



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

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA RT-PCR MÚLTIPLE, PARA LA DETECCIÓN
DE AGENTES VIRALES ASOCIADOS AL COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO
(CRP)”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MVZ. ALEF ISAI GONZÁLEZ ALVARADO

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT – FMVZ

COMITÉ TUTOR:

Dra. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA – FMVZ

Dra. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA – FESC



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A ti, a la vida, a Dios...

*Energía creadora e inexplicable que desafía la
probabilidad y romper paradigmas.*

*A mi mamá Leticia Alvarado, Doña Evita
González mi segunda mamá, mis hermanas y
sobrinos por su amor y su apoyo siempre
incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que siempre está cuando se necesita; a mi mamá **María Leticia Alvarado González**, inspiración y ejemplo de fortaleza, guía de vida, gracias por tu apoyo incondicional, gracias por tu amor, tu comprensión y tu cariño. A mí **“mamá Eva”** por el amor que siempre me brindas, la sabiduría compartida y confianza brindada. A mis hermanas **Zarai y Quetzalma**, compañeras de vida, por su apoyo y confianza en todos mis proyectos.

Al **Dr. José Iván Sánchez Betancourt**, tutor, ejemplo y mentor profesional; por su orientación, el conocimiento compartido; guía profesional fundamental en este proceso, por su confianza y amistad brindada.

A mi comité tutor por su apoyo y aportaciones **Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira.**

A mi jurado **Dr. Abel Ciprián Carrasco, Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, Dr. Humberto Ramírez Mendoza, Dr. Heliot Zarza Villanueva.**

Al **Equipo de Investigación del Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Cerdos** por el conocimiento compartido, sus enseñanzas, apoyo, orientación y principalmente la amistad brindada. **Dr. Iván Sánchez, Dra. Rebeca Martínez, M en C. Saúl Reveles, Dr. René Segura, Dra. Jaqueline Cervantes, Dr. Manuel Saavedra, M en C. María José Martínez, Dra. Mariana Pérez y Dra. María Josefina Contreras, M en C. Carmen Gaitán, M en C. Brenda Maya, M en C. Guadalupe Chávez, M en C. Mariana García. MVZ. Selene Quintana y MVZ. Amaranta Velázquez.**

Agradezco al **Dr, Pedro Pradal Roa** por sus enseñanzas, orientación, apoyo a mi formación profesional y su amistad.

Al **Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos**, la **Dra. Carmen Mercado** por todo el apoyo brindado y la enseñanza compartida, **Dr. Gerardo Ramírez** jefe del departamento, a la **Sra. Carmen**, al **Sr. Inocente**, laboratoristas y todo el personal del DMZC.

A la **Unidad de Investigación** y al **Laboratorio de Microbiología** de la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por permitirme el uso de sus equipos.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** mi *alma mater* que me brindó la oportunidad de desarrollarme personal y profesionalmente. A mi amada **FMVZ**, una de las mejores escuelas de veterinaria del mundo, de la cual siempre estaré orgulloso de haber pertenecido.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada; y al **Proyecto de CONACYT-ciencia básica** con número de registro: **254244**.

Les doy gracias a todos y siempre estaré agradecido con todos ustedes por el apoyo brindado, en esta etapa profesional de mi vida...

RESUMEN

La Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) “*múltiple o uniplex*”, es una herramienta altamente sensible y específica, de rutina en los laboratorios de diagnóstico microbiológico, permite detectar y/o caracterizar genéticamente microorganismos asociados a enfermedades. En los cerdos, las enfermedades respiratorias son la principal causa de pérdidas económicas en la industria a nivel mundial. El **Complejo Respiratorio Porcino (CRP)** es una enfermedad respiratoria multifactorial, polimicrobiana y específica de cada país, en México no existe una prueba que detecte a los principales patógenos virales asociados al CRP. El objetivo de éste trabajo fue estandarizar la prueba de RT-PCR múltiple para detectar al **Virus de Influenza Porcina (SIV)**, al **Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VPRRS)**, **Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2)** y **Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCV)**, patógenos virales asociado al CRP, que se han identificado en la población porcícola nacional. Se diseñaron y probaron oligonucleótidos específicos que amplifican fragmentos altamente conservados del genoma de dichos virus. La RT-PCR múltiple, se estandarizó para los virus de PRRS, SIV y PCV2, en dos pasos, primero se realizó la retro transcripción (RT) por separado y después la PCR; la prueba mostró ser específica y sensible, detectando hasta 10^4 copias del templado objetivo de cada virus en la prueba múltiple y 10^2 en ensayos individuales. Por lo cual resulta ser una herramienta útil para el diagnóstico clínico de enfermedades virales polimicrobianas en cerdos.

Palabras clave: RT-PCR múltiple, CRP, Virus, RNA, DNA, PRRS, SIV, PCV2, PRCV, Herramienta diagnóstica, Sensible, Específica.

ABSTRACT

Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcriptase (RT-PCR) "multiplex or uniplex" is a tool characterized by being sensitive and specific, by routine in microbiological diagnostic laboratories, therefore, and by genetically characterizing microorganisms associated with diseases. In pigs, respiratory diseases are the main cause of economic losses in the industry worldwide. The **Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC)** is a multifactorial, polymicrobial respiratory disease, specific to each country and in Mexico there is no test to detect the main viral factors associated with CRP. The objective of this work was to standardize the test (**multiplex RT-PCR**) to detect the *Swine Influenza Virus (SIV)*, the *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)*, *Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)* and *Porcine Respiratory Coronavirus (PRCV)*, viral pathogens associated with CRP, which have been identified in the national swine population. Specific oligonucleotides that amplify highly conserved fragments of the genome of said viruses were designed and tested. The multiple RT-PCR was standardized for PRRS virus, SIV and PCV2, in two steps, first step RT is performed separately and after PCR; the most specific and sensitive test; The oligonucleotides only amplified fragments of the genome of the virus for which they were designed, detecting one or several viruses, up to 104 copies of the time in the target of each virus in the multiple test and 102 in the individual test. What turns out to be a useful tool for the clinical diagnosis of polymicrobial viral diseases in pigs.

Keywords: Multiplex RT-PCR, PRDC, Virus, RNA, DNA, PRRS, SIV, PCV2, PRCV Diagnostic tool, Sensitive, Specific.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| DEDICATORIA..... | II |
| AGRADECIMIEMNTOS..... | II |
| RESUMEN..... | IV |
| ABSTRACT..... | V |
| CONTENIDO | VI |
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| LISTA DE CUADROS..... | XI |
| 1 INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO (CRP)..... | 3 |
| 1.1.1 IMPACTO ECONÓMICO..... | 4 |
| 1.1.2 ETIOLOGÍA | 5 |
| 1.2 VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (PRRS) | 6 |
| 1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA..... | 7 |
| 1.2.2 TRANSMISIÓN..... | 8 |
| 1.2.3 PATOGENIA..... | 8 |
| 1.2.4 SIGNOS CLÍNICOS..... | 9 |
| 1.3 VIRUS DE INFLUENZA PORCINA (IP) | 11 |
| 1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA..... | 13 |
| 1.3.2 TRANSMISIÓN..... | 13 |
| 1.3.3 PATOGENIA..... | 13 |
| 1.3.4 SIGNOS CLÍNICOS..... | 14 |
| 1.4 CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2)..... | 15 |
| 1.4.1 EPIDEMIOLOGÍA..... | 18 |
| 1.4.2 TRANSMISIÓN..... | 18 |
| 1.4.3 PATOGENIA..... | 18 |
| 1.4.4 SIGNOS CLÍNICOS..... | 19 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1.5 | CORONAVIRUS RESPIRATORIO PORCINO (PRC) | 21 |
| 1.5.1 | EPIDEMIOLOGÍA..... | 23 |
| 1.5.2 | TRANSMISIÓN | 23 |
| 1.5.3 | PATOGENIA..... | 24 |
| 1.5.4 | SIGNOS CLÍNICOS..... | 24 |
| 1.6 | MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DISPONIBLES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS VIRALES ASOCIADOS AL CRP | 25 |
| 1.7 | REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) | 26 |
| 1.8 | RT-PCR MÚLTIPLE O MULTIPLEX | 28 |
| 2 | JUSTIFICACIÓN | 29 |
| 3 | OBJETIVOS | 30 |
| 3.1 | GENERAL | 30 |
| 3.2 | ESPECÍFICOS | 30 |
| 4 | MATERIAL Y MÉTODOS | 31 |
| 4.1 | DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS | 31 |
| 4.2 | PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS Y SÍNTESIS | 32 |
| 4.3 | DESARROLLO DE STOCKS VIRALES Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO | 32 |
| 4.3.1 | VIRUS | 32 |
| 4.3.2 | EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO | 32 |
| 4.4 | ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR MÚLTIPLE | 32 |
| 4.5 | CONDICIONES DE REACCIONES DE RT-PCR Y PCR | 33 |
| 4.6 | VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS | 34 |
| 4.7 | SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA RT-PCR INDIVIDUAL Y MÚLTIPLE | 35 |
| 5 | RESULTADOS | 37 |
| 5.1 | DESARROLLO DE OLIGONUCLEÓTIDOS | 37 |
| 5.2 | TEMPERATURA MEDIA DE ALINEACIÓN DE CADA PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.3 | ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR MÚLTIPLE | 38 |
| 5.4 | ESPECIFICIDAD DE LA PCR MULTIPLEX | 40 |
| 5.5 | SENSIBILIDAD DE LA PCR MÚLTIPLE | 41 |
| 6 | DISCUSIÓN..... | 42 |
| 7 | CONCLUSIONES..... | 44 |
| 8 | ABREVIATURAS..... | 45 |
| 9 | REFERENCIAS..... | 48 |

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Crio-microscopia electrónica del virión del virus de PRRS,

Figura. 2. Esquema de la organización del genoma del virus de PRRS.

Figura. 3. Imagen de microscopia electrónica del virión de Influenza. Del lado izquierdo se muestra una imagen con la esquematización del mismo virus y la organización de los segmentos de su genoma.

Figura. 4. Crio-microscopia electrónica de PCV2.

Figura. 5. Esquema del genoma de PCV2. Basado en el genoma complete de la cepa: No.AF027217. Se muestran cuatro ORFs, el número de nucleótidos que le corresponde y su orientación de transcripción se indica con un triángulo rojo. El “Steam-Loop (SL). Región intergénica (RI).

Figura. 6. Árbol filogenético basado en el ORF2 de PCV2, construido usando el método de (a) Neighbor Joining, (b) Maximum likelihood. Muestra la existencia de 4 genotipos de PCV2.

Figura. 7. Microfotografía electrónica de una partícula de un coronavirus (Izquierda). Observada en el contenido intestinal de un cerdo con diarrea. Barra representa 100 nm. A la derecha esquema de la estructura del virion de GET. MEM membrana lipídica, S proteína Spike, M, proteína larga de membrana; E, proteína menor de la envoltura; HE, hemoaglutinin-esterasa; N, proteína de la nucleocápside; CS, envoltura nuclear y NC, nucleocápside.

Figura. 8. Diagrama que esquematiza la estructura del genoma de GET y PRCV (a). Las deleciones en el gen S se muestran en línea punteada, donde se indica el nucleótido de inicio y término de la deleción, así como el tamaño de la deleción y del gen S para cada cepa. Y en amarillo se muestran genes no estructurales. (b) esquematización de la región intergénica entre gen S a ORF3b, donde se marcan con color azul, las regiones codificantes en la cepa de referencia PUR46-MAD y en verde y rojo, las inserciones y deleciones respectivamente, marcando la posición de la inserción o deleción.

Figura. 9. Esquema de una reacción de PCR múltiple, donde se muestran 4 diferentes segmentos a amplificar o segmentos Diana 1, 2, 3, 4; reacciones en un mismo tubo que se visualizan posteriormente en un gel y se diferencian por su tamaño o peso molecular en pares de base (pb). Tomado de Bolivar 2014.

Figura. 10. Condiciones de ciclado de la RT-PCR en un solo paso para la estandarización de los oligonucleótidos de cada virus de forma individual.

Figura. 11. Imagen de la captura de pantalla del programa DNACalculator utilizado para la obtención de número de copias (DS) de cada amplicón generado por los oligonucleótidos diseñados para este estudio.

Figura. 12. Electroforesis de dos geles de agarosa al 2%, teñidos con red gel, donde: A) Se observan el Marcado de peso molecular (MP) 50 bp DNA Ladder, los productos de PCR para PRRS, SIV y PCV2 en los carriles 1, 2 y 3 respectivamente; el producto de PCR múltiple en el carril 4 y el control negativo en el carril 5. B) Se observan el mismo MP, los productos de PCR múltiple de un gradiente de temperaturas de 50 a 55°C y el control negativo.

Figura. 13. Electroforesis de un gel de agarosa al 2%, teñida con red gel, que muestra la prueba de especificidad de la PCR múltiple. En el primer carril de izquierda a derecha se observa el marcado de peso molecular (MP) 50 bp DNA Ladder, el control negativo, los productos de PCR para PRRS, IP y PCV2; el producto múltiple de todos los virus anteriores y los productos de GET, DEP, células PK15, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) y *Enterococcus faecalis* respectivamente.

Figura. 14. Imagen de la electroforesis de un gel de agarosa al 2%, teñida con red gel, que muestra la prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos para el virus de IP, PCV2 y PRRS, incluidos en la PCR múltiple, probados de forma individual.

LISTA DE CUADROS

Cuadro.1. Segmentos genómicos del virus de influenza A/swine/México/GtoDMZC01/2014 (H1N2) y sus proteínas codificadas.

Cuadro.2. Clasificación de las enfermedades asociadas a circovirus porcino tipo 2 y los principales signos clínicos para su diagnóstico individual.

Cuadro.3. Bases de secuencias elaboradas para cada virus

Cuadro.4. Volumen optimizado de reactivos del kit de RT-PCR empleados en este estudio.

Cuadro.5. Oligonucleótidos diseñados y sus características de diseño.

Cuadro.6. Temperatura de alineación y rango de amplificación de los oligonucleótidos diseñados.

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias en los cerdos son la principal causa de pérdidas económicas en la industria porcícola mundial (1). Son de carácter multifactorial, influenciada por factores macro y micros ambientales; características anatomofisiológicas propias del cerdo que lo hacen más o menos susceptible y la presencia de agentes infecciosos (2). El Complejo Respiratorio Porcino (CRP) es una enfermedad multifactorial y polimicrobiana, inducida por la presencia de múltiples microorganismos, específico de cada país y que determinan la presentación clínica y patológica de la enfermedad; lo cual hace que el diagnóstico, tratamiento y control sea sumamente difícil y se oriente a los patógenos circulantes de la región (3,4).

En México no hay estudios que determinen la incidencia real de los principales agentes infecciosos involucrados en el CRP con mayor frecuencia; tal vez por lo complejo que resulta, la falta de infraestructura, el alto costo y pocas pruebas diagnósticas virales disponibles en el país, generando dependencia de pruebas diagnósticas desarrolladas en el extranjero para la detección de éstos patógenos. Pruebas de las cuales, en la mayoría de los casos **se desconoce su eficacia para detectar agentes enzoóticos** (5).

En el presente trabajo se estandarizó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR) para detectar a los principales patógenos virales asociados al CRP, que se han reportado y/o aislado en la población porcícola nacional. Como son el **Virus de Influenza Porcina (SIV), Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VPRRS) y Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2)** (3,5–10).

La RT-PCR múltiple amplifica fragmentos altamente conservados del genoma de los virus mencionados y regiones con un bajo índice de mutación; que garantizan la detección de una amplia gama de cepas virales; enfocada principalmente a virus aislados en cerdos de la población porcina nacional (5). Contribuye a estudiar la interacción, sinergismo y distribución de dichos patógenos, ayuda a disminuir la dependencia de pruebas diagnósticas

del extranjero, asegura la identificación de virus circulantes en la población porcícola nacional y de cepas virales del extranjero que pudieran ingresar al país.

1.1 COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO (CRP)

Las enfermedades respiratorias en los cerdos son la principal causa de pérdidas económicas en la industria porcícola mundial (1,3). Son de carácter multifactorial, es decir influenciada por factores macro y microambientales, características anatomofisiológicas propias del cerdo que lo hacen más o menos susceptible y la presencia de agentes infecciosos (11). De forma natural diversos virus y bacterias cohabitan el tracto respiratorio y los mecanismos fisiológicos de defensa del cerdo mantienen en equilibrio la población de dichos microorganismos, evitando daño a los tejidos y la diseminación de los mismos por todo su organismo. Sin embargo, existen patógenos capaces de evadir los mecanismos de defensa del tracto respiratorio de los cerdos, considerados como “patógenos primarios”, estableciendo una infección, dañar esos mecanismos de defensa y hacer al cerdo vulnerable a “patógenos secundarios u oportunistas” que aprovechan los fallos en el mecanismos de defensa del huésped, ocasionados por el medioambiente, el manejo y/o factores de virulencia de los patógenos primarios para establecer una infección (1,3,12,13).

El término **Complejo Respiratorio Porcino (CRP)** fue usado para describir neumonías de etiología múltiple, causando signos clínicos y fallas en la ganancia de peso en cerdos de la etapa de crecimiento y finalización (4). Actualmente se emplea para describir neumonías y problemas respiratorios de etiología polimicrobiana en cualquier etapa productiva del cerdo (3).

El CRP es una enfermedad multifactorial y polimicrobiano, inducido por la combinación de múltiples microorganismos patógenos y no patógenos, específicos de la zona geográfica, región o país donde se ubica la unidad de producción (4). La combinación de los factores de virulencia de los patógenos involucrados, determina la gravedad y manifestación clínica de la enfermedad; el impacto en la salud de los animales y por lo tanto en la producción. La interacción polimicrobiano del CRP, es específica del país, zona, región y unidad de producción, esto hace que el diagnóstico, tratamiento y control sea sumamente difícil y se oriente a los patógenos de la región (4).

1.1.1 IMPACTO ECONÓMICO

El Complejo Respiratorio Porcino (CRP) es la enfermedad más frecuente en la producción porcícola mundial y el impacto económico real generado, no se ha cuantificado de forma detallada debido a lo difícil que resulta su análisis (10). Sin embargo, a nivel mundial se han cuantificado diversos brotes de enfermedades respiratorias ocasionados por algunos virus involucrados en este complejo. En 2013 Holtkamp y colaboradores, estimaron una pérdida aproximada de \$660 millones de dólares anuales en la industria porcina de Estados Unidos de Norteamérica por **VPRRS**, por otra parte, ese mismo año Nieuwenhuis y su equipo cuantificó los efectos económicos de los brotes de PRRS en 9 granjas de Europa, estimando una reducción de 1.7 cerdos vendidos por cerda; una pérdida de 59 a 379 euros por cerda por brote y los costos después del brote de 3 a 160 euros por cerda, pérdidas estimadas dependiendo del sistema de producción, tipo de granja y número de cerdas en producción. Las pérdidas económicas se asociaron principalmente a alta morbilidad y generación de problemas crónicos, que aumentan los costos por medicación, vacunación, incremento en medidas de bioseguridad y ocasionalmente altas mortalidad en las diversas etapas productivas del cerdo, disminuyendo la rentabilidad de las empresas porcinas (14–17).

En México no hay estudios que determinen con exactitud el impacto económico del CRP en la industria porcina, pero de igual forma se ha tratado de cuantificar diversos brotes del virus de **PRRS** en algunas granjas. Herrera en 2012, estimó costos de aproximadamente 80 y 120 millones de dólares al año, calculó que un brote agudo de PRRS cuesta entre \$2500 y \$3500 pesos mexicanos por cerda al año (18). Amador en 2013 midió el impacto económico de la seroconversión al virus de PRRS de hembras de pie de cría y cerdos de abasto en granjas de ciclo completo del centro del país, evaluando parámetros productivos, reproductivos y económicos de las hembras seropositivas, seronegativas y libres, encontrando una disminución en la fertilidad de poco más de 10%, un aumento en la mortalidad pre destete de 6.5%, la ganancia diaria de peso también se vio afectada reduciendo 150g menos y el costo del kilogramo de cerdo producido y hembras producidas por año se incrementó con respecto al grupo control (19). En 2016, este mismo autor evaluó el impacto de esta enfermedad en los estados de Sonora Jalisco y Yucatán, encontrando una

reducción del 11% en la fertilidad, 0.5% de Lechones Nacidos Vivos (LNV) menos por parto, un incremento de abortos en 11% y un incremento del 7% en la mortalidad de cerdos; generando un costo extra de \$3,057.12 pesos mexicanos por hembra por año, datos similares a los anteriormente reportados, lo cual proporciona una estimación del impacto económico y muestra una idea del costo de la enfermedad a nivel nacional (20).

1.1.2 ETIOLOGÍA

A nivel mundial los patógenos primarios asociados al CRP de mayor relevancia para la industria porcina, enlistan a virus y bacterias que incluyen principalmente al **virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (vPRRS)**, el **Virus de Influenza Porcina (SIV)**, **Pseudorabies virus (PRV)**, **Circovirus Porcino tipo2 (PCV2)**, **Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCV)** y a bacterias como **Mycoplasma hyopneumoniae**, **Pasteurella multocida** y **Actinobacillus pleuropneumoniae (APP)**. Como patógenos secundario se reporta la participación de virus como **Torque teno sus virus (TTSuV)**, **Paramyxovirus (PMV)**, **Porcine Cytomegalovirus (PCMV)**, y bacterias como **Bordetella bronchiseptica**, **Actinobacillus suis**, **Haemophilus parasuis**, **Salmonella entérica serovariedad choleraesuis**, **Streptococcus suis**; entre otros (1,3,4,12,13,21).

El carácter polimicrobiano del CRP, es específico del país, zona o región donde se ubica la unidad de producción y los patógenos de mayor relevancia dependen del impacto ocasionado a la industria porcina de esa región, por lo tanto en este trabajo se describen a los patógenos virales de mayor relevancia para la industria porcina del país y a nivel mundial (4,7,22,23).

1.2 BETAARTERIVIRUS SUID 2

El *Betaarterivirus suid 2* o anteriormente llamado *virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino*, es un virus envuelto, actualmente reclasificado en el Orden de los *Nidovirales*, Familia: *Arteriviridae*, Género: *Betaarterivirus*, que incluye a los dos genotipos que afecta a cerdos (24,25). Uno fue identificado y aislado por primera vez en Europa y denominado Lelystad Virus o Genotipo 1 (26) y el otro aislado casi simultáneamente en E.U.A. de un brote de una enfermedad con la misma signología clínica, referida como “la enfermedad misteriosa del cerdo”, se aisló un virus muy parecido denominado VR2332 o Genotipo 2 (27). Ambos genomas con una similitud nucleotídica del 70%, los cuales han evolucionado individualmente de forma divergente y acelerada, generando recombinaciones y cepas altamente patógenas en ambos genotipos (28–33).

El *Betaarterivirus suid 2* es una partícula redonda u ovalada, de apariencia lisa, de aproximadamente 50 a 70 nm de diámetro (Figura 1), genoma RNA lineal de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 15.1–15.5 kb (34).

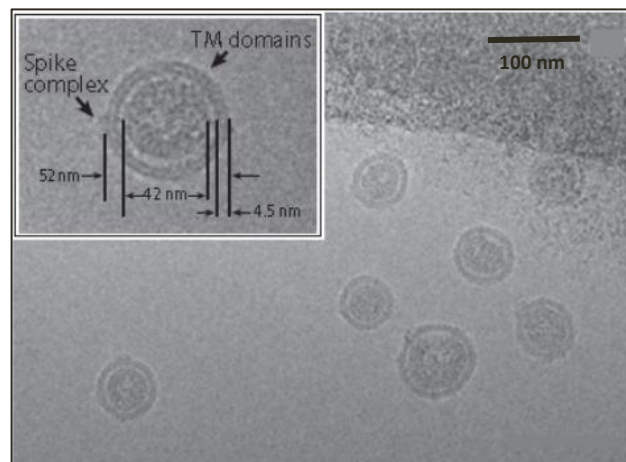


Figura 1. Crio-microscopía electrónica del virión del virus del *Betaarterivirus suid 2*, indicando las dimensiones del virión. Tomado de Dokland, 2010.

Se predice que el genoma codifica 11 marcos de lectura abiertos u *Open Reading Frames* (ORFs), en su extremo 5' el ORF 1a y 1b que abarcan aproximadamente el 75% del genoma, codifican dos poli proteínas que originan 14 enzimas involucradas en la replicación y recientemente se ha descrito un nuevo ORF (TF) en la región central del

(39). Desde su reconocimiento en 1980 en Norte América (26), se ha distribuido en todo el mundo y se considera un virus de distribución mundial donde se encuentran granjas de producción de cerdos, con la excepción de Australia, Nueva Zelanda, Finlandia, Noruega, Suecia y Suiza, sin embargo existen granjas serológicamente negativas dentro de países productores donde la enfermedad es endémica (40). En México, solamente se han identificado variantes del genotipo 2 o Americano del Betaarterivirus suid 2 y se considera una enfermedad endémica de notificación mensual obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (6,41).

1.2.2 TRANSMISIÓN

El Betaarterivirus suid 2 es altamente contagioso, su transmisión es por contacto directo de cerdo a cerdo y la diseminación por aerosol en estudios experimentales sugiere que no es mayor a 1 metro, es cepa dependiente y entra a las granjas al ingresar animales enfermos o semen contaminado con el virus; sin embargo, otros estudios sugieren que el virus puede diseminarse a más de 9 km por corrientes de aire, en meses fríos y con alta humedad, así como por fómites y vehículos contaminados (30,39,40).

1.2.3 PATOGENIA

La infección ocurre por contacto directo de animales enfermos, el Betaarterivirus suid 2 ingresa por vías respiratorias o por semen contaminado en inseminación artificial principalmente; al ingresar se replica en macrófagos alveolares, posteriormente pasa a circulación y se replica en monocitos periféricos, células dendríticas, células del sistema retículo endotelial incluidas la micro glía, células germinales del epitelio testicular y macrófagos intersticiales de otros tejidos (38). Aunque se ha confirmado la presencia de virus en una diversidad de tejidos, el pulmón, tejidos linfoides, placas de Peyer, testículo y el riñón son considerados como órgano blanco del Betaarterivirus suid 2 (39). La destrucción de células epiteliales y macrófagos alveolares genera la secreción de citocinas especialmente $TNF\alpha$, ocasionando riesgo de lesiones vasculares, daño de células epiteliales capilares y la salida de proteínas plasmáticas a los tejidos, pudiendo ocasionar trombosis y oclusión de los conductos alveolares. Genera una reducción transitoria de células blancas circulantes y las células B y linfocitos CD4 y CD8 son afectados en los linfonodos durante

la primera semana de infección. La infección resulta en neumonía intersticial, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis, lesiones renales y necrosis linfoide dentro de los primeros 14 días de infección (30). El virus es eliminado en semen hasta por 42 días pudiendo infectar cerdas por largos periodos. La infección durante la gestación se realiza después de la implantación y lleva a reabsorciones, momificaciones y mortinatos, dependiendo del momento de la infección. La viremia en cerdas dura aproximadamente 1 a 9 días y en cerdos jóvenes de 3 a 9 y hasta 12 semanas, durante este periodo el virus es diseminado a través de secreciones nasales, saliva y heces. Aunque el virus persiste en tonsilas hasta 105 días *post* infección (38,39), el Betaarterivirus suid 2 es considerado como patógeno primario y diversos autores han descrito la patogénesis del virus (30,38,42), también se ha evidenciado que la coinfección con otros patógenos porcinos exagera la presentación clínica de la enfermedad, altera la respuesta inmune típica del hospedero e incrementa las mutaciones y cambios genéticos del virus con respecto a la infección por un solo patógeno, evidenciando la complicada naturaleza polimicrobiana de los problemas respiratorios en cerdos (43,44). El Betaarterivirus suid 2 es el virus más aislado de casos de CRP, en combinación con *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* y las enfermedades asociadas a *Circovirus porcino tipo 2* (PCVAD) principalmente (21,38,45).

1.2.4 SIGNOS CLÍNICOS

La enfermedad genera inapetencia en las cerdas de 24 a 36 horas de forma individual y de 7 a 10 días en la granja, fiebre no consistente, raramente excede los 40 °C y es transitoria, los abortos se observan en cualquier etapa de la gestación, los primeros abortos aparecen a los 22 días, 2 a 3% aproximadamente y posteriormente van incrementando (39). Se observa hiperemia y congestión de las orejas, nariz y cola en el 2% de los animales, incrementan los lechones nacidos muerto y la mortalidad de cerdos de hasta 1 semana de vida, se reduce la duración de gestación hasta 2 días y la lactación es afectada por la inapetencia de las cerdas, la fertilidad se reduce incrementando el retorno al estro pero se atribuye a la fertilidad de los sementales (46). En crecimiento y desarrollo incrementan las enfermedades respiratorias y se observan cambios en la piel pero se recuperan en 5 a 7 días después de la infección y se da un incremento en alguna enfermedad endémica presente. A nivel de granja, se observa un incremento en la mortalidad predestete y de nacidos muertos, la

mortalidad en destete aumenta hasta un 9% y el retorno a estro incrementa hasta un 18% (39).

1.3 VIRUS DE INFLUENZA PORCINA (SIV)

El Virus de Influenza Porcina es un virus perteneciente a la Familia: *Orthomixoviridae*, Género: *Alphainfluenzavirus*, Especie: *Influenza A virus*; Familia recientemente subclasificada por el ICTV en *Alfa, Beta, Gamma y Deltainfluenzavirus*, géneros que incluyen a una especie cada uno: Influenza A, B, C y D respectivamente; con características antigénicas distinguibles en su nucleoproteína y proteínas de matriz (25). Los virus de Influenza A, infectan principalmente aves silvestres, murciélagos, seres humanos, cerdos y mamíferos marinos. Se agrupa en subtipos antigénicamente distintos, con base en las glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA); proteínas virales que le dan la selectividad, reconocimiento y antigenicidad al virus; de las que a la fecha se han identificado 18 hemaglutininas y 11 neuraminidasas distintas (47,48).

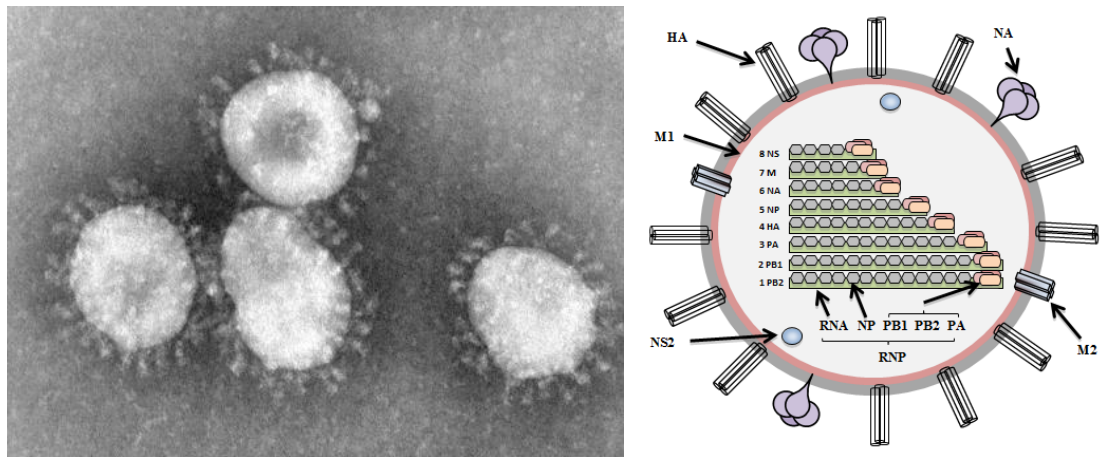


Figura 3. Microscopía electrónica del virión de Influenza. Y la organización de los segmentos de su genoma. Tomado y adaptado de Kingsford *et al*, 2009 y Urbania *et al*, 2014.

El influenza virus A, es un virus RNA de cadena simple y sentido negativo, envuelto en una bicapa lipídica proveniente de la célula huésped, esférico pleomórfico de aproximadamente 80 a 120 nm de diámetro y genoma segmentado (Figura 3); 8 segmentos de RNA de 890 a 2341 nucleótidos de largo y un total de 13.5 kb aproximadamente, que codifican 12 proteínas, PB2, PB1, PB1-F1, N20, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2, las dos últimas

no estructurales, se sintetizan en la célula infectada pero no se incorporan al virión que se detallan en el Cuadro 1 (48–50).

Cuadro. 1. Segmentos genómicos del virus de influenza A/swine/México/GtoDMZC01/2014 (H1N2) y sus proteínas codificadas.

| Segmento | Longitud (nt) | Nombre de la proteína | Función de la Proteína |
|-----------------------------------|---------------|---|--|
| 1 Polimerasa B2 (PB2) | 2316 | Polimerasa B2 (PB2) | Proteína interna de replicación viral |
| 2 Polimerasa B1 (PB1) | 2316 | Polimerasa B1 (PB1) PB1 – F2 | Proteína interna de replicación viral De orientación mitocondrial y apoteótica |
| 3 Polimerasa A (PA) | 2247 | Polimerasa A | Proteína interna de replicación viral |
| 4 Hemoaglutinina (HA) | 1729 | Hemoaglutinina (HA) | Glicoproteína de superficie de unión viral, determinante antigénica y específica de subtipo (H1 a H18). |
| 5 Nucleoproteína (NP) | 1576 | Nucleoproteína (NP) | Proteína de la nucleocápside, recubre al RNA, es de orientación nuclear para la transcripción del RNA y específica en tipos A,B y C |
| 6 Neuraminidasa (NA) | 1477 | Neuraminidasa NA) | Glicoproteína de superficie y determinante antigénico, involucrada en la liberación del virión de la célula huésped y es específica de subtipos (N1 a N11) |
| 7 Matriz (M) | 1027 | Matriz 1 (M1) Matriz 2 (M2) | Proteína de la estabilidad de membrana, es específica en tipos A,B y C Proteína de membrana de recubrimiento viral y específica en especies A,B, C y D. |
| 8 Proteínas no estructurales (NS) | 901 | Proteína no estructural 1 (NS1) Proteína de exporte nuclear (NEP)/No estructural 2 (NS2) | Proteína interna Regula el ciclo de vida del virus, especialmente la transcripción de los RNAm y la localización de las ribonucleoproteínas virales. |

Adaptado de Gramer, 2005 y Sánchez, *et al*, 2017.

Los influenzavirus A tienen una constante variabilidad genética, asociada a su alta tasa de mutaciones puntuales característica de los virus RNA, debido a errores de la RNA polimerasa que van de 10^{-4} a 10^{-3} nucleótidos erróneos por ciclo de replicación (51), o “DRIFT” y por otro lado, su genoma segmentado facilita la reorganización genética,

intercambio de segmentos de distintos subtipos virales “Shift”, debido a la coinfección de una misma célula, reordenamiento antigénico ligado a la aparición de virus recombinantes de diferentes huéspedes y de carácter pandémico (52,53).

1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA

El virus de influenza A se encuentra bajo constante vigilancia epidemiológica a nivel mundial, por su carácter zoonótico (49). En México son de reporte obligatorio los subtipos de alta patogenicidad de aves y cualquier subtipo ajeno a su hospedero natural; en cerdos, es de reporte obligatorio cualquier subtipo de influenza A con la excepción de H1N1, H1N2 y H3N2 de origen porcino (41,51,54).

Los principales subtipos que afectan a cerdos son: H1N1, H1N2 y H3N2, pero se han reportado virus de diverso origen, principalmente aviarios (H9N2, H7N7, H4N6, H3N1, H2N3 y H5N2) (39,53,55). Asociados a la presencia de los dos tipos de receptores en los cerdos, por los que los virus de Influenza A tienen afinidad, el ácido siálico α 2,3-galactosa y ácido siálico α 2,6 galactosa, para virus aviarios y humanos respectivamente. Sin embargo, estudios más detallados demuestran que humanos, hurones y aves presentan los mismos receptores en diferente distribución, por lo tanto son capaces de infectarse (56–58).

1.3.2 TRANSMISIÓN

Se realiza por contacto directo de cerdo a cerdo, por aerosol en gotitas infectadas de estornudos de animales enfermos, todos los fluidos corporales se consideran potencialmente infecciosos, se ha detectado en semen y raramente se transmite por fómites contaminados porque no persiste en el medio ambiente por largo tiempo (59).

1.3.3 PATOGENIA

En las infecciones clásicas, el virus ingresa por vía oro-nasal al tracto respiratorio y se multiplica rápidamente en células del epitelio bronquial, tonsilas, tráquea, linfonodos traqueo bronquiales y pulmones, ocasionando congestión y necrosis focal del epitelio bronquial, diseminándose a todo el tracto respiratorio (39). Los pequeños bronquios se obstruyen por el exudado rico en neutrófilos, la necrosis e hiperplasia del epitelio bronquial incrementa los niveles de citocinas ($\text{INF}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$, IL6 e IL1) en fluidos bronquio alveolares y se presentan los signos clínicos dentro de las primeras 16 horas, a las 24 – 72 horas el

virus alcanza su máxima concentración en los bronquios, ductos alveolares y alveolos, posteriormente la concentración del virus comienza a disminuir y los animales se comienzan a recuperar (60). Puede haber viremia e infección transplacentaria, en el último tercio de gestación, ocasionando falla en el desarrollo del pulmón y pueden detectarse anticuerpos en el feto. Si la infección no se complica con agentes secundarios, después de 2 semanas post-infección los cerdos llegan a recuperarse de la enfermedad (39).

1.3.4 SIGNOS CLÍNICOS

La replicación del virus en los cerdos infectados generalmente está limitada al tracto respiratorio y los signos clínicos de la enfermedad aparecen súbitamente observando tos, descargas nasales y oculares, estornudos, heces pastosas, letargia, anorexia, disnea e hipertermia (≥ 41 °C). Los animales jóvenes rehúsan moverse, los animales adultos pierden el apetito y en reproductores la actividad reproductiva puede verse afectada. Tiene alta morbilidad, hasta el 100% y baja mortalidad, en brotes atípicos pocos animales muestran signos agudos, vómito o diarrea y se observan abortos durante 3 días hasta por 3 semanas en el segundo tercio de gestación (50,59,60).

1.4 CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV2)

El *Circovirus Porcino Tipo 2* (PCV2, del inglés *Porcine circovirus type 2*) es una partícula viral de forma icosaédrica, no envuelta, de aproximadamente 12 a 25nm (Figura 4) que pertenece a la Familia *Circoviridae*, Género *Circovirus*, del cual se han identificado tres diferentes especies en cerdos, PCV1, PCV2 y PCV3, el último recientemente reconocido por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) (25). De estos tres tipos, solo dos se asocian a problemas clínicos y patológicos, PCV2 y PCV3 (61). Tischer y colaboradores (1974) describieron a PCV1 como contaminante de la línea celular PK 15 (ATCC- CCL31) y lo consideraron un virus no patógeno para los cerdos (62). PCV3 fue recientemente identificado mediante técnicas moleculares en cerdos con un cuadro clínico similar al ocasionado por el tipo 2 (63). PCV2 se asocia a múltiples síndromes y enfermedades llamadas “Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino o **PCVAD**, del inglés *Porcine Circovirus Asosociated Disease*”, las cuales incluyen al Síndrome de Debilitamiento Multisistémico Pos-destete o **PMWS**, del inglés, *Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome*, Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina o **PDNS** del inglés *Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*, fallas reproductivas, enteritis granulomatosa, linfadenitis necrotizante, epidermitis exudativa y complejo respiratorio porcino, algo muy importante de resaltar es que, PCV2 no es capaz de desencadenar algún cuadro clínico por sí solo pero es indispensable para su desarrollo (24,44,57,61,64).

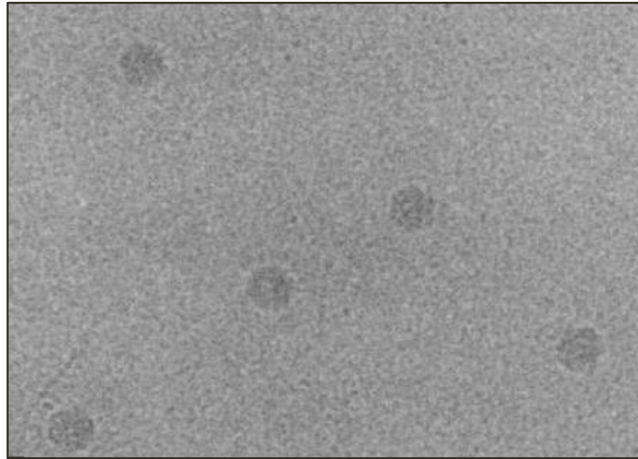


Figura. 4. Crio microscopía electrónica de PCV2.
Fuente: Crowther *et al*, 2003.

El genoma de PCV2 es ADN circular de una sola cadena en ambisentido, de 1766 a 1768 nucleótidos, con 3 ORFS reconocidos, que se predice codifica 11 proteínas, empalmadas en ambas cadenas, la cadena empaquetada en el virión y la complementaria sintetizada en el hospedador como se ejemplifica en el esquema de la figura 5. El ORF 1 o Rep gen, es el más conservado y codifica proteínas asociadas a la replicación del ADN. El ORF3 asociado al control de la apoptosis celular. Y el ORF 2 codifica la proteína de la cápsides o Cap; proteína estructural e inmunogénica, muy variable que se utiliza para sub clasificar a PCV2 en diversos genotipos (65–67).

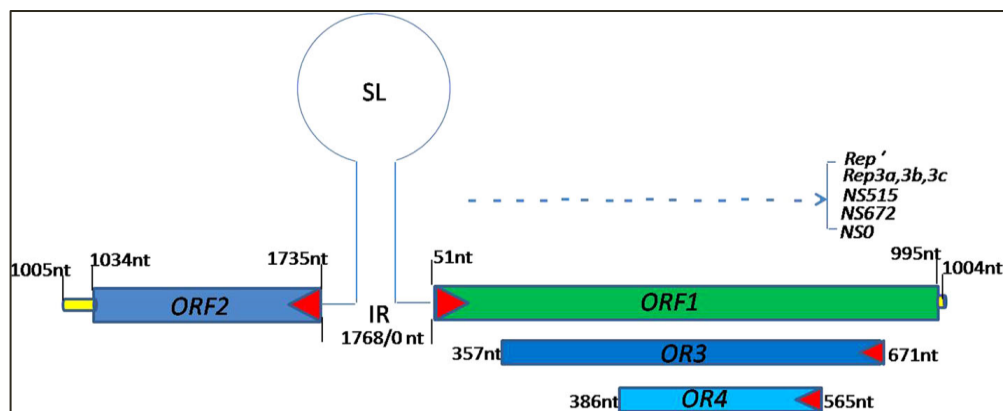


Figura. 5. Esquema del genoma de PCV2.

Basado en el genoma completo de la cepa con número de acceso del GenBank: AF027217. Se muestran cuatro ORFs, el número de nucleótidos que le corresponde y su orientación de transcripción se indica con un triángulo rojo. El “Steam-Loop (SL). Región intergénica (RI). Fuente: Lv *et al*, 2014.

En PCV2 se han identificado grupos, genética y antigénicamente diversos, que se han subclasificado de acuerdo a la similitud existente entre la secuencia genética del ORF2, designando a cada genotipo con una letra minúscula al final (68). El último análisis filogenético de secuencias de genoma completo y del ORF2 disponibles en el GenBank realizado en 2015 por Franzo y colaboradores, reconoce 4 genotipos diversos, PCV2a, PCV2b, PCV2c y PCV2d, como se observa en el árbol filogenético basado en el ORF2 de PCV2 de la Figura 6 (7,68).

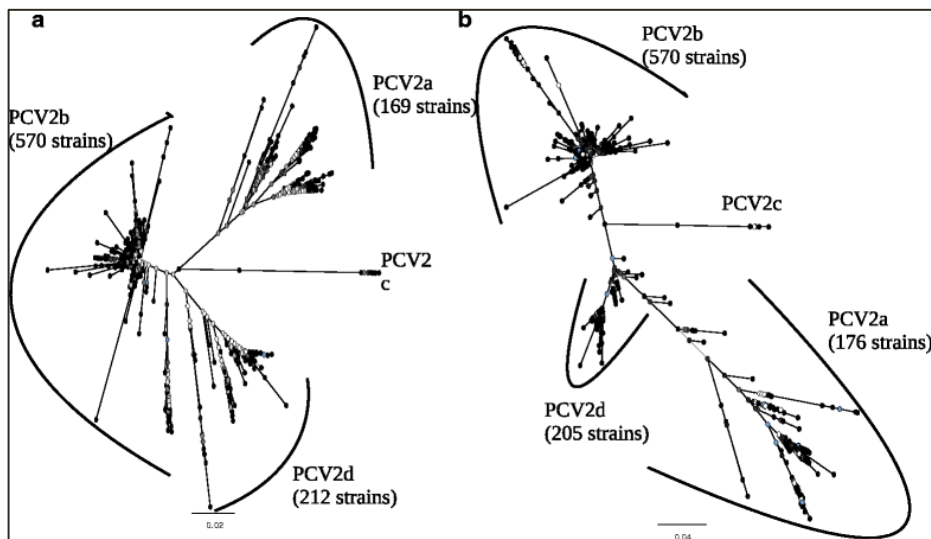


Figura. 6. Árbol filogenético basado en el ORF2 de PCV2.

Construido usando el método de (a) Neighbor Joining, (b) Maximum likelihood. Muestra la existencia de 4 genotipos de PCV2. Fuente: Franzo, *et al*, 2015.

Recientemente se han identificado recombinaciones genéticas entre genotipos de PCV2a y PCV2b y de PCV2 con PCV1, generando virus recombinantes intra e inter genotipo altamente patógenos y antigénicamente diversos, que ocasionan cuadros clínicos devastadores en la industria porcina, también se reporta, que la infección concomitante de diferentes genotipos de PCV2 y PRRS incrementa los porcentajes de mutaciones silenciosas y no silenciosas del virus de PRRS, sin embargo, en esos estudios no se analizaron los cambios ocurridos con PCV2 (43,69–71).

1.4.1 EPIDEMIOLOGÍA

Es una enfermedad de distribución mundial, considerada como una enfermedad reemergente y endémica en todas las regiones con producción porcina a nivel mundial (39). Se caracteriza por presentar una alta morbilidad y baja mortalidad, no es zoonosis y su único huésped susceptibles de forma natural son los cerdos, salvajes y domésticos; aunque se ha identificado en ratas de granja y se ha infectado de forma experimental bovino, demostrando que los cerdos no son la única especie susceptible (72–74). En México, PCV2 está clasificado dentro del grupo 2 y se considerada de notificación inmediata obligatoria a las dependencias oficiales de sanidad animal del país (7,41,75).

1.4.2 TRANSMISIÓN

La principal ruta de transmisión es oro-nasal por contacto directo con cerdos infectados o fluidos corporales de animales enfermos (saliva, heces, orina y semen), atraviesa barrera placentaria y se disemina en semen, debido a su gran resistencia al medio ambiente es muy factible la diseminación por fómites y vehículos contaminados, la transmisión entre granjas por vientos no está documentada pero los roedores podrían jugar un papel muy importante (76).

1.4.3 PATOGENIA

El circovirus ingresa por vía oro-nasal, tras placentaria o venérea, se une a receptores de heparansulfato y condroitin sulfato B de células en constante replicación, principalmente macrófagos, células dendríticas, endoteliales e histiocitos en linfonodos. En infecciones transplacentarias los embriones pueden infectarse después de la implantación y en fetos jóvenes de entre 40 y 70 días de gestación el virus se replica principalmente en miocitos, hepatocitos, órganos linfoides y pulmón, hay viremia y diseminación del virus por todo el organismo del huésped, una depresión linfoide, principalmente linfocitos B y T. La infección puede ser subclínica y el virus se disemina por secreciones nasales, heces durante dos días pos infección y hasta 5 en semen. Se puede secretar en leche y calostro y los anticuerpos aparecen hasta 14 días pos infección. El Síndrome de Debilitamiento Multisistémico Pos-destete o PMWS, es considerado el problema más importante asociado a PCV2, donde circovirus es esencial para el desarrollo de la signología, que aparece 10 a 14 días post infección y está relacionada a la carga viral presente. La inmunidad pasiva

protege de los signos clínicos pero no de la infección y altos niveles de anticuerpos predisponen al desarrollo de PDNS (62,77).

1.4.4 SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos observados en las diferentes presentaciones subclínica y clínicas, de las diversas Enfermedades Asociadas a Circovirus Porcino son muy amplias; Joaquín Segalés (2012) propone clasificarlas y agruparlas de acuerdo a los principales signos clínicos: a) en infección subclínica (PCV2-SI); b) enfermedad sistémica (PCV2.SD) que agrupa al síndrome del desmedro multisistémico post destete PMWS, circovirosis Porcina e infección sistémica asociada a PCV2; c) enfermedad pulmonar por PCV2 (PCV2-LD) que incluye a la enfermedad respiratoria asociada a PCV2 y a la neumonía proliferativa y necrotizante; d) enfermedad entérica por PCV2 que incluye a la enteritis asociada a PCV2 y e) enfermedad reproductiva por PCV2, resumidos en el cuadro 2 (78).

Cuadro.2. Clasificación de las enfermedades asociadas a circovirus porcino y los principales signos clínicos para su diagnóstico individual.

| Nombre de la PCVD | Principales signos clínicos y criterios de diagnóstico individual |
|---|--|
| Infección subclínica de PCV2 (PCV2-SI) | Baja ganancia de peso, sin signos clínicos. Mínimas o nulas lesiones histopatológicas y baja cantidad de virus detectable en tejidos por PCR. |
| Enfermedad sistémica por PCV2 (PCV2-SD) | Debilitamiento, pérdida de peso, baja en promedios de ganancia diaria de peso. Depleción linfoide moderada a severa con inflamación granulomatosa del tejido linfoide y moderada a alta detección de virus en tejidos dañados. |
| Enfermedad pulmonar por PCV2 (PCV2-LD) | Dificultad para respirar y disnea, signos clínicos respiratorios. Bronconeumonía intersticial o bronconeumonía intersticial granulomatosa linfocitocítica, fibroplasia peri bronquial mediana a severamente necrotizante, bronquiolitis ulcerativa o proliferativa moderada a severamente necrotizante en ausencia de lesiones linfoides. Moderada a alta cantidad de virus en pulmón. El tejido linfoide puede no tener lesiones microscópicas. |
| Enfermedad entérica por PCV2 (PCV2-ED) | Diarrea, enteritis granulomatosa con depresión linfoide e inflamación granulomatosa en placas de Peyer pero no en otros tejidos linfoides. |
| Enfermedad reproductiva por PCV2 (PCV2-RD) | Abortos y/o momificaciones, fallas reproductivas al final de la gestación, miocarditis fibrinosa a necrotizante en fetos y moderada a alta cantidad de virus en corazón por PCR. Retorno a estro regular, seroconversión a PCV2. Positivas a PCV2 por PCR alrededor de la ocurrencia del retorno a estro. |
| Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS) | Pápulas y maculas rojo oscuro a purpuras en la piel de los miembros posteriores y región perineal. Lesiones hemorrágicas a necrotizantes en la piel. Riñones pálidos e hinchados con petequias corticales generalizadas. Vasculitis sistémica necrotizante y glomerulonefritis fibrinosa y necrotizante. |

Adaptado de Segalés. 2012.

1.5 CORONAVIRUS RESPIRATORIO PORCINO (PRC)

El **Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCV)**, del inglés *Porcine Respiratory Coronavirus*), pertenece a la Familia Coronaviridae recientemente reclasificada. Los coronavirus se subdividen en cuatro grupos: Alfa, Beta, Gamma y Delta-Coronavirus (α -, β -, γ - y δ -CoV), genética y antigénicamente diversos, que afectan a diversos mamíferos y aves principalmente; son específicos de especie pero análisis genéticos y filogenéticos sugieren que frecuentemente cruzan la barrera inter especie (79). La subfamilia: **Orthocoronavirinae**, Género: *Alfacoronavirus*, subgénero: *Tegacovirus*, especie: *Alfacoronavirus 1*, agrupan **4 subespecies**: los Coronavirus Felinos, Caninos, al virus de la gastroenteritis transmisible porcina (**TGEV**) y al **PRCV**; (25).

El Coronavirus Respiratorio Porcino (**PRCV**) , es un virus envuelto, de 120 a 160 nm, esféricos o pleomórficos que en su superficie, presentan espículas en forma de espiga que en imágenes de microscopía electrónica tiene la apariencias de corona (Figura 7), (80,81).

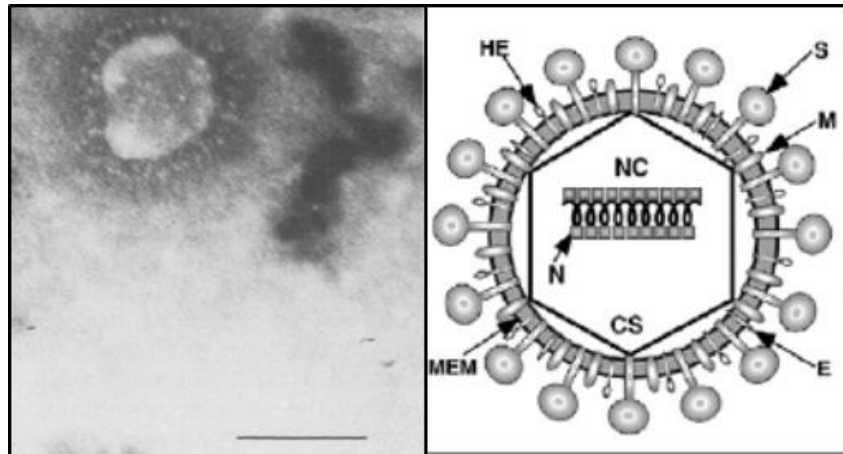


Figura. 7. Microfotografía electrónica de una partícula de un coronavirus.

Observada en el contenido intestinal de un cerdo con diarrea. Barra representa 100 nm. Ala derecha el esquema de la estructura del virion de GET. MEM membrana lipídica, S proteína Spike, M, proteína larga de membrana; E, proteína menor de la envoltura; HE, hemoaglutinina-esterasa; N, proteína de la nucleocápside; CS, envoltura nuclear y NC, nucleocápside.

Fuente: Dea S *et al* 1985 y de Contents, 2011.

El genoma del **PRCV** es RNA lineal de cadena sencilla y sentido positivo, de aproximadamente 27 a 28 kb de largo, con 7 ORF que codifican para 8 proteínas (80). El

ORF1ab codifican una larga poli proteína que da origen a pequeñas proteínas no estructurales asociadas a la replicación (16); el ORF2 o “S”, codifica la proteína S o “*Spike*”, una glicoproteína de membrana tipo I, que sirve como receptor de unión y de entrada del virus, es la más variable en todos los coronavirus, se escinde en dos dominios S1 y S2, siendo el dominio S1 el más variable; El ORF3 dividido en 3a y 3b es disfuncional en PRCV pero en GET codifica dos proteínas no estructurales asociadas a la virulencia; el ORF4 y 5 o E y M, codifican pequeñas glicoproteínas transmembranales asociadas a la envoltura y aunque son las proteínas más conservadas de los coronavirus, son muy cortas para análisis filogenéticos; el ORF6 o “N” codifica a la proteína de la nucleocápside, altamente inmunogénica, conservada y objetivo de análisis filogenéticos y de pruebas serológicas. Los anticuerpos neutralizantes son dirigidos hacia la glicoproteínas de superficie, mayormente conformacionales, localizados en la porción N-terminal de la proteína S. La proteína S se unen a la amino peptidasa N y los residuos de heparan sulfato y de ácido siálico sirven como factores de unión no específicos (80–82).

EL Coronavirus Respiratorio Porcino se considera un virus mutante, genética y antigénicamente muy relacionado al virus de la Gastroenteritis Transmisible Porcina (**TGEV**), con una delección de 621 a 628 nucleótidos en la región N-terminal del gen de la proteína S que difiere en localización y tamaño entre los diferentes aislados, pequeñas delecciones e inserciones en el ORF3a y 3b de diferente tamaño y localización tanto en **PRCV** como en **TGEV** como se muestra en la figura 8 (a) y (b). Esas múltiples mutaciones/recombinaciones, se relacionan con la pérdida del tropismo del tejido y virulencia de las distintas cepas virales, aunque su verdadero roll se desconoce. La delección en la proteína S de PRCV causa la pérdida de una región codificante para el receptor de unión a la amino peptidasa N, lo que se asocia al cambio del tropismo de tejido y virulencia de las distintas cepas (82–85).

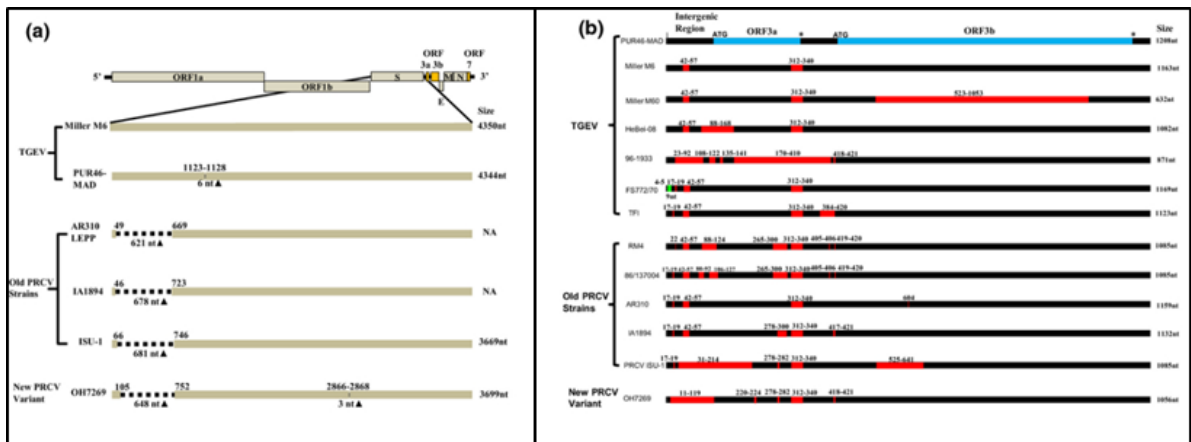


Figura 8. Diagrama que esquematiza la estructura del genoma de GET y PRCV.

(a) Las deleciones en el gen S se muestran en línea punteada, donde se indica el nucleótido de inicio y término de la deleción, así como el tamaño de la deleción y del gen S para cada cepa. En amarillo se muestran genes no estructurales. (b) esquematización de la región intergénica entre gen S a ORF3b, donde se marcan con color azul, las regiones codificantes en la cepa de referencia PUR46-MAD y en verde y rojo, las inserciones y deleciones respectivamente, marcando la posición de la inserción o deleción. Fuente: Zhang *et al*, 2015.

1.5.1 EPIDEMIOLOGÍA

Desde su descubrimiento en 1986 en Bélgica se ha reportado en varios países de Europa, Asia y América (83). En Canadá y EEUU, se han descrito diversas variantes del virus (80). Su prevalencia es desconocida y actualmente se considera enzoótico en las producciones de cerdo de todo el mundo, no es Zoonosis, su único huésped conocido es el cerdo y confunde el diagnóstico serológico de TGEV; su incidencia incrementa en los meses de invierno y desaparece en primavera. En México, el virus no se ha reportado y no se realiza diagnóstico diferencial de este virus. Las autoridades sanitarias la consideran una enfermedad del grupo 3, como enfermedad endémicas de notificación mensual obligatoria a las autoridades (41,82,84).

1.5.2 TRANSMISIÓN

La transmisión es por aerosol o contacto directo, principalmente al destete y cuando se mezclan o se reintroducen animales susceptibles, crecimiento y finalización. En regiones productoras con granjas con elevada densidad de población animal, el virus puede diseminarse por aire varios kilómetros (86).

1.5.3 PATOGENIA

La infección es generalmente por aerosol o contacto directo y el virus se replica principalmente en pulmón, células de la mucosa nasal, de la traqueal, bronco-alveolar, en neumocitos tipo 2 y macrófagos alveolares (87). Las lesiones se limitan al tracto respiratorio, ocasiona varios grados de neumonía intersticial, puede haber viremia y el antígeno ser detectado en la submucosa del intestino delgado pero no en la mucosa, se ha detectado en semen hasta 6 días posteriores a la infección (39). El PRCV se disemina por aerosol hasta siete días pos infección, el cuadro generalmente es subclínico pero en infecciones experimentales con otros agentes infecciosos demuestra ser un patógeno inmunosupresor (82). Generalmente no causa lesiones pero se ha observado bronconeumonía catarral, neumonía intersticial, hiperplasia y pérdida del epitelio bronquial, pero los daños se restringen al pulmón y bronquios (39,86,87).

1.5.4 SIGNOS CLÍNICOS

La infección es subclínica, aunque se reporta anorexia, disnea, tos, estornudos, postración y fiebre de 40°C por 1 a 5 días en infecciones experimentales, también se ha observado que infecciones con PRC solo, o con IP, tienen bajo impacto en promedios de crecimiento, pero en concomitancia con PRRS el efecto inmunosupresor es mucho mayor (39,86).

1.6 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DISPONIBLES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS VIRALES ASOCIADOS AL CRP

El diagnóstico de enfermedades infecciosas es crucial para implementar medidas terapéuticas, profilácticas, de control y erradicación de patógenos virales. Actualmente existen diversas técnicas o pruebas diagnósticas, enfocadas en la detección de patógenos virales de forma directa o indirecta; que se complementan y contribuyen en la identificación y caracterización de los patógenos virales (10). Las pruebas diagnósticas indirectas; enfocadas en detectar anticuerpos que muestra que los animales estuvieron en contacto con algún virus específico; dentro de los que destacan ELISA, que demuestran los cambios en los títulos de anticuerpos; Seroneutralización (SN), efectivo evaluación el funcionamiento de vacunas; inhibición de la hemaglutinación (IH) para virus hemaglutinantes, entre otras pruebas (39,86).

Las pruebas directas, detectan la presencia de los virus específicos, partes estructurales o su material genético, que incluyen técnicas como el aislamiento viral en células o embrión de pollo, prueba de oro para determinar la asociación del agente causal a una enfermedad específica; microscopia electrónica, que permite visualizar al virión en el tejido o cultivo celular e identificar su morfología; aglutinación en el caso de virus hemaglutinantes; ensayo inmunoenzimático directo (ELISA) , inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia directa e inmunohistoquímica, técnicas que mediante inmunomarcaje hacen visible al virión (40). Recientemente las pruebas enfocadas en la detección y/o amplificación del material genético del agente causal cómo: la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con sus diversos tipos o variantes, hibridación de ácidos nucleicos y secuenciación, sirven como herramientas alternativas, rápidas, económica, altamente sensibles y específica; que pueden facilitar el diagnóstico y monitoreo de las enfermedades virales en el sector agropecuario (10,88,89). Pruebas que no se encuentran disponibles en todos los laboratorios y estandarizadas para todos los virus en cuestión, en su mayoría costosas y tardadas; algunas solamente disponibles para investigación por su costo y equipo requerido (10,39,86).

1.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una herramienta de rutina en los laboratorios de diagnóstico microbiológico, permite detectar y/o caracterizar genéticamente microorganismos causantes o asociados a alguna enfermedad; es una técnica que revolucionó la biología molecular desde su invención en 1983 por Kary Mullis. Quien fundó las bases de nuevas técnicas moleculares que se sigue perfeccionando, mejorando y adaptando a las necesidades y exigencias de los laboratorios de diagnóstico e investigación de patógenos en la actualidad (89).

La PCR es una técnica en la que se amplifica selectivamente cualquier fragmento de ADN de forma exponencial, solamente, conociendo las secuencias que lo delimitan. El método utiliza un par de secuencias cortas de ADN sintético de una sola cadena, llamados oligonucleótidos, iniciadores o *primers* que sirven de anclaje o sustrato a la ADN polimerasa para que comience a adicionar nucleótidos de forma secuencial y realizar la cadena complementaria. El proceso se resume en tres sencillos pasos: el primero es la desnaturalización o separación de la doble cadena de ADN por temperaturas mayores a 90 °C, el segundo es la alineación o hibridación de los oligonucleótidos con su secuencia complementaria a temperaturas de 45 a 70 °C, y el tercero es la extensión en la que la ADN polimerasa anexa los nucleótidos complementarios a la cadena molde, que se da a temperaturas de 72 a 78°C (90–92).

Los cambios de temperaturas y el número de repeticiones de cada paso se realizan en un equipo llamado termociclador. Un protocolo generalmente tiene un periodo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 a 10 minutos, seguida de 20 a 40 ciclos cortos de desnaturalización, alineación y extensión, que varían en tiempo y temperatura dependiendo del tamaño del producto a amplificar, en los cuales se generan múltiples copias de la secuencia de ADN blanco; finaliza con un periodo de extensión extra a 72°C por 5 a 10 minutos en el que se completan las cadenas de ADN que durante los ciclos no se hayan finalizado (89,93).

La visualización del producto de PCR generalmente se realiza en geles de agarosa o poliacrilamida, los cuales al someterse a una corriente eléctrica o electroforesis, permiten la

separación de los diversos fragmentos amplificados de ADN. Finalmente los productos se tiñen con un agente intercalante; una sustancia que se une o intercala a las cadenas de ADN formadas y que fluoresce en presencia de rayos ultravioleta (UV), y se visualizan en un fotodocumentador (89,92).

Actualmente se han adaptado o desarrollado diversas variantes de la técnica de PCR como la PCR anidada, en la cual se re-amplifica un fragmento más pequeño del primer fragmento amplificado; PCR cuantitativo y/ o tiempo real, la cual permite cuantificar la cantidad de **ADN** presente en la muestras y el termociclador detecta el número de copias generadas en cada ciclo; PCR digital, que detecta el tamaño de los productos amplificados; RT-PCR, que permite amplificar fragmentos de **ARN** mediante la retro-transcripción del RNA por una retro transcriptasa; PCR múltiple, en la cual se amplifican diversos fragmentos de un mismo o diversos fragmentos de **ADN**; entre otras (92).

1.8 RT-PCR MÚLTIPLE O MULTIPLEX

Es un tipo de PCR que combina un proceso de retro transcripción y la amplificación de múltiples fragmentos de ADN en una misma reacción; el proceso de retro transcripción por la adición de una enzima transcriptasa inversa, realiza la cadena complementaria o cADN a cadenas sencillas de ADN o RNA (89). Posteriormente, la adición de diversos oligonucleótidos permite amplificar de forma exponencial múltiples fragmentos de ADN en la misma reacción de PCR. Finalmente los diferentes amplificados se distinguen por su tamaño en la electroforesis (Figura 9), (90,94).

El potencial de esta prueba le ha dado un auge como herramienta diagnóstica en laboratorios de diagnóstico microbiológico, estudios médicos y biológicos, principalmente en estudios taxonómicos porque reduce costos y tiempo, al ser necesaria solamente una reacción para probar una muestra contra diversos patógenos (90,95).

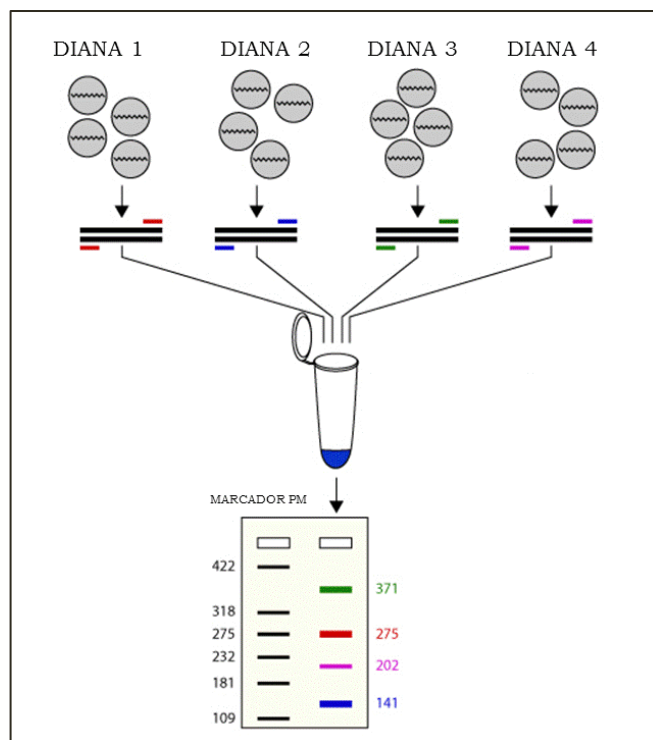


Figura. 9. Esquema de una reacción de PCR múltiple.

Se muestran 4 diferentes segmentos a amplificar o segmentos Diana 1, 2, 3, 4; reacciones en un mismo tubo que se visualizan posteriormente en un gel y se diferencian por su tamaño o peso molecular en pares de base (pb). Fuente: Bolivar *et al*, 2014.

2 JUSTIFICACIÓN

La técnica de RT-PCR múltiple **tiene un alto potencial como herramienta diagnóstica**, alto grado de sensibilidad y especificidad, es fácil de usar y en México no existe una prueba diagnóstica que detecte más de un patógeno; de los virus más frecuentemente asociados al CRP. El desarrollo de una RT-PCR múltiple, implica un desafío en la estandarización, pero laboratorios de diagnóstico e investigación están desarrollando sus propias metodologías y estrategias para diagnosticar enfermedades polimicrobianas más eficientes.

La mayoría de pruebas de PCR actualmente disponibles en el país, son fabricadas en el extranjero, desarrolladas para cubrir las necesidades de su región, no garantizan la detección de virus circulantes en el país, son para un reducido número de enfermedades y principalmente para la detección de patógenos individuales.

El Laboratorio de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia en Cerdos (DMZC) cuenta con la infraestructura y equipo necesario para implementar la prueba. Por lo tanto, estandarizar una prueba sensible y específica como la RT-PCR múltiple, reducirá costos, tiempo y esfuerzos en el diagnóstico, proveerá mayor información a los procesos de investigación de interacciones, sinergismo, prevalencia y monitoreo de las diversas cepas de virus circulantes. Además permite implementar medidas correctivas, oportunas que reduzcan pérdidas en la producción porcina mexicana y a mejorar el bienestar de los animales.

3 OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Estandarizar la prueba de RT-PCR Múltiple, que detecte y diferencie de forma conjunta, rápida y precisa, los principales patógenos virales asociados al CRP en México.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Desarrollar *Oligonucleótidos* dirigidos a regiones conservadas y menos variables del genoma de virus presentes en México, que permitan detectar la mayor diversidad de cepas y subtipos virales antes mencionados.
2. Estandarizar la Prueba de RT-PCR múltiple para los 4 principales virus asociados al CRP antes mencionados.
3. Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

El diseño de oligonucleótidos se realizó con el programa **Primer Designer®**, **Scientific & Educational Software**, tomando en cuenta especificaciones que garantizan un diseño fidedigno, evitan errores de especificidad y sensibilidad como son:

- Tamaño promedio de 18 a 30 nucleótidos, ideal 20.
- Concentración de Guanina (G) y Citosina (C) de entre 40 y 60%.
- Evitar secuencias repetidas de una misma base (poli X).
- Que los extremos 3' no sean complementarios entre ellos, ni con el resto de oligonucleótidos para evitar la formación de dímeros.
- Que la temperatura media de alineación sea similar y no varíe más de 3 grados de diferencia entre oligonucleótidos y en un rango de 50 a 65 °C (91,96–98).

Para garantizar que los oligonucleótidos diseñados detectaran virus que circulan en la población porcina nacional. Se elaboraron bases de datos con secuencias nucleotídica de los genes más conservados de cada virus, disponibles en el GenBank del National Center of Biotechnology Informations (NCBI) del 2009 al 2017, de virus aislados y reportados en México, Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (Cuadro 3). Las secuencias se alinearon con el programa Clustal W de Mega 7.0®, se identificó la región más conservadas de cada genoma viral, ideal para enfocar el diseño de oligonucleótidos para diagnóstico y como criterio se consideró que no formen dímeros, con el uso del programa MFEprimer-3.0 beta.

Cuadro. 3. Bases de secuencias elaboradas para cada virus

| Virus | ORF conservado | Tamaño del ORF. | Numero de secuencias |
|-------------|----------------|-----------------|--|
| PRRS | 6 | ~525 nt | 537 secuencias |
| IP | 7 | ~1025 nt | Base 1: 549 secuencias Base 2: 3065 secuencias* |
| PCV2 | 1 | ~940 nt | 61 secuencias |
| PRC | S | ~3700 nt | 19 secuencias |

*base de secuencias reportada por Elhefnawi *et al.*, 2011

4.2 PRUEBA DE ESPECIFICIDAD DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS Y SÍNTESIS

La prueba de especificidad *in silico* se realizó mediante un análisis BLAST (Basic Local Aligmen Search Tool) herramienta del NCBI, se verificó que los oligonucleótidos diseñados se alinearan exclusivamente a las secuencias de los virus objetivos, confirmando su especificidad, homología y cobertura de secuencias virales. La evaluación práctica se realizó mediante PCR, anexando material genético de virus, bacterias y células negativas a los virus, verificando que no existieran amplificaciones inespecíficas.

4.3 DESARROLLO DE STOCKS VIRALES Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

4.3.1 VIRUS

Los virus utilizados en este trabajo se obtuvieron de la viroteca del Laboratorio de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia en Cerdos. Se utilizó el virus de PRRS- cepa VR2332 del ATCC®; dos virus aislados de Influenza Porcina, subtipo H1N1 y subtipo H3N2; un aislado de PCV2 y de TGEV, virus aislados previamente en dicho laboratorio. Los virus se almacenaron a -70°C durante el desarrollo del experimento.

4.3.2 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

La extracción del material genético viral se realizó con dos kits comerciales de extracción de ácidos nucleicos, siguiendo las especificaciones del fabricante. El Kit de extracción QIAmp® Viral RNA, para la obtención de RNA de los virus de PRRS, IP y GET. Y el Kit de extracción QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit, para obtener el DNA de PCV2 y el DNA y/o RNA de las muestras de tejido empleadas en la evaluación de la prueba.

El material genético obtenido se cuantificó en un equipo Qubit™ 2.0, siguiendo la metodología del fabricante y se almacenó a -70°C hasta su uso.

4.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR MÚLTIPLE

La estandarización de la RT-PCR múltiple se realizó siguiendo dos metodologías, primero se obtuvo la temperatura óptima de alineación de cada uno de los virus con sus respectivos

oligonucleótidos mediante gradientes de temperatura, con el kit One-Step® RT-PCR de QIAGEN® en un solo paso y se determinó el rango de amplificación de cada par de oligonucleótidos. Posteriormente los oligonucleótidos con temperaturas de alineación similar de cada virus (IP, PRRS, PCV2 y PRCV), se probaron en combinación múltiple.

La segunda metodología consistió en realizar la reacción de RT y PCR para cada virus. La retrotranscripción se realizó con el Kit Superscript II RT, de Invitrogen ® y posteriormente la reacción de PCR y PCR múltiple con el kit Amplificasa ® de Biotecmol ®, siguiendo las especificaciones del fabricante.

4.5 CONDICIONES DE REACCIONES DE RT-PCR Y PCR

Las condiciones de las reacciones de RT-PCR y PCR para cada kit empleado fueron las siguientes: la reacción en un solo paso se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante, optimizando los reactivos a un volumen final por reacción de 10.1 µl. En la reacción en dos pasos, la retro-transcripción se realizó siguiendo las especificaciones de los fabricantes y en la reacción de PCR se optimizó el kit de Amplificasa® a un volumen final de 20 µl (Cuadro 4).

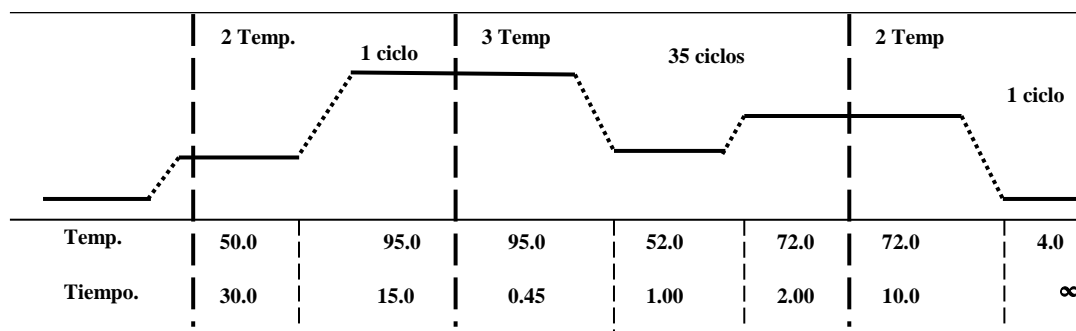
Cuadro. 4. Volumen optimizado de reactivos del kit de RT-PCR empleados en este estudio.

| kit One-Step® /Reactivo | Volumen en µl | kit Amplificasa®/ Reactivo | Volumen en µl |
|-------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| RT-Buffer 5x | 21 | Amortiguador 10X | 2 |
| Q-Buffer 5x | 2 | dNTPS | 2 |
| H2O | 3.2 | Cloruro de Magnesio | 1 |
| Oligo Forward | 0.25 | Oligo Forward | 1 |
| Oligo Reverse | 0.25 | Oligo Forward | 1 |
| Mix de enzimas | 0.4 | Amplificasa | 0.1 |
| dNTPs | 0.4 | DNA genómico | 1 |
| Muestra | 1.5 | H2O | 11.9 |
| Volumen final | 10.1 µl | Volumen final | 20.0 µl |

La reacción de RT-PCR, RT y PCR se realizaron en un termociclador marca Labnet MultiGen Optimax® de 6 canales, con las condiciones de ciclado que se muestran en la

Figura 10. El ciclado de la RT se realizó siguiendo la metodología recomendada por el fabricante y para la reacción de PCR por separado, se eliminó el paso de RT y se dio una desnaturalización inicial de 10 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante.

Figura. 10. Condiciones de ciclado de la RT-PCR en un solo paso para la estandarización de los oligonucleótidos de cada virus de forma individual.



4.6 VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 2% en TAE 1x, Thermo Scientific ® (Tris Ácido Acético EDTA), con 1µl de Gel Red ® como colorante fluorescente de ácidos nucleicos por cada 15 ml de agarosa.

Cada carril del gel se cargó con 5 µl de Marcador de Peso Molecular 50 bp DNA Ladder de Invitrogen™ en el primer pozo y en los pozos siguientes 5 µl de cada reacción de PCR, previamente mezclada con 1 µl de Buffer de carga (25 mg de azul de bromofenol 6x, 3 ml de glicerol, aforado a 10 ml con agua destilada).

La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis CLP Bioscience modelo 75.710, con 400 ml de TAE 1x y una fuente de poder BIO-RAD Power PAC 300 a 100 volts, durante 45 minutos a 90 volts.

Los geles se observaron y fotografiaron en un transiluminador Kodak Gel Logic 112, con cámara Kodak Molecular Imaging Software V.5.0.1.27 Standard Edition 2008., con luz UV.

4.7 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA RT-PCR INDIVIDUAL Y MÚLTIPLE

Para determinar la sensibilidad y eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos, se siguió la metodología descrita por Sint, *et al*, (2012); homogenizando la concentración de copias de amplicones de cada virus por micro litro y posteriormente realizar diluciones decuples seriadas de la siguiente forma:

1. Se purificaron los amplificadores de cada par de oligonucleótidos con el kit Gel Extraction Kit ® QIAquick.
2. Se cuantificó el DNA extraído con el kit de cuantificación Qubit dsDNA high-sensitivity de Thermo Fisher Scientific ®.
3. Se estimó el peso molecular y número de copias o cadenas dobles (DS) de cada amplicón generado por cada par de oligonucleótidos con el programa **DNACalculator** (Figura 11) disponible en el link: (<http://www.uibk.ac.at/ecology/forschung/biodiversitaet.html.en>).
4. Se realizaron diluciones para homogenizar la concentración de templados de DNA de cada virus.
5. Se realizaron diluciones decuples seriadas para obtener la concentración en la que hubiera igual número de templados de DNA por μl de cada virus.
6. Y finalmente se determinó la mínima cantidad de copias detectables de los oligonucleótidos en la PCR simple y en la PCR múltiple.

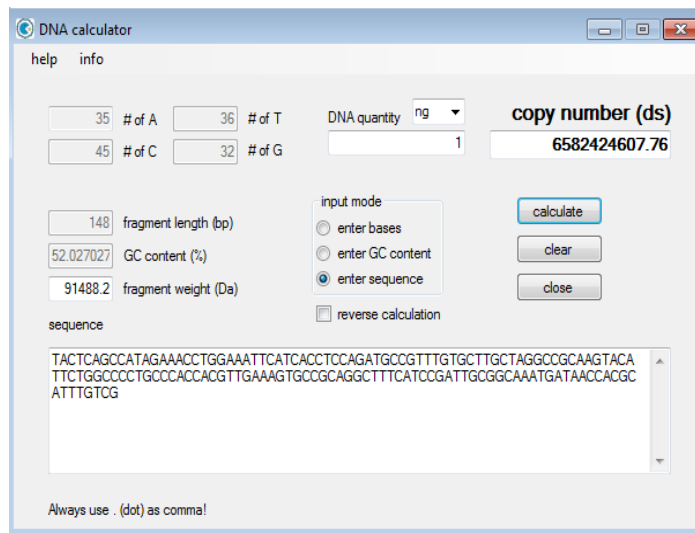


Figura. 11. Imagen de la captura de pantalla del programa DNACalculator. Programa utilizado para la obtención de número de copias (DS) de cada amplicón generado por los oligonucleótidos diseñados para este estudio.

La especificidad se corroboró, realizando RT-PCR con material genético de cultivos celulares libres de Influenza Virus tipo A, PRRS, PCV2 y TGEV, bacterias y de virus no objetivo de los oligonucleótidos, a las reacciones.

5 RESULTADOS

5.1 DESARROLLO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se desarrollaron y sintetizaron 9 pares de oligonucleótidos, siguiendo la metodología antes descrita, el Cuadro 5 muestra el resumen de las características de diseño de cada oligonucleótido.

Cuadro. 5. Oligonucleótidos diseñados y sus características de diseño.

| Virus | No. acceso ⁰ | ORF | Posición | Tamaño y Secuencia del oligonucleótido 5'-----3' | BD ¹ | % G/C | Tm ² | Tamaño Amplicón | |
|-------|-------------------------|---------|-------------|---|----------------------------|----------|-----------------|--------------------|-----------|
| PRRS | AF066183.4 | 6 | 14631-14778 | 20 | F TAYTCDGCCATAGARACMTG | 4 | 45 | 63 | |
| | | | 404-14778 | 18 | R CRACRAAYGCGTGGTTAT | 3 | 44 | 65 | |
| | | 7 | 14726-14745 | 20 | F AAGTGCCGCAGGCTTTCATC | 0 | 46 | 59 | 148 |
| | | | 15354-15373 | 20 | R CCACACGGTCGCCCTAATTG | 0 | 45 | 58 | 644 |
| PCV2 | KT795289.1 | 1 | 663-682 | 20 | F1 GGTTACCATGGTGAARAAGT | 1 | 45 | 64 | |
| | | | 795-814 | 20 | R CTGGTAATCAGAATACTGCG | 0 | 45 | 64 | |
| | | | 551-570 | 20 | F2 GAATGTACACGTCATTGTGG | 0 | 46 | 56 | |
| | | 412-431 | 20 | F3 CTGCTGTGAGTACCTTGTTG | 0 | 46 | 56 | | |
| | | 2 | 804-824 | 21 | F CTGATTACCAGCAATCAGACC | 0 | 47 | 60 | 152 |
| | | | 1626-1644 | 19 | R ACCGYTACCGYTGAGAGAAG | 0 | 50 | 63 | 263 |
| PRC | DQ811787.1 | S | 20272-20291 | 20 | F TAAGGAAGGGTAAGTTGCTC | 0 | 45 | 65 | |
| | | | 21583-20602 | 20 | R TTCTTCAAAGCTAGGGACTG | 0 | 45 | 65 | |
| | DQ811788.1 | | 20281-20300 | | F TAAGGAAGGGTAAGTTGCTC | 0 | 45 | 65 | 329-362 |
| | | | 21273-21292 | | R TTCTTCAAAGCTAGGGACTG | 0 | 45 | 65 | 1012-1043 |
| SIV | KT225469.1 | 7 | 143-162 | 20 | F GGARTGGYTRAAGACAAGAC | 3 | 45 | 64 | |
| | | | 648-667 | 20 | R GTYCTCATYGCNTGYACCAT | 4 | 45 | 65 | |
| | | 7 | 13-36 | 24 | F AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG | 0 | 50 | 62 | 525 |
| | | | 231-252 | 22 | R CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC | 0 | 54 | 64 | 240 |

No. acceso⁰ = Numero de acceso del GenBank de la cepa de referencia, **BD¹** = bases degeneradas, **Tm²** = temperatura media de alineación en °C, tamaño de amplicón en pb.

Se eligió un par de oligonucleótidos para cada virus y se mandaron sintetizar en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la empresa T4Oligo®.

5.2 TEMPERATURA MEDIA DE ALINEACIÓN DE CADA PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Las temperaturas medias de alineación y rango de amplificación se determinaron mediante gradientes de temperatura. Siguiendo la metodología antes descrita y los resultados obtenidos para cada par de oligonucleótidos Cuadro 6.

Cuadro. 6. Temperatura de alineación y rango de amplificación de los oligonucleótidos diseñados.

| Virus | ORF | Nombre | Tm | Rango de Tm de amplificación | Tamaño del Amplicón |
|-------|-----|---|------|------------------------------|---------------------|
| PRRS | 6 | PRRS/AGA-F PRRS/AGA-R | 51 | 49 - 52 | 148 |
| | 7 | PRRS/ISB-F PRRS/ISB-R | 59 | 59-64 | 644 |
| PCV2 | 1 | PCV2/AGA-F PCV2/AGA-R PCV2/AGA-F2 | 52 | 49-55 | 152 |
| | | PCV2/AGA-F3 | | | 263 |
| | | 402 | | | |
| | 2 | PCV2/FB-F PCV2/FB-R | 59 | 57-62 | 840 |
| PRCV | 5 | PRCV/AGA-F PRCV/AGA-R | 63.5 | 61-65 | 329-362 |
| | | PRCV/AGA-F | | | 1012-1043 |
| | | PRCV/AGA-R | | | |
| SIV | 7 | IP/AGA-F IP/AGA-R | 50 | 40-52 | 525 |
| | 7 | IP/ISB-F IP/ISB-R | 52 | 49-54 | 240 |

Nota: En negritas se presentan los pares de oligonucleótidos diseñados para cada virus y usados en la prueba múltiple, ya que tenían temperaturas de alineación similares.

5.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR MÚLTIPLE

La estandarización de la RT-PCR múltiple se realizó en dos pasos, primero se realizó la retro transcripción del RNA de los virus de PRRS e IP, siguiendo la metodología antes descrita y la reacción de PCR múltiple en un segundo paso posterior. La estandarización de la PCR múltiple se logró con la combinación de los oligonucleótidos de PRRS/AGA, PCV2/AGA e IP/AGA, obteniendo amplicones de 148, 263 y 525 pares de bases respectivamente. La temperatura media de alineación óptima de la PCR múltiple fue de 52°C (Figura 13(A)). Las concentraciones de oligonucleótido fueron de 0.5, 0.16 y 0.34 mM, para PRRS, PCV2 e IP respectivamente y las concentraciones de reactivos fueron de 10 % de amortiguador de reacción 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100

μg/ml gelatina, 1.5 mg/ml BSA; 1% Tritón X100), 15 % de Cloruro de magnesio (MgCl₂, 30 mM), 5U de Taq DNA polimerasa y 20 % de Deoxinucleótidos (dNTP) 2.0 mM. Con 30 ciclos bajo las condiciones descritas en la metodología.

Los oligonucleótidos diseñados para PRCV se descartaron, debido a que su T_m de alineación no se pudo adaptar a la de los oligonucleótidos estandarizada para el resto de los virus y a la falta de un control positivo para éste. En la Figura 12 (B) se muestra un gradiente de temperatura de 50 a 55 °C de la PCR múltiple para los virus de PRRS, PCV2 e IP.

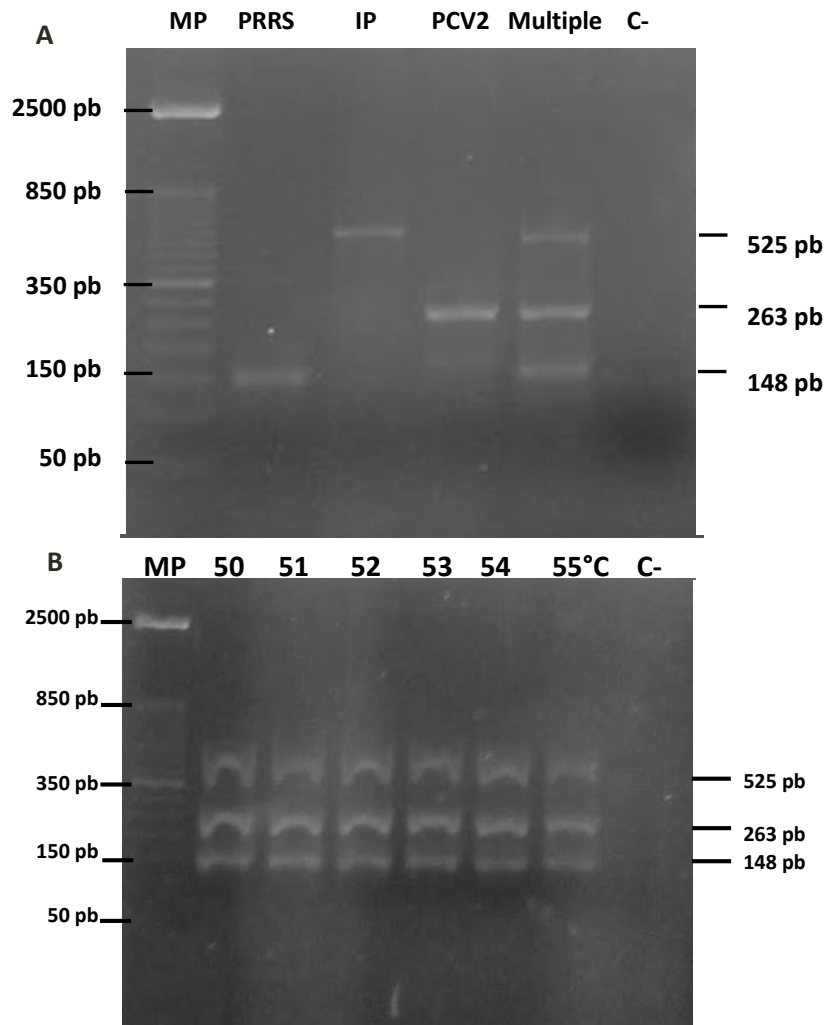


Figura. 12. Imagen de la electroforesis de dos gels de agarosa.

Preparados al 2%, teñidos con red gel, donde: A) Se observan el Marcado de peso molecular (MP) 50 bp DNA Ladder, los productos de PCR para PRRS, SIV y PCV2 en los carriles 1, 2 y 3 respectivamente; el

producto de PCR múltiple en el carril 4 y el control negativo en el carril 5. B) Se observan el mismo MP, los productos de PCR múltiple de un gradiente de temperaturas de 50 a 55°C y el control negativo.

5.4 ESPECIFICIDAD DE LA PCR MULTIPLEX

La especificidad de los oligonucleótidos incluidos en la RT-PCR múltiple (PRRS/AGA, PCV2/AGA e IP/AGA) se determinó de forma individual y en ensayo múltiple, conforme a la metodología descrita. Todos mostraron ser específicos para los virus respectivos, no se identificó ningún amplicón con el material genético de otro patógenos como GET, DEP, células PK15, *E. coli*, *Bacillus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) y *Enterococcus faecalis*; con los que fueron probados (Figura 14).

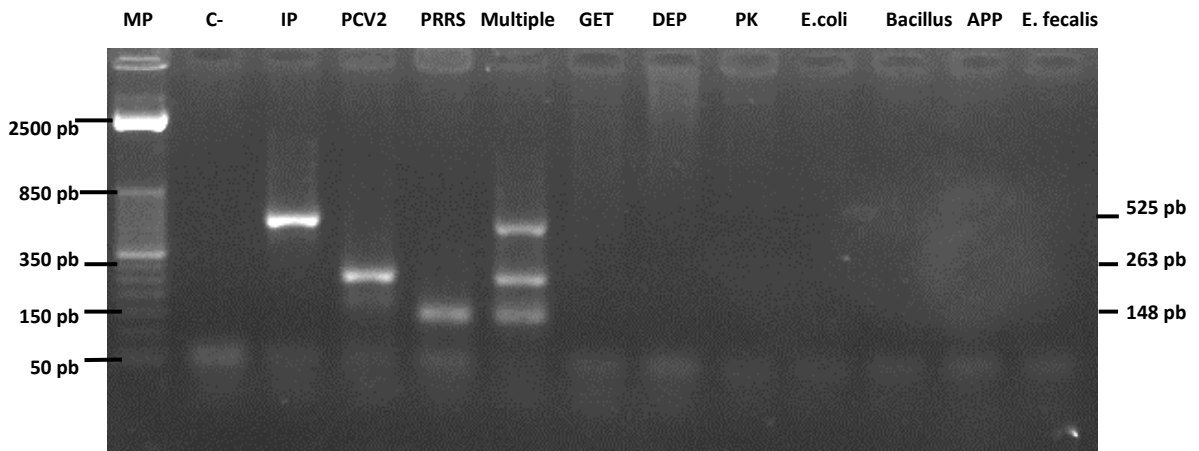


Figura. 13. Imagen de la electroforesis de un gel de agarosa

Preparado al 2%, teñida con red gel, que muestra la prueba de especificidad de la PCR múltiple. En el primer carril de izquierda a derecha se observa el marcado de peso molecular (MP) 50 bp DNA Ladder, el control negativo, los productos de PCR para PRRS, IP y PCV2; el producto múltiple de todos los virus anteriores y los productos de GET, DEP, células PK15, *E. coli*, *Bacillus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) y *Enterococcus faecalis* respectivamente.

5.5 SENSIBILIDAD DE LA PCR MÚLTIPLE

La sensibilidad de los oligonucleótidos probados de forma individual, e incluidos en la PCR múltiple, fue de 10^2 y 10^1 copias de templado para los virus de IP, PRRS y PCV2, respectivamente, como se muestra en la figura 14.

La sensibilidad de la PCR múltiple fue de 10^4 copias de templado para los virus de PRRS y PCV2 y de para IP de 10^5 copias de templado.

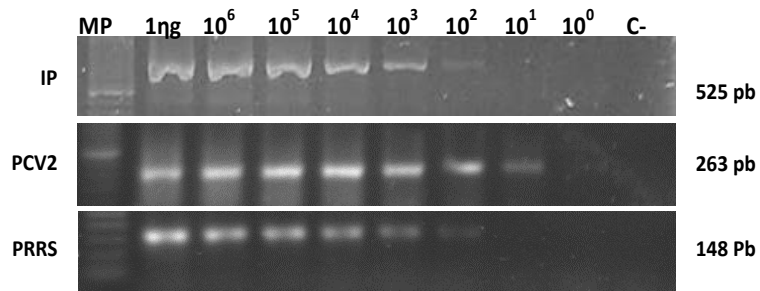


Figura. 14. Imagen de la electroforesis de un gel de agarosa. Preparado al 2%, teñida con red gel, que muestra la prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos para el virus de IP, PCV2 y PRRS, incluidos en la PCR múltiple, probados de forma individual.

6 DISCUSIÓN

La técnica de RT-PCR múltiple es una variante de PCR, ampliamente utilizada en el campo de las enfermedades infecciosas, es una herramienta útil para el diagnóstico, tipificación y cuantificación de virus, bacterias y parásitos (94). Actualmente laboratorios de diagnóstico e investigación de enfermedades infecciosas están generando nuevos protocolos y variantes de PCR que se adapten a sus necesidades, permitan obtener mayor información de las muestras procesadas, ahorren costos y tiempo en la identificación de agentes infecciosos.

La porcicultura en México es una industria muy importante del sector pecuario nacional (100,101). Sin embargo las enfermedades virales emergentes y reemergentes que afectan a los cerdos, representan un reto para la producción y salud de los cerdos (102). El Complejo Respiratorio Porcino es una enfermedad respiratorio polimicrobiana, específica de cada región geográfica, que ocasiona grandes pérdidas a la porcicultura nacional y mundial (4,16,20,93).

En los últimos años en México se han estandarizado diversas pruebas diagnósticas para la detección más eficiente de patógenos virales de interés veterinario y porcícola, generalmente pruebas serológicas y algunas técnicas moleculares como PCR, enfocadas en la identificación de nuevos patógenos pero de forma individual (103–105). El protocolo de RT-PCR múltiple estandarizado en este estudio permite detectar a los virus de PRRS, PCV2 e IP principales virus involucrados en el CRP, de forma individual o conjunta. Permite evaluar co-infecciones virales y ofrece una opción de diagnóstico económico, rápido y preciso; esencial para la prevención, control y tratamiento de la enfermedad.

Estudios previos describen ensayos de PCR y RT-PCR múltiples similares, en los que detecta hasta 6 virus RNA y DNA, diseñadas para patógenos virales y bacterianos presentes en los diversos países donde se desarrollaron; pruebas con alta sensibilidad y especificidad (13,77,106–108). En esta Prueba de RT-PCR múltiple desarrollada, se detectan a los virus de PRRS, IP y PCV2, patógenos virales involucrados en el CRP presentes en México. La metodología empleada en el diseño y elaboración de los oligonucleótidos; así como la evaluación práctica, demostró, la especificidad de cada oligonucleótido al amplificar

exclusivamente el material genético de cada virus objetivo, coincidiendo con lo reportado en otros estudios (69,107).

La metodología empleada en la estandarización de la prueba molecular de RT-PCR múltiple permitió obtener límites de detección bajos, en comparación a lo reportado en la literatura; 10^3 copias de amplicones de cada virus, para obtener una amplificación detectable en los geles de agarosa, mejorando la sensibilidad obtenida por Xu *et al.*, 2012, de 450 picogramos de material genético total extraído y se asemeja a lo obtenido por Sint et al. (2012) en pruebas de PCR tiempo real (107,108).

Finalmente, aunque se estandarizó la RT-PCR individual para el gen S de PRCV, no fue posible adaptar ese par de oligonucleótidos a la reacción múltiple.

7 CONCLUSIONES

La RT-PCR múltiple estandarizada en este trabajo, cumple el objetivo de este proyecto de investigación, detectando a los virus de PRRS, IP y PCV2, de forma individual o conjunta; es una herramienta útil en el diagnóstico virológico del CRP en México, permite evaluar co-infecciones virales, ofrece una opción de diagnóstico económico, rápido y preciso; que proporciona mayor información de las muestras procesadas. Y aunque la prueba carece de una evaluación con muestras de campo; los resultados obtenidos son altamente confiables ya que todas las pruebas realizadas en el laboratorio como se muestra, fueron constantes y la metodología empleada permite escalar el diseño de la prueba, incorporando más oligonucleótidos y llevándola a un sistema de RT-PCR tiempo real, en futuros trabajos.

8 ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| APP | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BD | Bases Degeneradas |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| cDNA | Acido Desoxirribonucleico complementario |
| CRP | Complejo Respiratorio Porcino |
| DEP | Diarrea Epidémica Porcina |
| DEPC | Di-Etil Pyrocarbonate, Pirocarbonato de Di-Etilo |
| DMZC | Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos |
| dNTP | Desoxinucleótidos |
| <i>E. coli</i> | Escherichia coli |
| <i>et al</i> | Y otros |
| FMVZ | Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia |
| GENBANK | Base de datos de secuencias genéticas del NCBI |
| h | Horas |
| ICTV | International Committee on Taxonomy of Viruses |
| IP | Influenza Porcina |
| Kb | Kilobases |
| Kg | Kilogramos |
| L | Litros |

| | |
|----------------|---|
| LNV | Lechones Nacidos Vivos |
| MEGA | Molecular Evolutive Genetics Analysis |
| mg | Miligramos |
| μg | Microgramos |
| μl | Microlitros |
| μM | Micromoles |
| MP | Marcador de Peso molecular |
| nm | Nanómetros |
| ng | Nanogramos |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information Search database |
| nM | Nanomoles |
| OIE | Organización Mundial de la salud |
| ORF | Open Reading Frame, Marco de lectura abierto |
| VPRRS | Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus |
| PCV2 | Porcine Circovirus Type |
| PRCV | Porcine Respiratory Coronavirus |
| pb | Pares de bases |
| PCVAD | Porcine Circovirus Associated Disease |
| PDNS | Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome |
| PED | Porcine Epidemic Diarrhea |
| PMWS | Síndrome de Debilitamiento Multisistémico Pos-destete |
| PCR | Polimerase Chain Reactions, Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| RT | Retrotranscripción |
| RT- PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción |

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| SIV | Swine Influenza Virus |
| TAE | Tris Ácido Acético EDTA |
| Temp | Temperatura |
| TGEV | Transmissible Gastroenteritic Virus |
| °C | Grados Centígrados |

9 REFERENCIAS

1. Qin S, Ruan W, Yue H, Tang C, Zhou K, Zhang B. Viral communities associated with porcine respiratory disease complex in intensive commercial farms in Sichuan province, China. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-31554-8>
2. Bochev I. PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (PRDC): A REVIEW. I. ETIOLOGY, EPIDEMIOLOGY, CLINICAL FORMS AND PATHOANATOMICAL FEATURES. Vol. 10, *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2007.
3. Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL. Chapter 13 Porcine Respiratory Disease Complex. In: Brogden KA, Guthmiller JM, editors. *Polymicrobial Diseases* [Internet]. Washington (DC): ASM Press; 2002.; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2481/>
4. Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Heal Res Rev*. 2011;
5. Ciprian Carrasco A, Mendoza Elvira S. Microbiología en el Complejo Respiratorio Porcino en México [Internet]. BM Editores. México, México; 2016 Sep. Available from: <http://bmeditores.mx/microbiologia-en-complejo-respiratorio-porcino-en-mexico/2/8>
6. López-Robles G, Montalvo-Corral M, Burgara-Estrella A, Hernández J. Serological and molecular prevalence of swine influenza virus on farms in northwestern Mexico. *Vet Microbiol*. 2014;
7. Ramírez-Mendoza H, Martínez C, Mercado C, Castillo-Juárez H, Hernández J, Segalés J. Porcine circovirus type 2 antibody detection in backyard pigs from Mexico City. *Res Vet Sci*. 2007;
8. Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico [Internet]. Vol. 12, *J Swine Health Prod*. Minnesota; 2004. Available from: <http://www.aasv.org/shap.html>.

9. Burgara-Estrella A, Reséndiz-Sandoval M, Cortey M, Mateu E, Hernández J. Temporal evolution and potential recombination events in PRRSV strains of Sonora Mexico. *Vet Microbiol.* 2014;
10. Giles TA, Belkhiri A, Barrow PA, Foster N. Molecular approaches to the diagnosis and monitoring of production diseases in pigs. *Res Vet Sci* [Internet]. 2017;114(May):266–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.016>
11. Lung O, Ohene-Adjei S, Buchanan C, Joseph T, King R, Erickson A, et al. Multiplex PCR and Microarray for Detection of Swine Respiratory Pathogens. *Transbound Emerg Dis.* 2017;
12. Velasco-Villalvazo JL. Complejo respiratorio porcino (CRP) [Internet]. *Porcicultura.com.* México; 2012 [cited 2016 Aug 20]. p. 10. Available from: <https://www.porcicultura.com/micrositio/Virbac-de-México/Complejo-respiratorio-porcino-%28CRP%29>
13. White M. Porcine respiratory disease complex (PRDC). *Livestock* [Internet]. 2011;16(2):40–2. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2044-3870.2010.00025.x>
14. Miller GY, Song Y, Bahnson PB. An economic model for estimating batch finishing system profitability with an application in estimating the impact of preventive measures for porcine respiratory disease complex [Internet]. Vol. 9, *Journal of Swine Health and Production.* 2001. Available from: <http://www.aasv.org/shap.html>.
15. Argerich J, Font J, Menjón R, Bollo J. Impacto económico del complejo respiratorio porcino. *La genética actual* [Internet]. 2008 Jan;44–5. Available from: www.albeitar.asisvet.com
16. Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, Zimmerman JJ, Rotto HF, Yoder TK, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers [Internet]. *Journal of Swine Health and Production.* 2013. Available from: <http://www.aasv.org/shap.html>.
17. Nieuwenhuis N, Duinhof TF, Van Nes A. Papers: Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds. *Vet Rec.*

- 2013;170(9):225.
18. Herrera- Martín JADC. Costos ocultos de la enfermedad de PRRS y su efecto en estado de resultados. In: AMVEC, editor. 2° Simposio internacional de PRRS México 2013 [Internet]. México: Consultor privado; 2013. p. 46. Available from: <http://www.amvec.com/pdfs/PRRSUNAM.pdf>
 19. Amador Cruz J. Efecto económico del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) en granjas porcinas de ciclo completo en México [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.; 2013. Available from: <http://132.248.9.195/ptd2013/abril/0692480/Index.html>
 20. Amador Cruz J. Evaluación del impacto económico del virus de prrs en granjas porcinas en México [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.; 2016. Available from: <http://132.248.9.195/ptd2016/enero/0739467/Index.html>
 21. Chae C. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet J*. 2016;
 22. Batista L, Pijoan C, Lwamba H, Johnson CR, Murtaugh MP. Genetic diversity and possible avenues of dissemination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in two geographic regions of Mexico [Internet]. Vol. 12, *J Swine Health Prod*. Available from: <http://www.aasv.org/shap.html>.
 23. Sánchez-Betancourt JI, Cervantes-Torres JB, Saavedra-Montañez M, Segura-Velázquez RA. Complete genome sequence of a novel influenza A H1N2 virus circulating in swine from Central Bajío region, Mexico. *Transbound Emerg Dis*. 2017;
 24. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol*. 2017;
 25. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). The ICTV Report Virus

Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses [Internet]. The ICTV Report Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. 2018 [cited 2018 Oct 25]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/

26. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* 1991;
27. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Louis Harris, Hennings JC, Shaw DP, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagnostic Investig.* 1992;
28. Shi M, Lam TT-Y, Hon C-C, Murtaugh MP, Davies PR, Hui RK-H, et al. Phylogeny-Based Evolutionary, Demographical, and Geographical Dissection of North American Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. *J Virol.* 2010;
29. Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TTY, Leung FCC. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 2010;
30. Chand RJ, Tribble BR, Rowland RRR. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Curr Opin Virol.* 2012;
31. Kvisgaard LK, Hjulsager CK, Brar MS, Leung FCC, Larsen LE. Genetic dissection of complete genomes of Type 2 PRRS viruses isolated in Denmark over a period of 15 years. *Vet Microbiol.* 2013;
32. Brar MS, Shi M, Murtaugh MP, Leung FCC. Evolutionary diversification of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 2015;
33. Wang X, Marthaler D, Rovira A, Rossow S, Murtaugh MP. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vaccinated herds in the United States. *Virus Res.* 2015;
34. Dokland T. The structural biology of PRRSV. *Virus Res.* 2010;
35. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D. Current knowledge on the

- structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates Brief Review. Arch Virol. 2000;
36. Shi M, Lam TTY, Hon CC, Hui RKH, Faaberg KS, Wennblom T, et al. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. Virus Res. 2010;
 37. Music N, Gagnon CA. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. Anim Health Res Rev. 2010;
 38. Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, et al. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. Annu Rev Anim Biosci. 2016;
 39. Taylor, D J. PIG DISEASES. Ninth. Taylor, D J, editor. Glasgow: Taylor, D,J. and wayment & Publishing Solutions Ltd.; 2013. 430 p.
 40. World Organisation for Animal Health (OIE). Report of the OIE ad hoc on Procine Reproductive Respiratoy Syndrome [Internet]. Paris; 2008. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/PRRS_guide_web_bulletin.pdf
 41. SECRETARIA DE AGRICULTURA GANADERIA DESARROLLO RURAL PESCA Y ALIMENTACIÓN. ACUERDO mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. [Internet]. México; 2018. Available from: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018
 42. Zhang Q, Yoo D. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. Vet Microbiol. 2015;
 43. Yin SH, Xiao CT, Gerber PF, Beach NM, Meng XJ, Halbur PG, et al. Concurrent porcine circovirus type 2a (PCV2a) or PCV2b infection increases the rate of amino acid mutations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during serial passages in pigs. Virus Res. 2013;
 44. Kim J, Chung HK, Chae C. Association of porcine circovirus 2 with porcine

- respiratory disease complex. *Vet J.* 2003;
45. Nguyen VG, Kim HK, Moon HJ, Park SJ, Chung HC, Choi MK, et al. Evolutionary Dynamics of a Highly Pathogenic Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Analyses of Envelope Protein-Coding Genes. *Transbound Emerg Dis.* 2015;
 46. Guérin B, Pozzi N. Viruses in boar semen: Detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenology.* 2005;
 47. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio.* 2014;
 48. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* 2013;
 49. Gramer MR. Defining swine influenza virus [Internet]. Vol. 13, *J Swine Health Prod.* Minnesota; 2005. Available from: <http://www.aasv.org/shap.html>.
 50. Crisci E, Mussá T, Fraile L, Montoya M. Review: Influenza virus in pigs. *Molecular Immunology.* 2013.
 51. Pauly MD, Procaro MC, Luring AS. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. *Elife.* 2017;
 52. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses. *J Virol.* 2006;
 53. Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S, Chen JL. Evolution of influenza a virus by mutation and re-assortment. *Int J Mol Sci.* 2017;
 54. Mena I, Nelson MI, Quezada-Monroy F, Dutta J, Cortes-Fernández R, Lara-Puente JH, et al. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. *Elife.* 2016;
 55. Nelson MI, Vincent AL. Reverse zoonosis of influenza to swine: New perspectives on the human-animal interface. *Trends in Microbiology.* 2015.
 56. Kumlin U, Olofsson S, Dimock K, Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respi Viruses.* 2008;

57. Munoz O, De Nardi M, Van Der Meulen K, Van Reeth K, Koopmans M, Harris K, et al. Genetic adaptation of influenza A viruses in domestic animals and their potential role in interspecies transmission: A literature review. *EcoHealth*. 2016.
58. Graaf M De, Fouchier RAM. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J*. 2014;
59. Sebastian MR, Lodha R, Kabra SK. Swine origin influenza (swine flu). *Indian J Pediatr*. 2009;
60. Calore EE, Uip DE, Perez NM. Pathology of the swine-origin influenza A (H1N1) flu. *Pathol Res Pract*. 2011;
61. Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, et al. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J Virol*. 2017;
62. Ellis J. Porcine Circovirus: A Historical Perspective. *Vet Pathol*. 2014;
63. Phan TG, Giannitti F, Rossow S, Marthaler D, Knutson T, Li L, et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J*. 2016;
64. Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM, Todd D. Comparison of the Structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *J Virol* [Internet]. 2003;77(24):13036–41. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.24.13036-13041.2003>
65. Tribble BR, Rowland RRR. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Research*. 2012.
66. Lv QZ, Guo KK, Zhang YM. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes*. 2014;
67. Ren L, Chen X, Ouyang H. Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts. *Virus Genes*. 2016.
68. Franzo G, Cortey M, Olvera A, Novosel D, De Castro AMMG, Biagini P, et al. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): Still a real challenge. *Virol J*. 2015;
69. Xu XG, Chen G Da, Huang Y, Ding L, Li ZC, Chang CD, et al. Development of

- multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses. *J Virol Methods*. 2012;
70. Guo L, Lu Y, Wei Y, Huang L, Wu H, Liu C. Porcine circovirus genotype 2a (PCV2a) and genotype 2b (PCV2b) recombinant mutants showed significantly enhanced viral replication and altered antigenicity in vitro. *Virology*. 2011;
 71. Gerber PF, Johnson J, Shen H, Striegel D, Xiao CT, Halbur PG, et al. Association of concurrent porcine circovirus (PCV) 2a and 2b infection with PCV associated disease in vaccinated pigs. *Res Vet Sci*. 2013;95:775–81.
 72. Nayar GPS, Hamel AL, Lin L, Sachvie C, Grudeski E, Spearman G. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Canada, DIAGNOSTIQUES AU*. 1999 Apr;2.
 73. Halami MY, Freick M, Shehata AA, Müller H, Vahlenkamp TW. Susceptibility of calves to porcine circovirus-2 (PCV2). *Vet Microbiol*. 2014;
 74. Zhai SL, Chen SN, Liu W, Li XP, Deng SF, Wen XH, et al. Molecular detection and genome characterization of porcine circovirus type 2 in rats captured on commercial swine farms. *Arch Virol*. 2016;
 75. Robles F, Chevez J, Angulo R, Díaz E, González C. Analysis of the Genetic Sequences of PCV2 Virus in Mexico. *J Med Heal Sci [Internet]*. 2010;Vol:4,(5):185–9. Available from: <https://waset.org/Publication/analysis-of-the-genetic-sequences-of-pcv2-virus-in-mexico/8806>
 76. Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med*. 2009;
 77. Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, et al. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol [Internet]*. 2010;143(2–3):120–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.012>
 78. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res*. 2012;
 79. Hulswit RJG, de Haan CAM, Bosch BJ. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes. In: John Ziebuhr Serial, editor. *Advances in Virus Research*. Giessen,

- Germany: 1st September 2016; 2016. p. 310.
80. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K-Y. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses*. 2010;2(1999–4915):1804–1820;
 81. Neuman BW, Buchmeier MJ. Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. In: John Ziebuhr Serial, editor. *Advances in Virus Research*. Giessen, Germany: 1st September 2016; 2016. p. 310.
 82. Kim L, Hayes J, Lewis P, Parwani A V., Chang KO, Saif LJ. Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch Virol*. 2000;
 83. Rasschaert D, Duarte M, Laude H. Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J Gen Virol*. 1990;
 84. Laude H, Van Reeth K, Pensaert M. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet Res*. 1993;
 85. Wang L, Zhang Y. Genomic Characterization of a New PRCV Variant, United States, 2014. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2015;64(2):672–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12400>
 86. Swine Health Information Center By the Center for Food Security and Public Health. **PORCINE RESPIRATORY CORONAVIRUS**. Iowa State ; 2016.
 87. Halbur PG, Pallares FJ, Opriessnig T, Vaughn EM, Paul PS. Pathogenicity of three isolates of porcine respiratory coronavirus in the USA. *Veterinary Record* (2003) [Internet]. 1985 Mar;358–61. Available from: <http://veterinaryrecord.bmj.com/>
 88. Brogden KA, Guthmiller JM. *Polymicrobial Diseases* [Internet]. ASM Press, editor. Washington (DC): Copyright © 2002, ASM Press; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2475/>
 89. Schuller M, Sloots TP, James GS, Halliday CL, Carter IWJ. *PCR for Clinical Microbiology*. Schuller M, Sloots TP, James GS, Halliday CL, Carter IWJ, editors. New York: Springer Science+Business Media B.V. 2010; 2010. 420 p.
 90. Bolivar AM, Rojas A, Garcia-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and

- standardization protocol). *Av en Biomed.* 2014;3(1):25–33.
91. Yan W. Multiplex PCR primer design for simultaneous detection of multiple pathogens. *Methods Mol Biol.* 2015;
 92. J.Park D. PCR Protocols [Internet]. 2011. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-944-4_23
 93. Tian D, Ni YY, Zhou L, Opriessnig T, Cao D, Piñeyro P, et al. Chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus containing shuffled multiple envelope genes confers cross-protection in pigs. *Virology.* 2015;
 94. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal.* 2002;
 95. Sint D, Raso L, Traugott M. Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol Evol.* 2012;
 96. Kumar A, Chordia N. In silico PCR primer designing and validation. *Methods Mol Biol.* 2015;
 97. Li K, Brownley A. Primer design for RT-PCR. *Methods Mol Biol.* 2010;
 98. Li K, Shrivastava S, Stockwell TB. Degenerate primer design for highly variable genomes. *Methods Mol Biol.* 2015;
 99. Elhefnawi M, Alaidi O, Mohamed N, Kamar M, El-Azab I, Zada S, et al. Identification of novel conserved functional motifs across most Influenza A viral strains. *Virol J.* 2011;
 100. FIRA FI en R con la A. Panorama Agroalimentario 2017 [Internet]. 2017. Available from: [http://www.ugrpg.org.mx/pdfs/Panorama Agroalimentario Carne de cerdo 2017.pdf](http://www.ugrpg.org.mx/pdfs/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_cerdo_2017.pdf)
 101. SIAP-SAGARPA. Servicio de Información Agropecuaria y Perquera SIAP [Internet]. Produccion ganadera. 2018. Available from: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
 102. Meng XJ. Emerging and Re-emerging Swine Viruses. *Transbound Emerg Dis.* 2012;
 103. García-Plata M. Desarrollo de una prueba de diagnóstico serológico (elisa) para la detección de anticuerpos específicos en contra del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (prrs). Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.

104. Bedoya-Lopez F. Identificación de cambios genéticos del circovirus porcino tipo II (pcv2), en muestras de campo, mediante la secuenciación del marco de lectura abierto 2 (ofr2). Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
105. Sotomayor-Gonzalez A. Determinación de muestras positivas al virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRS) con la técnica de RT-PCR. Universidad Autónoma de México; 2010.
106. Bochev I. Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC): A review. I. Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features. Vol. 10, Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2007.
107. Wernike K, Hoffmann B, Dauber M, Lange E, Schirrmeier H, Beer M. Detection and typing of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex real-time RT-PCR. PLoS One. 2012;
108. Wu H, Rao P, Jiang Y, Opriessnig T, Yang Z. A sensitive multiplex real-time PCR panel for rapid diagnosis of viruses associated with porcine respiratory and reproductive disorders. Mol Cell Probes. 2014;