



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DEL VIRUS DE LA DIARREA
EPIDÉMICA PORCINA EN LA REPÚBLICA MEXICANA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

SAÚL REVELES FÉLIX

TUTOR PRINCIPAL

JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

ROSALBA CARREÓN NÁPOLES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A ti...

Tú que has encontrado el camino hacia lo más profundo de mi ser, tú que me conoces más que cualquier otra persona, tú que has sabido llenar mi vida de alegría, paz y amor. Dedicado a ti Saúl Reveles Félix, que me has permitido conocerte, y del cual siempre estaré agradecido de ser quien eres.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

Por ser las personas que me han dado el mayor apoyo, amor e impulso para ser lo que soy, sin ustedes no sería la persona que ahora soy. A mis padres por estar siempre ahí, y brindarme su apoyo; papá, gracias por tu dedicación y entrega hacia nosotros (tus hijos), por todos los consejos y enseñanzas que siempre me has dado a lo largo de los años. Mamá, gracias por ser la persona que siempre me brinda su cariño y amor, por todos sus consejos en cada una de las etapas de mi vida. A mis hermanos Juan, Alejandra y Cristina, por todos esos momentos invaluable que hemos compartido, por mostrar su interés en mí, en mi trabajo, mis proyectos, y en mi vida en general; sin duda alguna, cada uno de ustedes por diferentes que seamos, compartimos algo mucho más grande que la sangre, el amor y cariño de poder llamarnos hermanos.

A mis tutores.

Por la dedicación, interés y esfuerzo que mostraron, por sus enseñanzas dentro de mi desarrollo académico y profesional; por brindarme el apoyo necesario para la culminación satisfactoria de este proyecto y por estar ahí no sólo en el ámbito académico, también en todo el apoyo personal, gracias por su amistad.

A mis sinodales.

Al Dr. Armando Pérez y Dr. Humberto Ramírez, por todo su apoyo brindado, por el tiempo y dedicación que mostraron, por sus valiosos conocimientos y aportaciones.

A mis compañeros y amigos.

A cada una de las personas que me han brindado la dicha de compartir juntos la vida en sus diversas etapas. Por estar siempre ahí al pendiente de mi proceso de desarrollo académico, por todas esas bonitas vivencias y alegrías que hemos sabido compartir, y porque hasta en malos momentos nos hemos encontrado unidos. Gracias a todo el grupo de investigación, en el cual he estado sumergido estos últimos años, sin las aportaciones de todos y cada uno de ustedes, no sería la persona que ahora soy, gracias por compartir buenas experiencias, por compartir los conocimientos que cada uno de ustedes tiene, sin la necesidad de mostrarnos egoístas unos con otros. Porque estamos aquí para ir compartiendo y enseñando lo que aprendemos en nuestras investigaciones, y así todos llegar a ser grandes profesionistas, más de lo que ya son cada uno de ustedes, y no sin

antes ser las grandiosas personas que son. A mi novia, por todo el apoyo no sólo en lo personal, sino también en lo profesional, gracias por compartir gustos, experiencias y sueños.

A la UNAM

Gracias por permitirme desarrollarme en una de tus mejores facultades, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Gracias al Departamento de Medicina Zootecnia de Cerdos, por presentarme las condiciones necesarias para la realización de este proyecto. Gracias a todo el personal académico y administrativo con el cual me vi involucrado, y han estado ahí.

A Conacyt

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido durante los estudios de posgrado.

Al proyecto “PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA EL CONTROL DEL VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA”, No. de Registro: 38445-1635-30-VI-14.

Al proyecto de CONACYT - CIENCIA Básica, No. de Registro: 254244.

A todos mis conocidos.

Agradezco aquí a cada una de las personas que a lo largo de mi camino por este mundo y de mi vida, han estado ahí conmigo, para brindarme su amistad, su alegría, su cariño o simplemente un rato de felicidad, con el simple hecho de hacer ameno este andar por aquí. No cabe duda que en cualquier lugar del mundo nos encontramos con personas maravillosas, que tocan nuestra vida y que nos hacen parar por un momento y decir “que bella es la vida”, cada día doy gracias a Dios por el haber puesto en mi camino a todas esas personas que han hecho de esta vida una experiencia inolvidable, gracias a todos los que saben que están aquí.

Muchas gracias a todos...

RESUMEN

El virus de la diarrea epidémica porcina provoca una enfermedad contagiosa principalmente en lechones, caracterizada por diarrea, vómito, deshidratación y alta mortalidad. El virus pertenece a la familia *Coronaviridae*, es de ARN de cadena sencilla y su genoma codifica para 4 proteínas estructurales (spike, nucleocápside, membrana y envoltura) y 3 proteínas no estructurales (replicasa 1a y 1b, y ORF 3), siendo la spike la más importante debido a su alta variabilidad, su importancia en la inducción de anticuerpos neutralizantes y en la replicación del virus. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia del virus en diferentes granjas de la República Mexicana, estandarizar una RT-PCR dirigida al gen spike, realizar la secuenciación del producto obtenido, y determinar la variabilidad genética de los virus identificados. Se obtuvieron 53 muestras positivas por RT-PCR tiempo real, identificando la presencia del virus en 15 estados de la República Mexicana. Por medio de la RT-PCR estandarizada se amplificaron 28 muestras, de 10 diferentes estados, de éstas se obtuvieron 20 secuencias del gen spike, 20 del gen ORF3, 20 del gen de envoltura, 19 del gen de membrana, y 18 del gen de la nucleocápside. Al realizar la caracterización genética del virus, a partir con el gen spike, se pudo apreciar en el árbol filogenético dos pequeños grupos de cepas en diferentes clados. Así mismo la similitud encontrada entre las cepas mexicanas fue del 98.82 al 99.98%, mientras que de éstas con las cepas emergentes americanas se encontró del 99.35-99.95%, con cepas Indel-S de 95-95.93%, y de las clásicas de 92.75-93.26%. Tres diferentes cepas presentaron inserción, de éstas las cepas vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015 y vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC45/2016, presentaron inserción de un aminoácido (⁴²⁴Y⁴²⁵, ⁴⁴⁷D⁴⁴⁸, respectivamente). Y la cepa vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2019, presentó la inserción de dos aminoácidos (⁵³⁷SQ⁵³⁸), dentro de la región COE.

Palabras claves: Virus de la diarrea epidémica porcina, República Mexicana, RT-PCR, caracterización genética.

ABSTRACT

The Porcine Epidemic Diarrhea virus causes a contagious disease characterized by diarrhea, vomit, dehydration and high mortality mainly in piglets. This virus that belongs to the *Coronaviridae* family is a single-stranded RNA whose genome encodes for 4 structural proteins (spike, nucleocapsid, membrane and envelope) and 3 non-structural proteins (replicases 1a and 1b, and ORF3). The spike protein is the most important due to its high variability, its role in the induction of neutralizing antibodies and its importance on virus replication. The aims of the present study were to detect the presence of the virus in different farms from Mexico, to standardize an RT-PCR targeted to the spike gene, to sequence the obtained product, and to determine the genetic variability of the identified viruses. Fifty-three positive samples of 15 states of the Mexican Republic were obtained by real-time RT-PCR. By means of standardized RT-PCR, 28 samples of 10 different states were amplified. It represents 20 sequences of the spike gene, 20 of the ORF3 gene, 20 of the envelope gene, 19 of the membrane gene, and 18 of the nucleocapsid gene. The genetic characterization of the spike gene showed two small groups of strains in different clades from the phylogenetic tree. Likewise, the similarity between the Mexican strains was from 98.82 to 99.98%. While the similarity with the emerging American strains was from 99.35 to 99.95%, with Indel-S strains from 95 to 95.93%, and the classic ones from 92.75 to 93.26%. Three different strains had insertions. The vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015 and vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC45/2016 strains showed insertion of an amino acid (⁴²⁴Y⁴²⁵, ⁴⁴⁷D⁴⁴⁸, respectively). And the vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2019 strain presented the insertion of two amino acids (⁵³⁷SQ⁵³⁸), within the COE region.

Keywords: Porcine Epidemic Diarrhea virus, Mexican Republic, RT-PCR, genetic characterization.

CONTENIDO

| | |
|--|------|
| DEDICATORIA | I |
| AGRADECIMIENTOS | II |
| RESUMEN | IV |
| ABSTRACT | V |
| CONTENIDO | VI |
| LISTA DE FIGURAS | VIII |
| LISTA DE CUADROS | X |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 2 |
| AGENTE ETIOLÓGICO | 3 |
| CORONAVIRUS | 5 |
| ORF 1a y 1b | 6 |
| Spike (S) | 7 |
| Nucleocápside (N) | 8 |
| Membrana (M) | 8 |
| Proteína de membrana pequeña o envoltura (E) | 9 |
| Genes accesorios | 9 |
| REPLICACIÓN VIRAL | 10 |
| VARIANTES | 11 |
| PATOGENIA | 12 |
| SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES | 13 |
| DIAGNÓSTICO | 14 |
| REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA | 15 |
| SECUENCIACIÓN | 16 |
| JUSTIFICACIÓN | 19 |
| HIPÓTESIS | 20 |
| OBJETIVO GENERAL | 21 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| Muestreo en granjas de la República Mexicana. | 22 |

| | |
|---|----|
| Preparación de las muestras | 23 |
| Detección del virus de la diarrea epidémica porcina | 23 |
| Estandarización de la RT-PCR dirigida hacia el gen S..... | 23 |
| Diseño de Oligonucleótidos | 23 |
| Purificación de ARN..... | 25 |
| Transcripción en reversa (RT) | 26 |
| Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 27 |
| Electroforesis | 28 |
| Secuenciación | 29 |
| Análisis de secuencias | 29 |
| RESULTADOS..... | 30 |
| Detección del virus de la diarrea epidémica porcina. | 30 |
| RT-PCR de los genes S, ORF3, E, M y N | 31 |
| Secuenciación | 33 |
| Análisis del gen S..... | 36 |
| Análisis de similitud del gen S | 39 |
| Epítomos de la proteína S | 40 |
| Región COE..... | 41 |
| Epítomos SS2, SS6 y 2C10..... | 43 |
| Análisis del gen ORF3..... | 44 |
| Análisis del gen Envoltura | 46 |
| Análisis del gen Membrana | 48 |
| Análisis del gen Nucleocápside | 50 |
| DISCUSIÓN | 53 |
| CONCLUSIONES | 59 |
| ABREVIATURAS | 61 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 65 |
| ANEXOS..... | 74 |
| Anexo 1. Cepas de referencia del vDEP | 74 |
| Anexo 2. Comprobación de la RT..... | 76 |
| Anexo 3. Protocolo RT-PCR estandarizado | 77 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación esquemática del vDEP, organización genómica (A) y la estructura del virión (B)..... | 4 |
| Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del vDEP..... | 11 |
| Figura 3. Porcentaje de muestras por estado..... | 22 |
| Figura 4. Esquema de la posición de los oligonucleótidos para su amplificación..... | 25 |
| Figura 5. Esquematización de las condiciones de la RT..... | 27 |
| Figura 6. Esquematización de las condiciones de la PCR..... | 28 |
| Figura 7. Electroforesis de la RT-PCR en gel de agarosa al 1.5%..... | 31 |
| Figura 8. Porcentaje y número de muestras positivas a la RT-PCR punto final..... | 32 |
| Figura 9. Análisis filogenético de la secuencia completa del gen S con las cepas de referencia..... | 37 |
| Figura 10. Análisis filogenético del gen S de las secuencias vDEP/IN-DMZC..... | 39 |
| Figura 11. Porcentajes de similitud entre las secuencias mexicanas con las cepas de referencia: USA/Colorado/2013, USA/OH851/2014, BEL/CV777/1977..... | 40 |
| Figura 12. Identificación de los epítomos de la proteína S (COE, SS2, SS6 y 2C10) en las secuencias vDEP/IN-DMZC..... | 41 |
| Figura 13. Sitios de cambios dentro de la región COE..... | 43 |
| Figura 14. Sitios de cambios dentro de los epítomos SS2, SS6 y 2C10..... | 44 |
| Figura 15. Análisis filogenético del gen ORF3 de las secuencias vDEP/IN-DMZC, junto con las cepas de referencia..... | 45 |
| Figura 16. Análisis filogenético del gen de envoltura de las secuencias vDEP/IN-DMZC, junto con las cepas de referencia..... | 47 |
| Figura 17. Análisis filogenético del gen de membrana de las secuencias vDEP/IN-DMZC, junto con las cepas de referencia..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Análisis filogenético del gen de la nucleocápside de las secuencias vDEP/IN-DMZC, junto con las cepas de referencia..... | 51 |
| Figura 19. Sitios de sustitución de aminoácidos de las secuencias vDEP/IN-DMZC del gen de la nucleocápside..... | 52 |
| Figura 20. A) Cuantificación de la concentración del ADN total presente en la muestra. B) Electroforesis del producto de la PCR anidada..... | 76 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados para el vDEP..... | 24 |
| Cuadro 2. Resultados de las muestras al vDEP por RT-PCRq..... | 30 |
| Cuadro 3. Resultados de las muestras secuenciadas, así como el número de aminoácidos de cada una de las secuencias encontradas..... | 34 |
| Cuadro 4. Cepas de referencia del vDEP..... | 75 |

INTRODUCCIÓN

El virus de la Diarrea Epidémica Porcina (vDEP) fue identificado por primera vez en los 70 del siglo XX, se caracteriza por provocar una enfermedad contagiosa principalmente en lechones de los 0 a los 7 días de edad presentando diarrea, vómito, deshidratación y alta mortalidad, lo que resulta en grandes pérdidas económicas (Jung & Saif 2015; Sun *et al.* 2015a; Zimmerman *et al.* 2013). La enfermedad se mantuvo en Europa y Asia hasta el 2013 (Jarvis *et al.* 2016a), dándose el primer reporte en los Estados Unidos en Abril de ese año (Stevenson *et al.* 2013). En México se declaró oficialmente su presencia en mayo del 2014 ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (OIE 2014). En los últimos años se ha distribuido por varios países del continente Americano (Jarvis *et al.* 2016a; Lee 2015; Ojkic *et al.* 2015).

El vDEP pertenece al género de los Alfacoronavirus, en la familia *Coronaviridae*, es de ARN de cadena sencilla que mide ~28,000pb; este comprende 7 marcos de lectura abiertos (ORF's) que codifican para 4 proteínas estructurales; Proteínas: spike (S); nucleocápside (N), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E); y 3 proteínas no estructurales (replicasas 1a y 1b, y ORF 3) (Vlasova *et al.* 2014; Song & Park 2012). La proteína spike es la más importante debido a su alta variabilidad, su importancia en la inducción de anticuerpos neutralizantes y en la replicación del virus (Woo *et al.* 2010; Weiss & Leibowitz 2011). Las cepas aisladas en los brotes iniciales en Estados Unidos fueron clasificadas como cepas altamente patógenas. En 2014, en Ohio, USA fue identificada una cepa de menor patogenicidad, conocida como Indel-S debido a que presenta tres deleciones de nucleótidos y una inserción en el gen S, semejante a la cepa clásica CV777 (Wang, Byrum, *et al.* 2014), Actualmente se han reportado cepas tipo Indel-S, no Indel y cepas clásicas en diversos países donde la enfermedad es endémica, aunque la patogenicidad de las diferentes cepas es variada (Suzuki *et al.* 2015; Hanke *et al.* 2015; Lee & Lee 2017; Chung *et al.* 2016; Grasland *et al.* 2015). De

igual manera, han sido descritas varias cepas recombinantes entre las secuencias de los genes de cepas Indel, no Indel y clásicas (Li *et al.* 2016; Jarvis *et al.* 2016a), así como entre las regiones del gen spike (Vlasova *et al.* 2014). También se han encontrado cepas recombinante entre algunos coronavirus entéricos (Boniotti *et al.* 2016; Akimkin *et al.* 2016).

En México, en los últimos años, se han producido brotes con una alta mortalidad de lechones en las granjas. Mediante la aplicación de protocolos de bioseguridad y de procedimientos de manejo se ha podido disminuir la incidencia de brotes, aunque se han presentado brotes nuevos en algunas granjas y rebrotes en granjas que ya se encontraban estables. Así, conocer las diferentes cepas que se encuentran circulando dentro y entre las granjas se vuelve necesario para realizar un mejor control de la enfermedad. Por ello, en el presente trabajo fueron identificadas las diferentes cepas variantes presentes en algunos estados de la República Mexicana.

ANTECEDENTES

La Diarrea Epidémica Porcina (DEP) es una enfermedad entérica aguda de los cerdos, descrita por primera vez en el Reino Unido hacia el año de 1971, altamente contagiosa en todas las etapas productivas de los cerdos, los cuales suelen presentar diarrea, vómito y deshidratación. El agente etiológico fue identificado siete años después en Bélgica como un coronavirus, llamado virus de la Diarrea Epidémica Porcina (vDEP) (Y. Chen *et al.* 2014; Wang, Byrum, *et al.* 2014; Jung & Saif 2015; Sun *et al.* 2015a; Ojkic *et al.* 2015). La presencia de esta enfermedad se mantuvo delimitada a unos países de Europa y Asia; a finales del siglo XX y comienzos de este siglo hubo brotes en algunos países europeos (Alemania, Francia, Suiza, Italia) y asiáticos (Corea, China, Tailandia) (Song & Park 2012). A partir del 2010 han surgido cepas variantes del vDEP en China, a las cuales se les ha asociado con brotes con una morbilidad del 80-100%, y con mortalidades que van desde el 50 al 90% en lechones lactantes, lo que resulta en

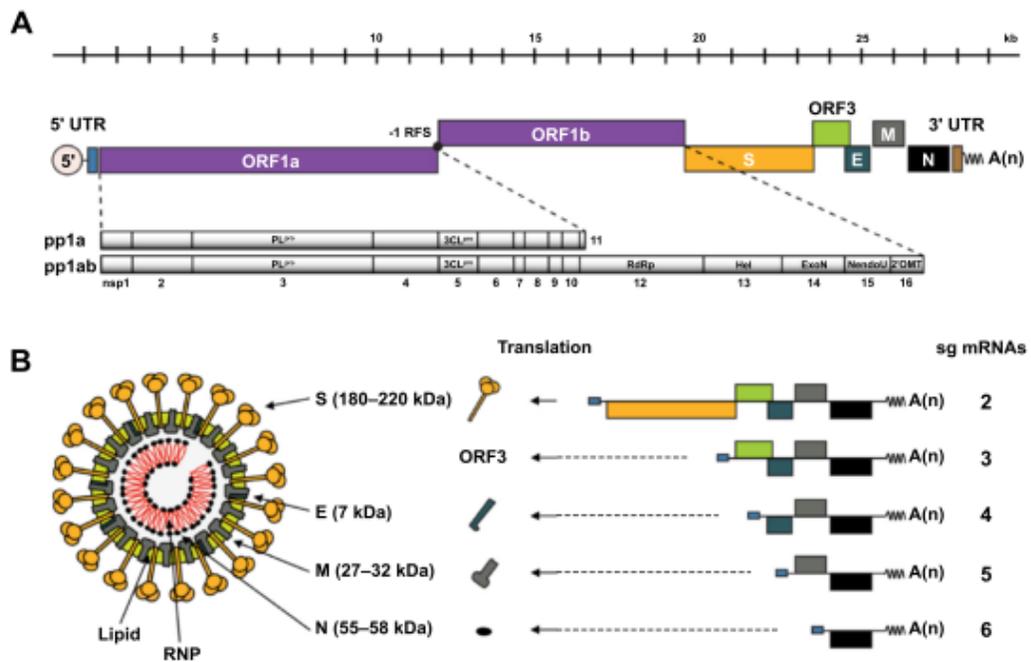
grandes pérdidas económicas. A principios del 2013 se reportó que en los Estados Unidos (Stevenson *et al.* 2013), algunas granjas experimentaban una explosiva epidemia de diarrea y vómito afectando a cerdos de todas las edades, causando entre un 90 y 95% de mortalidad entre los lechones. Al realizar estudios histológicos se reveló una severa atrofia de los vellosidades en todos los segmentos del intestino delgado pero las pruebas de laboratorio realizadas para detectar rotavirus y virus de gastroenteritis trasmisible resultaron negativos; sin embargo, la microscopia electrónica con tinción negativa reveló pequeñas partículas parecidas a coronavirus y a través de PCR se consiguió la amplificación de una región conservada del gen de la polimerasa de todos los miembros de la familia de los coronavirus. Subsecuentes secuenciaciones y análisis de las mismas revelaron la identidad de las cepas de vDEP, que tiene una alta identidad (del 99%) a cepas de China aisladas en 2012 (Huang *et al.* 2013; Wang, Byrum, *et al.* 2014).

En México se comenzaron a presentar algunos brotes de diarreas atípicas con alta mortalidad de lechones en granjas de la zona centro-occidente del país, lo cual daba evidencia clínica sugerente a la causada por el vDEP. Después de la realización de un muestreo epidemiológico en producciones de diferentes tipos, y de realizar el análisis por medio de la prueba RT-PCR, se logró identificar la positividad de algunas de las muestras hacia este virus, por lo cual se declaró oficial en mayo del 2014 ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (OIE 2014). En estos últimos años se han reportado brotes con alta mortalidad provocando un alto impacto en las producciones en Canadá, Perú, Colombia, República Dominicana, Japón, Corea del Sur, Alemania, Portugal y Ucrania (Jarvis *et al.* 2016b).

AGENTE ETIOLÓGICO

El vDEP es un virus ARN envuelto de cadena sencilla y en sentido positivo, con un diámetro medio de 130 nm. De acuerdo con la nomenclatura establecida por el

Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), el vDEP pertenece a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*, y al género de los Alfacoronavirus. El genoma está conformado por aproximadamente 28,000 nucleótidos, y comprende una región 5' no codificable (UTR), una 3' UTR y al menos 7 marcos de lectura abiertos (ORF's) que codifican para 4 proteínas estructurales: spike (proteína S); nucleocápside (N), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E); y 3 proteínas no estructurales: replicasas 1a y 1b, y ORF 3. Éstos están dispuestos en el genoma en el orden de replicasa 5' - 3' (Figura 1) (Vlasova *et al.* 2014; Song & Park 2012; Lee 2015). La proteína spike es la responsable de los picos presentes en la superficie de los coronavirus, la cual le da la característica con apariencia de corona bajo el microscopio electrónico, y es una glicoproteína tipo I de membrana con péptidos de señal (Woo *et al.* 2010; Weiss & Leibowitz 2011).



Fuente: (Lee 2015)

Figura 1. Representación esquemática del vDEP, organización genómica (A) y la estructura del virión (B).

CORONAVIRUS

Los coronavirus son una familia de virus ARN que junto con los arterivirus pertenecen al orden de los Nidovirales. Dentro de la familia *Coronaviridae* se tienen dos subfamilias los *torovirinae* y los *coronavirinae*, estos últimos son divididos en cuatro géneros (alfa, beta, gamma y deltacoronavirus). Los coronavirus causan enfermedades en diversos animales domésticos y silvestres, así como en humanos. Dichas enfermedades pueden ser agudas o crónicas, principalmente son enfermedades entéricas, respiratorias y algunas veces neurológicas o cursar con hepatitis. Comúnmente infectan a su hospedador de manera especie-especie, siendo transmitidas comúnmente por vía respiratoria o por vía oro-fecal. Los alfacoronavirus que afectan a la especie porcina son el virus de la gastroenteritis transmisible, el coronavirus respiratorio porcino y el virus de la diarrea epidémica porcina; otros coronavirus patógenos para el cerdo son los betacoronavirus como el virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, y un deltacoronavirus porcino (Gerdt & Zakhartchouk 2017; Piñeros *et al.* 2015).

Los coronavirus son virus envueltos ARN de cadena positiva de 80 a 120 nm de diámetro, con genomas largos de 26.4 a 31.7 Kb, y con contenido de guaninas y citosinas que varían de 32 a 43%. Todos los coronavirus contienen un genoma similar, en ambos extremos 3' y 5' contienen una región corta no traducida, el locus de replicasa codificado dentro del extremo 5' y las proteínas estructurales codificadas en el 3', éstas se encuentran en el siguiente orden: spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N). En algunos virus del género betacoronavirus antes del gen S se encuentra codificado el gen de la hemaglutinina esterasa (HE). En los diferentes subgrupos de coronavirus se encuentran números variables de marcos de lectura abiertos, dentro de sus genomas (Masters 2006; Woo *et al.* 2010; Weiss & Leibowitz 2011; Madhugiri *et al.* 2016). La proteína nucleocápside junto con el genoma ARN forma un complejo helicoidal dentro del virus. Los trímeros de la proteína spike se encuentran presentes en la superficie, lo que le da su característica morfológica de corona.

Las proteínas M y E son transmembranales involucradas en el ensamblaje viral y en algunos virus la proteína HE forma pequeños picos en la membrana. En el extremo 5' se encuentran dos ORF, 1a y 1b, que codifican para dos largas poliproteínas no estructurales, la pp1a y pp1b, que dirigen la replicación y transcripción del genoma.

Para determinar la posición filogenética de los coronavirus, se hace la construcción de árboles filogenéticos usando diferentes genes. Los genes más comúnmente usados para estudios de filogenia incluyen el de la proteasa de tipo quimotripsina (nsps5), de la polimerasa (nsp12), de la helicasa (nsp13), el gen S y el gen N, ya que éstos se encuentran presentes en todos los coronavirus (Woo *et al.* 2010). En el caso del vDEP se realiza la genotipificación a partir de la secuencia completa del genoma o por algunos genes como son S, M, N y ORF3, usados para determinar la diversidad y las relaciones evolutivas de los aislados de vDEP (Lv *et al.* 2016).

Los análisis filogenéticos del gen S completo, por medio de la inferencia con el método neighbor-joining, demuestran que el virus se divide genéticamente en dos grupos: genogrupo I (GI, cepas clásicas) y genogrupo II (GII, cepas pandémicas); a su vez, cada uno se divide en dos subgrupos Ia y Ib, y IIa y IIb, respectivamente. Dentro del GI, se encuentran las cepas clasificadas del tipo Indel-S, donde están las cepas clásicas como la prototipo CV777 y cepas vacúnales (genotipo Ia), así como cepas emergentes (genotipo Ib) de Estados Unidos, China, Europa, entre otras. En el subgrupo IIa se encuentran genotipos recientes prevalentes en varios países de Europa, Asia y América; en el subgrupo IIb hay otros genotipos prevalentes de China y otros países asiáticos (Huang *et al.* 2013; Lv *et al.* 2016; Lee 2015).

ORF 1a y 1b

El ORF1a y 1b de los coronavirus ocupa aproximadamente dos terceras partes del genoma, codifican para la poliproteína replicasa y es traducida de ambos ORF's.

La replicasa codifica de 15 a 16 proteínas no estructurales (NSPs), llamadas nsp1, nsp2, nsp3, nsp4, etc. Estas proteínas difieren en número, secuencia y función entre los grupos de coronavirus, algunas codifican para proteínas de funciones esenciales, como proteasas (nsp5 y nsp6), para la ARN polimerasa dependiente de ARN (nsp12) y para la helicasa (nsp13) (Compans *et al.* 2005; Masters 2006; Woo *et al.* 2010; Lee 2015).

Spike (S)

Las proteínas S son glicoproteínas tipo I de membrana con péptidos de señal, que están insertadas en la envoltura viral para formar las espículas que dan a los virus su morfología característica semejante a una corona cuando se visualiza por microscopia electrónica. Estas proteínas participan en la interacción del virus con los receptores celulares que median la entrada viral y para la propagación de célula a célula, a través de su capacidad para inducir la fusión de las membranas. Las proteínas S se sintetizan como un precursor de aproximadamente 120 kDa que es glicosilada cotraduccionalmente para obtener un peso molecular final de 180 kDa (Woo *et al.* 2010; Weiss & Leibowitz 2011; Masters 2006). Son las proteínas con las secuencias más variables en los genomas de los coronavirus. Funcionalmente está dividida en dos subunidades, dominio N-terminal S1 (1-789 aminoácidos) y C-terminal S2 (790-1383 aminoácidos), el dominio S1 es el más variable. La mayor parte de la proteína está expuesta al exterior del virus, se ensambla en la membrana como un trímero en el que la subunidad S1 forma una estructura de cabeza globular que se une al receptor y la subunidad S2 forma un tallo transmembranal, que es la responsable de la actividad de fusión con la célula. (Kim *et al.* 2015; Jarvis *et al.* 2016a; Makadiya *et al.* 2016; de Haan *et al.* 2008; Huang *et al.* 2013).

La secuencia de aminoácidos de la proteína S es conocida por ser apropiada para determinar las relaciones genéticas entre diferentes cepas aisladas del vDEP y para su uso en el desarrollo de ensayos diagnósticos y de vacunas (Hao *et al.*

2014; Kim *et al.* 2015; Kwan *et al.* 2016; Y. Chen *et al.* 2014; Oh *et al.* 2014). En la mayoría de las cepas el gen S consiste en una secuencia de 4161 nucleótidos, que codifican para 1386 aminoácidos. Sin embargo, el gen muestra altas variaciones en el número de nucleótidos que dan como consecuencia que algunas cepas presenten deleciones o inserciones (Lee 2015; Jarvis *et al.* 2016a).

Nucleocápside (N)

La N es una proteína básica de unión al ARN que juega papeles tanto estructurales, como no estructurales en la replicación. La proteína N junto con el genoma ARN forman la cápside viral; de igual manera interacciona con la proteína de membrana durante el ensamblaje (Weiss & Leibowitz 2011; Compans *et al.* 2005; Lee 2015). Se ha demostrado que la proteína se asocia con complejos de transcripción-replicación en células infectadas. El gen N es otro objetivo común para el estudio filogenético de los coronavirus. Debido a su inmunogenicidad también es usado para clonación y generación de proteínas recombinantes para ensayos serológicos (Woo *et al.* 2010; Masters 2006). La proteína N del vDEP inhibe el crecimiento de las células epiteliales del intestino y prolonga la fase S del ciclo celular, mientras se produce dentro de la célula. Adicionalmente, provoca un efecto antagónico en la producción del interferón, lo que constituye una estrategia de evasión de la respuesta inmunológica (Xu *et al.* 2013).

Membrana (M)

Esta proteína contiene entre 221-262 aminoácidos y es la proteína más abundante en la envoltura del virus. La proteína M consiste en un dominio N-terminal glicosilado hidrófilo corto, expuesto en la superficie externa del virus, seguido de tres dominios transmembrana y una cola larga C-terminal que se encuentra al interior del virus. Ésta contiene dos dominios, uno anfipático adyacente al tercer dominio transmembrana, y otro hidrofílico corto (Masters 2006; Weiss & Leibowitz 2011; Woo *et al.* 2010). Las proteínas M juegan un papel crucial en el ensamblaje y la gemación de las partículas virales, e interactúan entre sí y con las otras

proteínas N, E y S del virión. Las proteínas M son inmunogénicas e inducen la producción de anticuerpos de protección, con actividad de neutralización viral (Lee 2015; Compans *et al.* 2005).

Proteína de membrana pequeña o envoltura (E)

Las proteínas E de los coronavirus son proteínas transmembranales pequeñas, formadas por 76-109 aminoácidos, comprometidas en el ensamblaje de partículas virales, junto con la coexpresión de la proteína M (Lee 2015; Compans *et al.* 2005). Cada proteína E contiene tres dominios, un dominio N-terminal corto, un dominio transmembrana largo y un dominio C-terminal hidrófilo (Woo *et al.* 2010; Weiss & Leibowitz 2011).

Genes accesorios

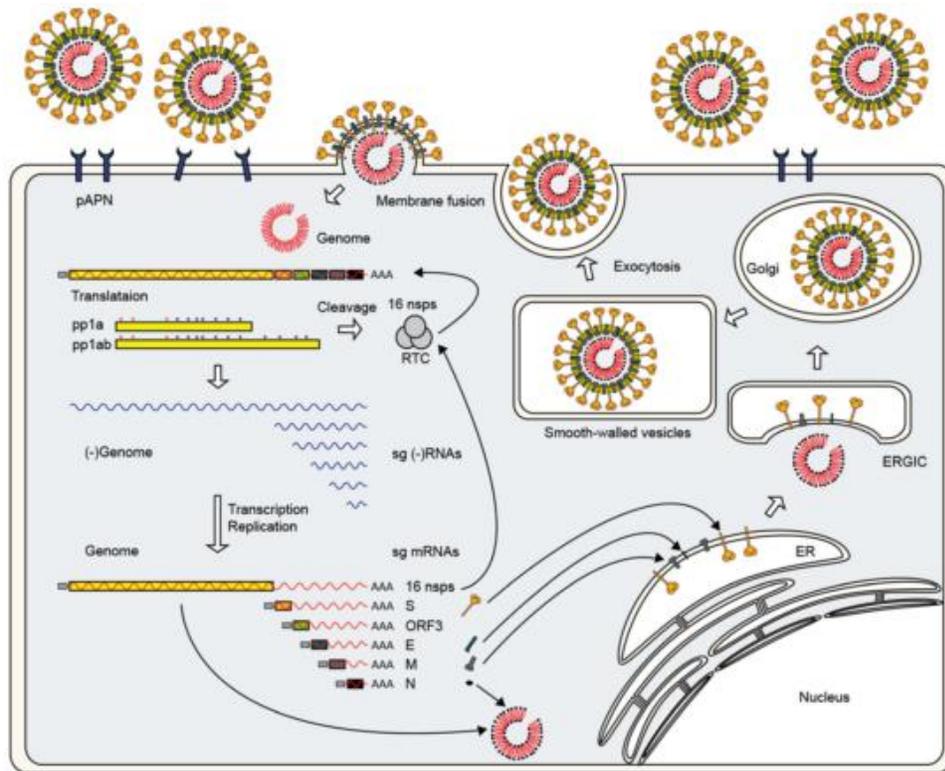
Todos los coronavirus contienen genes accesorios, los cuales se encuentran dentro de distintos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) e intercalados entre los genes replicasa, S, E, M y N. Estos genes extras pueden variar dependiendo del virus. El vDEP tiene solo uno, mientras que el SARS-CoV puede tener hasta ocho, en algunos casos pueden estar como accesorios dentro de un gen como el gen interno que se encuentra en el gen N de varios de los betacoronavirus. Los genes accesorios de los coronavirus originalmente fueron llamados no estructurales, sin embargo esto no necesariamente ocurre, ya que unos forman parte de la estructura de los virus (Woo *et al.* 2010; Masters 2006).

El vDEP presenta un ORF3 entre el gen S y el gen E, este ORF3 también se encuentra presente en otros virus como el vGET, HCoV-NL63, SARS-CoV, entre otros (Masters 2006). En el vGET puede presentar inserciones y deleciones, lo cual sugiere que el gen puede estar involucrado en la patogenicidad viral (Song *et al.* 2003; Woo *et al.* 2010). Los análisis filogenéticos del ORF3 no han encontrado diferencias específicas entre las cepas clasificadas con el gen S, como las Indel-S y las no Indel-S, teniendo una identidad de nucleótidos de 95.4%-95.7%, por lo

cual se considera que este gen está altamente conservado (Vlasova *et al.* 2014; Wang *et al.* 2016).

REPLICACIÓN VIRAL

La infección de los coronavirus inicia por el apareamiento del virus con los receptores de la célula, lo que desencadena una serie de eventos que terminan con el ingreso de la nucleocápside en el citoplasma sitio donde se lleva a cabo la traducción del genoma en sentido positivo, actuando como ARN mensajero, del que se traduce en primera instancia la poliproteína de la replicasa. Ésta actuará sobre el genoma para producir un ARN anti sentido y llevar a cabo dos pasos simultáneos de transcripción de los ARNs que codificarán para las diferentes proteínas estructurales y, por otro lado, para la replicación del ARN. Una vez sintetizadas las proteínas S, E y M pasan al retículo endoplásmico, de donde son llevadas a un compartimento entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Mientras tanto la nucleocápside es formada por el ensamblaje de la proteína N con el nuevo ARN. La nucleocápside se une con las proteínas en el compartimento mediante gemación, dando como origen a los nuevos viriones, los cuales son exocitados por medio de vesículas pequeñas o sacos de Golgi (Figura 2). Durante la infección por algunos coronavirus una fracción de la proteína S que no ha sido ensamblada en el virión puede estar presente en la membrana plasmática de la célula, siendo un factor predisponente para que se lleve a cabo la fusión con las células vecinas (Masters 2006; Weiss & Leibowitz 2011; Compans *et al.* 2005; Lee 2015).



Fuente: (Lee 2015)

Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del vDEP.

VARIANTES

El vDEP generó una mayor atención para el 2010, cuando se presentaron brotes con cepas mayormente patógenas a las que ya circulaban y que se reportaban desde los años 80 en China (Chen *et al.* 2010). Con la llegada del vDEP al continente americano, en 2013, y con el estudio de las cepas presentadas en los brotes iniciales en Estados Unidos, éstas fueron clasificadas como cepas emergentes patógenas. Sin embargo, en 2014 fue encontrada en Ohio (USA) una cepa de menor patogenicidad, conocida como Indel-S debido a que en su región N-terminal presenta una inserción de un aminoácido (aa) (aa 161–162) y dos deleciones (aa 59–60 y aa 140), diferente a lo observado en las cepas altamente virulentas del vDEP, pero semejantes a las cepas clásicas, como la cepa CV777

(Wang, Byrum, *et al.* 2014; Chen *et al.* 2017). Con lo anterior se determinó que existía la circulación de dos grandes grupos de cepas, las del tipo Indel-S y las no Indel-S (Vlasova *et al.* 2014). Las primeras han sido encontradas en diversos países donde la enfermedad es endémica, aunque han sido descritas como cepas de alta y de baja patogenicidad (Suzuki *et al.* 2015; Hanke *et al.* 2015; Lee & Lee 2017; Chung *et al.* 2016; Grasland *et al.* 2015). De igual manera han sido identificadas varias cepas recombinantes, producto de la recombinación entre las secuencias de los genes de cepas Indel-S, no Indel-S y clásicas (Li *et al.* 2016; Jarvis *et al.* 2016a), así como entre las regiones de la proteína S, la S1 y la S2 (Vlasova *et al.* 2014). Asimismo se han encontrado cepas recombinantes entre algunos coronavirus entéricos, como lo es el vDEP con el virus de la gastroenteritis transmisible (Boniotti *et al.* 2016; Akimkin *et al.* 2016). También se ha encontrado una cepa recombinante con otra ya previamente descrita como recombinante y una cepa emergente, que presenta una mortalidad del 30% (Valkó *et al.* 2017). Finalmente, se han obtenido cepas con mutaciones después de realizar pases seriados en cultivos celulares (Q. Chen *et al.* 2014; Oka *et al.* 2014; Lee *et al.* 2017; Chen *et al.* 2015). Estas mutaciones están dadas por deleciones en los genes de S, ORF3, E, M, N, ORF 1a/b, nsp1, nsp3, nsp9, nps11 (Chen *et al.* 2015), o en los genes de nsp2, nsp3, nsp5, nps12 y nsp13 (Lee *et al.* 2017).

PATOGENIA

El vDEP ingresa al organismo por vía oral, a través de aerosoles, heces, vómito o fómites contaminados. Experimentalmente se ha estudiado la patogénesis del virus en lechones de tres días de edad, encontrando que la replicación viral ocurre en el citoplasma de los enterocitos del intestino delgado se lleva a cabo de las 12-18 horas post-inoculación, mientras que los signos clínicos a las 22-36 horas post-inoculación (Zimmerman *et al.* 2013; Gallagher & Buchmeier 2001; Jung & Saif 2015). El vDEP tiene efecto citolítico y provoca una necrosis aguda, lo cual genera atrofia de las vellosidades (Jung & Saif 2015; Annamalai *et al.* 2015). Sin embargo,

el virus puede no producir muerte de los enterocitos en cerdos infectados (Kim & Chae 2000). Aunque algunos estudios sugieren que el vDEP no replica en otros órganos, se ha logrado identificar antígenos virales por inmunohistoquímica y material genético por RT-PCR en pulmón, hígado, riñón y bazo de lechones infectados experimentalmente (Park & Shin 2014). Por otro lado, después de la inoculación de una cepa emergente americana en lechones gnotobióticos, se detectó únicamente sólo el antígeno viral en duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon (Jung *et al.* 2014).

La aminopeptidasa N (APN), una glucoproteína transmembrana de 150kDa expresada en los enterocitos, se creía que era el receptor de vDEP debido a que es el receptor para otros coronavirus, como el vGET (C. Li, Li, Lucio de Esesarte, Guo, Elzen, *et al.* 2017; Li *et al.* 2007; Nam & Lee 2010; Liu *et al.* 2015). Estudios recientes han demostrado que el vDEP puede infectar varias líneas celulares carentes del receptor APN, mientras que vGET y una cepa de coronavirus humano (HCoV-229E-S1) no replicaron (W. Li *et al.* 2017). Sin embargo, otras evidencias indican que aunque el receptor APN no es necesario, si promueve la capacidad infectiva del virus (Shirato *et al.* 2016).

Con pasajes subsecuentes de diferentes cepas patógenas en cultivos celulares, se ha logrado atenuarlas y reducir significativamente su patogenicidad. Algunas cepas, incluso, pierden totalmente su patogenicidad y los efectos citotóxicos y citopáticos producidos *in vitro* (Chen *et al.* 2015; Lee *et al.* 2017; Q. Chen *et al.* 2014). La finalidad y utilidad de estos estudios ha sido determinar las mutaciones que atenúan las cepas y obtener virus no patógeno para usarlo en la vacunación.

SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES

Los signos clínicos se observan de 22-36 h post-infección, la diarrea acuosa es el signo más frecuente y característico, presentada en cerdos de todas las edades, provocando una morbilidad de hasta el 100%. Los lechones menores a una

semana son los más afectados, pueden morir después de 3 a 4 días debido a deshidratación severa. La mortalidad en lechones es del 50% al 100% (Jung & Saif 2015; Lin *et al.* 2016; Lv *et al.* 2016; Zimmerman *et al.* 2013). Los animales enfermos pueden presentar vómitos, depresión y anorexia, y a menudo dan la impresión de presentar dolor abdominal. Los hallazgos anatomopatológicos se limitan al intestino delgado, el cual se presenta distendido, con apariencia translúcida y con contenido acuoso amarillento. Estos cambios podrían estar relacionados a los daños de la mucosa provocados por la infección viral de los enterocitos, los cuales muestran vacuolas, descamación y, ocasionalmente, la formación de sincitios. Las vellosidades presentan acortamiento o pérdida, y algunas pueden fusionarse. En el estómago se puede apreciar la presencia de coágulos de leche que no ha sido digerida (Zimmerman *et al.* 2013; Stevenson *et al.* 2013; Huang *et al.* 2013; Jung & Saif 2015; Lee 2015; Lin *et al.* 2016).

DIAGNÓSTICO

La DEP no puede ser diagnosticada solo con los signos clínicos que se presenten en la granja, ni mucho menos con la observación de las lesiones macroscópicas, debido a la semejanza con lesiones provocadas por otros virus entéricos. Los métodos de laboratorio son necesarios para el diagnóstico etiológico. Los métodos más comúnmente usados son la inmunofluorescencia directa (IF), para detectar antígenos virales, y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para demostrar la presencia del virus en heces o de anticuerpos en suero. El virus también puede ser detectado por inmunocromatografía, inmunohistoquímica, microscopia electrónica, reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) y aislamiento viral (AV) (Geiger & Connor 2013; Song & Park 2012; Zimmerman *et al.* 2013). Para el diagnóstico mediante la prueba RT-PCR en tiempo real, se usan iniciadores que amplifican fragmentos de la proteína N o M debido a que éstas tienen regiones conservadas entre varias cepas del virus. También se usan iniciadores dirigidos al gen S, útil para poder identificar las cepas

circulantes dentro de diferentes regiones. El diagnóstico se puede realizar a partir de muestras de heces o de intestino, y de suero de animales con signología (D. Song *et al.* 2006; Steinrigl *et al.* 2015; Wang, Zhang, *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2014).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una herramienta de biología molecular, basada en el estudio de los ácidos nucleicos de cualquier organismo. Es una reacción enzimática *in vitro* para amplificar millones de veces una secuencia de ADN específica por la repetición de varios ciclos de copiado de la secuencia blanco. Esta técnica se caracteriza por su alta eficiencia, sensibilidad y reproducibilidad, que genera resultados fáciles de analizar y altamente confiables (Walker 2013; Tamay de Dios *et al.* 2013; Roche 2006). La PCR toma como fundamento la actividad que normalmente realiza la enzima ADN polimerasa, que sintetiza ADN dentro de la célula. Esta reacción se da comúnmente en tres etapas, 1) la desnaturalización, que es el proceso por el cual la doble cadena de ADN se separa entre sí, dejando cada una de las hebras libres, 2) la hibridación, es cuando se vuelven a unir ambas cadenas, cada una con su complementaria, de manera *in vitro* se usan secuencias complementarias cortas de nucleótidos, llamados oligonucleótidos, y 3) la extensión, que es el proceso en el cual la ADN polimerasa se ensambla en la porción de doble cadena del ADN y comienza a sintetizar una nueva cadena a partir de la molde ya existente. Estas tres etapas son simulados de manera *in vitro* por un equipo llamado termociclador, el cual en cada una de las etapas modifica las temperaturas para que se lleve a cabo adecuadamente el proceso, repitiendo entre 25 a 35 ciclos (Walker 2013; Roche 2006; Martínez & Silva 2004).

Para que se lleve a cabo la reacción se necesitan varios componentes: una cadena ADN molde o también llamado templado, la ADN polimerasa, nucleótidos libres (desoxinucleótidos trifosfatados, o dNTPs), oligonucleótidos (también llamados iniciadores) y iones, como magnesio principalmente. El templado es el

material genético base que se quiere amplificar, y debe purificarse del organismo de interés. La ADN polimerasa más comúnmente usada es la Taq polimerasa, aislada de *Thermus aquaticus*, que se mantiene activa a las temperaturas altas de desnaturalización (su actividad máxima es a 72°C). Los dNTPs, se preparan en concentraciones de trabajo van de 20 a 200 μM en una solución Tris buferada (10mM, pH 7.7-8.0) para dar un balance óptimo entre rendimiento, especificidad y fidelidad. Los oligonucleótidos deben tener una longitud de entre 20-25 nucleótidos, un porcentaje de citosinas-guaninas de entre el 40-60% y una similitud del 100% a la cadena molde a amplificar, se utilizan dos oligonucleótidos, uno en sentido 5' a 3' llamado "forward", y otro en anti-sentido 3' a 5' llamado "reverse", entre los cuales no debe de haber auto-complementariedad. Las concentraciones de trabajo recomendadas van de 0.1-0.5 μM . El magnesio se utiliza porque actúa como un cofactor enzimático de la reacción, cuya concentración óptima de trabajo de 0.5-2.5 mM, ajustable para no afectar en el rendimiento de la Taq polimerasa (Walker 2013; Park 2011; Tamay de Dios *et al.* 2013; Roche 2006; Innis & Gelfand 1990).

SECUENCIACIÓN

La secuenciación es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas que nos permiten conocer el orden de la secuencia de los nucleótidos (A, C, T, G), cuya combinación en un orden determinado constituyen el código genético de un organismo. Esta metodología es útil en la investigación de los procesos biológicos fundamentales, y en campos aplicados esta información puede usarse para predecir enfermedades, estudiar el parentesco, estimar la evolución, entre otras (Carrilho 2015; De *et al.* 2004). La secuenciación surgió en 1975, en la Universidad de Cambridge por el bioquímico Frederick Sanger. La idea central está basada en copiar el proceso natural de replicación del ADN. Se realiza como método enzimático que utilizaba trifosfato de dideoxinucleótidos (ddNTP). Ya que la deoxirribosa de un ddNTP no cuenta con el grupo 3-OH, cuando el nucleótido

es incorporado a la cadena de ADN se bloquea la adición del siguiente nucleótido, por lo que cada molécula sintetizada va a terminar aleatoriamente. De esta manera se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico.

La estrategia es hacer cuatro reacciones diferentes de síntesis de ADN, utilizando un ddNTP distinto, ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP, lo que va a generar una escalera de moléculas de ADN. Estos fragmentos de DNA se separan en un gel por electroforesis con cuatro carriles distintos, para determinar la secuencia del templado (Sanger 2007). Casi al mismo tiempo que Sanger, Allan Maxam y Walter Gilbert desarrollaron un método alternativo de secuenciación basado en la modificación química del ADN. Este método requiere marcaje radioactivo en uno de los extremos y la purificación del fragmento de ADN que se desea secuenciar. El tratamiento químico genera rupturas en una pequeña proporción, de uno o dos nucleótidos en cada una de las reacciones G, A+G, C, C+T. Posteriormente, se separan los fragmentos producto de las cuatro reacciones por tamaño mediante electroforesis en gel (Maxam & Gilbert 1977). En 1980, Sanger, Maxam y Gilbert compartieron el Premio Nobel de Química.

El método de Sanger tiene varias ventajas sobre el método de Maxam-Gilbert. El primero se puede realizar en un par de horas, en cambio el segundo tarda por lo menos un día; y las reacciones por el método de Sanger son más puras, con menos contaminantes que puedan afectar la reacción. La automatización de la secuenciación con base en la metodología de Sanger y con el uso de dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos, que desplazaron a los isótopos radioactivos, representa una gran ventaja ya que los fluoróforos son detectados por medio de un láser en una electroforesis capilar y la señal emitida es transferida directamente a una computadora donde un programa le da interpretación y ensambla la secuencia. Así, la captura de las secuencias se hace más rápida y con mayor reproducibilidad. Con los métodos automatizados y la aplicación de

cuatro diferentes fluoróforos en una sola reacción, se pueden determinar miles de secuencias de bases por día (Aksyonov et al. 2006; De et al. 2004; Carrilho 2015).

En los últimos años han surgido tecnologías de nueva generación, las llamadas técnicas de secuenciación masiva, que hacen la secuenciación mucho más rápida y más barata. Estas estrategias tienen en común, que evitan el paso de clonaje en bacterias, este es sustituido por la fragmentación del ADN. Una vez fragmentado el ADN se le añaden adaptadores en los extremos, los cuales presentan una secuencia complementaria de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y a su vez combinarla con la secuenciación masiva. Entre las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación se encuentran: Roche-454 (pirosecuenciación), Solexa (Illumina), SOLiD (Secuencing by Oligo ligation and detection), Ion Torrent, entre otras (Quail *et al.* 2012; Carrilho 2015). El fundamento de la tecnología de Ion Torrent se basa en la semiconducción, se detectan los cambios de pH que son producidos por la liberación de iones de hidrogeno (H^+), esto ocurre cuando hay unión de un nucleótido en la cadena base que se está secuenciando. Cada nucleótido se va agregando en soluciones por separado, dando de esta manera la interpretación de la secuencia (Quail et al. 2012; Ion Torrent by Life Technologies 2011).

JUSTIFICACIÓN

Es necesario realizar muestreos de intestino y heces de cerdos con enfermedades entéricas en granjas de la República Mexicana, con la finalidad de comenzar a aislar las cepas circulantes del vDEP y evaluar si éstas cuentan con las mismas características genéticas que las altamente patógenas reportadas en Asia y en Estados Unidos. Asimismo, es importante conocer si existe variabilidad entre las cepas identificadas en México y su potencial de infección. Lo anterior podría contribuir al desarrollo de métodos de diagnóstico, sensibles y específicos, para la detección de las diferentes cepas del vDEP circulantes en el país y posteriormente desarrollar vacunas efectivas.

HIPÓTESIS

Debido a la alta prevalencia de la DEP y al ingreso rápido del vDEP en las granjas de la República Mexicana, se encontrará una sola variante de este virus.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las variantes genéticas del vDEP en las granjas de la República Mexicana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar un muestreo en diferentes granjas sospechosas a vDEP, con la finalidad de detectar la presencia del virus.
2. Estandarizar la prueba de RT-PCR hacia la proteína S para la detección de vDEP.
3. Identificar el linaje de las muestras positivas por secuenciación.
4. Determinar la variabilidad genética de los virus identificados en las diferentes regiones de la República Mexicana con base en el gen spike (S).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo en granjas de la República Mexicana.

Entre los años 2013 a 2016, fue realizado un muestreo representativo de intestinos y heces de lechones, de aproximadamente una semana de edad, con cuadros digestivos sugerentes a la enfermedad causada por el vDEP. Un total de 68 muestras (47 de intestinos y 21 de heces) fueron proporcionadas por asesores privados del sector porcícola y por el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los especímenes provinieron de granjas ubicadas en 17 estados de la República Mexicana: Aguascalientes (1), Ciudad de México (2), Estado de México (4), Guanajuato (2), Hidalgo (1), Jalisco (7), Michoacán (1), Morelos (1), Nuevo León (1), Oaxaca (1), Puebla (21), Querétaro (9), San Luis Potosí (3), Sonora (6), Tlaxcala (1), Veracruz (4) y Yucatán (1) (figura 3).

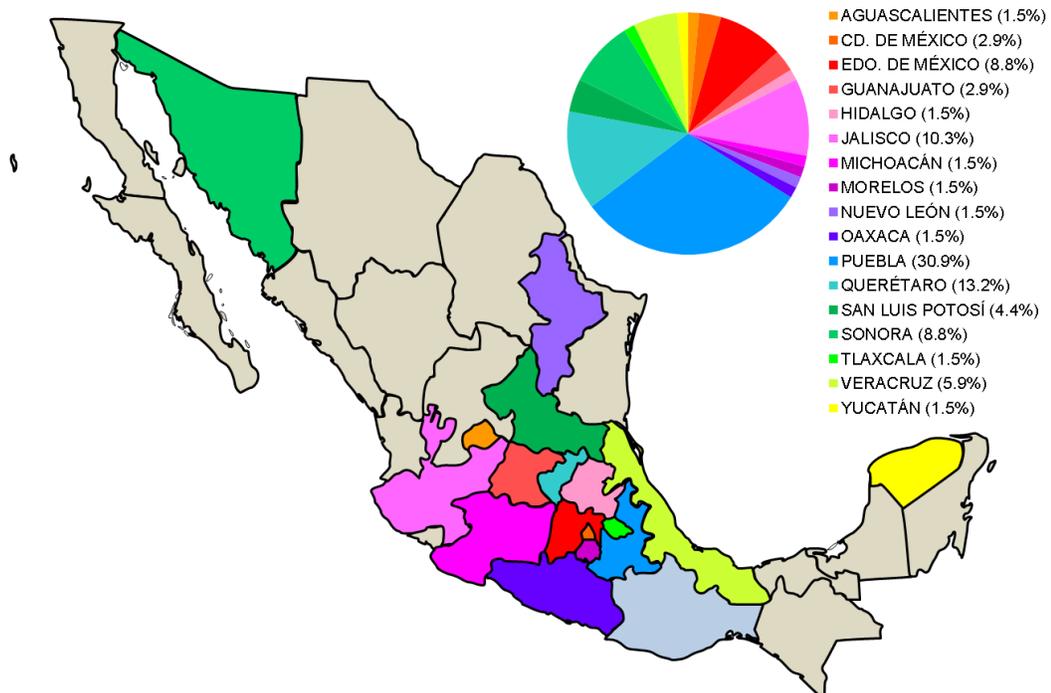


Figura 3. Porcentaje de muestras por estado. En el mapa con distintos colores se observan los estados muestreados y en la gráfica se observa el porcentaje de muestras obtenidas en cada estado.

Preparación de las muestras

Se realizó una inspección general física de las muestras, de éstas se tomó una porción representativa y se procedió bajo lo siguiente: si la muestra era de intestino se realizó la pulverización en mortero con nitrógeno líquido, el pulverizado obtenido se mezcló por Vortex durante aproximadamente 15 s con solución buferada de fosfatos (PBS) en una proporción de 1:5, y se realizó la clarificación de la muestra por centrifugación a 5000 rpm durante 25 min. A las muestras de heces se les adicionó PBS en una proporción de 1:10, se homogenizaron por Vortex aproximadamente por 40 s, se dejaron en refrigeración a 4°C durante 2h, después fueron clarificadas por centrifugación a 5000 rpm durante 25 min. Los sobrenadantes obtenidos de ambos tipos de muestras fueron utilizados de inmediato para la realización de la RT-PCR Tiempo Real (RT-PCRq). El resto de los sobrenadantes fue almacenado a -70°C.

Detección del virus de la diarrea epidémica porcina

La detección del antígeno viral se realizó con prueba de inmunocromatografía de ANIGEN (Animal Genetics México), y la RT-PCRq con el kit comercial Real-Time RT-PCR PEDV/SDCV, Pockit®. Ambas técnicas se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante. De las muestras positivas se decidió utilizar aquella que presentaba un ct ("Threshold point" o ciclo umbral) más alto para realizar la estandarización de la RT-PCR punto final dirigida hacia el gen S del vDEP.

Estandarización de la RT-PCR dirigida hacia el gen S

Diseño de Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con la herramienta Primer-BLAST del National Center of Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (NCBI) tomando como referencia la secuencia del genoma completo de un virus emergente de Estados Unidos, la cepa Colorado/2013 (No. de acceso Genbank:

KF272920.1). Para todos los oligonucleótidos diseñados se buscó que la temperatura de metilación (T_m) fuera de 60°C. Posteriormente, se realizó la alineación en el programa MEGA 7.0.25, de más de 80 secuencias reportadas en diferentes partes del mundo, con la finalidad de revisar la variación de los oligonucleótidos con las diferentes cepas del virus. De igual manera se realizó el análisis de los oligonucleótidos mediante el software OligoAnalyzer 3.1 de la página del IDT (Integrated DNA Technologies, <https://www.idtdna.com>), para determinar que se cumplieran los criterios de diseño. Ya obtenidos los oligonucleótidos ideales, se usó el programa Basic Local Alignment Sequence Tool (BLAST) del NCBI para validar su especificidad única hacia las secuencias del vDEP. Los oligonucleótidos que se obtuvieron fueron sintetizados por una empresa nacional (T4 oligo®, <http://t4oligo.com/home/>). Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos que amplifican en dos fragmentos el gen S, y otro par que amplifica en un fragmento los genes ORF3, E, M y N, las secuencias de los oligonucleótidos se presentan en el cuadro 1.

| NOMBRE | SECUENCIA (5' ----- 3') | GEN | AMPLICÓN |
|------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------|
| SRF/vDEP/S-F1 | GTGTCATCACCGAAAAGTTGGC | S | 2 952 |
| SRF/vDEP/S-R1 | TCAACAGACTCAAGCCTAGCG | | |
| SRF/vDEP/S-F2 | TCTATGGCTTTAGAGGTGAGGGTATC | S | 2 428 |
| SRF/vDEP/S-R2 | GTGGGCAATAAAGAACAATGACAGC | | |
| SRF/vDEP/AII-F3 | GCTGTCATCGTTCTTTATTGCC | ORF3, E, M, N | 2 829 |
| SRF/vDEP/AII-R3 | CCTTCTTGCACTGACATTACCAC | | |

Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados para el vDEP.

En la siguiente figura se puede observar los sitios donde hibridan cada uno de los seis oligonucleótidos, así como el tamaño aproximado en pares de bases que se obtendría en la amplificación.

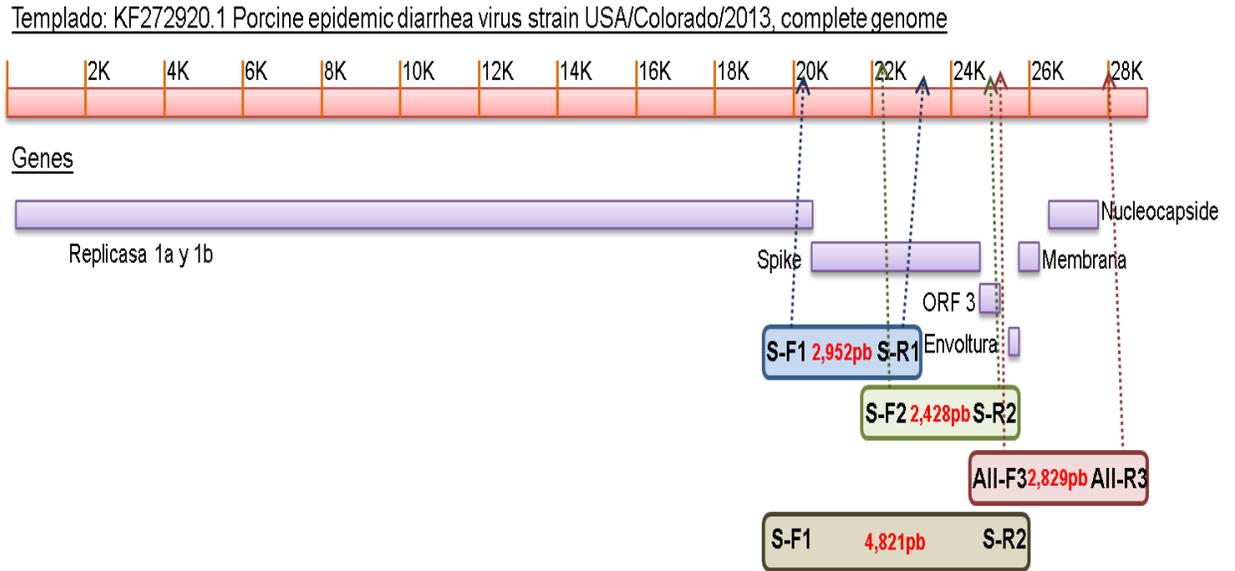


Figura 4. Esquema de la posición de los oligonucleótidos para su amplificación.

Purificación de ARN

Se realizó la purificación del ARN con el kit de extracción QIAmp Viral RNA Mini, Qiagen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con la siguiente metodología:

1. En un tubo Eppendorf de 1.5ml se colocaron 560µl de buffer AVL, 5.6µl de acarreador de RNA y 140µl de la muestra.
2. Se homogeniza con vortex por aproximadamente 15 s, y se incuba durante 10 min a temperatura ambiente.
3. Posteriormente se le adicionan 560µl de etanol al 100%, para ser agitado con vortex durante 10 s.
4. Luego se transfiere a una columna, y se centrifuga a 8000 rpm por 60 s, se coloca el tubo con la columna en otro tubo recolector.

5. Se adiciona a la columna 500µl de buffer de lavado AW1 y se centrifuga a 9000 rpm por 60 segundos, se cambia a otro tubo para colectar.
6. Se le adiciona 500µl de buffer de lavado AW2 y se centrifuga a 14000 rpm por 3 min, se coloca el tubo con la columna en otro tubo Eppendorf.
7. Se le adiciona 30µl de agua libre de RNAsas, se incuba por 60 segundos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 14000 rpm por 60 s (este último paso se realiza dos veces, para obtener un volumen total de 60µl).

Nota: la muestra obtenida se usa inmediatamente, o se almacena a -70°C.

Transcripción en reversa (RT)

Una vez obtenido el ARN, y previo a la RT se realizó el tratamiento de la muestra purificada con ADNAsas con el kit RQ-1 RNase-Free DNase (Promega®), en un microtubo de 0.2ml se colocó 1µg de ARN, 8µl de H₂O DEPC, 1µl de buffer RQ1 RNase free DNase 10x, y 1µl de RQ1 RNase free DNase, esta mezcla se colocó en el termociclador a 37°C durante 30 min, al terminar esto, se le adicionó 1µl de solución stop, y se dejó nuevamente en el termociclador a 65°C durante 10 min.

Una vez terminado esto se llevó a cabo la RT para obtener el cDNA mediante el kit comercial Superscript II RT (Invitrogen®, con la siguiente metodología (figura 5):

1. Con un volumen total de 5µl de ARN, se le adiciona 1µl de Oligo SRF/vDEP/All-R3 (20µM), 1µl de dNTPs (10mM).
2. Se coloca en el termociclador a una temperatura de 60°C durante 5 min, posterior se baja la temperatura a 4°C.
3. Se le adiciona 4µl de 5x first stand buffer, 2µl de 0.1 M DTT y 1µl de RNasa OUT (40U/µl).
4. Se coloca a una temperatura de 42°C durante 2 min, posterior se baja a 4°C.
5. Se le adiciona 1µl de Enzima Superscript RT (200u).
6. Se coloca a una temperatura de 42°C por 50 min, y por ultimo 70°C por 15 minutos, al final se baja la temperatura a 4°C.

Con la finalidad de comprobar que la reacción de la transcriptasa reversa se estaba llevando a cabo de manera adecuada, se realizó la cuantificación del ADN

total con el equipo Qubit 2.0 Fluorometer (Life technologies), con el kit Qubit® dsDNA HS Assay, siguiendo las instrucciones del proveedor, y a la par se realizó la prueba RT-PCR punto final anidada usada para el diagnóstico dentro del DMZC con el kit Onestep, pero omitiendo la RT en la reacción (Anexo 2).

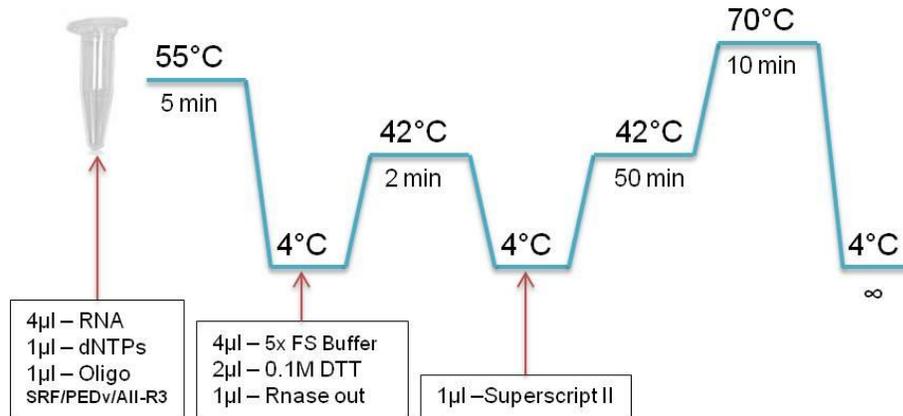


Figura 5. Esquematización de las condiciones de la RT.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó a partir del cDNA obtenido de la RT, mediante el empleo del Kit LongAmp™ Hot Start Taq 2X Master Mix de BioLabs®. Se realizó la optimización del kit, bajo las indicaciones del fabricante, para cada reacción se agrega en un microtubo lo siguiente: 1.5µl del cDNA (1pg-1ng), 0.4µl de iniciador SRF/vDEP/S-F1 (20µM), 0.4µl de iniciador SRF/vDEP/S-R2 (20µM), para obtener la amplificación del gen Spike, mientras que para amplificar los demás genes se utilizaron 0.4µl de iniciador SRF/vDEP/All-F3 (20µM), 0.4µl de iniciador SRF/vDEP/All-R3 (20µM), a lo anterior se le adicionó 5µl de LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix y 2.7µl de agua libre de nucleasas, para obtener un total por reacción de 10µl, el producto obtenido fue sometido a electroforesis. Para la estandarización de la prueba se usaron las siguientes condiciones de amplificación (figura 6): Desnaturalización inicial 94°C/30s, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/30s, alineación se realizaron gradientes de temperatura

cada un grado de 50-59°C/30s, extensión de 65°C/5.2min y un ciclo de extensión final a 65°C/10 min.

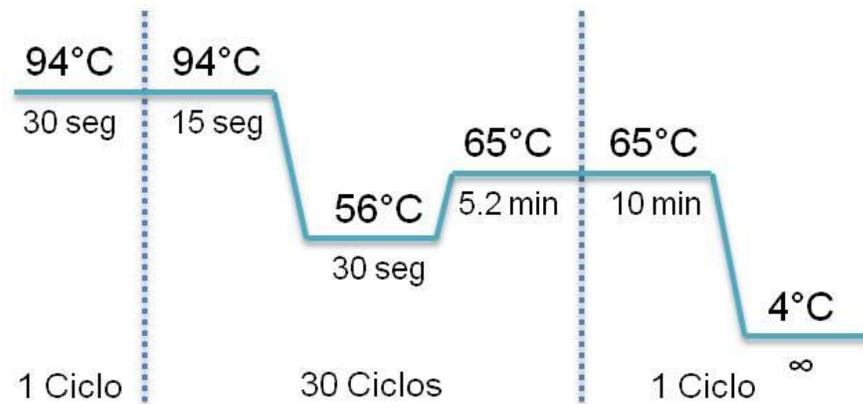


Figura 6. Esquematización de las condiciones de la PCR.

Electroforesis

Para la realización de la electroforesis se prepararon geles de agarosa (Agarose Molecular Biology Grade, Vivantis) a una concentración de 1.5%, en un volumen final de 30ml, se les adicionó 2µl de RedGel 1X (Biotium), para el corrimiento del gel se utilizó una cámara de electroforesis CLP Bioscience Modelo 75.710, con una fuente de poder (BIO-RAD Power PAC 300) donde se ajustó a un tiempo de 60 min a 90 voltios. Se utilizó como buffer de corrida TAE (50X TAE Electrophoresis Buffer, Thermo Scientific) (40mM de Tris base, 20mM de ácido acético y 1mM de EDTA), se cargaron los productos de la RT-PCR en los geles, con 5µl del volumen total de la reacción más 1µl de Buffer de Azul de Bromofenol 6X (25mg de Azul de Bromofenol, 3ml de Glicerol y se aforó a 10ml con agua destilada estéril), en un pocillo aparte se colocaron 3µl marcador de peso molecular (1kb plus ladder, Invitrogen). Una vez realizada la electroforesis, los geles se visualizaron en un transiluminador Kodak Gel Logic 112, con cámara Kodak Molecular Imaging Software V.5.0.1.27 Standard Edition 2008.

Secuenciación

El cDNA obtenido de la amplificación del gen de interés, fue sometido a secuenciación mediante la plataforma Ion Personal Genome Machine (PGM) siguiendo las especificaciones del proveedor para la secuenciación de DNA. En breve, 100ng de cDNA fue empleado para la elaboración de la librería con el Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Life Technologies), el cDNA fue fragmentado físicamente con el Bioruptor® Sonication System hasta obtener fragmentos de 200 pares de bases (pb), a estos fragmentos se ligaron adaptadores, repararon los extremos y se purificó el DNA. La cantidad, calidad e integridad fue evaluada usando High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Santa Clara, CA). Se obtuvo un templado de la librería haciendo uso del Ion PGM™Hi-Q™ OT2 Kit (Life Technologies) mediante PCR de emulsión en el Ion OneTouch™ 2 System. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un chip Ion 314 Chip v2 y con el Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing kit (Life Technologies). Las lecturas obtenidas fueron filtradas con el FastQC plug-in v3.4.1.1, seleccionando solo aquellas con un Qscore ≥ 20 (6,074,916 reads), la profundidad obtenida fue mayor a 300X.

Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias se revisó la calidad de la secuencia y se editaron dejando solamente las secuencias que codifican para la proteína, esto se realizó utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment editor 7.2.6., una vez obtenidas las secuencias fueron comparadas con otras secuencias de referencia en el Genbank para la reconstrucción filogenética. El análisis de alineación de cada gen se realizó por el método Clustal W, posteriormente se realizó la construcción del árbol filogenético, por el método Neighbor-Joining (NJ), calculando el bootstrap por 1000 replicas, estos dos análisis usando el software MEGA 7.0 (molecular evolutionary genetics analysis) (Kumar *et al.* 2016), las secuencias de nucleótidos se convirtieron en secuencias de aminoácidos y se evaluaron los cambios entre ellas.

RESULTADOS

Detección del virus de la diarrea epidémica porcina.

Del las 68 muestras se obtuvieron 53 positivas por medio de RT-PCRq (cuadro 2) de 15 estados de la República Mexicana, las cuales representan el 77.94%. De éstas 39 fueron de intestino y 14 de heces. La detección de muestras positivas en intestino fue de un 82.97%, mientras que para las heces fue del 66.66%, del total de las muestras procesadas.

| PROCEDENCIA (ESTADO) | TOTAL DE MUESTRAS | RESULTADO RT-PCRq | | | |
|-------------------------|----------------------|-------------------|--------------|-----------|--------------|
| | | (+) | % | (-) | % |
| AGUASCALIENTES | 1 | 0 | 0.00 | 1 | 6.67 |
| CIUDAD DE MÉXICO | 2 | 1 | 1.89 | 1 | 6.67 |
| ESTADO DE MÉXICO | 6 | 4 | 7.55 | 2 | 13.33 |
| GUANAJUATO | 2 | 2 | 3.77 | 0 | 0.00 |
| HIDALGO | 1 | 1 | 1.89 | 0 | 0.00 |
| JALISCO | 7 | 6 | 11.32 | 1 | 6.67 |
| MICHOACÁN | 1 | 1 | 1.89 | 0 | 0.00 |
| MORELOS | 1 | 1 | 1.89 | 0 | 0.00 |
| NUEVO LEÓN | 1 | 1 | 1.89 | 0 | 0.00 |
| OAXACA | 1 | 1 | 1.89 | 0 | 0.00 |
| PUEBLA | 21 | 17 | 32.08 | 4 | 26.67 |
| QUERÉTARO | 9 | 7 | 13.21 | 2 | 13.33 |
| SAN LUIS POTOSÍ | 3 | 2 | 3.77 | 1 | 6.67 |
| SONORA | 6 | 5 | 9.43 | 1 | 6.67 |
| TLAXCALA | 1 | 1 | 1.89 | 0 | 0.00 |
| VERACRUZ | 4 | 3 | 5.66 | 1 | 6.67 |
| YUCATÁN | 1 | 0 | 0.00 | 1 | 6.67 |
| TOTAL | 68 | 53 | 77.94 | 15 | 22.06 |

Cuadro 2. Resultados de las muestras al vDEP por RT-PCRq.

RT-PCR de los genes S, ORF3, E, M y N

Una vez estandarizada la RT y la PCR (anexo 3), se realizó las amplificaciones del gen S completo y de los demás genes estructurales, generándose dos bandas, una de un peso aproximado de 4,821pb, y otra de 2,829pb aproximadamente (Figura 7).

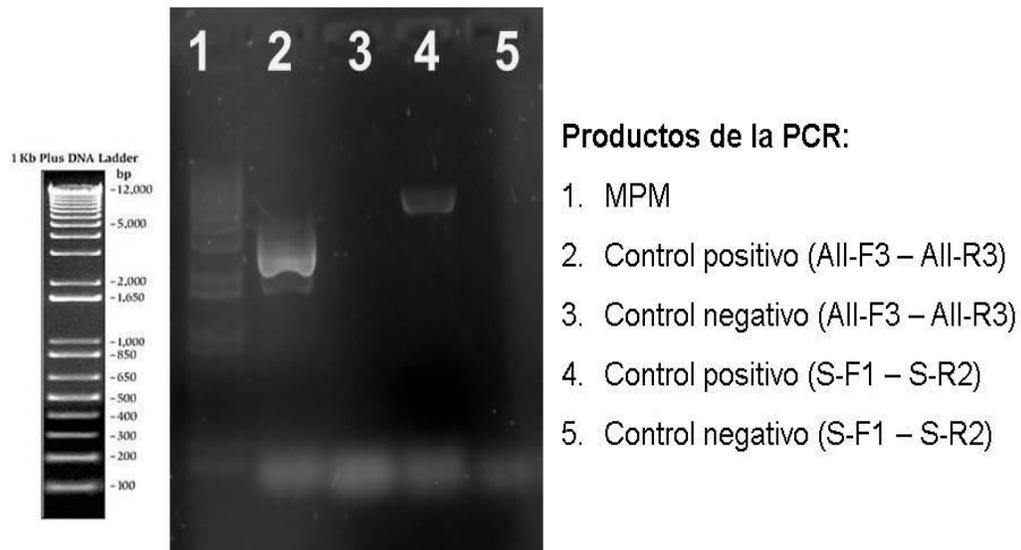


Figura 7. Electroforesis de la RT-PCR en gel de agarosa al 1.5%. RT-PCR estandarizada para el gen S (Carril 4), así como para los genes ORF3, E, M, N (Carril 2).

A las 53 muestras que fueron positivas para el vDEP (ver Cuadro 2), se les realizó las dos RT-PCR punto final para el gen S y para los demás genes estructurales, y se obtuvo la amplificación de 28 muestras, las cuales provinieron de 10 de los 17 estados muestreados, estos son el Estado de México (3), Guanajuato (1), Jalisco (4), Michoacán (1), Puebla (10), Querétaro (4), San Luis Potosí (2), Sonora (1), Tlaxcala (1) y Veracruz (1) (figura 8).

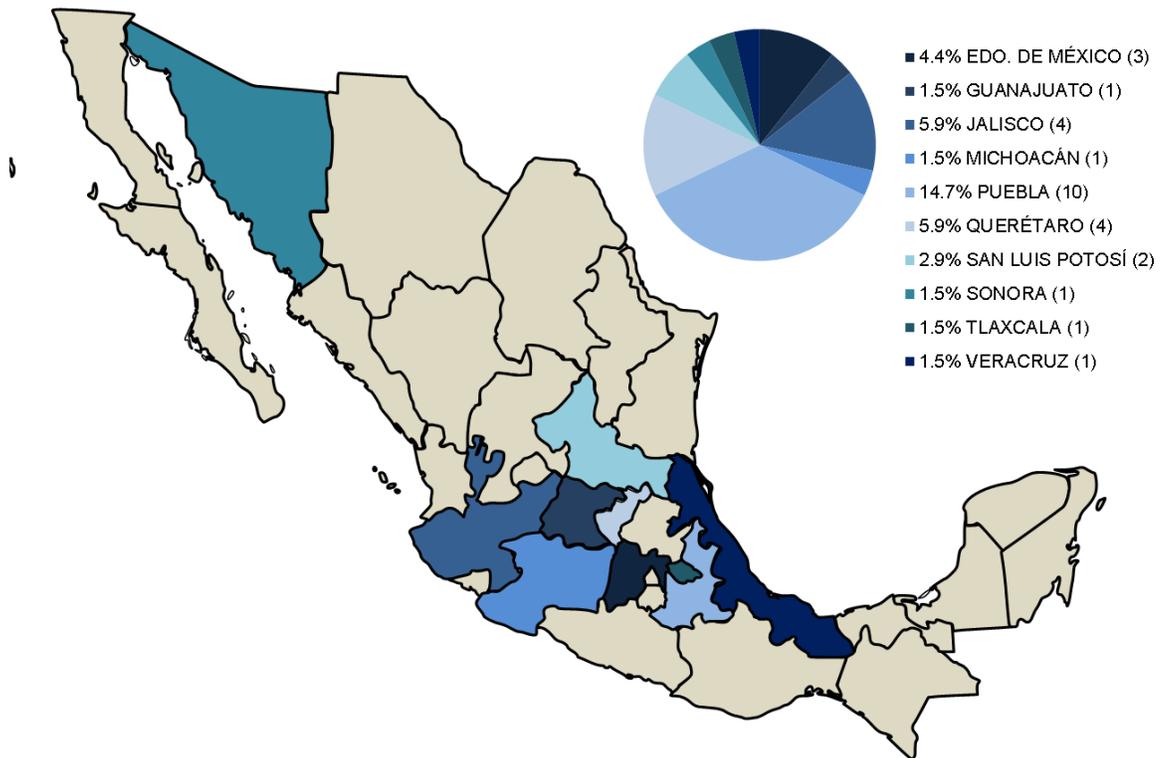


Figura 8. Porcentaje y número de muestras positivas a la RT-PCR punto final. En el mapa con distintos colores se observan los estados que presentaron muestras con amplificación positiva hacia los genes S, ORF3, E, M y N, en la gráfica se observa el porcentaje de muestras obtenidas en cada Estado.

Secuenciación

A partir de las 28 muestras amplificadas, se obtuvieron 20 secuencias de nucleótidos para el gen S completo de los siguientes estados y años, Estado de México (1,2014), Guanajuato (1,2015), Jalisco (3,2015), Michoacán (1,2015), Puebla (1,2014; 5,2015; 2,2016), Querétaro (2,2016), San Luis Potosí (1,2015), Sonora (1,2015), Tlaxcala (1,2014) y Veracruz (1,2015) (Cuadro 3).

Para el ORF3 se obtuvieron de igual manera 20 secuencias del gen completo, Estado de México (1,2014; 1,2015), Guanajuato (1,2015), Jalisco (3,2015; 1,2016), Michoacán (1,2015), Puebla (1,2014; 3,2015; 2,2016), Querétaro (3,2016), San Luis Potosí (1,2015), Tlaxcala (1,2014) y Veracruz (1,2015) (Cuadro 3).

Para el gen de envoltura se obtuvieron 20 secuencias del gen completo, Estado de México (1,2014; 1,2015), Guanajuato (1,2015), Jalisco (3,2015; 1,2016), Michoacán (1,2015), Puebla (1,2014; 3,2015; 2,2016), Querétaro (3,2016), San Luis Potosí (1,2015), Tlaxcala (1,2014) y Veracruz (1,2015) (Cuadro 3).

Para el gen completo de membrana se obtuvieron 19 secuencias, Estado de México (1,2014; 1,2015), Guanajuato (1,2015), Jalisco (2,2015; 1,2016), Michoacán (1,2015), Puebla (1,2014; 3,2015; 2,2016), Querétaro (3,2016), San Luis Potosí (1,2015), Tlaxcala (1,2014) y Veracruz (1,2015) (Cuadro 3).

Para el gen de la nucleocápside se obtuvieron 18 secuencias completas, Estado de México (1,2014; 1,2015), Guanajuato (1,2015), Jalisco (2,2015; 1,2016), Michoacán (1,2015), Puebla (1,2014; 3,2015; 1,2016), Querétaro (2,2016), San Luis Potosí (1,2015), Tlaxcala (1,2014) y Veracruz (1,2015) (Cuadro 3).

| Id. de la muestra | Procedencia | Año | Tipo de muestra | Genes secuenciados (aminoácidos) | | | | |
|----------------------|-----------------|------|-----------------|----------------------------------|------|-----|-----|-----|
| | | | | S | ORF3 | E | M | N |
| GenBank: KF272920 | Colorado/USA | 2013 | Referencia | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC0 | Puebla | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| INI-DMZC3 | Tlaxcala | 2014 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC5 | Puebla | 2014 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC6 | Edo. de México | 2014 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC9 | San Luis Potosí | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC10 | Jalisco | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC11 | Jalisco | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | (-) | (-) |
| IN-DMZC12 | Puebla | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC13 | Edo. de México | 2015 | Intestino | (-) | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC14-1 | Puebla | 2014 | Intestino | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| IN-DMZC14-2 | Puebla | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC15 | Guanajuato | 2015 | Intestino | 1387 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC16 | Puebla | 2015 | Intestino | 1386 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| IN-DMZC17 | Edo. de México | 2015 | Intestino | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| IN-DMZC18 | San Luis Potosí | 2015 | Intestino | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| IN-DMZC19 | Michoacán | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC20 | Puebla | 2015 | Heces | 1386 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| IN-DMZC22 | Veracruz | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC23 | Sonora | 2015 | Heces | 1386 | (-) | (-) | (-) | (-) |
| IN-DMZC25 | Jalisco | 2015 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC42 | Puebla | 2016 | Intestino | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| IN-DMZC43 | Querétaro | 2016 | Intestino | (-) | 224 | 76 | 226 | (-) |
| IN-DMZC44 | Puebla | 2016 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC45 | Querétaro | 2016 | Intestino | 1387 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC46 | Jalisco | 2016 | Intestino | (-) | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC48 | Puebla | 2016 | Intestino | 1386 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC49 | Querétaro | 2016 | Intestino | 1389 | 224 | 76 | 226 | 441 |
| IN-DMZC50 | Querétaro | 2016 | Intestino | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |

Cuadro 3. Resultados de las muestras secuenciadas, así como del número de aminoácidos de cada una de las secuencias encontradas.

De las 20 secuencias obtenidas para el gen S, 17 tienen una longitud de 4161 nucleótidos, que codifican para 1386 aminoácidos más su codón de paro; dos tienen 4164 nucleótidos que codifican para 1387 aminoácidos más su codón de paro, y otra más presenta una longitud de 4170 nucleótidos, que codifican para 1389 aminoácidos y un codón de paro. Para la secuencia del gen ORF3, las 20 muestras presentaron una longitud de 675 nucleótidos, que codifican para 224 aminoácidos y un codón de paro. Para el gen E, todas las secuencias obtenidas tuvieron una longitud de 231 nucleótidos, que codifican para 76 aminoácidos y un codón de paro. Para el gen M todas las secuencias tuvieron una longitud de 681 nucleótidos que codifican para 226 aminoácidos y un codón de paro. Para el gen N se obtuvo un producto de secuenciación de 1326 nucleótidos, los cuales codifican para una cadena de 441 aminoácidos y un codón de paro.

Análisis del gen S

El análisis filogenético incluye las 20 secuencias del gen S completo, de muestras positivas provenientes del Estado de México, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tlaxcala y Veracruz. De igual manera se incluyeron algunas cepas de referencia de América, Europa y Asia (Anexo 1). El análisis nos sugiere como resultado los diferentes clados en los que se han clasificado las cepas del vDEP (figura 9).

En el clado superior se pueden apreciar las cepas del tipo no Indel-S, encontradas en diferentes países, en la rama superior de este clado están incluidas las cepas encontradas en este estudio, que a su vez están dentro de las cepas emergentes americanas junto con varias cepas mexicanas ya descritas por Lara-Romero *et al*, en el 2017, y cepas de referencia como la USA/Colorado/2013 (KF272920).

Las secuencias encontradas se pueden apreciar dispersas dentro de este grupo de cepas, sin embargo se observa que las cepas vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC5/2014, vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC12/2015, vDEP/MEX/TLAX/IN-DMZC3/2014, vDEP/MEX/SLP/IN-DMZC9/2014, vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC16/2015, vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC20/2015 y vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2014, se encuentran estrechamente relacionadas en una rama, junto con la cepa DEP/MEX/MICH/01/2013 descrita por Lara-Romero *et al* (2017).

Las secuencias mexicanas más distantes que se encuentran en otro grupo son, la vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC6/2014, vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015, vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015, vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC45/2016, vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016 y vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC48/2016. Así mismo las demás cepas se encuentran en la parte media del clado de cepas emergentes americanas (Figura 9).

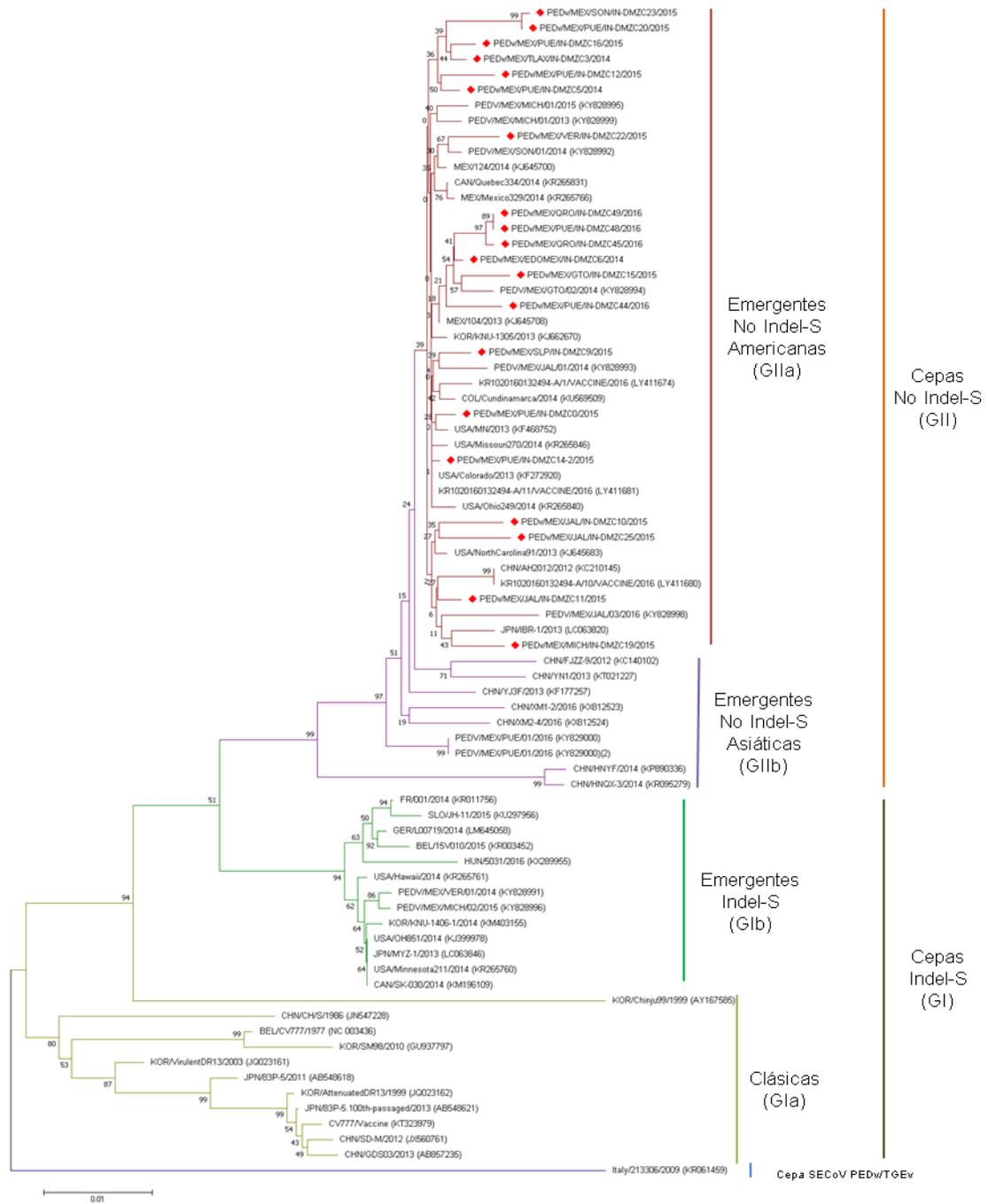


Figura 9. Análisis filogenético de la secuencia completa del gen S con las cepas de referencia. En rojo se han marcado las cepas encontradas en el presente estudio. El árbol se realizó con el método Neighbor-Joining, utilizando máxima probabilidad compuesta por distancia de nucleótidos y con 1000 repeticiones para bootstrap, con MEGA7.

Dentro del análisis filogenético realizado sólo con la cepa de referencia USA/Colorado/2013 (KF272920), con la cepa clásica CV777 (NC_003436) y con la cepa emergente Indel-S OH851 (KJ399978), se encontró que la distribución de las secuencias obtenidas de los diferentes estados, no se encuentran juntas entre ellas (Figura 10). Marcados con un círculo color gris se pueden observar las secuencias obtenidas de Puebla, de color azul las secuencias de Jalisco, de color rosa las secuencias de Querétaro, de color negro, anaranjado, verde, amarillo, verde limón, morado y guinda, las secuencias de Veracruz, San Luis Potosí, Tlaxcala, Sonora, Michoacán, Estado de México y Guanajuato, respectivamente, las cepas de referencia se encuentran marcadas con un triángulo de color rojo. Se puede observar que en la rama donde se encuentra la secuencia vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC5/2014, se encuentran otras tres de Puebla del año 2015, además de la secuencia de Sonora del mismo año, y la de Tlaxcala del 2014. En la rama vecina a ésta se encuentran otras dos secuencias de Puebla del año 2015, que están más cercanas a la cepa de referencia USA/Colorado/2013. Y dentro de este mismo se hallan las tres cepas de Jalisco, así como la secuencia de Veracruz y de San Luis Potosí, todas del año 2015. En la rama inferior se puede observar que las secuencias agrupadas en este clado son la del Estado de México del 2014, la de Michoacán y Guanajuato de 2015, y tres secuencias del 2016, dos de ellas de Querétaro y la restante de Puebla. Separada de estas dos ramas, y sin una homología cercana, se encuentra la secuencia vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC/2016.

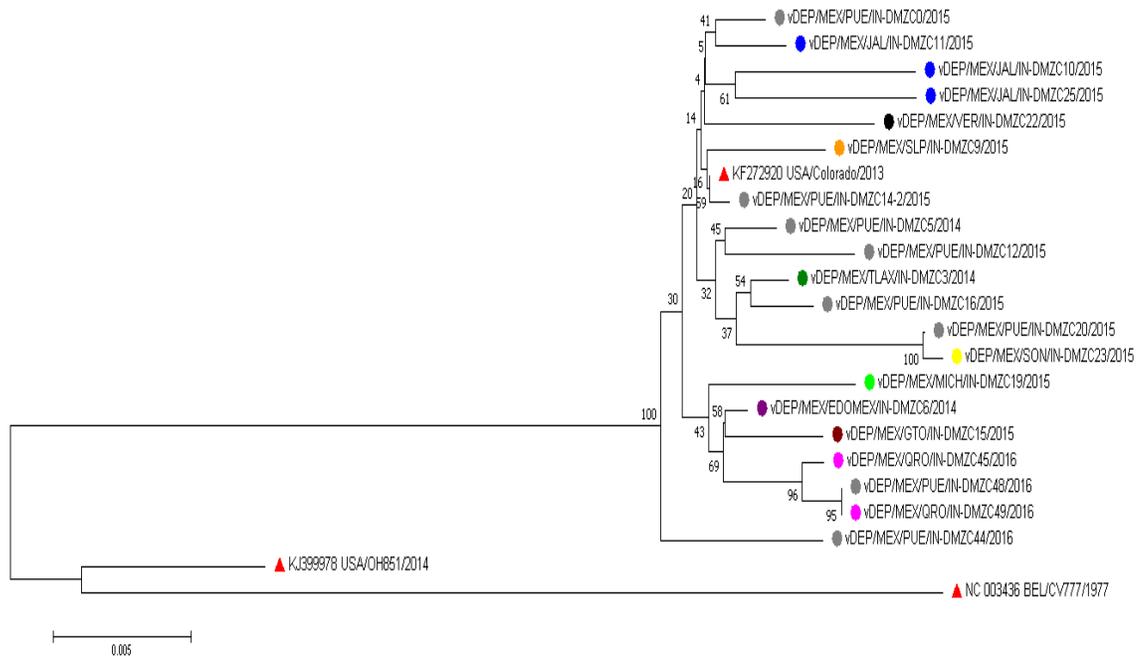


Figura 10. Análisis filogenético del gen S de las secuencias vDEP/IN-DMZC, junto con las cepas USA/Colorado/2013 (KF272920), CV777 (NC_003436) y OH851 (KJ399978). El árbol se construyó con el método Neighbor-Joining, usando un bootstrap de 1000 repeticiones, con MEGA7.

Análisis de similitud del gen S

Con base en el análisis de similitud obtenido, las secuencias de nucleótidos encontradas en este estudio presentaron una similitud entre el 99.35 al 99.95%, (vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016 y vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC14-2/2015, respectivamente) con relación a la cepa de referencia USA/Colorado/2013 (KF272920), mientras que con la cepa Indel-S USA/OH851/2014 (KJ399978) la similitud fue del 95 y 95.93% (vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC14-2/2015 y vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC6/2014, respectivamente). Asimismo, se encontró una similitud menor, que va de 92.75 a 93.26% (vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016 y vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC14-2/2015, respectivamente) con la cepa clásica BEL/CV777/1977 (NC_003436). Entre las diferentes secuencias encontradas se pudo observar que existe una similitud entre ellas que va del

98.82% (entre vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC20/2015 y vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2015) al 99.98% (entre vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2015 y vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016) (Figura 11). Al realizar el análisis de la alineación de las secuencias, se encontró que la secuencia vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015 presentó la inserción de una tirosina (Y) entre la posición 424–425 y la secuencia vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC45/2016 presentó una inserción de un ácido aspártico (D) entre la posición 447-448 (Figura 12).

| Cepas | nt | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|----------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1 USA/Colorado/2013 (KF272920) | 4161 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 USA/OH851/2014 (KJ399978) | 4152 | 96.05 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 BEL/CV777/1977 (NC_003436) | 4152 | 93.28 | 95.57 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC0/2015 | 4161 | 99.86 | 95.91 | 93.16 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 vDEP/MEX/TLAX/IN-DMZC3/2014 | 4161 | 99.83 | 95.91 | 93.21 | 99.69 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC5/2014 | 4161 | 99.78 | 95.86 | 93.21 | 99.64 | 99.81 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC6/2014 | 4161 | 99.83 | 95.93 | 93.21 | 99.69 | 99.71 | 99.66 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 vDEP/MEX/SLP/IN-DMZC9/2015 | 4161 | 99.71 | 95.86 | 93.06 | 99.57 | 99.66 | 99.57 | 99.59 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC10/2015 | 4161 | 99.59 | 95.69 | 93.02 | 99.45 | 99.42 | 99.38 | 99.42 | 99.3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC11/2015 | 4161 | 99.76 | 95.81 | 93.06 | 99.66 | 99.59 | 99.54 | 99.57 | 99.47 | 99.4 | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC12/2015 | 4161 | 99.59 | 95.71 | 93.09 | 99.45 | 99.62 | 99.66 | 99.47 | 99.35 | 99.21 | 99.4 | | | | | | | | | | | | | |
| 12 vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC14-2/2015 | 4161 | 99.95 | 95 | 93.26 | 99.81 | 99.38 | 99.78 | 99.83 | 99.71 | 99.54 | 99.71 | 99.59 | | | | | | | | | | | | |
| 13 vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015 | 4164 | 99.57 | 95.71 | 93.04 | 99.42 | 99.45 | 99.4 | 99.69 | 99.33 | 99.16 | 99.3 | 99.26 | 99.57 | | | | | | | | | | | |
| 14 vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC16/2015 | 4161 | 99.69 | 95.79 | 93.09 | 99.54 | 99.78 | 99.69 | 99.57 | 99.47 | 99.28 | 99.45 | 99.5 | 99.69 | 99.3 | | | | | | | | | | |
| 15 vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015 | 4161 | 99.52 | 95.62 | 92.97 | 99.38 | 99.5 | 99.35 | 99.64 | 99.33 | 99.16 | 99.35 | 99.21 | 99.52 | 99.38 | 99.28 | | | | | | | | | |
| 16 vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC20/2015 | 4161 | 99.45 | 95.64 | 92.97 | 99.3 | 99.52 | 99.42 | 99.33 | 99.23 | 99.09 | 99.28 | 99.28 | 99.45 | 99.09 | 99.4 | 99.13 | | | | | | | | |
| 17 vDEP/MEX/VER/IN-DMZC22/2015 | 4161 | 99.42 | 95.47 | 92.87 | 99.28 | 99.26 | 99.21 | 99.26 | 99.18 | 98.99 | 99.23 | 99.06 | 99.38 | 98.99 | 99.11 | 99.04 | 98.89 | | | | | | | |
| 18 vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2015 | 4161 | 99.42 | 95.62 | 92.94 | 99.28 | 99.5 | 99.4 | 99.3 | 99.21 | 99.06 | 99.26 | 99.26 | 99.42 | 99.06 | 99.38 | 99.11 | 99.98 | 98.87 | | | | | | |
| 19 vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC25/2015 | 4161 | 99.66 | 95.71 | 92.92 | 99.52 | 99.5 | 99.45 | 99.5 | 99.38 | 99.35 | 99.45 | 99.26 | 99.62 | 99.23 | 99.35 | 99.21 | 99.16 | 99.11 | 99.18 | | | | | |
| 20 vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC44/2016 | 4161 | 99.74 | 95.86 | 93.21 | 99.59 | 99.62 | 99.57 | 99.71 | 99.5 | 99.33 | 99.5 | 99.38 | 99.74 | 99.45 | 99.47 | 99.4 | 99.26 | 99.18 | 99.26 | 99.4 | | | | |
| 21 vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC45/2016 | 4164 | 99.54 | 95.62 | 92.9 | 99.42 | 99.42 | 99.35 | 99.66 | 99.3 | 99.13 | 99.3 | 99.16 | 99.54 | 99.33 | 99.28 | 99.35 | 99.04 | 98.97 | 99.01 | 99.21 | 99.42 | | | |
| 22 vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC48/2016 | 4161 | 99.59 | 95.66 | 92.99 | 99.45 | 99.47 | 99.4 | 99.71 | 99.35 | 99.16 | 99.33 | 99.26 | 99.59 | 99.45 | 99.33 | 99.4 | 99.09 | 99.06 | 99.06 | 99.26 | 99.5 | 99.76 | | |
| 23 vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016 | 4170 | 99.35 | 95.42 | 92.75 | 99.21 | 99.23 | 99.16 | 99.47 | 99.11 | 98.92 | 99.09 | 99.01 | 99.35 | 99.23 | 99.09 | 99.16 | 98.85 | 98.82 | 98.82 | 99.01 | 99.26 | 99.45 | 99.76 | |

Figura 11. Porcentajes de similitud entre las secuencias mexicanas con las cepas de referencia: USA/Colorado/2013, USA/OH851/2014, BEL/CV777/1977.

Epítomos de la proteína S

Con base en el alineamiento de aminoácidos de las secuencias encontradas, y tomando como referencia la cepa emergente americana del tipo no Indel-S USA/Colorado/2013 (KF272920), se pudo encontrar (Figura 12) que la región COE se encuentra ubicada entre la porción del 502-641, con un total de 140 aminoácidos en 19 secuencias, similar a la cepa de referencia; la región COE de una secuencia contuvo 142 aminoácidos.

La región del epítopo SS2 se encuentra entre la posición 751 a la 758, con una longitud de 8 aminoácidos; el epítopo SS6, también de 8 aminoácidos, está

localizado entre las posiciones 767 a la 774. Por último, el epítipo 2C10 se encontró entre la posición 1371 a la 1377, y tuvo una longitud de 7 aminoácidos.

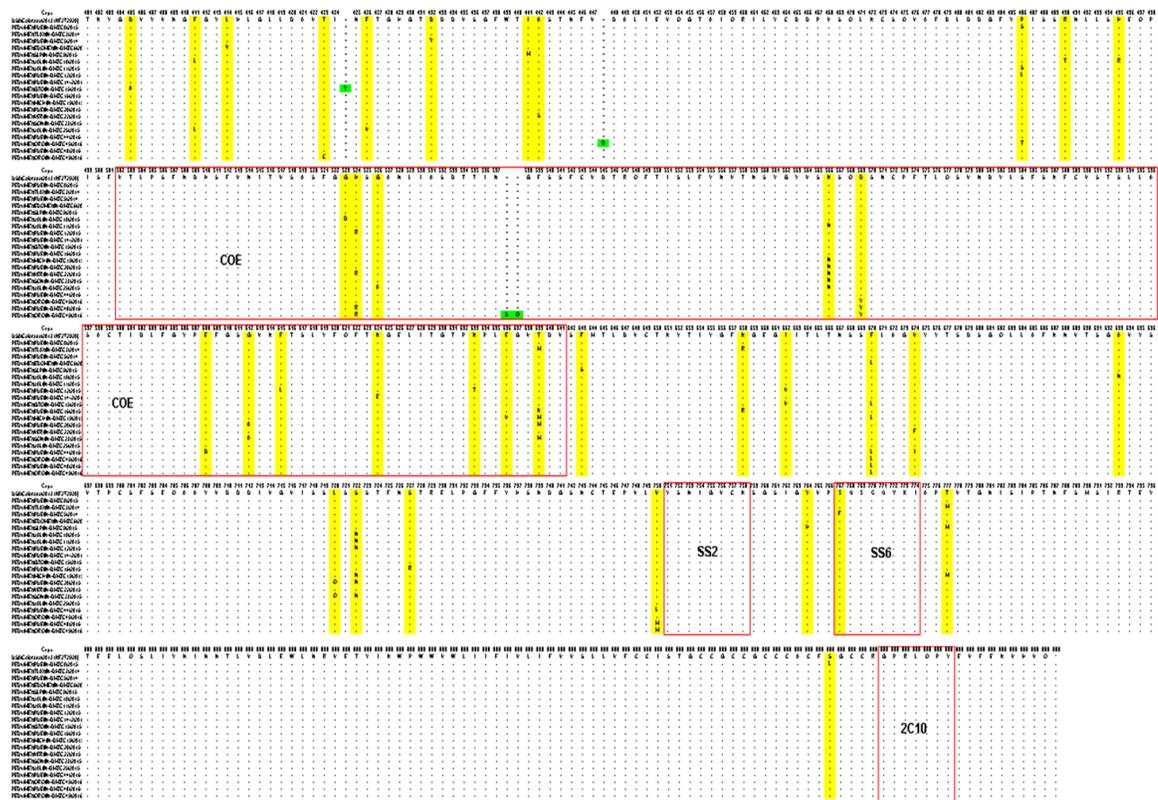


Figura 12. Identificación de los epítipos de la proteína S (COE, SS2, SS6 y 2C10) en las secuencias vDEP/IN-DMZC, resaltadas en recuadro rojo. Marcado en color amarillo se aprecian las sustituciones de uno o más aminoácidos, con base en la secuencia de referencia USA/Colorado/2013.

Región COE

Hay una región conformada por 140 aminoácidos en la cepa de referencia Usa/Colorado/2013, que contiene el epítipo COE. En este estudio se encontró que 19 secuencias contienen este mismo número de aminoácidos, sin embargo, una secuencia presentó una inserción de dos aminoácidos. De las 20 secuencias encontradas y analizadas en el presente estudio 15 de ellas presentaron sustituciones de aminoácidos desde uno hasta tres, dentro de la misma secuencia

(Figura 13). La secuencia vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC10/2015 presentó sustitución de una glicina (G) a un ácido aspártico (D) en la posición 523. En la posición 524 cuatro secuencias (vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC12/2015, vDEP/MEX/VER/IN-DMZC22/2015, vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC48/2016 y vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016) presentaron sustitución de una histidina (H) a una arginina (R). En la secuencia vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC25/2015 se encontró la sustitución de una glicina (G) a una alanina (A) en la posición 526. En la secuencia vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2019, entre el aminoácido 537-538, se encontró una inserción de dos aminoácidos, una serina (S) y una glutamina (Q). En la posición 566, las secuencias vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC11/2015, vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015, vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC20/2015, vDEP/MEX/VER/IN-DMZC22/2015, vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2015 y vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC25/2015, presentaron la sustitución de una lisina (K) a una asparagina (N). En la posición 569 se encontró la sustitución de un ácido aspártico (D) a una tirosina (Y) en las secuencias vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC/45/2016, vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC48/2016 y vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016. En la posición 608 de la secuencia vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC44/2016 se presentó la sustitución de un ácido glutámico (E) a un ácido aspártico (D). En la posición 612 de las secuencias vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC20/2015 y vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2015, se observó la sustitución de una glicina (G) por una alanina (A). En la secuencia vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC12/2015 se observó una sustitución a una leucina (L) por una fenilalanina (F) en la posición 615 y otra sustitución en la posición 633 de una lisina (K) a una treonina (T). La posición 628 de la secuencia vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC14-2/2015 pasó de una lisina (K) a un ácido glutámico (E). La cepa vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015 presentó otra sustitución en la posición 636 de un ácido glutámico (E) a una valina (V). Por último en la posición 639 se observó sustitución de una treonina (T) a una lisina (K) para la secuencia vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC16/2015, y en la misma posición 639 de las secuencias vDEP/MEX/TLAX/IN-DMZC3/2014, vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015,

vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC20/2015 y vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2015 de una treonina (T) a una metionina (M).

| Cepa | COE | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 523 | 524 | 526 | 537 | - | - | 538 | 566 | 569 | 608 | 612 | 615 | 624 | 633 | 636 | 639 |
| USA/Colorado/2013 (KF272920) | G | H | G | H | - | - | G | K | D | E | G | F | K | K | E | T |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC0/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/TLAX/IN-DMZC3/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | M |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC5/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC6/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/SLP/IN-DMZC9/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC10/2015 | D | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC11/2015 | . | . | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC12/2015 | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | L | . | T | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC14-2/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | E | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC16/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | K |
| vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015 | . | . | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | V | M |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC20/2015 | . | . | . | . | . | . | . | N | . | A | . | . | . | . | . | M |
| vDEP/MEX/VER/IN-DMZC22/2015 | . | R | . | . | . | . | . | H | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2015 | . | . | . | . | . | . | . | N | . | A | . | . | . | . | . | M |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC25/2015 | . | . | A | . | . | . | . | N | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC44/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | D | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/GRO/IN-DMZC45/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC48/2016 | . | R | . | . | . | . | . | . | Y | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/GRO/IN-DMZC49/2016 | . | R | . | . | S | Q | . | . | Y | . | . | . | . | . | . | . |

Figura 13. Sitios de cambios dentro de la región COE, con base en la secuencia de referencia USA/Colorado/2013.

Epítotos SS2, SS6 y 2C10

Con base en la cepa de referencia Usa/Colorado/2013, los epítotos SS2 y 2C10, con 8 aminoácidos (YSNIGVCK) y 7 aminoácidos (GPRLQPY), respectivamente, no presentaron ninguna sustitución en las secuencias analizadas (Figura 14). El epítoto SS6 (SQSGQVKI), sólo mostró una sustitución de una serina (S) a una fenilalanina (F), en la posición 767 de la secuencia (vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC5/2014).

| Cepa | SS2 | | | | | | | | SS6 | | | | | | | | 2C10 | | | | | | | |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | 751 | 752 | 753 | 754 | 755 | 756 | 757 | 758 | 767 | 768 | 769 | 770 | 771 | 772 | 773 | 774 | 1371 | 1372 | 1373 | 1374 | 1375 | 1376 | 1377 | |
| USA/Colorado/2013 (KF272920) | Y | S | H | I | G | V | C | K | S | Q | S | G | Q | V | K | I | G | P | R | L | Q | P | Y | |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC0/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/TLAX/IN-DMZC3/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC5/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | F | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC6/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/SLP/IN-DMZC9/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC10/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC11/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC12/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC14-2/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC16/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC20/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/VER/IN-DMZC22/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/SON/IN-DMZC23/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC25/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC44/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/GRO/IN-DMZC45/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC48/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |
| vDEP/MEX/GRO/IN-DMZC49/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | |

Figura 14. Sitios de cambios dentro de los epítotos SS2, SS6 y 2C10, en relación con la secuencia de referencia USA/Colorado/2013.

Análisis del gen ORF3

El análisis filogenético del ORF3 demostró que todas las secuencias encontradas en el presente trabajo, se ubican dentro del cluster 1-1 (Figura 15), junto con la mayoría de las cepas de referencia del tipo Indel-S y del tipo no Indel-S, de diversos países, usadas en el presente estudio. El alineamiento de los 224 aminoácidos demostró cuatro sustituciones con base en las cepas de referencia usadas en este estudio (Anexo 1). La secuencia vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC11/2015 presentó dos sustituciones de aminoácidos, una en la posición 71 de una metionina (M) a una leucina (L), y otra en la posición 144 de una isoleucina (I) a una treonina (T); la secuencia vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC6/2014 tuvo una sustitución en la posición 136, de una alanina (A) a una valina (V). Por último, en la posición 139 la sustitución fue de una tirosina (Y) a una fenilalanina (F) en la secuencia vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC5/2014.



Figura 15. Análisis filogenético del gen ORF3 de las secuencias vDEP/IN-DMZC, junto con las cepas de referencia. El árbol se construyó con el método Neighbor-Joining, usando un bootstrap de 1000 repeticiones, con MEGA7.

Análisis del gen Envoltura

El análisis filogenético realizado para el gen de envoltura nos lanza dos grupos dentro del árbol (figura 16), en donde se puede apreciar que las 20 secuencias encontradas en este estudio se ubican en el grupo II, junto con todas las cepas emergentes de referencia, de los diferentes países. En la alineación de las secuencias de aminoácidos se encontró que la secuencia vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC25/2015 presentó una sustitución en la posición 39, de una fenilalanina (F) a una valina (V).

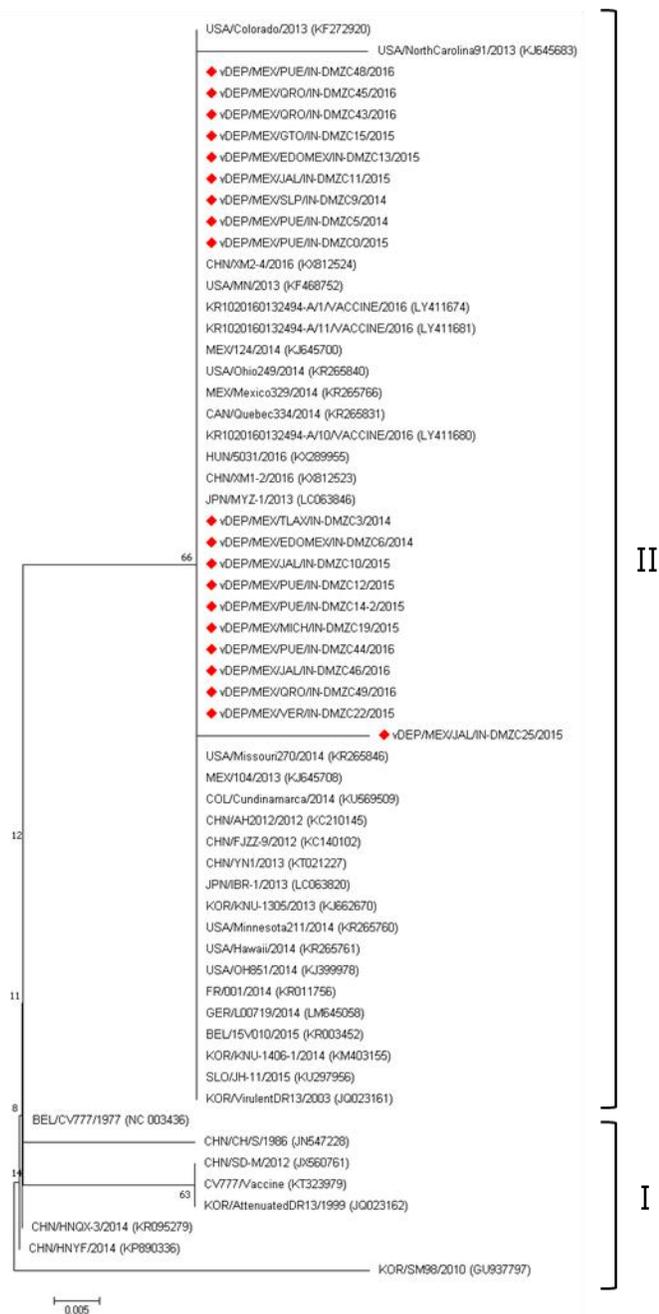


Figura 16. Análisis filogenético del gen de envoltura de las secuencias vDEP/IN-DMZC (rombos rojos), junto con las cepas de referencia. El árbol filogenético se construyó con el método Neighbor-Joining, usando un bootstrap de 1000 repeticiones, con MEGA7.

Análisis del gen Membrana

El análisis del gen de membrana y la construcción del árbol filogenético, indican que éste se divide en dos grandes grupos (I y II), y cada uno de estos en dos subgrupos (Ia, Ib y IIa, IIb) (Figura 17). Las 19 secuencias obtenidas en este trabajo se encuentran en el grupo I, 18 de ellas en el subgrupo Ia y una en el subgrupo Ib. El alineamiento de aminoácidos demostró dos sitios de sustitución, uno en la posición 54 de una isoleucina (I) a una treonina (T) en la secuencia vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015, con relación a todas las cepas de referencia. La secuencia vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC10/2015 presentó una sustitución en la posición 42, de una alanina (A) a una valina (V), con respecto a las cepas de referencia emergentes. Las cepas de referencia clásicas presentan en esta posición una valina (V).

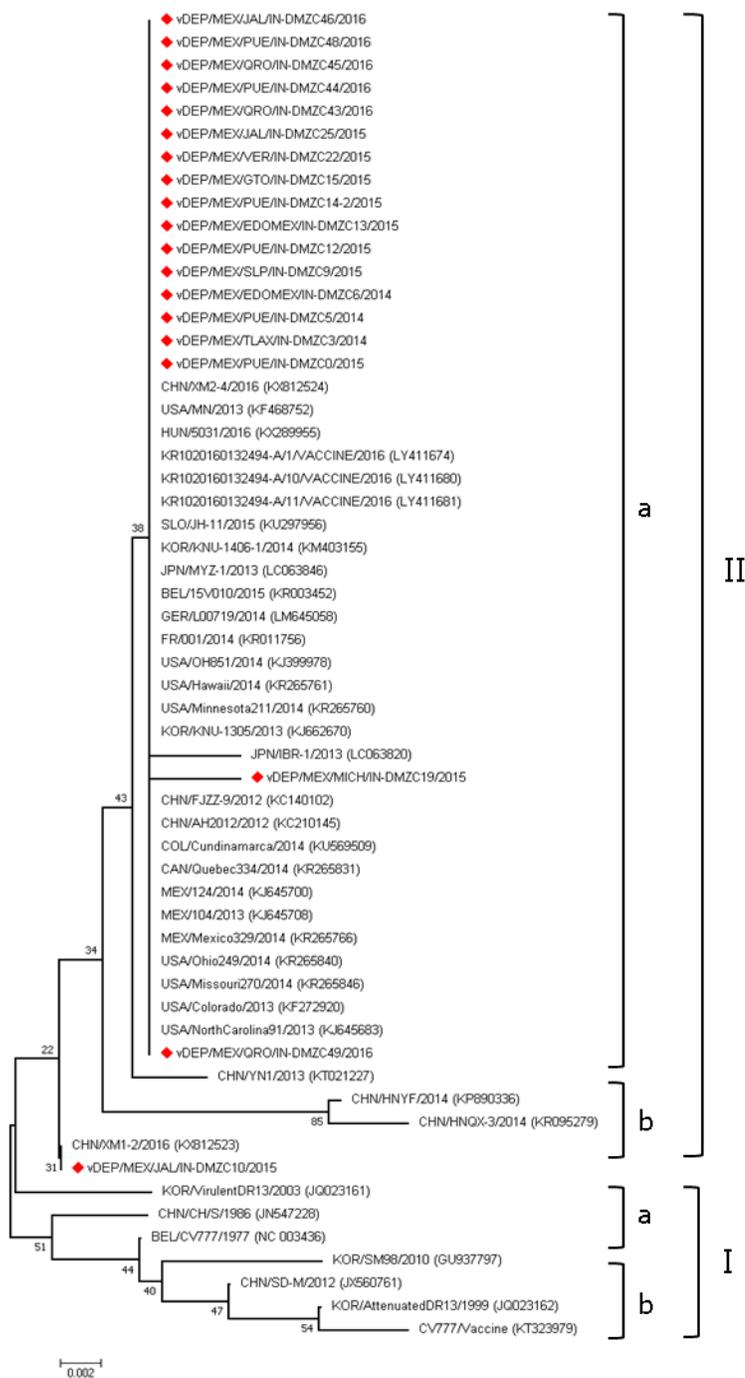


Figura 17. Análisis filogenético del gen de membrana de las secuencias vDEP/IN-DMZC (rombos rojos) y su relación con las cepas de referencia. El árbol filogenético se construyó con el método Neighbor-Joining, usando un bootstrap de 1000 repeticiones, con MEGA7.

Análisis del gen Nucleocápside

El análisis del gen de la nucleocápside y la construcción del árbol filogenético, indican que éste se divide en dos grandes grupos (I y II), y cada uno estos en dos subgrupos (Ia, Ib y IIa, IIb), respectivamente (Figura 18). De las 18 secuencias encontradas, 16 se sitúan en el subgrupo IIa, mientras que una (vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC13/2015) en el subgrupo IIb, y otra más (vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC14-2/2015) fuera de ambos grupos cerca de la cepa atenuada KOR/VirulentDR13/2003 (JQ023161).

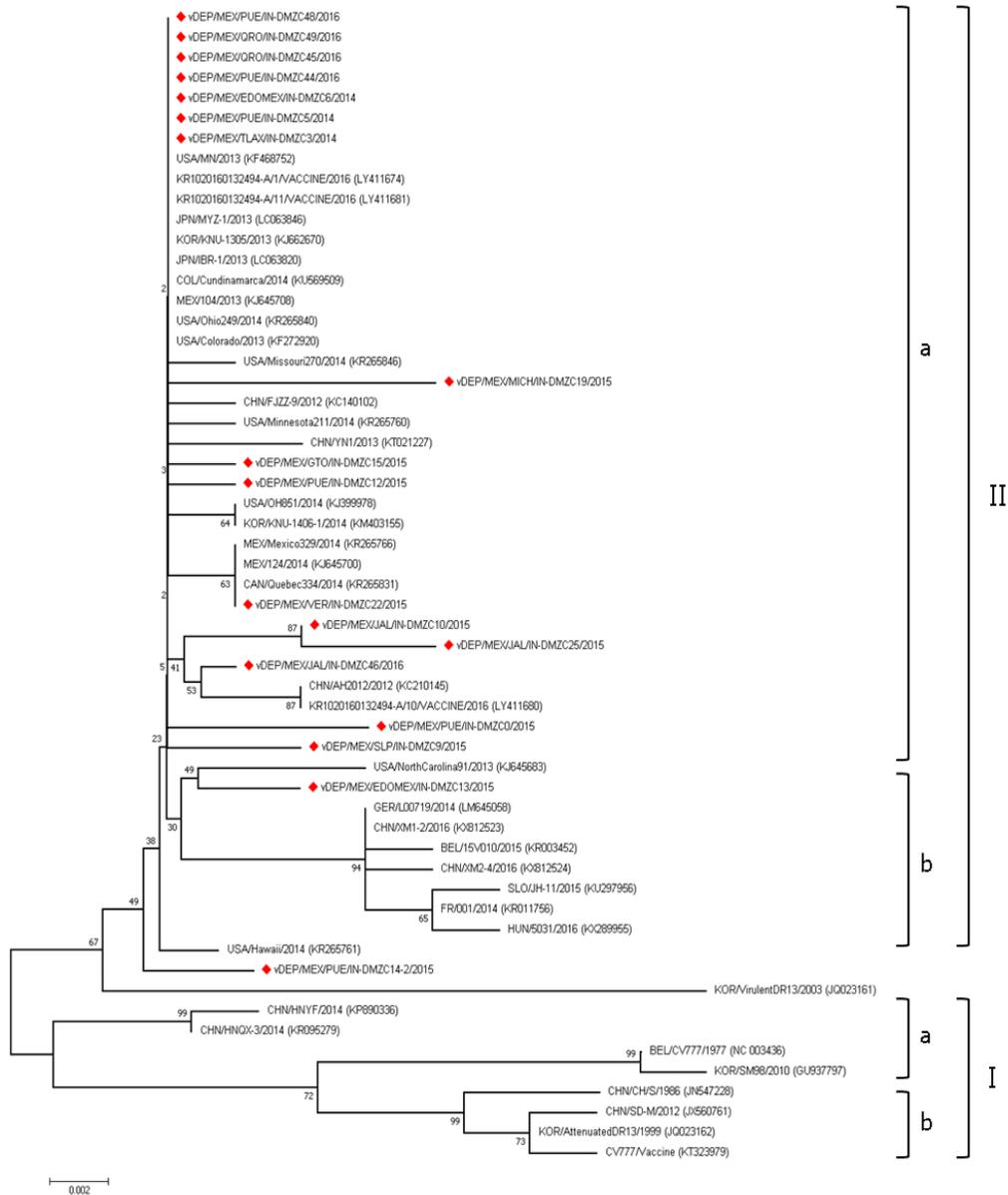


Figura 18. Análisis filogenético del gen de la nucleocápside de las secuencias vDEP/IN-DMZC (rombos rojos), junto con las cepas de referencia. El árbol se construyó con el método Neighbor-Joining, usando un bootstrap de 1000 repeticiones, con MEGA7.

El alineamiento de aminoácidos codificados por el gen de la nucleocápside demostró que habían 21 sitios de sustitución de aminoácidos (figura 19), con respecto a la secuencia de referencia USA/Colorado/2013. La secuencia

vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC0/2015, presentó tres sustituciones (Q126L, S149G y K380I), y de éstas la isoleucina (I) en la posición 380 se encuentra presente en las cepas clásicas atenuadas de referencia (Anexo 1). La secuencia vDEP/MEX/SLP/IN-DMZC9/2015 presentó dos sustituciones, una isoleucina (I) en lugar de una serina (S) en la posición 13, y una alanina (A) en lugar de una treonina (T) en la posición 428. En la posición 145 se observó la sustitución de una alanina (A) por una valina (V), y en la posición 256 la sustitución de una serina (S) por una asparagina (N) en las secuencias vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC10/2015 y vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC25/2015. En esta última secuencia se observaron otras dos sustituciones de aminoácidos, una asparagina (N) en la posición 8 en lugar de un ácido aspártico (D), y una fenilalanina (F) en lugar de una leucina (L) en la posición 367. Otra secuencia que presentó cuatro sustituciones fue la vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015, de un ácido aspártico (D) a un ácido glutámico (E) en la posición 228, de una isoleucina (I) a una valina (V) en la posición 235, de una prolina (P) a una serina (S) en la posición 248 y en la 413 de una treonina (T) a una asparagina (N).

| Cepa | 8 | 72 | 126 | 130 | 145 | 149 | 162 | 178 | 183 | 188 | 204 | 228 | 235 | 237 | 241 | 248 | 256 | 367 | 380 | 413 | 428 |
|--------------------------------|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| USA/Colorado/2013 (KF272920) | D | N | Q | S | A | S | P | R | G | Q | S | D | I | E | K | P | S | L | K | T | T |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC0/2015 | . | . | L | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | I | . | . |
| vDEP/MEX/TLAX/IN-DMZC3/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC5/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC6/2014 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/SLP/IN-DMZC9/2015 | . | . | . | I | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC10/2015 | . | . | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | N | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC12/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | D | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/EDOMEX/IN-DMZC13/2015 | . | K | . | . | . | . | . | . | . | L | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC14-2/2015 | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015 | . | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/MICH/IN-DMZC19/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | E | V | . | . | S | . | . | . | N | . |
| vDEP/MEX/VER/IN-DMZC22/2015 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | P | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC25/2015 | N | . | . | . | V | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | N | F | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC44/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC45/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/JAL/IN-DMZC46/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC48/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |

Figura 19. Sitios de sustitución de aminoácidos de las secuencias vDEP/IN-DMZC del gen de la nucleocápside, con respecto a la cepa de referencia USA/Colorado/2013.

DISCUSIÓN

Las gastroenteritis causadas por agentes virales en las producciones porcinas han tomado mucha importancia los últimos años, debido a las grandes pérdidas económicas que representan para el sector (Paarlberg 2014; Lee 2015; Furutani *et al.* 2017). Dentro de los agentes con mayor importancia se encuentra el vDEP, al cual desde su ingreso en la República Mexicana en 2013 (OIE 2014), se le ha prestado gran atención debido a que provoca alta morbilidad y mortalidad (Lin *et al.* 2016; Lee *et al.* 2017). Al ser un virus emergente, y debido a sus altas tasas de mutación, se ha dificultado su control o erradicación, lo cual ha provocado rebrotes en las producciones porcinas, aún después de controlarse por un tiempo la enfermedad (Sun *et al.* 2015b; Piñeros *et al.* 2015; Hanke *et al.* 2017; Van Diep *et al.* 2018).

En el presente estudio, se utilizaron muestras de intestino delgado y heces de lechones, ubicados en granjas de tipo semi-tecnificadas y tecnificadas de 17 estados de la República Mexicana. El mayor porcentaje de detección de vDEP fue en muestras de intestino (82.97%), y un menor porcentaje de detección en muestras de heces (66.66%). Es probable que la etapa de la enfermedad durante la que se tomaron las muestras, el manejo y almacenamiento o transporte de los especímenes hayan influido en las diferencias de detección del vDEP identificadas (Jung & Chae 2004; Zimmerman *et al.* 2013). Otra explicación a éste hecho puede ser la presencia de algún factor inhibidor de la reacción de RT-PCRq presente en las heces (Martínez & Silva 2004; Hoxhaj 2017).

El ingreso de un virus a un país y que afecta la producción animal es un problema serio. Su eliminación se vuelve difícil, y a veces hasta imposible, por lo que la enfermedad causada se vuelve endémica (Choi *et al.* 2014; Lee 2015; Lv *et al.* 2016). En México se han informado diferentes prevalencias del agente etiológico. La OIE, por parte de SENASICA, reportó una prevalencia del 30%, en el periodo comprendido entre agosto de 2013 a mayo de 2014 (OIE 2014). En otro estudio, realizado del 2013 al 2016, se reportó un 88.8% de muestras positivas al vDEP

(Lara-Romero *et al.* 2017). En el presente estudio, se encontró una prevalencia del 77.94% del vDEP, identificado en 15 (46.87%) de los 32 estados de la República Mexicana, sumándose los estados de Hidalgo, Oaxaca y San Luis Potosí a los estados con presencia del virus reportados previamente (OIE 2014; Lara-Romero *et al.* 2017). La prevalencia en otros países es muy variada; en Corea se encontró una prevalencia de 26.3% entre enero del 2004 y mayo de 2005 (D. S. Song *et al.* 2006), en China las prevalencias reportadas van de 61.10 a 78.49% entre febrero del 2011 al marzo del 2014 (Sun *et al.* 2016).

La proteína S de los coronavirus, es una glicoproteína de membrana tipo I que interactúa con los receptores de la célula durante la entrada del virus (Gallagher & Buchmeier 2001; Bosch *et al.* 2003; Li *et al.* 2017). El gen que codifica para esta proteína es el más usado para realizar la caracterización genética del virus (Hulswit *et al.* 2016; Li *et al.* 2017). Se han descrito diferentes genotipos del gen de la proteína S basados en sus características genéticas y en los periodos en los que han emergido: GIa (clásicas), GIb (emergentes Indel-S), GIIa (emergentes No Indel-S americanas) y GIIb (emergentes No Indel-S asiáticas) (Lee 2015; Jarvis *et al.* 2016b; Vlasova *et al.* 2014). En México estudios anteriores han identificado cepas circulantes de los genotipos GII (americanas), así como cepas del genotipo GI (Indel-S) (Trujillo-Ortega *et al.* 2016; Lara-Romero *et al.* 2017). En el presente trabajo las 20 secuencias encontradas se ubican dentro del genotipo GIIa como las cepas emergentes americanas y asiáticas (Lee 2015; Barrera *et al.* 2017). Sin embargo, las secuencias encontradas en Jalisco (IN-DMZC10, IN-DMZC11 y IN-DMZC25) y en Michoacán (IN-DMZC19), se ubican en un cluster junto con cepas emergentes de Japón, Corea y China, mientras que las secuencias restantes, se ubican en un cluster con las cepas americanas. Por lo anterior, es probable que el origen de las cepas circulantes en la República Mexicana derive de diferentes países.

Se ha descrito que el porcentaje de similitud del gen S, entre las cepas del virus clásicas y emergentes, va del 96-98%. Dentro del cluster de las cepas de Estados

Unidos la similitud es mayor (99.33-99.61%), con respecto a las cepas emergentes de China (98.10-99.50%) (Lin *et al.* 2016). En el presente estudio se pudo observar que la similitud de las secuencias encontradas en la República Mexicana con respecto a las cepas emergentes americanas es del 99.35-99.95%. En otro estudio donde se secuenció la región S1, de cuatro muestras procedentes del Estado de México, encontraron una similitud del 99%, con respecto a cepas emergentes (Trujillo-Ortega *et al.* 2016). Las secuencias del presente estudio presentan una similitud del 95-95.93% con las cepas Indel-S emergentes, y de 92.75-93.26% con las cepas de referencia clásicas. Estos resultados coinciden con las similitudes encontradas (99.1-99.8%), con cepas emergentes no Indel-S de Filipinas (Kwan *et al.* 2016), mientras que en Taiwán, las cepas presentaron una similitud entre el 94.4-99.9% (Temeeyasen *et al.* 2014), y en China se reportaron en un rango del 99.7-99.8% (Chiou *et al.* 2017).

La proteína S presenta varias regiones que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, aunque hay variabilidad alta respecto entre las cepas virales (Sun *et al.* 2014; Lin *et al.* 2016; Chen *et al.* 2017). Los epítomos neutralizantes de la proteína S son SS2 (posición de aminoácidos descrita, 748-755), SS6 (posición de aminoácidos descrita, 764-771) (Sun *et al.* 2008), y 2C10 (posición de aminoácidos descrita, 1368-1374) (Cruz *et al.* 2006). En el presente estudio, se realizó la comparación con la cepa de referencia USA/Colorado/2013, ya que la similitud era mayor con el genogrupo GI1a (figura 9). Dentro del análisis se obtuvo la posición de los epítomos, ⁷⁵¹YSNIGVCK⁷⁵⁸, ⁷⁶⁷SQSGQVKI⁷⁷⁴ y ¹³⁷¹GPRLQPY¹³⁷⁷ (SS2, SS6 y 2C10, respectivamente). Asimismo, se pudo observar que las 20 secuencias analizadas no presentaban cambios en los epítomos SS2 y 2C10, mientras una cepa de Puebla, del año 2014 (IN-DMZC5) tiene una mutación L/S₇₆₇F en el epítomo SS6, una posición que se ha descrito con mutaciones en diferentes cepas (Hao *et al.* 2014; Sato *et al.* 2018).

Por otra parte, el dominio de unión al receptor (o región COE), que se describió dentro de la posición 499-638 (Chang *et al.* 2002), nosotros lo encontramos entre

la posición del aminoácido 502 al 641. Se observaron un total de 13 sustituciones de aminoácidos en las 20 secuencias analizadas en el presente trabajo. En un estudio previo se describieron 7 cambios de aminoácidos en diferentes cepas virulentas, comparadas con la cepa de referencia CV777 (Wang *et al.* 2016). Recientemente, en México se encontraron 11 sustituciones en 7 cepas diferentes (Lara-Romero *et al.* 2017), una de estas sustituciones (H₅₂₄R) fue en una cepa de Sonora. Las sustituciones identificadas en el presente trabajo fueron en las cepas de Puebla, Veracruz y Querétaro. Se han descrito cambios de aminoácidos entre las cepas clásicas (GI) en comparación con las cepas virulentas del genogrupo GII en la región COE (Sato *et al.* 2018). Los datos mencionados sugieren que las variaciones antigénicas entre los diferentes grupos de cepas está dada por los cambios de 8 a 11 aminoácidos en este epítipo neutralizante (Kang *et al.* 2005; Lin *et al.* 2016). Las secuencias del epítipo COE estudiadas en el presente trabajo presentaron la sustitución de las tres serinas (A₅₂₂S, A₅₅₄S y G₅₉₉S) mismas que se han descrito en las cepas emergentes globales, así como las dos del epítipo SS6 (L₇₆₇S y D₇₆₉S). Estas sustituciones de aminoácidos se han descrito como sitios de fosforilación por la presencia de la serina (Hao *et al.* 2014; Chiou *et al.* 2017; Van Diep *et al.* 2018), las cuales suelen ser modificaciones post-traduccionales reversibles, que pueden regular la estabilidad y actividad de una proteína viral, así como las interacciones con otras proteínas celulares y virales (Keating & Striker 2012). En el presente estudio fue identificada la inserción de dos aminoácidos ⁵³⁷SQ⁵³⁸ en la región COE, en la cepa vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2016, esta inserción pudiera estarle confiriendo a la proteína S diferente actividad biológica.

La proteína no estructural ORF3, juega un papel importante durante la unión y ensamblado del virus, así como en la infectividad y patogenicidad viral (Sung *et al.* 2015; Wang *et al.* 2012). Se ha descrito que la similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF3 entre las cepas es de 93.7-100% (Temeeyasen *et al.* 2014; Sun *et al.* 2014). En el presente trabajo encontramos una similitud con las cepas de referencia globales emergentes del 99.1-100%. Estos resultados podrían ser

explicados con base en que ORF3 es un gen relativamente conservado (Temeeyasen *et al.* 2014; Kwan *et al.* 2016; Wang *et al.* 2016). Se han descrito varias cepas que presentan deleciones de aminoácidos dentro del ORF3, lo que las hace tener característica de cepa atenuada (Suzuki *et al.* 2015; Kwan *et al.* 2016); sin embargo, las cepas incluidas en nuestro estudio corresponden en identidad a cepas virulentas.

La proteína de envoltura tiene varias funciones dentro de la replicación viral, incluyendo el ensamblado del virus, la interacción con proteínas de la célula huésped y la activación de los canales de iones (Weiss & Leibowitz 2011; Sung *et al.* 2015). Se ha descrito una similitud del 98.7-100% entre las diferentes cepas de los diferentes países (Fan *et al.* 2017), lo cual corresponde con los resultados del presente estudio ya que la similitud con las cepas globales de referencia fue del 100% (Anexo 1). En una cepa encontramos la sustitución de un aminoácido, derivando en una similitud del 98.68%.

La proteína de membrana es el componente más abundante en la envoltura viral y desempeña un papel importante en el ensamblado viral. También induce la formación de anticuerpos neutralizantes (Shenyang *et al.* 2007; Song & Park 2012). La similitud de la secuencia del gen M entre diferentes cepas es del 96.6 al 100% (Jinghui & Yijing 2005; Fan *et al.* 2012; Fan *et al.* 2017). En las secuencias analizadas en nuestro estudio se encontró una similitud del 98.67-100% con respecto a las cepas globales emergentes usadas. Adicionalmente, encontramos que 18 de las cepas son del subgrupo Ia, mientras que la cepa vDEP/MEX/PUE/IN-DMZC10/2015 sería del subgrupo Ib, junto con algunas cepas Chinas (Kim *et al.* 2015). El epítipo conservado ¹⁹⁵WAFYVR²⁰⁰ la proteína de membrana (Zhang *et al.* 2012), también se encontró conservado en todas las secuencias analizadas en nuestro estudio.

La proteína nucleocápside es una fosfoproteína básica asociada al genoma del virus, al cual le provee estabilidad, tiene actividad en el ensamblaje viral y juega un papel importante en la transcripción y replicación del virus (Compans *et al.* 2005;

Woo *et al.* 2010; Grunewald *et al.* 2017). Su gen es altamente conservado; la homología en la secuencia de los aminoácidos codificados es del 94.8-100% (Li *et al.* 2013). En cepas Japonesas del vDEP encontraron una similitud del 98.72-100% con cepas emergentes americanas (Van Diep *et al.* 2018). En el presente trabajo encontramos una similitud entre las cepas estudiadas del 99.09-100% con respecto a la cepa de referencia emergente americana (USA/Colorado/2013). Las mutaciones encontradas en algunas cepas del presente estudio, como la IN-DMZC15 (P₁₆₂S), la IN-DMZC19 (P₂₄₈S) y la IN-DMZC46 (G₁₈₃S) pudieran sugerirnos una mayor fosforilación de la nucleocápside, que a su vez tendría influencia en los procesos de transcripción y replicación del virus (Grunewald *et al.* 2017; Van Diep *et al.* 2018),.

CONCLUSIONES

- En el presente estudio se logró determinar la presencia del virus de la diarrea epidémica porcina en 15 estados de la República Mexicana: Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tlaxcala, Veracruz. La frecuencia fue del 77.94%.
- Se realizó la estandarización de la prueba RT-PCR punto final, dirigida al gen S (4,821pb) y para los últimos genes del genoma del virus (ORF3, E, M, N; 2,829pb), logrando la amplificación de 28 muestras provenientes de 10 estados: Estado de México (3), Guanajuato (1), Jalisco (4), Michoacán (1), Puebla (10), Querétaro (4), San Luis Potosí (2), Sonora (1), Tlaxcala (1) y Veracruz (1).
- Se obtuvieron 20 secuencias completas de cada uno de los siguientes genes: spike, ORF3 y de envoltura; 19 del gen de membrana y 18 del gen de la nucleocápside.
- Se obtuvo la caracterización genética, a partir del gen spike, de las 20 secuencias encontradas, ubicándolas dentro del genogrupo GIIa, que corresponde a las cepas emergentes No Indel-S. Las muestras analizadas provinieron del Estado de México, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tlaxcala y Veracruz.
- Se pudo apreciar la separación de dos pequeños grupos de cepas en clados diferentes. Un grupo incluye las cepas de Michoacán, Estado de México, Guanajuato, Querétaro y Puebla; el otro grupo está conformado por las cepas de Sonora, Tlaxcala, San Luis Potosí, Veracruz, Jalisco y cinco de Puebla. Una sola cepa de Puebla se encontró separada de los dos grupos anteriores.

- Se pudo observar una similitud del 98.82-99.98% entre las cepas circulantes en la República Mexicana; con respecto a las cepas emergentes americanas la similitud encontrada fue del 99.35-99.95%, con las cepas Indel-S de 95-95.93% y con las clásicas de 92.75-93.26%.
- Tres cepas presentaron inserciones: las cepas vDEP/MEX/GTO/IN-DMZC15/2015 y vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC45/2016 de un aminoácido (⁴²⁴Y⁴²⁵, ⁴⁴⁷D⁴⁴⁸, respectivamente), y la cepa vDEP/MEX/QRO/IN-DMZC49/2019 de dos aminoácidos (⁵³⁷SQ⁵³⁸), dentro de la región COE.

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| °C | Grados Celsius |
| µl | Microlitros |
| µM | Micromolar |
| A | Adenina |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| APN | Aminopeptidasa N |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| AV | Aislamiento viral |
| BLAST | Basic local alignment search tool |
| ct | Threshold point; Ciclo umbral |
| C | Citosina |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| COE | Dominio de unión al receptor |
| ddNTP | Didesoxinucleótidos |
| DEP | Diarrea epidémica porcina |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate; Pirocarbonato de dietilo |
| DMZC | Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos |
| dNTPs | Desoxinucleótidos trifosfatados |
| E | Envoltura |
| EDOMEX | Estado de México |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| <i>Et al</i> | y otros |
| FMVZ | Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia |
| G | Guanina |
| GI | Genogrupo 1 |
| Gla | Genogrupo 1a |
| Glb | Genogrupo 1b |
| GII | Genogrupo 2 |

| | |
|----------------|--|
| GIIa | Genogrupo 2a |
| GIIb | Genogrupo 2b |
| GTO | Guanajuato |
| h | Horas |
| HCoV | Human coronavirus; Coronavirus humano |
| HE | Hemaglutinina esterasa |
| ICVT | International committee on taxonomy of viruses; Comité internacional de taxonomía de virus |
| IDT | Integrated DNA technologies |
| IF | Inmunofluorescencia |
| Indel-S | Inserción y deleción en el gen spike |
| IN-DMZC | Investigación Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos |
| JAL | Jalisco |
| kb | kilobases |
| kDa | Kilo daltones |
| M | Membrana |
| MEGA | Molecular evolutionary genetics analysis |
| MEX | México |
| mg | Miligramos |
| MICH | Michoacán |
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| MPM | Marcador de peso molecular |
| N | Nucleocápside |
| NCBI | National center for biotechnology information |
| ng | Nanogramos |
| nm | Nanómetros |
| NSPs | Proteínas no estructurales |
| OIE | Organización mundial de sanidad animal |

| | |
|----------------|--|
| ORF | Open reading frame; Marco abierto de lectura |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Solución buferada de fosfatos |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PEDV | Porcine diarrhea epidemic virus |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| pp1a | Poliproteína 1a |
| pp1b | Poliproteína 1b |
| PUE | Puebla |
| QRO | Querétaro |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT | Transcriptasa reversa |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa |
| RT-PCRq | Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa en tiempo real |
| s | Segundos |
| S | Spike |
| S1 | Dominio spike 1 |
| S2 | Dominio spike 2 |
| SARS | Severe acute respiratory síndrome; Síndrome respiratorio agudo grave |
| SLP | San Luis Potosí |
| SON | Sonora |
| T | Timina |
| TAE | Tris-acetato-EDTA |
| Taq | Thermus aquaticus |
| TLAX | Tlaxcala |
| Tm | Temperatura de fusión del DNA |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |
| USA | The United States of America; Estados Unidos de América |

| | |
|-------------|---|
| UTR | Untranslated region; Regiones no traducidas |
| vDEP | Virus de la diarrea epidémica porcina |
| VER | Veracruz |
| vGET | Virus de la gastroenteritis transmissible |

BIBLIOGRAFIA

- Akimkin, V. et al., 2016. New chimeric porcine coronavirus in Swine Feces, Germany, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), pp.1314–1315.
- Aksyonov, S.A. et al., 2006. Multiplexed DNA sequencing-by-synthesis. *Analytical Biochemistry*, 348(1), pp.127–138.
- Annamalai, T. et al., 2015. Veterinary Immunology and Immunopathology Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 168(3–4), pp.193–202. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.09.006>.
- Barrera, M. et al., 2017. Tracking the Origin and Deciphering the Phylogenetic Relationship of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Ecuador. *BioMed Research International*, 2017, pp.1–7. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2978718/>.
- Boniotti, M.B. et al., 2016. Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 22(1), pp.83–87.
- Bosch, B.J. et al., 2003. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. , 77(16), pp.8801–8811.
- Carrilho, E., 2015. A review of DNA sequencing techniques A review of DNA sequencing techniques. , 2(August), pp.169–200.
- Chang, S.-H. et al., 2002. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Molecules and cells*, 14(2), pp.295–299.
- Chen, F. et al., 2015. Comparative genomic analysis of classical and variant virulent parental/attenuated strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Viruses*, 7(10), pp.5525–5538.
- Chen, J., Wang, C. & Shi, H., 2010. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. , pp.1471–1476.
- Chen, Q. et al., 2014. Isolation and Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses Associated with the 2013 Disease Outbreak among Swine in the. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, pp.234–243.
- Chen, Q. et al., 2017. Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets. , (2016), pp.1107–1121.
- Chen, Y. et al., 2014. Infection , Genetics and Evolution Characterization of the

- porcine epidemic diarrhea virus codon usage bias. *INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION*, 28, pp.95–100. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.004>.
- Chiou, H.Y. et al., 2017. Phylogenetic Analysis of the Spike (S) Gene of the New Variants of Porcine Epidemic Diarrhoea Virus in Taiwan. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(1), pp.157–166.
- Choi, J. et al., 2014. Infection , Genetics and Evolution Comparative genome analysis and molecular epidemiology of the reemerging porcine epidemic diarrhea virus strains isolated in Korea. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, pp.348–351. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.06.005>.
- Chung, H. et al., 2016. New emergence pattern with variant porcine epidemic diarrhea viruses , South Korea , 2012 – 2015. *Virus Research*, 226(October 2012), pp.14–19. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.06.013>.
- Compans, R.W. et al., 2005. *Coronavirus Replication and Reverse Genetics*,
- Cruz, D.J.M., Kim, C. & Shin, H., 2006. Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes. , 354, pp.28–34.
- De, R. et al., 2004. Secuenciación De Ácidos Nucleicos. , p.9. Available at: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf.
- Van Diep, N. et al., 2018. Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013-2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks. *BMC Veterinary Research*, 14(1), pp.1–12.
- Fan, B. et al., 2017. Characterization of Chinese Porcine Epidemic Diarrhea Virus with Novel Insertions and Deletions in Genome. *Nature Publishing Group*, pp.1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44209>.
- Fan, J.-H., Zou, Y.-Z. & Li, J.-H., 2012. Heterogeneity in membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in China. *Virus Genes*, (45), pp.113–117.
- Furutani, A. et al., 2017. Impact of porcine epidemic diarrhea on herd and individual Berkshire sow productivity. *Animal Reproduction Science*, 183(January), pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.013>.
- Gallagher, T.M. & Buchmeier, M.J., 2001. MINIREVIEW Coronavirus Spike Proteins in Viral Entry and Pathogenesis. , 374, pp.371–374.
- Geiger, J.O. & Connor, J.F., 2013. Porcine Epidemic Diarrhea , Diagnosis , and Elimination. , pp.1–4.

- Gerds, V. & Zakhartchouk, A., 2017. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 206, pp.45–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.029>.
- Grasland, B. et al., 2015. Complete Genome Sequence of a Porcine Epidemic Diarrhea S Gene Indel Strain Isolated in France in December 2014. , 3(3), pp.2014–2015.
- Grunewald, M.E. et al., 2017. The coronavirus nucleocapsid protein is ADP-ribosylated. *Virology*, (November), pp.0–1. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.020>.
- de Haan, C. a M. et al., 2008. Cleavage of group 1 coronavirus spike proteins: how furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation. *Journal of virology*, 82(12), pp.6078–6083. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2395124&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Hanke, D. et al., 2015. Comparison of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21(3), pp.493–496.
- Hanke, D. et al., 2017. Porcine epidemic diarrhea in europe: In-detail analyses of disease dynamics and molecular epidemiology. *Viruses*, 9(7).
- Hao, J., Xue, C. & He, L., 2014. Bioinformatics insight into the spike glycoprotein gene of field porcine epidemic diarrhea strains during 2011 – 2013 in Guangdong , China. , pp.58–67.
- Hoxhaj, A., 2017. *Optimization and Troubleshooting*,
- Huang, Y.-W. et al., 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio*, 4(5), pp.e00737-13. Available at: <http://mbio.asm.org/cgi/content/long/4/5/e00737-13> [Accessed May 31, 2016].
- Hulswit, R.J.G., de Haan, C.A.M. & Bosch, B.J., 2016. *Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.004>.
- Innis, M.A. & Gelfand, D.H., 1990. OPTIMIZATION OF PCRs. *PCR Protocols*, pp.3–12. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123721808500056>.
- Ion Torrent by Life Technologies, 2011. Ion Torrent Amplicon Sequencing. *Application Note*, pp.1–5. Available at: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf.
- Jarvis, M.C. et al., 2016a. Genomic and evolutionary inferences between American

- and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Preventive Veterinary Medicine*, 123, pp.175–184.
- Jarvis, M.C. et al., 2016b. Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Preventive Veterinary Medicine*, 123, pp.175–184.
- Jinghui, F.A.N. & Yijing, L.I., 2005. Cloning and Sequence Analysis of the M gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus LJB / 03. *Virus Genes*, pp.69–73.
- Jung, K. et al., 2014. Pathology of US Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain PC21A in. , 20(4), pp.1–4.
- Jung, K. & Chae, C., 2004. Effect of temperature on the detection of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Veterinary Diagnostic Investigation*, (16), pp.237–239.
- Jung, K. & Saif, L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection : Etiology , epidemiology , pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal*, 204(2), pp.134–143. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.017>.
- Kang, T. et al., 2005. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expression & Purification*, 41, pp.378–383.
- Keating, J.A. & Striker, R., 2012. Phosphorylation events during viral infections provide potential therapeutic targets. *Reviews in Medical Virology*, 22(3), pp.166–181.
- Kim, O. & Chae, C., 2000. Veterinary Pathology Online.
- Kim, S.-H. et al., 2015. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus in Korea from 1998 to 2013. *Archives of virology*, 160(4), pp.1055–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25666198>.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), p.msw054. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904>.
- Kwan, Y., Cho, K.Y. & Lim, B.A.S., 2016. Molecular characterization of the spike and ORF3 genes of porcine epidemic diarrhea virus in the Philippines. *Archives of Virology*, 161(5), pp.1323–1328.
- Lara-Romero, R. et al., 2017. Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013–2016. *Virus Genes*, 54(2), pp.215–224. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1528-x>.
- Lee, C., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus : An emerging and re-emerging

- epizootic swine virus. *Virology Journal*, pp.1–16. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0421-2>.
- Lee, S. et al., 2017. Genetic characteristics, pathogenicity, and immunogenicity associated with cell adaptation of a virulent genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*, 207(March), pp.248–258. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.019>.
- Lee, S. & Lee, C., 2017. Complete genome sequence of a novel S-insertion variant of porcine epidemic diarrhea virus from South Korea. *Archives of Virology*, (March 2016).
- Li, B.X., Ge, J.W. & Li, Y.J., 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, 365(1), pp.166–172.
- Li, C., Li, W., Lucio de Esesarte, E., Guo, H., Elzen, P. van den, et al., 2017. Cell attachment domains of the PEDV spike protein are key targets of neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, (April).
- Li, C., Li, W., Lucio de Esesarte, E., Guo, H., van den Elzen, P., et al., 2017. Cell Attachment Domains of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein Are Key Targets of Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, 91(12), pp.e00273-17. Available at: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00273-17>.
- Li, R. et al., 2016. Genome sequencing and analysis of a novel recombinant porcine epidemic diarrhea virus strain from Henan, China. *Virus Genes*, 52(1), pp.91–98.
- Li, W. et al., 2017. Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry. *Virus Research*, 235(March), pp.6–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.03.018>.
- Li, Z. et al., 2013. Sequence and phylogenetic analysis of nucleocapsid genes of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strains in China. , pp.1267–1273.
- Lin, C. et al., 2016. Evolution , antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Research*, 226, pp.20–39. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.023>.
- Liu, C. et al., 2015. Receptor Usage and Cell Entry of Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus. *Journal of Virology*, 89(11), pp.6121–6125. Available at: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00430-15>.
- Lv, C. et al., 2016. Porcine epidemic diarrhea virus: current insights. *Virus Adaptation and Treatment*, pp.1–12.
- Madhugiri, R. et al., 2016. *Coronavirus cis-Acting RNA Elements* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.007>.

- Makadiya, N. et al., 2016. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virology Journal*, 13(1), p.57. Available at: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-016-0512-8>.
- Martínez, C. & Silva, E., 2004. Metodos fisico quimicas en biotecnologia. *Analytical chemistry*, 62(13), pp.1202–1214.
- Masters, P.S., 2006. THE MOLECULAR BIOLOGY OF CORONAVIRUSES. *Advances in Virus Research*, 66(06).
- Maxam, A.M. & Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Biochemistry*, 74(2), pp.560–564.
- Nam, E. & Lee, C., 2010. Contribution of the porcine aminopeptidase N (CD13) receptor density to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Veterinary Microbiology*, 144(1–2), pp.41–50. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.024>.
- Oh, J. et al., 2014. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Archives of Virology*, 159(11), pp.2977–2987.
- OIE, 2014. Infección por el Virus de la Diarrea Epidémica Porcina, México. *Ficha Técnica de la OIE*, p.4. Available at: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/informaciones-especificas-y-recomendaciones/porcine-epidemic-diarrhoea/>.
- Ojkic, D. et al., 2015. The first case of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 56(2), pp.149–152.
- Oka, T. et al., 2014. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Veterinary Microbiology*, 173(3–4), pp.258–269. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.012>.
- Paarlberg, P.L., 2014. Updated Estimated Economic Welfare Impacts of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV). , Dept. of A, pp.1–38.
- Park, D.J., 2011. *PCR Protocols* Third.,
- Park, J. & Shin, H., 2014. Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages. *Virus Research*, 191, pp.143–152. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.038>.
- Piñeros, R., Darío, J. & Galvis, M., 2015. Coronavirus en porcinos : importancia y presentación del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 29, pp.73–89. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542015000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

- Quail, M.A. et al., 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13(1), p.1. Available at: BMC Genomics.
- Roche, 2006. PCR Applications Manual. *Evolution*, p.340.
- Sanger, F., 2007. Determination of Nucleotide Sequences in DNA. , 214(4526), pp.1205–1210.
- Sato, T. et al., 2018. Efficacy of genogroup 1 based porcine epidemic diarrhea live vaccine against genogroup 2 field strain in Japan. *Virology Journal*, 15(1), p.28. Available at: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-018-0940-8>.
- Shenyang, G. et al., 2007. High-level prokaryotic expression of envelope exterior of membrane protein of porcine epidemic diarrhea virus. , 123, pp.187–193.
- Shirato, K. et al., 2016. Porcine aminopeptidase N is not a cellular receptor of porcine epidemic diarrhea virus, but promotes its infectivity via aminopeptidase activity. *Journal of General Virology*, 97(10), pp.2528–2539.
- Song, D. et al., 2006. Use of an internal control in a quantitative RT-PCR assay for quantitation of porcine epidemic diarrhea virus shedding in pigs. , 133, pp.27–33.
- Song, D. & Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus : a comprehensive review of molecular epidemiology , diagnosis , and vaccines. , pp.167–175.
- Song, D.S. et al., 2003. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. , 21, pp.1833–1842.
- Song, D.S. et al., 2006. Multiplex Reverse Transcription-PCR for Rapid Differential Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, Transmissible Gastroenteritis Virus, and Porcine Group a Rotavirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, pp.278–281.
- Steinrigl, A. et al., 2015. First detection , clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria. *BMC Veterinary Research*, pp.1–5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0624-1>.
- Stevenson, G.W. et al., 2013. in the United States : clinical signs , lesions , and viral genomic sequences.
- Sun, D. et al., 2016. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China : a mini-review. *Virology*, (2).
- Sun, D. et al., 2008. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. , 131, pp.73–81.

- Sun, M. et al., 2015a. Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of porcine epidemic diarrhea virus in asia. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), pp.1484–1492.
- Sun, M. et al., 2015b. Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of porcine epidemic diarrhea virus in asia. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), pp.1484–1492.
- Sun, R. et al., 2014. Genetic variability and phylogeny of current Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains based on spike, ORF3, and membrane genes. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Sung, M.H. et al., 2015. Evolutionary characterization of the emerging porcine epidemic diarrhea virus worldwide and 2014 epidemic in Taiwan. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, pp.108–115. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.011>.
- Suzuki, T. et al., 2015. Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. *Infection, Genetics and Evolution*, 36(April 2013), pp.363–368. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.017>.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C., 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(5), pp.70–78. Available at: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf>.
- Temeeyasen, G. et al., 2014. Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, pp.205–213. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.001>.
- Trujillo-Ortega, M.E. et al., 2016. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: Case report. *BMC Veterinary Research*, 12(1), pp.8–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0763-z>.
- University of Minnesota, 2013. New rapid semi-quantitative RT-PCR assay developed to detect porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary diagnostic lab*.
- Valkó, A. et al., 2017. PORCINE EPIDEMIC DIARRHOEA VIRUS WITH A RECOMBINANT S GENE DETECTED IN HUNGARY , 2016. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(2), pp.253–261.
- Vlasova, A.N. et al., 2014. Distinct Characteristics and Complex Evolution of PEDV Strains , North America , May 2013-February 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), pp.15–22.

- Walker, J.M., 2013. *PCR Detection of Microbial Pathogens* Second. M. Wilks, ed.,
- Wang, E. et al., 2016. Molecular Characterization of the ORF3 and S1 Genes of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Non S-INDEL Strains in Seven Regions of. , pp.1–15.
- Wang, K. et al., 2012. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. , 586, pp.384–391.
- Wang, L., Byrum, B. & Zhang, Y., 2014. New Variant of Porcine Epidemic Diarrhea Virus , United States , 2014 To the Editor : Porcine epidemic. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), pp.917–919.
- Wang, L., Zhang, Y. & Byrum, B., 2014. Development and evaluation of a duplex real-time RT-PCR for detection and differentiation of virulent and variant strains of porcine epidemic diarrhea viruses from the United States. *Journal of Virological Methods*, 207, pp.154–157. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.005>.
- Weiss, S.R. & Leibowitz, J.L., 2011. *Coronavirus Pathogenesis* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>.
- Woo, P.C.Y. et al., 2010. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. , pp.1804–1820.
- Xu, X. et al., 2013. Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle , induces endoplasmic reticulum stress , and up-regulates interleukin-8 expression. *Veterinary Microbiology*, 164(3–4), pp.212–221. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.034>.
- Zhang, Z. et al., 2012. Identification of a conserved linear B-cell epitope in the M protein of porcine epidemic diarrhea virus. *Virology Journal*, 9(1), p.1. Available at: *Virology Journal*.
- Zhao, P. et al., 2014. Development of a multiplex TaqMan probe-based real-time PCR for discrimination of variant and classical porcine epidemic diarrhea virus. *Journal of Virological Methods*, 206, pp.150–155. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.06.006>.
- Zimmerman, J.J. et al., 2013. *Diseases of Swine*,

ANEXOS

Anexo 1. Cepas de referencia del vDEP

| Tipo de Cepa | Origen | No. Acceso | Nombre Cepa |
|-------------------------------|-----------|------------|--------------------------|
| Emergente No Indel-S (G2, 2b) | USA, 2013 | KF272920 | USA/Colorado/2013 |
| | USA, 2013 | KJ645683 | USA/NorthCarolina91/2013 |
| | USA, 2014 | KR265846 | USA/Missouri270/2014 |
| | USA, 2014 | KR265840 | USA/Ohio249/2014 |
| | MEX, 2014 | KR265766 | MEX/Mexico329/2014 |
| | MEX, 2013 | KJ645708 | MEX/104/2013 |
| | MEX, 2014 | KJ645700 | MEX/124/2014 |
| | CAN, 2014 | KR265831 | CAN/Quebec334/2014 |
| | MEX, 2013 | KY828999 | PEDV/MEX/MICH/01/2013 |
| | MEX, 2014 | KY828992 | PEDV/MEX/SON/01/2014 |
| | MEX, 2014 | KY828993 | PEDV/MEX/JAL/01/2014 |
| | MEX, 2015 | KY828995 | PEDV/MEX/MICH/01/2015 |
| | MEX, 2016 | KY829000 | PEDV/MEX/PUE/01/2016 |
| | MEX, 2016 | KY828994 | PEDV/MEX/GTO/02/2016 |
| | MEX, 2016 | KY828997 | PEDV/MEX/JAL/01/2016 |
| | MEX, 2016 | KY828998 | PEDV/MEX/JAL/03/2016 |
| | COL, 2014 | KU569509 | COL/Cundinamarca/2014 |
| Emergente No Indel-S (G2, 2a) | CHN, 2012 | KC210145 | AH2012 |
| | CHN, 2013 | KF177257 | YJ3F |
| | CHN, 2012 | KC140102 | CH/FJZZ-9/2012 |
| | CHN, 2013 | KT021227 | YN1 |
| | JPN, 2013 | LC063820 | IBR-1/JPN/2013 |
| | KOR, 2013 | KJ662670 | KNU-1305 |
| | KOR, 2008 | KF779469 | MF3809/2008/SouthKorea |
| | KOR, 1999 | AY167585 | Chinju99 |
| EMERGENTES INDEL-S (G1, 1b) | USA, 2014 | KR265760 | USA/Minnesota211/2014 |
| | USA, 2014 | KR265761 | USA/Hawaii/2014 |
| | USA, 2014 | KJ399978 | OH851 |
| | CAN, 2014 | KM196109 | SK-030 |

| | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------------------|
| | MEX, 2014 | KY828991 | PEDV/MEX/VER/01/2015 |
| | MEX, 2015 | KY828996 | PEDV/MEX/MICH/02/2015 |
| | FR, 2014 | KR011756 | FR/001/2014 |
| | GER, 2014 | LM645058 | GER/L00719/2014 |
| | BEL, 2015 | KR003452 | 15V010/BEL/2015 |
| | JPN, 2013 | LC063846 | MYZ-1/JPN/2013 |
| | KOR, 2014 | KM403155 | KNU-1406-1 |
| | SLO, 2015 | KU297956 | SLO/JH-11/2015 |
| Clásicas (G1, 1a) | CHN, 1986 | JN547228 | CH/S |
| | CHN, 2012 | JX560761 | SD-M |
| | KOR, 2003 | JQ023161 | Virulent DR13 |
| | KOR, 1999 | JQ023162 | Attenuated DR13 |
| | BEL, 1977 | NC_003436 | CV777 (PEDv) |
| | | KT323979 | CV777 (Cepa Vacunal) |
| | KOR, 2010 | GU937797 | SM98 |
| | JPN, 2011 | AB548618 | 83P-5 |
| | JPN, 2013 | AB548621 | 83P-5 100th-passaged |
| | CHN, 2013 | AB857235 | GDS03 |
| Vacunales Boehringer | 2016 | LY411681 | KR 1020160132494-A/11 |
| | 2016 | LY411680 | KR 1020160132494-A/10 |
| | 2016 | LY411674 | KR 1020160132494-A/1 |
| Recombinantes | ITA, 2009 | KR061459 | Italy/213306/2009 |
| | CHN, 2014 | KP890336 | CH/HNYF/2014 |
| | HUN, 2016 | KX289955 | HUN/5031/2016 |
| | USA, 2013 | KF468752 | MN |
| | CHN, 2016 | KX812523 | XM1-2 |
| | CHN, 2016 | KX812524 | XM2-4 |
| | CHN, 2014 | KR095279 | CH/HNQX-3/14 |
| PRCV | USA, 2006 | DQ811787 | ISU-1 |
| TGEV | USA, 2006 | DQ811785 | Miller M6 |
| TGEV | USA, 1952 | DQ811789 | Virulent Purdue |
| PDCoV | USA, 2013 | KR265853 | USA/Minnesota/2013 |
| PDCoV | USA, 2014 | KR265865 | USA/Iowa459/2014 |

Cuadro 3. Cepas de referencia del vDEP.

Anexo 2. Comprobación de la RT

A partir de la muestra control IN-DMZC16, se obtuvo la cuantificación de ADN total, de los diferentes procesos durante la estandarización de la RT: ARN purificado, ARN tratado con DNAsas, y ADN complementario producto de la RT, y el ADN producto amplificado de la PCR anidada punto final (protocolo de diagnóstico implementado en el DMZC), obteniendo 37.4, 20.2, 23.6 y >600 ng/μl, respectivamente, esto se puede observar en la figura 20A, donde se aprecia que una vez dado el tratamiento se reduce la concentración del ADN total 17.2 ng/μl, ya realizada la RT se aumenta 2.4 ng/μl, por último, al finalizar el proceso con la PCR, el producto de esta no pudo ser cuantificado por el equipo Qubit®, ya que presentaba una concentración elevada, >600 ng/μl.

Se realizó una PCR anidada con el kit Onestep (Qiagen), omitiendo la RT, para esta se utilizó la muestra obtenida de la RT (Kit: Superscript II, Invitrogen) por duplicado, sin tratamiento con DNAsas y con tratamiento, aquí se logró obtener la amplificación de ambas, para los productos de ambos PCR, esto se puede observar en la siguiente figura 20B.

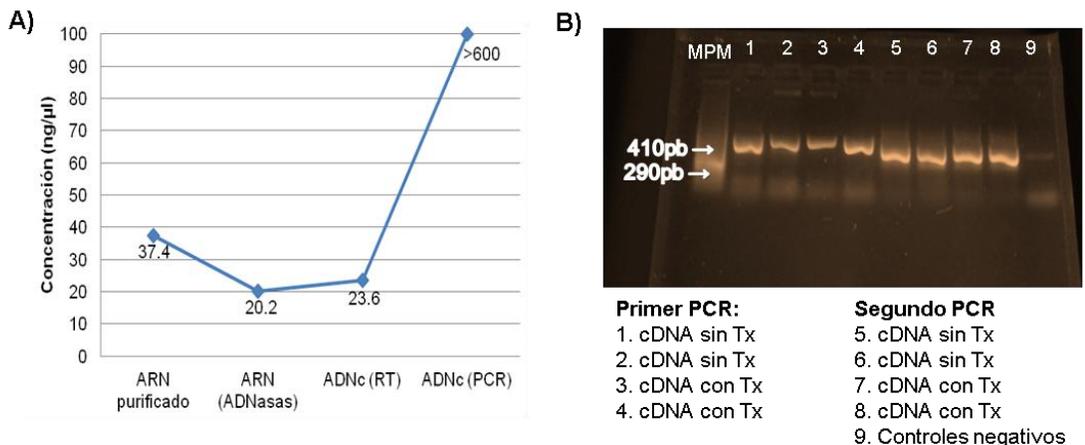


Figura 20. A) Cuantificación de la concentración del ADN total presente en la muestra. **B)** Electroforesis del producto de la PCR anidada.

Anexo 3. Protocolo RT-PCR estandarizado

1) Purificación.

- Kit de extracción QIAmp Viral, Qiagen.

2) Tratamiento con dnasas

(Kit: RQ-1 RNase-Free DNase, Promega)

- Colocar en tubos para PCR, uno por cada muestra:
 - o **1 µg** RNA
 - o **1 µl** RQ1 RNase free DNase 10x buffer
 - o **1 µl** RQ1 RNase free DNase
 - o H₂O DEPC cbp aforar a **10 µl**
- Colocar los tubos en el termociclador 37°C durante 30 minutos.
- Al terminar, adicionar solución stop **1 µl** y colocar nuevamente en el termociclador los tubos a 65°C durante 10 minutos.

3) Transcriptasa Reversa (RT)

(Kit: Superscript II RT, Invitrogen)

- Después del tratamiento con DNasa, adicionar a cada muestra:
 - o **5 µl** RNA (Muestra)
 - o **1 µl** Oligo SRF/vDEP/All-R3 (20 µM)
 - o **1 µl** dNTP's mix
- Colocar los tubos en el termociclador a 55°C durante 5 minutos, después bajar la temperatura a 4°C, mientras se prepara lo siguiente para cada una de las muestras, la mezcla se hace en un tubo separado.
 - o **4 µl** de 5x First Stand Buffer
 - o **2 µl** de 0.1 M DTT
 - o **1 µl** de RNase out
- Adicionar a cada muestra **7 µl** de la mezcla anterior, mezclar ligeramente en Vortex y colocar en el termociclador a 42°C durante 2 minutos.

- Añadir a cada muestra **1 µl** de Superscript II, y colocar en el termociclador a 42°C por 50 minutos, continuar con 70°C durante 15 minutos.
- Al terminar, se guardan las muestras a -80°C, hasta su posterior uso en PCR.

3) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

(Kit: LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix, NEB-R)

- Colocar en un ependorff:
 - o **1.5 µl** cDNA
 - o **0.4 µl** Primer F (SRF/vDEP/S1-F o SRF/vDEP/All-F3, 20 µM)
 - o **0.4 µl** Primer R (SRF/vDEP/S2-R o SRF/vDEP/All-R3, 20 µM)
 - o **5 µl** Master Mix
 - o **2.7 µl** H₂O libre de nucleasas
 - o Volumen total: 10µl por reacción
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:
 - 94°C por 30 seg (1x)
 - 94°C por 15 seg (30x)
 - 56°C por 30 seg (30x)
 - 65°C por 5 min 20 seg (30x)
 - 65°C por 10 min (1x)

4) Lectura de resultados (por electroforesis):

Gel de agarosa al 1.5%, 90 volts durante 60 minutos.

Colocar 3 µl de MPM (1Kb Plus DNA Ladder) en un carril, y 1 µl de Buffer de carga con 5 µl de muestra en los carriles.

Producto esperado: Gen S = **4,821pb**; Genes ORF3, E, M, N = **2,829pb**.