propagar al virus de la diarrea epidémica porcina en cultivo celular mediante tratamiento enzimático (tripsina). El aislamiento de virus tiene una sensibilidad y

una especificidad muy alta. Sin embargo, existen algunas desventajas como; el proceso suele ser lento, ya que puede tardar varios días o incluso semanas para la identificación del agente y en consecuencia puede no estar disponible a tiempo e influir en la atención del paciente, además de ser un proceso laborioso y caro. Por otra parte se requiere el uso de sistemas de cultivos adecuados, por ejemplo, se necesitan varias líneas celulares para la detección óptima del virus.

El efecto citopático reportado en la literatura, comparado con del presente estudio, desde el primer pase concuerda con lo observado; la formación de sincitios y fusión celular al igual que Kusanagi *et al.*, (1992) y también con Chen *et al.*, (2014), en donde se observan los mismos efectos citopáticos de dos cepas diferentes del VDEP en una serie de 10 pases.

Hoy en día con el desarrollo de las nuevas técnicas de biología molecular, la identificación de genomas virales ha ayudado en el diagnóstico de enfermedades. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), tiene una sensibilidad tan alta que puede amplificar una única molécula de DNA y una sola copia de genes puede ser extraída, de mezclas complejas de secuencias genómicas y visualizada como bandas diferentes en geles de agarosa.

En estudios previos se ha demostrado que la técnica de RT-PCR, puede presentar límites de detección variables, por ejemplo: Kim *et al.*, 2001 reportaron que al amplificar un segmento del gen de la glicoproteína S, esta técnica es capaz de detectar un mínimo de $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml (Kim *et al.*, 2001), y mediante la amplificación del gen M detectaron $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml (Song *et al.*, 2006, Ishikawa *et al.*, 1997). En el presente estudio se calculó la mínima cantidad de RNA viral que detecta la técnica cuantificando directamente con el nanodrop, los resultados mostraron la amplificación a partir de un mínimo de 0.09 ng/μl de RNA para el segmento del gen S y 0.9 ng/μl para el gen M.

Para la estandarización de la técnica de RT-PCR se utilizó un kit comercial para realizar la reacción en un solo paso (transcripción inversa y PCR en un solo tubo) por lo cual se utilizaron oligonucleótidos específicos para generar cDNA (DNA complementario) para su posterior amplificación. Las ventajas de utilizar un kit en un solo paso es la reducción en la manipulación de las muestras, error en el pipeteo y disminución de contaminación cruzada. Es importante considerar la cantidad y la calidad del RNA utilizado en la reacción, ya que se puede comprometer la eficiencia de la reacción de RT que es la parte más sensible del procedimiento. Por otra parte los kits comerciales pueden ser costosos, sin embargo, se utiliza una menor cantidad de reactivos (IDT, 2016, Lee *et al.*, 2008).

Existen diversos estudios en los que han evaluado la eficiencia de los protocolos en un solo paso, por ejemplo De Paula *et al.*, (2004) probó cinco kits comerciales para RT-PCR, dos kits para reacción en dos pasos (RT y PCR por separado) y tres en un solo paso, entre ellos RT-PCR One-Step QIAGEN. De un total de 27 muestras de suero utilizadas positivas al virus del dengue, 24 y 25 muestras fueron positivas para los kits en dos pasos, y 27 muestras con el kit RT-PCR One-Step QIAGEN, mientras que para los otros dos kits en un solo paso las muestras positivas fueron 6 y 10. Adicionalmente en el estudio, se comprobó que los kits de un solo paso detectan menores concentraciones de virus del dengue tipo 1 que los kits de dos pasos. El kit RT-PCR One-Step QIAGEN detectó hasta 1×10^2 UFP/ml, mientras que el kit de dos paso más sensible (sistema de transcripción inversa/DNA Taq polimerasa) detecta hasta 1×10^4 UFP/ml. La capacidad de detectar concentraciones más bajas del virus de dengue tipo 1 podría explicar por qué el kit RT-PCR One-Step QIAGEN tenía el mejor rendimiento entre los kits probados en sus experimentos. Con estos datos se muestra que los kits de un solo paso son más eficientes en la detección del virus del dengue que los kits de dos pasos, son menos laboriosos, más rápidos y eliminan la etapa de síntesis de cDNA (DNA

complementario) en un tubo diferente, lo que podría dar lugar a una disminución sustancial en la contaminación de la muestra.

Las muestras utilizadas en el estudio de Park y Shin, (2014), donde infectó experimentalmente a lechones con cuatro diferentes aislados del VDEP e identificó mediante la técnica de RT-PCR la presencia de RNA viral, fueron de intestino delgado, pulmón, vejiga, riñón y bazo, utilizó oligonucleótidos diseñados de regiones conservadas del gen S. El resultado obtenido fue positivo en todas las muestras de intestino infectadas con los cuatro aislados y solo un aislado fue positivo para las demás muestras. En el estudio realizado por Ishikawa *et al.*, (1997) estandarizó la técnica de RT-PCR para identificar el VDEP, utilizando muestras de intestino delgado y heces, así como oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen M. En estos experimentos, en comparación con el presente estudio, se utilizan muestras similares pero se incluye pulmón, el cual resultó positivo al VDEP de acuerdo al tamaño del segmento esperado en la RT-PCR. La mayoría de los estudios de diagnóstico para diarrea epidémica porcina se han limitado a estudiar solo del tracto gastrointestinal, es por ello que se necesita un enfoque integral para identificar la patogénesis en otros órganos o en otros tipos de células diferentes. En el estudio realizado por Park y Shin, (2014) identificaron la presencia de genoma viral en el intestino delgado y en las vías respiratorias de los lechones infectados con el VDEP, esto sugiere que, además del intestino delgado, el tracto respiratorio porcino también podría ser un sitio de replicación para el VDEP. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, del total de las 13 muestras de pulmón, 9 y 7 resultaron positivas al VDEP con los oligonucleótidos del gen S y M respectivamente, lo que sugiere no descartar esta posible teoría. Dado que las secuencias del gen S son variables, contienen varios grados de deleción y sustituciones en diferentes cepas de coronavirus aislados (Li *et al.*, 2012, Park *et al.*, 2011, Duarte y Laude, 1994, Miller *et*

al., 2016) las mutaciones pueden afectar el tropismo celular del VDEP de campo, lo que permite la presencia del virus en el tracto respiratorio, además de la infección del intestino delgado (Park y Shin, 2014).

Como ya se mencionó anteriormente en este estudio se identificó mediante la técnica de RT-PCR la presencia de genoma viral del VDEP en intestino delgado, contenido gástrico, estómago, hisopos rectales y pulmón, lo que confirma lo reportado por Park y Shin, (2014), ofreciendo una nueva perspectiva sobre el tropismo del virus y podría ser un hallazgo importante para la gestión de la patogénesis en las granjas de cerdos infectadas con el VDEP. Desde el primer reporte del virus en Estados Unidos en el año 2013, se ha calculado un gran impacto en la industria porcina, la producción declinó un 6-7% en el 2014 y una disminución del 3 al 11% de la población total de cerdos comparada con años anteriores (Alvarez *et al.*, 2015).

Aunado a esto, reportes del USDA del mes de febrero del presente año, confirman la presencia de una coinfección del virus de la diarrea epidémica porcina y el Deltacoronavirus porcino en granjas de Estados Unidos, este es un dato que alerta sobre el sinergismo de estos dos coronavirus en un mismo hospedero (Site, 2016).

Es importante considerar el diagnóstico integral para la oportuna detección de la enfermedad, en conjunto con el diagnóstico diferencial y descartar otros posibles agentes etiológicos.

8. Conclusiones

La obtención del control positivo del virus de la diarrea epidémica porcina a partir de una muestra propagada en cultivo celular para la replicación viral, permitió la estandarización de la técnica de RT-PCR punto final, demostrando así, la presencia del virus en muestras obtenidas durante un brote de diarrea en una granja porcina de ciclo completo.

La cuantificación del RNA viral permitió determinar la mínima cantidad requerida en la técnica de RT-PCR estandarizada para amplificar fragmentos del gen S y M del virus de la diarrea epidémica porcina, resultando 0.09 ng/ μ l RNA y 0.9 ng/ μ l respectivamente. Lo que indica un más alto nivel de detección para la amplificación del gen de la proteína S.

Se logró identificar la presencia del virus causante del brote de diarreas en cerdos de la granja, no solo en muestras de intestino delgado y contenido gástrico, la cual en esta técnica indico ser la muestra más adecuada para la detección del genoma viral. También se demostró la presencia del VDEP en muestras analizadas de pulmón.

Es importante la aplicación del diagnóstico integral para la detección del virus y la futura implementación de un diagnóstico diferencial de enfermedades virales entéricas de cerdos, para determinar el verdadero agente causal, y con ello el desarrollo de inmunoprolácticos seguros, así como contar con un reporte específico en las granjas de los virus circulantes en las regiones del país.

9. Anexo de materiales y reactivos

Anexo 1. Agarosa

TopVision Agarose Tablets, caja con 200 tabletas (0.5g), Thermo scientific, número de catálogo R2801.

Anexo 2. Buffer de carga

DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo scientific, número de catálogo R0611, vial con 5 x 1.0 mL.

Anexo 3. Marcador de peso molecular

GeneRuler 100 bp DNA Ladder, número de catálogo SM0241, Thermo scientific vial con 50 µg.

Anexo 4. Bromuro de etidio

Ethidium Bromide UltraPure™, Invitrogen, 10 mg/ml número de catálogo 15585011.

10. REFERENCIAS

- 1) *Aasv.* 2015. Iowa, Estados Unidos. <https://www.aasv.org/aasv%20website/Resources/Diseases/PorcineEpidemicDiarrhea.php> [consulta: 24 Dic 2015].
- 2) Alvarez, J., Sarradell, J., Morrison, R. yPerez, A. 2015. Impact of Porcine Epidemic Diarrhea on Performance of Growing Pigs. *PLoS One*, 10.
- 3) *Aphis.* 2015. Estados Unidos. https://www.aphis.usda.gov/newsroom/2014/06/pdf/sa_pedv_vaccine.pdf [consulta: 24 Dic 2015].
- 4) Ben Salem, A. N., Chupin Sergei, A., Bjadovskaya Olga, P., Andreeva Olga, G., Mahjoub, A. yProkhvatilova Larissa, B. 2010. Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. *J Virol Methods*, 165, 283-93.
- 5) *Bmeditores.* 2014. Ciudad de México, México. <http://bmeditores.com/situacion-actual-de-la-diarrea-epidemica-porcina-y-estrategias-de-control/> [consulta: 24 Sep 2014].
- 6) *Cdc.* 2014. Atlanta, Estados Unidos. http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/12/14-0908_article [consulta: 14 Sep 2014].
- 7) Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J. T., Stensland, W. R., Pillatzki, A. E., Gauger, P. C., Schwartz, K. J., Madson, D., Yoon, K. J., Stevenson, G. W., Burrough, E. R., Harmon, K. M., Main, R. G. yZhang, J. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol*, 52, 234-43.
- 8) De Paula, S. O., De Melo Lima, C., Torres, M. P., Pereira, M. R. G. yLopes Da Fonseca, B. A. 2004. One-Step RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to Two-Step RT-PCR approaches. *Journal of Clinical Virology*, 30, 297-301.
- 9) Duarte, M. yLaude, H. 1994. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J Gen Virol*, 75 (Pt 5), 1195-200.
- 10) Ducatelle, R., Coussement, W., Charlier, G., Debouck, P. yHoorens, J. 1981. Three-dimensional sequential study of the intestinal surface in experimental porcine CV 777 coronavirus enteritis. *Zentralbl Veterinarmed B*, 28, 483-93.
- 11) Ducatelle, R., Coussement, W., Debouck, P. yHoorens, J. 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Vet Pathol*, 19, 57-66.

- 12) Fehr, A. R. yPerlman, S. 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 1282, 1-23.
- 13) Fields, B., Knipe, D. yHowley, P. 2007. Fields virology. 5th. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- 14) Goede, D. yMorrison, R. B. 2015. Production impact & time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Prev Vet Med*.
- 15) Hofmann, M. yWyler, R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol*, 26, 2235-9.
- 16) Huang, Y. W., Dickerman, A. W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T. yMeng, X. J. 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio*, 4, e00737-13.
- 17) *Idt*. 2016. Estados Unidos: 2011. <http://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2011/09/12/one-step-two-step> [consulta: 16 Feb 2016].
- 18) Ishikawa, K., Sekiguchi, H., Ogino, T. ySuzuki, S. 1997. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. *J Virol Methods*, 69, 191-5.
- 19) Jung, K., Annamalai, T., Lu, Z. ySaif, L. J. 2015a. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. *Vet Microbiol*, 178, 31-40.
- 20) Jung, K., Eyerly, B., Annamalai, T., Lu, Z. ySaif, L. J. 2015b. Structural alteration of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Vet Microbiol*, 177, 373-8.
- 21) Jung, K., Kim, J., Kim, O., Kim, B. yChae, C. 2003. Differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by multiplex RT-nested PCR and comparison with in situ hybridization. *J Virol Methods*, 108, 41-7.
- 22) Jung, K. ySaif, L. J. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J*, 204, 134-43.
- 23) Jung, K., Wang, Q., Scheuer, K. A., Lu, Z., Zhang, Y. ySaif, L. J. 2014. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerg Infect Dis*, 20, 662-5.
- 24) Kim, O. yChae, C. 2000. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets. *Vet Pathol*, 37, 62-7.

- 25) Kim, S. H., Kim, I. J., Pyo, H. M., Tark, D. S., Song, J. Y. yHyun, B. H. 2007. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *J Virol Methods*, 146, 172-7.
- 26) Kim, S. Y., Song, D. S. yPark, B. K. 2001. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest*, 13, 516-20.
- 27) Kusanagi, K., Kuwahara, H., Katoh, T., Nunoya, T., Ishikawa, Y., Samejima, T. yTajima, M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J Vet Med Sci*, 54, 313-8.
- 28) Kweon, C. H., Kwon, B. J., Lee, J. G., Kwon, G. O. yKang, Y. B. 1999. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine*, 17, 2546-53.
- 29) Lee, C. S., Kang, B. K., Lee, D. H., Lyou, S. H., Park, B. K., Ann, S. K., Jung, K. ySong, D. S. 2008. One-step multiplex RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system. *J Virol Methods*, 151, 30-4.
- 30) Lee, D. K., Park, C. K., Kim, S. H. yLee, C. 2010. Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Res*, 149, 175-82.
- 31) Li, Z. L., Zhu, L., Ma, J. Y., Zhou, Q. F., Song, Y. H., Sun, B. L., Chen, R. A., Xie, Q. M. yBee, Y. Z. 2012. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in south China. *Virus Genes*, 45, 181-5.
- 32) Miller, L. C., Crawford, K. K., Lager, K. M., Kellner, S. G. yBrockmeier, S. L. 2016. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction assays for Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) to assess PEDV transmission in growing pigs. *J Vet Diagn Invest*, 28, 20-9.
- 33) Oie. 2014. Francia.
<http://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDF>
<http://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDF>
 [consulta: 13 Sep 2015].
- 34) Park, J. E., Cruz, D. J. yShin, H. J. 2011. Receptor-bound porcine epidemic diarrhea virus spike protein cleaved by trypsin induces membrane fusion. *Arch Virol*, 156, 1749-56.
- 35) Park, J. E. yShin, H. J. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages. *Virus Res*, 191, 143-52.

- 36) *Porcicultura*. 2014. Ciudad de México, México. http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos_int.asp?cve_art= [consulta: 24 Sep 2014].
- 37) Ren, X. yLi, P. 2011. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Genes*, 42, 229-35.
- 38) Ribes, J. M., Ortego, J., Ceriani, J., Montava, R., Enjuanes, L. yBuesa, J. 2011. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)-based vectors with engineered murine tropism express the rotavirus VP7 protein and immunize mice against rotavirus. *Virology*, 410, 107-18.
- 39) Rio, D. C., Ares, M., Jr., Hannon, G. J. yNilsen, T. W. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, pdb.prot5439.
- 40) *Sagarpa*. 2014. Ciudad de México, México. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B393.aspx> [consulta: 22 Sep 2014].
- 41) Sambrook, J. R. 2001. DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. *New York Cold Spring Harbor Laboratory*.
- 42) *Senasica*. 2014. Ciudad de México, México. <http://www.senasica.gob.mx/?IdNot=1499> [consulta: 18 Sep 2014].
- 43) Shibata, I., Tsuda, T., Mori, M., Ono, M., Sueyoshi, M. yUrano, K. 2000. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet Microbiol*, 72, 173-82.
- 44) Shirato, K., Matsuyama, S., Ujike, M. yTaguchi, F. 2011. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J Virol*, 85, 7872-80.
- 45) *Site, T. P.* 2016. Chicago, Estados Unidos. <http://www.thepigsite.com/swinenews/41188/update-on-swine-enteric-coronavirus-disease-in-us/> [consulta: 18 mar 2016].
- 46) Song, D. yPark, B. 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44, 167-75.
- 47) Song, D. S., Kang, B. K., Oh, J. S., Ha, G. W., Yang, J. S., Moon, H. J., Jang, Y. S. yPark, B. K. 2006. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J Vet Diagn Invest*, 18, 278-81.
- 48) Suthar, M. S., Diamond, M. S. yGale Jr, M. 2013. West Nile virus infection and immunity. *Nat Rev Micro*, 11, 115-128.

- 49) Ujike, M. yTaguchi, F. 2015. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*, 7, 1700-25.
- 50) *Unión ganadera regional de Jalisco*. 2014. Guadalajara, México. http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=167&Itemid=325 [consulta: 14 Oct 2014].
- 51) *Usda*. 2014. Estados Unidos. <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome> [consulta: 5 Oct 2014].
- 52) *Viralzone*. 2015. Suiza. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/766.html#tab6 [consulta].
- 53) Wang, K., Lu, W., Chen, J., Xie, S., Shi, H., Hsu, H., Yu, W., Xu, K., Bian, C., Fischer, W. B., Schwarz, W., Feng, L. ySun, B. 2012. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett*, 586, 384-91.
- 54) Wang, Y., Li, J. R., Sun, M. X., Ni, B., Huan, C., Huang, L., Li, C., Fan, H. J., Ren, X. F. yMao, X. 2014. Triggering unfolded protein response by 2-Deoxy-D-glucose inhibits porcine epidemic diarrhea virus propagation. *Antiviral Res*, 106, 33-41.
- 55) Yin, J., Ren, X., Tian, Z. yLi, Y. 2007. Assembly of pseudorabies virus genome-based transfer vehicle carrying major antigen sites of S gene of transmissible gastroenteritis virus: potential perspective for developing live vector vaccines. *Biologicals*, 35, 55-61.
- 56) Zhao, J., Shi, B. J., Huang, X. G., Peng, M. Y., Zhang, X. M., He, D. N., Pang, R., Zhou, B. yChen, P. Y. 2013. A multiplex RT-PCR assay for rapid and differential diagnosis of four porcine diarrhea associated viruses in field samples from pig farms in East China from 2010 to 2012. *J Virol Methods*, 194, 107-12.
- 57) Zhao, S., Gao, Q., Qin, T., Yin, Y., Lin, J., Yu, Q. yYang, Q. 2014. Effects of virulent and attenuated transmissible gastroenteritis virus on the ability of porcine dendritic cells to sample and present antigen. *Vet Microbiol*, 171, 74-86.
- 58) *Zoetis*. 2015. Estados Unidos. <https://www.zoetis.com/news-media/feature-stories/usda-grants-zoetis-conditional-license-porcine-epidemic-diarrhea-vaccine> [consulta: 24 Dic 2015].