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

Análisis de la secuencia del gen S del virus de la Diarrea Epidémica Porcina durante un brote, re-brote y presentación endémica de la enfermedad en el periodo 2014-2018.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A :

ERIKA NAYELLI HERNÁNDEZ VILLEGAS

TUTOR PRINCIPAL:

MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM.

COMITÉ TUTOR
ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM.

SUSANA MENDOZA ELVIRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM.

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Enero 2019.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis papás, hermanos y amigos, en especial a Mariana y Alejandra que siempre han estado presentes para apoyarme, motivarme, escucharme y aconsejarme en todo momento.

Ésta etapa vivida durante la maestría me ha servido para crecer en muchos ámbitos; académico, profesional y personal. Se convirtió en un medio para el desarrollo de muchos sueños que habían estado guardados y ansiosos por materializarse.
Ha sido una etapa muy difícil, llena de cambios y aprendizajes, pero sin duda una de las mejores que haya vivido.

Solo queda agradecer a todas aquellas personas, momentos y situaciones que permitieron con acciones positivas y negativas que las cosas estén sucediendo como hasta ahora.

En una nueva etapa que está por comenzar en mi vida, debo reconocer que no podría ser igual sin haber vivido la anterior. Existen temores, pero también confianza debido a las experiencias acontecidas, que sin duda me han marcado para siempre.

AGRADECIMIENTOS

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, docentes y administrativos.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada durante la realización de la maestría.

Financiamiento otorgado por el proyecto PAPIIT IN220515.

Laboratorio de Investigación y Desarrollo, Laboratorios Tornel S. A.

Dr. Ricardo Flores Castro. M.C Juan Carlos Martínez Neria. MVZ. Adriana Olvera García.

M.C Eduardo Aguilar Huerta por la ayuda y orientación técnica otorgada, así como el ánimo para el desarrollo del experimento. Gracias por nunca darte por vencido cuando los resultados no eran lo que esperábamos. Gracias por contagiarme de tu optimismo y paciencia. Gracias por despertar en mí las ganas de seguir aprendiendo.

Laboratorio de Microbiología e Inmunología FMVZ-UNAM.

Comité tutor: María Elena Trujillo Ortega, Rosa Elena Sarmiento Silva y Susana Mendoza Elvira.

Miembros del jurado, gracias por sus comentarios y sugerencias para poder finalizar este trabajo. Dr. Carlos Sandoval IBT-UNAM por el préstamo de material, Rocío Tirado Mendoza FACMED, Hugo Ramírez Álvarez FESC.

M.C Teresa de Jesús López Pérez, M.C Naomi Santiago Sánchez, M.C Alicia Sotomayor González, MVZ. Héctor Nájera por el apoyo técnico siempre brindado.

Equipo PED, José Becerra, gracias por siempre escucharme y apoyarme.

Gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Virología e Inmunología por el ánimo, amistad y ayuda siempre brindada.

RESUMEN

La enfermedad de la diarrea epidémica porcina ha provocado grandes pérdidas económicas a la industria porcina a nivel mundial debido a que provoca una mortalidad hasta del 100% en lechones infectados. Fue identificada por primera vez en Europa en 1971, y desde entonces se ha ido distribuyendo alrededor del mundo, esta enfermedad es provocada por el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (Coronavirus). En el año 2013 el virus llegó a los Estados Unidos, Canadá y México, ocasionando el alza en los precios de venta de cerdo en pie y canal.

Con el reciente uso de vacunas contra el virus de la Diarrea Epidémica Porcina en nuestro país, y de la tasa de mutación reportada para este virus, surge la necesidad de obtener mayor información acerca de este comportamiento del virus presente en las granjas porcinas.

En el presente estudio se evaluó la presencia del virus de la diarrea epidémica porcina en muestras provenientes de granjas donde se presentó un brote de la enfermedad en el año 2014, un re-brote en el año 2018 y una granja donde la enfermedad ha sido endémica desde que se presentaron los primeros casos en nuestro país.

La proteína S es el mayor antígeno viral, por esa razón, se han diseñado vacunas que la tienen como blanco especifico, además de ser la proteína viral más variable. Es por ello que se han desarrollado estudios para conocer la secuencia del gen que codifica para dicha proteína, con el fin de conocer la posible presencia de cambios en ella y realizar una evaluación del uso y adecuada protección provista por las vacunas en nuestro país. Ya que es un importante problema de salud animal que continua provocando pérdidas económicas en México.

ABSTRACT

The porcine epidemic diarrhea disease has caused great economic losses to the pig industry worldwide because it causes a mortality up to 100% in infected piglets. It was identified for first time in Europe in 1971 and since then, it has been spread around the world. This disease is caused by the Porcine Epidemic Diarrhea Virus (*Coronavirus*). In 2013, the virus reached the United States, Canada and Mexico, causing the rise in sales prices of standing and carcass pigs.

With the recent use of vaccines against the Porcine Epidemic Diarrhea virus in our country, and the mutation rate reported to this virus, it has surged the necessity to get more information about the virus behavior that is present in pig farms.

In the present study, the presence of porcine epidemic diarrhea virus was evaluated in samples from farms where an outbreak of the disease occurred in 2014, a re-outbreak in 2018 and a farm where the disease has been endemic since the first cases were presented in our country.

The protein S is the largest viral antigen, for that reason, the vaccines that have been designed have this protein as specific target; moreover, this protein is the most variable viral protein. That is why, it has been developed studies with the aim to know the sequence of the gene that codes for this protein in order to know the possible presence of changes in it.

Furthermore, it is important to make an assessment about the use and adequate protection provided by vaccines in our country because, it is a major animal health problem that still continues and causes economic losses in Mexico.

Contenido

RESUMEN III
ABSTRACT IV
INTRODUCCIÓN 1
1.1 Situación en México 3
1.2 Agente etiológico 6
1.3 Replicación viral 10
1.4 Características físicas del agente etiológico 13
1.5 Forma de transmisión 14
1.6 Descripción de la enfermedad de la Diarrea Epidémica Porcina 14
1.7 Diagnóstico 16
JUSTIFICACIÓN 16
HIPÓTESIS 17
OBJETIVO GENERAL 17
4.1 Objetivos particulares 17
MATERIAL Y MÉTODOS 18
5.1 Muestras 18
5.2 Procesamiento de las muestras 18
RESULTADOS 22
6.1 Selección de muestras positivas 22
6.2 Obtención de los fragmentos del gen S 22
6.3 Análisis de las secuencias de los fragmentos de PCR y obtención de la secuencia nucleotídica del gen S 23
6.4 Análisis de las secuencias obtenidas con cepas reportadas en México 26
6.6 Análisis de las secuencias obtenidas respecto a cepas de referencia a nivel mundial 34
6.7 Análisis filogenético 38
6.8 Análisis de las secuencias de aminoácidos 40

6.9 Análisis de los sitios de glicosilación 43
6.10 Modelación de la proteína 44
DISCUSIÓN 46
CONCLUSIONES 50
ANEXO DE MATERIALES Y REACTIVOS 52
PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS 52
REFERENCIAS 53

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de localización del primer foco de diarrea epidémica porcina reportado por la OIE 3
Figura 2. Representación esquemática del VDEP y su mapa genético basado en la cepa CV777 7
Figura 3. Representación esquemática de la replicación viral de un virus RNAss+. 13
Figura 4. Representación gráfica del genoma del VDEP. Se muestra el gen S y los pares de oligonucleótidos (A-G) utilizados para su amplificación. 20
Figura 5. Amplificación del fragmento de 370 pb del gen M 22
Figura 6. Amplificación de los fragmentos de diferentes tamaños para la obtención del gen completo del gen S 23
Figura 7. Lectura de un electroferograma de la secuencia del fragmento B del gen S del VDEP 24
Figura 8. Verificación de la secuencia consenso construida 25
Figura 9. Construcción de la secuencia final al ensamblar los fragmentos secuenciados de manera manual. 25
Figura 10. Alineamiento de nuestras secuencias obtenidas con la secuencia de la cepa mexicana utilizada como referencia 26
Figura 11. Divergencias y similitudes presentes en las secuencias 28
Figura 12. Cambios presentes en las secuencias alineadas. 29
Figura 13. Cambios en las secuencias del gen S del VDEP. 30
Figura 14. Representación de las regiones de la secuencia del gen Spike que proveen alguna característica de la función o estructura a la proteína 31
Figura 15. Alineamiento de las secuencias de las cepas de referencia. 35
Figura 16. Cambios a lo lago de la secuencia del gen S 37

Figura 17. Cambios en la secuencia del gen spike en regiones significativas que proveen características de función y estructura a la proteína 38
Figura 18. Árbol filogenético de las secuencias de origen mexicano..... 39
Figura 19. Árbol filogenético de las secuencias referencia del mundo.....40
Figura 20. Deducción de la secuencia nucleotídica a aminoácidos. 42
Figura 21. Análisis de los posibles cambios en los sitios de glicosilación en las secuencias obtenidas 44
Figura 22. Se muestra el modelo de la proteína Spike de la secuencia deducida a aminoácidos ……. 45

Índice de cuadros

Cuadro 1. Pareja de iniciadores utilizados para a amplificación del gen completo que codifica para la proteína Spike del virus 19
Cuadro 2. Secuencias utilizadas en el alineamiento para el análisis de nuestras secuencias obtenidas con secuencias de origen mexicano en el periodo de tiempo de interés 26
Cuadro 3. Cambios en las secuencias reportadas con respecto a la secuencia de referencia Jalisco 2017. 33
Cuadro 4. Secuencias utilizadas para el alineamiento y análisis con cepas de referencia a nivel mundial 34
Cuadro 5. Sitios de N-glicosilación en las secuencias reportadas. 43
Cuadro 6. Sitios de O-glicosilación en las secuencias reportadas. 44

Lista de abreviaturas

ADN Ácido desoxirribonucleico

APHIS The Unidet States Department of Agriculture´s Animal and Plant Health Inspection Service

APN Aminopeptidasa N

ARN Ácido ribonucleico

BLAST N Basic Local Alignment Search Tool

BSL3 Laboratorio nivel de bioseguridad 3

CPA Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales

CTD Dominio C-terminal

CV777 Cepa China de referencia del virus de la diarrea epidémica porcina

DCP deltacoronavirus porcino

ddNTPs Dideoxinucleotidos

DEP Diarrea epidémica porcina

dNTP´s Deoxinucleotidos

E Proteína de envoltura

ELISA Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

ERGIC Compartimiento del retículo endoplasmico-Golgi

FeCoV Coronavirus felino

HcoV-229E Coronavirus humano

IgA Inmunoglobulina A

INDELS inserciones y deleciones en gen spike

kDa kilodaltons

M Proteína de membrana

N Proteína de nucleocapside

NSPS Proteínas no estructurales

NTD Dominio N-terminal

OIE Organización mundial de sanidad animal

ORF Marco abierto de lectura

RBD Dominio de unión al receptor

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

S Proteína spike

SAGARPA Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación

SENASICA Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria

SIVE Sistema nacional de vigilancia epidemiológica

USDA U.S Deparment of Agriculture

UTR Regiones no traducidas

VDEP Virus de la Diarrea Epidémica Porcina

VGET Virus de la Gastroenteritis Transmisible

INTRODUCCIÓN

Las diarreas agudas son la mayor causa de morbilidad y mortalidad en cerdos a nivel mundial. Las infecciones entéricas en animales son frecuentemente asociadas a virus, incluyendo rotavirus y coronavirus. De acuerdo con un análisis metagenómico, en el cual se evaluaron muestras de cerdos con diarreas de China en 2012, el 77% eran causadas por coronavirus, lo cual indica que estos son importantes patógenos entéricos de los cerdos (Zuñiga, Pascual-Iglesias, Sanchez, Sola, & Enjuanes, 2016).

Se han descrito diferentes coronavirus que causan enfermedades entéricas en cerdos en todo el mundo; virus de la Gastroenteritis Transmisible (VGET), virus de la Diarrea Epidémica Porcina (VDEP) y Deltacoronavirus Porcino (DCP), dichos virus son patógenos emergentes y re-emergentes (McCluskey & Morrison, 2016).

La Diarrea Epidémica Porcina (DEP) es una enfermedad intestinal de origen viral altamente contagiosa, forma parte del síndrome diarreico de los lechones, los signos clínicos no son específicos por lo que es fácil confundirla con enfermedades causadas por otros agentes etiológicos, por ello, se considera fundamental el diagnóstico diferencial del agente causal de manera oportuna, a fin de permitir que los productores lleven a cabo las acciones adecuadas de bioseguridad en las granjas y así, implementar medidas preventivas y de control para evitar su diseminación (Huang et al., 2013; Ishikawa, Sekiguchi, Ogino, & Suzuki, 1997; Jung & Saif, 2015; S. Y. Kim, Song, & Park, 2001; Kweon, Kwon, Lee, Kwon, & Kang, 1999; D. K. Lee, Park, Kim, & Lee, 2010; Salem et al., 2010; D. Song & Park, 2012; D. S. Song et al., 2006; J. Zhao et al., 2013; S. Zhao et al., 2014).

Se ha descrito que los cerdos que logran la infección por el VDEP generalmente presentan retraso en el crecimiento, disminución de la conversión alimenticia, aumento de los costos de alimentación. Debido a la alta mortalidad de lechones, las infecciones por dicho virus dan como resultado una disminución del número de cerdos a rastro, un suministro insuficiente de carne y la inestabilidad del precio de la carne de cerdo. De acuerdo con un estudio publicado por (Goede & Morrison, 2016) una hembra infectada con el virus, al someterla a un programa de inmunidad colectiva, por ejemplo el feedback, el cual consiste

en la maceración del tracto gastrointestinal de lechones infectados con el VDEP, adicionado con leche, agua o alimento y se le ofrece a la cerda. En promedio tardará 28 semanas en producir lechones negativos por PCR al virus de la diarrea epidémica porcina, lo que ocasiona pérdidas económicas en la granja.

La DEP se observó por primera vez en cerdos lactantes en Reino Unido en el año de 1971. El agente causal fue identificado en 1978 en Bélgica, y durante los años 70´s a los 90´s ocasionó grandes pérdidas económicas en diferentes países de Europa, los brotes fueron poco frecuentes, pero continuó extendiéndose y persistiendo de forma endémica en las granjas porcinas de esta región (Q. Chen et al., 2014; Huang et al., 2013; Jung & Saif, 2015; D. K. Lee et al., 2010; Shibata et al., 2000; Wang et al., 2014).

En Asia, el primer caso reportado de DEP se presentó en Japón en 1982, Corea del Sur en 1993, aunque se piensa que el virus está presente desde 1987 en esta región, en Tailandia en 2008, el virus se convirtió en endémico aun después de la aplicación de vacunas para controlar el brote en estas regiones (Q. Chen et al., 2014; Ishikawa et al., 1997; D. K. Lee et al., 2010; Shibata et al., 2000). En China no se conoce con exactitud el año en que comenzó a circular el virus, sin embargo, en octubre del año 2010 al 2012 se registró una alta incidencia de casos de DEP, y paso en poco tiempo a una epizootia. Estudios realizados posteriormente, en este país, de epidemiologia molecular y análisis genéticos del virus, demostraron la presencia de una variante genéticamente diferente a la cepa vacunal usada a partir del año 2010 (VIRALZONE, 2015.), la cual exhibía una gran variabilidad y posible recombinación del gen que codifica para la proteína de superficie Spike, con la característica de diversas inserciones y deleciones en la secuencia por lo cual se le llamó cepa INDELS (Sun, Wang, Wei, Chen, & Feng, 2016).

Esta nueva variante de cepa del VDEP remergente en China afectó a cerdos de todas las edades, provocó una alta morbilidad y mortalidad de casi el 100% en lechones, trayendo consigo altas pérdidas económicas en granjas e inestabilidad en el precio de la carne y subproductos del cerdo. Aunado a esto, se han reportado otros agentes etiológicos involucrados con diarreas en cerdos, sin embargo el VDEP es el mayor agente causal de diarreas de acuerdo con diversos estudios (Jung, Annamalai, Lu, & Saif, 2015; Jung, Eyerly, Annamalai, Lu, & Saif, 2015; D. S. Song et al., 2006; J. Zhao et al., 2013).

En Estados Unidos, el 17 de mayo del 2013 se confirmó, por el U.S Department of Agriculture (USDA), el primer caso positivo al VDEP en Iowa, para el 28 de septiembre del mismo año se confirmaron 679 casos positivos (38.8%), en diferentes etapas productivas. La cepa identificada mostró una estrecha relación genética con la cepa China reportada en el brote del 2010 al 2012 (Q. Chen et al., 2014; Huang et al., 2013; Jung & Saif, 2015; USDA, 2015.).

1.1 Situación en México

En México se presentó el primer caso de DEP el 30 de julio del 2013 en el Bajío mexicano (Degollado, Jalisco y La Piedad, Michoacán), ver figura 1. El 8 de agosto se emitió un diagnóstico confirmatorio con la técnica de RT-PCR en tiempo real, en el laboratorio BSL3, de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, CPA (BMEDITORES. 2014).

Figura 1. Mapa de localización del primer foco de diarrea epidémica porcina reportado por la OIE (OIE, 2014).

El reporte de la enfermedad a la Organización Mundial de Sanidad Animal OIE, se realizó el 21 de mayo del 2014, como una enfermedad emergente, con una morbilidad de 3 y

mortalidad de 2 en una escala de 1-5 de acuerdo con esta institución. Dicho reporte indicó la presencia de 83 focos de la enfermedad en 17 estados de la República Mexicana, este reporte se realizó después de un monitoreo entre agosto del 2013 a mayo del 2014 en el cual se analizaron un total de 2,309 muestras por RT-PCR en tiempo real, en granjas de ciclo completo, de 19 entidades federativas. El 30% fueron positivos (alrededor de 770 casos, de un total de 16 millones de animales) en los Estados de Aguascalientes, Baja California, Colima, Ciudad de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala y Veracruz. El 70% de las muestras negativas pertenecieron a los Estados de Yucatán y Oaxaca (SAGARPA, 2014; SENASICA, 2014), este estudio identificó la presencia del virus en México por análisis molecular y posteriormente (Trujillo-Ortega et al., 2016), reportaron el aislamiento y la identificación del virus de la DEP en lechones.

A partir del momento en que se notificaron los primeros casos de la presencia de la DEP en México su distribución en el total del territorio nacional comenzó a extenderse, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) notificó para el primer trimestre del 2016, 84 reportes de diarrea epidémica porcina, de las 434 solicitudes a los laboratorios autorizados para diagnosticar esta enfermedad; 132 en Yucatán, 127 en Puebla, 94 Sonora, 20 Querétaro, 17 Jalisco, 13 Quintana Roo, 8 Sinaloa, 6 Veracruz, 5 Guanajuato, 3 Zacatecas, 2 San Luis Potosí y 1 solo caso para Campeche, Chihuahua, Ciudad de México, Guerrero, Estado de México, Morelos y Tabasco. Puesto que la signología de la DEP no es específica, es necesario realizar el diagnóstico diferencial con el VGET, sin embargo, de acuerdo con la última información del SIVE no se reportan casos (SIVE 2016., 2016).

En México, las pérdidas económicas reportadas debido a la infección por el virus de la DEP en la producción de carne de cerdo fueron de aproximadamente el 9.7% (PORCICULTURA, 2014). Las cuales se debieron directamente a la elevada mortalidad de los lechones, los costos de producción aumentaron por el retraso del crecimiento, reducción en la conversión alimenticia y el incremento en los costos de alimentación, así como, se disminuyó la cantidad de cerdos al sacrificio, hubo un abasto insuficiente y se creó la implementación de medidas de bioseguridad más estrictas en la mayoría de las granjas porcinas (SUN et al., 2016).

El control de la enfermedad se realiza mediante la aplicación de vacunas, algunos países como Japón, Corea del Sur y China han diseñado vacunas eficaces, las más usadas en Asia son las elaboradas con virus atenuado (cepa de referencia CV777) con las cuales, se han demostrado una protección en las cerdas de hasta un 85.19%, mientras que la inmunidad pasiva (que transfieren las cerdas a los lechones) es del 85%. Las vacunas vivas atenuadas tienen el riesgo de reversión y/o de recombinación con cepas de virus de campo circulante, como lo que sucedió en Asia después del brote del 2010 en China (Zuñiga et al., 2016).

Otra estrategia que se utilizó en Asia al principio del brote fue la inmunización con tejido inactivado proveniente de animales infectados, la protección reportada con este método fue del 77.28% aplicado a lechones de 3 días de edad y del 97.06% por inmunidad pasiva. Aun cuando se reportaron niveles de protección favorables, su preparación es complicada y costosa, lleva mucho tiempo y hay problemas en el control de calidad. Las vacunas elaboradas con virus modificado mediante ingeniería genética (inserciones o deleciones de genes virales o vacunas de ingeniería inversa) y las vacunas inactivadas ofrecen inmunidad de mucosas parcial, pero son muy eficientes para inducir inmunidad materna a los lechones (Saif, 2015; Zuñiga et al., 2016).

Debido a la falta de vacunas eficaces contra el VDEP, antiguamente, en la mayoría de los países donde se presentó un brote, incluyendo México, una práctica comúnmente aplicada en granjas a modo de prevención fue el uso de “feedback” o “licuados” el cual consiste en la maceración de un solo paquete intestinal, contenido gástrico y diarrea de los cerdos que presentan signos clínicos de la DEP en las primeras 6 a 12 horas de vida, para el cual se llevan a cabo diferentes protocolos de administración y preparación (Goede & Morrison, 2016; USDA, 2015). Actualmente, existen vacunas contra dicha enfermedad; en los Estados Unidos la USDA a través del The United States Department of Agriculture’s Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) asignó el 16 de junio y el 8 de septiembre del 2014, respectivamente, a los laboratorios Harrisvaccines, Inc. (Laboratorios MSD) y Zoetis licencias condicionales para la comercialización y uso de sus vacunas contra el VDEP, los cuales han cubierto con éxito los estudios de bioseguridad, y están en espera de su certificación por la USDA (APHIS 2014; ZOETIS, 2015). En México a partir del año 2017 se comenzaron a comercializar dichas vacunas, las cuales han sido bien

aceptadas en la industria porcina, sin embargo, aún falta un gran número de estudios a nivel de campo que comprueben su eficacia.

1.2 Agente etiológico

El virus de la diarrea epidémica porcina pertenece al orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*, género *Alphacoronavirus*. Es un virus envuelto y pleomórfico, posee un genoma de ARN no segmentado, de cadena sencilla en sentido positivo, de aproximadamente 28 kb, con estructura Cap en el extremo 5´ y en el 3´cola de poli adeninas. Tiene un diámetro de 95 nm a 190 nm, incluyendo las proyecciones, las cuales son de 18 nm de longitud aproximadamente (Q. Chen et al., 2014; Huang et al., 2013; Jung, Eyerly, et al., 2015; D. Song & Park, 2012; D. S. Song et al., 2006; Ujike & Taguchi, 2015; Wang et al., 2014).

De la secuencia 5’ a 3’ contiene cinco regiones no traducidas (UTR) y se conocen siete marcos abiertos de lectura (ORF2-6) que codifican para cuatro proteínas estructurales; spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) y tres no estructurales. El genoma se organiza en el siguiente orden, 5´replicasa (1a/1b)-S-ORF3-E-M-N-3´ ver figura 2. En el extremo 5´se encuentran el ORF1a y ORF1b, ocupando dos tercios del genoma y codifican para dos poliproteínas (pp1a y pp1ab) y para la polimerasa viral, el gen replicasa codifica para proteínas no estructurales (NSPS) (Q. Chen et al., 2014; Huang et al., 2013; Jung, Eyerly, et al., 2015; Jung et al., 2014; D. K. Lee et al., 2010; D. Song & Park, 2012; Ujike & Taguchi, 2015).

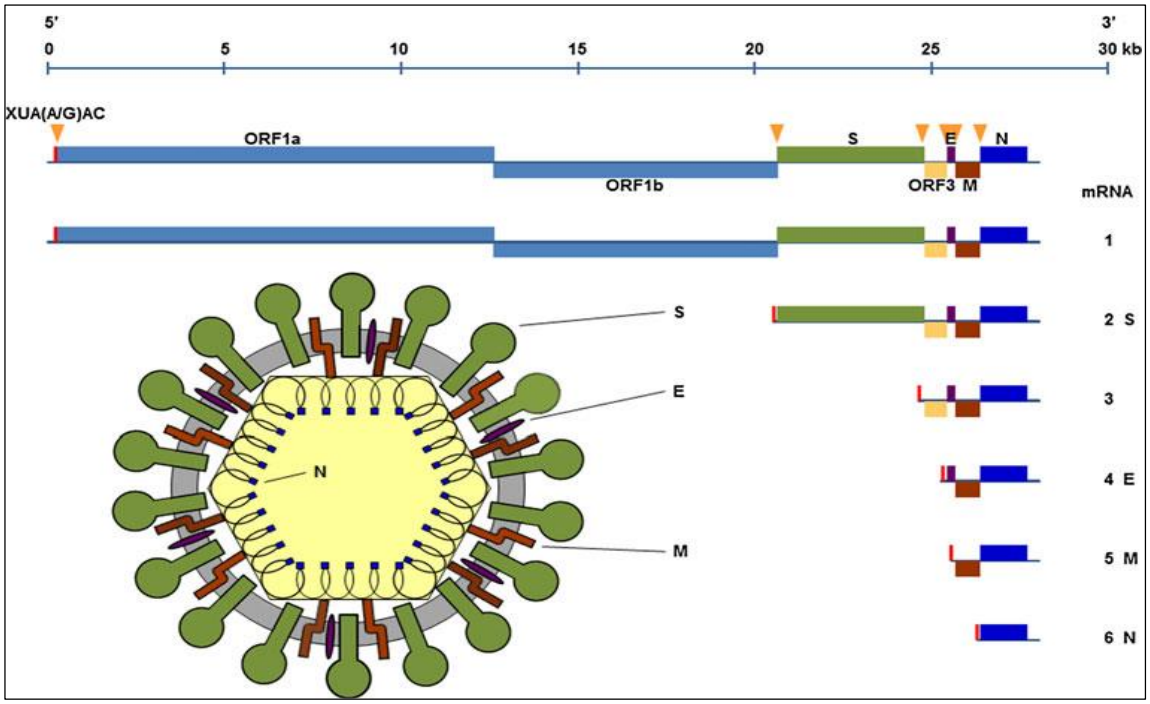

Figura 2. Representación esquemática del VDEP y su mapa genético basado en la cepa CV777 (número de acceso GenBank, AF353511) (D. Song & Park, 2012).

En el extremo 3´ proximal un tercio del genoma codifica para cuatro proteínas estructurales; la proteína spike (S) de un peso de 150-220 kDa, proteína de envoltura (E) de 7 kDa, proteína de membrana (M) de 20-30 kDa y proteína de nucleocapside (N) de 58 kDa. El ORF3a está localizado entre los genes estructurales, codifica una proteína accesoria, la cual se sugiere que es un factor de virulencia y de adaptación al cultivo celular (Q. Chen et al., 2014; D. K. Lee et al., 2010; D. Song & Park, 2012; Ujike & Taguchi, 2015; Wang et al., 2014).

Dentro de las proteínas virales estructurales, la proteína S es el mayor antígeno viral, es de fundamental importancia para la regulación de la interacción con los receptores de la célula huésped para mediar la entrada viral, así como la inducción de anticuerpos neutralizantes. Esta proteína está también asociada con el crecimiento en cultivo celular y la atenuación de la virulencia *in vitro* e *in vivo* del VDEP, es por esta razón que es considerada como un objetivo primario para el desarrollo de vacunas efectivas contra el VDEP (Jung, Eyerly, et al., 2015; D. K. Lee et al., 2010; Ren & Li, 2011; Ribes et al., 2011; D. Song & Park, 2012; Ujike & Taguchi, 2015; Yin, Ren, Tian, & Li, 2007).

La proteína S del VDEP es una glicoproteína transmembranal de fusión tipo I, la cual se caracteriza por tener una estructura α-hélice coiled-coil en la porción C-terminal (estructura α-hélice secundaria superenrrollada), es una proteína de gran tamaño, aproximadamente de 1,383 aminoácidos (aa), tiene regiones altamente glicosiladas (29 sitios de N-glicosilación). Se ensambla en trímeros en la superficie del virión, dando la apariencia de corona característica de los coronavirus. El péptido señal se ubica entre el aa 1-25, la región que se encuentra en la superficie del virión va del aa 26-1324, la región transmembranal del aa 1325-1344 y la región que va del aa 1345-1383 está anclada a la proteína de matriz. Los epítopos neutralizantes se ubican en las posiciones de aa 499-638, 748-755, 764-771 y 1368-1374 aa. La proteína tiene dos dominios, N-terminal (S1) en la posición 1-789 y C-terminal (S2) en la posición 790-1,383 aa, la cual es la región más conservada de la proteína (D. Song & Park, 2012; Ujike & Taguchi, 2015).

El dominio S1 es el sitio de unión entre el virión y el receptor de la membrana celular. La unión con el receptor induce cambios conformacionales en la glicoproteína S, exponiendo así, el péptido de fusión de la región S2 y activando así la fusión de membranas (Fields, Knipe, & Howley, 2013; VIRALZONE, 2015).

La proteína spike de los coronavirus contiene dos dominios repetidos (heptad repeats HR por sus siglas en inglés) S2, la cual es una característica típica de las proteínas de fusión viral de clase I, estos contienen un heptapéptido repetitivo (ABCDEFG), con a y d, los cuales son residuos hidrófobos característicos de la coiled-coil, que participa en el proceso de fusión.

Se ha reportado que la aminopeptidasa N (APN), la cual es una proteína transmembrana tipo II expresada en el dominio apical de las células epiteliales de los tractos respiratorio y entérico, es una proteasa dependiente de Zinc (Zn2+) y degrada preferentemente péptidos o proteínas con aminoácidos neutros en la porción N-terminal, es el receptor natural de la célula, que utilizan los virus de la GET, coronavirus humano 229E (HcoV-229E) y coronavirus felino (FeCoV), todos estos pertenecen al grupo 1 de los coronavirus (alfa-coronavirus) al igual que el VDEP, sin embargo estudios actuales ponen en duda a la APN como único receptor (Jung, Eyerly, et al., 2015; D. Song & Park, 2012).

Existen múltiples estudios de la estructura de la proteína Spike, los cuales son esenciales para comprender la relación genética, el estatus epidemiológico del virus de campo y la diversidad de aislados *in vitro* del VDEP, así como la asociación entre mutaciones genéticas y la función viral (Jung & Saif, 2015; D. Song & Park, 2012).

Existen diversos análisis filogenéticos basados en la variabilidad del gen S, los cuales proveen una idea acerca de las distintas recombinaciones y mutaciones de esta proteína, dando lugar a diferentes cepas con algunas variables genéticas en diferentes regiones y zonas geográficas alrededor del mundo. Entre el 2008 y 2010 se identificó una nueva cepa del VDEP, caracterizada por múltiples inserciones/deleciones y mutaciones de la proteína S, comparada con cepas reportadas de Corea del Sur y China. La cepa del virus presente en Estados Unidos está estrechamente relacionada con las cepas presentes en Alemania, Francia, Bélgica, Corea del Sur, Taiwán y Japón. Actualmente se han identificados dos tipos de cepas en los Estados Unidos; la cepa original de alta patogenicidad y la cepa INDEL S, con inserciones y deleciones en la región N-terminal y patogénica es media.

La proteína M es una proteína transmembranal de múltiple paso, es el componente más abundante de la envoltura viral, tiene un tamaño aproximado de 226 aa. Juega un papel central en la morfogénesis del virus y en el ensamblaje a través de sus interacciones con otras proteínas virales (S y N). Se sugiere que la proteína M existe como un dímero en el virión, y puede adoptar dos conformaciones diferentes, esto es lo que le permite promover la curvatura de la membrana y unirse a la nucleocápside. Tiene tres regiones transmembranales, dos en la superficie del virión (corto amino-terminal) y una interna (largo carboxi-terminal) de aproximadamente 6-8 nm (Ren & Li, 2011; D. Song & Park, 2012; Ujike & Taguchi, 2015).

La proteína M no solo participa en el proceso de ensamblaje viral, también induce anticuerpos que neutralizan el virus en presencia del complemento, así como la inducción de interferón α (INFα) (D. Song & Park, 2012)(Ren & Li, 2011), adicionalmente la interacción de las proteínas M y E permiten la formación de pseudo-partículas exhibidas para inducir la actividad de interferón, similar a la que inducen los viriones completos (D. Song & Park, 2012; Ujike & Taguchi, 2015).

La proteína E se encuentra en pequeñas cantidades dentro del virión, estas proteínas en los coronavirus son muy divergentes, sin embargo, mantienen una arquitectura común. Tiene un ectodominio N-terminal y un endodominio C-terminal y actividad de canal iónico, con lo que puede facilitar el ensamblaje y la liberación del virus.

La proteína N tiene dos dominios separados, un dominio N-terminal (NTD) y un dominio C-terminal (CTD), que se une al ARN del virión y provee una estructura básica para la nucleocapside, formando una ribonucleoproteína helicoidal. Es altamente fosforilada, se ha sugerido que la fosforilación provoca un cambio estructural que mejora la afinidad por el ARN viral. Esta fosfoproteína es asociada con la transcripción del genoma viral, empaquetamiento genómico y posteriormente empaquetar el genoma encapsidado en partículas virales. Es una proteína conservada y por esta razón puede ser usada como blanco específico en el diagnóstico temprano de la infección por VDEP. Los epitopos de la proteína N son importantes en la inducción de la inmunidad mediada por células (Ren & Li, 2011; D. Song & Park, 2012; Ujike & Taguchi, 2015).

Estudios indican que el ORF3 influye en la virulencia, en algunos experimentos la adaptación del virus al cultivo celular se ha modificado este gen y de esta forma se reduce la virulencia como es el caso del VGET (D. Song & Park, 2012).

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

1.3 Replicación viral

La unión inicial del virión a la célula huésped se inicia mediante interacciones entre la proteína S y su receptor, muchos α-coronavirus, al igual que el VDEP, utilizan la aminopeptidasa N (APN) de la superficie celular. Posterior a la unión inicial del receptor, tal como se muestra en la figura 3, algunos virus envueltos necesitan fusionar su envoltura con la membrana de la célula huésped para introducir su nucleocápside al citosol de la

célula diana, esto se favorece por la escisión proteolítica de la proteína S mediante una proteasa. La proteína spike tiene una doble función; el dominio S1 de la proteína S viral, se encarga de la unión al receptor, mientras que la entrada del virus por fusión de membranas es mediada por el dominio S2. Este proceso de fusión implica cambios conformacionales en la proteína spike, que con ayuda de enzimas proteolíticas, como la tripsina, provocan la escisión de la proteína S en dos sitios dentro de la porción S2 de la proteína, con la primera escisión se separara el dominio de unión al receptor (RBD) y los dominios de fusión de la proteína, la segunda es para exponer el péptido de fusión, el cual se inserta en la membrana, permitiendo que se fusione la membrana viral y celular, dando como resultado la fusión y finalmente la liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula (Belouzard, Millet, Licitra, & Whittaker, 2012; Fehr & Perlman, 2015; VIRALZONE, 2015).

Una característica fundamental de las proteínas de fusión viral tipo I es el llamado "péptido de fusión", es una secuencia hidrofóbica muy conservada, que interactúa con las membranas y desempeña un papel esencial en la reacción de fusión, en el caso de los coronavirus, de acuerdo con la conformación previa a la fusión que tiene la proteína, está protegido dentro de la interfaz del trímero, es decir, es interno. Existen dos cambios principales de conformación que ocurren durante la fusión, el primero sucede después de la acidificación del endosoma, un enlazador no estructurado se convierte en helicoidal permitiendo así, la formación de una gran hélice en la parte N-terminal. En esta conformación, el péptido de fusión es proyectado, en donde se une el virus con la membrana de la célula hospedera. El segundo cambio conformacional consiste en la inversión de la Hélice-C, la cual se empaqueta en los surcos coiled-coil en N-terminal, y forma un tipo ramo de seis hélices (6HB), con esta conformación, el dominio transmembranal y el péptido de fusión pegado a la membrana celular se aproximan y facilitan la fusión del virus con la célula.

Este proceso es seguido de la síntesis de la poliproteína replicasa para la transcripción del ARN genómico viral, este gen codifica dos grandes ORF, rep1a y rep1b, que expresan dos poliproteínas pp1a y pp1ab (Ujike & Taguchi, 2015).

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

es transcrito y replicado, dando lugar al ARN mensajero viral y el nuevo ARN genómico de cadena sencilla (Fehr & Perlman, 2015).

Posteriormente se lleva a cabo la traducción y síntesis de proteínas estructurales codificadas por el ARN viral, los ARN mensajeros de las proteínas S, E, M son traducidas e insertadas en el retículo endoplásmico, se mueven por la vía secretora hasta llegar al compartimiento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC). El genoma viral es encapsidado por la proteína N y las proteínas estructurales virales presentes en el compartimiento intermedio, formando así viriones maduros.

Seguido del ensamblaje, los viriones son transportados a la superficie de la célula en vesículas y se liberan por exocitosis. La proteína S que no se ensambla en viriones migra hasta la superficie celular donde realiza la fusión célula-célula entre las células infectadas y las células cercanas no infectadas. Esto conduce a la formación de células multinucleadas gigantes (sincitios), lo que permite que el virus se disemine dentro de un organismo infectado sin ser detectado o neutralizado por anticuerpos específicos contra el virus, lo cual es una estrategia para la evasión del sistema inmune (Fehr & Perlman, 2015; Ujike & Taguchi, 2015).

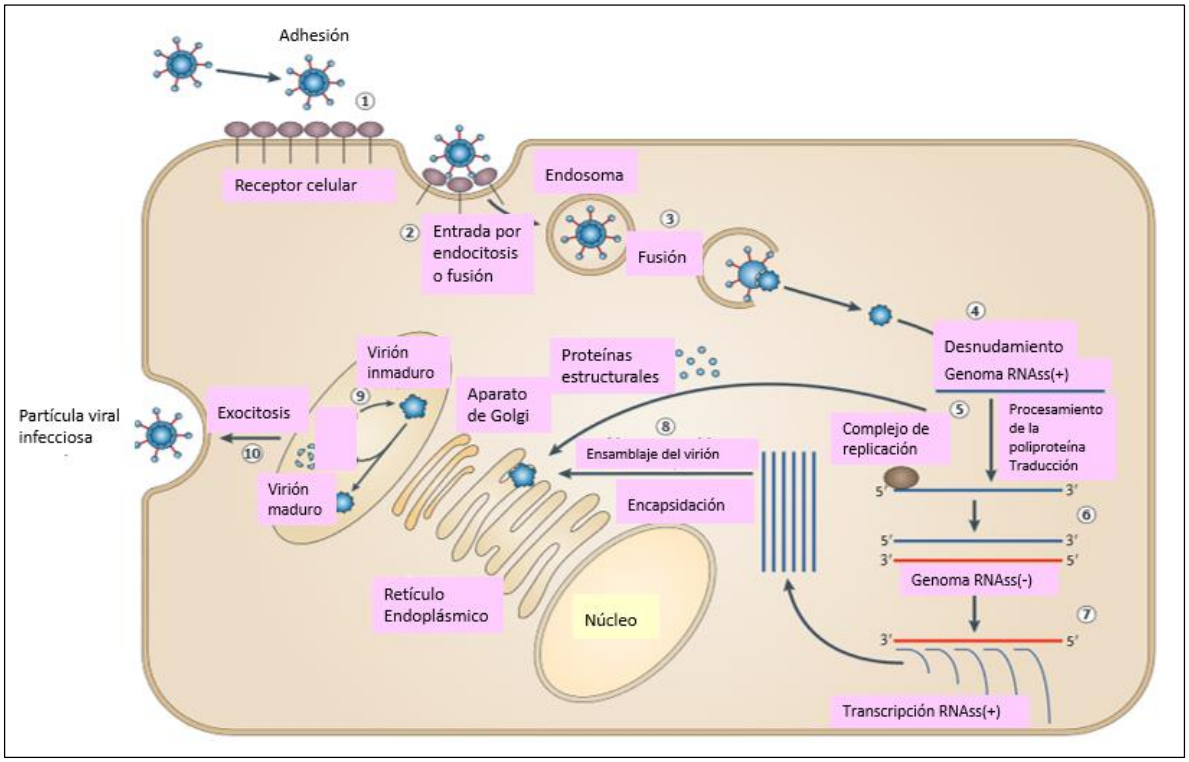

Figura 3. Representación esquemática de la replicación viral de un virus RNAss+.
Adaptado de (Suthar, Diamond, & Gale, 2013).

Existen múltiples estudios donde reportan el aislamiento del VDEP en cultivo celular utilizando la línea celular Vero (riñón de mono verde africano) y medio de cultivo adicionado con tripsina, sin embargo, este no es el único método de aislamiento viral descrito, por ejemplo el uso de otras enzimas proteolíticas y otras líneas celuares. El efecto citopático observado se caracteriza por fusión celular, formación de sincitios, vacuolización y desprendimiento celular (Q. Chen et al., 2014; Hofmann & Wyler, 1988; Kusanagi et al., 1992; Kweon et al., 1999; Shibata et al., 2000).

1.4 Características físicas del agente etiológico

El VDEP es sensible al éter y cloroformo, tiene una densidad en sacarosa de 1.18 g/ml, es relativamente estable a una temperatura de 4 a 50°C. De acuerdo con la OIE (Organización mundial de sanidad animal) el virus sobrevive al menos 28 días en el estiércol a 4°C; 7 días a 25°C en alimentos secos contaminados con material fecal; hasta 14 días a 25°C en

piensos húmedos y por lo menos, 28 días en una mezcla de alimentos húmedos a 25°C (Jung & Saif, 2015; OIE, 2014; D. Song & Park, 2012; USDA, 2015)

El virión se inactiva a una temperatura de 60°C y a un pH menor a 4 y mayor a 9 y con desinfectantes ácidos o alcalinos; agentes oxidantes, cloro, compuestos fenólicos, formalina al 1%, anhidrocarbonato de sodio al 4%, formaldehído y glutaraldehído, solventes lipídicos, yodóforos en ácido fosfórico al 1% e hidróxido de sodio al 2%, así como detergentes no iónicos (Jung & Saif, 2015; D. K. Lee et al., 2010; OIE, 2014).

1.5 Forma de transmisión

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

Se sugiere también transmisión aérea, ya que de acuerdo con algunos estudios se ha llegado a identificar partículas infecciosas del virus, así como material genético hasta 10 millas alrededor de granjas infectadas (Jung & Saif, 2015; S. H. Kim et al., 2007; OIE, 2014).

Jung y colaboradores en el 2015, reportaron el 23-41% de ARN del VDEP presente en muestras de leche de cerdas lactantes afectadas con el virus, sugiriendo que la leche de las cerdas afectadas podría ser una ruta de transmisión vertical del VDEP, sin embargo no hay estudios que comprueben dicho postulado (Jung & Saif, 2015). El periodo de incubación del virus en lechones es de 3 a 4 días y el periodo infectivo puede durar entre 6 y 35 días después de la aparición de los primeros signos de enfermedad (OIE, 2014; USDA, 2015).

1.6 Descripción de la enfermedad de la Diarrea Epidémica Porcina

El VDEP, al igual que los otros coronavirus entéricos, causa enteritis aguda en cerdos de todas las edades, induce baja en el apetito y peso en cerdos adultos, en los animales destetados de finalización y cerdas gestantes, la enfermedad es autolimitante y desaparece después de 5-10 días. En lechones recién nacidos de menos de 5 días de edad, se alcanza una mortalidad de hasta un 100% a causa de la diarrea severa y deshidratación, sin embargo, la mortalidad en los lechones infectados mayores a 10 días es menor del 10%. Se

sabe que conforme aumenta la edad de los animales disminuye la mortalidad de un 1 a 3% en cerdos en engorda. La susceptibilidad de los lechones a la DEP se debe al lento recambio de los enterocitos, una semana en comparación con cerdos mayores, donde ocurre de 2-3 días (O. Kim & Chae, 2000; USDA, 2015).

Se trata de una enfermedad altamente contagiosa en cerdos de todas las edades, provoca diarrea acuosa, deshidratación, vómito, destrucción de los enterocitos y atrofia de las vellosidades intestinales. Los signos clínicos dependen de la historia de la granja, si hubo una exposición previa, la inmunidad desarrollada en los cerdos y el estatus endémico de la granja, región y área afectada (J. Chen et al., 2010; Q. Chen et al., 2014; S. H. Kim et al., 2007; S. Y. Kim et al., 2001; D. K. Lee et al., 2010; USDA, 2015).

Las lesiones macroscópicas se limitan solo al tracto gastrointestinal y se caracterizan por el adelgazamiento de las paredes intestinales, se observan transparentes desde el duodeno hasta el colon, con la acumulación de grandes cantidades de líquido amarillento en el lumen intestinal y la presencia de gas. El estómago se llena de leche cuajada, posiblemente debido a la reducción del peristaltismo intestinal. La congestión de los vasos mesentéricos se detecta con frecuencia y el edema de los linfonodos mesentéricos. A pesar de la diarrea grave persistente, cerdos infectados presentan de bajo a moderado apetito de 3-5 días después de la aparición de la diarrea (X. Chen et al., 2012; Jung, Annamalai, et al., 2015; Jung & Saif, 2015; Jung et al., 2014).

De acuerdo con lo reportado por (Coussement, Ducatelle, Debouck, & Hoorens, 1982; Jung et al., 2014), las lesiones histológicas que presentan los lechones infectados experimentalmente son; enteritis atrófica severa, vacuolización leve de las células epiteliales superficiales y edema subepitelial en el ciego y el colon.

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

1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de la infección en lechones con el VDEP se basa en un diagnóstico integral, las características de los signos clínicos y lesiones histopatológicas observadas en los lechones que presentan alguna enfermedad entérica se pueden llegar a confundir con otros agentes etiológicos, es por esta razón que se recomienda solicitar un diagnóstico diferencial de laboratorio de los agentes causantes de diarreas en lechones, detección directa del agente por aislamiento viral, microscopia electrónica, así como detección de anticuerpos específicos contra el virus utilizando ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, o la detección del material genético viral con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta última técnica se basa en la amplificación de secuencias específicas de ADN, por medio de secuencias cortas de oligonucleótidos sintéticos, los cuales se hibridan de forma específica con cada una de las cadenas de ADN, previamente desnaturalizadas. Para el estudio de los virus con genoma ARN se desarrolló la RT-PCR, que cuenta con un paso previo de retro transcripción, para la síntesis del ADN complementario, necesario para la PCR (S. H. Kim et al., 2007; S. Y. Kim et al., 2001; Salem et al., 2010).

La secuenciación genética se basa en la determinación del orden de los nucleótidos en regiones genéticas o genomas específicos. Es una herramienta relativamente nueva, con infinidad de aplicaciones, la cual ha ganado gran importancia en el campo de la virología, ya que nos facilita la identificación y genotipificación de virus involucrados en brotes y transmisión de enfermedades, ofreciendo la posibilidad de conocer variantes virales circulantes, así como, predecir algunos cambios genotípicos, asociados al tropismo, resistencia a fármacos antivirales y evasión de la respuesta inmune (Makadiya et al., 2016; Saif, 2015; Suthar et al., 2013).

JUSTIFICACIÓN

Existen múltiples reportes de la enfermedad causada por el virus de la diarrea epidémica porcina y el gran impacto económico causado en las producciones. La aparición de re-

brotes y el uso de vacunas aparentemente ineficaces sugiere que existe una gran variabilidad genética entre los virus circulantes, lo cual ha permitido que esta especie viral se establezca de manera endémica, dificultando así su control, aún con el uso reciente de vacunas en México.

Se han identificado diferentes cepas virales basadas en la secuencia de la glicoproteína Spike del VDEP, las cuales se caracterizan por poseer inserciones y deleciones. En México hay poca información relacionada con la variabilidad genética en aislados virales *in vitro* y virus de campo.

HIPÓTESIS

Serán identificadas variantes en la secuencia nucleotídica del gen S de los virus causantes de la DEP derivados de brote, re-brote y circulante de granjas donde la enfermedad es endémica.

OBJETIVO GENERAL

Secuenciar el gen que codifica para la proteína Spike para analizar y determinar posibles diferencias genéticas del VDEP a partir de cerdos infectados provenientes de granjas con brote, re-brote y virus circulante donde la enfermedad es endémica.

4.1 Objetivos particulares

Identificar muestras positivas al virus de la diarrea epidémica porcina detectando un segmento del gen M mediante la técnica de RT-PCR.

Amplificar el gen completo que codifica para la proteína Spike del virus de la diarrea epidémica porcina a partir de muestras positivas a la RT-PCR.

Purificar los productos de la RT-PCR, clonarlos y obtener el ADN plasmídico para secuenciar el gen completo que codifica para la proteína Spike utilizando la técnica de secuenciación tipo Sanger.

Realizar análisis comparativos de las secuencias obtenidas por métodos bioinformáticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Muestras

Las muestras se obtuvieron de diferentes granjas sospechosas al virus de la Diarrea Epidémica Porcina. Estuvieron conformadas principalmente por contenido intestinal, contenido estomacal, hisopos rectales con heces, vómito y sobrenadante de cultivos celulares infectados.

- El virus aislado en cultivo celular de la línea celular VERO provino de un pulmón positivo al VDEP de uno de los primeros brotes presentados en México; Jilotepec, Estado de México en el 2014, número de acceso GenBank KM044335.1 (Trujillo-Ortega et al., 2016).
- Hisopo rectal obtenido de la misma granja de donde se aisló el virus del año 2014, en la cual se presentó un re-brote de la enfermedad al inicio del año 2018.
- Intestino delgado y contenido intestinal proveniente de una granja de Lagos de Moreno, Jalisco; en donde la enfermedad es endémica desde el año 2013, cuando el virus llegó a nuestro país.

5.2 Procesamiento de las muestras

La extracción del material genético viral se realizó con el kit de extracción QIAamp® Viral RNA Mini Kit QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante. Para la determinación de las muestras positivas al virus de la diarrea epidémica porcina se realizó RT-PCR punto final, la cual amplifica un segmento del gen M del VDEP, la pareja de iniciadores que se utilizaron como método de escrutinio, fueron los reportados por (Kweon et al., 1999), los cuales amplifican un segmento de 370 pb del gen M, el cual es el más conservado del VDEP, (P1 5’-GGACACATTCTTGGTGGTCT-3’ y P2 5’-GTTTAGACTAAATGAAGCACTTTC-3’). La reacción de RT-PCR se realizó con el kit comercial OneStep QIAGEN® de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain de Thermo Fisher Scientific.

Las muestras que resultaron positivas al VDEP mediante la amplificación del gen M , se utilizaron para amplificar el gen completo que codifica para la proteína Spike del virus, utilizando la combinación de algunos de los iniciadores reportados por (Van Diep, Norimine, Sueyoshi, Lan, & Yamaguchi, 2017) y otros diseñados por el MC. MVZ Eduardo Aguilar. En el cuadro 1 se enlistan los iniciadores con su secuencia, tamaño y posición en el genoma viral, los reportados por el artículo tienen el sufijo CS y los otros diseñados presentan el sufijo SPED.

Cuadro 1. Pareja de iniciadores utilizados para la amplificación del gen completo que codifica para la proteína Spike del virus de la diarrea epidémica porcina.

	Identificación	**Secuencia**	**Tamaño**	**Posición en genoma cepa CV777**
A	1SPEDVfwd	GTGGCGCTGTGATTGACGGCAAC	1066 pb	20378
	CS1-R	CATGCACCAAAGTGGAATCATT		21444
B	CS2-F	AATGGCCACATACCAGAAGG	253 pb	21372
	1SPEDVrvs	GAGCCTTCAGCAAGAATGAC		21625
C	2SPEDVfwd	TGGCGTTTGTAATGGAGCTG	754 pb	21536
	CS2-R	GTGAAATGGTAAATTGTCTAGTGTCAA		22290
D	CS3-F	GCATCTGACACTACTATCAATGG	1231 pb	22224
	3SPEDVrvs	ACACCAGGTAGTACCATGAC		23455
E	4SPEDVfwd	GTTCTAATGGTCGCTCTGTG	452 pb	23383
	CS4-R	CAATAGAACTAGAAATGGCTTGGAAG		23835
F	4SPEDVfwd	GTTCTAATGGTCGCTCTGTG	959 pb	23383
	4SPEDVrvs	CTGGTAGTTGGTCTCTAGTC		24342
G	5SPEDVfwd	TCGCGACGTATGTTTGAACC	740 pb	24248
	Orf3PEDVrvs	ATTGCGCCTCAAAGAAGACG		24988

En la figura 4 se esquematiza el genoma del virus de la diarrea epidémica porcina y la ubicación de los iniciadores del cuadro 3 para la amplificación del gen S completo. El fragmento A abarca una pequeña porción final del ORF1b, el fragmento B, C, D, E y F se sitúan a lo largo del gen S. El fragmento G se localiza hacia la porción final del gen S y abarca la primera porción del ORF3, con la finalidad de cubrir por completo el gen S al llevarse a cabo la reacción de secuenciación.

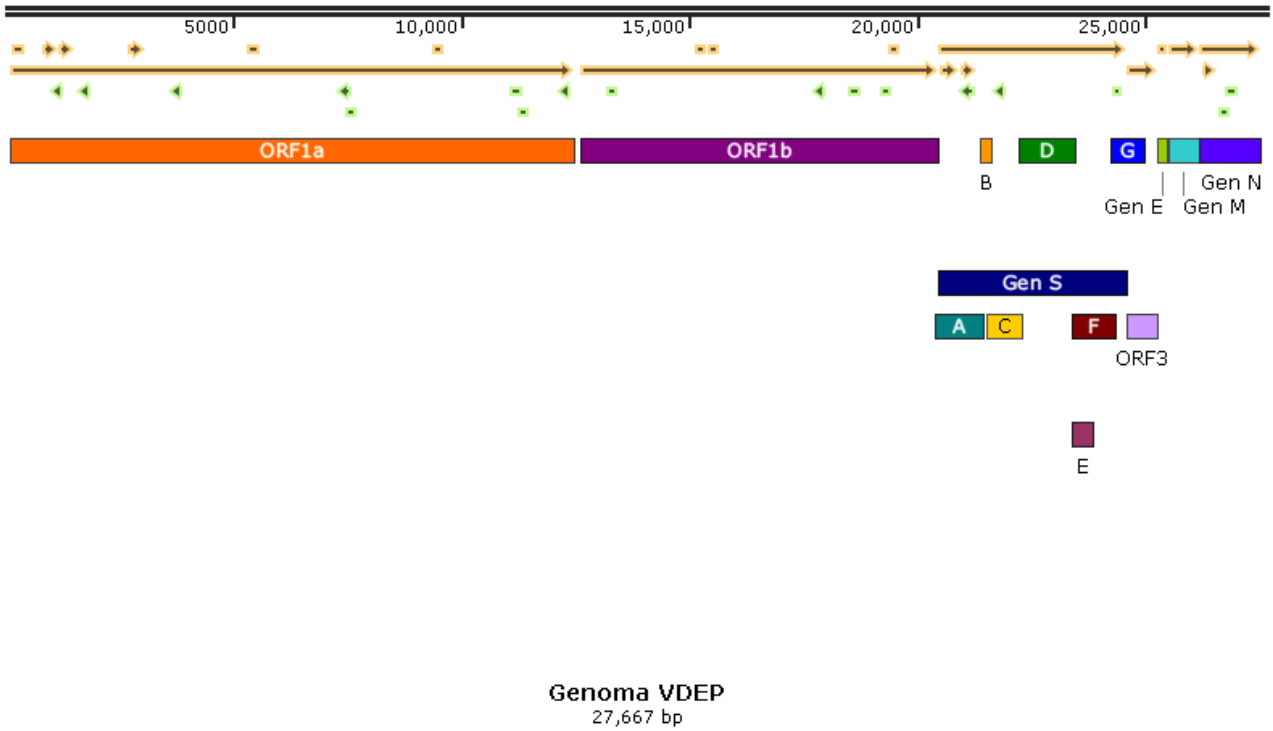

Figura 4. Representación gráfica del genoma del VDEP. Se muestra el gen S y los pares de oligonucleótidos (A-G) utilizados para su amplificación.

Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión (TopVision Low Melting Point, Thermo Scientific) al 1% teñido con SYBR® Safe DNA Gel Strain de Thermo Fisher Scientific. Las bandas del tamaño esperado se cortaron y purificaron con el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit, QIAGEN.

Posteriormente los productos fueron cuantificados con el Espectrofotómetro NanoDrop™ Lite y para obtener una mayor concentración de ADN de algunas muestras se decidió re amplificarlas utilizando el kit PCR Master Mix Thermo Scientific, se volvieron a purificar con el kit ya antes descrito. Toda la metodología se llevó a cabo siguiendo los protocolos del fabricante.

Con el fin de obtener una mejor calidad de las secuencias, los fragmentos del gen S amplificados por la PCR se clonaron por separado utilizando el kit de clonación, CloneJET PCR Cloning kit, Thermo Scientific, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, para la transformación se utilizaron bacterias *E, coli* DH5α, donadas por la Dra. María Elena Munguía del instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Una vez aisladas las clonas de bacterias transformadas se purificaran los plásmidos con el kit Zyppy Plasmid Miniprep Kit, Zymo y se comprobó por medio de PCR la presencia del inserto de interés de cada uno de los fragmentos.

La técnica de secuenciación fue elaborada por la M. en C Patricia de la Torre en el Instituto de Biomédicas, UNAM. Para la reacción de secuenciación se utilizó el kit "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" de la marca Applied Biosystems, el cual contiene todos los reactivos necesarios para dicha técnica, buffer, dNTP´s, ddNTPs, y la enzima AmpliTaq Gold. Esta reacción de secuenciación se purificó por columnas Centri-Sep, posteriormente se secó en una centrífuga de vacío y se resuspendió en 10ul de Hi-Di Formamide. Las reacciones se separaron por electroforesis capilar en el equipo 3500xL Genetic Analyzer Applied Biosystems.

Finalmente, una vez que se recibieron los archivos de las secuencias se visualizaron y analizaron los electroferogramas utilizando el programa MEGA7, la información se transformó en formato Fasta y se analizó con BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool).

Con la ayuda del programa Clone Manager se construyeron las secuencias consenso, provenientes de las lecturas de la secuencia *forward* y *reverse* de cada fragmento obtenido, así como revisando manualmente el electroferograma y la secuencia en formato fasta, con el fin de evitar lecturas erróneas de las bases.

Para realizar el ensamble del gen completo se utilizó nuevamente el programa MEGA7, con el cual se fue construyendo manualmente la secuencia. Posteriormente se utilizó también este programa para la realización de alineamientos con ClustalW, de nuestras secuencias obtenidas, así como de secuencias mexicanas de interés y secuencias reportadas que se utilizan como referencia. La construcción de los arboles filogenéticos se realizó con el algoritmo Neighbor joining, los cuales se realizaron utilizando el programa Clustal W de Biolinux.

Para la visualización y análisis completo de los alineamientos realizados, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, se utilizó el programa SnapGene. El análisis de los sitios de glicosilación, así como la modelación de la proteína *in silico* se realizó con la ayuda del

sitio web (“Xpasy.org,” 2018). Para la posterior visualización y análisis de la proteína modelada, se utilizó el programa Chimera 1.13.1.

RESULTADOS

6.1 Selección de muestras positivas

Las muestras analizadas mediante la técnica de RT-PCR punto final que amplificaban un segmento del gen M resultaron positivas aproximadamente el 30% al VDEP. En la figura 5 se pueden apreciar los amplicones del tamaño esperado de muestras de contenido intestinal y contenido estomacal provenientes de lechones de una granja de Lagos de Moreno del año 2017, en donde la enfermedad es endémica.

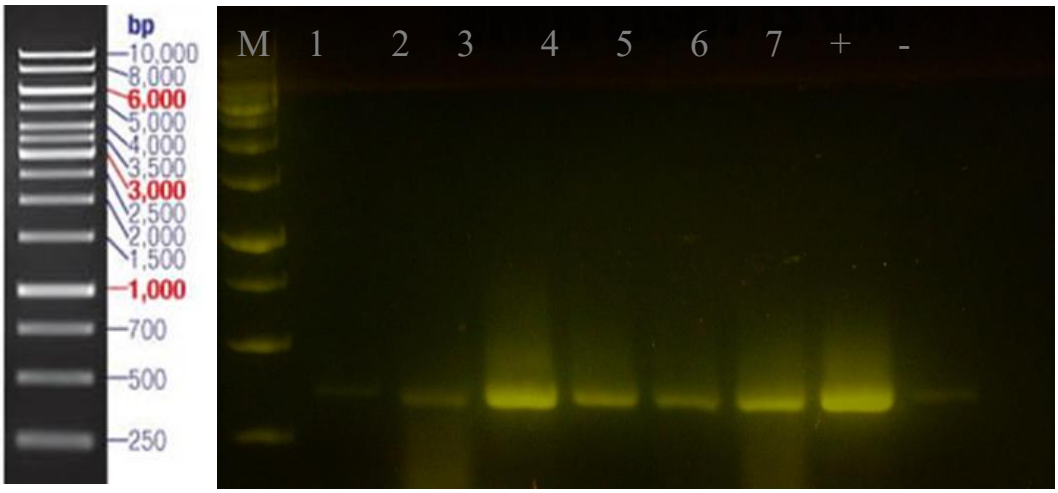

Figura 5. Amplificación de un fragmento de 370 pb del gen M, las muestras positivas corresponden al tamaño esperado. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb (M), los carriles 1, 2 y 5 corresponden a muestras de contenido estomacal, los carriles 3, 4, 6 y 7 corresponden a muestras de contenido intestinal, últimos dos carriles (+) control positivo y (–) control negativo.

6.2 Obtención de los fragmentos del gen S

Las muestras que resultaron positivas a la amplificación del gen M, fueron utilizadas para amplificar seis diferentes fragmentos del gen S. En la figura 6 se aprecian los diferentes fragmentos de los distintos tamaños de acuerdo a la posición en el gen.

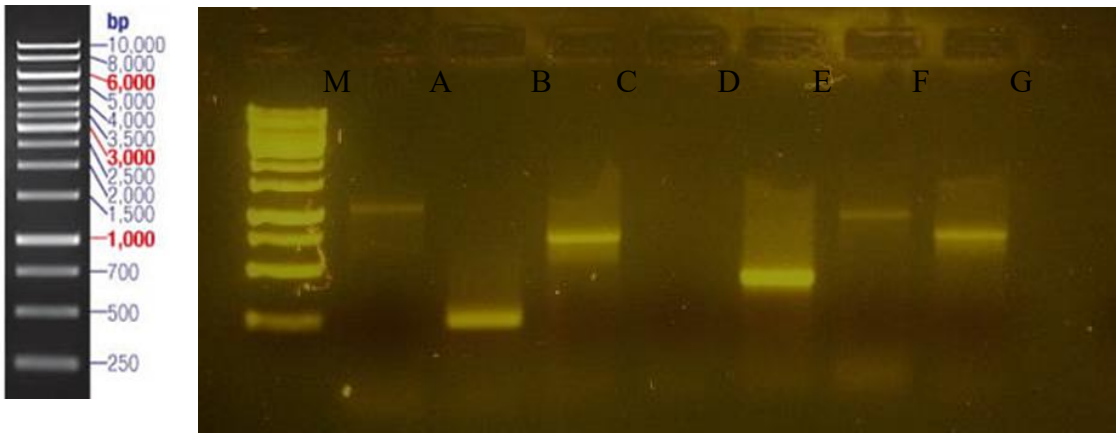

Figura 6. Amplificación de los fragmentos de diferentes tamaños para la obtención del gen completo del gen S, provenientes de la muestra de contenido intestinal. Las letras indican la identificación de dichos fragmentos, los cuales corresponden al tamaño esperado.

Después de purificar los fragmentos de PCR correspondientes al gen S del VDEP, se clonaron y se mandaron a secuenciar, de acuerdo con el protocolo antes descrito. De esta manera se obtuvieron las lecturas de las secuencias de cada una de las tres muestras diferentes con las que se trabajó.

6.3 Análisis de las secuencias de los fragmentos de PCR y obtención de la secuencia nucleotídica del gen S

Los resultados obtenidos de la técnica de secuenciación se visualizaron con la ayuda del programa MEGA7. En la figura 7, en la parte superior se muestra un ejemplo del electroferograma enviado por el servicio de secuenciación correspondiente al segmento B de la muestra de contenido intestinal. En dicha gráfica se puede apreciar claramente la buena calidad de la lectura de la secuencia. Cada pico corresponde a una lectura de la señal de un nucleótido. En la parte inferior se muestra la transformación a formato fasta de la secuencia con la cual se obtuvo la secuencia consenso y se utilizó para el posterior ensamble del gen completo, así como para la realización de los siguientes análisis.

Figura 7. En la parte superior se aprecia la lectura de un electroferograma de la secuencia del fragmento B del gen S del VDEP obtenida de una muestra de contenido intestinal, cada pico de colores corresponde a la señal emitida por cada uno de los nucleótidos secuenciados. En la parte inferior de la figura se observa la transformación de la secuencia a formato fasta y la realización de la secuencia consenso a partir de la secuencia obtenida bidireccionalmente para su posterior análisis.

Después de la obtención de las secuencias consenso de cada fragmento, se realizó un análisis BLASTn a cada una y con ello se pudo determinar con que secuencia ya reportada en el GenBank compartía un mayor porcentaje de similitud. Con estos resultados se determinó la secuencia de referencia utilizada como guía para la realización del ensamble de los fragmentos y con ella la obtención de nuestras secuencias completas del gen S del VDEP. Al realizar dicho análisis, de determinó que nuestras secuencias se alinearon por completo con el gen S del VDEP, el mayor porcentaje de identidad se obtuvo con secuencias reportadas de cepas de origen mexicano, por lo cual se estableció la secuencia con el número de acceso en GenBank MH004420.1, la cual fue originaria de cerdos del Estado de Jalisco del año 2017.

Para ensamblar los diferentes fragmentos y obtener una sola secuencia del gen S de cada muestra secuenciada se utilizó el programa Mega7, con el cual se realizaron alineamientos individuales de cada fragmento con la secuencia de referencia. Todos los cambios observados en las bases con respecto a la secuencia de referencia se verificaron nuevamente con sus correspondientes electroferogramas para asegurarnos que no existieran errores en ellas. En la figura 8 en la parte superior, se puede observar la comparación de las

secuencias consenso y la secuencia utilizada como referencia. En la parte inferior se muestran los electroferogramas con los cuales se construyeron las secuencias consensos. Se realizó la comparación simultánea de ambas con el fin de evitar posibles errores en las secuencias.

Figura 8. Verificación de la secuencia consenso construida, la cual se observa en la parte superior, en la parte inferior se muestra el electroferograma correspondiente. Se realizó la comparación de la secuencia usada como referencia y la consenso, con el fin de visualizar posibles errores en la construcción de la secuencia consenso.

Finalmente se unieron manualmente todos los fragmentos hasta que se construyó una sola secuencia del gen S del VDEP para cada una de nuestras muestras provenientes del sobrenadante de cultivo celular, hisopo y contenido intestinal. En la figura 9 se aprecia la forma manual en la cual se construyó el ensamble final utilizando el mismo programa.

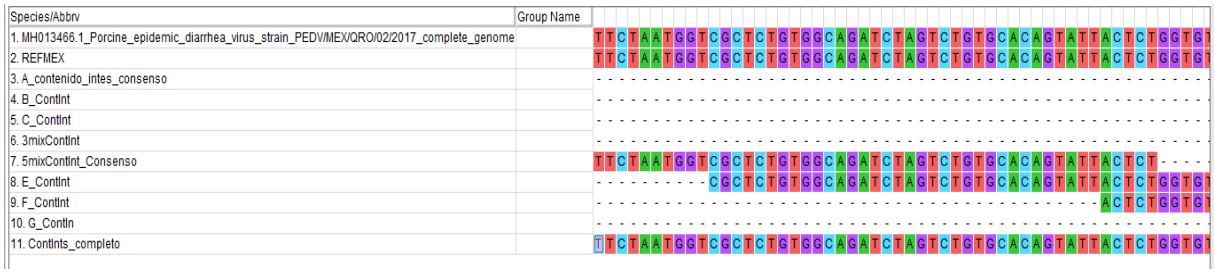

Figura 9. Construcción de la secuencia final del gen S del VDEP al ensamblar los fragmentos secuenciados de manera manual. En la parte superior se visualiza la secuencia utilizada como referencia, cada fragmento secuenciado alineó en su lugar correspondiente para formar una sola secuencia del gen S como se aprecia en el último renglón.

Con la finalidad de verificar si se realizó de forma correcta el ensamble y así visualizar los posibles cambios en las bases entre nuestras muestras y la cepa utilizada como referencia, se realizó un alineamiento de la secuencia completa del gen S del VDEP de nuestras muestras con la secuencia mexicana utilizada como referencia. La figura 10 muestra la alta homología entre nuestras secuencias y la de referencia.

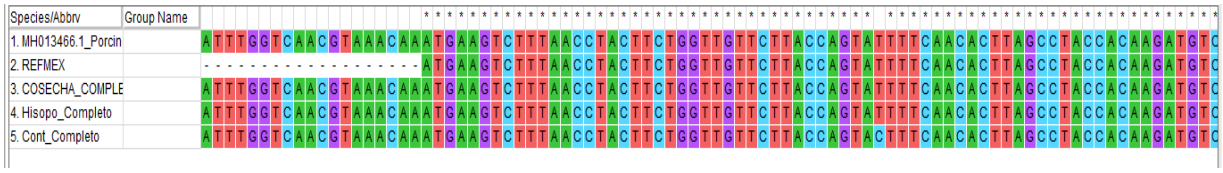

Figura 10. Alineamiento de las secuencias obtenidas del gen S del VDEP con la secuencia de la cepa mexicana utilizada como referencia. Se puede apreciar la alta homología que existe entre ellas.

6.4 Análisis de las secuencias obtenidas con cepas reportadas en México

Una vez que se obtuvo la construcción completa del gen S se realizaron dos diferentes alineamientos utilizando el programa Clustal W; el primero fue utilizando nuestras secuencias obtenidas (cosecha, hisopo y contenido intestinal), la secuencia que tomamos como referencia del Estado de Jalisco 2017, así como las secuencias mexicanas reportadas dentro del periodo de tiempo de nuestro interés 2014-2018, sesgándolas a solo la región del bajío mexicano, tomando como base las razones e importancia anteriormente descritas. Dichas secuencias se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencias utilizadas en el alineamiento para el análisis de nuestras secuencias obtenidas con secuencias de origen mexicano en el periodo de tiempo de interés.

Número de acceso GenBank	**Lugar de origen de la secuencia**
MH004420.1	Jalisco 2017
---	Cosecha 2014 (brote)
---	Hisopo 2018 (re-brote)
---	Contenido intestinal 2017 (presentación endémica)
MH013466.1	Querétaro 2017
MH006958.1	Michoacán 2013
MH006962.1	Michoacán 2015

KR265766.1	México 2014
MH006964.1	Jalisco 2014
KY828998.1	Jalisco 2016
MH006959.1	Guanajuato 2013
KY828994.1	Guanajuato 2014
MH004412.1	Guanajuato 2016

De lado izquierdo se aprecian los números de acceso de las secuencias en GenBank, de lado derecho se encuentran los lugares de origen y año de dichas secuencias.

Los cambios identificados en el alineamiento de las secuencias analizadas de origen mexicano, fueron visibles en la región S1, la cual es descrita como la región más variable del gen S. En la figura 11 se ejemplifican algunos de los cambios observados a lo largo de las secuencias de cepas de origen mexicano. Las primeras cuatro secuencias corresponden a la cepa utilizada como referencia; Jalisco 2017, seguida por la secuencia de contenido intestinal (presentación endémica), cosecha (brote) e hisopo (re-brote) respectivamente, así como las otras secuencias de origen mexicano antes descritas. Algunos de los cambios solo están presentes en nuestras secuencias reportadas, tal como lo podemos observar en dicha figura. En la parte superior se identifica un cambio de base de C por T en las secuencias de cosecha e hisopo (brote y re-brote), en la parte inferior de la figura se observa una deleción en estas mismas secuencias.

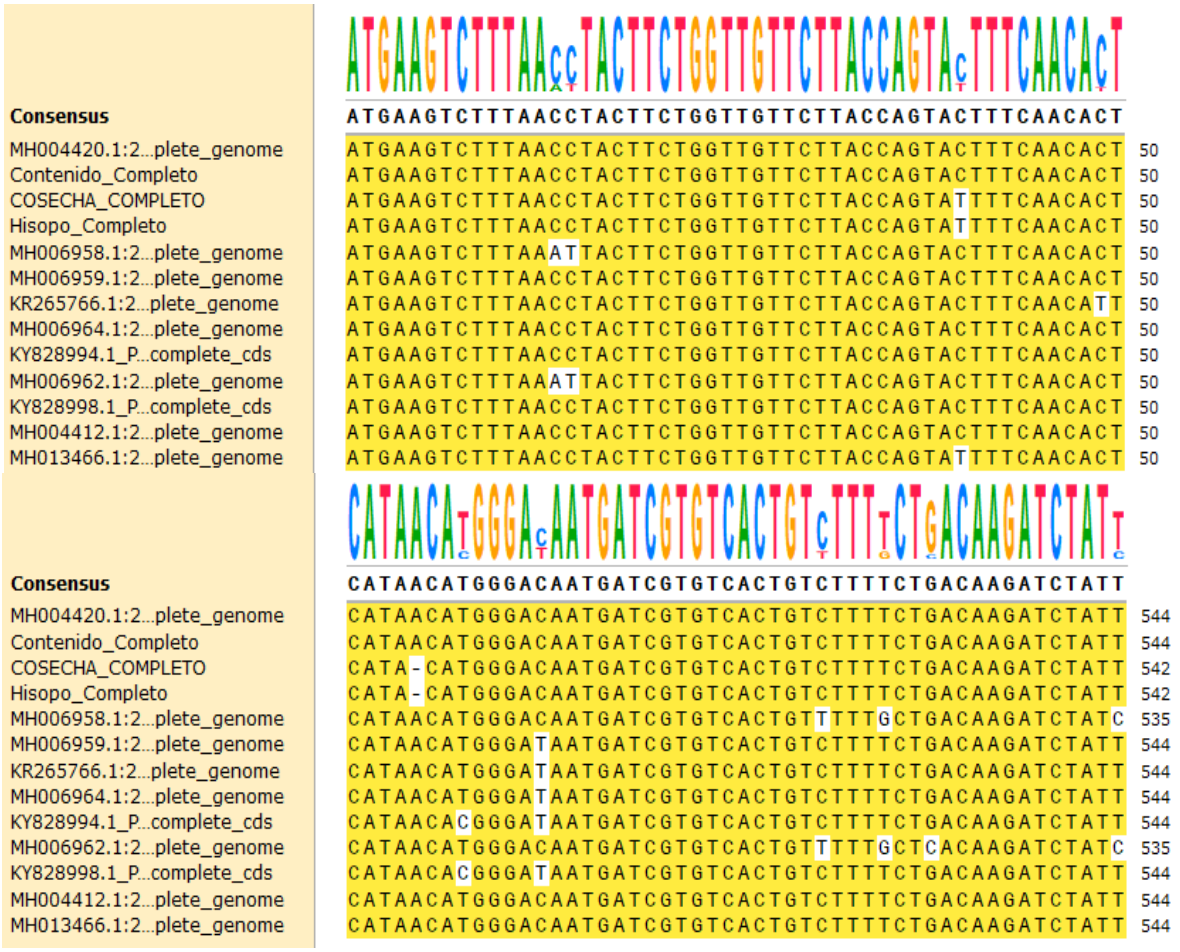

Figura 11. Se observan las divergencias y similitudes presentes en las secuencias, de acuerdo al tamaño de las letras. Al disminuir el tamaño, significa que existen cambios en la secuencia, las letras más grandes indican zonas de homología dentro del alineamiento.

A lo largo de toda la secuencia del gen S del VDEP se identificaron algunas diferencias entre las mismas secuencias reportadas de origen mexicano. Dichos cambios se tratan de sustituciones nucleotídicas, en algunas posiciones los cambios son sinónimos y en otros no sinónimos, dichos cambios fueron evaluados si realmente eran significativos en la estructura y función de la proteína al analizar la secuencia de aminoácidos de nuestras secuencias reportadas. En la figura 12 se ejemplifican algunos de los cambios antes mencionados, los cuales se pueden observar a lo largo de las todas las secuencias analizadas en este alineamiento.

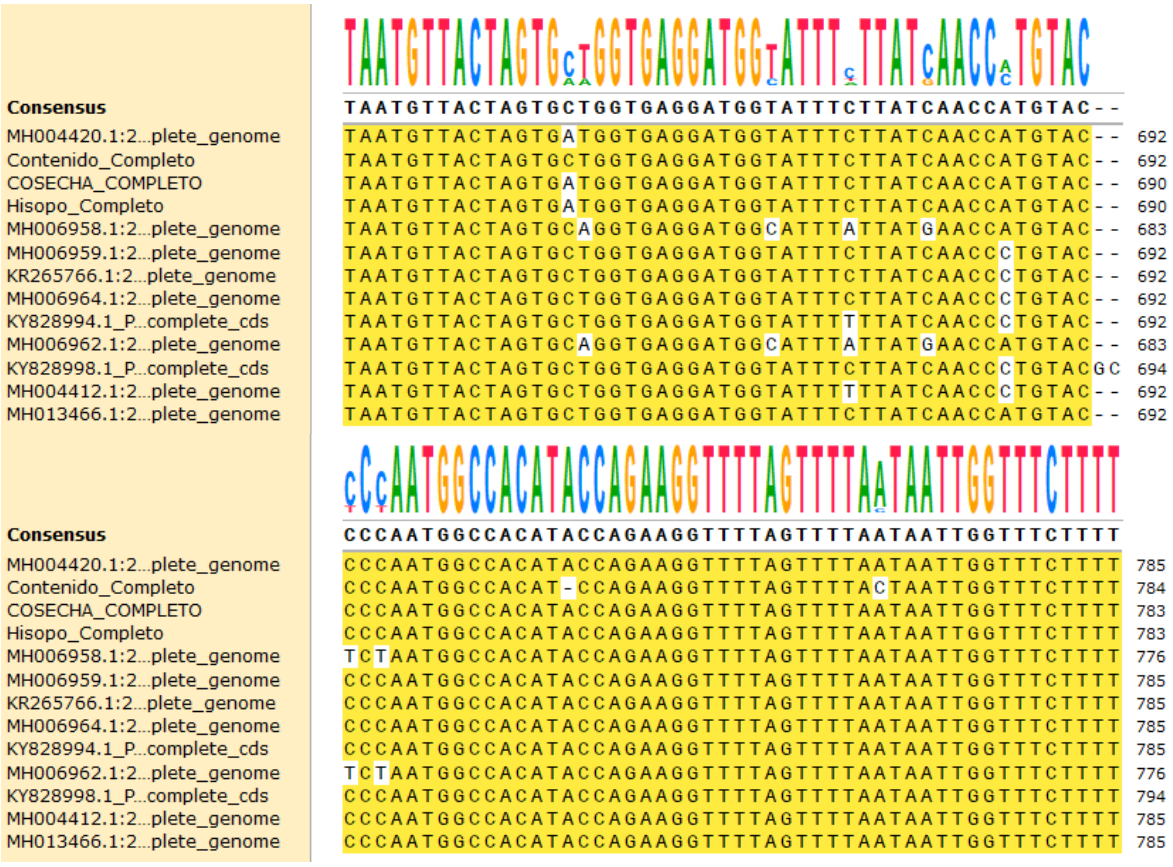

Figura 12. Cambios presentes en las secuencias alineadas del gen S del VDEP. En la parte superior se aprecia un cambio en las secuencias; Jalisco 2017, cosecha e hisopo, los cuales no están presentes en las otras cepas de origen mexicano. También se aprecian otros cambios entre las otras secuencias, los cuales no se presentan en nuestras secuencias obtenidas ni en la cepa usada como referencia. En la parte inferior de la figura se aprecian dos cambios en la secuencia de contenido intestinal, el primero es una deleción y el segundo cambia de A por C en comparación con las secuencias alineadas.

Con base en el análisis del alineamiento de las secuencias de cepas del VDEP de origen mexicano reportadas en el periodo de interés se distinguieron algunos cambios a lo largo de toda la secuencia del gen S, dicho análisis incluyó, no solo las deleciones y cambios en los nucleótidos, si no también se trató de ubicar su posición en el gen y la región a la cual pertenece; región externa del virus, transmembranal, anclada a la proteína de matriz, la presencia de dichos cambios en la secuencia donde se encuentran los sitios de neutralización o en alguna otra donde se proporcionen cambios que influyan en la estructura o función de la proteína Spike. En la figura 13 se muestran algunos de los cambios en nuestras secuencias obtenidas así como su localización en las diferentes

regiones de la secuencia del gen S del VDEP. En la parte superior se muestra el inicio de la secuencia y los cambios se remarcan en color rojo, comparados con la secuencia utilizada como referencia de Jalisco 2017. En la parte inferior de la figura se aprecian cambios en las secuencias de contenido intestinal y cosecha (presentación endémica y brote), en un sitio neutralizante de la región S, en los otros sitios neutralizantes no se presentan ningún tipo de cambios. También se aprecian otros cambios en las otras secuencias mexicanas analizadas dentro de la misma región.

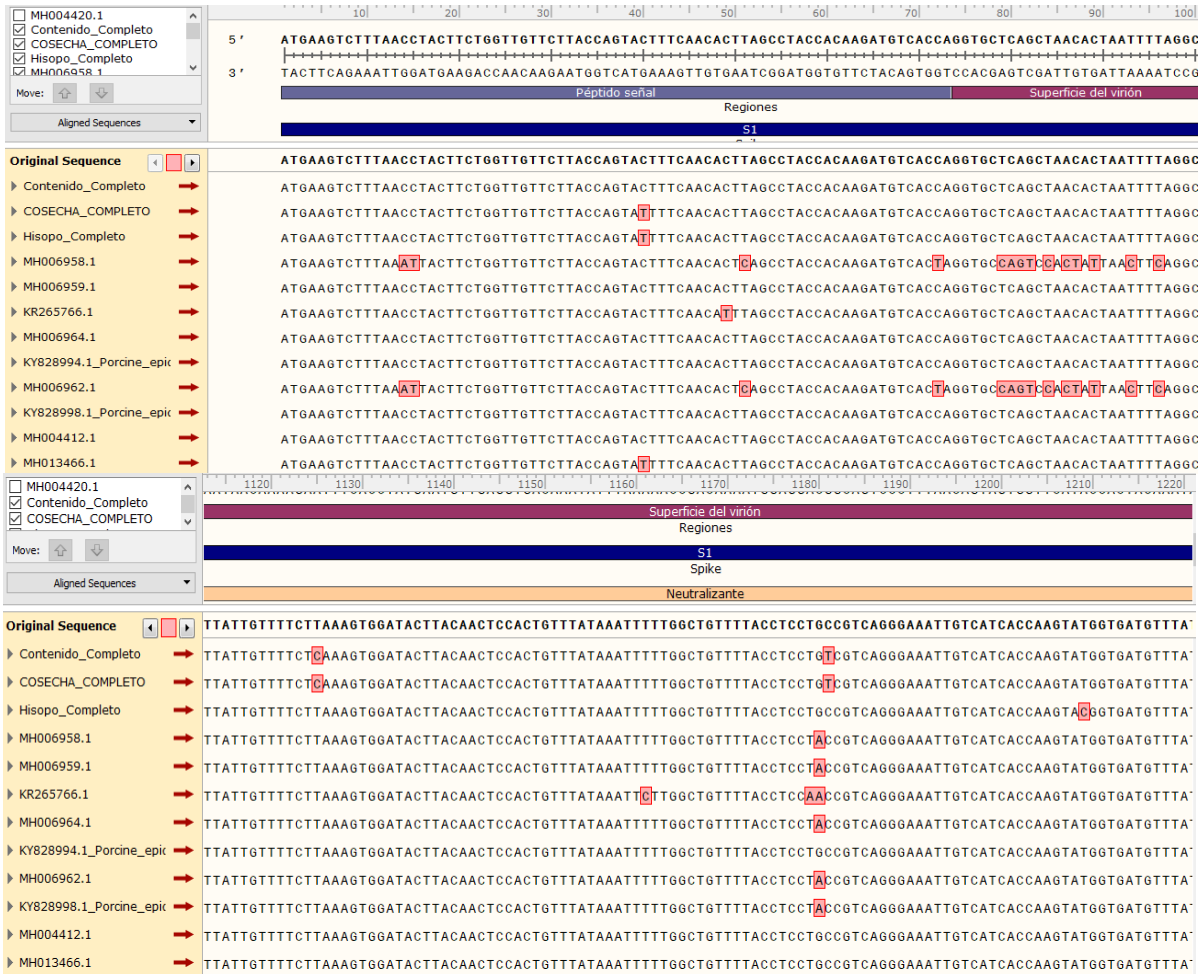

Figura 13. Cambios en las secuencias del gen S del VDEP. En la parte superior se aprecia un cambio de C por T en las secuencias de cosecha e hisopo en la región S1, dentro del péptido señal. En esta misma región existen otros cambios en las diferentes secuencias alineadas. En la parte inferior se muestran dos cambios en las secuencias de contenido intestinal y cosecha, así como otros cambios de las otras secuencias alineadas, en comparación con la secuencia de referencia de Jalisco 2017, todos estos cambios están presentes en un sitio neutralizante en la región S1 del gen S.

De acuerdo con este tipo de análisis no se presentaron otros cambios en las secuencias en las regiones que le dan ciertas características importantes en su función y estructura. Por ejemplo en la región rica en cisteínas, presente en la región C-terminal de la secuencia del gen, así como en la región del motivo de dicha proteína, todas estas presentes en la región anclada a la proteína de matriz en la subunidad S2. En la figura 14 se ejemplifica dicho análisis, es evidente la conservación de la secuencia de nucleótidos entre las cepas mexicanas.

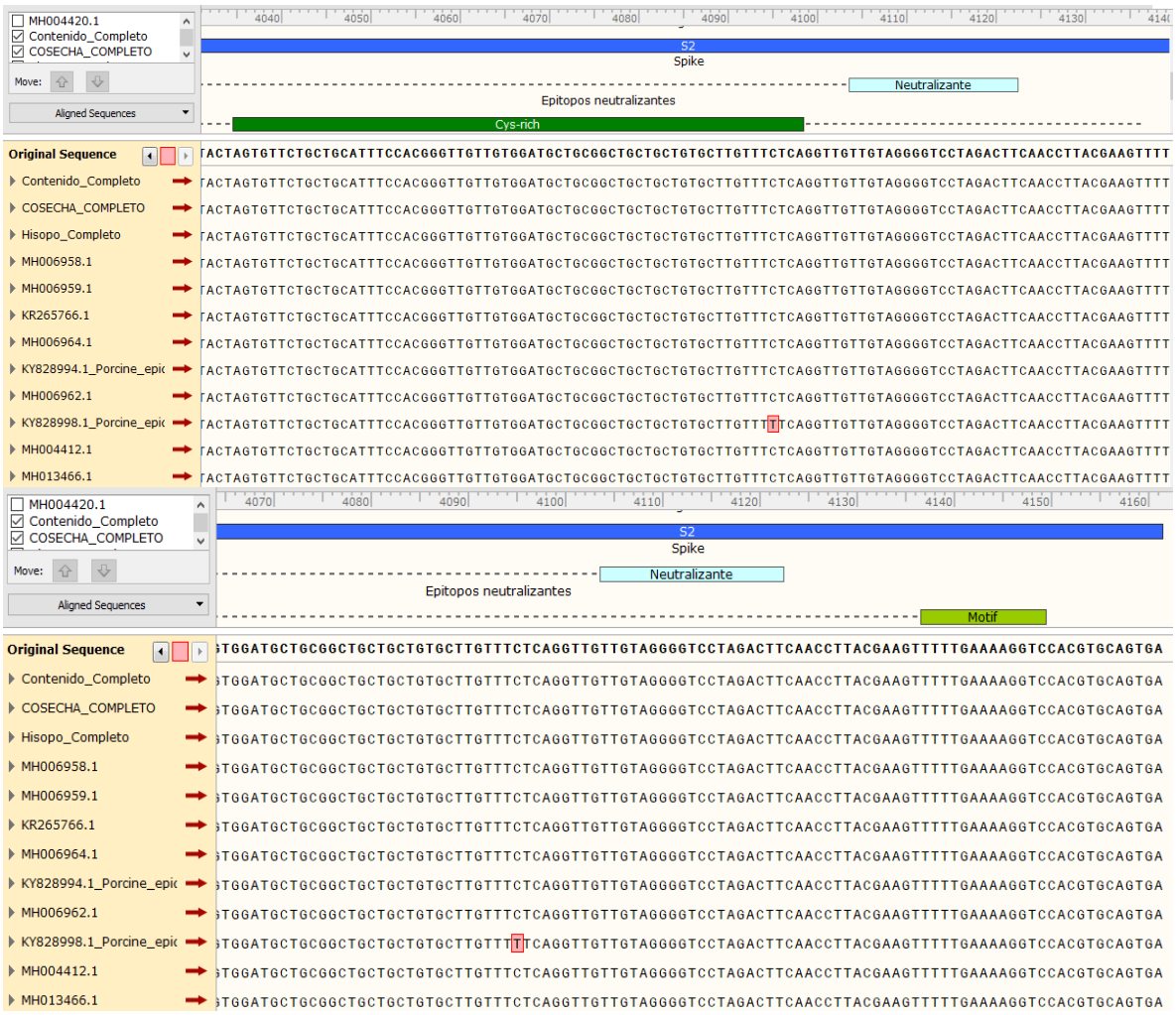

Figura 14. Representación de las regiones de la secuencia del gen S del VDEP que proveen alguna característica de la función o estructura a la proteína, se presenta la región rica en cisteínas en verde obscuro, un sitio neutralizante en azul cielo y un motivo en color verde olivo. Es evidente la conservación en las secuencias en la subunidad S2.

Tal como se ha descrito, existen algunos cambios en nuestras secuencias nucleotídicas del VDEP en comparación con la secuencia con mayor homología, Jalisco 2017, la cual fue utilizada como referencia. Se identificó la presencia de algunas deleciones, mutaciones sinónimas o no sinónimas en las diferentes regiones del gen de la proteína Spike. Dichos cambios se resumen en el cuadro 3, se puede observar que la secuencia que presentó mayor cantidad de cambios es la secuencia de contenido intestinal (presentación endémica) con un número total de 24 cambios, incluyendo una deleción. Las secuencias de cosecha e hisopo (brote y re-brote) cuentan con un total de 19 cambios, incluyendo dos y tres deleciones respectivamente. La mayoría de estos cambios se encontraron en la subunidad S1 de las tres secuencias. La secuencia de cosecha 2014 presenta un total de ocho de estos cambios en sitios neutralizantes, seguido por la muestra de contenido intestinal con cuatro y la muestra de hisopo con tres cambios. La mayoría de estos cambios se presentan en la región de la superficie del virión. La secuencia con un mayor número de cambios es la obtenida de contenido intestinal, la secuencia con mayor cantidad de cambios en sitios neutralizantes es la secuencia derivada de cultivo celular, cosecha 2014.

Cuadro 3. Cambios en las secuencias obtenidas en el estudio con respecto a la secuencia de referencia Jalisco 2017. La mayoría de los cambios se presentan en la subunidad S1 del gen de la proteína Spike del VDEP.

Ubicación y número de cambios en la secuencia	**Contenido intestinal 2017 (presentación endémica)**	**Cosecha 2014 (brote)**	**Hisopo 2018 (re-brote)**
Número total de cambios	24	19	19
Número total de deleciones	1	2	3
Mutaciones sinónimas	3	2	2
Mutaciones no sinónimas	20	14	14
Subunidad S1	18	16	12
Subunidad S2	6	3	7
Péptido señal	1	1	0
Superficie del virión	23	18	19
Anclado a proteína de matriz	0	0	0
Sitios neutralizantes	4	8	3
Región rica en cisteínas	0	0	0
Motivo	0	0	0

6.6 Análisis de las secuencias obtenidas respecto a cepas de referencia a nivel mundial

Se realizó un alineamiento con las secuencias obtenidas en el estudio, la secuencia mexicana de referencia y secuencias que se utilizan como referencia en diferentes estudios por su importancia epidemiológica y el posible flujo de la enfermedad en el mundo. Entre ellas se incluyen la cepa China prototipo de referencia CV777, cepa de Estados Unidos con inserciones y deleciones en el gen Spike (IDELS) Iowa, EUA 2013, así como una cepa reportada en Japón como de alta virulencia OKN-1/JPN/2013. Todas estas pertenecen al mismo periodo de tiempo de nuestro interés. Las secuencias utilizadas para dicho análisis se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Secuencias del VDEP utilizadas para el alineamiento y análisis con cepas de referencia a nivel mundial, dicho alineamiento incluye nuestras secuencias obtenidas en este estudio así como la secuencia de origen mexicano que utilizamos como referencia.

N° Referencia GeneBank	**Origen de la secuencia**
MH004420.1	Jalisco 2017 (referencia)
---	Cosecha 2014 (brote)
---	Hisopo 2018 (re-brote)
---	Contenido intestinal 2017 (presentación endémica)
AF353511.1	Cepa CV777 China
KF804028.1	Iowa, EUA, 2013
KF272920.1	USA/Colorado/2013,
AB548623.1	Tokio, Japón, 2013
GU180144.1	Corea del Sur, 2010
KM196110.1	Canadá, 2014
KU836638.1	Yorkshire, Inglaterra, 2016
KX580953.1	Beijing, China, 2013
LC063836.1	OKN-1/JPN/2013

A lo largo de la subunidad S1 del gen S del VDEP de las secuencias analizadas, se resaltan un gran número de cambios entre ellas. La cepa prototipo de referencia CV77 China y LC063836.1 Japón comparte ciertas similitudes entre sus secuencias en la subunidad S1 al compararlas con las otras secuencias alineadas. Es así como entre la mayoría de las secuencias analizadas existe cierta similitud entre ellas en una parte de su secuencia, pero estas difieren con la cepa CV777, y por ello se resaltan algunos cambios. Es de suma importancia la presencia de la estrecha relación que existe entre nuestras secuencias mexicanas, la cepa KF804028.1 Iowa, EUA, 2013 y USA/Colorado/2013, lo cual coincide completamente con los reportes anteriores. En la figura 15 se muestra el alineamiento entre las secuencias ya mencionadas, se observan las similitudes y diferencias entre ellas

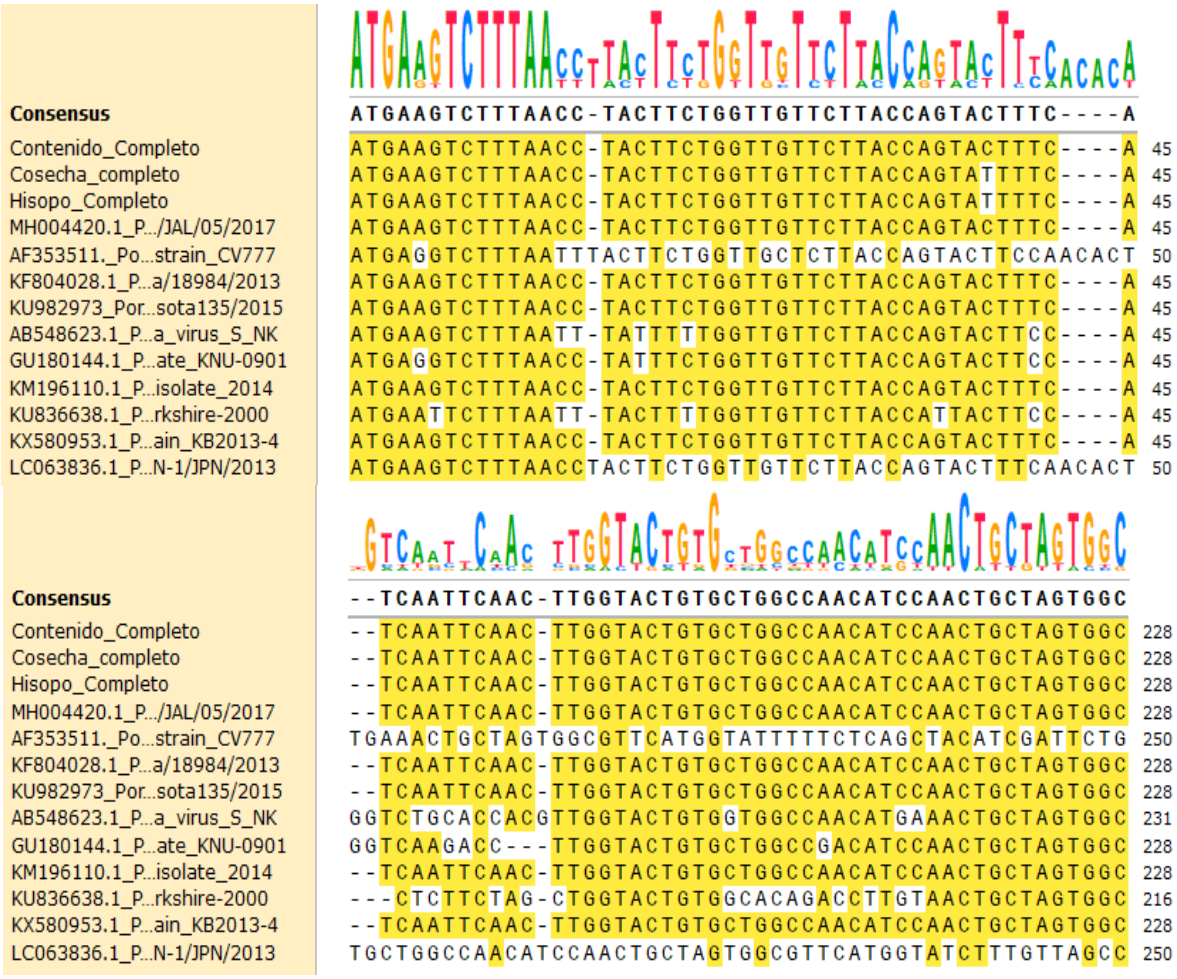

Figura 15. Alineamiento de las secuencias de las cepas de referencia del VDEP. En la parte superior e inferior se observan las similitudes entre la cepa CV777 y LC063836.1 Japón con respecto a las

otras secuencias alineadas. Se observa la gran similitud entre las secuencias obtenidas en el estudio, la cepa mexicana utilizada como referencia MH004420.1 y la cepa KF804028.1 Iowa 2013.

Como se ha mencionado anteriormente, existen cambios entre las secuencias del VDEP alineadas Con respecto a las secuencias obtenidas en el estudio, se aprecian cambios en mayor medida en la secuencia de cosecha e hisopo, provenientes de la misma granja del Estado de México (brote y re-brote), a diferencia de la secuencia de contenido intestinal, la cual se obtuvo de una granja donde la enfermedad siempre ha estado presente desde que el virus llegó a nuestro país, es decir, es endémico en la granja. Además de que, esta región es una gran productora de carne de cerdo, la cual está en constante presión debido a la gran cantidad de animales en granjas cercanas. Esta razón también conlleva a la aparición de ciertos cambios en la secuencia de contenido intestinal, con respecto a las mismas secuencias mexicanas y las otras también usadas.

Es evidente la existencia de cambios en las secuencias analizadas con respecto a la cepa CV777. Se aprecian desde la región del péptido señal, gran parte de la región de superficie del virión, así como la presencia de cambios en los sitios de neutralización. Dichos cambios nos podrían indicar y explicar las razones del porque las vacunas desarrolladas a nivel mundial que utilizan esta secuencia como referencia no proveen la protección esperada en distintas granjas de distintos países. Estos cambios se pueden observar en la figura 16, en donde en la parte superior se ilustran los cambios en la región del péptido señal, así como en la parte inferior se muestran los cambios entre las secuencias con respecto a la cepa prototipo CV777 en los sitios neutralizantes.

A lo largo de la subunidad S2 del gen S del VDEP, la cual es la más conservada a diferencia de la subunidad S1, también se aprecian cambios pero en menor medida debido a esta razón. Los cambios presentes son constantes entre las secuencias utilizadas para el análisis y se comparten también con las secuencias obtenidas en el estudio. Además cabe mencionar que existen algunos otros cambios que solo están presentes en las secuencias obtenidas y la cepa mexicana de referencia con respecto a las otras secuencias analizadas reportadas de diferentes regiones del mundo.

Hacia el último extremo de la secuencia del gen S, también se aprecian la presencia de algunos otros cambios mínimos. Las regiones donde podemos encontrar dichos cambios

pertenecen a la región transmembranal, la región anclada a la proteína de matriz y la región reportada como rica en cisteínas. Sin embargo en el último sitio neutralizante, no existe la

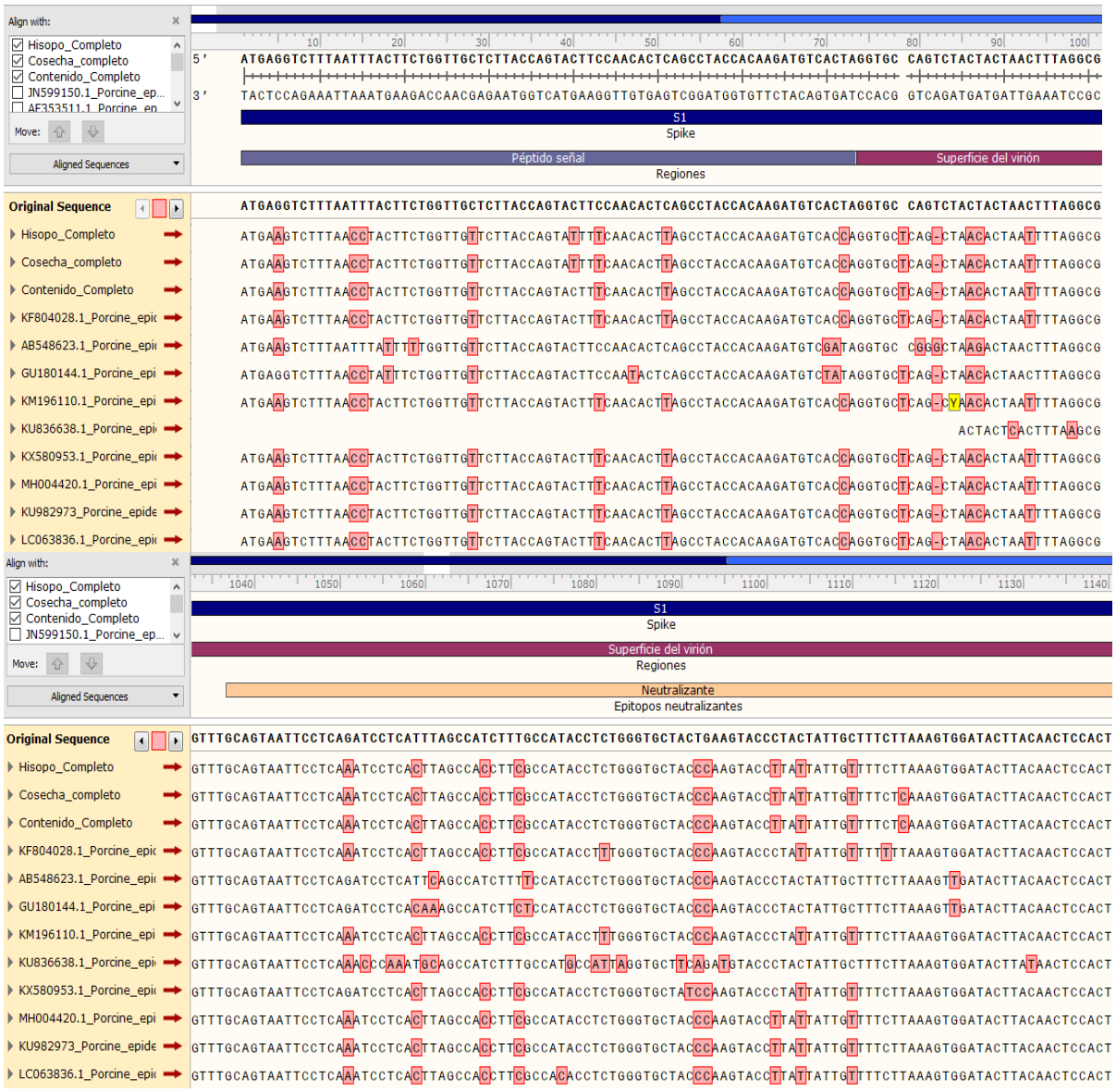

Figura 16. Cambios a lo lago de la secuencia del gen S del VDEP. En la parte superior se aprecian los cambios entre las secuencias alineadas en comparación con la cepa de referencia CV777 con número de acceso en GenBank AF353511.1, en dicho alineamiento corresponde a la secuencia original, en la región del péptido señal y en la región de la superficie del virión. En la parte inferior se muestran los cambios entre las secuencias con respecto a la cepa CV777 en los sitios neutralizantes.

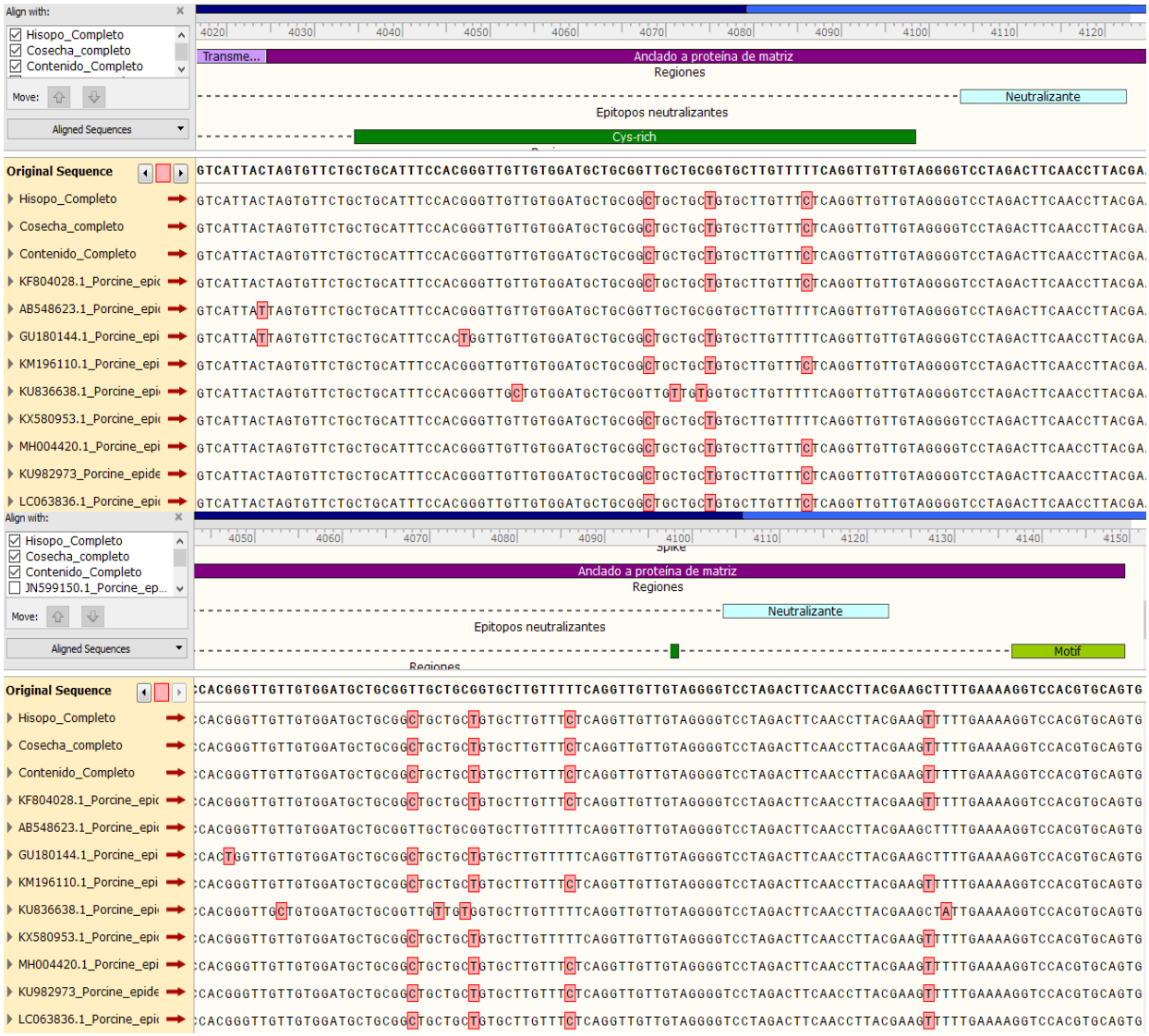

Figura 17. Cambios en la secuencia del gen spike en regiones significativas que proveen características de función y estructura a la proteína. En la parte superior se aprecian cambios en la región rica en cisteínas, en la parte inferior se aprecia la falta de cambios en la región neutralizante y en el motivo.

6.7 Análisis filogenético

Adicionalmente también se realizó un análisis filogenético con secuencias del gen S del VDEP de cepas de origen mexicano y del mundo. Se utilizó el método Neihbor Joining, modelo Tamura Nei, con un valor de Bootstrap de 1000 para la construcción de ambos árboles.

En la figura 18 se muestra el análisis de las secuencias del VDEP mexicanas, donde podemos observar la similitud existente entre las secuencias, su origen y fecha, con ello nos podemos dar una idea del posible flujo de la enfermedad. Las secuencias originarias del Estado de Michoacán se agruparon en una rama, diferente a la de las secuencias obtenidas en el estudio.

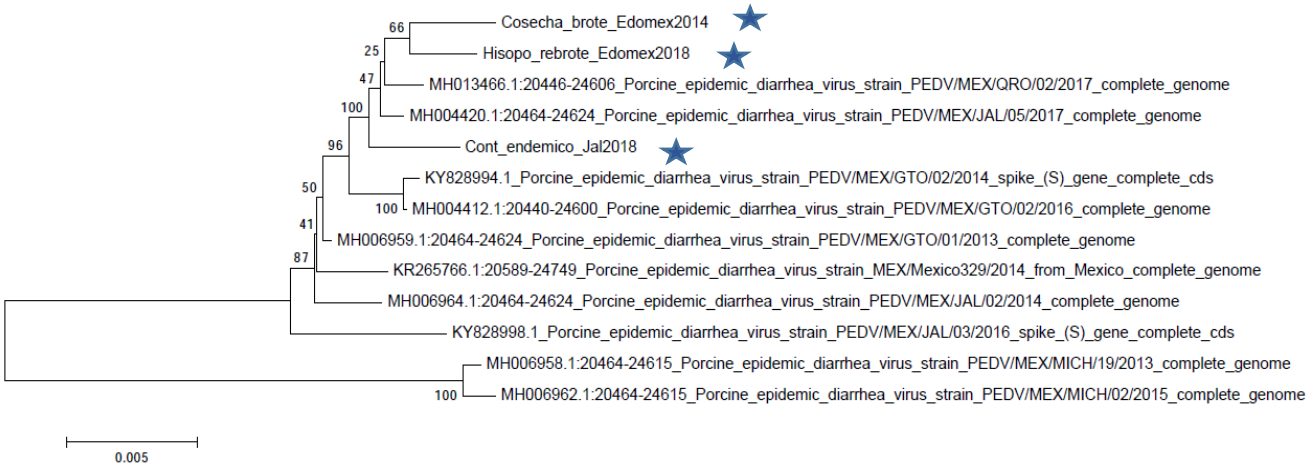

Figura 18. Árbol filogenético de las secuencias de origen mexicano. Se señalan nuestras secuencias reportadas, contenido intestinal (presentación endémica), hisopo (re-brote) y cosecha (brote), muestran estrecha relación con las secuencias de Jalisco 2017 utilizada como referencia y Querétaro 2017. Las secuencias que pertenecen al Estado de Michoacán se agrupan en otra rama.

Respecto a la relación entre las secuencias del gen S del VDEP de distintas regiones del mundo, se observó en el árbol filogenético que las secuencias de la cepa de origen mexicano utilizada como referencia y las secuencias obtenidas en el estudio (brote, re-brote y presentación endémica) se agruparon con las cepas de origen americano, alejándose así de la cepa prototipo CV777 de origen chino, tal como se muestra en la figura 19. En este análisis se agregó la secuencia del gen S del virus de la gastroenteritis transmisible como secuencia externa, con el fin de mostrar la diferencia entre esta secuencia con respecto al gen S del virus de la diarrea epidémica porcina, dicha secuencia se agrupa en una rama completamente independiente.

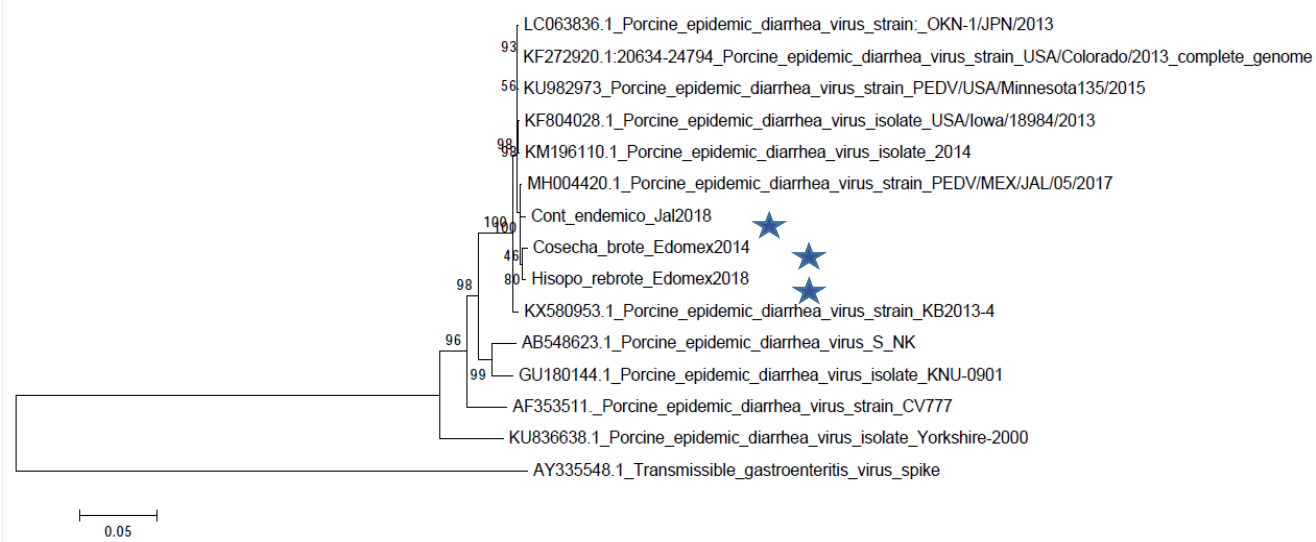

Figura 19. Árbol filogenético de las secuencias del gen S del VDEP mexicanas y de referencia de otras regiones. Se señalan las secuencias obtenidas en el estudio, a partir de contenido intestinal (presentación endémica), hisopo (re-brote) y cosecha (brote). Se observa la estrecha relación que existe entre las secuencias de origen mexicano y las secuencias americanas. La secuencia del gen S del virus de la gastroenteritis transmisible queda fuera del grupo de secuencias del VDEP.

6.8 Análisis de las secuencias de aminoácidos

Considerando los cambios existentes en las bases nucleotídicas de las secuencias analizadas en el apartado anterior, se espera la presencia de cambios en la secuencia aminoacídica.

Se observaron diversos cambios en las secuencias deducidas a aminoácidos obtenidas en el estudio con respecto a la secuencia mexicana utilizada como referencia. En la región del péptido señal, por ejemplo, en la secuencia de cosecha e hisopo (brote y re-brote), se identificó una mutación no sinónima del residuo fenilalanina, que en la secuencia de referencia y contenido intestinal (presentación endémica) fue leucina, sin embargo, ambos aminoácidos son no polares, con lo cual se espera que no se modifique la conformación proteica. Es importante mencionar que aunque existan cambios en las bases nucleotídicas, de acuerdo con el código genético, se pueden presentar distintas combinaciones de codones que dan como resultado el mismo aminoácido (mutaciones sinónimas). Ambas situaciones presentes en el análisis, se ejemplifican en la figura 20.

Los programas utilizados para deducción de nucleótidos a aminoácidos, no identifican los gaps, por lo que al estar presentes cambian el orden de los tripletes y modifican el marco de lectura, es por ello que al analizarlas, en esas partes se presenten cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de referencia, sin embargo *in vivo* estos "errores" son muy significativos, ya que en algunos casos pueden modificar la conformación y función de la proteína.

Dentro de los resultados, también se pudo apreciar cambios en los aminoácidos entre grupos, por ejemplo de un aminoácido polar, treonina, a un no polar, valina, dentro de la secuencia analizada. Aunado a estos cambios, existen otros en donde los aminoácidos pertenecen al mismo grupo, por ejemplo, aminoácidos no polares, por lo cual el cambio de residuo aparentemente no afectaría la conformación de la proteína.

Cabe mencionar que en la región de los sitios neutralizantes o en otros sitios representativos de la función y propiedades de la proteína, ocurrió exactamente lo mismo que lo descrito anteriormente, cambiando las bases nucleotídicas y la deducción de aminoácidos en donde no difirieron los aminoácidos codificados por la secuencia, siendo exactamente el mismo en la proteína.

A lo largo de toda la secuencia de aminoácidos, en la subunidad S1 y S2, se pudo observar que no existen muchos cambios en la secuencia, que aunque en la secuencia nucleotídica si se presentaban, al deducir a aminoácidos (mutaciones sinónimas), estos cambios dejan de ser significativos en la secuencia del gen S que codifica para la proteína spike. De igual manera ocurre en las regiones de estas subunidades, incluyendo los sitios de neutralización, el péptido señal, péptido de fusión, así como en la región transmembranal, el sitio de anclaje a la matriz, la región rica en cisteínas y el motivo de la proteína. Lo cual nos indica que existe una gran conservación en la secuencia que provee características importantes a la proteína y sin ellas se perdería la función y conformación.

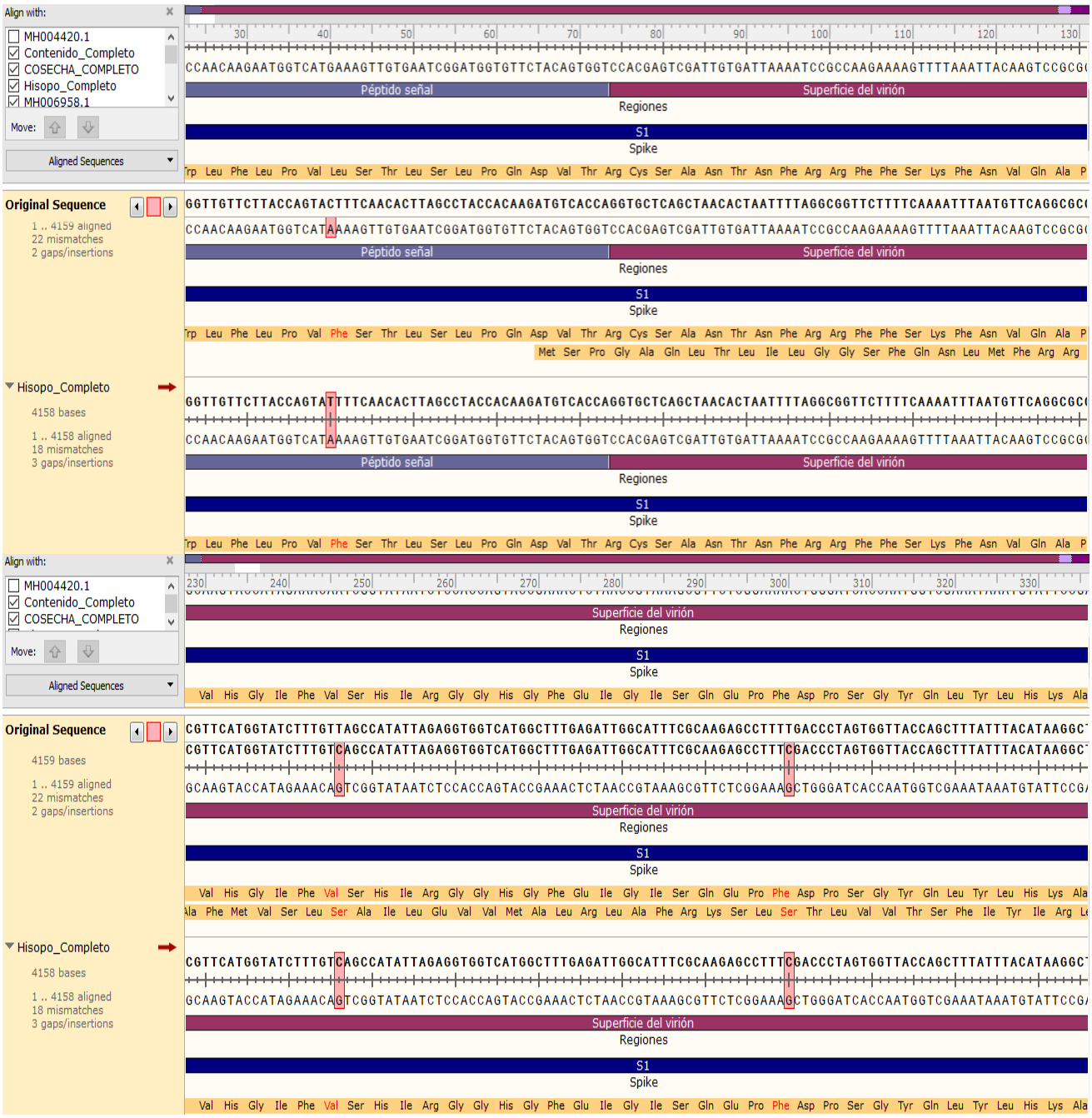

Figura 20. Deducción de la secuencia nucleotídica a aminoácidos. En la parte superior se presentan cambios de residuos del mismo grupo en las secuencias analizadas con respecto a la secuencia utilizada como referencia, donde el cambio es de leucina a fenilalanina en las secuencias de cosecha e hisopo. En la parte inferior de la figura se presentan mutaciones sinónimas en la secuencia nucleotídica que no modifican la secuencia de aminoácidos.

6.9 Análisis de los sitios de glicosilación

Aunado al análisis anterior de la secuencia aminoacídica, y debido a la que la proteína Spike es una glicoproteína, se decidió realizar un análisis de los posibles sitios de glicosilación, con la ayuda de la herramienta de predicción de los sitios de glicosilación del sitio web ("Xpasy.org," 2018.). Dicho análisis se realizó para determinar los sitios de N-glicosilación y O-glicosilación para cada una de las secuencias obtenidas en el estudio. Estos resultados se muestran en el cuadro 5 y 6 respectivamente.

N-Glicosilación

Cuadro 5. Sitios de N-glicosilación en las secuencias obtenidas en el estudio de la proteína Spike del VDEP.

	Posición	**Secuencia**	**Cambio**	**Valor**
Contenido intestinal	62	NSTW	No	0.6833
	118	NATA	No	0.7322
	216	NVTS	No	0.7931
	323	NDTS	No	0.6851
	350	NSSN	No	0.6619
	780	NISI	No	0.6589
	1248	NKTL	No	0.7340
	1260	NRTG	No	0.5731
	1272	NATY	No	0.2814
Cosecha	62	NSTW	No	0.6833
	118	NATA	No	0.7322
	214	NVTS	No	0.8059
	322	NDTS	No	0.6851
	349	NSSN	No	0.6619
	779	NISI	No	0.6740
	1247	NKTL	No	0.7340
	1259	NRTG	No	0.5731
	1271	NATY	No	0.2816
Hisopo	62	NSTW	No	0.6833
	118	NATA	No	0.7323
	214	NVTS	No	0.8059
	321	NDTS	No	0.6853
	348	NSSN	No	0.6698
	778	NISI	No	0.6589
	1246	NKTL	No	0.7340
	1258	NRTG	No	0.5732
	1270	NATY	No	0.2816

O-Glicosilación

Cuadro 6. Sitios de O-glicosilación en las secuencias obtenidas en el estudio de la proteína Spike del VDEP.

	Posición	**Secuencia**	**Valor**
Contenido intestinal	1021	No	0.537952
	1265	No	0.509202
Cosecha	130	No	0.558992
	143	No	0.518692
	1020	No	0.534289
	1264	No	0.5
Hisopo	130	No	0.560586
	143	No	0.512801
	1019	No	0.536519
	1263	No	0.507722

Después de la predicción de dichos sitios se realizó la identificación de ellos en cada una de las secuencias generadas, con la finalidad de conocer la presencia de cambios en ellas en los sitios de N y O glicosilación. De acuerdo con este análisis no se identificó ningún cambio en las secuencias del estudio, tal como se ejemplifican en la figura 21.

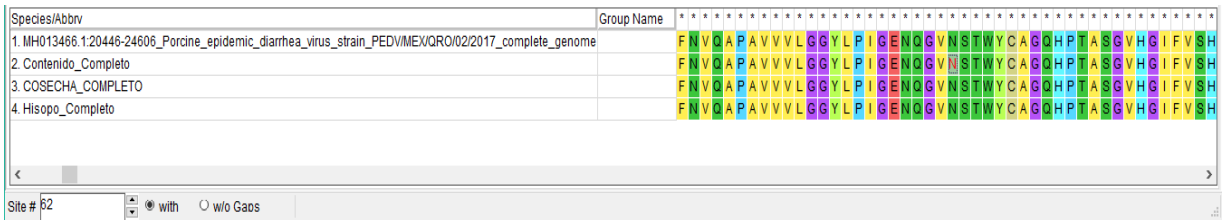

Figura 21. Análisis de los sitios de glicosilación en la proteína spike del VDEP en las secuencias obtenidas en el estudio, observe que no se identificaron cambios.

6.10 Modelación de la proteína

Posterior a los análisis antes mencionados, se modeló la proteína Spike del VDEP utilizando cada una de las secuencias obtenidas en el estudio. Se comparó con la región ya reportada y cristalizada de dicha proteína. En la figura 22 podemos observar el modelo de la proteína S con la secuencia de aminoácidos deducida obtenida de la muestra de contenido intestinal (presentación endémica) y su comparación con la región de la proteína de referencia cristalizada con la cual coincide totalmente. También se resaltan los sitios

neutralizantes donde obtuvimos cambios entre nuestra secuencia y la cepa prototipo China CV777.

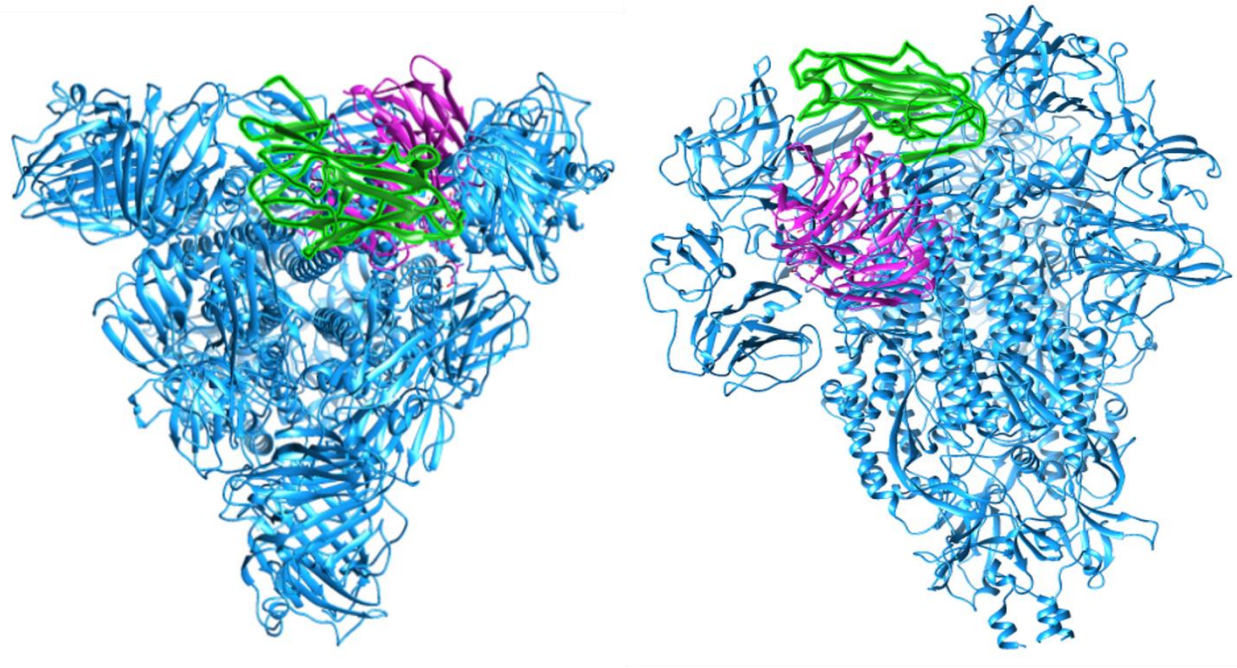

Figura 22. Se muestra el modelo de la proteína spike del VDEP de la secuencia deducida a aminoácidos obtenida de la muestra de contenido intestinal (presentación endémica) vista en dos diferentes ángulos (color azul). En color morado se aprecia la proteína de referencia 10.2210/pdb4J79/pdb del VDEP. En color verde se marcan los sitios de neutralización en donde se presentaron algunos cambios en comparación con la secuencia de la cepa prototipo China CV777. Los cambios reportados no marcan diferencia en la forma del ensamble ni en los sitios de glicosilación, lo cual no afecta aparentemente la conformación de la proteína Spike.

DISCUSIÓN

El virus de la diarrea epidémica porcina causa una enfermedad entérica aguda en los cerdos, lo que genera importantes pérdidas económicas para la industria porcina en todo el mundo. Los enfoques actuales de vacunación contra este coronavirus emergente son solo parcialmente efectivos, aunque la infección natural protege a los cerdos contra la reinfección y proporciona inmunidad lactogénica a los lechones lactantes (Jung & Saif, 2015; S. Y. Kim et al., 2001; Kweon et al., 1999; C. Li et al., 2017).

Debido a que la proteína codificada por el gen S del virus de la diarrea epidémica porcina posee grandes funciones en la entrada y salida del virus en la célula hospedera, así como la presencia de sitios de neutralización por anticuerpos y una alta variabilidad, es de suma importancia su análisis, no solo para conocer el ciclo de replicación viral, sino también para su uso y síntesis como posible blanco de vacunas específicas y efectivas contra dicha enfermedad, aunado a estos análisis, también existen estudios para determinar la variabilidad genética del VDEP y de epidemiologia molecular, los cuales arrojan una gran cantidad de información de dicha infección viral.

La heterogeneidad del gen S de las cepas del VDEP se identificó por primera vez en Corea en 2010 (D. K. Lee et al., 2010). Posteriormente desde octubre del 2010 se identificó una variante del virus de la diarrea epidémica porcina, la cual afectaba a lechones y causó pérdidas económicas devastadoras a las cerdas en provincias del sudeste de China (X. Chen et al., 2012). Los brotes de la enfermedad causada por el virus tuvieron una mayor importancia en dicho año cuando estos brotes fueron causados por nuevas cepas más patógenas que las clásicas observadas en la década de 1980. De acuerdo con (J. Chen et al., 2010) en el 2010 se reportaron variantes del VDEP en algunas granjas porcinas que fueron vacunadas con virus inactivado basadas en la cepa CV777 antes del brote. Identificándose así, una nueva variante del virus, con algunas inserciones en la proteína S en comparación con la cepa CV777, lo cual atribuyen al resurgimiento de dicha infección (W. Li et al., 2012).

En el año 2013, estas cepas patógenas se propagaron por América, después del primer caso reportado en los Estados Unidos en abril de dicho año, en donde el virus era idéntico a la

cepa de China reportada en el 2010, emergió o reapareció la enfermedad en la industria porcina de todo el mundo (Huang et al., 2013; S. Lee & Lee, 2014; Marthaler et al., 2013).

Durante este mismo brote en los Estados Unidos, se definieron dos cepas del VDEP denominadas S-Indel y no S-Indel debido a la posesión de un conjunto de inserciones y deleciones observadas en la glicoproteína Spike. Estas cepas están estrechamente relacionadas con las cepas clásicas, incluida la cepa China CV777, lo cual podría indicar la presencia de inserciones y deleciones dentro de las proteínas S de estas cepas clásicas. Posteriormente se demostró que los virus S-Indel y no S-Indel causan diferentes grados de mortalidad en los lechones, las cepas S-Indel del VDEP aparentemente representan los virus menos patógenos. Tal como se muestra en el análisis filogenético de las cepas del mundo, las cepas americanas muestran una gran relación con las cepas de Canadá, México, Corea y Taiwan (Choudhury, Dastjerdi, Doyle, Frossard, & Steinbach, 2016; C. Li et al., 2017; Suzuki, Terada, Enjuanes, Ohashi, & Kamitani, 2018).

En una gran cantidad de estudios se toma como referencia la cepa China CV777 del virus de la diarrea epidémica porcina, para realizar un sin número de experimentos y análisis de dicho virus. Cuando la enfermedad llegó por primera vez a los Estados Unidos en el 2013 el análisis de la secuencia del virus indicaba una similitud del 99% con la cepa China CV777. En México, en ese mismo año se presentó también la enfermedad, los análisis demostraban la estrecha relación con el aislado mexicano y la cepa reportada en los Estados Unidos, de hasta un 98% de similitud, lo cual nos indica que el virus en México proviene directamente de la cepa China (Choudhury et al., 2016).

Los resultados del alineamiento de las secuencias obtenidas en el presente estudio con la secuencia mexicana que utilizamos como referencia y las secuencias que se utilizan como referencia en diferentes estudios por su importancia epidemiológica y el posible flujo de la enfermedad a nivel mundial, mostraron algunos cambios en la secuencia nucleotídica, así como en menor medida, pero no menos importante en la secuencia aminoacídica. Adicionalmente, este resultado sugiere un posible flujo de la enfermedad, ya que las muestras analizadas pertenecían al estado de México y Jalisco. Dichos estados forman parte del bajío mexicano, la cual es una región donde se concentra una gran cantidad de la población y producción porcícola.

En el 2013 también se registraron brotes altamente virulentos de dicha enfermedad en el norte de América y el este de Asia, incluyendo Taiwán. Aunado a esto, se han desarrollado vacunas para el control del VDEP en gran parte del mundo, sin embargo, no han sido del todo eficaces. De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de nuestras secuencias y el alineamiento con las otras secuencias a nivel mundial y en comparación con la cepa prototipo de China CV777, se identificaron cambios en la secuencia, los cuales podrían ser unas de las razones del porque la vacuna desarrollada con esa cepa no ofrece la protección deseada en las piaras.

Tal como se mencionó anteriormente, entre las proteínas estructurales, la proteína Spike, es responsable del reconocimiento de virus-huésped, la internalización del virus y la inducción de anticuerpos neutralizantes; es el principal determinante antigénico viral. Esta proteína Spike es ensamblada naturalmente con una estructura homotrimérica, la cual contiene varios sitios de glicosilación. También se sabe que esta glicoproteína se puede dividir en dos dominios S1 y S2 delimitados por el sitio de escisión específico. El dominio S1 contribuye al reconocimiento del receptor, la enteropatogenicidad y la inmunogenicidad, ya que contiene los epítopos neutralizantes dominantes, por lo que es el principal objetivo para el desarrollo de vacunas. Al vincularse con el S1, el dominio S2 se ancla en la membrana viral y provoca la fusión de la membrana (Chang, Hsu, Chao, & Chang, 2018). Tal como se observó en los resultados obtenidos, la región donde se mostraba una mayor cantidad de cambios en la secuencia, fue en el dominio S1, el cual posee algunos epítopos neutralizantes, usados como blanco para el desarrollo de vacunas contra el VDEP. (C. Li et al., 2017) han descrito la generación y caracterización de anticuerpos monoclonales neutralizantes y no neutralizantes generados contra la subunidad S1 de la proteína Spike. La caracterización de los anticuerpos para la reactividad cruzada y la neutralización cruzada reveló diferencias antigénicas entre las cepas del VDEP. Se identificaron en los sitios de neutralización sustituciones de aminoácidos individuales, los cuales afectaron la unión y neutralización del anticuerpo, tal como los que se observaron en el análisis de las cepas de referencia.

En Asia se han utilizado dos tipos de vacunas comerciales contra el virus de la diarrea epidémica porcina; inactivada y virus atenuado. Sin embargo la protección provista, no es

suficiente para controlar adecuadamente la infección. La protección que ofrece la infección natural es muy efectiva contra una posible re-infección, debido a la inmunidad lactogénica (pasiva) y de mucosa presente en los cerdos. Este último tipo de inmunidad (humoral) en el tracto entérico es un tipo de protección crítica para enfermedades entéricas. Las inmunoglobulinas IgA producidas son altamente resistentes a cortes proteolíticos en el tracto digestivo de los cerdos (C. Li et al., 2017).

De acuerdo con (C. Li et al., 2017) y tal como se mostró en los resultados del presente trabajo, la región N-terminal en la subunidad S1 muestra un alto grado de diversidad genética entre las cepas del VDEP, caracterizado por inserciones y deleciones. Esta diversidad puede contribuir con la variación en el sitio de unión y actividad con el hospedador, a pesar de esto, de acuerdo con el análisis realizado se pudo determinar la ausencia de cambios en los sitios de glicosilación de la proteína Spike, los cuales son de suma importancia para la función de la proteína. Sin embargo, el conocimiento de los epítopos neutralizantes, su naturaleza y ubicación en la estructura del gen S, así como los mecanismos por los cuales los anticuerpos interfieren con la infección es escaso. La generación de información al respecto podría indicar si la ineficacia de las vacunas utilizadas, no solo es a causa de las diferencias que existen entre las cepas actuales y la cepa prototipo vacunal de China, sino que también es importante el diseño de vacuna, el sitio de inmunización y con ello el tipo de inmunidad protectora que ofrece (Makadiya et al., 2016).

Respecto al análisis de la modelación de la proteína S la estructura no resulto modificada por los diferentes cambios observados a lo largo de la secuencia analizada. De acuerdo con (Walls et al., 2016) se ha establecido la conservación en *alfacoronavirus* de la proteína S, en los sitios que ofrecen características importantes a la proteína, tanto de estructura como de función, tal como lo es específicamente la región del péptido de fusión, lo cual refuerza la posibilidad de llegar a usarse como un blanco específico para las vacunas.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se obtuvo la secuencia completa del gen S del virus de la diarrea epidémica porcina a partir de muestras clínicas positivas a dicha enfermedad. Las cuales provinieron de granjas con brote, re-brote y donde la enfermedad es endémica.

Dichas secuencias se analizaron y se determinaron diferencias genéticas del virus, respecto secuencias reportadas en Genbank virus circulante en México, las cuales no sugirieron una modificación de importancia significativa en la función y conformación de la proteína Spike, dicha proteína tiene un papel sumamente importante en el ciclo de replicación del virus ni cambios que repercutan en la antigenicidad.

La dinámica evolutiva de los virus de RNA es compleja debido a sus altas tasas de mutación, rápidas tasas de replicación y grandes tamaños de población. Las múltiples rondas de replicación de un genoma viral dado pueden generar diversas variantes o una población viral heterogénea. Informes previos sobre otros virus de RNA han sugerido que la selección de variantes virales en una población, en lugar de la selección de variantes individuales, que pudieran tener efecto en la patogenicidad y permite la adaptación del virus a nuevos entornos. Esto se muestra en nuestro estudio, donde demostramos que

a pesar del tiempo desde la llegada de este virus a nuestro país, la presión de selección a la que probablemente se enfrenta en las producciones porcinas y la ausencia de vacunación ha permitido que se presenten cambios genéticos en el gen S sin mostrar cambios en la patogenicidad y antigenicidad.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, hasta este momento, podemos observar que después de 5 años de la llegada del VDEP a México, la presentación de casos en nuestro país continúa siendo un problema de salud animal, provocando grandes pérdidas económicas a la industria porcina.

Es necesario proponer más líneas de investigación que contribuyan a la disminución de casos de la enfermedad, así como el constante monitoreo molecular y serológico en granjas de diferentes regiones del país, y continuar con buenas medidas de bioseguridad, que hasta ahora han sido de vital importancia para la disminución de grandes brotes de la enfermedad como en el 2013-2014.

Debido a que actualmente en México se introdujo la vacunación contra el PEDV en 2018, es importante el monitoreo de los cambios genéticos y antigénicos del gen S.

ANEXO DE MATERIALES Y REACTIVOS

Agarose TopVision Low Melting Point, Thermo Scientific™ R0801.

Bacterias competentes *E. coli* DH5α

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit", Applied Biosystems 4337455.

Espectrofotómetro NanoDrop™ Lite.

Kit de clonación, CloneJET PCR Cloning kit, Thermo Scientific K1231.

Kit de extracción QIAamp® Viral RNA Mini Kit QIAGEN. Cat No./ID: 52906.

Kit PCR Master Mix Thermo Scientific K0171.

Kit purificación QIAquick® Gel Extraction Kit, QIAGEN Cat No./ID: 28115.

Kit Zyppy Plasmid Miniprep Kit, Zymo D4036.

SYBR® Safe DNA Gel Stain, Thermo Fisher Scientific S33102.

PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS

Biolinux

Chimera 1.13.1.

Clone Manager

ClustalW

MEGA7

SnapGene

REFERENCIAS

APHIS 2014. USDA Licenses First Vaccine for Porcine Epidemic Diarrhea [Online]. Estados Unidos. Retrieved December 24, 2015, from https://www.aphis.usda.gov/newsroom/2014/06/pdf/sa_pedv_vaccine.pdf

Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*. https://doi.org/10.3390/v4061011

BMEDITORES 2014. Situación Actual de la Diarrea Epidémica Porcina y Estrategias de Control [Online]. Ciudad de México, México. Retrieved September 24, 2014, from http://bmeditores.com/situacion-actual-de-la-diarrea-epidemica-porcina-y-estrategias-de-control/

Chang, C. Y., Hsu, W. T., Chao, Y. C., & Chang, H. W. (2018). Display of porcine epidemic diarrhea virus spike protein on baculovirus to improve immunogenicity and protective efficacy. *Viruses*, *10*(7), 8–10. https://doi.org/10.3390/v10070346

Chen, J., Wang, C., Shi, H., Qiu, H., Liu, S., Chen, X., … Feng, L. (2010). Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Archives of Virology*. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0720-2

Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J. T., Stensland, W. R., Pillatzki, A. E., … Zhang, J. (2014). Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the united states. *Journal of Clinical Microbiology*. https://doi.org/10.1128/JCM.02820-13

Chen, X., Yang, J., Yu, F., Ge, J., Lin, T., & Song, T. (2012). Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) samples from field cases in Fujian, China. *Virus Genes*, *45*(3), 499–507. https://doi.org/10.1007/s11262-012-0794-x

Choudhury, B., Dastjerdi, A., Doyle, N., Frossard, J. P., & Steinbach, F. (2016). From the field to the lab — An European view on the global spread of PEDV. *Virus Research*. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.09.003

Coussement, W., Ducatelle, R., Debouck, P., & Hoorens, J. (1982). Pathology of Experimental CV777 Coronavirus Enteritis in Piglets. I. Histological and Histochemical Study. *Veterinary Pathology*. https://doi.org/10.1177/030098588201900108

Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. In *Coronaviruses: Methods and Protocols*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1

Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2013). *Fields Virology, 6th Edition*. *Fields Virology*. https://doi.org/10.1093/cid/ciu346

Goede, D., & Morrison, R. B. (2016). Production impact & time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Preventive Veterinary Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.010

Hofmann, M., & Wyler, R. (1988). Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*.

Huang, Y., Dickerman, A. W., Piñeyro, P., LI, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., & Meng, X.-J. (2013). Origin , Evolution , and Genotyping of Emergent Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains in the United States. *MBio*. https://doi.org/10.1128/mBio.00737-13.Editor

Ishikawa, K., Sekiguchi, H., Ogino, T., & Suzuki, S. (1997). Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00157-2

Jung, K., Annamalai, T., Lu, Z., & Saif, L. J. (2015). Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. *Veterinary Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.04.022

Jung, K., Eyerly, B., Annamalai, T., Lu, Z., & Saif, L. J. (2015). Structural alteration of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.022

Jung, K., & Saif, L. J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Veterinary Journal*. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.017

Jung, K., Wang, Q., Scheuer, K. A., Lu, Z., Zhang, Y., & Saif, L. J. (2014). Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerging Infectious Diseases*. https://doi.org/10.3201/eid2004.131685

Kim, O., & Chae, C. (2000). In Situ Hybridization for the Detection and Localization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in the Intestinal Tissues from Naturally Infected Piglets. *Veterinary Pathology*. https://doi.org/10.1354/vp.37-1-62

Kim, S. H., Kim, I. J., Pyo, H. M., Tark, D. S., Song, J. Y., & Hyun, B. H. (2007). Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *Journal of Virological Methods*. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.021

Kim, S. Y., Song, D. S., & Park, B. K. (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. https://doi.org/10.1177/104063870101300611

Kusanagi, K., Kuwahara, H., Katoh, T., Nunoya, T., Ishikawa, Y., Samejima, T., & Tajima, M. (1992). Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*.

Kweon, C. H., Kwon, B. J., Lee, J. G., Kwon, G. O., & Kang, Y. B. (1999). Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine*. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00059-6

Lee, D. K., Park, C. K., Kim, S. H., & Lee, C. (2010). Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Res*. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.01.015

Lee, S., & Lee, C. (2014). Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerging Infectious Diseases*. https://doi.org/10.3201/eid2007.140294

Li, C., Li, W., Lucio de Esesarte, E., Guo, H., van den Elzen, P., Aarts, E., … Bosch, B.-J. (2017). Cell Attachment Domains of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein Are Key Targets of Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*. https://doi.org/10.1128/JVI.00273-17

Li, W., Li, H., Liu, Y., Pan, Y., Deng, F., Song, Y., … He, Q. (2012). New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerging Infectious Diseases*. https://doi.org/10.3201/eid1808.120002

Makadiya, N., Brownlie, R., Van Den Hurk, J., Berube, N., Allan, B., Gerdts, V., & Zakhartchouk, A. (2016). S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen Susanna Lau. *Virology Journal*. https://doi.org/10.1186/s12985-016-0512-8

Marthaler, D., Jiang, Y., Otterson, T., Goyal, S., Rossow, K., & Collins, J. (2013). Complete Genome Sequence of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain USA/Colorado/2013 from the United States. *Genome Announcements*. https://doi.org/10.1128/genomeA.00555-13

McCluskey, B. J., & Morrison, R. (2016). Another emerging disease: Swine Enteric Coronaviruses. *Preventive Veterinary Medicine*. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.12.001

OIE, 2014. (2014). Ficha técnica de la OIE; infección por el virus de la diarrea epidémica porcina [Online]. Francia. Retrieved from http://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDFhttp://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDF

PORCICULTURA, 2014. (2014). Escenarios clínicos de la diarrea epidémica porcina en México [Online]. Ciudad de México, México. Retrieved September 24, 2014, from http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos_int.asp?cve_art=

Ren, X., & Li, P. (2011). Development of reverse transcription loop-mediated isothermal

amplification for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Genes*. https://doi.org/10.1007/s11262-011-0570-3

Ribes, J. M., Ortego, J., Ceriani, J., Montava, R., Enjuanes, L., & Buesa, J. (2011). Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)-based vectors with engineered murine tropism express the rotavirus VP7 protein and immunize mice against rotavirus. *Virology*, *410*(1), 107–118. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.036

SAGARPA, 2014. (2014). Descarta SENASICA problema en producción porcina en México [Online]. Ciudad de México, México. Retrieved September 22, 2014, from http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B393.aspx

Saif, L. J. (2015). Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Revising transmissible gastroenteritis virus (TGEV) vaccine concepts. *2015 AASV Annual Meeting*, *226*, 403–406.

Salem, A. N. Ben, Chupin Sergei, A., Bjadovskaya Olga, P., Andreeva Olga, G., Mahjoub, A., & Prokhvatilova Larissa, B. (2010). Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. *Journal of Virological Methods*. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.02.010

SENASICA, 2014. (2014). Acciones de SAGARPA y productores para proteger la producción porcícola nacional [Online]. Ciudad de México, México. Retrieved September 18, 2014, from http://www.senasica.gob.mx/?IdNot=1499

Shibata, I., Tsuda, T., Mori, M., Ono, M., Sueyoshi, M., & Uruno, K. (2000). Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Veterinary Microbiology*. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00199-6

SIVE 2016. (2016). NO. DE INVESTIGACIONES POR ENFERMEDAD Y ESTADO EN CERDOS REPORTADAS AL SIVE EN EL 2016. Retrieved March 31, 2016, from https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sive

Song, D., & Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*. https://doi.org/10.1007/s11262-012-0713-1

Song, D. S., Kang, B. K., Oh, J. S., Ha, G. W., Yang, J. S., Moon, H. J., … Park, B. K. (2006). Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J Vet Diagn Invest*. https://doi.org/10.1177/104063870601800309

SUN, D., WANG, X., WEI, S., CHEN, J., & FENG, L. (2016). Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review. *Journal of Veterinary Medical Science*, *78*(3), 355–363. https://doi.org/10.1292/jvms.15-0446

Suthar, M. S., Diamond, M. S., & Gale, M. (2013). West Nile virus infection and

immunity. *Nature Reviews Microbiology*. https://doi.org/10.1038/nrmicro2950

Suzuki, T., Terada, Y., Enjuanes, L., Ohashi, S., & Kamitani, W. (2018). S1 subunit of spike protein from a current highly virulent porcine epidemic diarrhea virus is an important determinant of virulence in piglets. *Viruses*. https://doi.org/10.3390/v10090467

Trujillo-Ortega, M. E., Beltrán-Figueroa, R., García-Hernández, M. E., Juárez-Ramírez, M., Sotomayor-González, A., Hernández-Villegas, E. N., … Sarmiento-Silva, R. E. (2016). Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: Case report. *BMC Veterinary Research*. https://doi.org/10.1186/s12917-016-0763-z

Ujike, M., & Taguchi, F. (2015). Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*. https://doi.org/10.3390/v7041700

USDA, 2014. Tecchnical note Porcine Epidemic Diarrhea (PED) [Online]. Estados Unidos. Retrieved October 5, 2014, from http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome

Van Diep, N., Norimine, J., Sueyoshi, M., Lan, N. T., & Yamaguchi, R. (2017). Novel porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) variants with large deletions in the spike (S) ene Coexist with PEDV strains possessing an intact S gene in domestic pigs in Japan: A new disease situation. *PLoS ONE*, *12*(1), 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170126

VIRALZONE, 2015. Alphacoronavirus: Proteins by strain: Porcine epidemic diarrhea virus (strain CV777) (PEDV) [Online]. Suiza. Retrieved September 14, 2015, from http://viralzone.expasy.org/all_by_species/766.html#tab6

Walls, A. C., Tortorici, M. A., Bosch, B. J., Frenz, B., Rottier, P. J. M., DiMaio, F., … Veesler, D. (2016). Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature16988

Wang, Y., Li, J., Sun, M., Ni, B., Huan, C., Huang, L., … Mao, X. (2014). Triggering unfolded protein response by 2-Deoxy-D-glucose inhibits porcine epidemic diarrhea virus propagation. *Antiviral Research*. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.03.007

Xpasy.org. (2018). Retrieved October 16, 2018, from https://www.expasy.org/

Yin, J., Ren, X., Tian, Z., & Li, Y. (2007). Assembly of pseudorabies virus genome-based transfer vehicle carrying major antigen sites of S gene of transmissible gastroenteritis virus: Potential perspective for developing live vector vaccines. *Biologicals*. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2006.02.001

Zhao, J., Shi, B. jun, Huang, X. guo, Peng, M. yi, Zhang, X. min, He, D. ni, … Chen, P. yan. (2013). A multiplex RT-PCR assay for rapid and differential diagnosis of four porcine diarrhea associated viruses in field samples from pig farms in East China from 2010 to 2012. *Journal of Virological Methods*. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.008

Zhao, S., Gao, Q., Qin, T., Yin, Y., Lin, J., Yu, Q., & Yang, Q. (2014). Effects of virulent and attenuated transmissible gastroenteritis virus on the ability of porcine dendritic cells to sample and present antigen. *Veterinary Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.017

ZOETIS, 2015. (2015). USDA Grants Zoetis a Conditional License for Porcine Epidemic Diarrhea Vaccine [Online]. Estados Unidos. Retrieved December 24, 2015, from https://www.zoetis.com/news-media/feature-stories/usda-grants-zoetis-conditional-license-porcine-epidemic-diarrhea-vaccine

Zuñiga, S., Pascual-Iglesias, A., Sanchez, C. M., Sola, I., & Enjuanes, L. (2016). Virulence factors in porcine coronaviruses and vaccine design. *Virus Research*, *226*, 142–151. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.07.003