



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Estudio comparativo de la virulencia de una cepa  
epidémica y una cepa INDEL del virus de diarrea  
epidémica porcina**

**TESIS**

*Que para optar por el grado de*

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**Presenta:**

**Karla Castillo Cervantes**

**Tutor:**

**José Francisco Rivera Benítez, INIFAP**

**Comité Tutor:**

**Armando Pérez Torres, FM-UNAM**

**Humberto Ramírez Mendoza, FMVZ-UNAM**

**Ciudad Universitaria, CDMX, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Aprovecha el día*

*No dejes que termine sin haber crecido un poco,  
sin haber sido feliz, sin haber alimentado tus sueños.*

*No te dejes vencer por el desaliento.*

*No permitas que nadie te quite el derecho de expresarte, que es  
casi un deber.*

*No abandones tus ansias de hacer de tu vida algo extraordinario.*

Walt Whitman

*Dedicado a las personas más importantes en mi vida:*

*Mi familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi mayor agradecimiento es para mi familia, a ellos que siempre han estado apoyándome, a pesar de la distancia, siempre apoyando mis locuras y sueños. Gracias por darme todo a manos llenas, porque ustedes son los que me dan la fuerza suficiente para seguir adelante, ustedes son los que me inspiran a seguir luchando y a nunca desanimarme. Gracias má, gracias pá, por dar lo mejor para que yo sea la mejor. Gracias Beno, por escuchar y aconsejarme, por hacerme reír aunque esté triste y cuidarme a tu manera.

A mi otra familia. A esas personas que he tenido la fortuna de conocer y de las cuales he aprendido tanto. Gracias a esas personas que sin la necesidad de pedirlo, estuvieron ahí para aconsejarme y nunca dejarme desfallecer a pesar de las circunstancias tan complicadas que sucedieron en este proceso. Gracias a Rosalía, Angélica, Libertad, Luis Mario, Amanda, Valeria, Quetzal, Aleyda, Maricela y Jesús. Sin ustedes no lo hubiera logrado.

A mis colegas nerds, amigos y amantes de la ciencia, por sus consejos, enseñanzas y por las risas más satisfactorias que se han escuchado en un laboratorio de investigación. Muy especialmente a Chio, Flor, José Luis, Marco, Lili, Manuel, Miguel, Vero y Dani, por todo su apoyo para la realización de esta investigación, por sus enseñanzas, cariño y comprensión; sin ustedes no hubiera sido posible.

A los Doctores José Francisco Rivera Benítez y Humberto Ramírez Mendoza, por la confianza que me otorgaron para realizar este proyecto.

Al MC Noé Juárez, por compartir sus conocimientos para la realización del análisis estadístico de este proyecto.

A los Histotecnólogos Marco Antonio Aguilar y Alfredo Amadeo Días Estrada, por sus consejos y ayuda para realizar parte del proceso experimental de esta investigación.

A la MC Evelyn Pulido Camarillo, por todo su cariño, amistad y enorme paciencia, por los consejos y regaños justos y necesarios para no dejar que el pesimismo arruinara mi placer de hacer ciencia.

Al mejor maestro con el que tuve el placer de divertirme y aprender durante esta etapa. Al Dr. Armando Pérez Torres por todos sus consejos, apoyo, amistad y cariño; por todas esas palabras de aliento y comprensión, por todas esas horas frente al microscopio, en las que no faltó anécdota, chiste o consejo que hiciera siempre amena la enseñanza. Por rescatarme y nunca dejar que me rindiera; porque realmente es el Patrono de las causas perdidas.

¡GRACIAS, TOTALES!

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-MA, INIFAP); en el Laboratorio de Filogenia del sistema inmune de piel y mucosas del Departamento de Biología celular y tisular, de la Facultad de Medicina de la UNAM; en el Laboratorio de Virología molecular del Departamento de Microbiología e inmunología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM; en el Área de Inmunohistoquímica del Laboratorio de Patología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del IMSS y en el Laboratorio de Patología del Departamento de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia “Dr. Norberto Treviño Zapata de la UAT.

El financiamiento para el desarrollo del proyecto de investigación fue otorgado por Recursos Fiscales INIFAP No. 13592932977 “Desarrollo y validación de pruebas para la detección de anticuerpos y antígeno del virus de la diarrea epidémica porcina” y CONACYT PDCPN2014-01. No. 249177 “Desarrollo y evaluación de productos de diagnóstico y un biológico para el control y la prevención de la diarrea epidémica porcina”.

La alumna fue becaria del Programa de Becas para Estudios de Posgrado CONACYT con número de CVU 830849.

# AUTORIZACIÓN INSTITUCIONAL PARA REALIZAR EXPERIMENTACIÓN CON SERES VIVOS



**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias  
de la Producción y de la Salud Animal**  
*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán  
Instituto de Investigaciones Biomédicas*

**SICUAE - SUBCOMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE  
ANIMALES EXPERIMENTALES**

**Protocolo Número: MC-2018/1-2**

**Título del Proyecto:** "Estudio Comparativo de la virulencia de una cepa epidémica y una cepa INDEL del virus de diarrea epidémica porcina"

**Investigador Responsable:** José Francisco Rivera Benítez

**Tesista:** Karla Castillo Cervantes

Después de haber revisado el proyecto de investigación el día 11 de abril del presente, el SICUAE consideró que reúne los requisitos que marcan las normas para el cuidado y uso de animales en experimentación, por lo cual, no tiene objeción en que se realicen los procedimientos planteados tal y como fueron descritos en el protocolo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria D.F. a 21 de noviembre del 2018

**EL COORDINADOR**

**DR. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT**

- Unidad de Posgrado, Edificio B, Primer Piso, B107. Circuito del Posgrado. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán, CDMX, C.P. 04510. Tels.: 01 (55) 5623-7005 y 01 (55) 5623-0222 ext.: #80023, #80005, #80024.
- Edificio 4 Posgrado. Planta alta. Fac de Med Vet y Zoot. Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Del Coyoacán, CDMX, C.P. 04510. Tels.: 01 (55) 5622-5854 al 57, Fax: 01 (55) 5616-7197 y 5616-2342.
- Secretaría Técnica de Producción y Salud Animal, FES-Cuautitlán: Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4, Km. 2.5 Carretera Cuautitlán Toluca, Col. San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54714, Tel.: 5623-1939 ext.: 39405.
- Edificio A, planta baja de la Secretaría de Enseñanza del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Nueva Sede, Circuito Maestro Mario de la Cueva (pasando el Jardín Botánico) Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, CDMX, C.P. 04510, Tel.: 01 (55) 5622-8908 ext.: 47985.

# ESTUDIO COMPARATIVO DE LA VIRULENCIA DE UNA CEPA EPIDÉMICA Y UNA CEPA INDEL DEL VIRUS DE DIARREA EPIDÉMICA PORCINA

*Por:*

Karla Castillo Cervantes

Tesis de Maestría

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Ciudad de México

2019

**Palabras clave:** Diarrea epidémica porcina, cepas, virulencia, México.

## Resumen

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad viral altamente contagiosa, no zoonótica, causada por el virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP). Esta enfermedad está caracterizada principalmente por ocasionar diarrea aguda acuosa en cerdos de todas las edades. Actualmente se desconoce la virulencia entre las cepas circulantes en México, por lo que el objetivo del presente estudio fue comparar la virulencia de dos cepas aisladas en el país. Se realizó la infección experimental a cuatro grupos de cerdos (n=12) con diferentes características de exposición (expuestos y no expuestos previamente al vDEP), se empleó la cepa epidémica (EP) PEDV/MEX/MICH/01/2013 y la cepa con inserciones y deleciones (INDEL) PEDV/MEX/VER/01/2014. La clasificación por grupo se asignó de la siguiente forma, G1, expuesto e infectado con la cepa epidémica (G1-E-EP), G2, no expuesto e infectado con la cepa epidémica (G2-NE-EP), G3, expuesto e infectado con la cepa INDEL (G3-E-INDEL) y G4, no expuesto e infectado con la cepa INDEL (G4-NE-INDEL). El cuadro clínico y lesiones más severas se presentaron en los lechones sin exposición previa a vDEP (G2-NE-EP y G4-NE-INDEL). Los lechones infectados con la cepa epidémica (G1-E-EP y G2-NE-EP), presentaron cuadros clínicos más severos, mismos que se caracterizaron por la presencia de diarrea, hipotermia, deshidratación, vómito, y anorexia; asimismo, presentaron mayor carga viral en intestino delgado y se detectó inmunorreactividad al vDEP en enterocitos del extremo apical de las vellosidades del intestino delgado, intestino grueso, neumocitos y parénquima renal. Los lechones inoculados con la cepa INDEL (G3-E-INDEL y G4-NE-INDEL), presentaron un cuadro clínico menos severo, sin embargo, su excreción viral en hisopados rectales fue mayor. Además, células del epitelio superficial de intestino delgado, linfonodos y glomérulos renales mostraron inmunorreactividad a vDEP. Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se evidenció que la virulencia de la cepa INDEL PEDV/MEX/VER/01/2014 es menor comparada con la cepa epidémica PEDV/MEX/MICH/01/ de México.

# COMPARATIVE STUDY OF THE VIRULENCE OF AN EPIDEMIC AND AN INDEL STRAINS OF THE PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS

*By:*

Karla Castillo Cervantes

Master's Thesis

Universidad Nacional Autonoma de Mexico  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Mexico City

2019

**Key words:** Porcine epidemic diarrhea, strain, virulence, Mexico.

## **Abstract**

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a highly contagious viral disease; it is not zoonotic and it is caused by the porcine epidemic diarrhea virus (PEDv). This disease is characterized to causing acute watery diarrhea in pigs of all ages. Currently, the virulence of PEDv strains of Mexico is unknown, so the objective of this study was to compare the virulence of two strains isolated in the country. Experimental infection was performed on four groups of suckling pigs (n = 12) with different exposure characteristics (exposed and not previously exposed to PEDv). The epidemic strain (EP) PEDV/MEX/MICH/01/2013 and the insertions and deletions (INDEL) strain PEDV/MEX/VER/01/2014 were used. The classification by group was assigned in the following way: G1, exposed and infected with the epidemic strain (G1-E-EP), G2, not exposed and infected with the epidemic strain (G2-NE-EP), G3, exposed and infected with the INDEL strain (G3-E-INDEL) and G4, not exposed and infected with the INDEL strain (G4-NE-INDEL). The clinical signs and the most severe lesions were observed in piglets without previous exposure to PEDv (G1-E-EP and G3-E-INDEL). The piglets infected with the epidemic strain (G1-E-EP and G2-NE-EP), presented the most severe clinical signs, which were characterized by the presence of diarrhea, hypothermia, dehydration, vomiting, and anorexia; likewise, they had a higher viral load in the small intestine; and PEDv immunoreactivity was detected in enterocytes of the apical tip of the villi of the small intestine, large intestine, pneumocytes and renal parenchyma. The piglets inoculated with the INDEL strain (G3-E-INDEL and G4-NE-INDEL) had a less severe clinical signs; however, their viral excretion in rectal swabs was higher. In addition, superficial epithelial cells of the small intestine, lymph nodes and renal glomeruli showed PEDv immunoreactivity. The results obtained in this study evidenced that the virulence of the INDEL PEDV/MEX/VER/01/2014 strain is lower compared with the epidemic PEDV/MEX/MICH/01/2013 strain from Mexico.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ÍNDICE DE CUADROS .....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
II.1. Descripción general de la diarrea epidémica porcina (DEP).....	14
II.2. Antecedentes históricos .....	14
II.3. Agente etiológico .....	15
II.3.1. Genoma, estructura del virión y clasificación .....	15
II.3.2. Ciclo de replicación .....	18
II.4. Patogénesis .....	19
II.5. Signos de la DEP en lechones.....	20
II.6. Lesiones en lechones.....	20
II.6.1. Lesiones macroscópicas .....	20
II.6.2. Lesiones microscópicas .....	21
II.7. Diagnóstico .....	21
II.7.1. Inmunohistoquímica (IHQ) .....	22
II.7.2. RT-PCR .....	22
II.7.3. Cultivo celular para aislamiento .....	22
II.7.4. Inmunofluorescencia (IFA) .....	22
II.7.5. Ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA indirecto).....	22
II.8. Prevención.....	23
III. JUSTIFICACIÓN .....	24
IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVOS.....	26
V.1. Objetivo general .....	26
V.2. Objetivos específicos.....	26
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
VI.1. Animales .....	27
VI.2. Selección de cepas virales.....	27
VI.3. Infección experimental.....	28
VI.4. Muestreo .....	28
VI.5. Procesamiento de las muestras.....	29

VI.5.1. Evaluación histológica .....	29
VI.5.2. Evaluación inmunohistoquímica.....	29
VI.5.3. Cuantificación de carga viral .....	30
VI.5.4. Análisis estadístico .....	31
VII. RESULTADOS .....	32
VII.1. Signos clínicos.....	32
VII.2. Lesiones macroscópicas .....	39
VII.3. Histopatología.....	46
VII.4. Inmunorreactividad de antígenos virales por IHQ .....	66
VII.5. Excreción y carga viral .....	105
VIII. DISCUSIÓN.....	109
IX. CONCLUSIONES.....	113
X. REFERENCIAS .....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la organización del genoma del vDEP y la estructura del virión. ....	16
Figura 2. Esquemización de la estructura de la proteína S del vDEP. ....	17
Figura 3. Ciclo de replicación del vDEP.....	19
Figura 4. Temperatura de lechones infectados con dos cepas del vDEP. ....	33
Figura 5. Gráfico de interacción para la probabilidad de presentación de consistencia de heces de lechones infectados con dos cepas del vDEP.....	34
Figura 6. Efecto de la probabilidad de que la deshidratación suceda por variable analizada. ....	36
Figura 7. Efecto de la probabilidad de que el vómito suceda por variable analizada. ....	38
Figura 8. Cambios morfológicos por evaluación macroscópica en intestinos de lechones infectados con dos cepas del vDEP.. ....	41
Figura 9. Cambios morfológicos en lechones infectados con una cepa epidémica del vDEP del G1-E-EP.....	42
Figura 10. Cambios morfológicos en lechones infectados con una cepa epidémica del vDEP del G2-NE-EP.....	43
Figura 11. Cambios morfológicos en lechones infectados con una cepa INDEL del vDEP del G3-E-INDEL.....	44
Figura 12. Cambios morfológicos en lechones infectados con una INDEL del vDEP del G4-NE-INDEL.....	45
Figura 13. Histopatología de yeyuno de lechones infectados con vDEP del G1-E-EP.....	51
Figura 14. Histopatología de órganos de lechones infectados con vDEP del G1-E-EP, Parte 1. ....	52
Figura 15: Histopatología de órganos de lechones infectados con vDEP del G1-E-EP, Parte 2. ....	53
Figura 16: Histopatología de yeyuno de lechones infectados con vDEP del G2-NE-EP. ...	57
Figura 17. Histopatología de órganos de lechones infectados con vDEP del G2-E-EP. ...	58
Figura 18. Histopatología de yeyuno de lechones infectados con vDEP del G3-E-INDEL. ....	62
Figura 19. Histopatología de yeyuno de lechones infectados con vDEP del G4-NE-INDEL. ....	65
Figura 20. Inmunorreactividad en enterocitos de intestino delgado de lechones infectados con vDEP.....	70
Figura 21. Inmunorreactividad en enterocitos de yeyuno de lechones del G1-E-EP.....	76
Figura 22. Inmunorreactividad en enterocitos de colon ascendente de lechones del G1-E-EP.. ....	80
Figura 23. Inmunorreactividad en linfonodos inguinales de lechones del G1-E-EP.....	81
Figura 24. Inmunorreactividad en enterocitos de yeyuno de lechones del G2-NE-EP.. ....	86
Figura 25. Detección de inmunorreactividad en yeyuno de lechón infectado con vDEP del G2-E-EP a los 3 días posinfección. ....	88
Figura 26. Inmunorreactividad en neumocitos de lechón del G2-E-EP a los 6 días posinfección.....	90
Figura 27. Inmunorreactividad en enterocitos de yeyuno de lechones del G3-E-INDEL.. .	94

Figura 28. Inmunorreactividad en enterocitos de yeyuno de lechones del G4-NE-INDEL.	99
Figura 29. Detección de inmunorreactividad en riñones de lechones infectados con vDEP..	103
Figura 30. Inmunorreactividad en linfonodos mesentéricos de lechón a los 3 DPI del G4-E-INDEL.	105
Figura 31. Carga viral en hisopados rectales de lechones infectados con dos cepas del vDEP.	106
Figura 32. Carga viral en intestino delgado de lechones infectados con una cepa epidémica del vDEP.	106
Figura 33. Carga viral en intestino delgado de lechones infectados con una cepa INDEL del vDEP.	107

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Características de grupos experimentales. ....	27
Cuadro 2. Signos clínicos de lechones inoculados con dos cepas del vDEP .....	32
Cuadro 3. Análisis estadístico basado en modelo logístico para una variable ordinal que evalúa la consistencia de heces por el tipo de cepa por estado de exposición. ....	34
Cuadro 4. Análisis estadístico que presenta la probabilidad de que la deshidratación suceda ( $p \leq 0.05$ ).....	36
Cuadro 5. Análisis estadístico que presenta la probabilidad de que el vómito suceda ( $p \leq 0.05$ ).....	37
Cuadro 6. Análisis estadístico que presenta la probabilidad de que la anorexia suceda ( $p \leq 0.05$ ).....	39
Cuadro 7. Análisis estadístico que presenta la probabilidad de que la mortalidad suceda ( $p \leq 0.05$ ).....	39
Cuadro 8. Análisis estadístico que presenta la probabilidad para los factores: tipo de cepa y estado de exposición sobre la excreción viral en hisopados rectales ( $p \leq 0.05$ ). ....	107
Cuadro 9. Análisis estadístico que presenta la probabilidad para los factores: tipo de cepa y estado de exposición sobre la excreción viral en duodeno ( $p \leq 0.05$ ). ....	107
Cuadro 10. Análisis estadístico que presenta la probabilidad para los factores: tipo de cepa y estado de exposición sobre la excreción viral en yeyuno ( $p \leq 0.05$ ). ....	108
Cuadro 11. Análisis estadístico que presenta la probabilidad para los factores: tipo de cepa y estado de exposición sobre la excreción viral en íleon ( $p \leq 0.05$ ). ....	108

## I. INTRODUCCIÓN

La porcicultura es una actividad productiva muy importante que incluye la crianza, alimentación y comercialización de los cerdos. La carne es el producto principal que se extrae de dicha actividad. China y EEUU son los principales países productores de este cárnico. Actualmente, México genera más de un millón de toneladas de carne de cerdo al año.

El consumo mundial de carne de cerdo ha aumentado en los últimos 10 años debido a su precio accesible en comparación con su contraparte bovina. Adicionalmente, ha aumentado la confianza del consumidor hacia dicho cárnico como una fuente saludable de proteína animal. Sin embargo, la producción y rentabilidad económica de la carne de cerdo es afectada, entre otras causas, por la presentación de enfermedades infecciosas, principalmente las gastrointestinales.

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad viral no zoonótica de los cerdos, caracterizada por provocar diarrea acuosa, deshidratación, pérdida de peso y mortalidad del 80 hasta el 100% en lechones neonatos. En 2014, se identificó por primera vez esta enfermedad en México. Desde entonces, las pérdidas económicas han sido muy importantes; sin embargo, no se han realizado estudios para evaluar la patogenicidad de las principales cepas circulantes en nuestro país y el impacto que pudiesen tener en los individuos más susceptibles. En este contexto, el objetivo de este estudio fue determinar la virulencia y tropismo de dos cepas del virus de diarrea epidémica porcina (vDEP) identificadas durante diferentes brotes en México.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **II.1. Descripción general de la diarrea epidémica porcina (DEP)**

La DEP es una enfermedad viral altamente contagiosa, no zoonótica, que afecta a los cerdos, es causada por el virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP). Los cerdos enfermos presentan diarrea aguda acuosa, vómito, anorexia, deshidratación y pérdida de peso. Los lechones neonatos presentan mayor severidad en la signología y tienen una mortalidad alta que puede ser desde el 80 hasta al 100% (Carvajal et al., 2015; Song et al., 2015). En cerdas adultas, la DEP puede acompañarse de problemas reproductivos como aumento de la tasa de reabsorción, aumento en la tasa de abortos, aumento en el porcentaje de fetos momificados. La tasa de partos, el número total de lechones nacidos por camada y el número de lechones nacidos vivos por camada disminuyen. Las cerdas infectadas en el último tercio de gestación pueden presentar agalactia y diarrea. La mortalidad disminuye a medida que aumenta la edad (Olanratmanee et al., 2010; Trujillo-Ortega, et al., 2016).

### **II.2. Antecedentes históricos**

El primer reporte de la DEP fue en Inglaterra en 1971, en granjas de cerdos de engorda. Sin embargo, el agente causal fue identificado hasta 1978, en Bélgica y se denominó virus de diarrea epidémica porcina (vDEP) cepa CV777 (Pensaert y De Bouck, 1978; Wood, 1977). Durante las décadas de 1970 y 1980, el vDEP se diseminó en varios países de Europa, causando brotes agudos en un número relevante de granjas de cerdos (Carvajal et al., 2015). Durante la década de los 90, los brotes de la DEP disminuyeron en países europeos aunque el virus persistió de forma endémica y sólo unos cuantos brotes graves han sido reportados en Europa (Jung y Saif, 2015; Song et al., 2015; Van Reeth y Pensaert, 1994).

Los primeros brotes del vDEP en Asia se reportaron en China y Japón en 1983, diseminándose a países vecinos como Corea, Tailandia y luego a Filipinas. En contraste a la situación europea, la DEP ha persistido como una de las principales causas de brotes de diarrea en Asia (Carvajal et al., 2015). En 2010,

ocurrió una gran epidemia con tasas altas de mortalidad en lechones lactantes de numerosas provincias de China; a partir de este año las manifestaciones clínicas en los animales han sido más severas y se han presentado numerosos brotes en otros países asiáticos (Chen et al, 2010; Chen et al., 2014).

En América, se registró por primera vez un caso de la DEP en EEUU en 2013; posteriormente se determinó que la variante detectada estaba relacionada genéticamente con la cepa circulante en China en 2012 (Huang et al., 2013; Chen et al., 2014; Song et al., 2015). En México, un brote de DEP se reportó en 2014 con una mortalidad de lechones del 100%. Posteriormente, el vDEP se identificó en Canadá, Perú, Colombia, Ecuador y República Dominicana (Carvajal et al., 2015; Davies, 2015; Trujillo-Ortega et al., 2016).

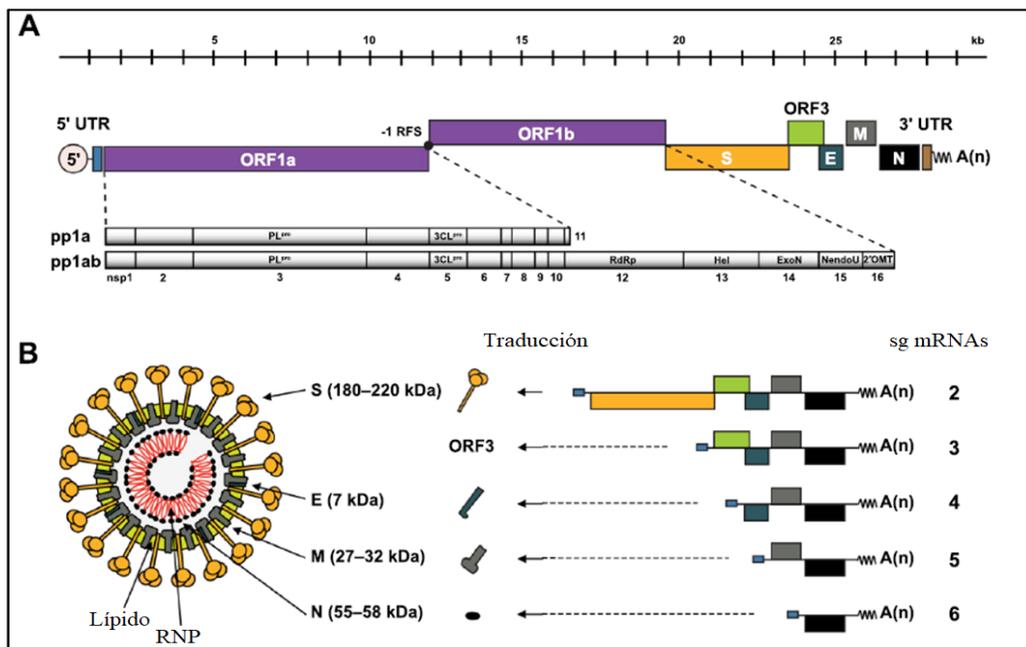
### **II.3. Agente etiológico**

El vDEP es un *Alfacoronavirus*, perteneciente a la familia *Coronaviridae*, del orden *Nidovirales*; posee un genoma de RNA de cadena sencilla en sentido positivo de 28 Kb, que está provisto de una envoltura lipoproteica (Carvajal et al., 2015; Jung y Saif, 2015; Lee, 2015). Se ha demostrado que el vDEP es estable a pH de 4 a 9 durante períodos prolongados de tiempo y a temperaturas de 4 y 37 °C; además, es resistente a ciclos continuos de congelación (-70 °C) y descongelación (37 °C) sin alterarse significativamente su infectividad (Hoffmann y Wyler, 1989; Jung y Saif, 2015). El vDEP es inactivado por desinfectantes, agentes oxidantes (Virkon S), cloro, compuestos fenólicos (One-Stroke Environ, Tek-Trol), hidróxido de sodio al 2%, formaldehído y glutaraldehído, detergentes iónicos y no iónicos, yodóforos fuertes en ácido fosfórico al 1% y disolventes lipídicos tales como cloroformo y éter (Jung y Saif, 2015; Lee, 2015).

#### **II.3.1. Genoma, estructura del virión y clasificación**

El genoma de vDEP tiene aproximadamente 28 Kb de longitud y consiste en una región 5' no traducida (UTR, por sus siglas en inglés), siete marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) y una cola 3' poliadenilada (Carvajal et al., 2015; Song et al., 2015). Los dos ORFs grandes, 1a y 1b, ocupan los dos tercios

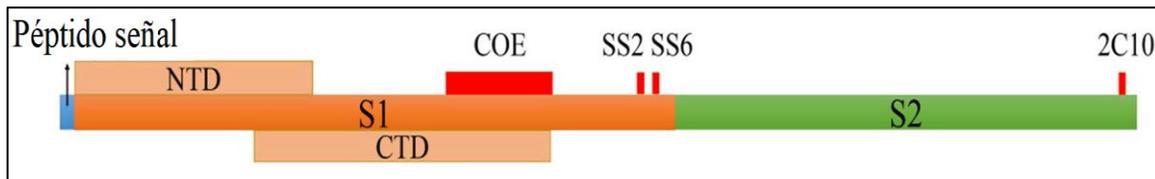
5' proximales del genoma. La traducción de ORF1a y ORF1b producen replicasas, pp1a y pp1ab, respectivamente. Este coronavirus presenta un gen accesorio, el ORF3, el cual puede prolongar la fase S del ciclo celular, facilita la formación de vesículas y regula la producción de viriones. Los restantes ORFs codifican cuatro proteínas estructurales: la glicoproteína de superficie spike (S), la proteína de membrana (M), la proteína de la envoltura (E) y la proteína de la nucleocápside (N) (Lee, 2015; Zhang y Yoo, 2016) (figura 1). La proteína N interactúa con el RNA viral para formar el complejo de ribonucleoproteína (RNP), mientras que las proteínas M y E ensamblan al virión y la glicoproteína S está relacionada con la patogenicidad viral, ya que se une al receptor de la célula diana (Huang et al., 2015; Li et al., 2016).



**Figura 1. Representación esquemática de la organización del genoma del vDEP y la estructura del virión.** A) Estructura del RNA genómico del vDEP. B) Esquemática del virión y las proteínas estructurales que lo conforman (Tomado y modificado de Lee, 2015).

La glicoproteína S está conformada por 1383 a 1386 aminoácidos (aa) y se divide en dos sitios S1 y S2. S1 está relacionado con la unión a las moléculas de la superficie de la célula diana, contiene un dominio N-terminal (NTD) y un C-

terminal (CTD), siendo el NTD dónde se han encontrado variaciones entre cepas clásicas y emergentes incluyendo S-INDEL, se sugiere que una mutación localizada en esta región puede afectar la afinidad al receptor celular. El sitio S2, está anclado a la membrana del vDEP y está relacionado con la fusión de membrana con la célula diana, lo que le permite la entrada e infección de los enterocitos (Deng et al., 2016; Huang et al., 2015; Li et al., 2016). Se han identificado epítomos neutralizantes en la secuencia de la proteína S, en S1: COE (aa 499-638), S1D (aa 636-789), SS2 (aa 748–755) y SS6 (aa 764–771); y en S2: 2C10 (aa 1368-1374) (Chang et al., 2002; Godet et al., 1994; Li et al., 2014) (figura 2).



**Figura 2. Esquematización de la estructura de la proteína S del vDEP.** (Tomado y modificado de Lara-Romero et al., 2018)

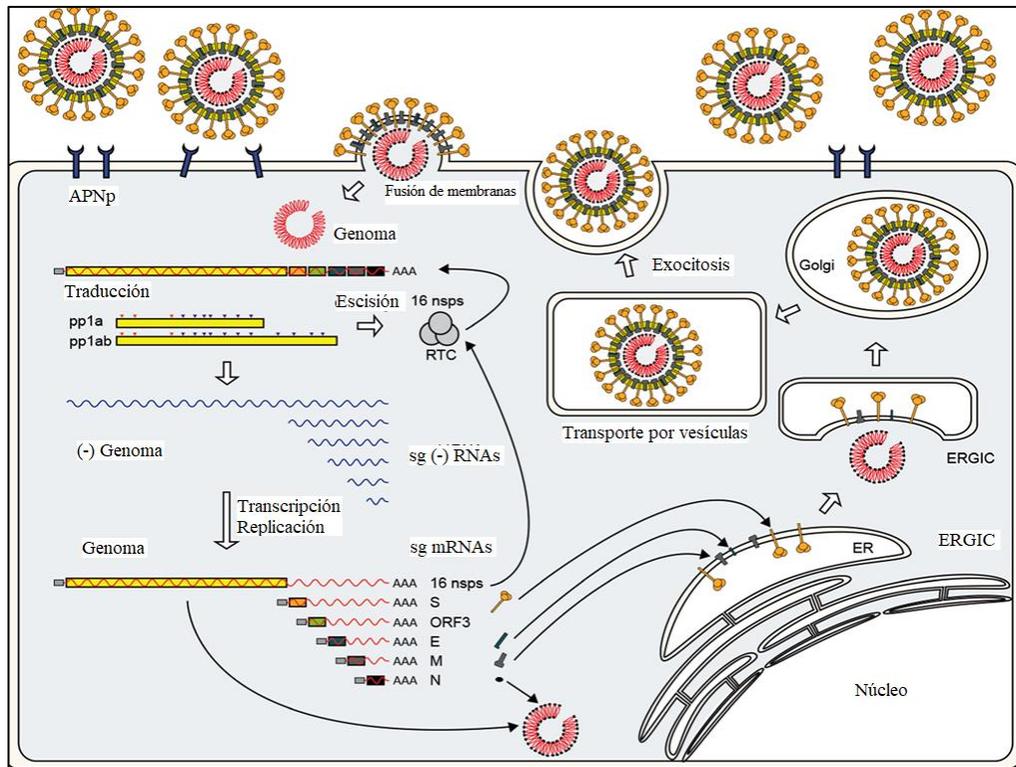
Existe sólo un serotipo de vDEP. Sin embargo, análisis filogenéticos lo han agrupado en dos genogrupos diferentes: G1 o clásico, que surgió en los años 70 en Europa; y G2 o epidémico, que son altamente virulentos y emergieron en 2010 en China. Estos genogrupos se han dividido en subgrupos 1a y 1b y 2a y 2b, respectivamente. El índice de mutación del vDEP es de  $6.2 \times 10^{-4}$  sustituciones/sitio/año (Deng et al., 2017; Lin et al., 2016). Además, se han identificado cepas nuevas que presentan inserciones o deleciones en el gen S, llamadas cepas S-INDEL (Lara-Romero et al., 2018; Liu et al., 2017, Song et al., 2015).

La secuencia del gen S es de especial importancia debido a la gran tasa de modificaciones que posee, éstas se encuentran relacionadas con la virulencia y evolución de cada cepa. Además, mediante análisis filogenéticos de diversas cepas, se ha encontrado que difieren especialmente en el NTD y se han detectado más de 100 mutaciones en esta secuencia de aminoácidos. A su vez, en las

posiciones 1-324 de la proteína S, se ha demostrado afinidad de unión a co-receptores de azúcar (Deng et al., 2017; Lin et al., 2016).

### **II.3.2. Ciclo de replicación**

El ciclo de replicación del vDEP inicia con la interacción de la proteína S del virus con la aminopeptidasa-N porcina de la superficie del enterocito. La proteína S es activada por enzimas proteolíticas que producen su escisión y fusión de membranas. El virión penetra a la célula y libera su genoma hacia el citoplasma celular; es traducido por los ribosomas para producir las replicasas pp1a y pp1ab; estas poliproteínas son escindidas en 16 proteínas no estructurales (NSPS) que conforman el complejo de replicación y transcripción (CRT). El CRT sintetiza una cadena de RNA en sentido negativo y posteriormente se produce la cadena en sentido positivo. Las proteínas S, E y M son traducidas en el retículo endoplásmico y son trasladadas al aparato de Golgi para ser glicosiladas. La proteína N interactúa con el nuevo RNA sintetizado para formar la ribonucleoproteína (RNP) de forma helicoidal para proteger al ácido nucleico viral. El virión es ensamblado en el compartimiento intermedio del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (ERGIC) y es transportado al citoplasma mediante una vesícula. La liberación del virión se lleva a cabo por exocitosis al fusionarse la vesícula con la membrana plasmática (Jung y Saif, 2015; Lee, 2015; Li et al., 2017) (figura 3).



**Figura 3. Ciclo de replicación del vDEP** (Tomado y modificado de Lee, 2015).

#### II.4. Patogénesis

Los coronavirus tienen un tropismo por células epiteliales de los sistemas respiratorio y digestivo, así como por macrófagos. Esta característica es regulada por la glicoproteína S, considerada como determinante del tropismo por tejidos y células, ya que uno de sus dominios tiene la capacidad de unión y fusión a la membrana de la célula diana, esto apoyado por la actividad de enzimas proteolíticas de la célula del hospedador (Lee, 2015; Millet y Whittaker, 2015). El vDEP principalmente infecta y se replica en enterocitos. Sin embargo, se ha demostrado por RT-PCR que el vDEP puede detectarse en órganos como pulmón, hígado, riñón y bazo (Li et al., 2016; Song et al., 2006).

La entrada del vDEP a los enterocitos se dirige y controla mediante el procesamiento proteolítico de la proteína S, la unión al receptor y la fusión a la membrana. *In vivo*, la disponibilidad de proteasas gástricas y pancreáticas expresadas localmente propician la infección del vDEP en el intestino. Ejemplos de estas proteasas son las transmembranales tipo II, furinas y proteasas

endolisosomales dependientes de pH ácido (Zamolodchikova, 2012). *In vitro*, el vDEP es dependiente de una proteasa que no es expresada por la célula diana y debe ser suministrada en el medio de cultivo para poder propagarse en el cultivo celular (Matsuyama y Taguchi, 2009).

La escisión proteolítica en la región N-terminal del sitio S2 de la glicoproteína S, activa al vDEP, con la suplementación de tripsina en una etapa posterior a la unión al receptor, por lo que se infirió que esta glicoproteína está protegida contra el procesamiento prematuro debido a la reducción de la accesibilidad del sitio de escisión, lo que contribuye a dirigir la infección a células diana apropiadas, por lo que el tropismo de este virus con envoltura, ha sido correlacionado con la disponibilidad de proteasas que medien la activación de la fusión con la células diana (Li et al., 2007; Matsuyama y Taguchi, 2009; Wicht et al., 2014).

El vDEP se replica en el citoplasma de los enterocitos y causa el acortamiento de las vellosidades. La hipotrofia y daño de la mucosa se acompaña de disminución en la capacidad enzimática digestiva y malabsorción, con produce diarrea acuosa profusa, deshidratación y muerte en los casos más severos (Carvajal et al., 2015; Song et al., 2006).

## **II.5. Signos de la DEP en lechones**

La DEP se caracteriza por ocasionar diarrea acuosa de presentación aguda en cerdos de todas las edades. Otros signos clínicos incluyen vómito, anorexia, deshidratación y pérdida de peso. Los cerdos neonatos presentan mayor severidad del cuadro clínico y la mortalidad va desde el 80 hasta el 100% (Carvajal et al., 2015; Song et al., 2015).

## **II.6. Lesiones en lechones**

### **II.6.1. Lesiones macroscópicas**

Las lesiones características de la DEP se limitan al tracto gastrointestinal en donde se ha descrito distensión gástrica, con presencia de leche sin digerir, posiblemente debido a la reducción del peristaltismo intestinal; paredes

intestinales finas y transparentes con acumulación de fluidos amarillentos en la luz intestinal; además, se ha observado congestión de los vasos mesentéricos y linfonodos mesentéricos edematosos (Ducatelle et al., 1982; Jung y Saif, 2015; Lee, 2015).

### **II.6.2. Lesiones microscópicas**

Las características histológicas de la infección por el vDEP incluyen enteritis atrófica difusa grave, degeneración hidrópica de enterocitos con vacuolación citoplasmática leve, necrosis, desprendimiento difuso de enterocitos, contracción de la lámina propia y acortamiento de las vellosidades (Ducatelle et al., 1982; Lee, 2015).

La infección con el vDEP provoca diarrea debido a la pérdida masiva de enterocitos, que conlleva a malabsorción de nutrientes. Mediante microscopía electrónica se ha observado la degeneración de mitocondrias en enterocitos infectados, lo cual induce la falla de los mecanismos de transporte activo indispensable para la absorción y aumento de la secreción intestinal. Asimismo, se ha detectado vacuolación leve en las células epiteliales colónicas infectadas, lo que interfiere con la reabsorción del agua, electrólitos y vitaminas (Carvajal et al., 2015; Ducatelle et al., 1982; Song et al., 2015). A su vez, se ha detectado la alteración de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> con acumulación de Na<sup>+</sup> intracelular que interfiere en la absorción de agua y provoca deshidratación (Lee, 2015).

### **II.7. Diagnóstico**

Debido a que los signos de la infección por el vDEP son indistinguibles a los causados por otros coronavirus, el diagnóstico de la DEP se debe basar en pruebas de laboratorio que detecten al virus de manera directa o los anticuerpos que se produzcan por la respuesta inmune contra el virus. Los métodos que sirven para la detección del virus son hibridación *in situ*, IHQ, RT-PCR y aislamiento viral. Los métodos que se centran en la detección de anticuerpos son la prueba de inmunofluorescencia (IFA) y ELISA (Carvajal et al., 2015; Hoffmann y Wyler, 1990).

### **II.7.1. Inmunohistoquímica (IHQ)**

La IHQ es una técnica de diagnóstico que se utiliza para la identificación de epítomos virales específicos, presentes en células infectadas (Kumar, 2009).

### **II.7.2. RT-PCR**

La RT-PCR es una metodología mediante la cual las moléculas de RNA se sintetizan *in vitro* en su secuencia complementaria de DNA (cDNA) mediante la enzima transcriptasa reversa, seguido de la amplificación del cDNA recién sintetizado mediante procedimientos de PCR estándar (Farrell, 2010).

### **II.7.3. Cultivo celular para aislamiento**

Para el aislamiento y propagación del vDEP en cultivo celular se ha descrito la utilización de la línea celular Vero, suplementada con tripsina la cual contribuye en la entrada y la liberación de viriones en las células (Hoffmann y Wyler, 1988; Jung y Saif, 2015). Como resultado de la infección viral *in vitro*, se producen efectos citopáticos (ECP) distintos como fusión celular, vacuolación y formación de sincitios (Jung y Saif, 2015; Lee, 2015). Además, se ha demostrado que el vDEP tiene actividad hemoaglutinante con eritrocitos de conejo después del tratamiento con tripsina (Park et al., 2010).

### **II.7.4. Inmunofluorescencia (IFA)**

La inmunofluorescencia (IFA), es una prueba en la que se utilizan anticuerpos unidos a un fluorocromo que permite la detección de proteínas virales específicas presentes en células infectadas (Lee, 2015).

### **II.7.5. Ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA indirecto)**

Esta metodología se utiliza para la detección de IgG, IgM e IgA en muestras de suero, calostro o leche, mediante la utilización de virus completos o proteínas recombinantes; la reacción es revelada utilizando un conjugado y un sustrato cromogénico (Diel et al., 2016).

## **II.8. Prevención**

La DEP no tiene tratamiento, sin embargo, en la actualidad se han desarrollado e implementado métodos para prevenirla. Existen vacunas atenuadas o inactivadas de varias cepas, las cuales fueron eficientes en Asia hasta 2010 cuando emergieron cepas de un genogrupo nuevo y la protección fue parcial o nula (Lin et al., 2015). En México se encuentran disponibles dos vacunas inactivadas basadas en la cepa USA/Colorado/2013 (Lara-Romero et al., 2017). Mediante análisis filogenéticos y de aminoácidos de la proteína S, se ha determinado que las diferencias entre las cepas epidémicas americanas y las S-INDEL residen en la región S1 (1-738aa), especialmente en el dominio NTD (1-390aa) mientras que el genoma restante es conservado entre los dos genogrupos (Chen et al., 2016; Lin et al, 2015).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La diarrea epidémica porcina se ha considerado una enfermedad reemergente de importancia para la sanidad y la producción animal, debido a la alta mortalidad que ha provocado en los últimos años. En la actualidad se desconoce si las variaciones genéticas entre las cepas circulantes en México producen diferencias en su patogenicidad y tropismo, y el impacto que pudiesen tener en los individuos más susceptibles. Al evaluar la presencia del vDEP y los daños que causa en diferentes órganos se podrá determinar si existe variabilidad en la severidad de las lesiones provocadas y si éstas dependen de variaciones genéticas en cada cepa aislada.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Existen diferencias en la virulencia y el tropismo entre las cepas epidémicas e INDEL del virus de diarrea epidémica porcina identificadas en México.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1.Objetivo general**

Determinar la virulencia y tropismo una cepa epidémica y una cepa INDEL del vDEP identificadas durante diferentes brotes en México.

### **V.2.Objetivos específicos**

- Identificar y valorar las lesiones causadas por el vDEP y su grado de severidad en diferentes órganos mediante anatomopatología e histopatología.
- Identificar la distribución del vDEP en órganos de los sistemas digestivo, respiratorio, urinario y linfático mediante IHQ.
- Cuantificar la excreción en heces y carga viral en duodeno, yeyuno e íleon mediante RT-PCR en tiempo real.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### VI.1. Animales

Se utilizaron cuatro grupos de lechones de 5 días de edad (N=48), de sexo y raza indistinta, provenientes del área de producción del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-MA), INIFAP. Para cada cepa utilizada del vDEP (epidémica e INDEL) se asignaron dos grupos experimentales, uno con lechones (n=12) provenientes de cerdas expuestas al virus durante la gestación para transferirles inmunidad lactogénica contra el virus, los cuales presentaron signos clínicos normales previos a la infección y fueron considerados como expuestos al vDEP; el otro grupo se integró con lechones (n=12) provenientes de cerdas libres del virus, con qRT-PCR negativa, con signos clínicos normales previos a la infección y que fueron considerados como no expuestos (cuadro 1). Los grupos experimentales se ubicaron en una sala de aislamiento y fueron alimentados con sustituto de leche *ad libitum*.

**Cuadro 1: Características de grupos experimentales.**

Grupo	Cepa	Característica	Identificación del grupo
1	EP: PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank. No.: KY828999)	Expuesto	G1-E-EP
2		No expuesto	G2-NE-EP
3	INDEL: PEDV/MEX/VER/01/2014 (GenBank. No.: KY828991.1)	Expuesto	G3-E-INDEL
4		No expuesto	G4-NE-INDEL

### VI.2. Selección de cepas virales

Estudios previos han demostrado que las diferencias genéticas entre las diferentes cepas de los genogrupos del vDEP proveen diferencias en la severidad de la presentación del cuadro clínico y la duración de éste (Huang et al., 2013; Lin et al., 2015).

En un estudio previo, por medio de RT-PCR, se amplificaron siete fragmentos del gen S y fueron secuenciados con el método de Sanger. Mediante el uso de programas bioinformáticos se realizó el análisis de la proteína S y se ubicaron los

epítomos reportados previamente (resultados no mostrados) (Huang et al., 2013; Lin et al., 2015; Lara-Romero et al., 2018). De acuerdo a la secuencia de aminoácidos de la proteína S, se seleccionó la cepa epidémica PEDV/MEX/MICH/01/2013 (GenBank. No.: KY828999) que presentó dos sustituciones L<sub>504</sub>P y L<sub>618</sub>V en el epítomo COE y la cepa INDEL PEDV/MEX/VER/01/2014 (GenBank. No.: KY828991.1) que presentó las sustituciones S<sub>226</sub>Y y Q<sub>228</sub>E, dichas sustituciones son con referencia en la cepa USA/Colorado/2013 (GenBank No.: KF272920) y la cepa INDEL OH851 (GenBank No.: KJ399978), las cuales pudiesen estar implicadas en la presentación de diferencias en la virulencia y tropismo entre las cepas mexicanas identificadas (Lara-Romero et al., 2018).

### **VI.3. Infección experimental**

Para cada aislamiento se realizaron infecciones experimentales en cerdos neonatos. La dosis fue ajustada mediante RT-PCR en tiempo real. Todos los animales fueron inoculados vía oral con 2 mL del inóculo que contenía un título de  $2 \times 10^6$  equivalentes genómicos (EG)/mL del vDEP. Se realizó el seguimiento clínico cada 24 h posinfección, se registraron presencia y severidad de signos, consistencia de heces y temperatura corporal. El protocolo realizado fue evaluado y aprobado por el subcomité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales (SICUAE), FMVZ, UNAM, número MC-2018/1-2.

### **VI.4. Muestreo**

Se colectaron hisopados rectales durante los primeros cinco días posinfección (DPI) y posteriormente cada tercer día hasta el 12 DPI, para cuantificar la carga viral excretada en heces a lo largo de la infección.

Cada tercer día, se realizó la eutanasia y necropsia de los lechones (n=3) que presentaron signos más severos, conforme al procedimiento descrito por Aluja y Constantino (2002). Previo a la eutanasia, se tranquilizó a los lechones con azaperona 1mg/g IM; posteriormente, se realizó la eutanasia con pentobarbital sódico al 6.3% a la dosis de 30mg/kg IV (Plumb, 2010). Durante la necropsia, se

registraron los hallazgos macroscópicos y se tomaron muestras de órganos de: sistemas digestivo, respiratorio, urinario y tejido linfoide. Los órganos colectados fueron preservados en formol amortiguado al 10% (pH 7.2) para realizar la evaluación histológica e inmunohistoquímica.

Además, se preservaron muestras de duodeno, yeyuno e íleon, mediante congelación a -70°C, para posteriormente realizar la cuantificación de la carga viral a través de RT-PCR en tiempo real.

## **VI.5. Procesamiento de las muestras**

### **VI.5.1. Evaluación histológica**

Los órganos previamente fijados en formol amortiguado al 10% (pH 7.2) fueron procesados mediante la técnica histológica ordinaria. Los cortes de 3 a 5 µm de grosor fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H&E). La observación se realizó en microscopía de campo claro con los objetivos 10x y 40x (Prophet, 1995).

### **VI.5.2. Evaluación inmunohistoquímica**

La distribución de antígenos del vDEP se determinó mediante el método indirecto de la técnica de inmunohistoquímica para identificar inmunorreactividad contra la proteína N del virus, la cual es la proteína viral más abundante expresada en células infectadas por el vDEP y está altamente conservada entre los genogrupos (Buchwalow y Bôcker, 2010; Kumar, 2009; Gerber et al., 2016).

Las muestras fueron fijadas por inmersión en formol amortiguado al 10% (pH 7.2), durante 24 h. Posteriormente, fueron procesadas con la técnica histológica ordinaria para obtener cortes en parafina de 4 µm de grosor, adheridos a portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina al 0.1%. Luego de desparafinarlos y rehidratarlos hasta agua destilada, los cortes fueron sometidos a reactivación antigénica con ImmunoDNA Retriever 20X with Citrate® (Bio SB) y calor húmedo en olla de presión a 96°C durante 15 min. La inactivación de la peroxidasa endógena se efectuó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol; y para el bloqueo de sitios inespecíficos se utilizó albúmina sérica bovina al 1% y suero de cabra al 5%, se

utilizó PBS como solución de lavado y para la preparación de reactivos. Se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal PEDV-NP Ascites SD6-29 (MedgeneLabs) a concentración 1:250 a 37°C durante 60 min. Como anticuerpo secundario se usó Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)® (Jackson Immuno Research) a concentración 1:200 a 37°C durante 60 min. Entre cada tratamiento se intercalaron lavados con PBS. El revelado se realizó con Liquid DAB-Plus Substrate Kit® (Invitrogen) y la contratinción con hematoxilina de Harris durante 5 min. La inmunorreactividad celular al vDEP fue positiva cuando se observó coloración citoplasmática marrón, con núcleo visible. Las muestras fueron analizadas de manera independiente por tres revisores, con un sistema de puntuación previamente validado.

### **VI.5.3. Cuantificación de carga viral**

La cuantificación de carga viral se obtuvo a partir de los hisopados rectales y de muestras de los órganos congelados a -70°C, mediante la realización de RT-PCR en tiempo real.

Previamente, se extrajo el RNA con el minikit comercial RNAeasy® (QIAGEN) conforme a las instrucciones del fabricante. En el caso de los órganos, primero se maceraron con buffer de lisis y arena estéril para posteriormente hacer la extracción con el kit comercial.

Para la cuantificación de carga viral se realizó una RT-PCR en tiempo real con el kit comercial QuantiTect Multiplex® RT-PCR (QIAGEN), utilizando iniciadores y sondas descritos previamente (Wang et al., 2014). Las etapas de la prueba fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: transcripción reversa a 50°C durante 2 min, desnaturalización a 95°C durante 20 seg, alineamiento a 55°C y extensión a 60°C durante 45 min por 40 ciclos. El valor de cuantificación absoluta se obtuvo mediante una curva estándar elaborada en el laboratorio, el valor final fue expresado en EG del vDEP por mL, y los valores fueron expresados en logaritmo base 10.

#### **VI.5.4. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el Software Analysis R 3.4.3 utilizando un modelo logístico para una variable ordinal para probabilidad con la finalidad de identificar si la consistencia de heces era independiente de los factores tipo de cepa y estado de exposición de los lechones infectados.

Además, se realizó el cálculo de probabilidad de la presentación de deshidratación, vómito, anorexia o muerte por la infección del vDEP, utilizando un modelo de regresión logística, con un nivel de significancia del 95% (valor de  $p=0.05$ ).

Para la cuantificación de carga viral excretada en hisopados rectales y la carga viral en intestino delgado, se realizó un análisis factorial 2 x 2 para identificar el efecto de los factores tipo de cepa y estado inmunológico sobre la variable de cuantificación. Dichos análisis estadísticos se realizaron con un valor de  $p=0.05$ .

Las medias y desviaciones estándar de temperatura corporal, carga viral en hisopados rectales e intestino delgado se calcularon para cada día usando el mismo software.

## VII. RESULTADOS

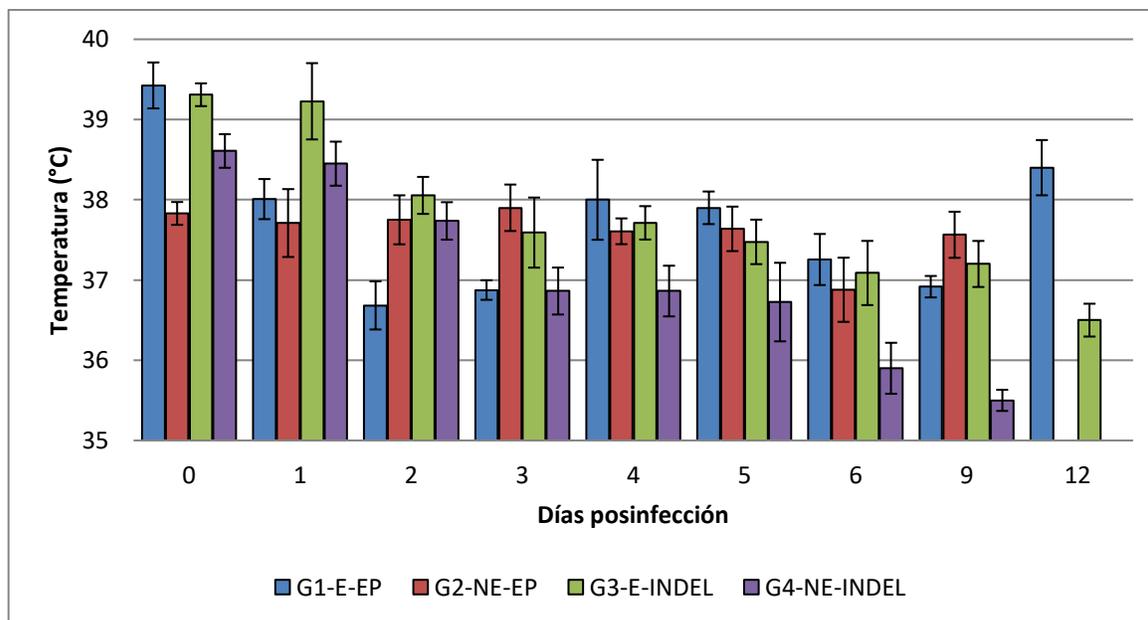
### VII.1. Signos clínicos

En todos los grupos experimentales, los cuadros clínicos más severos se presentaron durante los seis primeros días posinfección (DPI), los cuales se caracterizaron por la presencia de diarrea, deshidratación, vómito y anorexia. El cuadro clínico y lesiones más severas fueron presentados por los lechones sin exposición previa (G2-NE-EP y G4-NE-INDEL) con respecto a los que tenían exposición e inmunidad materna contra el vDEP (G1-E-EP y G3-E-INDEL). Sin embargo, los grupos G1-E-EP y G2-NE-EP, inoculados con la cepa epidémica, presentaron signos más severos y por un tiempo más prolongado comparados con los cerdos de los grupos G3-E-INDEL y G4-NE-INDEL, inoculados con la cepa INDEL, que presentaron diarrea pastosa y volvieron a tener consistencia de heces de apariencia normal y la hipotermia tuvo un período de duración menor (cuadro 2 y figura 4).

**Cuadro 2. Signos clínicos de lechones inoculados con dos cepas del vDEP**

Grupo	Inicio de diarrea (DPI)	Duración de diarrea (DPI)	Número de muertes no programadas	Menor temperatura (DPI) <sup>1</sup>	Intervalo promedio de temperatura <sup>2</sup>	Duración de hipotermia (DPI) <sup>3</sup>
G1-E-EP	1	12	0	34.0 [2]	36.7±0.4 a 39.4±0.3	6 [2-3, 6-9]
G2-NE-EP	1	12	5	32.7 [5]	35.9±0.3 a 38.1±0.2	7 [1-6]
G3-E-INDEL	1	6	0	36.2 [9]	36.5±0.5 a 39.6±0.3	1 [2]
G4-NE-INDEL	2	5	4	33.7 [6]	35.5±0.1 a 38.6±0.3	9 [2-9]

<sup>1</sup> Menor valor individual registrado [días posinfección]. <sup>2</sup> Los datos se muestran como media ± desviación estándar. <sup>3</sup> Duración de hipotermia [días posinfección]. DPI, días posinfección.



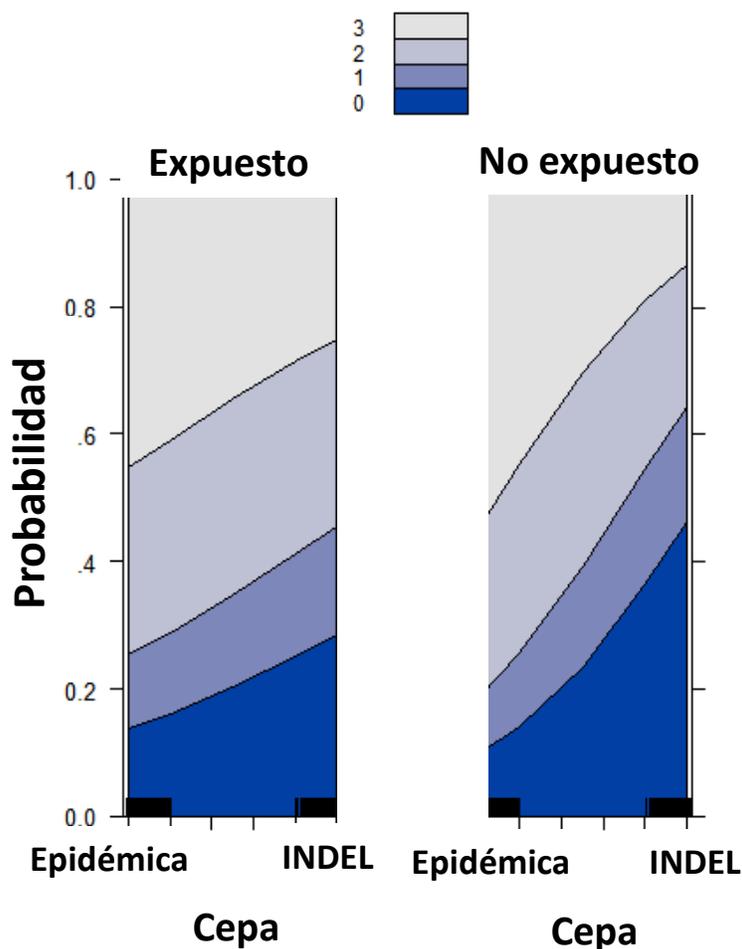
**Figura 4. Temperatura de lechones infectados con dos cepas del vDEP.** La línea horizontal indica el valor a partir del cual se consideró una temperatura hipotérmica, tomando los valores fisiológicos normales.

Para la variable heces, dada su naturaleza (escala ordinal) se analizó con un modelo logístico para una variable ordinal con el cual se detectó una interacción de los factores cepa y estado de exposición (cuadro 3). Las probabilidades que se encontraron se pueden observar en la figura 5. Por ejemplo, la probabilidad de que un lechón sin exposición previa al vDEP e infectado con la cepa INDEL presentara alguna de las diversas categorías en heces es la siguiente: consistencia normal, 46.3%; consistencia pastosa, 18.1%; diarrea pastosa, 22.2%; diarrea líquida, 13.4%.

**Cuadro 3. Análisis estadístico basado en modelo logístico para una variable ordinal que evalúa la consistencia de heces por el tipo de cepa por estado de exposición.**

<b>Coefficientes</b>	<b>Valor</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor de t</b>
Cepa	0.2514	0.6655	0.3777
Estado de exposición	1.5431	0.7312	2.1104
Asociación tipo de cepa y estado de exposición	1.1581	0.4454	-2.6002
<b>Interceptos</b>	<b>Valor</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Valor de t</b>
0 1	-1.1900	1.0774	-1.1045
1 2	-0.4494	1.0751	-0.4180
2 3	0.8222	1.0757	0.7643

Consistencia de heces: 0, heces normales; 1, heces pastosas; 2, diarrea pastosa; 3, diarrea líquida.



**Figura 5. Gráfico de interacción para la probabilidad de presentación de consistencia de heces de lechones infectados con dos cepas del vDEP. Consistencia de heces: 0, heces normales; 1, heces pastosas; 2, diarrea pastosa; 3, diarrea líquida.**

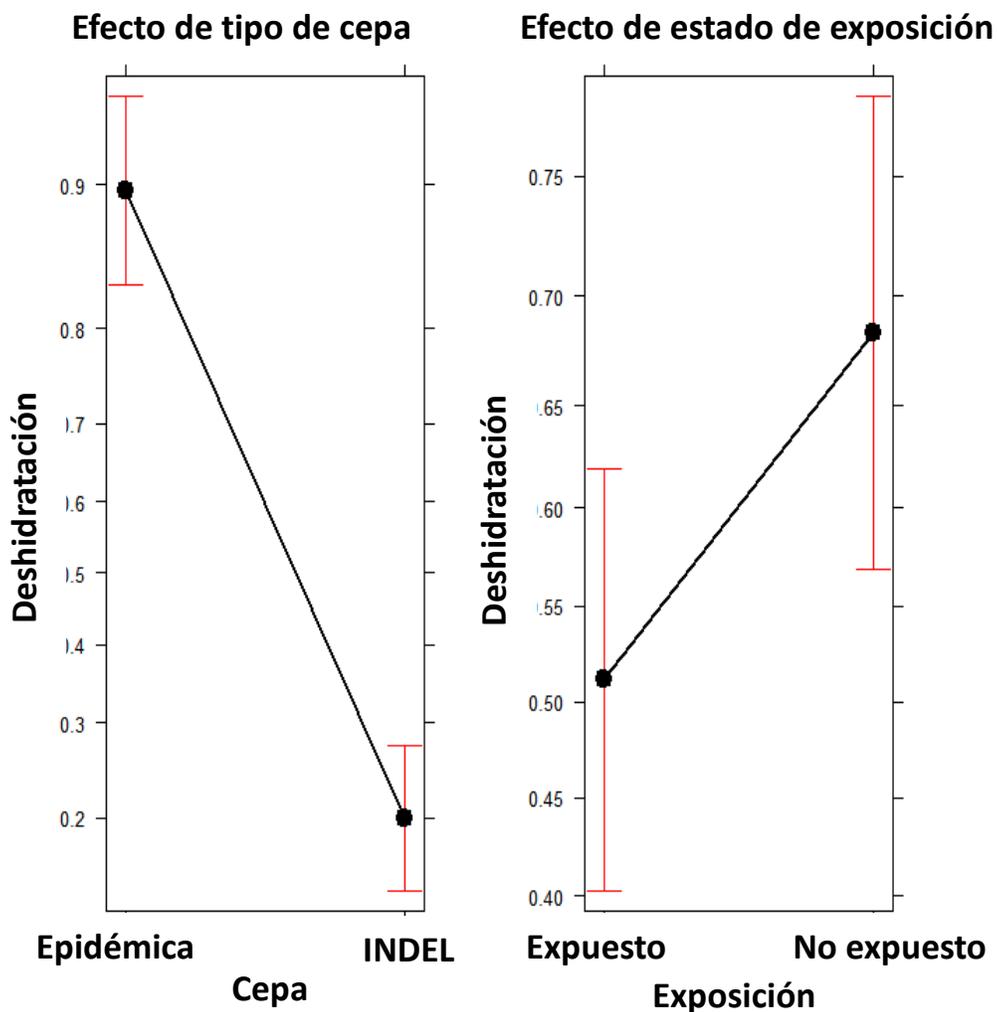
Con el análisis de regresión logística se calculó la probabilidad de que un lechón infectado con una de las cepas de vDEP, con un estado de exposición determinado, presentara deshidratación, vómito, anorexia o muerte durante una infección natural, con  $\alpha \leq 0.05$  (cuadro 4-7).

El análisis indicó que la probabilidad de presentar deshidratación era mayor para un lechón infectado con la cepa epidémica que la de un lechón infectado con la cepa INDEL (p-value: 0.00) (probabilidad: 0.9 y 0.2, respectivamente) (figura 6). A su vez, el análisis indicó que la probabilidad de presentar deshidratación era mayor para un lechón infectado sin exposición al vDEP que la de un lechón con exposición previa (p-value: 0.02) (probabilidad: 0.68 y 0.52, respectivamente) (figura 6).

**Cuadro 4. Análisis estadístico que presenta la probabilidad de que la deshidratación suceda ( $p \leq 0.05$ ).**

Variable: deshidratación	Valor de p
Tipo de cepa	0.00*
Estado de exposición	0.02*
Asociación tipo de cepa y estado de exposición	0.28

\* Valor estadísticamente significativo.



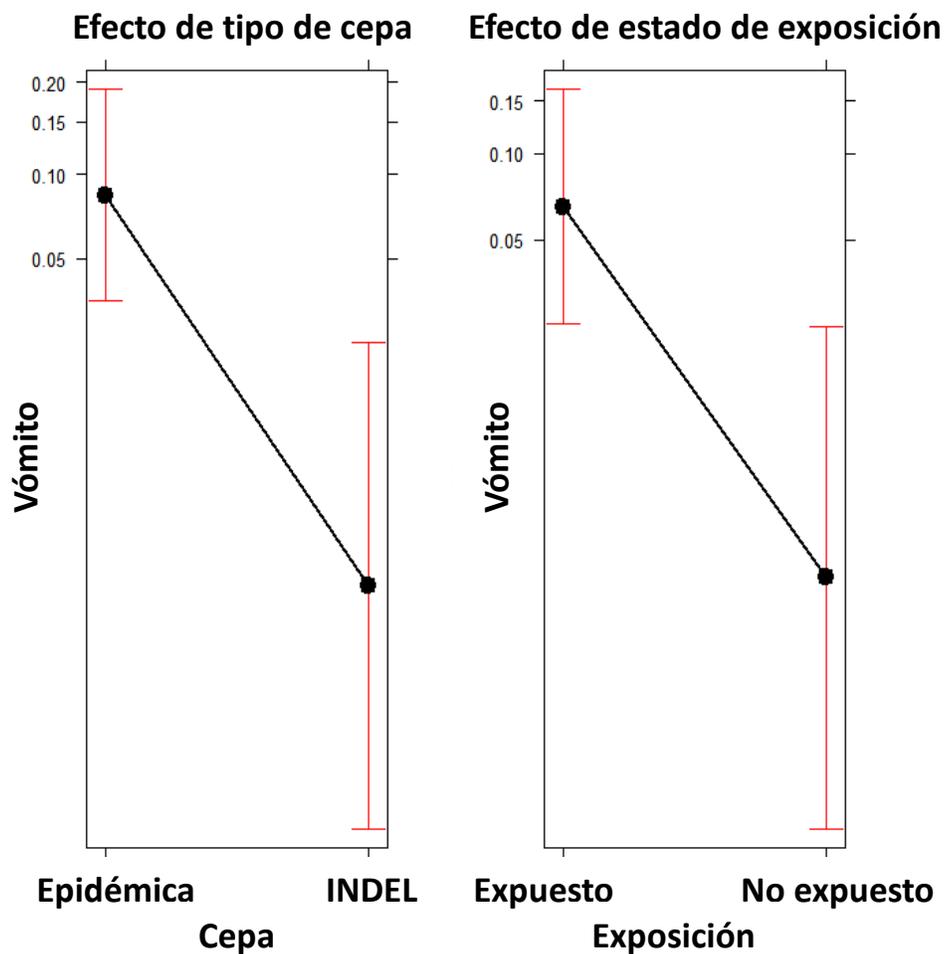
**Figura 6. Efecto de la probabilidad de que la deshidratación suceda por variable analizada.**

Además, el análisis indicó que la probabilidad de presentar vómito era mayor para un lechón infectado con la cepa epidémica que la de un lechón infectado con la cepa INDEL (cuadro 5) (p-value: 0.00) (probabilidad: 0.09 y 0.002, respectivamente) (figura 7). A su vez, el análisis indicó que la probabilidad de presentar vómito era mayor para un lechón infectado con exposición previa a vDEP que la de un lechón infectado sin exposición previa (p-value: 0.00) (probabilidad: 0.07 y 0.002, respectivamente) (figura 7).

**Cuadro 5. Análisis estadístico que presenta la probabilidad de que el vómito suceda ( $p \leq 0.05$ ).**

<b>Variable: vómito</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Tipo de cepa</b>	0.00*
<b>Estado inmunológico</b>	0.00*
<b>Asociación tipo de cepa y estado inmunológico</b>	0.78

\* Valor estadísticamente significativo.



**Figura 7. Efecto de la probabilidad de que el vómito suceda por variable analizada.**

A su vez, el análisis indicó que la probabilidad de presentar anorexia era casi nula tanto para un lechón infectado con la cepa epidémica como la de un lechón infectado con la cepa INDEL (cuadro 6) (p-value: 0.00), así como la de un lechón infectado con exposición previa al vDEP que la de un lechón infectado sin exposición previa (p-value: 0.02).

**Cuadro 6. Análisis estadístico que presenta la probabilidad de que la anorexia suceda ( $p \leq 0.05$ ).**

<b>Variable: anorexia</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Tipo de cepa</b>	0.00*
<b>Estado inmunológico</b>	0.002*
<b>Asociación tipo de cepa y estado inmunológico</b>	0.99

\* Valor estadísticamente significativo.

El análisis indicó que la probabilidad de muerte era casi nula tanto para un lechón infectado con exposición previa al vDEP que la de un lechón infectado sin exposición previa (cuadro 7) (p-value: 0.00).

**Cuadro 7. Análisis estadístico que presenta la probabilidad de que la mortalidad suceda ( $p \leq 0.05$ ).**

<b>Variable: muerte</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Tipo de cepa</b>	0.95
<b>Estado inmunológico</b>	0.00*
<b>Asociación tipo de cepa y estado inmunológico</b>	1.00

\* Valor estadísticamente significativo.

## **VII.2. Lesiones macroscópicas**

Para cada experimento, se programó la necropsia de tres animales, cada tercer día, sin embargo, durante el proceso experimental se realizaron necropsias no programadas de animales que murieron o se realizó la eutanasia por la severidad del cuadro clínico que presentaron. En el cuadro 2 se enlistan el número de animales no programados que murieron durante cada experimento.

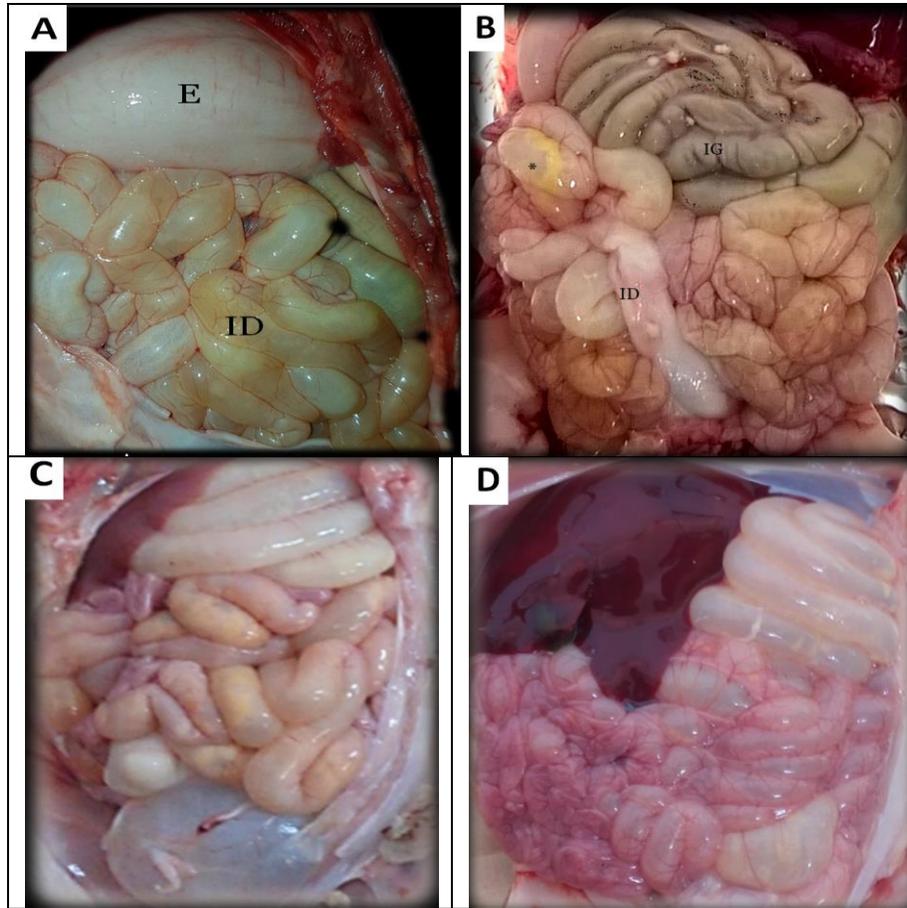
Durante la necropsia, en el G1-E-EP se identificaron paredes intestinales pálidas y transparentes con acumulación de gas y heces acuosas amarillentas, principalmente en intestino delgado (12/12, 100%) (figura 9, panel A), linfadenomegalia generalizada (7/12, 58.3%), enfisema subcutáneo (4/12, 33.3%), congestión difusa en pulmones (2/12, 16.6%), palidez en corazón (1/12,

8.3%), hígado (3/12, 25%), páncreas (1/12, 8.3%) y riñón (1/12, 8.3%); el bazo además de estar pálido tenía consistencia friable (2/12, 16.6%) (figura 10).

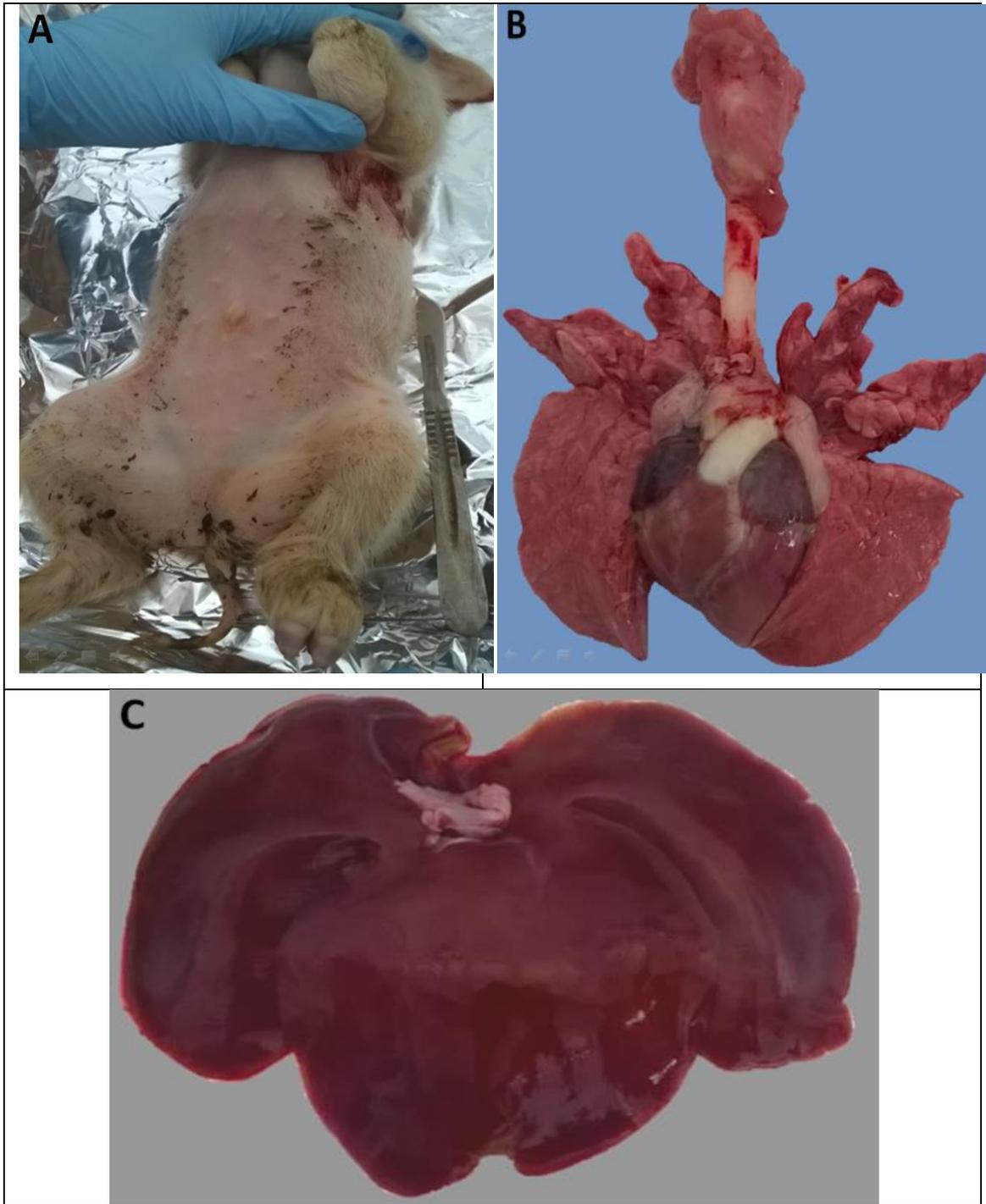
En el G2-NE-EP se identificaron paredes intestinales pálidas y transparentes con acumulación de gas y heces acuosas amarillentas principalmente en intestino delgado y grueso (11/12, 91.6%) (figura 9, panel B), congestión difusa en pulmones (1/12, 8.3%), infartos y palidez en hígado (1/12, 8.3%), y vesícula biliar con contenido color negro (1/12, 8.3%) y nefromegalia (1/12, 8.3%) (figura 11). Los lechones sólo sobrevivieron hasta los 9 DPI por los signos severos que presentaron, lo que provocó la muerte (5/12, 41.6%) no programada de algunos individuos del grupo (cuadro 2).

En el G3-E-INDEL se observaron lesiones macroscópicas en intestino delgado y grueso, las cuales se caracterizaron por paredes intestinales pálidas y con acumulación de gas (6/12, 50 %) (figura 9, panel C), ictericia (1/12, 8.3%), linfadenomegalia generalizada (9/12, 75%), adherencias y congestión difusa en pulmones (4/12, 33.3%), corazón con palidez (5/12, 41.6%) y adherencias (2/12, 16.6%), bazo con palidez (6/12, 50%) y fibrina (2/12, 16.6%), palidez en hígado (9/12, 75%), riñones cianóticos (2/12, 16.6%), con palidez y fibrina (4/12, 33.3%) (figura 12).

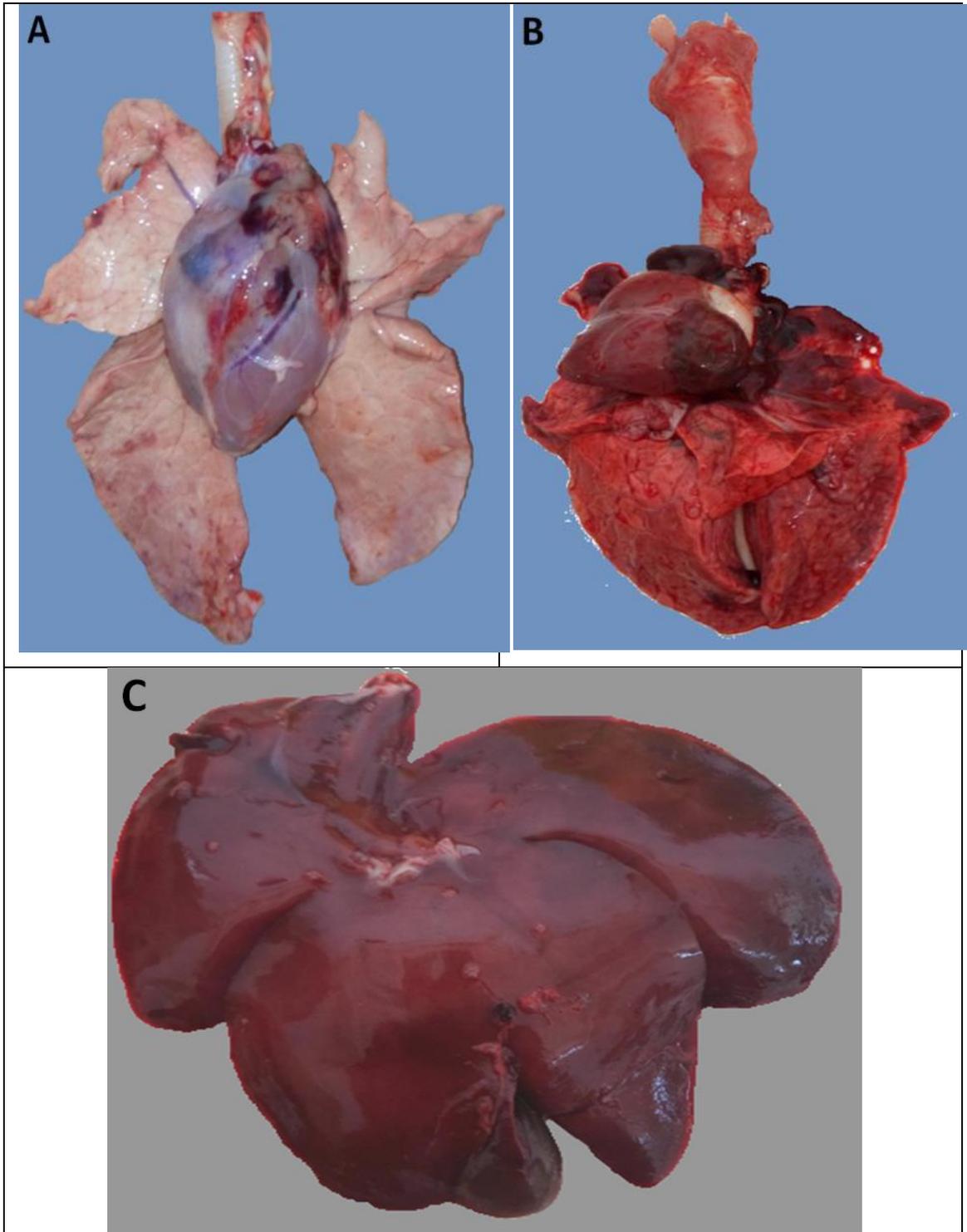
Los cerdos del G4-NE-INDEL presentaron lesiones macroscópicas en intestino delgado y grueso, las cuales se caracterizaron por paredes intestinales pálidas y con acumulación de gas (7/12, 58.3%) (figura 9, panel D), linfadenomegalia generalizada (5/12, 41.6%), congestión difusa en pulmones (5/12, 41.6%), adherencias en corazón (4/12, 33.3%), riñones fibrinosos (1/12, 8.3%) (figura 13). Este grupo sólo llegó al 9 DPI por la muerte (4/12, 33.3%) no programada de los lechones del experimento (cuadro 2).



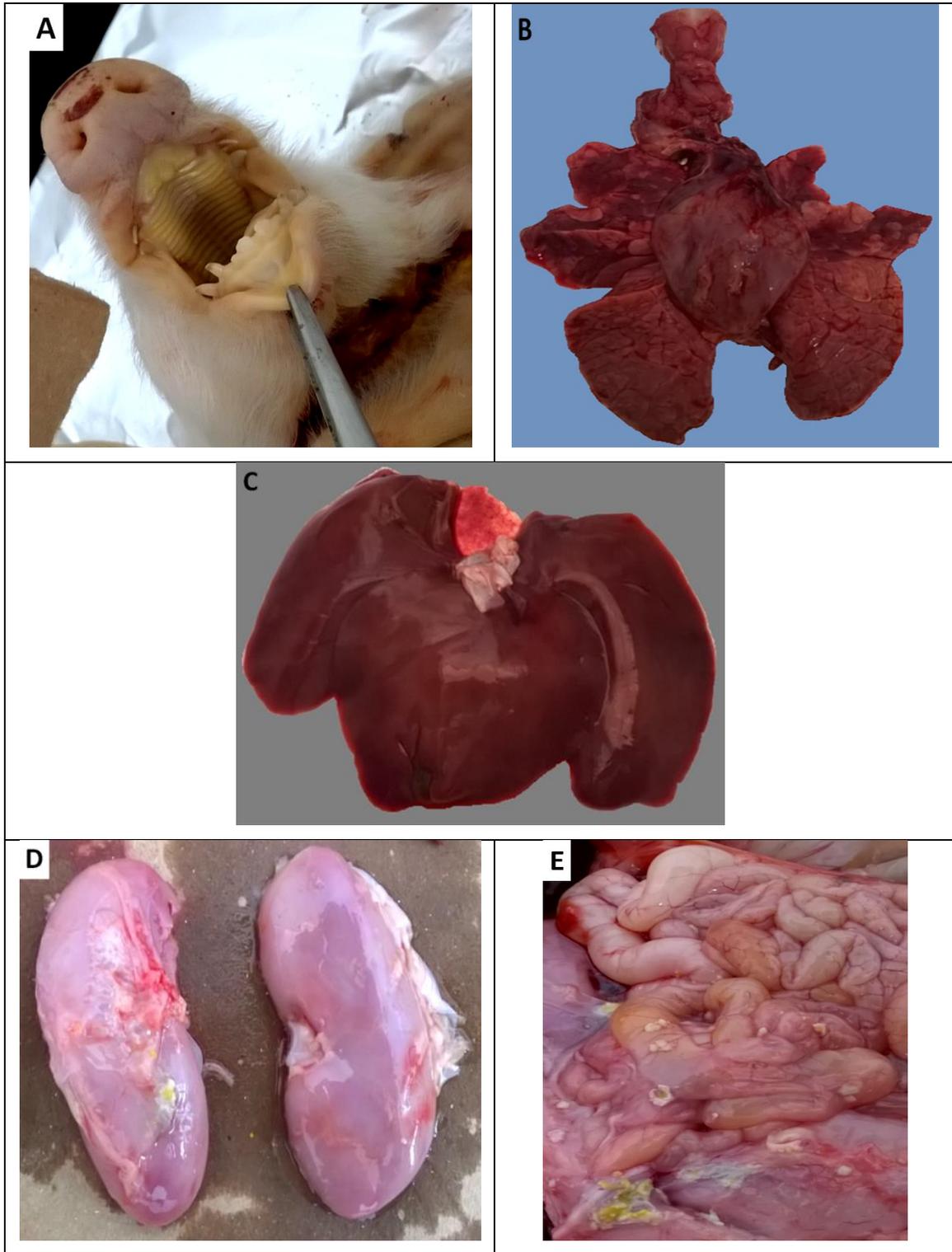
**Figura 8. Cambios morfológicos por evaluación macroscópica en intestinos de lechones infectados con dos cepas del vDEP.** A) Estómago e intestinos de lechón del grupo G1-NE-EP a los 3 DPI. Se pueden observar estómago (E) e intestino delgado (ID), este último lleno de gas y fluidos amarillentos, paredes intestinales transparentes. B) Intestino delgado de lechón del grupo G2-NE-EP a los 3 DPI. Se puede observar intestino delgado lleno de gas y fluidos amarillentos, paredes intestinales transparentes y pálidas. C) Intestinos de lechón del grupo G3-E-INDEL a los 6 DPI. Se puede apreciar la presencia de enteritis, adelgazamiento de paredes y acumulación fluidos amarillentos. D) Intestinos de lechón del grupo G4-NE-INDEL, a los 6 DPI. Se pueden observar intestinos delgado y grueso con acumulación de gas y paredes transparentes y pálidas.



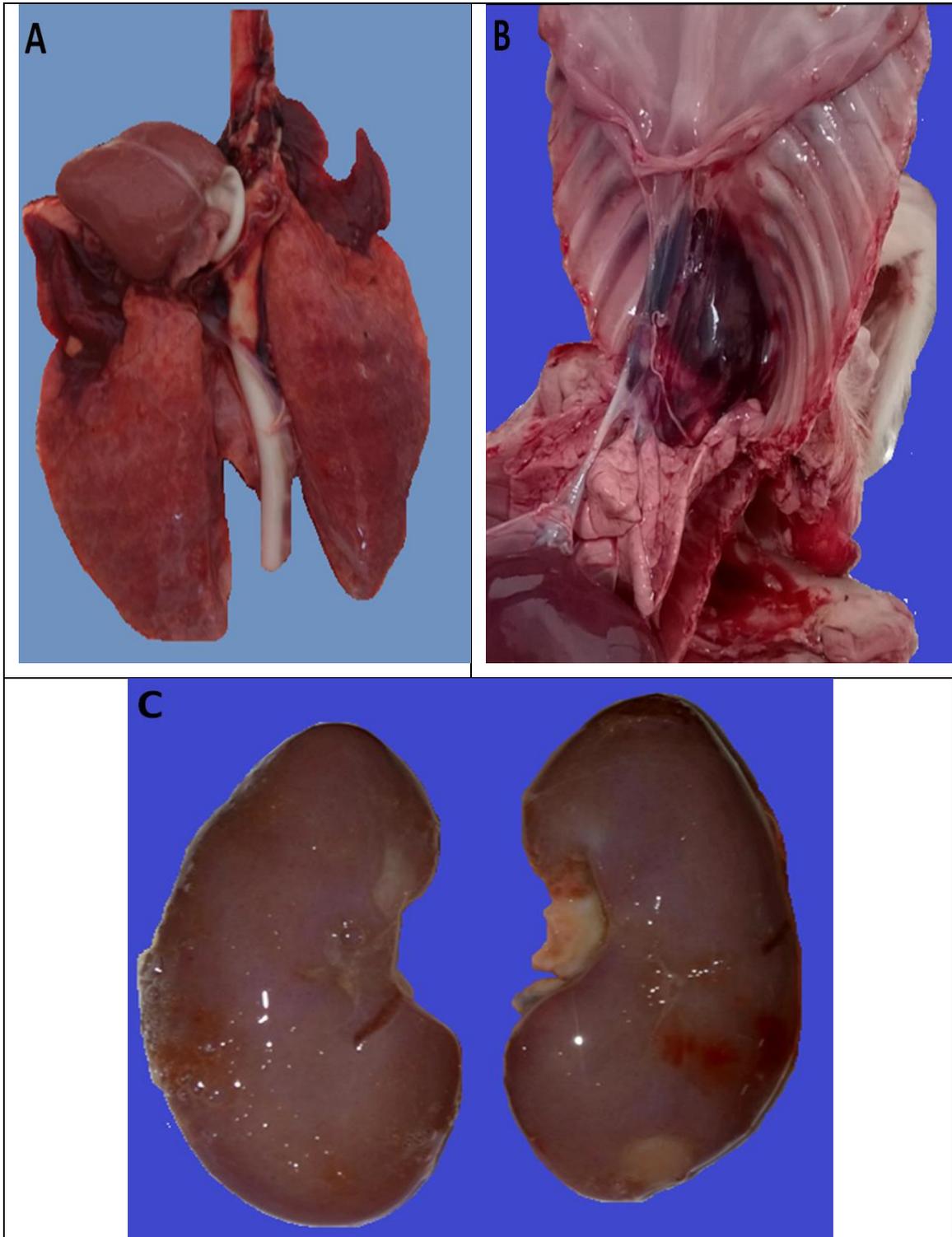
**Figura 9. Cambios morfológicos en lechones infectados con una cepa epidémica del vDEP del G1-E-EP. A) Linfadenomegalia inguinal. B) Congestión difusa en pulmones. C) Palidez y tejido friable en hígado.**



**Figura 10. Cambios morfológicos en lechones infectados con una cepa epidémica del vDEP del G2-NE-EP. A) Palidez e infartos en corazón. B) Congestión difusa en pulmones. C) Infartos y palidez en hígado y vesícula biliar con contenido color negro.**



**Figura 11. Cambios morfológicos en lechones infectados con una cepa INDEL del vDEP del G3-E-INDEL.** A) Ictericia en mucosas. B) Congestión difusa en pulmones. C) Palidez e infartos en hígado. D) Riñones cianóticos y presencia de fibrina. E) Adherencias en intestino delgado y presencia de fibrina.



**Figura 12. Cambios morfológicos en lechones infectados con una INDEL del vDEP del G4-NE-INDEL. A) Congestión difusa en pulmones. B) Adherencias en corazón y pulmones. C) Riñones fibrinosos.**

### **VII.3. Histopatología**

Los cambios histopatológicos encontrados en yeyuno de los cerdos del G1-E-EP fueron desepitelización y acortamiento de la región apical de las vellosidades yeyunales, infiltración linfocitaria en la lámina propia con presencia de eosinofilia; congestión y hemorragias en la región apical de las vellosidades, desde los 3 DPI, sin embargo a partir de los 9 DPI se observó regeneración del epitelio, aumento de ácido siálico en células caliciformes, eosinofilia e infiltración linfocitaria en la región apical de las vellosidades yeyunales (figura 13).

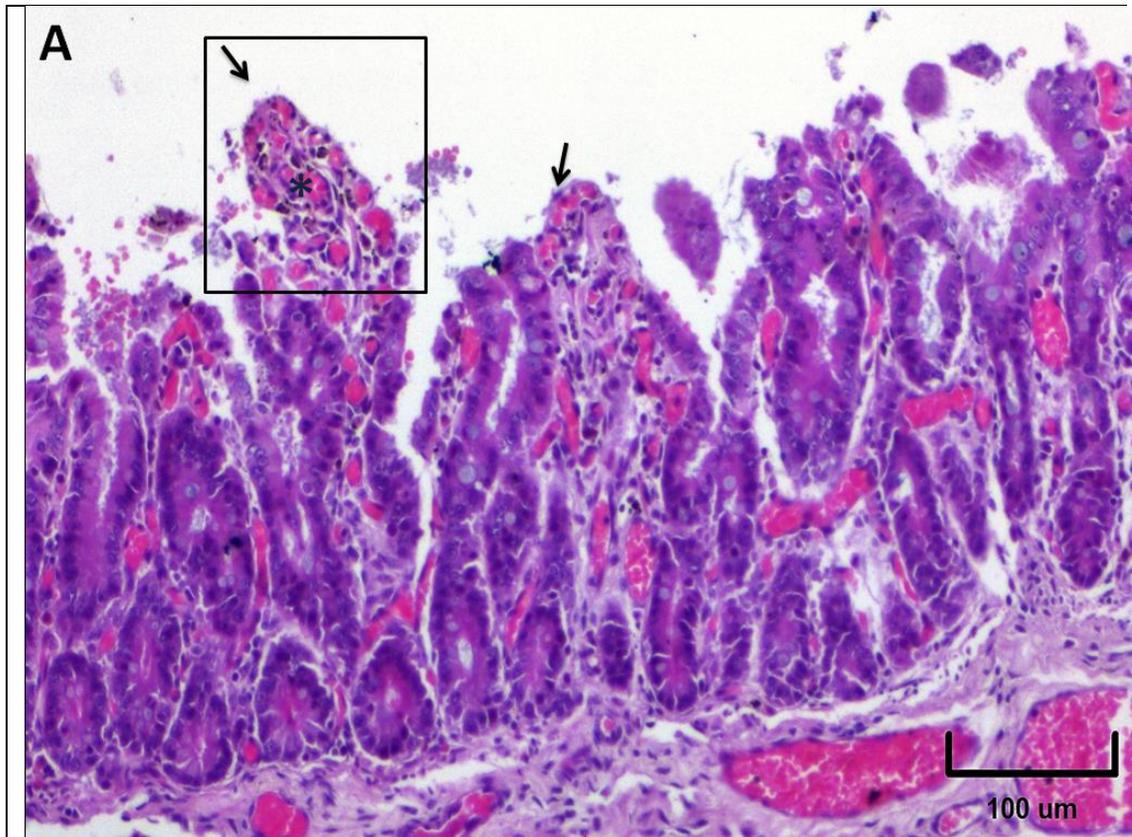
Además, en los sistemas respiratorio, urinario y linfático los cerdos de este mismo grupo presentaron degeneración leve difusa y hepatitis linfocítica leve multifocal (7/12, 58.3%), neumonía intersticial linfocítica leve difusa (6/12, 50%), esofagitis supurativa y erosiva severa difusa (2/12, 16.6%), linfonodos inguinales, mesentéricos y mediastínicos con abundantes hemosiderófagos (7/12, 58.3%), tonsilitis erosiva leve (1/12, 8.3%), enteritis linfoplasmocítica leve difusa en colon (5/12, 41.6%) y nefritis supurativa severa focal con nefrocalcinosis (1/12, 8.3%) (figuras 14 y 15).

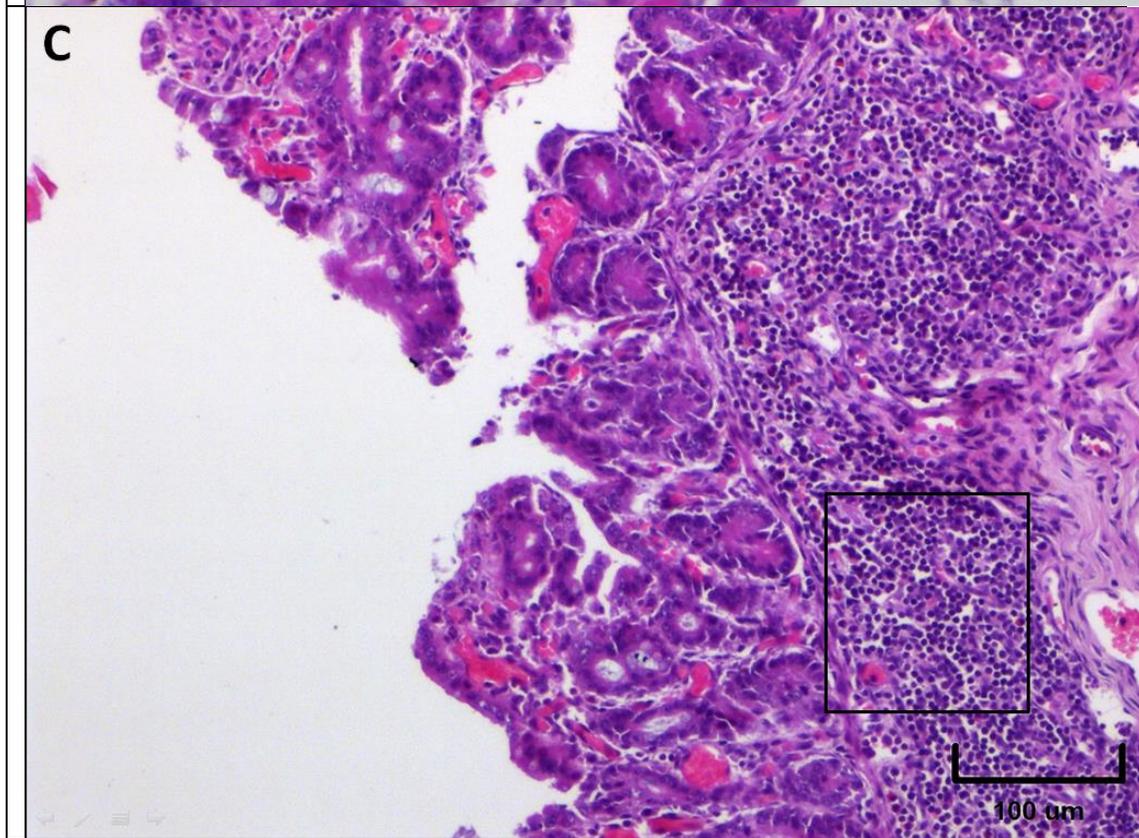
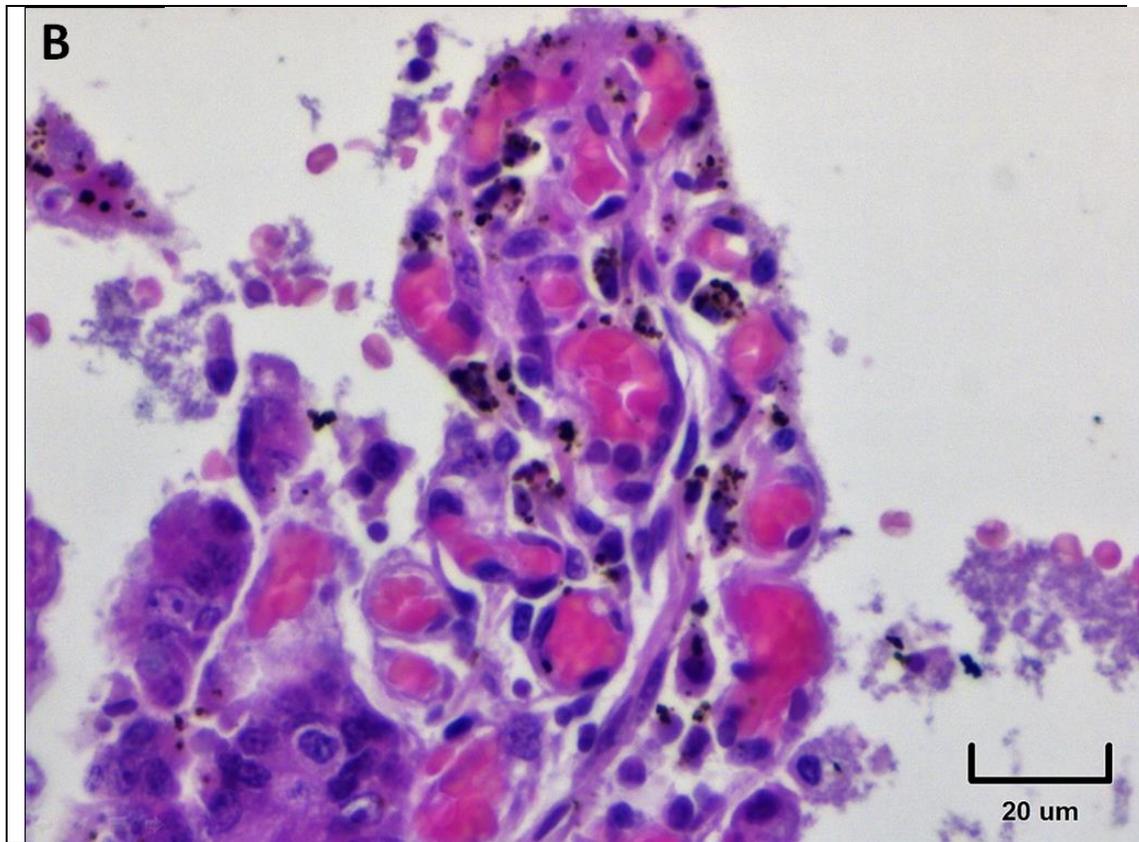
Las lesiones identificadas en los cerdos del G2-NE-EP fueron desepitelización de la región apical de las vellosidades yeyunales, congestión difusa y hemorragias, presencia de sincitios de 9 hasta más de 30 núcleos, infiltración linfocitaria en la lámina propia y aumento de ácido siálico en células caliciformes de los 3 hasta los 9 DPI que duró el experimento (figura 16); neumonía intersticial leve difusa (5/12, 41.6%), degeneración y congestión hepática leve difusa y hepatitis linfocítica leve multifocal (5/12, 41.6%), hígado con hemosiderina (1/12, 8.3%), enteritis linfocítica leve en colon (7/12, 58.3%), esplenocntracción y pulpa blanca despoblada (1/12, 8.3%) y linfonodos con abundantes hemosiderófagos (6/12, 50%) (figura 17).

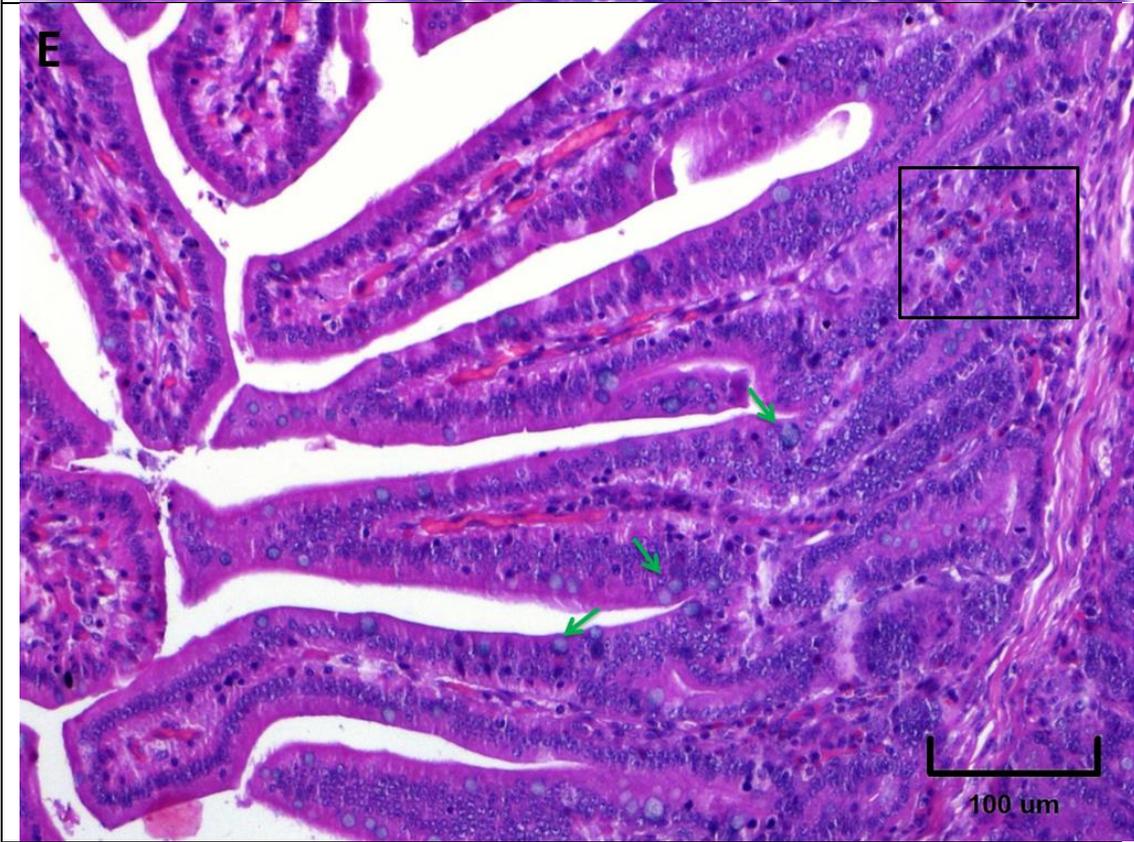
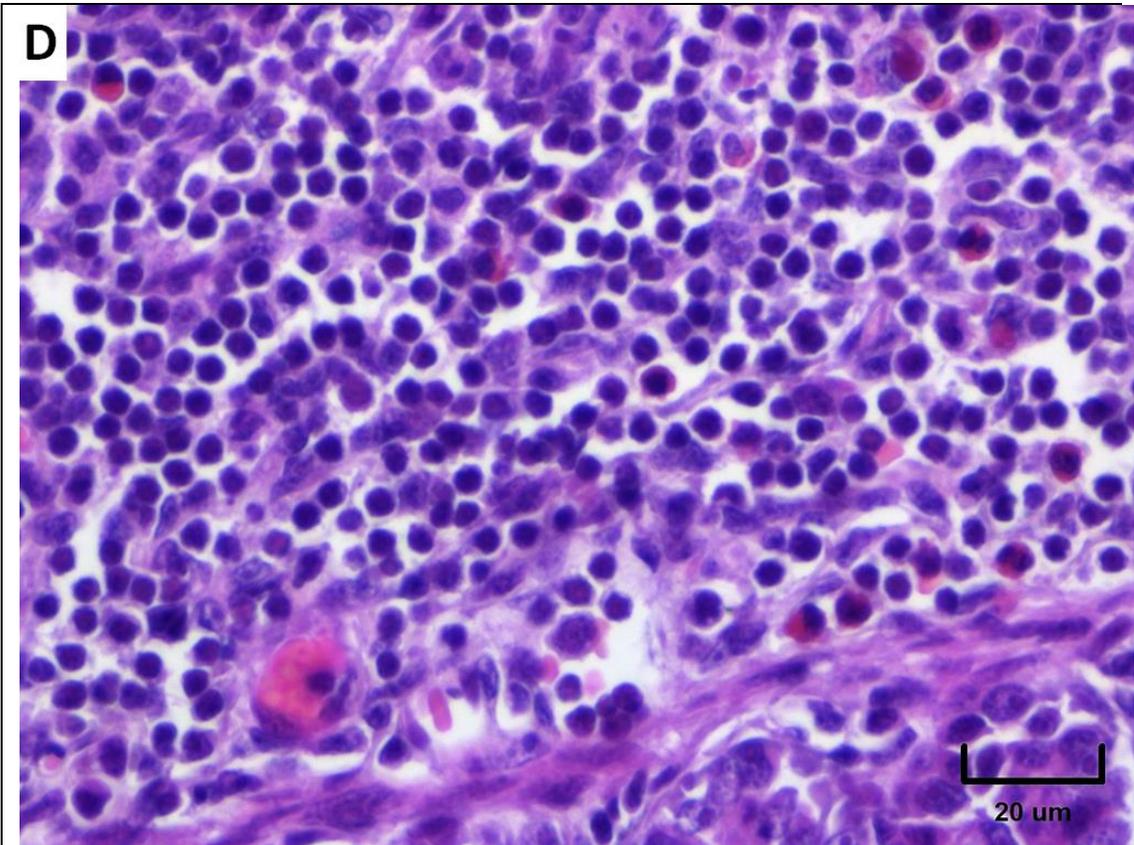
En el análisis histopatológico de yeyuno de los cerdos del G3-E-INDEL mostró desepitelización y necrosis de la región apical de las vellosidades, sin embargo, se observó eosinofilia e infiltración linfocitaria desde la lámina propia hasta la región apical y regeneración de células epiteliales desde los 3 DPI hasta

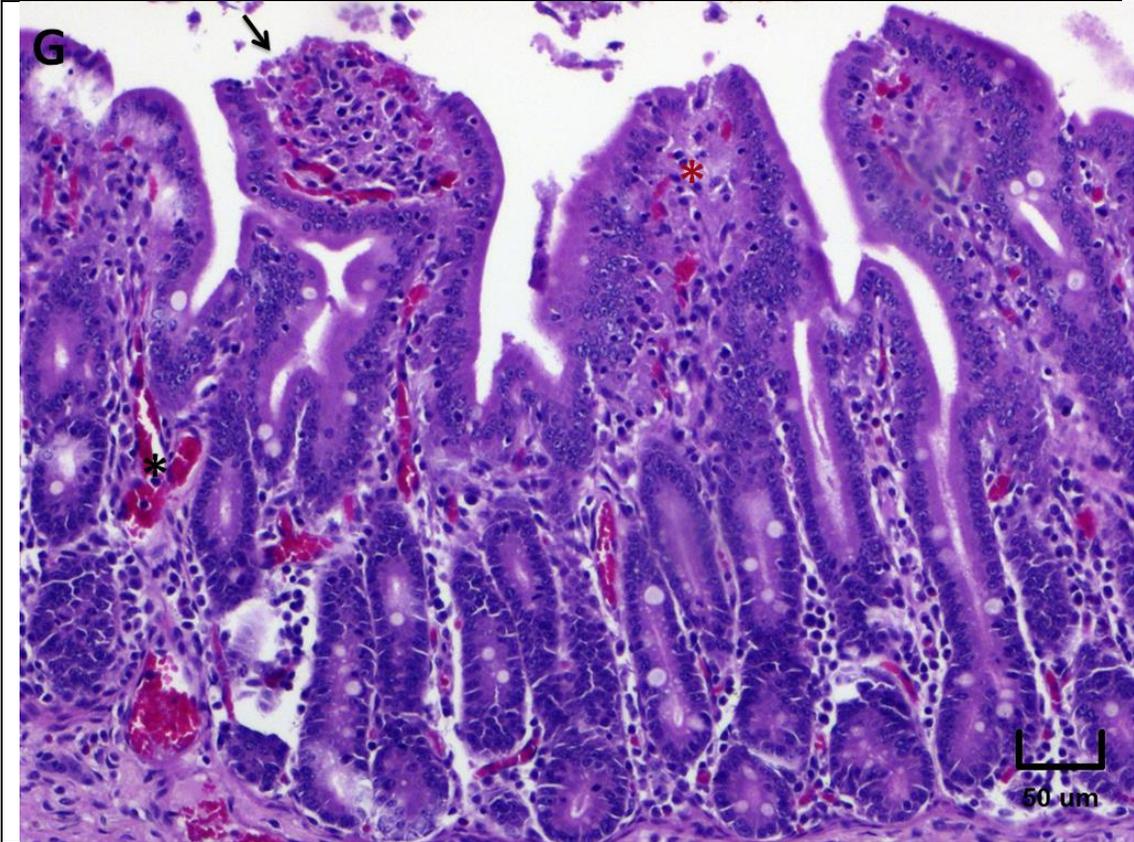
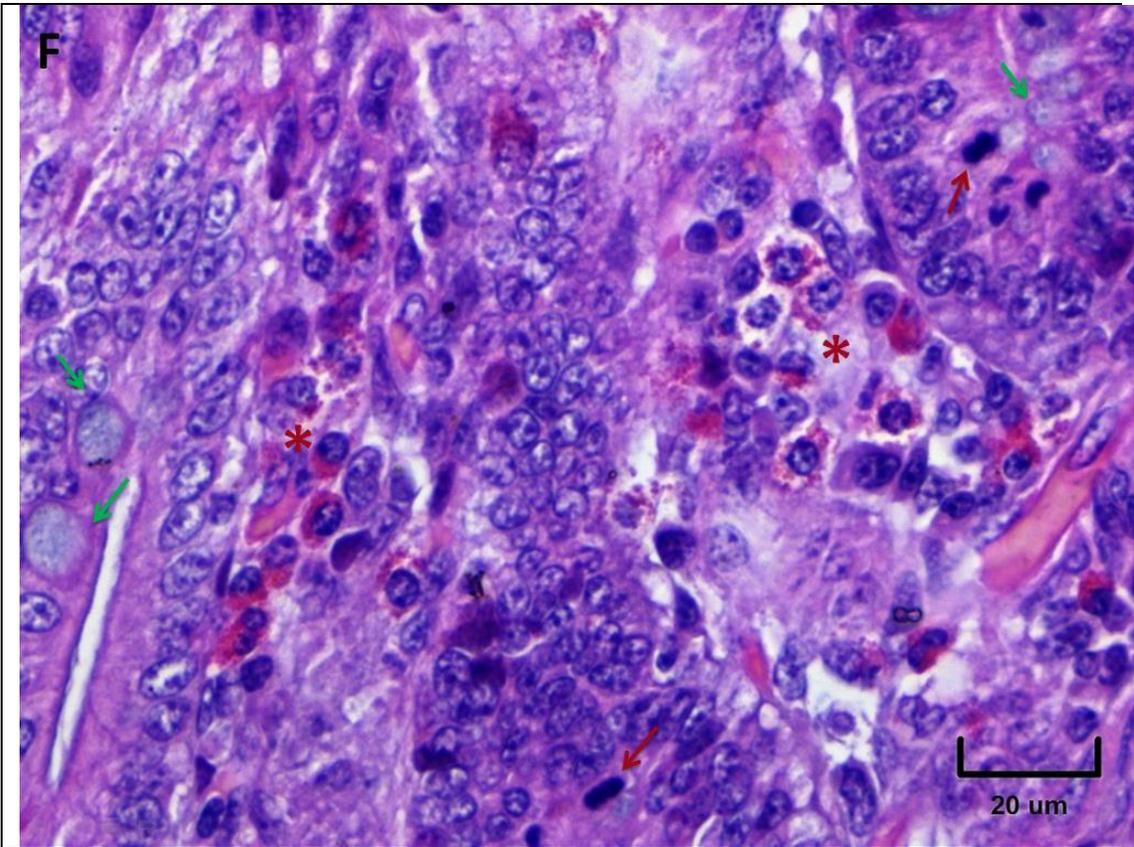
los 12 DPI; además de presencia de sincitios de más de 30 núcleos en la región apical de las vellosidades a los 6 DPI (figura 18).

Los cerdos del G4-NE-INDEL en el análisis histopatológico presentaron acortamiento de vellosidades yeyunales con infiltración linfocitaria desde los 3 DPI, sin embargo, presentaron recambio de las células epiteliales a los 9 DPI (figura 19).

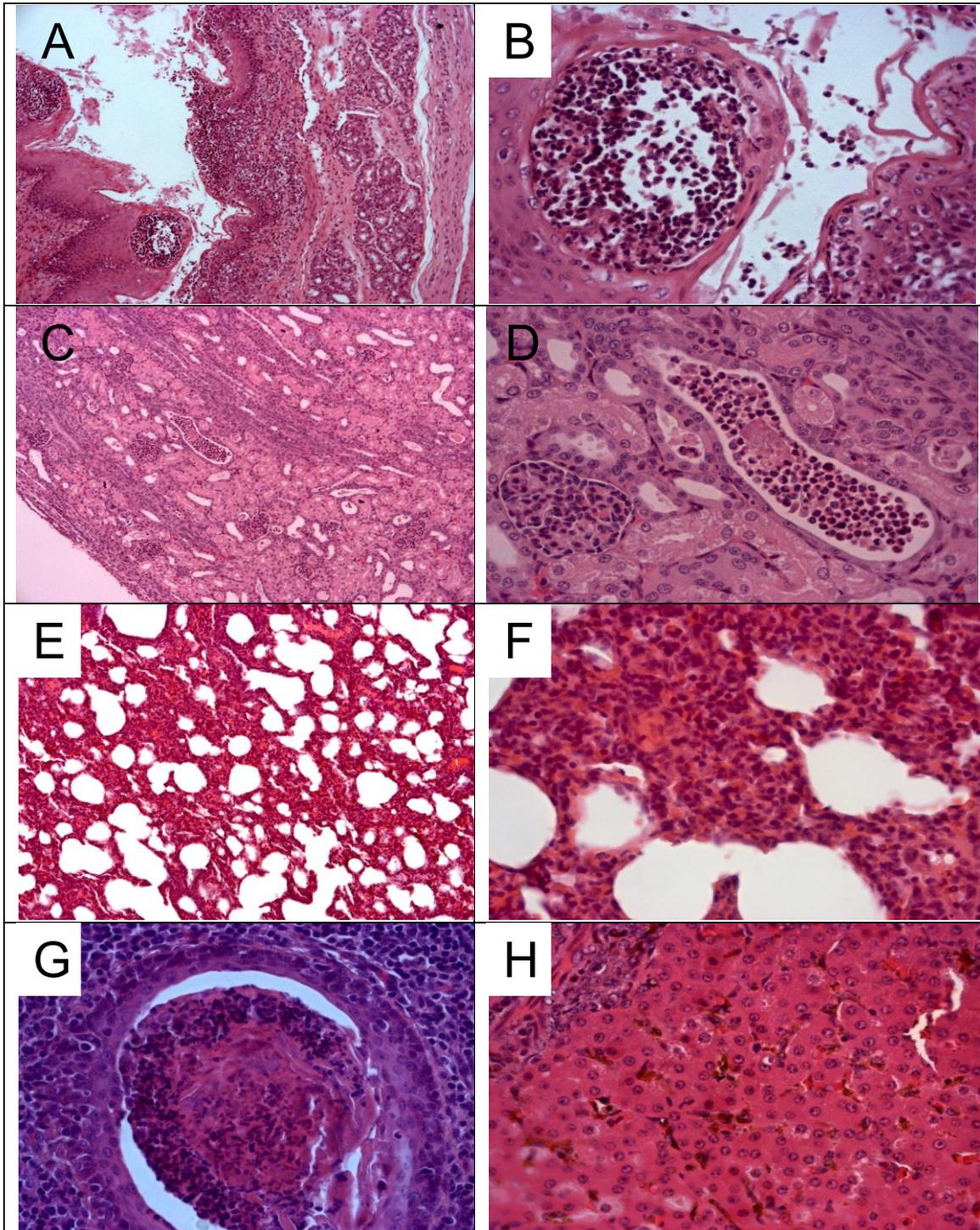




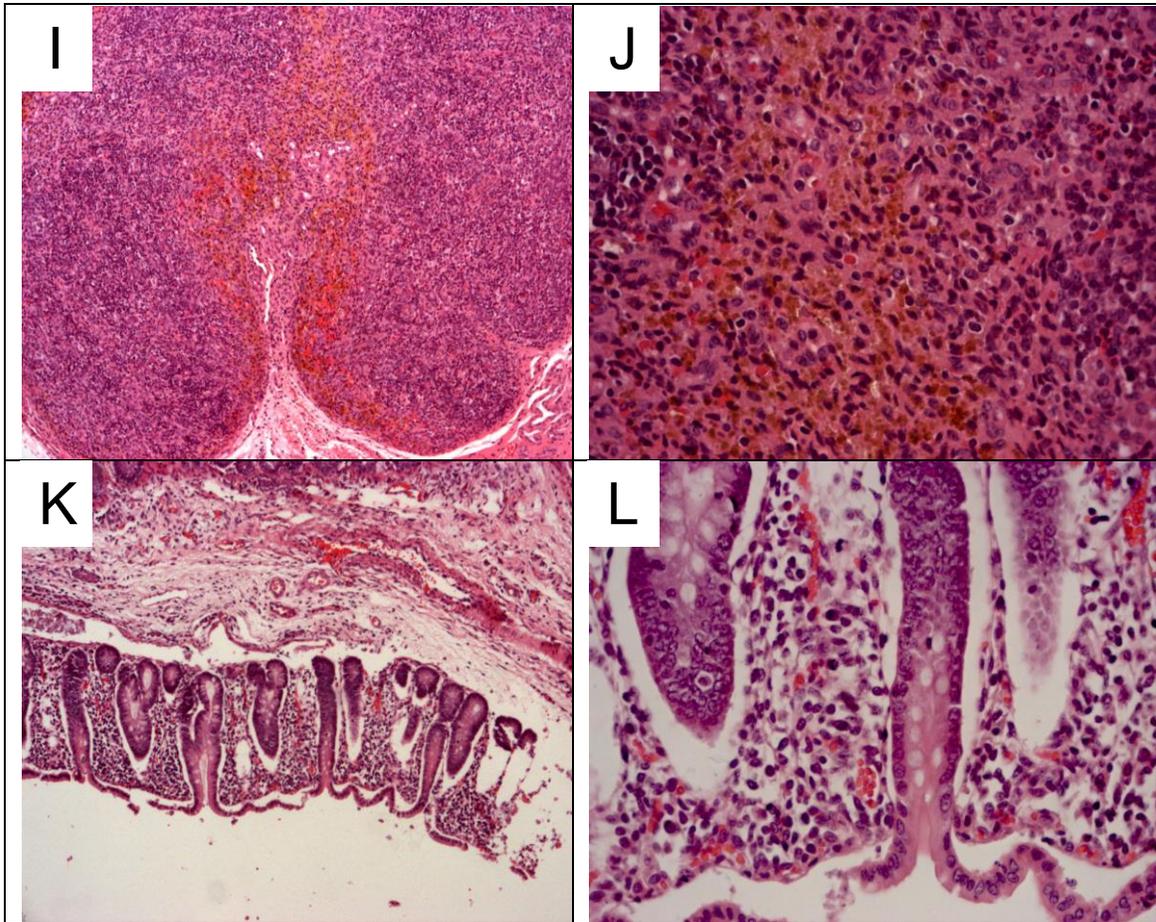




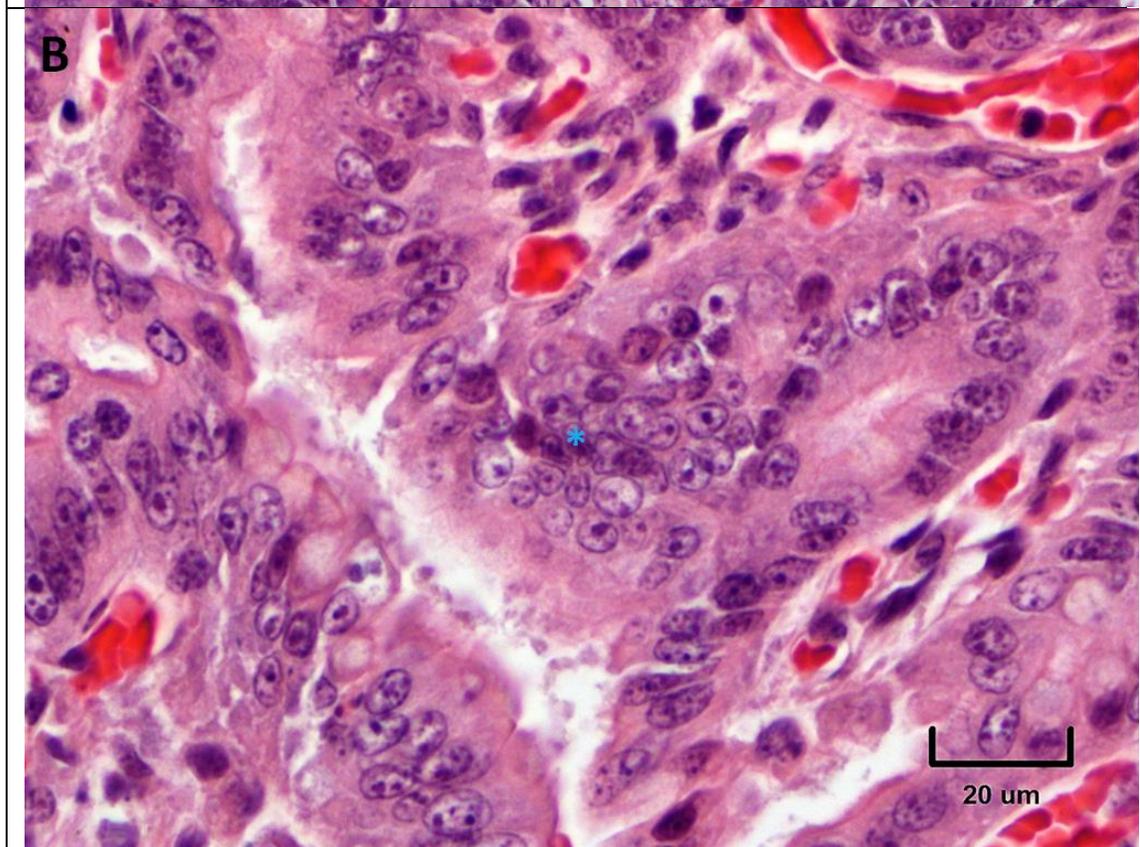
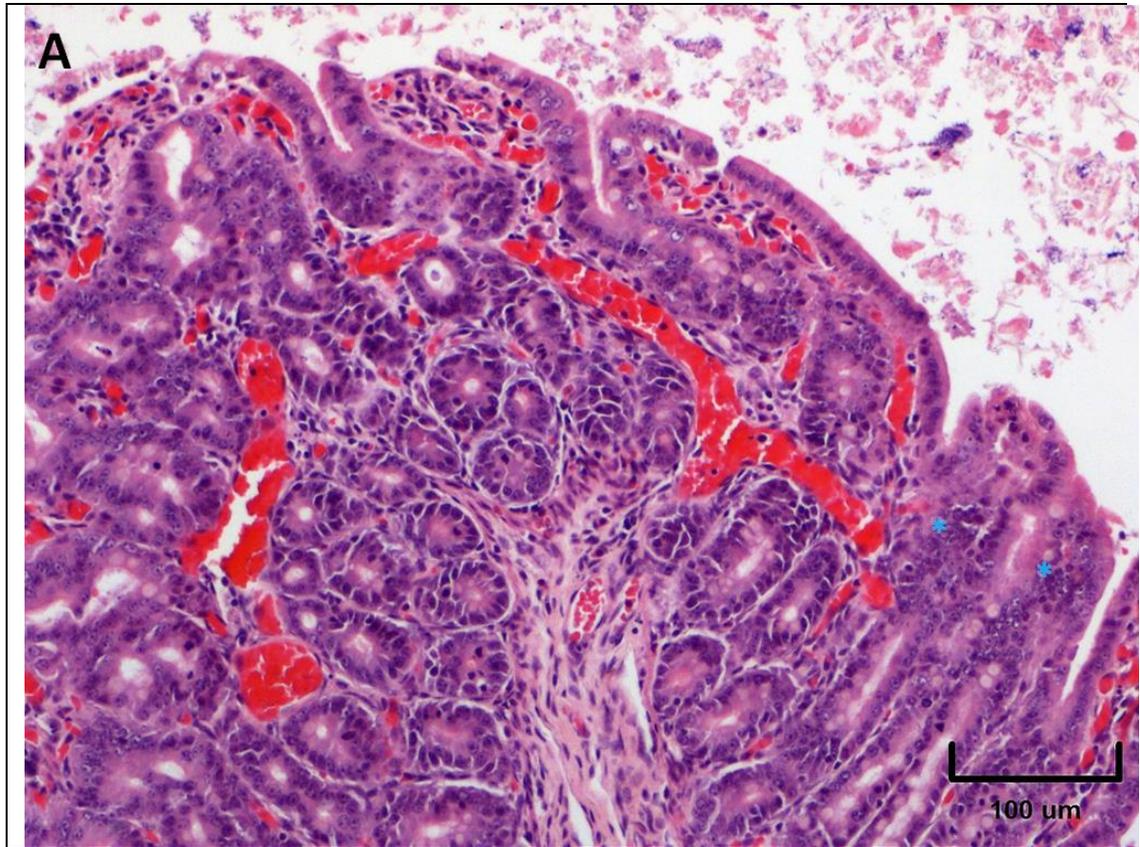
**Figura 13. Histopatología de yeyuno de lechones infectados con vDEP del G1-E-EP.** Se puede observar desepitelización (flechas negras), congestión y hemorragias (asterisco negro) en la región apical de las vellosidades yeyunales (A-B, 3 DPI), infiltración linfocitaria en la lámina propia, (C-D, 3 DPI), eosinofilia (asterisco rojo), basofilia de la teca de las células caliciformes, lo que sugiere un aumento de cargas negativas probablemente asociado a mucinas ricas en ácido siálico (flecha verde) y presencia de numerosas células mitóticas (flecha roja) (E-F, 6 DPI). A los 12 DPI siguieron presentes los hallazgos mencionados, aunque en menor extensión o con menor magnitud (G).

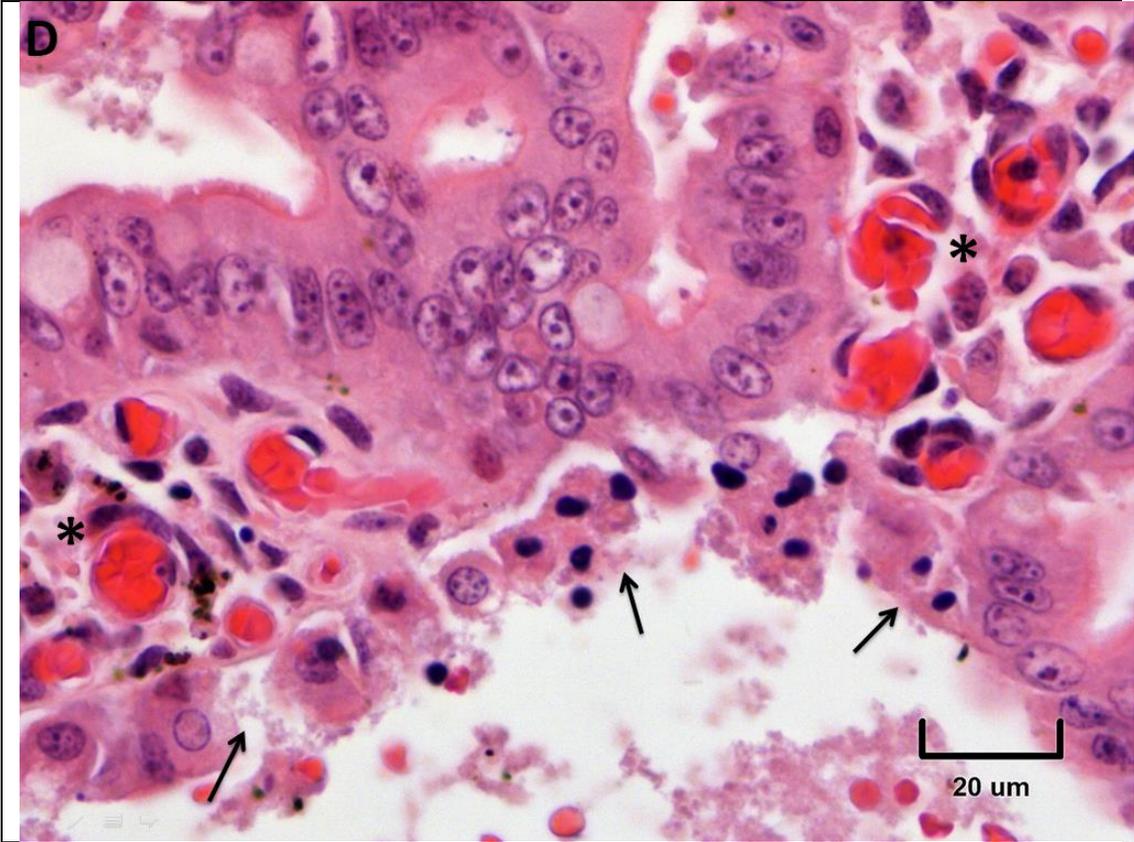
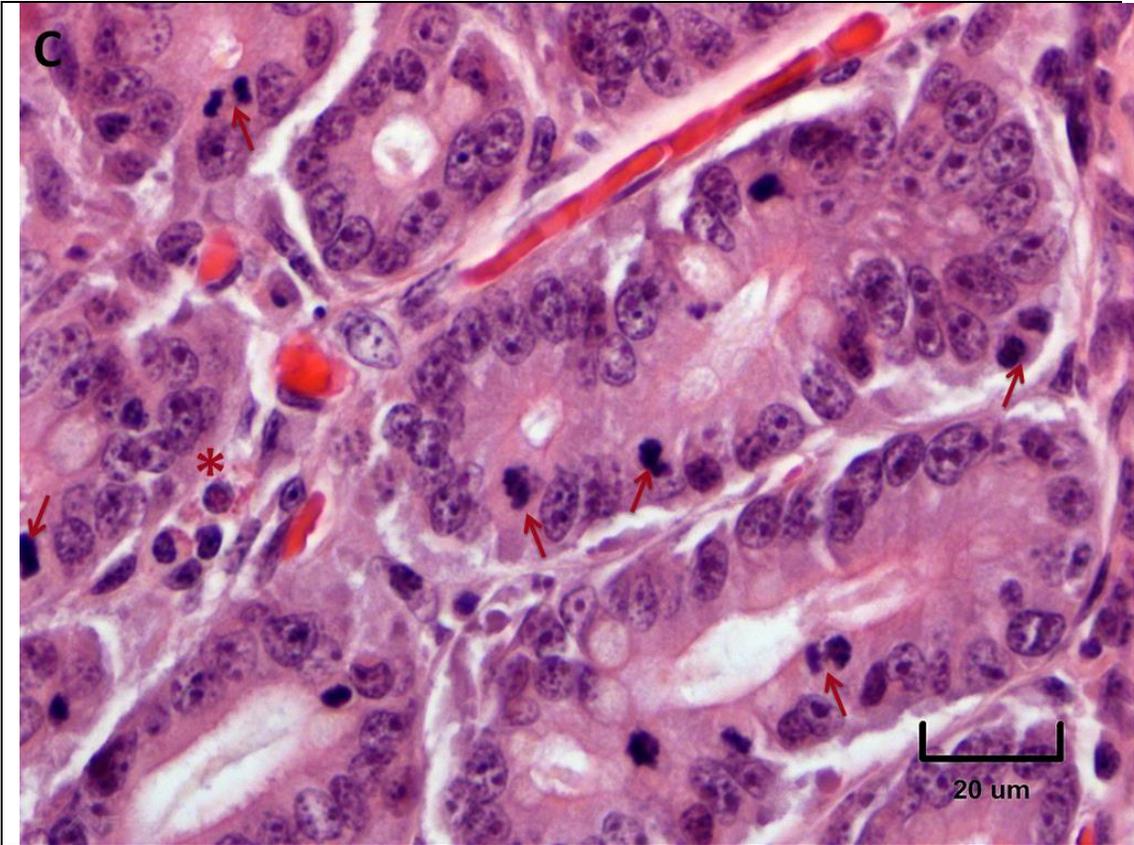


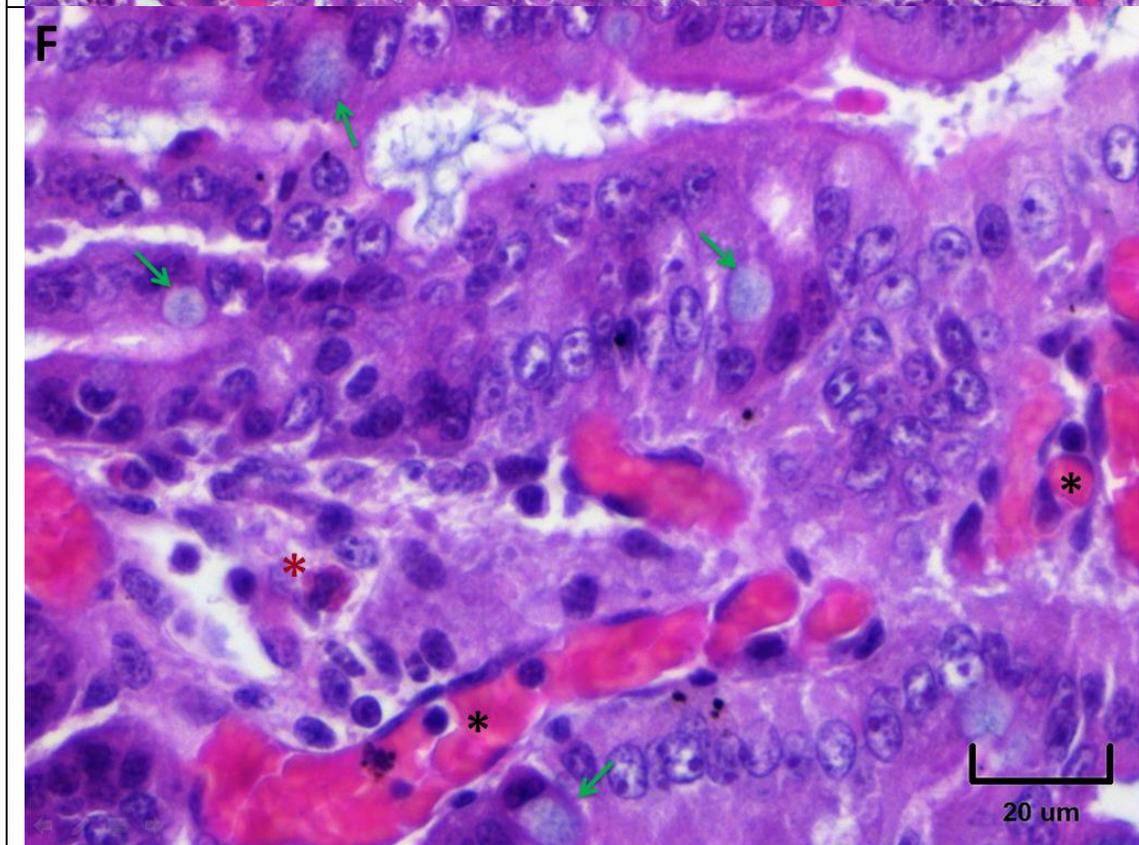
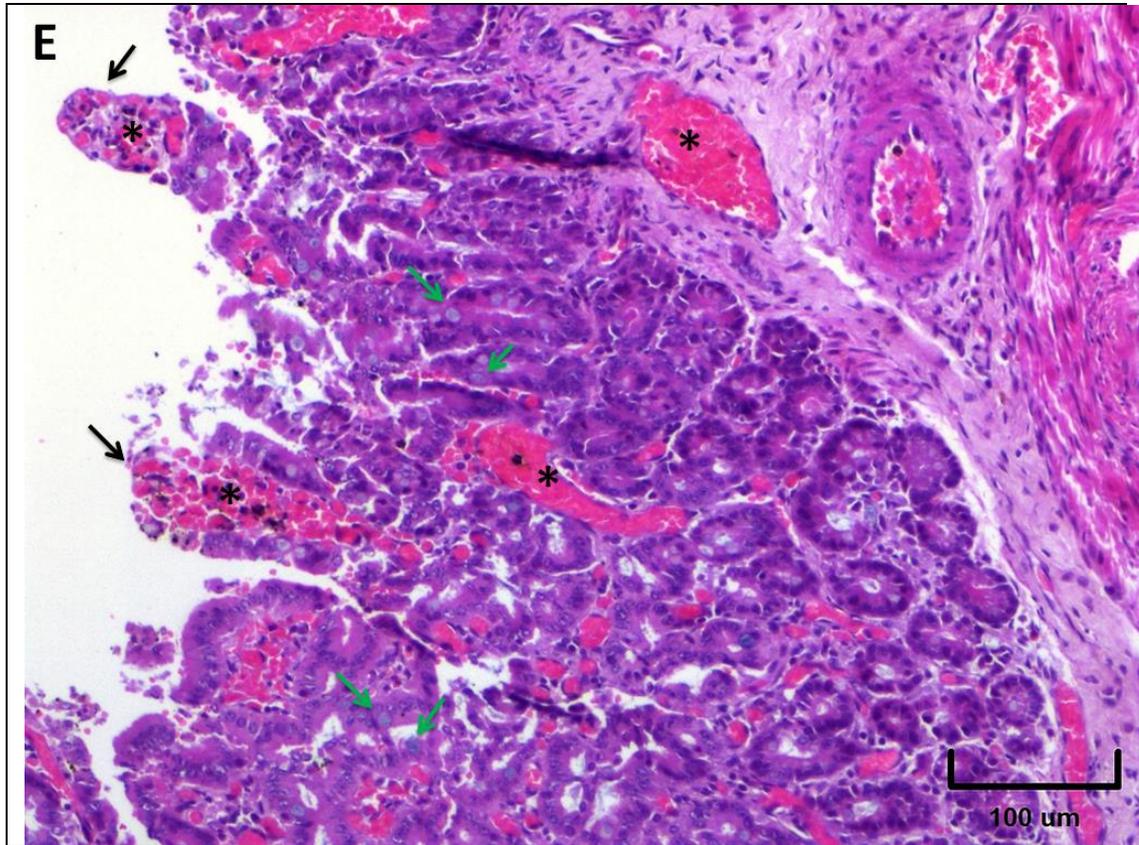
**Figura 14. Histopatología de órganos de lechones infectados con vDEP del G1-E-EP, Parte 1.** A-B) Esofagitis ulcerativa (3 DPI). C-D) Nefritis supurativa, severa, multifocal 3 DPI). E-F) Pulmón que muestran neumonía intersticial difusa moderada (3 DPI). G) Tonsilitis erosiva supurativa, leve, multifocal (3 DPI). H) Hígado con hemosiderina y hemosiderófagos o colestasis (3 DPI).



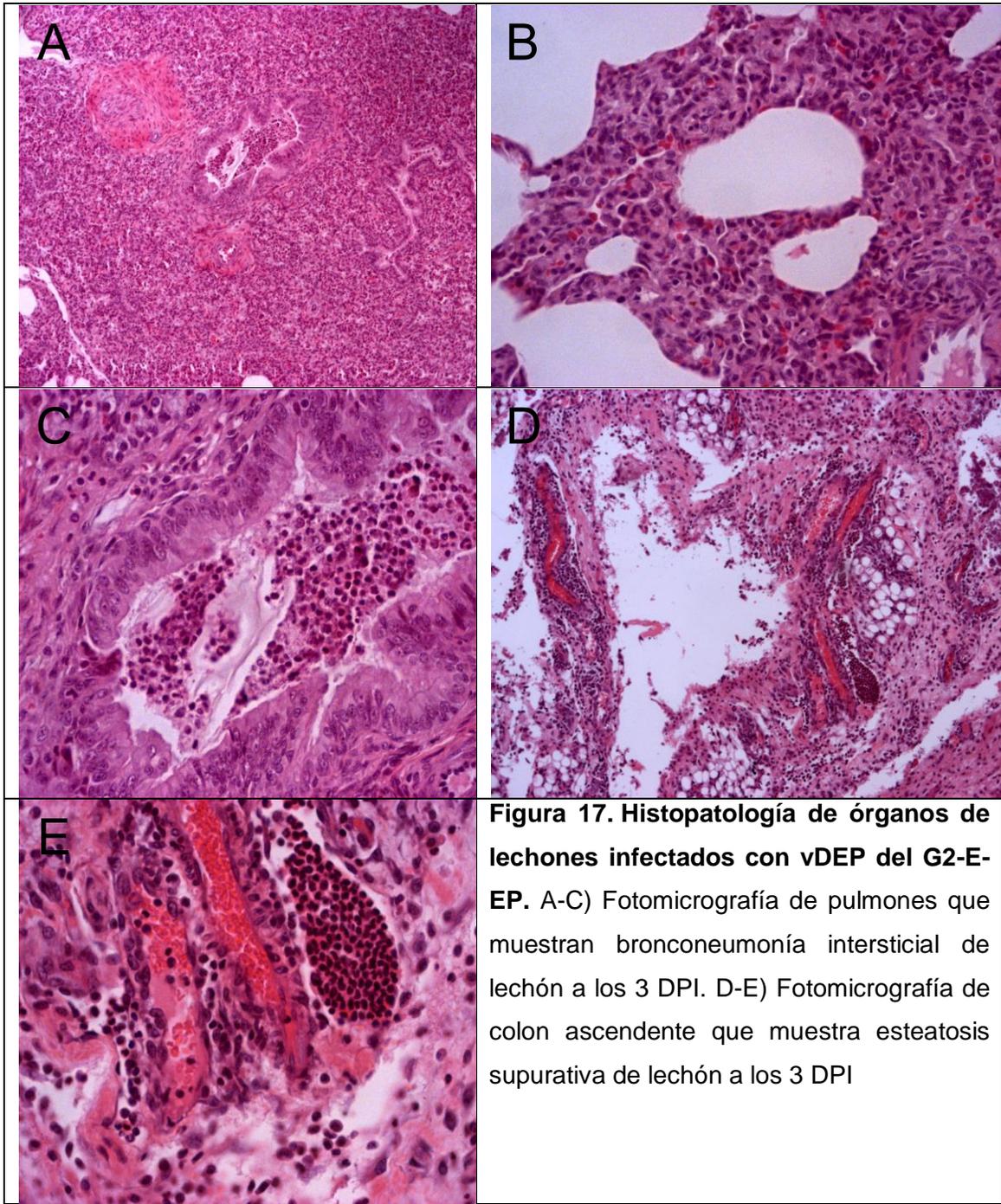
**Figura 15: Histopatología de órganos de lechones infectados con vDEP del G1-E-EP, Parte 2. I-J) Linfonodo (3 DPI) que muestra hemosiderina. K) Colitis linfoplasmocítica moderada difusa. (9 DPI).**



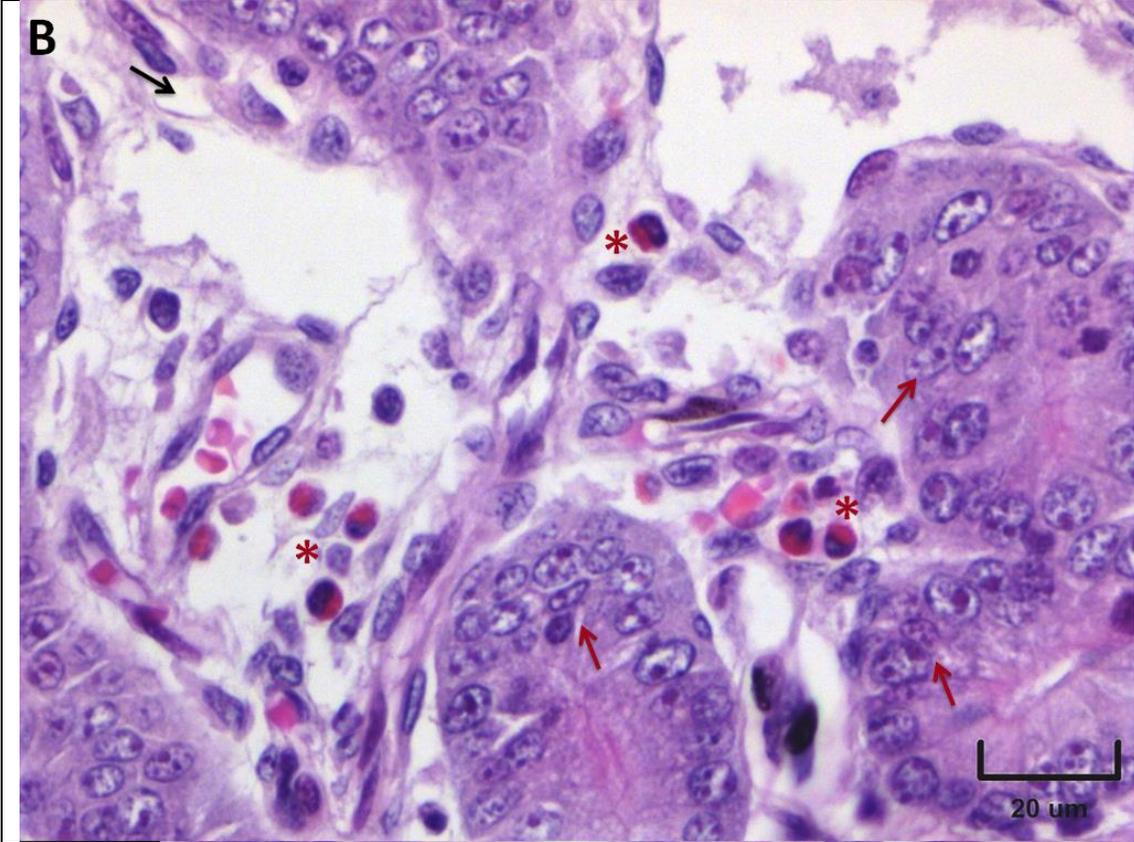
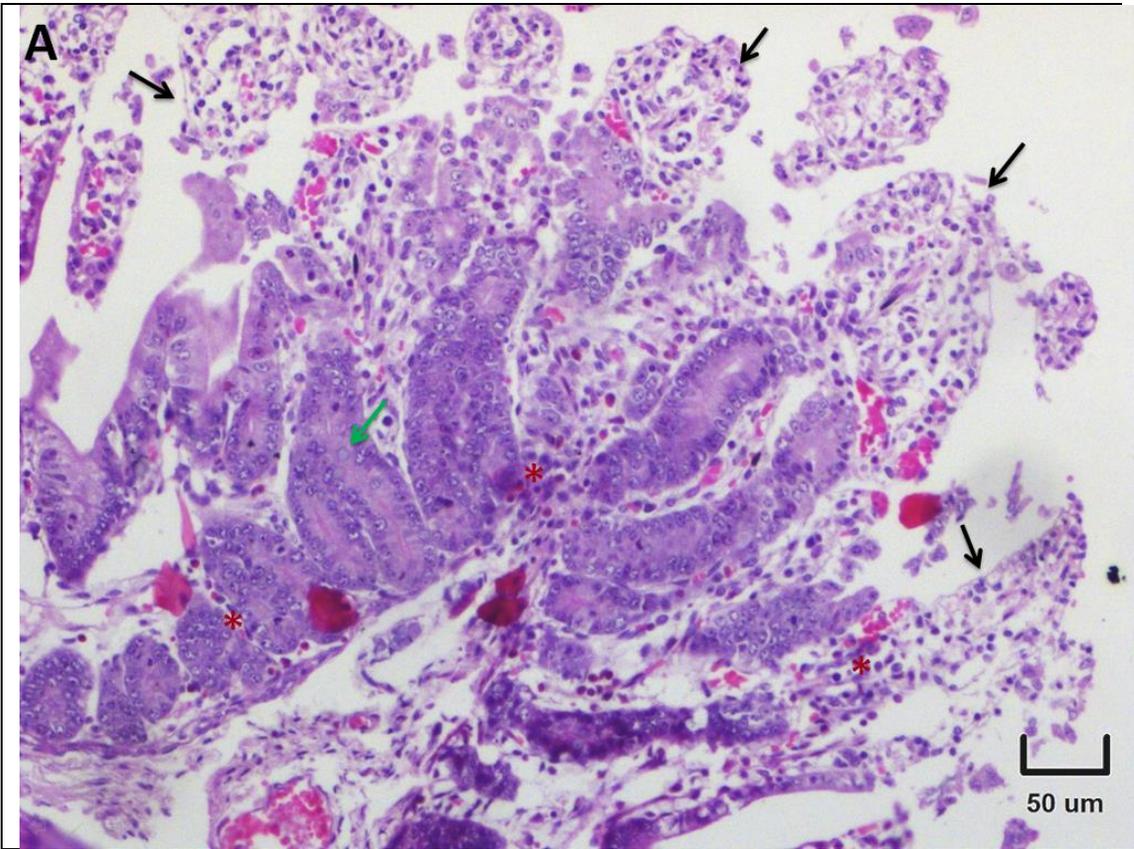


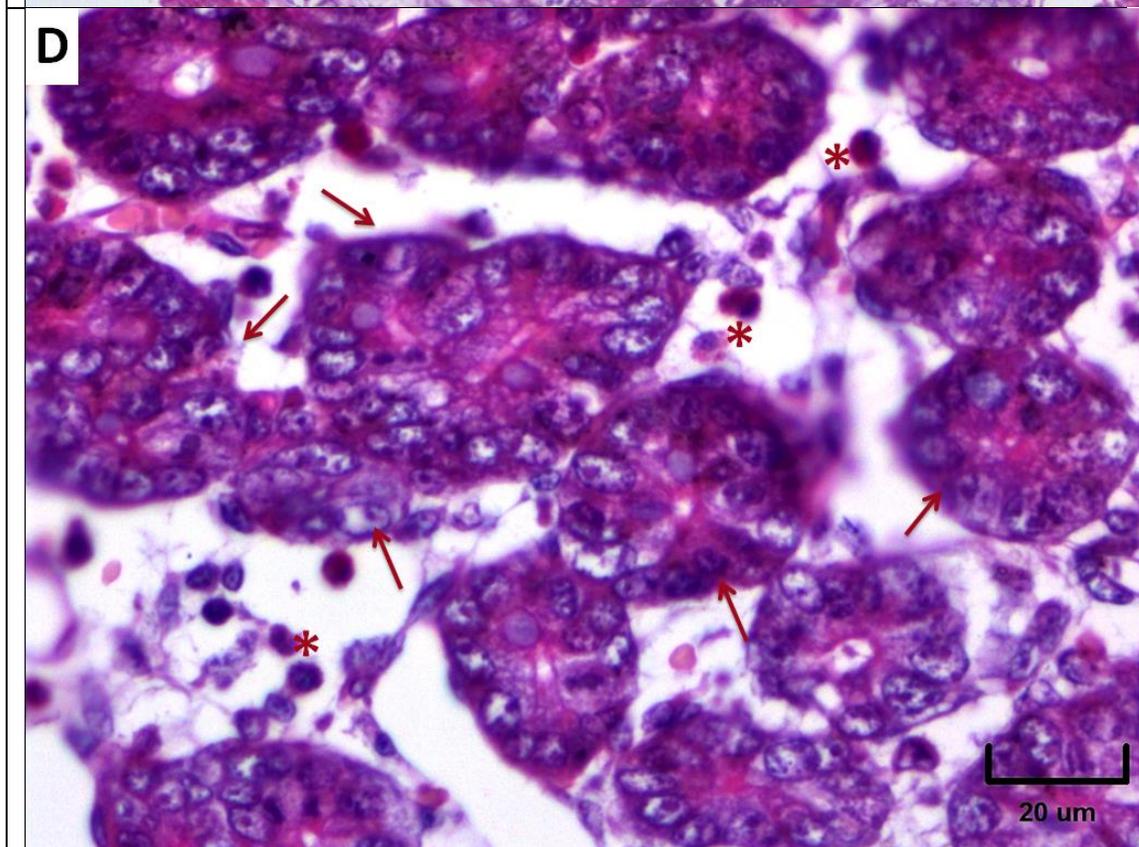
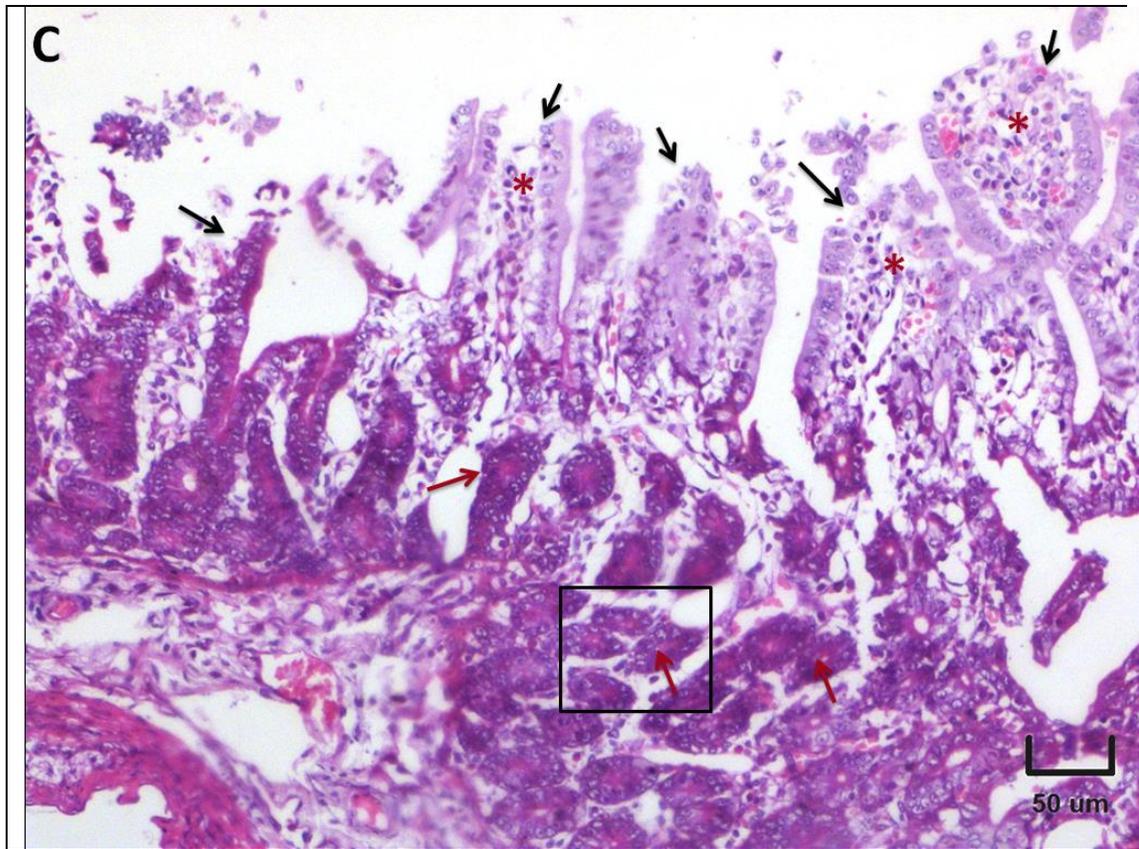


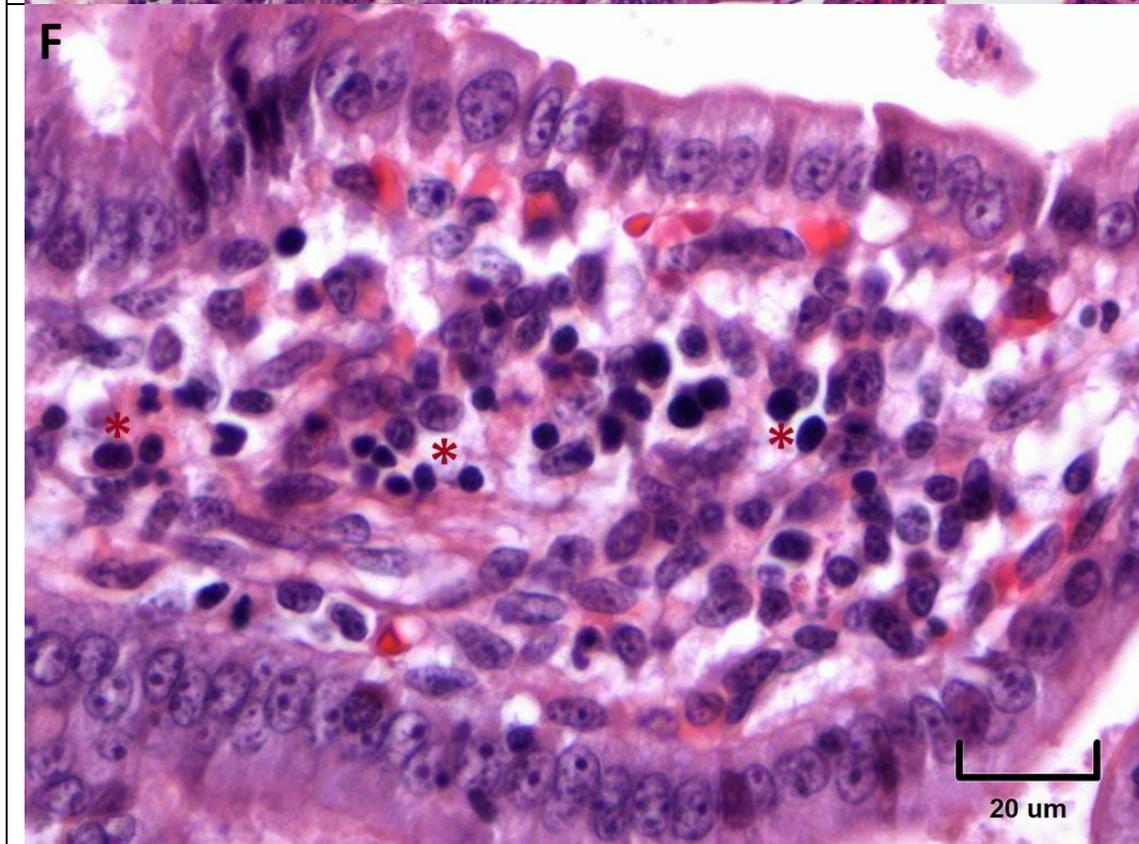
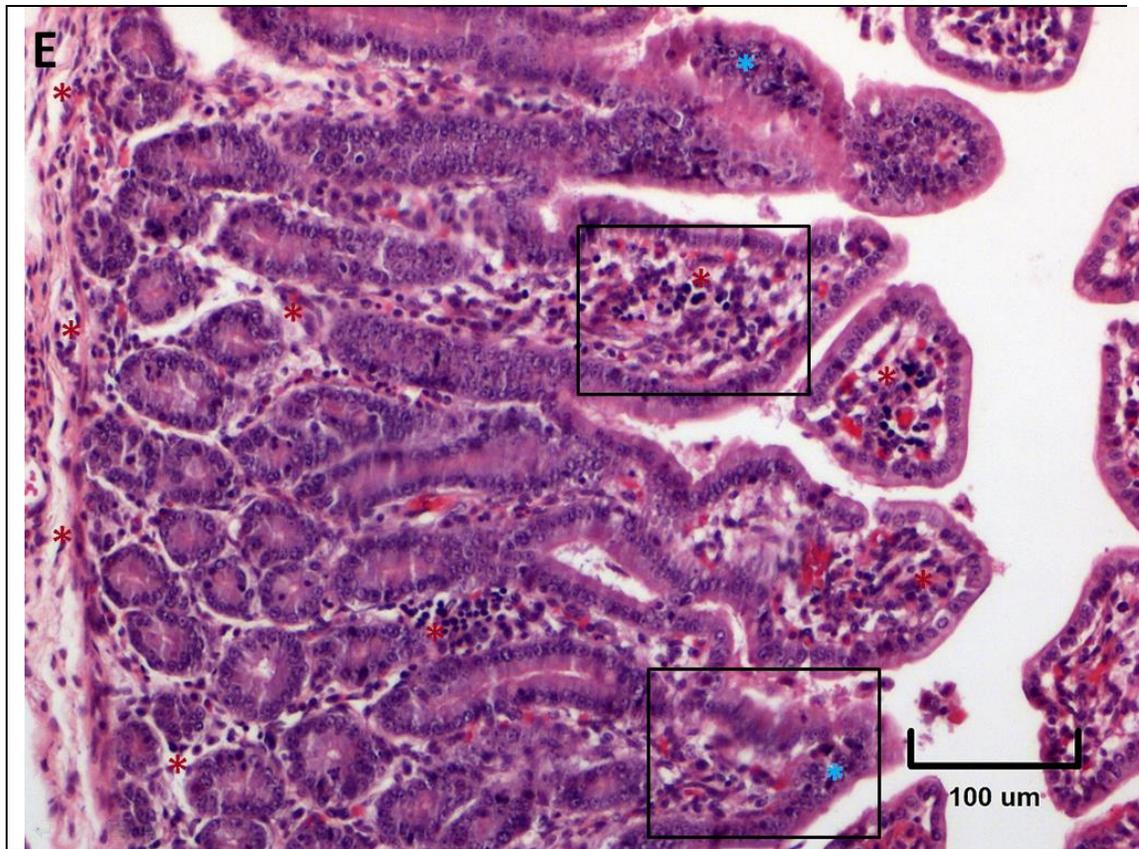
**Figura 16: Histopatología de yeyuno de lechones infectados con vDEP del G2-NE-EP.** Se puede observar la presencia de sincitios de más de 30 núcleos (A-B, asterisco azul, 3 DPI), infiltración linfocitaria y eosinofilia en la lámina propia de vellosidades, principalmente, aunque también en menor grado en la lámina propia periglandular (asterisco rojo) y presencia de numerosas células mitóticas (flecha roja) (C, 3 DPI), desepitelización y células epiteliales picnóticas (cuerpos apoptóticos) (flechas negras), congestión y hemorragias en la región apical de las vellosidades yeyunales (asterisco negro) (D, 3 DPI), aumento de ácido siálico de las células caliciformes (E-F, flecha verde, 6 DPI).



**Figura 17. Histopatología de órganos de lechones infectados con vDEP del G2-E-EP. A-C) Fotomicrografía de pulmones que muestran bronconeumonía intersticial de lechón a los 3 DPI. D-E) Fotomicrografía de colon ascendente que muestra esteatosis supurativa de lechón a los 3 DPI**

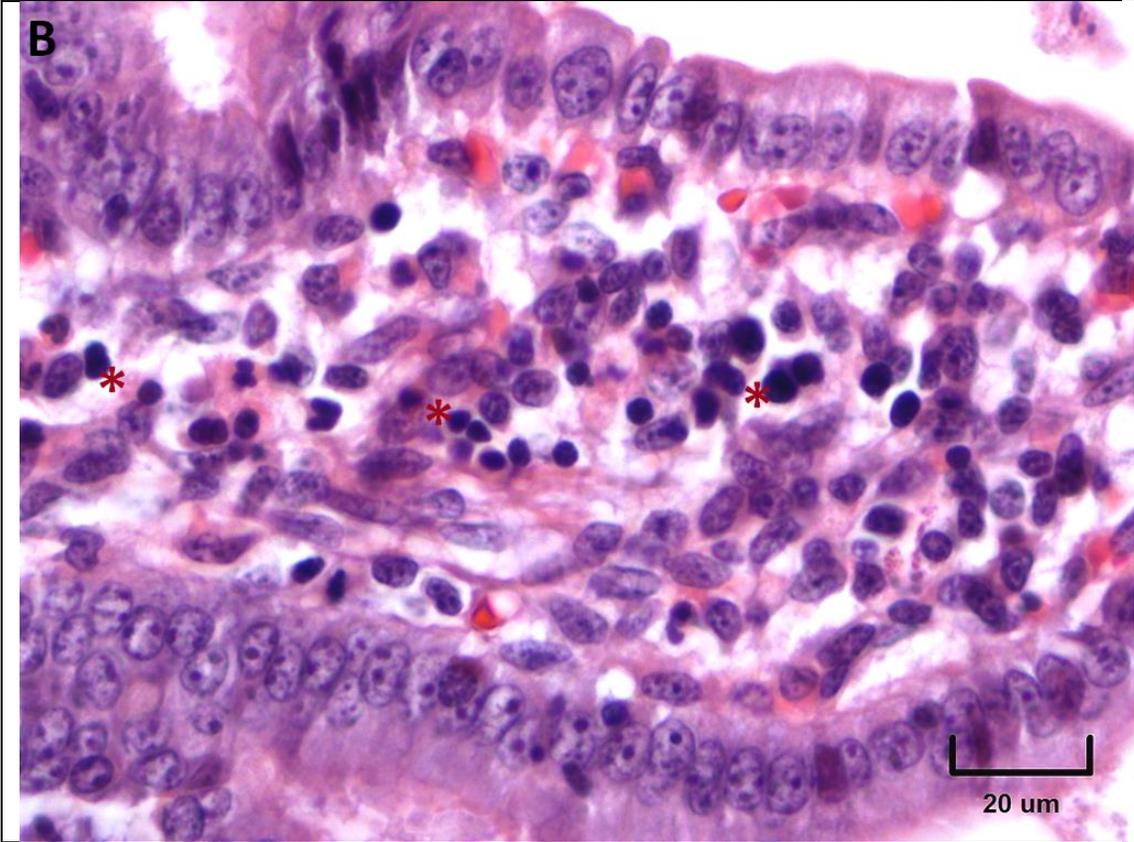


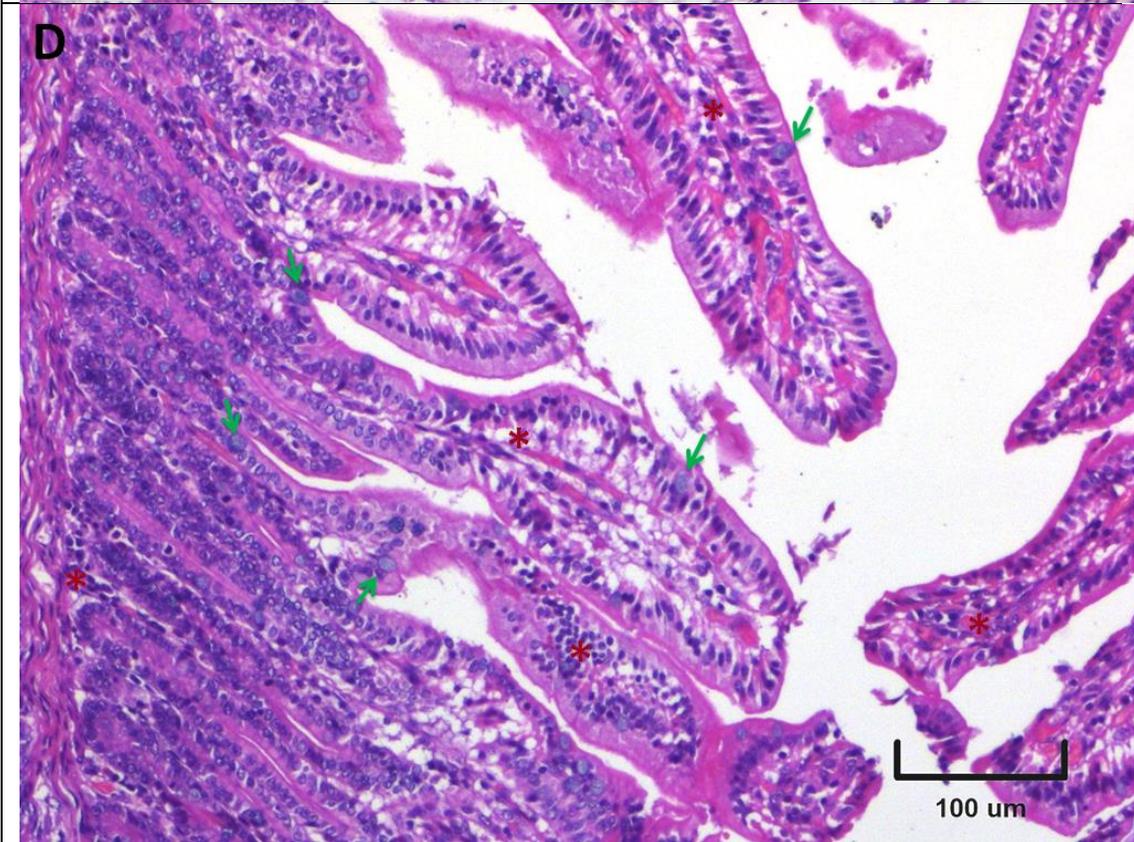
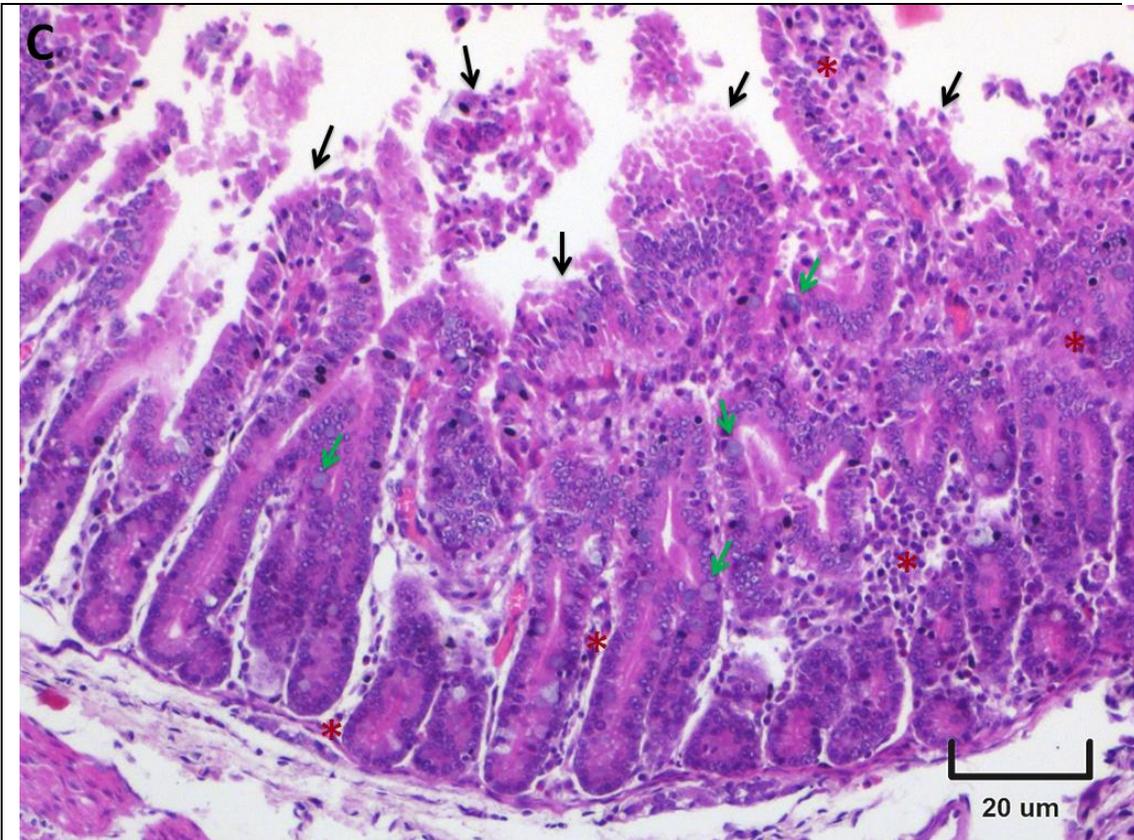






**Figura 18. Histopatología de yeyuno de lechones infectados con vDEP del G3-E-INDEL.** Se muestra desepitelización de la región apical de las vellosidades yeyunales (flecha negra), eosinofilia (asterisco rojo) y basofilia de las células caliciformes (flecha verde) (A-D 3 DPI, G, 9 DPI), aumento del recambio celular desde las glándulas intestinales (flecha roja) (B-D, 3 DPI), acortamiento de vellosidades yeyunales e infiltración linfocitaria con eosinofilia (asterisco rojo) y presencia de sincitios de más de 30 núcleos (asterisco azul) (E-G, 6 a 9 DPI).

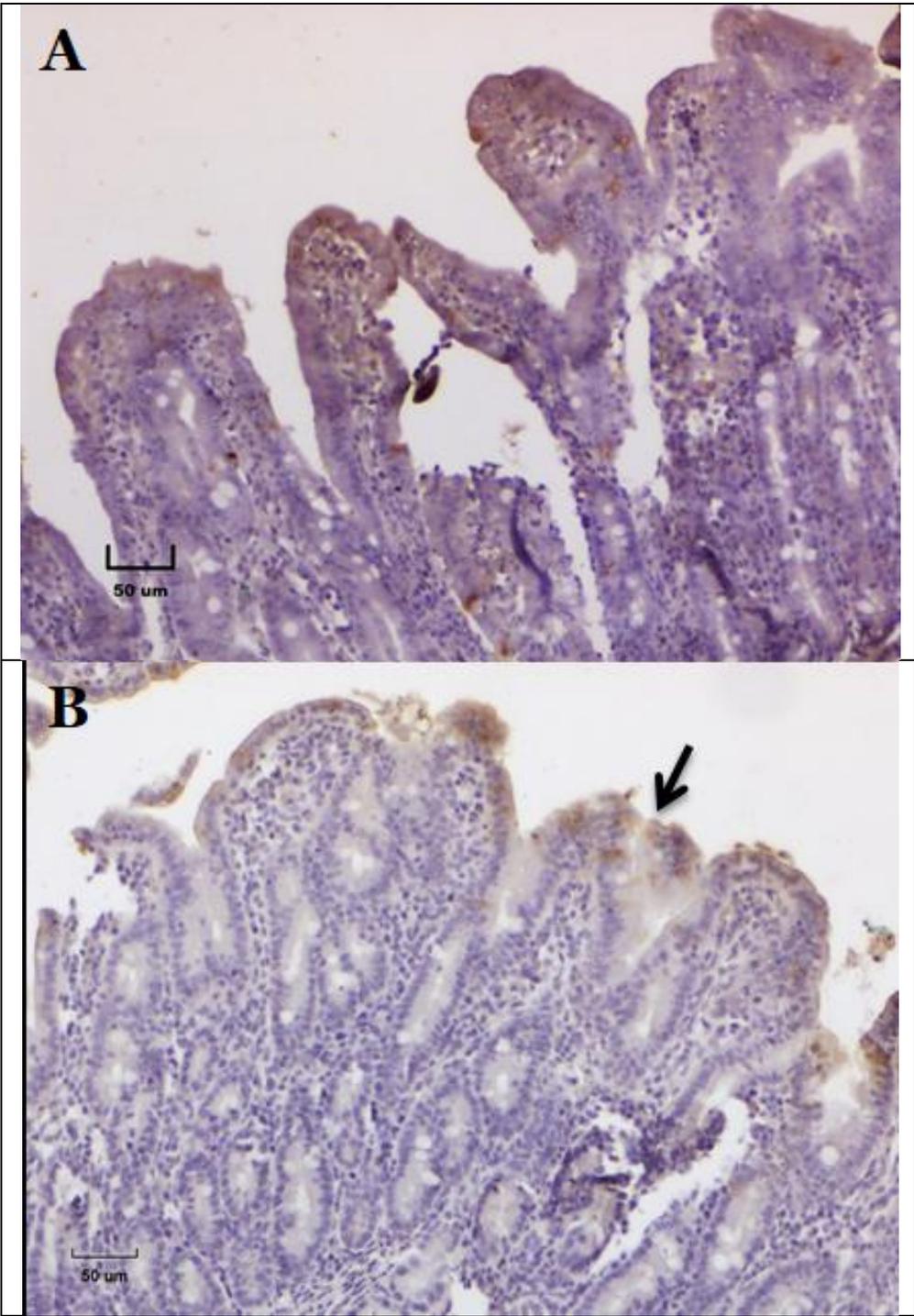


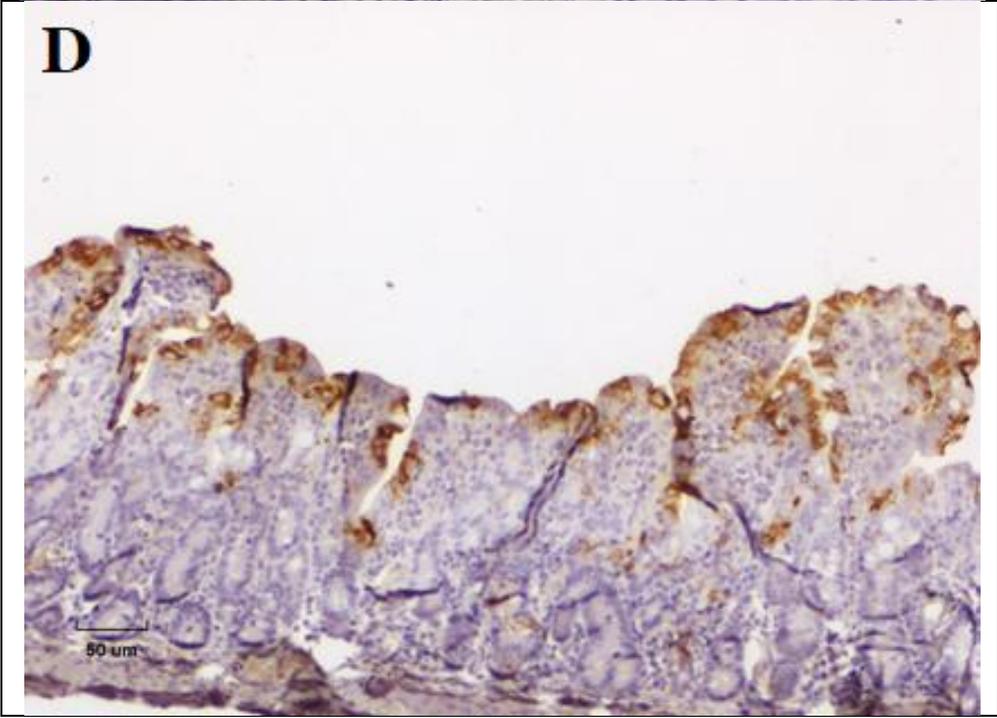
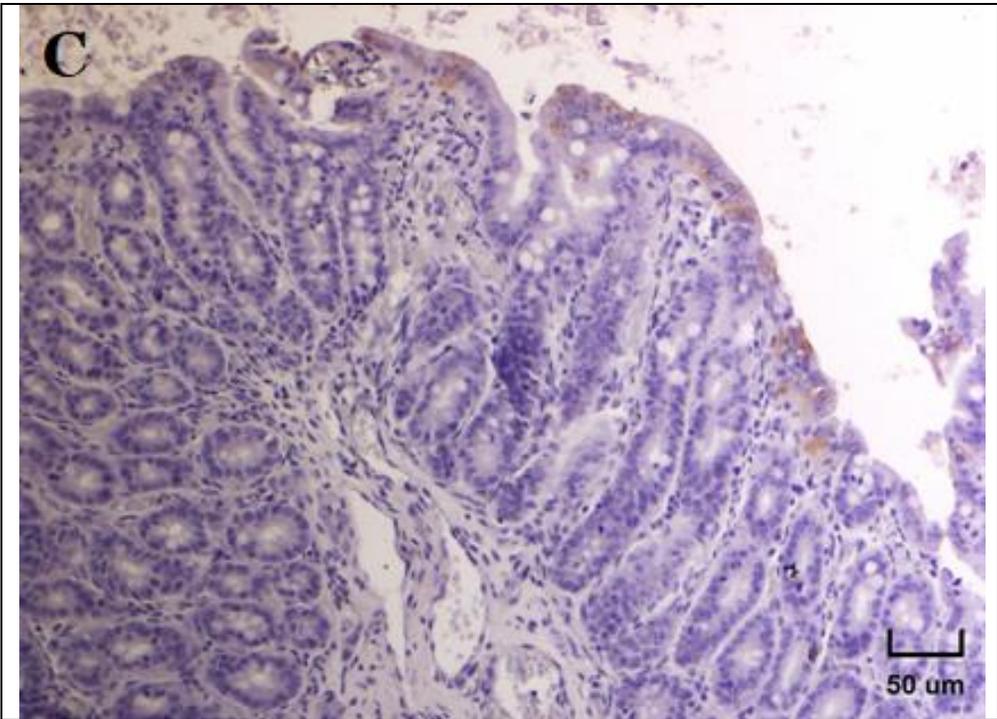


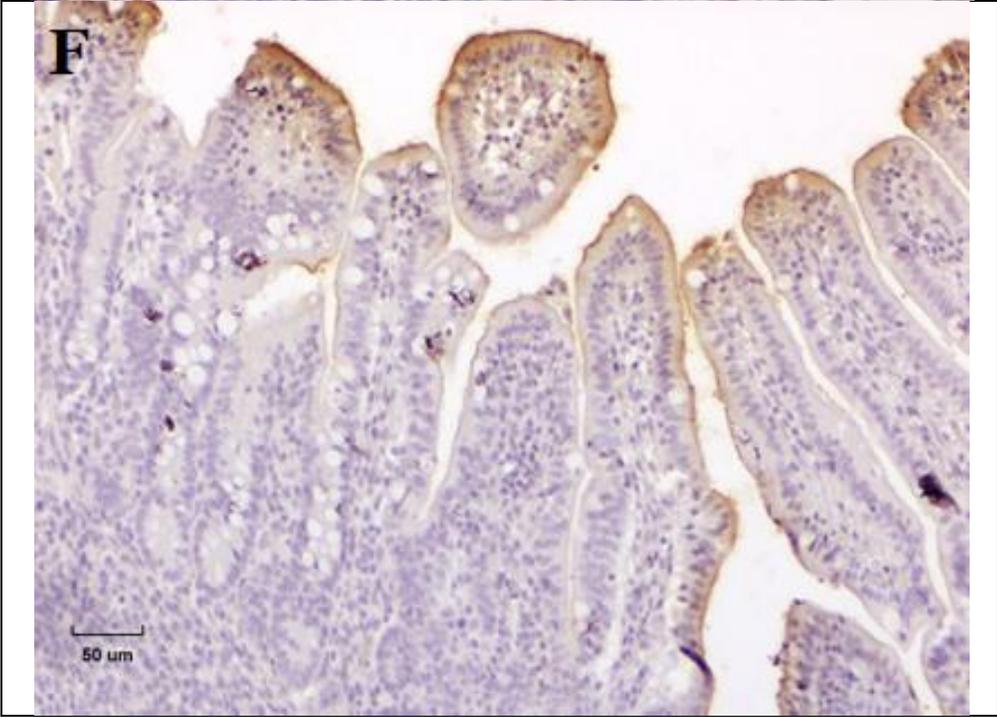
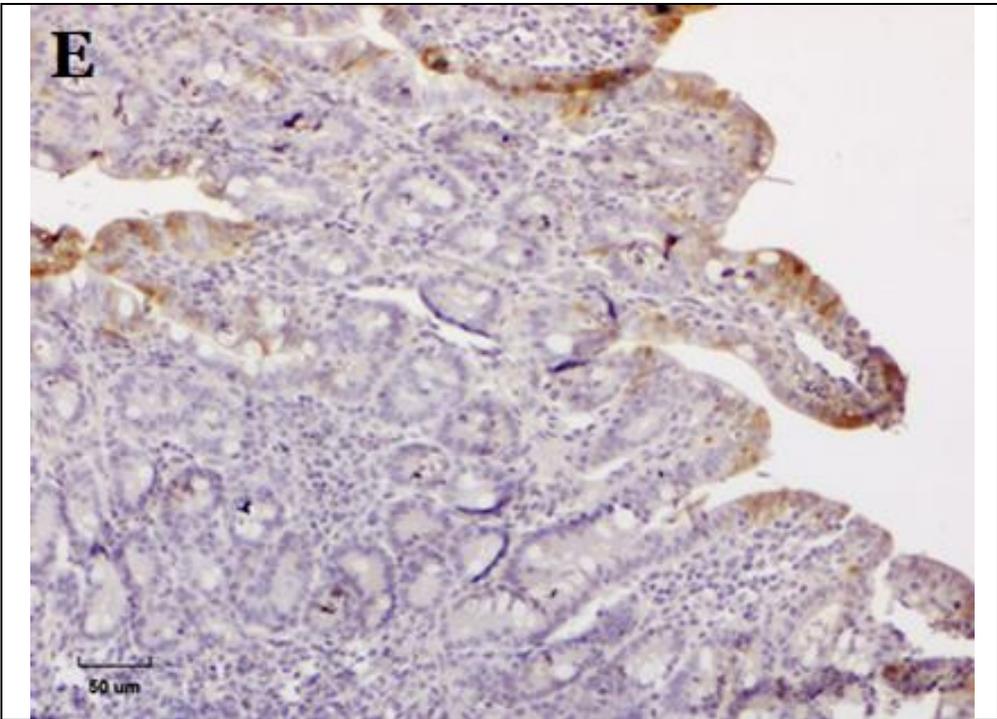
**Figura 19. Histopatología de yeyuno de lechones infectados con vDEP del G4-NE-INDEL.** Se puede observar acortamiento de vellosidades yeyunales (flechas negras) e infiltración linfocitaria (asterisco rojo) desde la lámina basal (A-B, 3 DPI), desepitelización (flechas negras), basofilia de las células caliciformes (flechas verdes) (C, 6 DPI) y reparación de epitelio (D, 9 DPI).

#### **VII.4. Inmunorreactividad de antígenos virales por IHQ**

La inmunorreactividad a la proteína N del vDEP se mostró con una señal color marrón en el citoplasma de los enterocitos de las vellosidades, y ocasionalmente, en algunas células de las criptas (figura 20). La distribución de antígenos virales en intestino delgado observada en lechones de los G2-NE-EP y G4-NE-INDEL fue más extensa que la observada en lechones de los G1-E-EP y G3-E-INDEL que sí poseían inmunidad contra el vDEP.

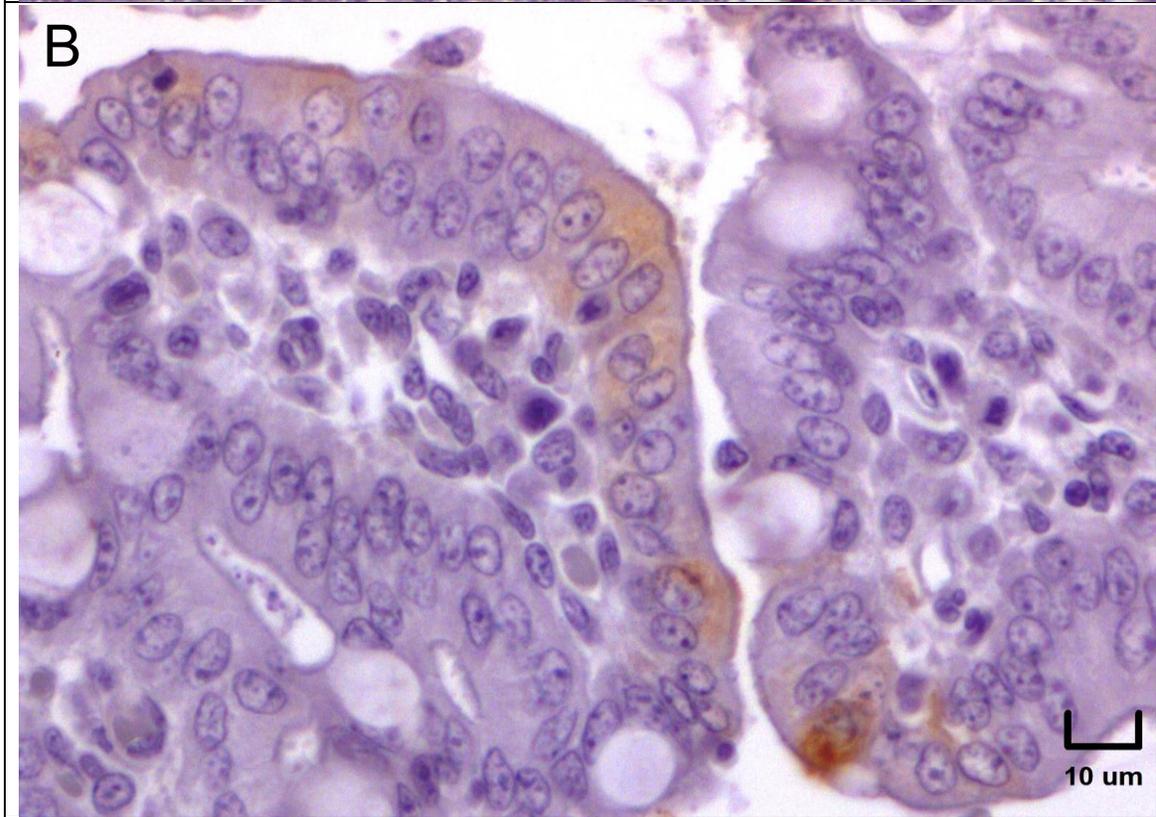
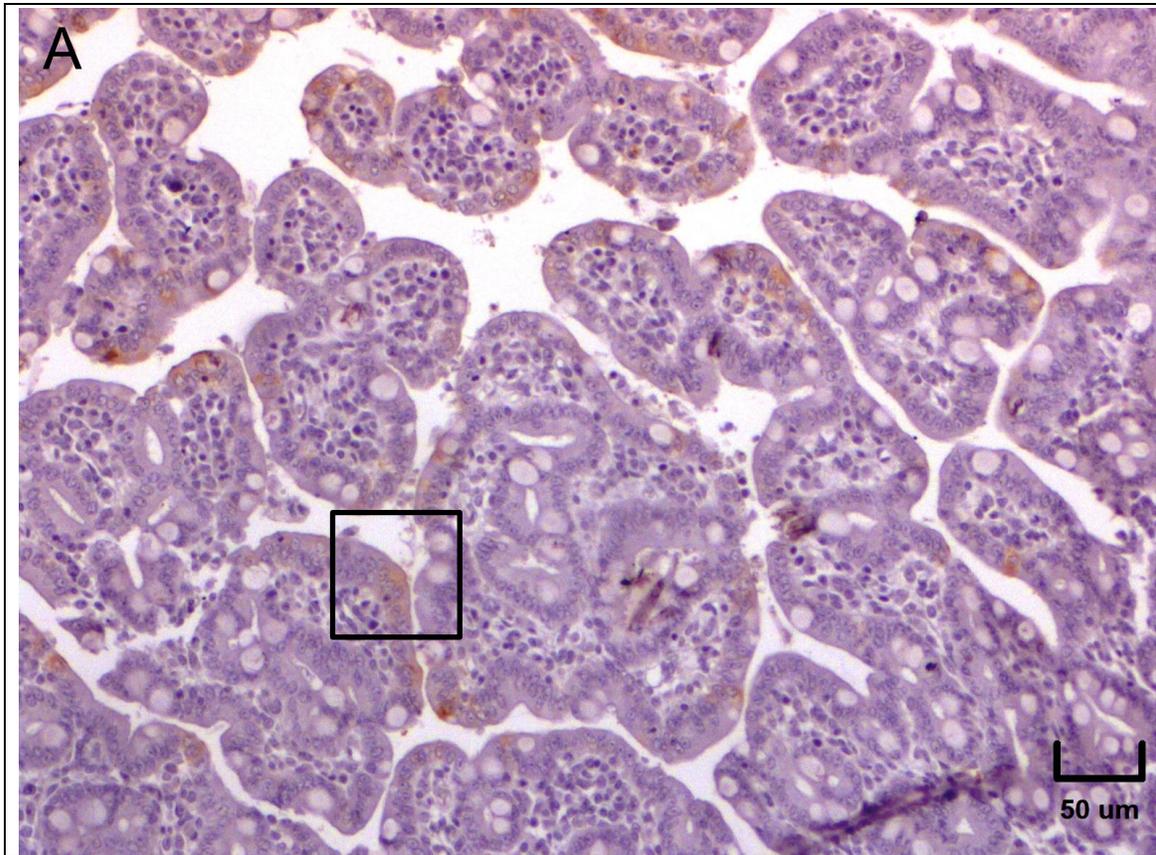


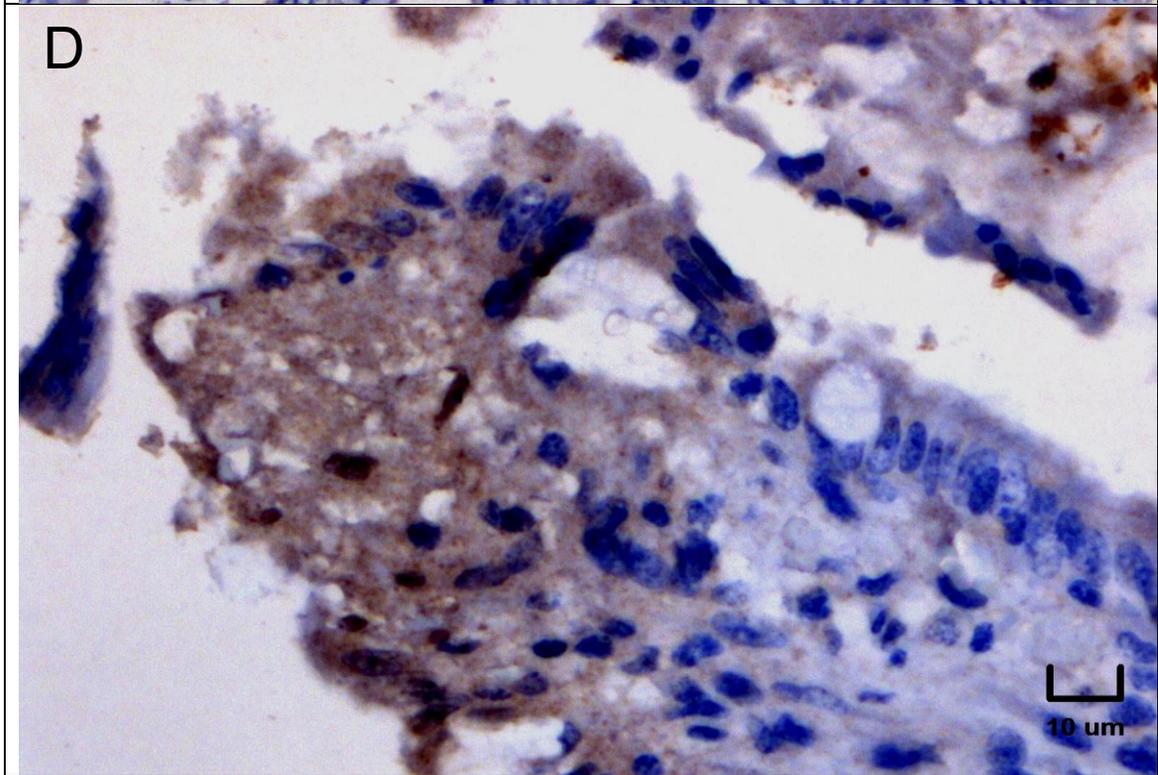
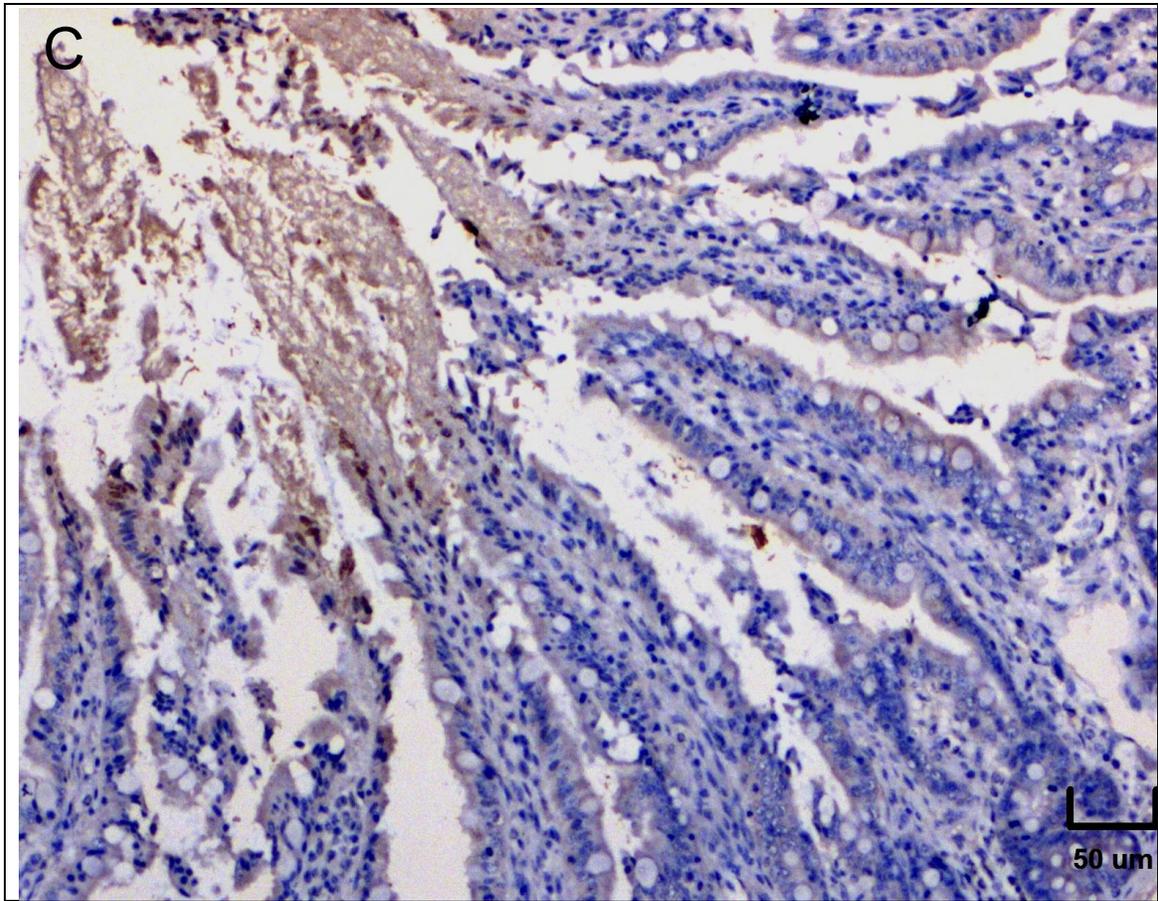


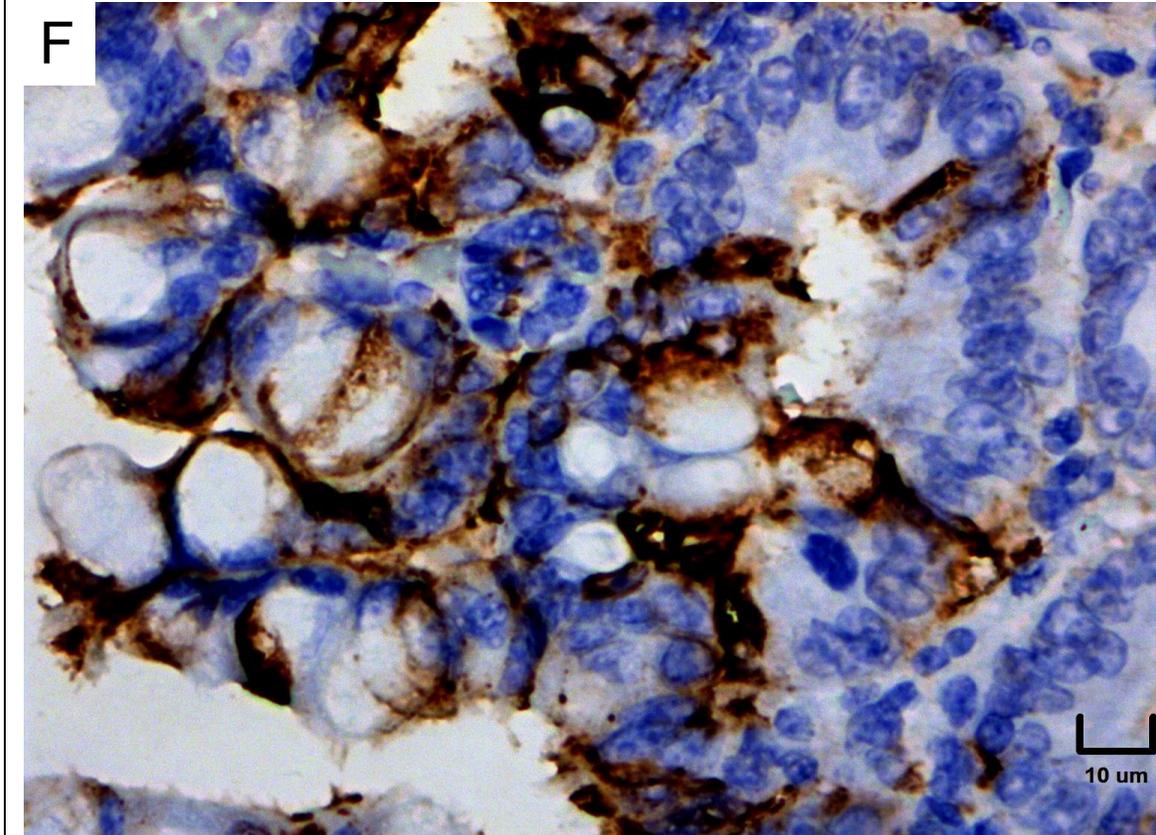
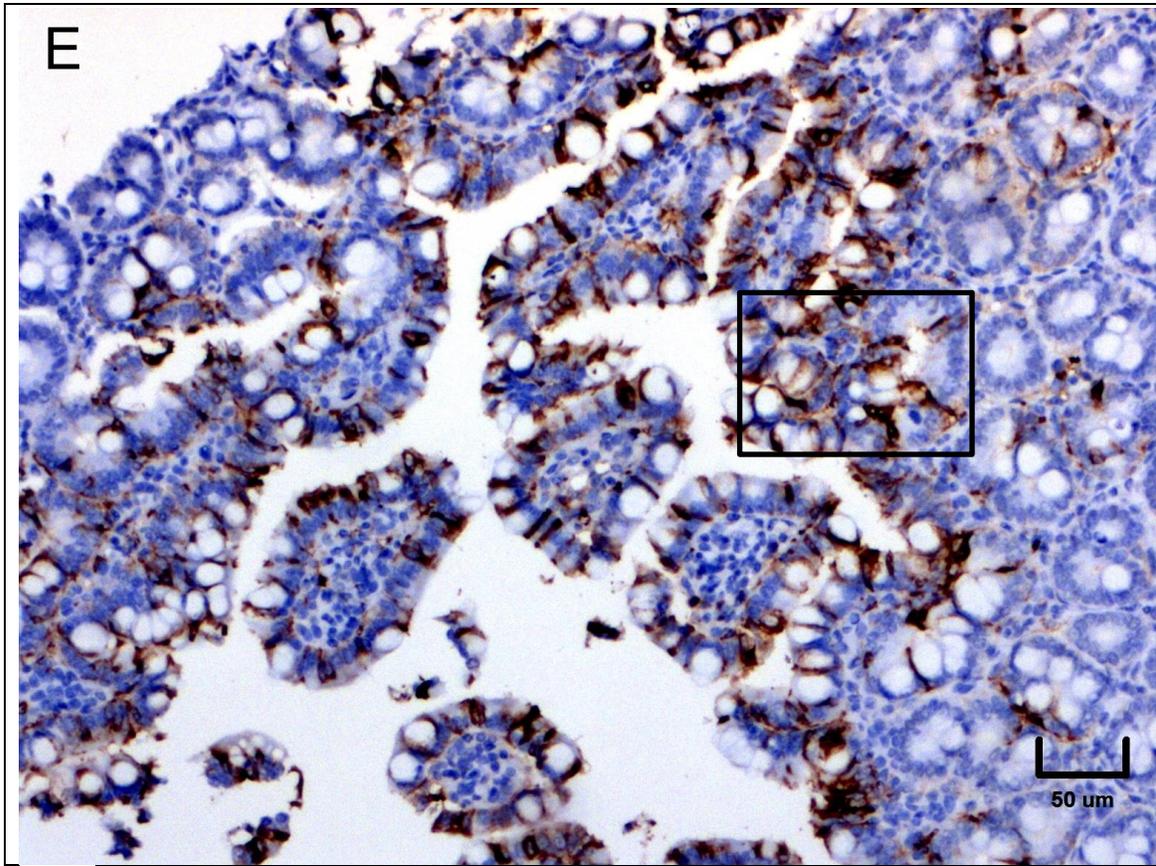


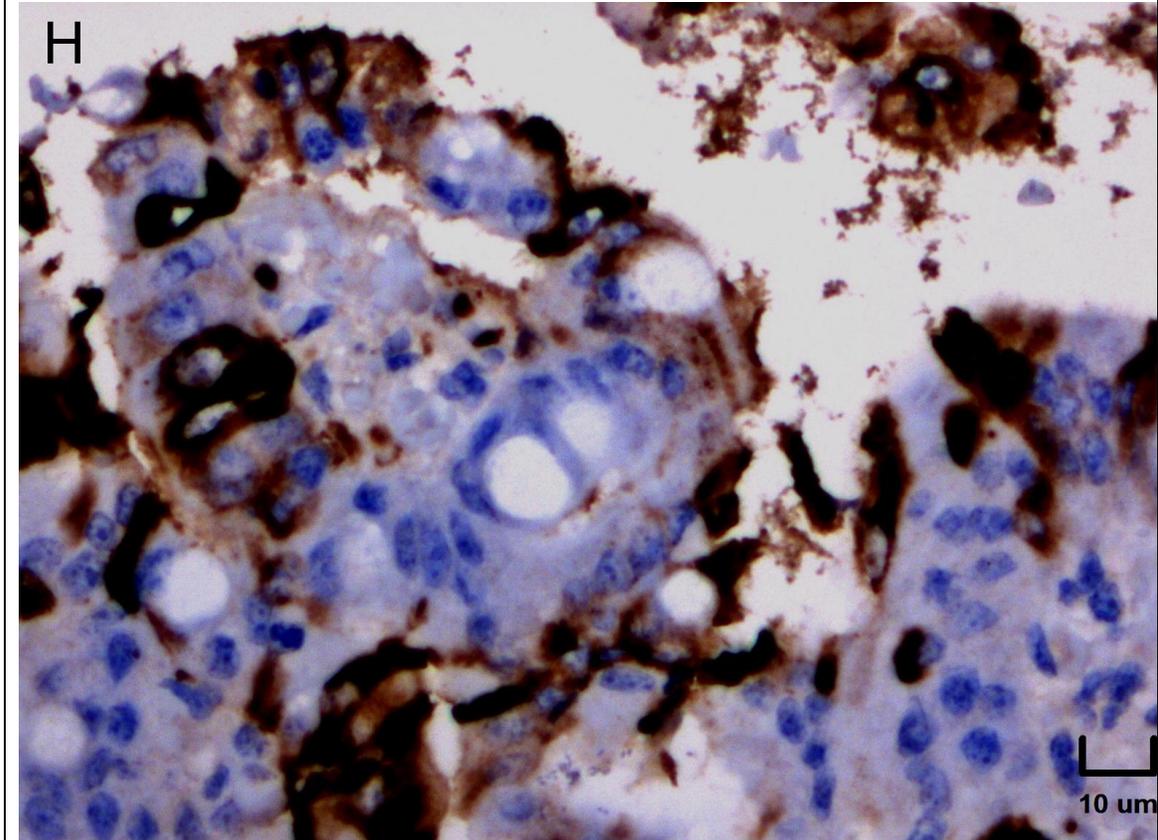
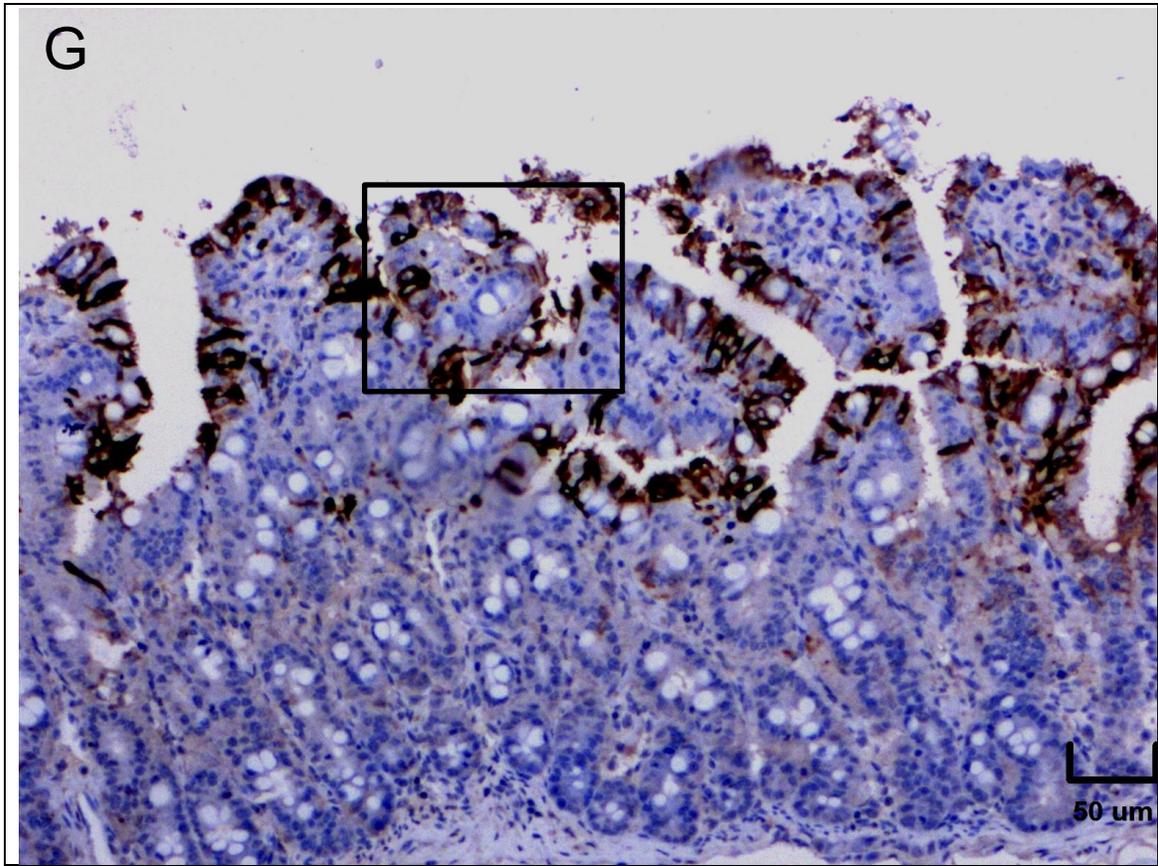
**Figura 20. Inmunorreactividad en enterocitos de intestino delgado de lechones infectados con vDEP.** Los enterocitos del extremo apical de la vellosidades duodenales (A, G2-NE-EP; B, G4-NE-INDEL), yeyunales (C, G2-NE-EP; D, G4-NE-INDEL,) e ileales (E, G2-NE-EP; F, G4-NE-INDEL,) fueron las células que mostraron la inmunorreactividad citoplasmática al vDEP, desde los 3 y 6 DPI en duodeno y yeyuno, y a los 6 y 9 DPI en íleon. Nótese la presencia de desepitelización de las vellosidades (B, flecha), y de escasas células vDEP positivas en las criptas y acortamiento de vellosidades (D).

En el G1-E-EP, se identificaron antígenos virales desde los 3 a las 12 DPI; la distribución del virus aumentó con el paso del tiempo, hasta cubrir más del 60% del extremo apical de las vellosidades intestinales (figura 21). Además, se detectó inmunorreactividad a la proteína N del vDEP en colon ascendente a los 6 y 9 DPI (figura 22), en linfonodos inguinales superficiales a los 3 y 6 DPI (figura 23) y en riñones a los 6 DPI (figura 29, paneles A y B).

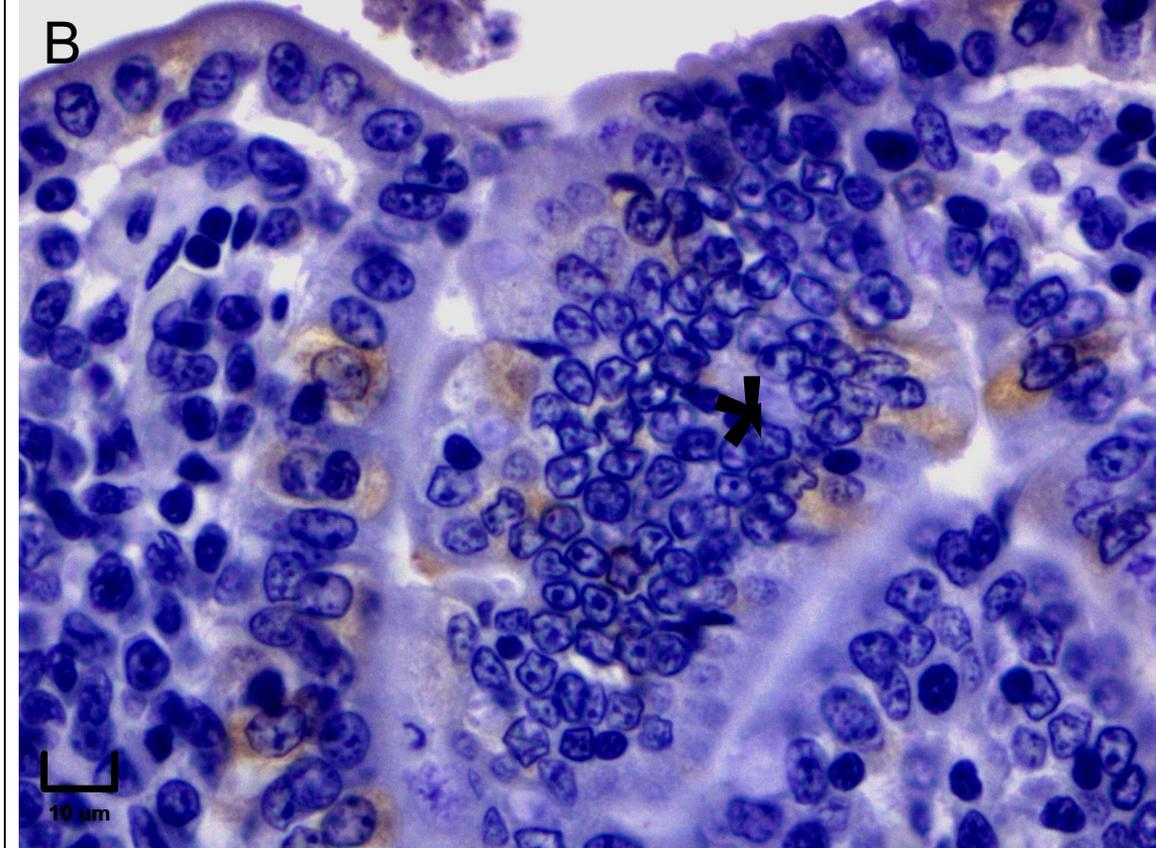
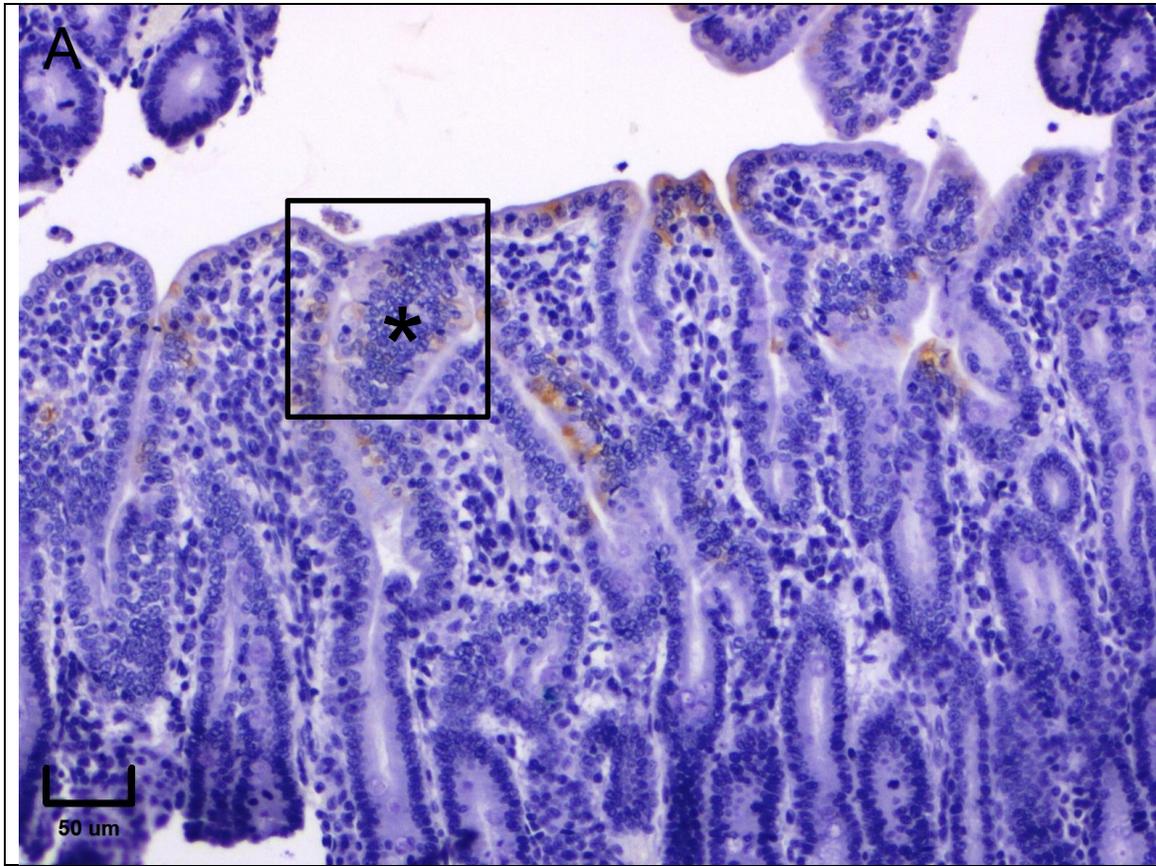


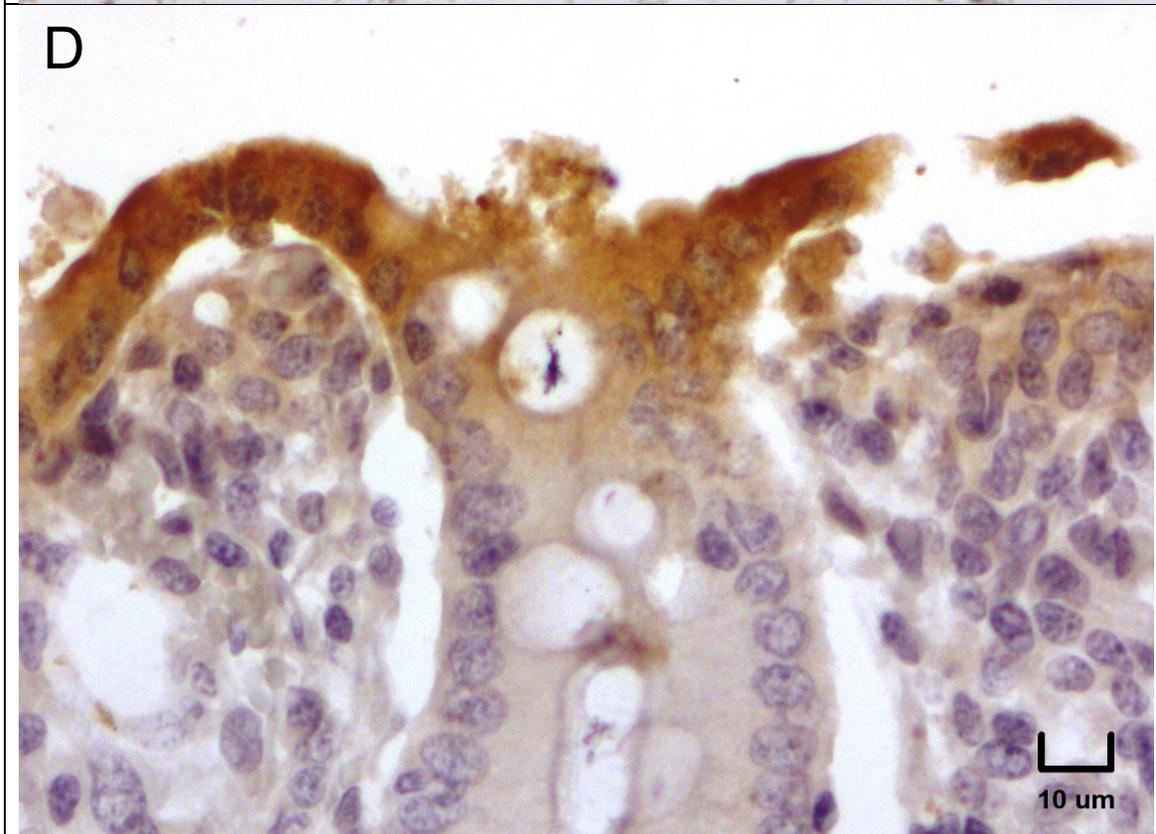
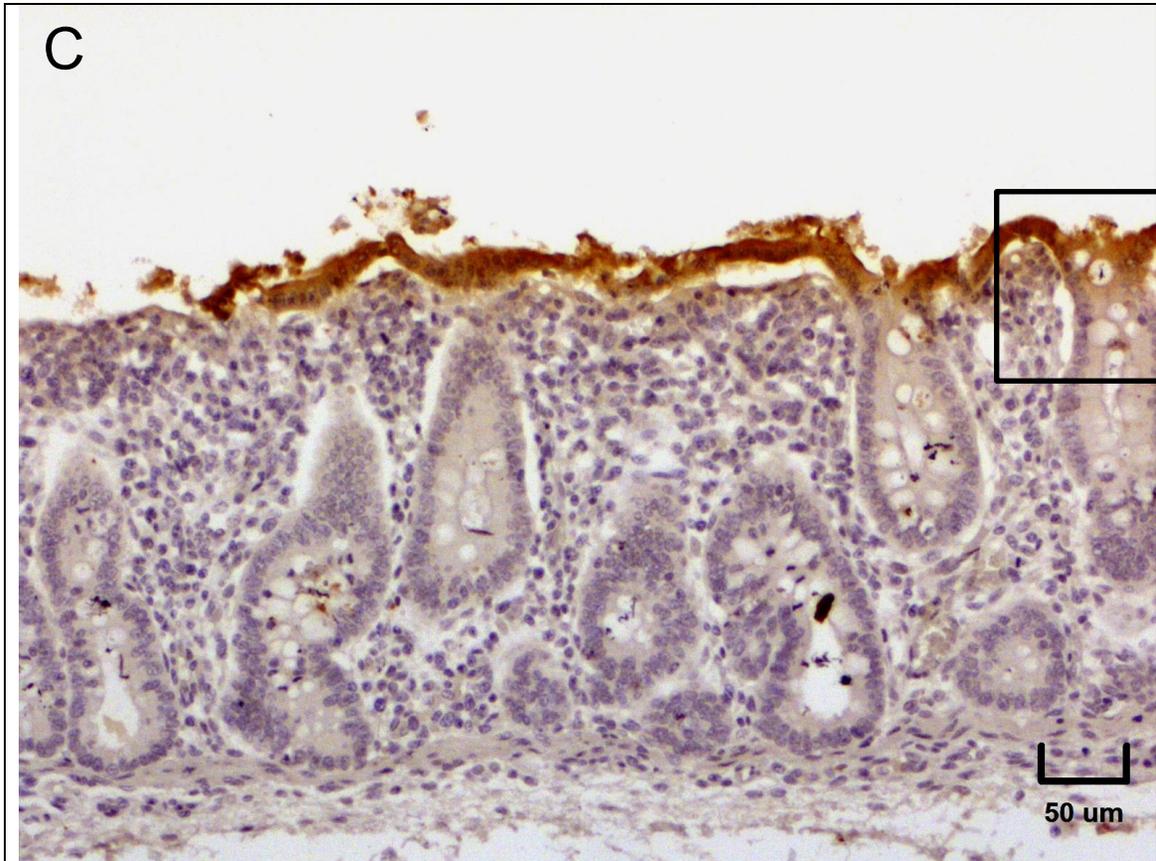


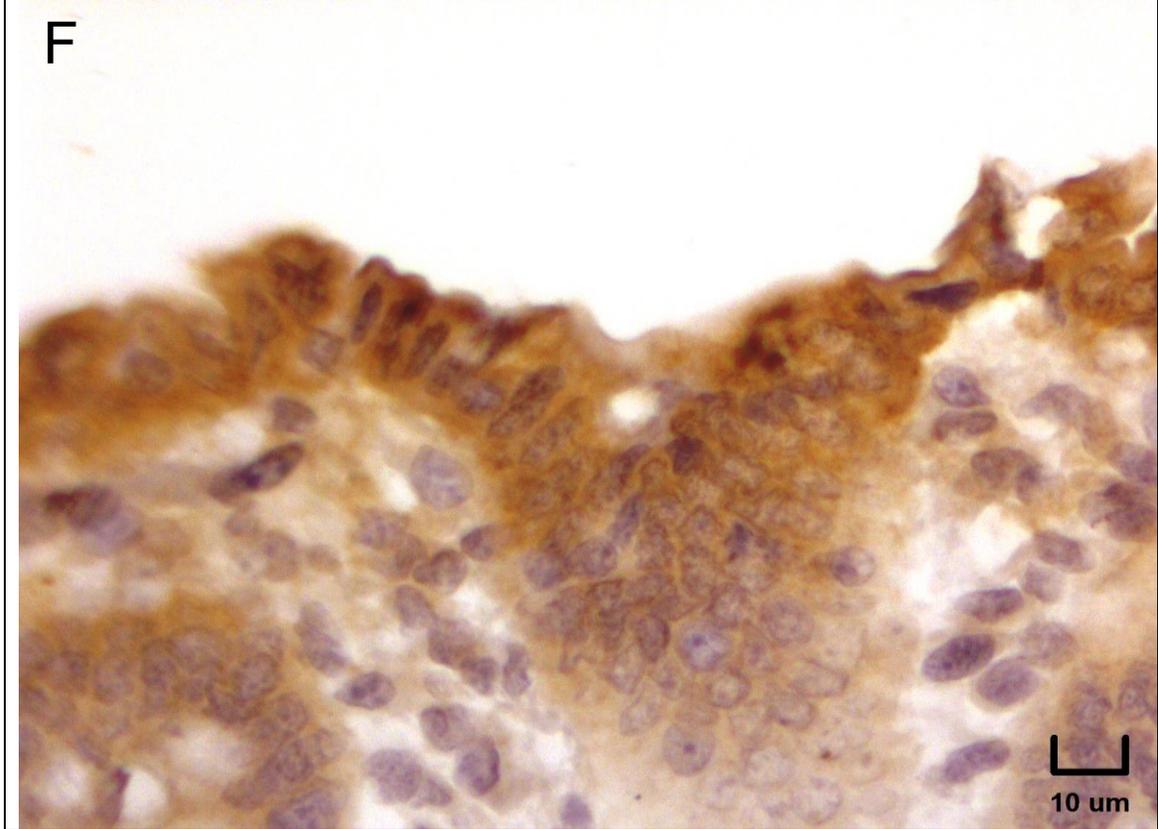
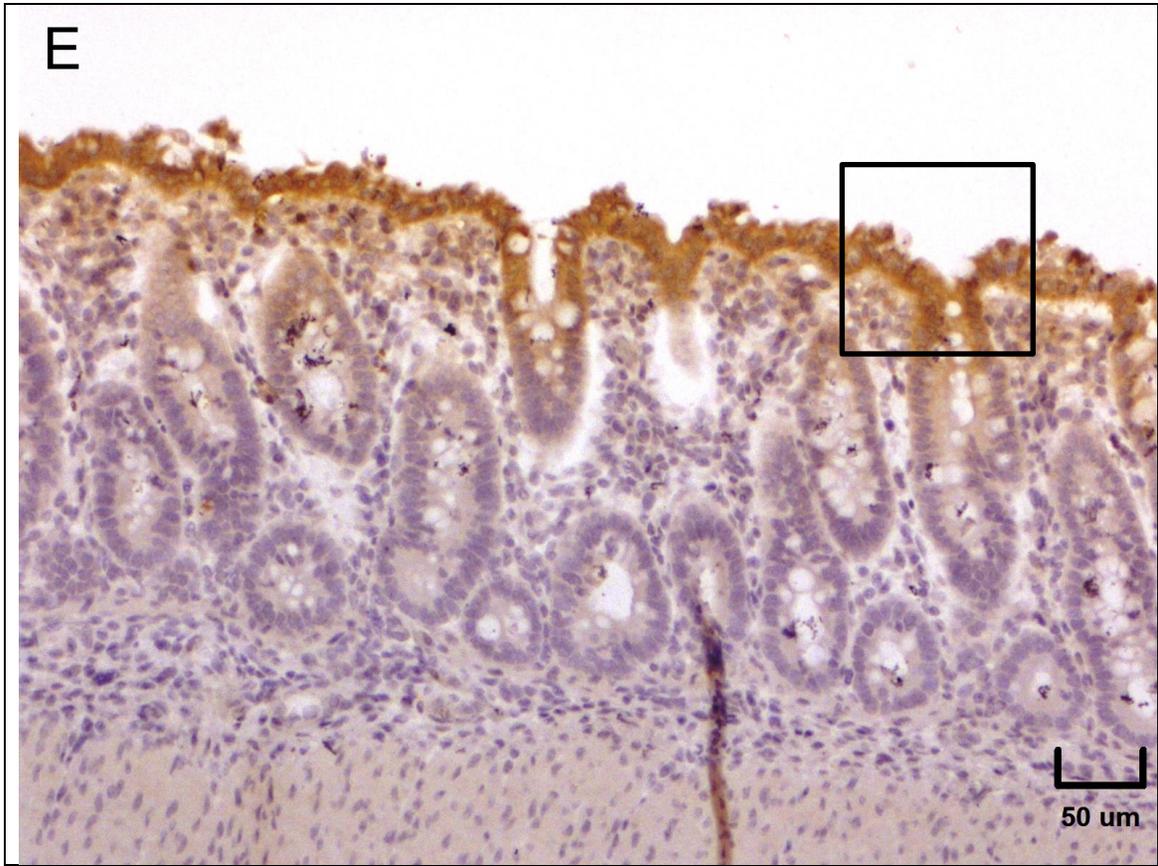




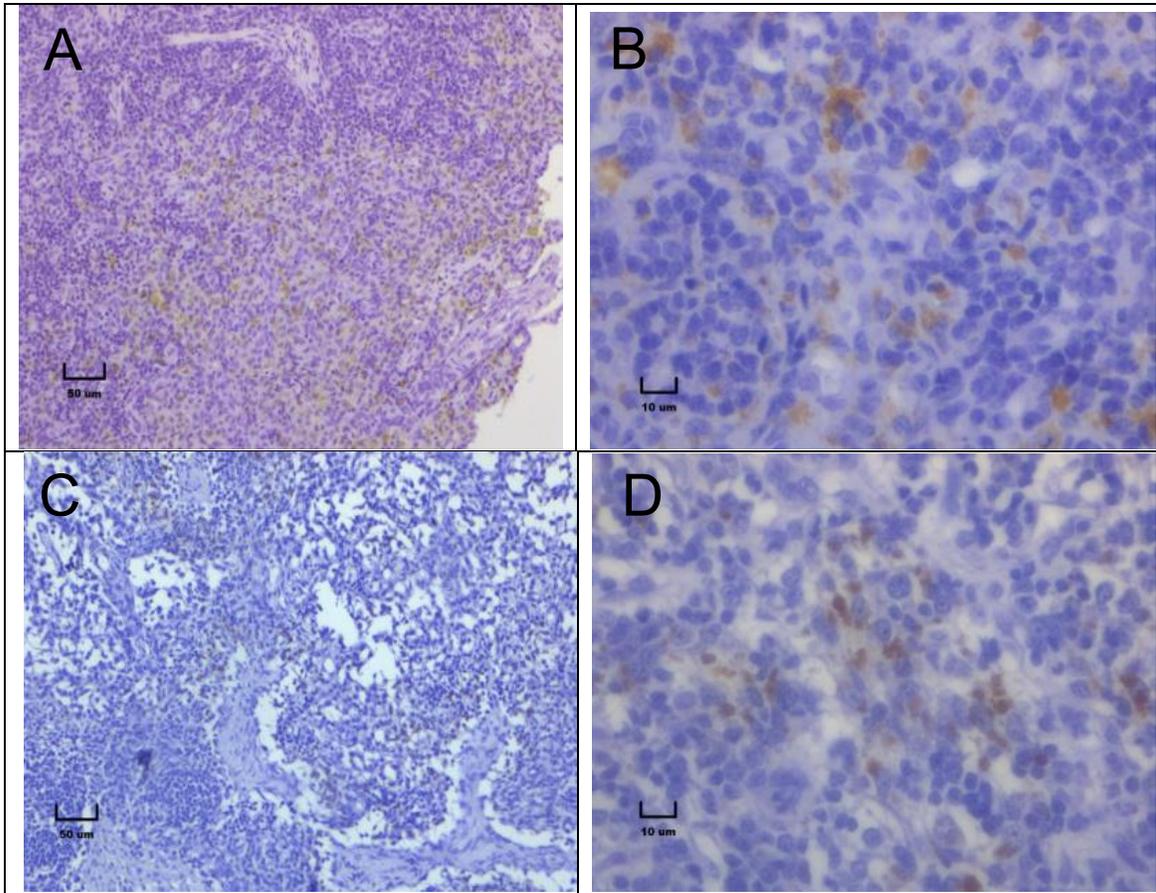
**Figura 21. Inmunorreactividad en enterocitos de yeyuno de lechones del G1-E-EP.** Los enterocitos de extremo apical de la vellosidades yeyunales fueron las células que mostraron la inmunorreactividad citoplasmática al vDEP, desde los 3 (A-B) hasta los 12 DPI (G-H). Nótese el aumento de la presencia de desepitelización de las vellosidades (C-D, 6 DPI), y células vDEP positivas del extremo apical de las vellosidades (E-F, 9 DPI) y escasamente en criptas (G-H, 12 DPI) a lo largo del tiempo (D, flecha).







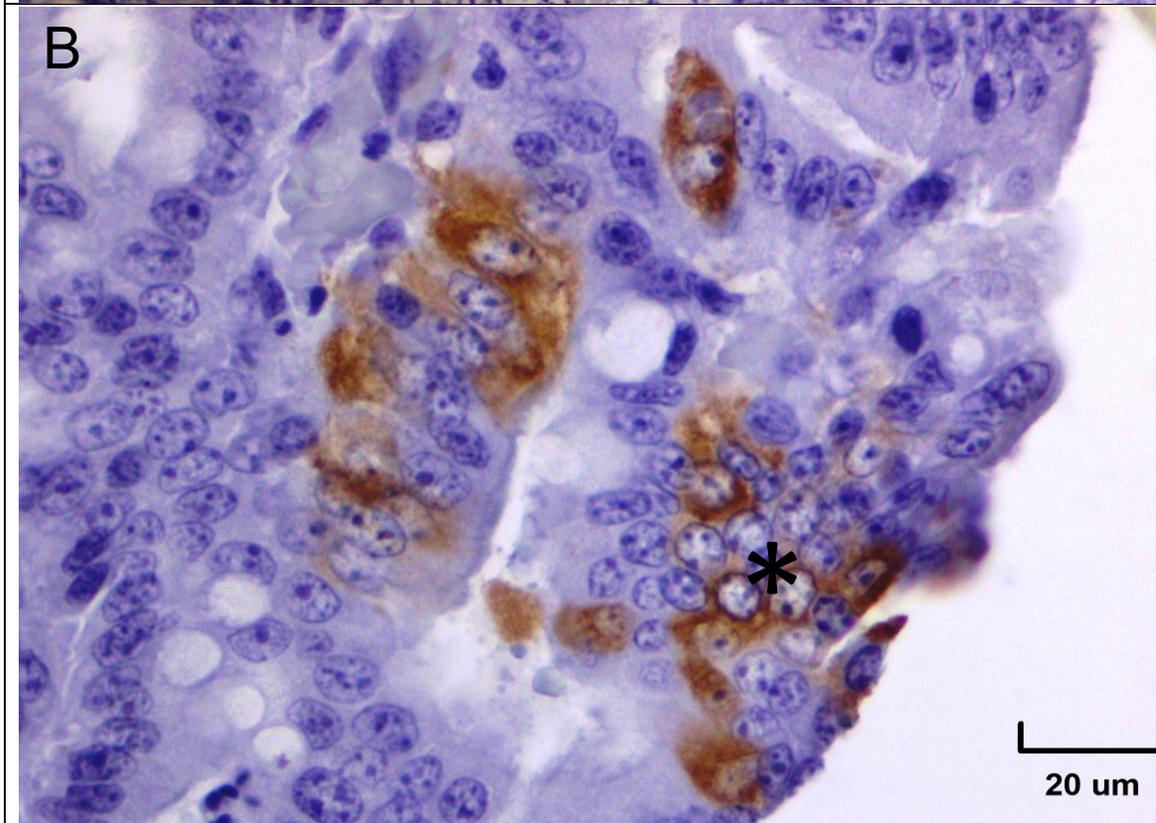
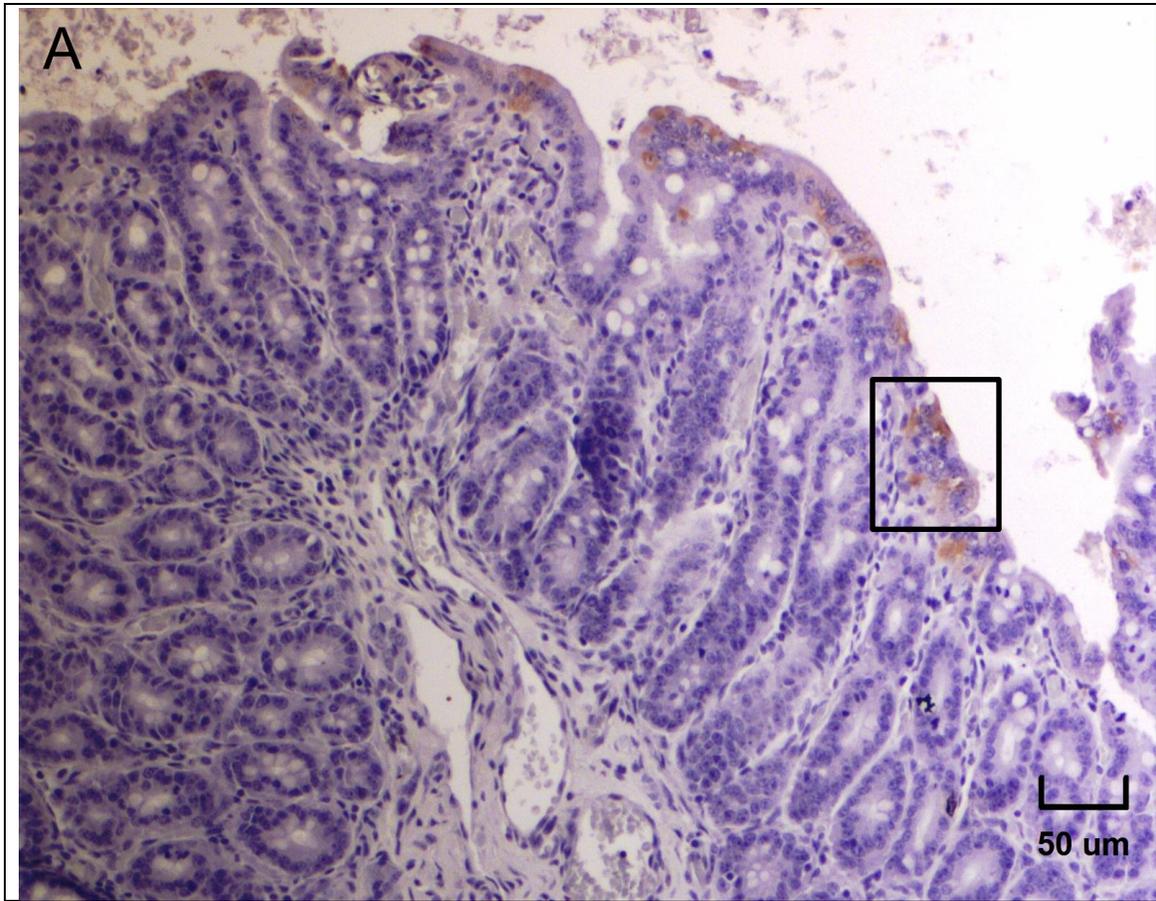
**Figura 22. Inmunorreactividad en enterocitos de colon ascendente de lechones del G1-E-EP.** Los enterocitos de extremo apical de las glándulas colónicas presentaron inmunorreactividad citoplasmática al vDEP a los 6 (A-B) y los 9 DPI (C-F). Nótese la presencia de sincitios de más de 30 núcleos con inmunorreactividad al virus (A-B, asterisco) y aumento de la presencia de células vDEP positivas del extremo apical glandular a lo largo del tiempo.

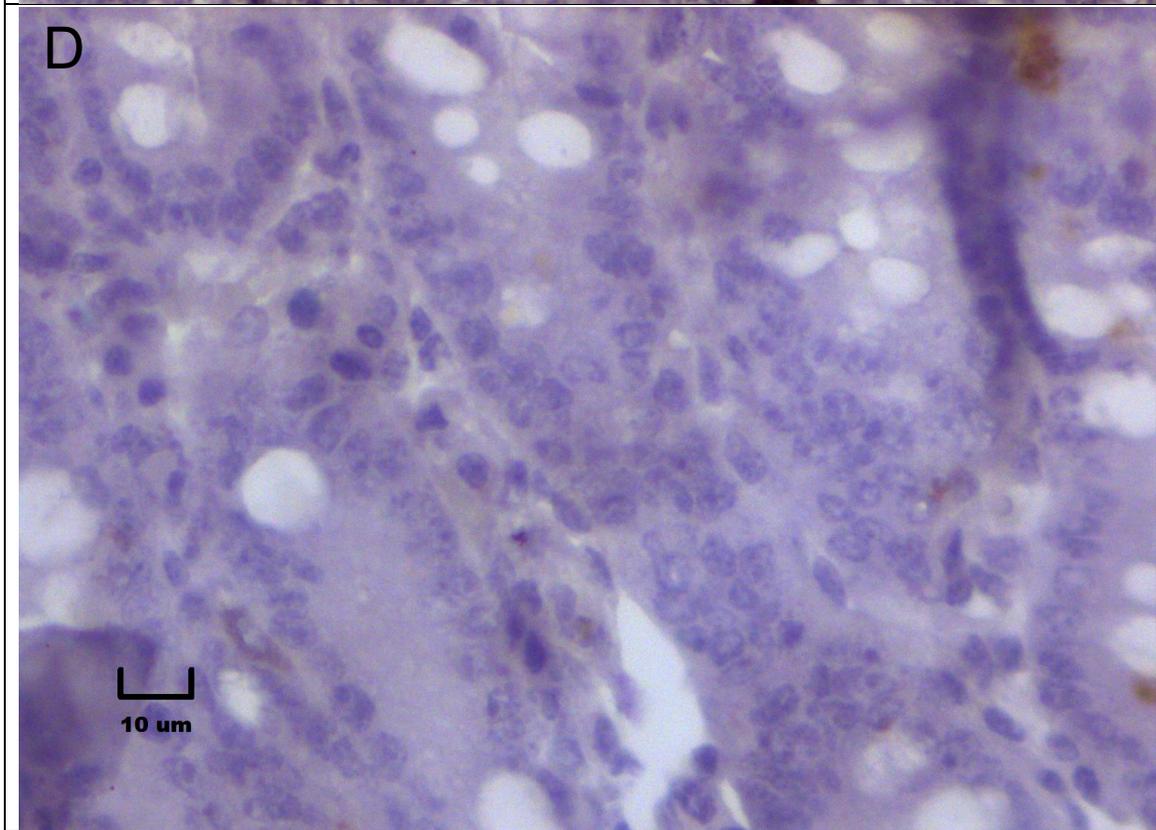


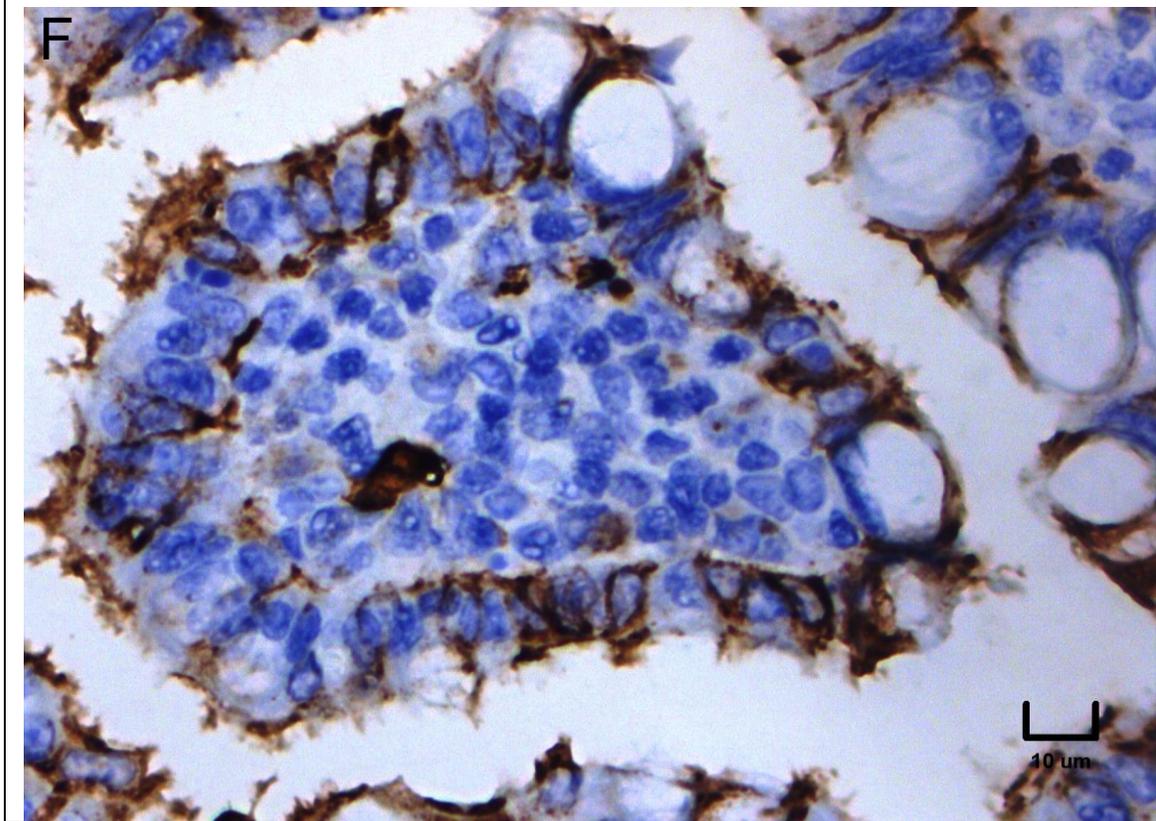
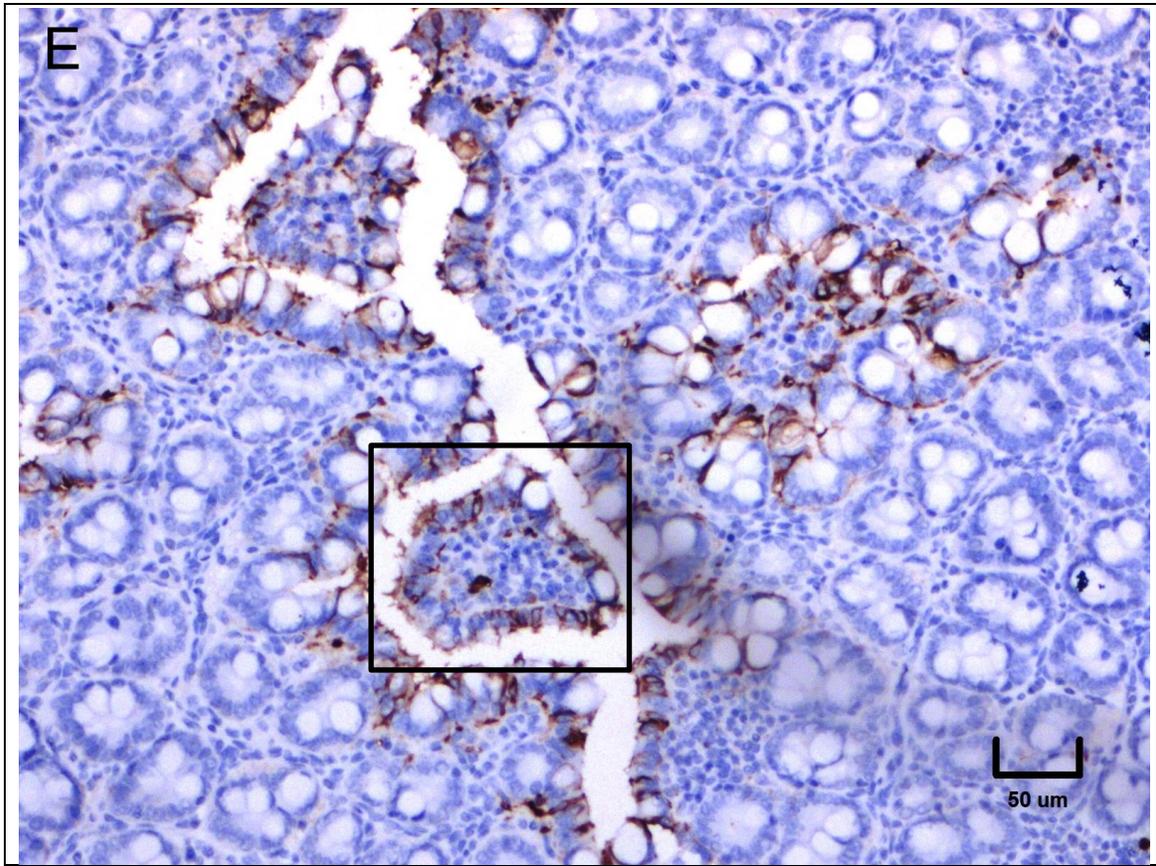
**Figura 23. Inmunorreactividad en linfonodos inguinales de lechones del G1-E-EP. Nótese la inmunorreactividad al vDEP en células no linfoides de la zona paracortical de un ganglio linfático inguinal 3 DPI (A-B) y 6 DPI (C-D).**

En el G2-NE-EP, se identificó inmunorreactividad al vDEP de 3 a 9 DPI, en más del 60% del extremo apical de las vellosidades intestinales. A los 3 DPI se identificaron sincitios de 9 a 30 núcleos en la zona apical de las vellosidades yeyunales, algunos con inmunorreactividad al vDEP (figura 24, panel A y B; figura 25, paneles B y C). Además, numerosos cuerpos apoptóticos y enterocitos desprendidos mostraron inmunorreactividad viral. Se pudo observar que la distribución del antígeno viral fue aumentando con el paso del tiempo, con base al área de inmunotinción a lo largo de la vellosidad intestinal. También, en este grupo experimental se detectaron antígenos virales del vDEP en algunas regiones del lóbulo apical derecho (LAD) del pulmón de un lechón a los 6 DPI (figura 26).

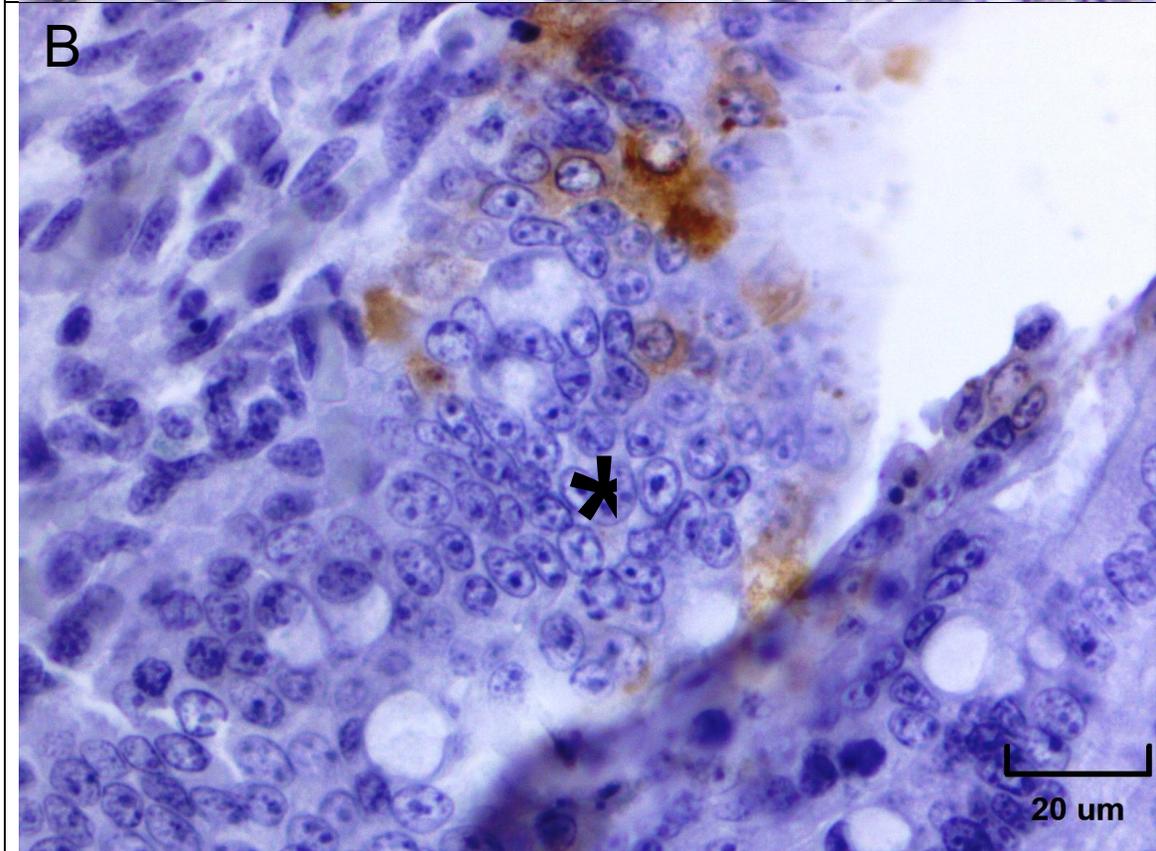
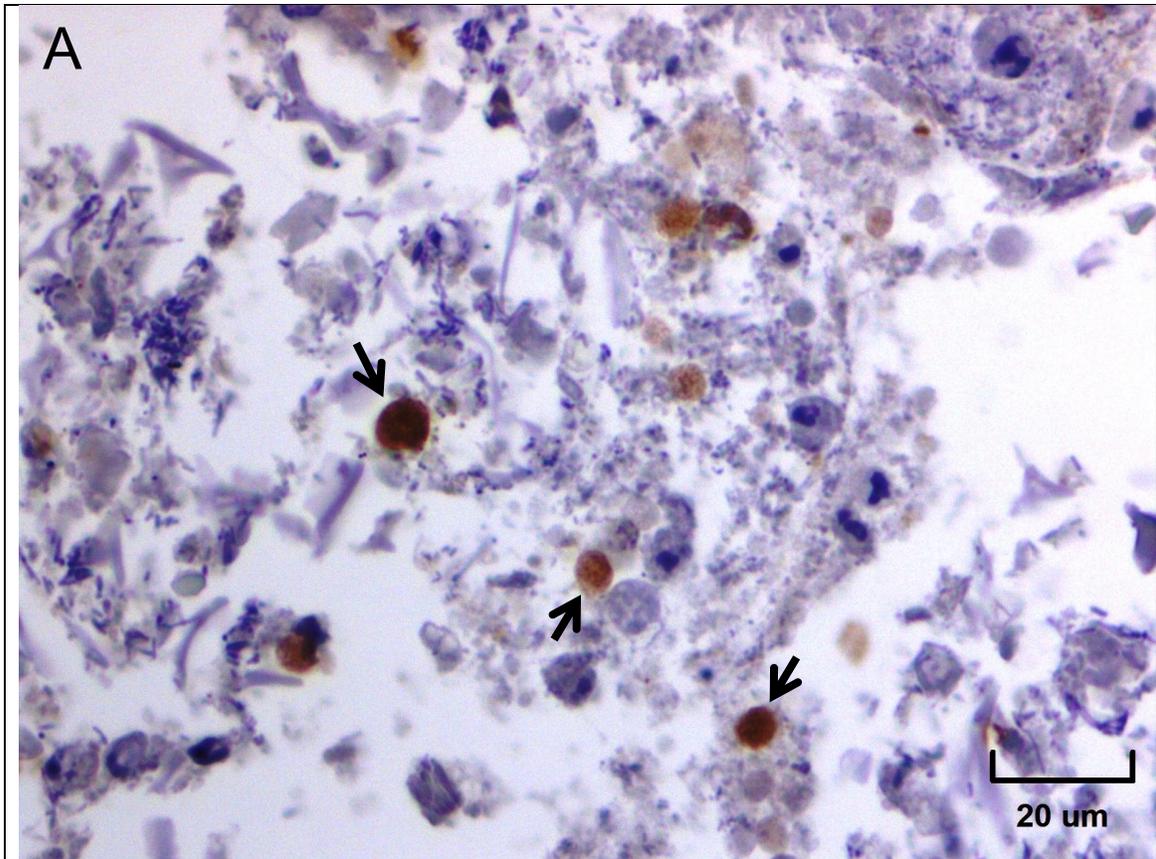
Por todo lo anterior se demuestra que la cepa epidémica PEDV/MEX/MICH/01/2013 de México tiene tropismo no sólo hacia intestino delgado y grueso, sino que también puede replicarse en pulmones, linfonodos y riñones.

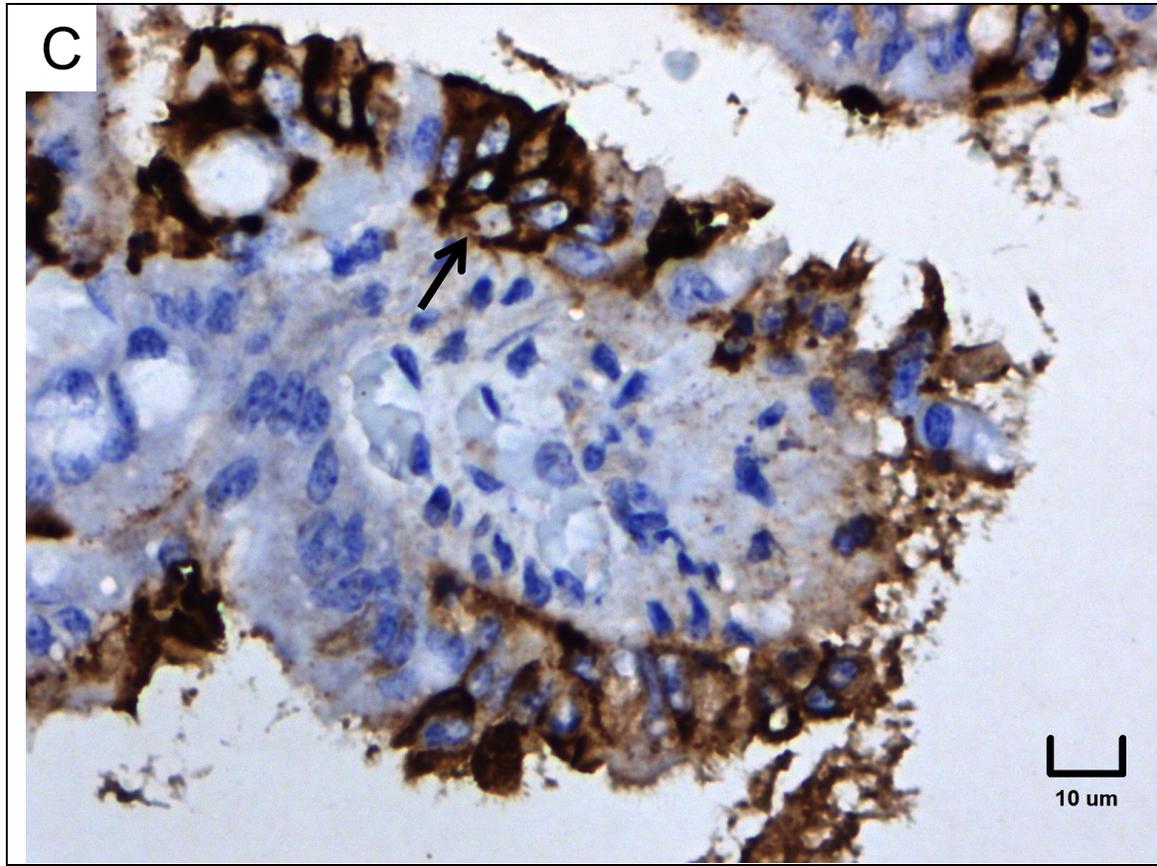




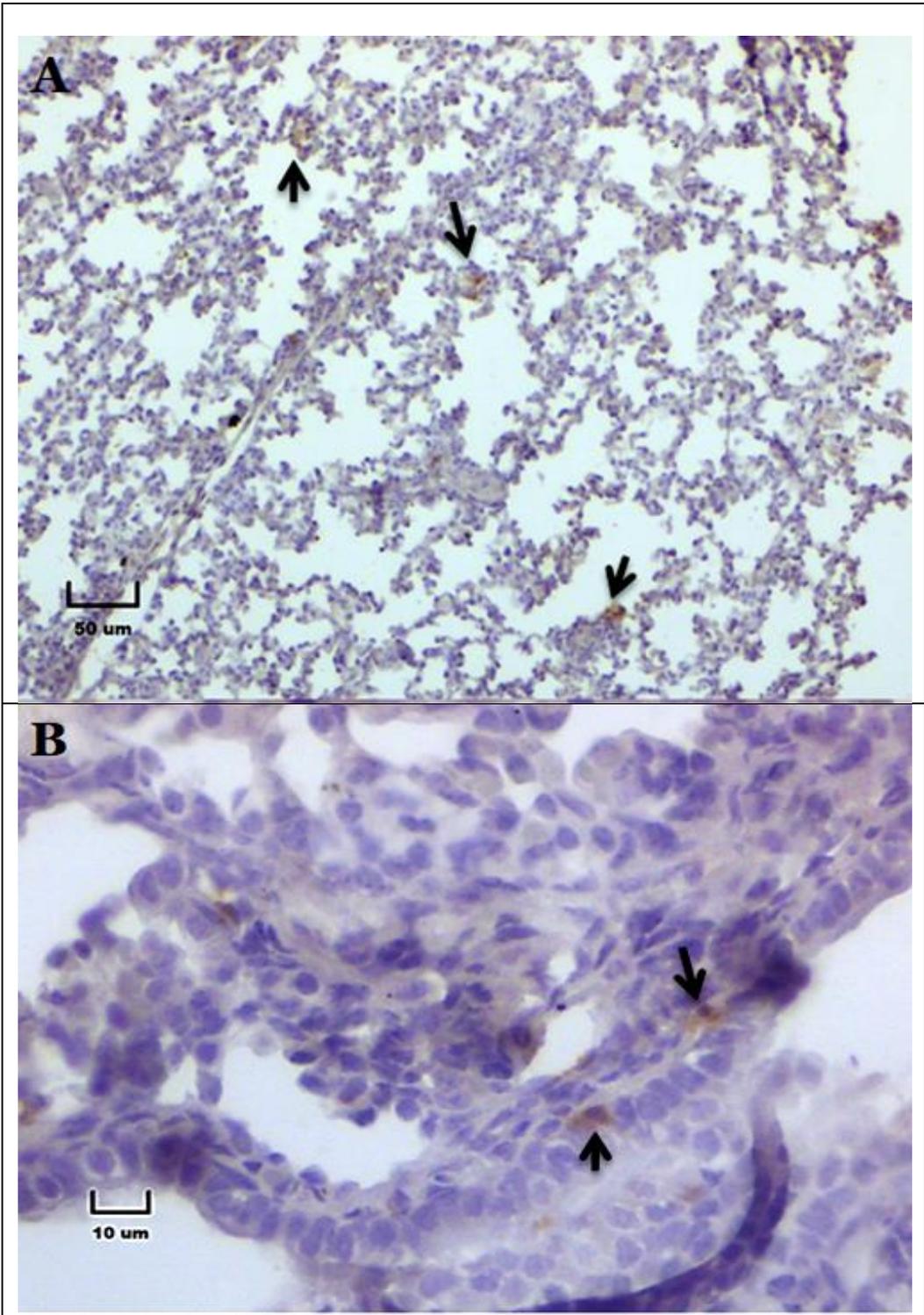


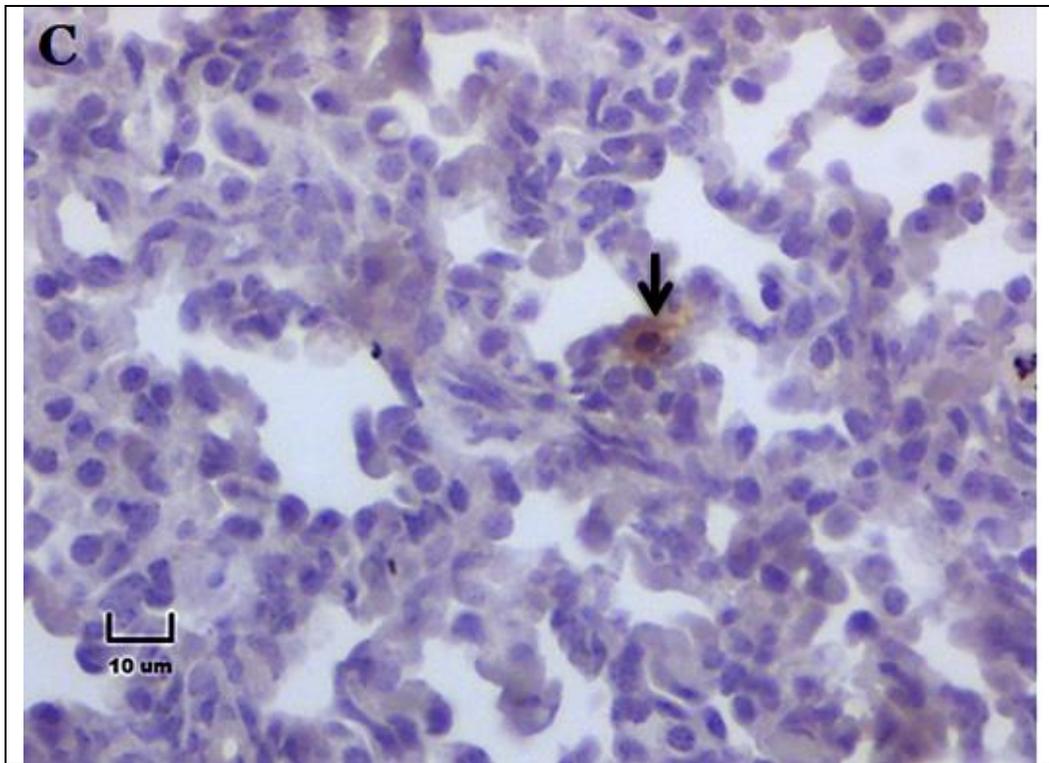
**Figura 24. Inmunorreactividad en enterocitos de yeyuno de lechones del G2-NE-EP.** Los enterocitos del extremo apical de las vellosidades yeyunales presentaron inmunorreactividad citoplasmática al vDEP que aumentó su número con el paso del tiempo, de los 3 (A-B) hasta los 9 DPI, incluyendo algunas células vDEP positivas en la lámina propia de las vellosidades y que probablemente son macrófagos o células dendríticas (E-F). Nótese la presencia de sincitios de más de 30 núcleos con inmunorreactividad al virus (B, asterisco), presencia de escasas células vDEP positivas en criptas (C-D, 6 DPI).





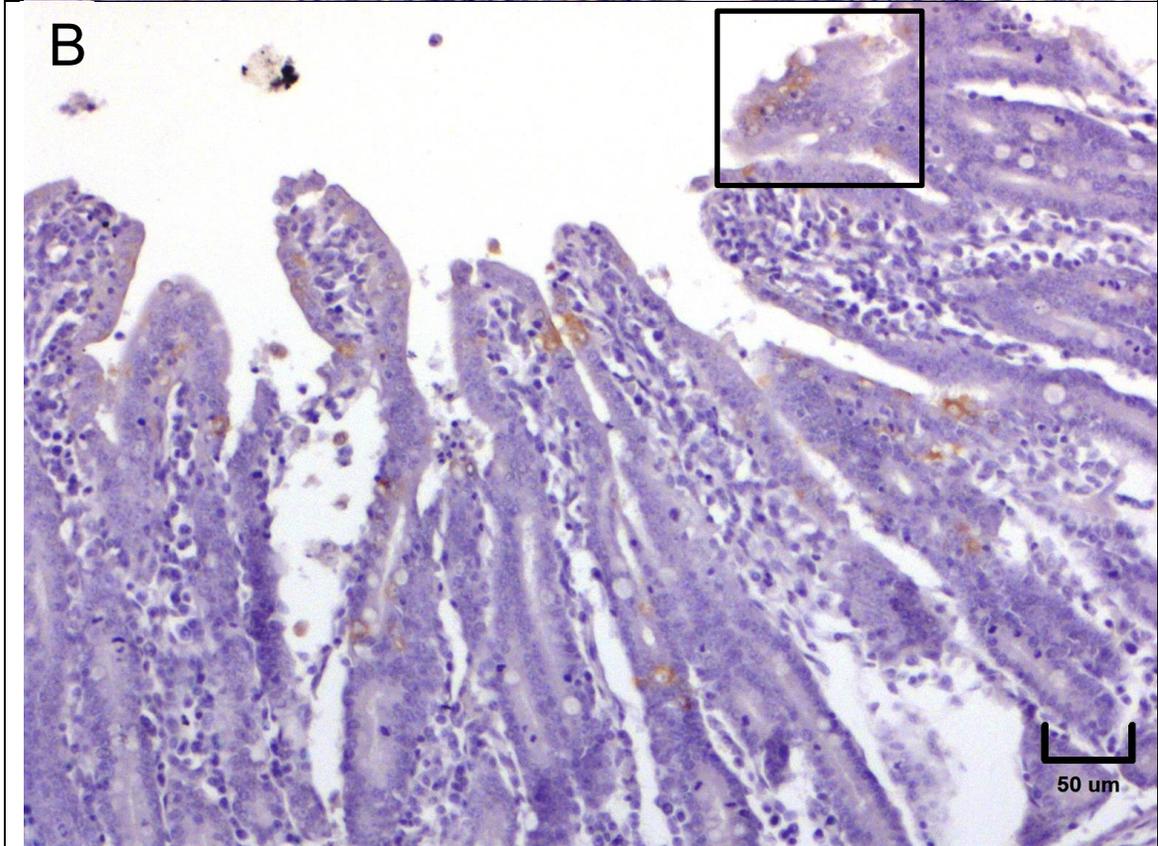
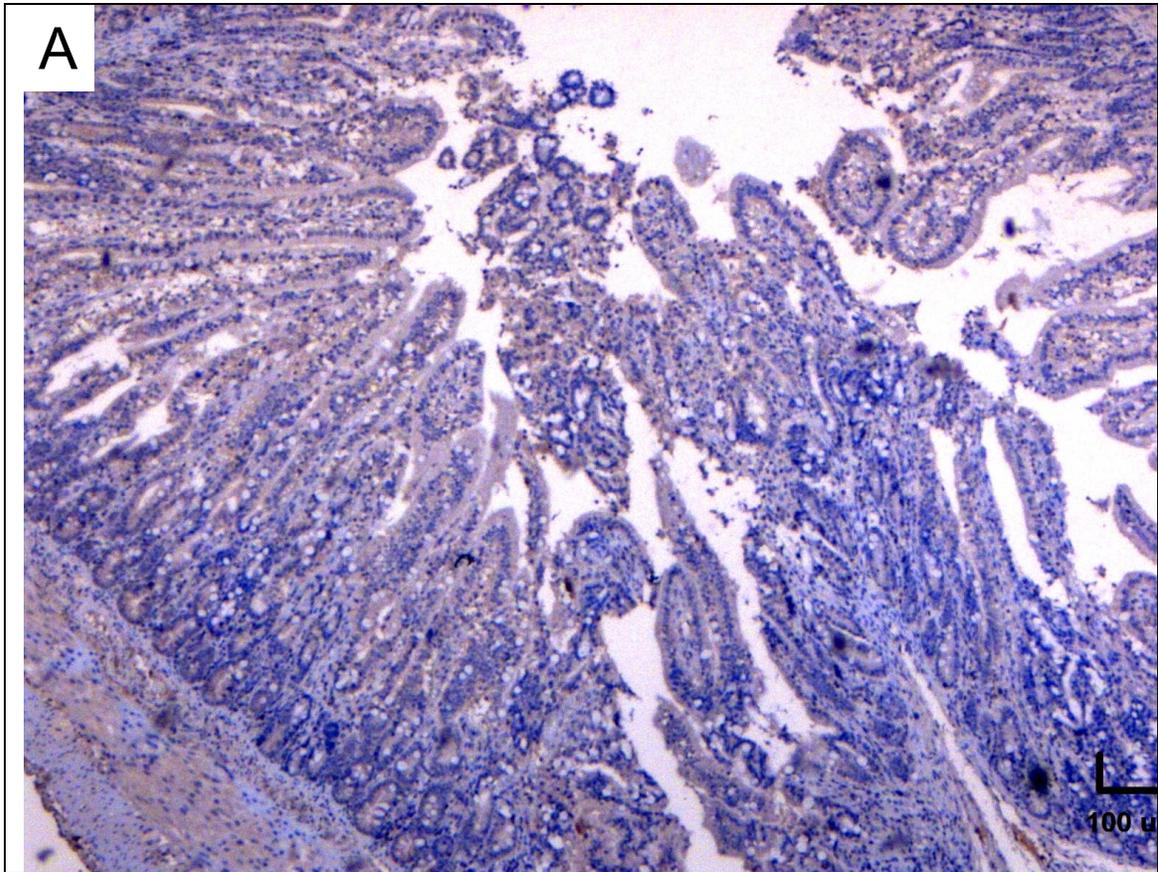
**Figura 25. Detección de inmunorreactividad en yeyuno de lechón infectado con vDEP del G2-E-EP a los 3 días posinfección.** A) En los detritos celulares, producto de la desepitelización apical de las vellosidades intestinales, algunas células redondeadas, probablemente en apoptosis, muestran inmunorreactividad intensa al vDEP (flechas negras). B) Sincitio de más de 30 núcleos con algunas zonas citoplasmáticas que presentan inmunorreactividad a vDEP. C) Sincitio de más de 9 núcleos con inmunorreactividad intensa al vDEP en el extremo apical de una vellosidad yeyunal (flecha negra).

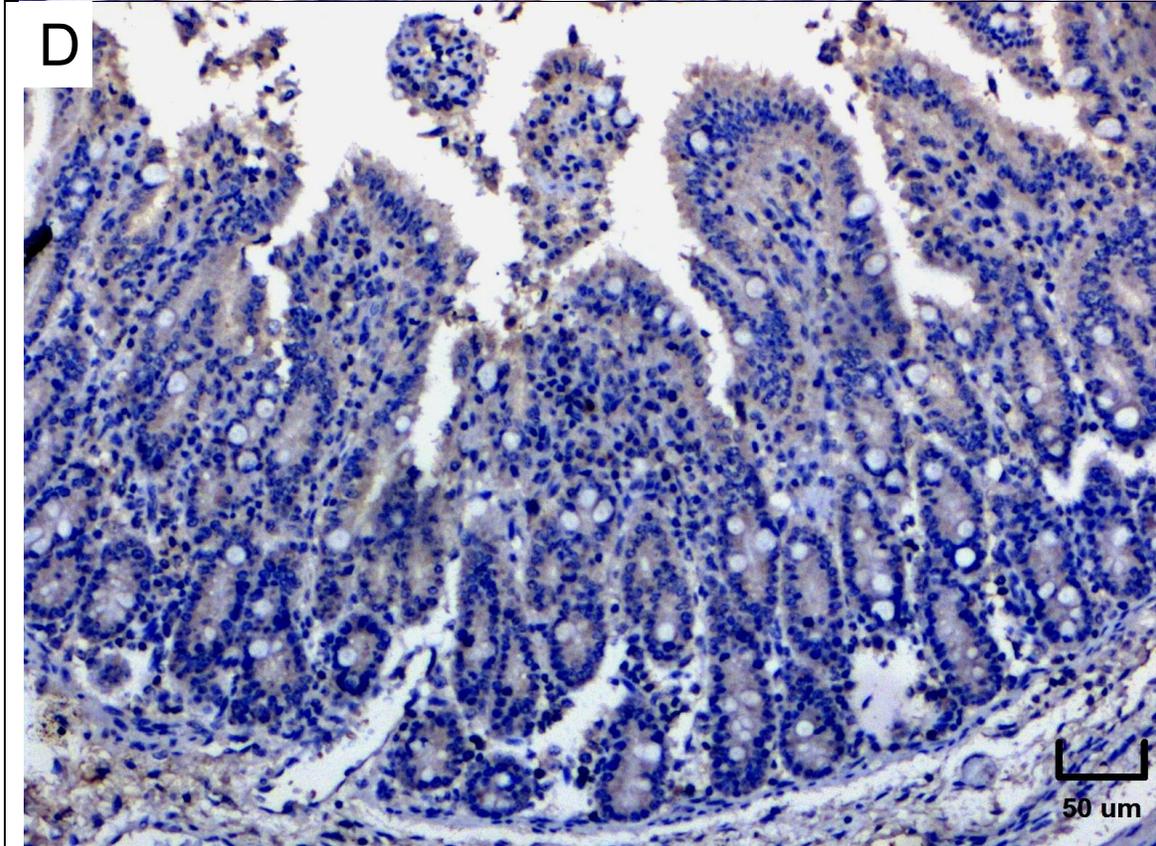
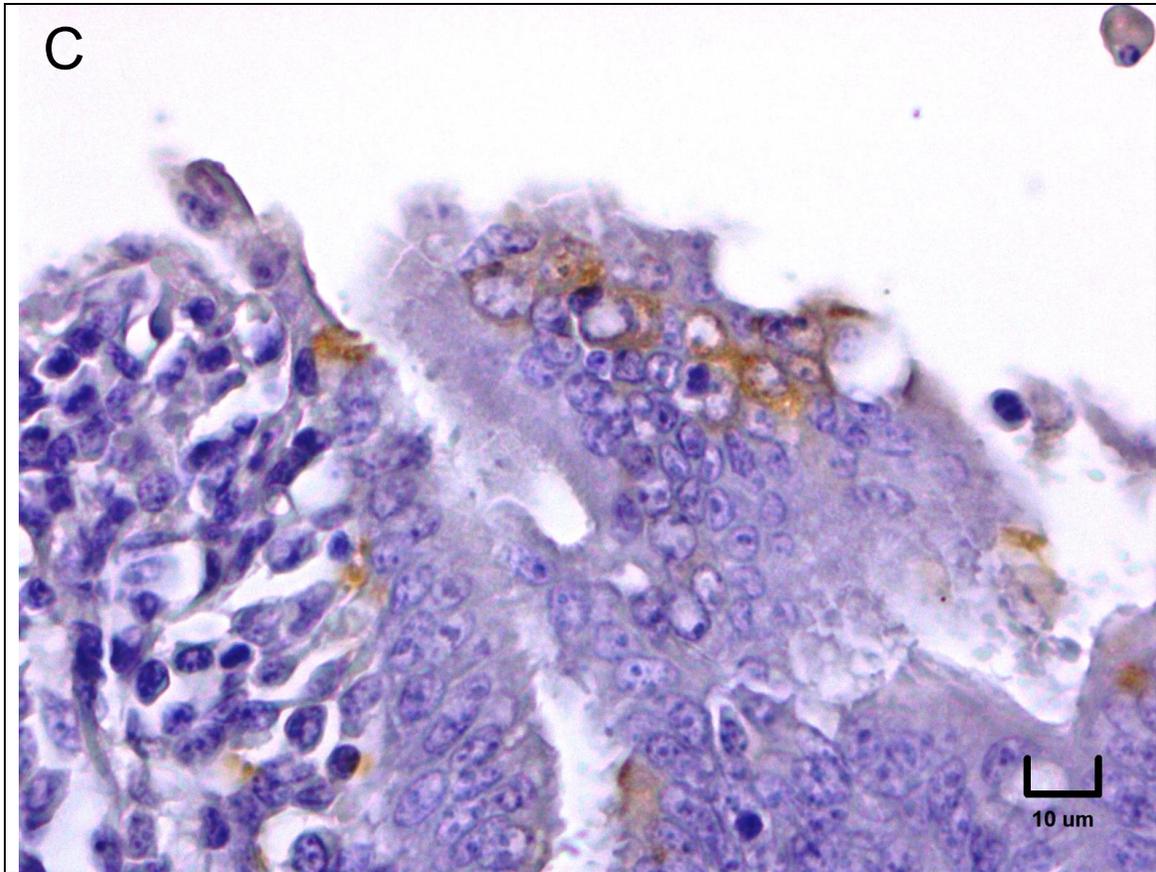


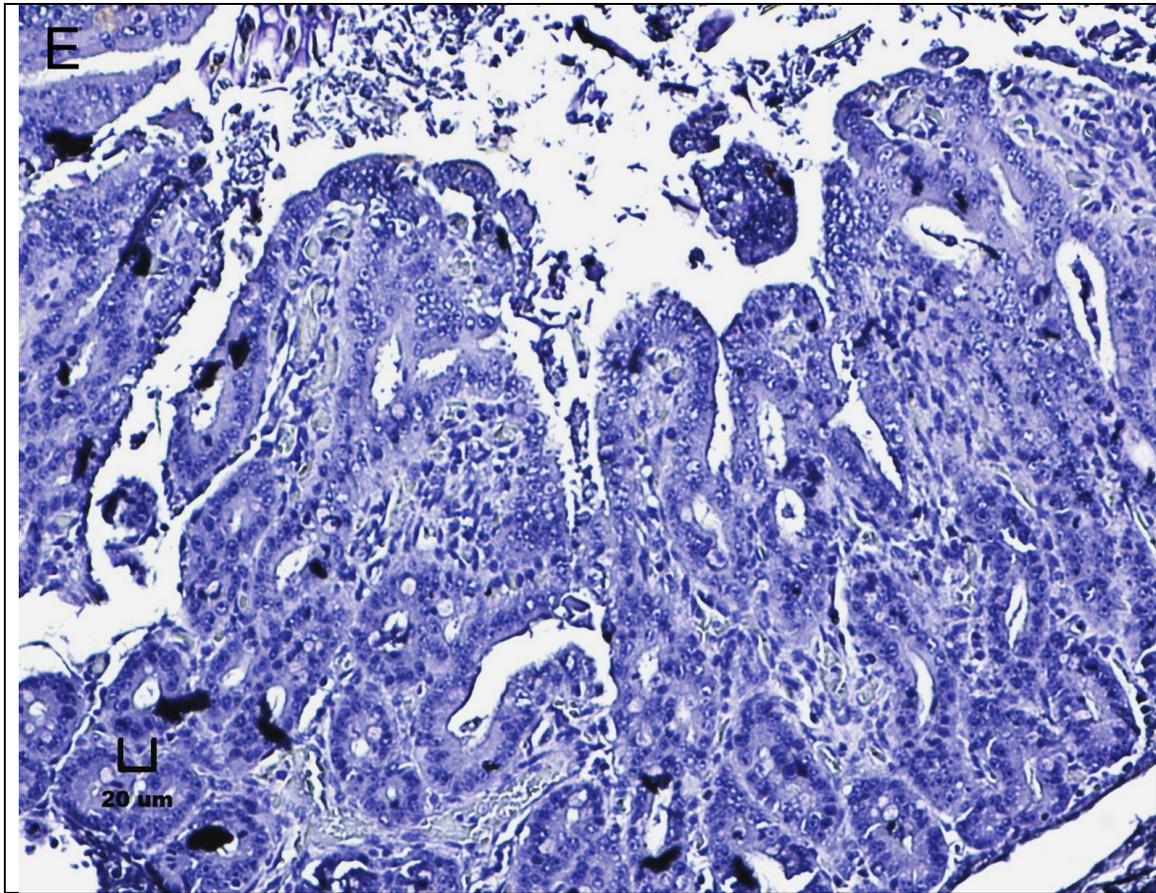


**Figura 26. Inmunorreactividad en neumocitos de lechón del G2-E-EP a los 6 días posinfección. A-C) Fotomicrografía con inmunorreactividad al vDEP en el lóbulo apical derecho del pulmón (LAD). Las flechas indican neumocitos tipo II con inmunorreactividad.**

En el G3-E-INDEL sólo se identificaron antígenos virales a los 6 DPI en una superficie menor al 30% de las vellosidades yeyunales, localizada principalmente hacia el extremo apical de éstas, casi no se encontró desprendimiento epitelial ni sincitios (figura 27, paneles B y C).





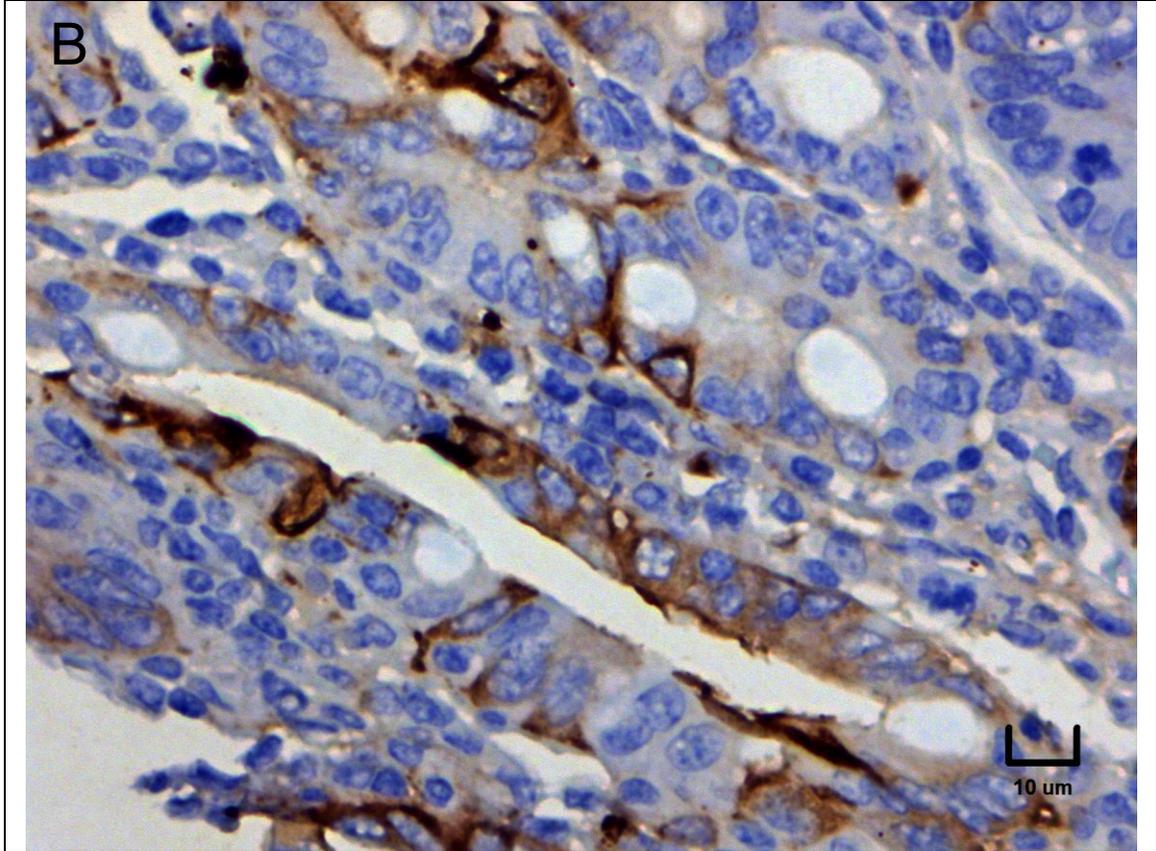
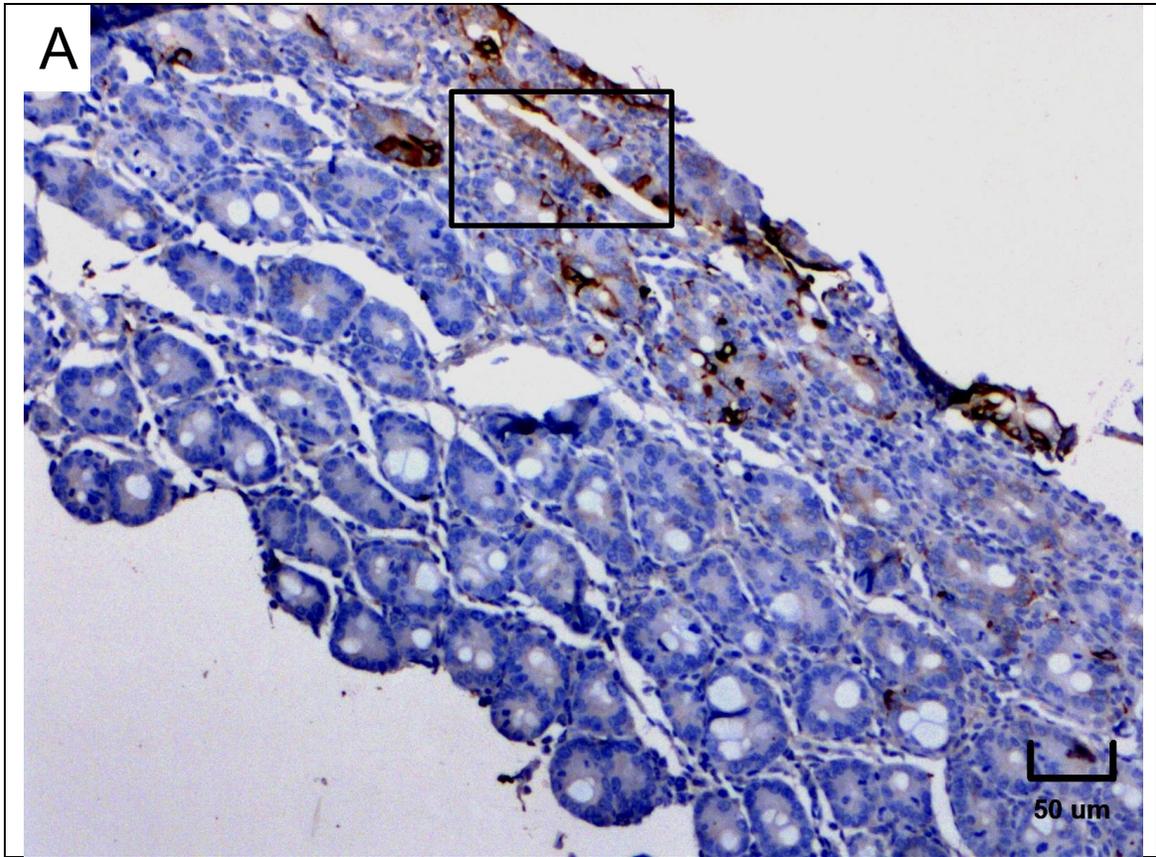


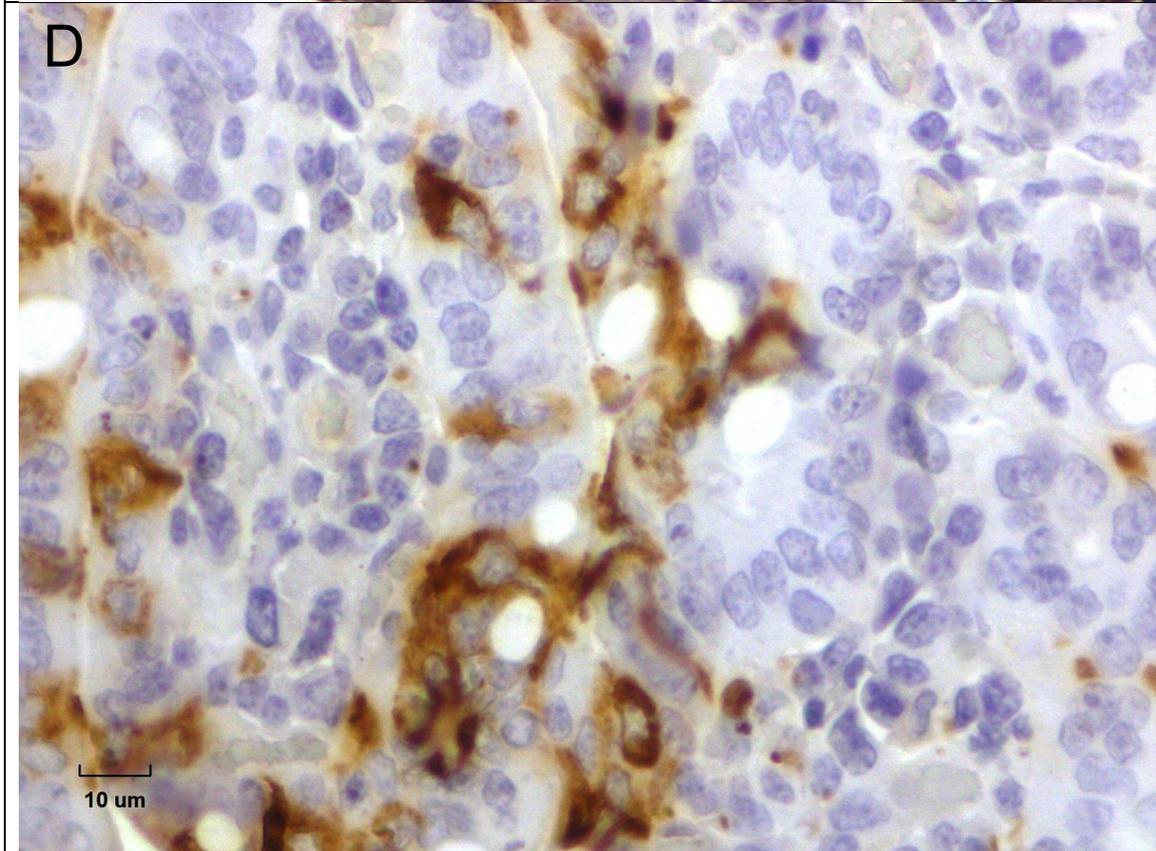
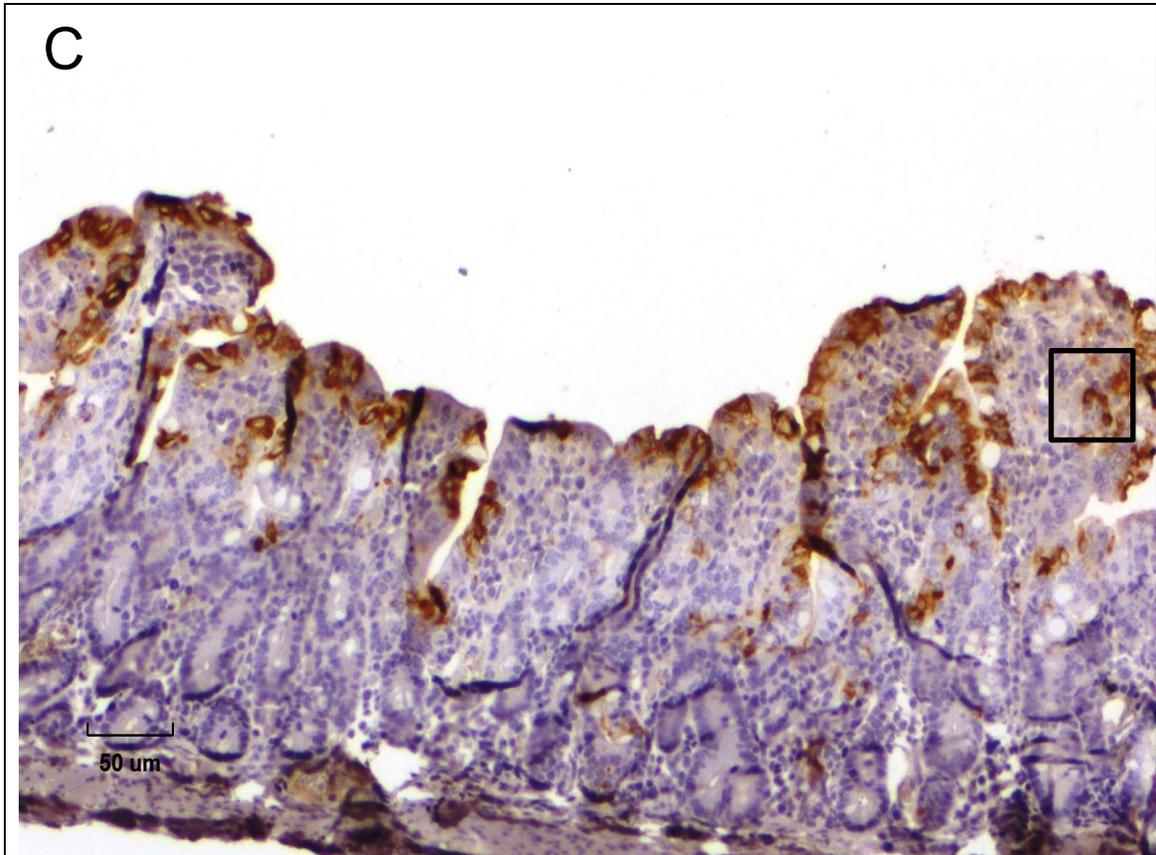
**Figura 27. Inmunorreactividad en enterocitos de yeyuno de lechones del G3-E-INDEL.** Sólo se detectaron enterocitos con inmunorreactividad citoplasmática al vDEP en el extremo apical de las vellosidades yeyunales a los 6 DPI (B-C). Se pueden observar las vellosidades yeyunales a los 3 DPI con pocos cambios histopatológicos (A), sin embargo a los 9 DPI (D) y 12 DPI (E) no se detectó inmunorreactividad al vDEP pero se observó acortamiento y desepitelización apical.

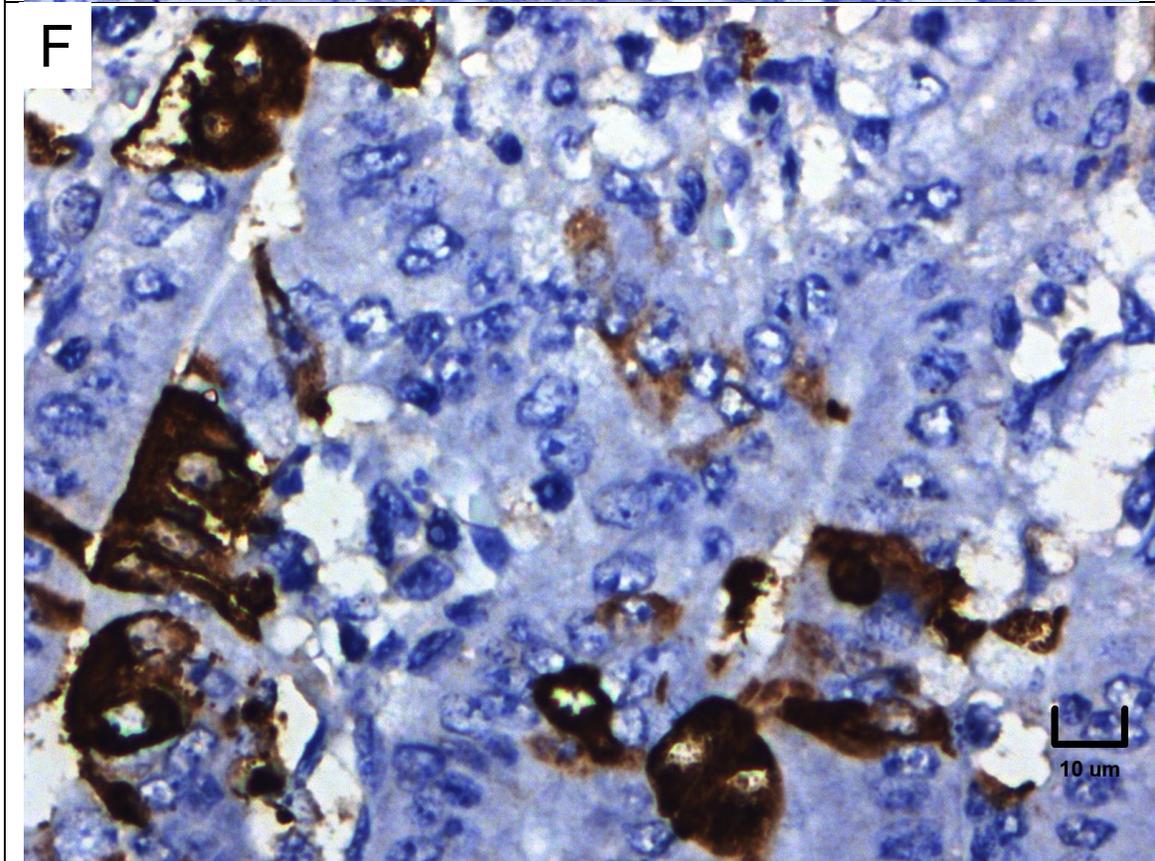
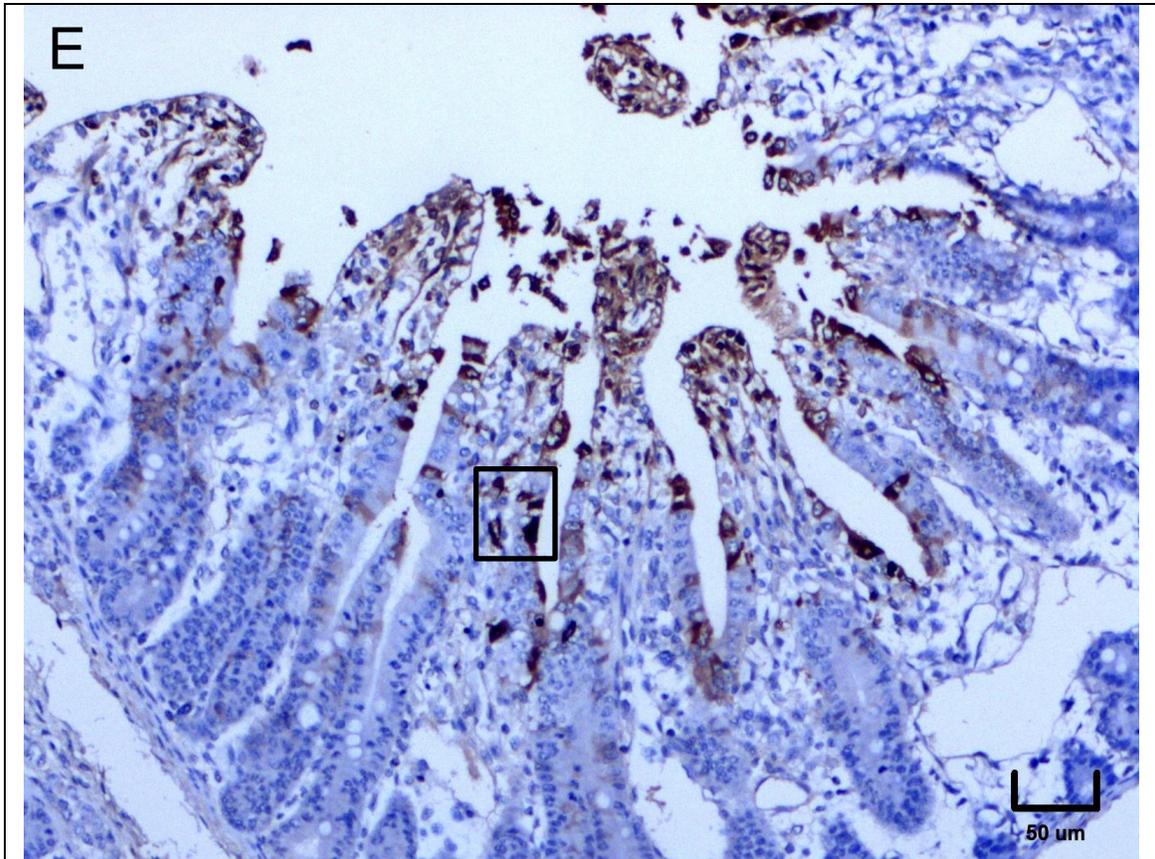
En el G4-NE-INDEL se detectaron antígenos virales del vDEP desde los 3 DPI hasta el final del experimento (9 DPI). A los 3 DPI, la inmunorreactividad fue muy intensa, aunque localizada en menos del 30% de la superficie de las vellosidades yeyunales (figura 28, paneles A y B). A los 6 DPI, el porcentaje de inmunodetección de antígenos del vDEP se incrementó hasta más del 60% de la región apical de las vellosidades yeyunales, ocasionalmente fueron detectados antígenos virales en algunas criptas (figura 28, panel C). A los 9 DPI, los hallazgos fueron similares a los observados a los 6 DPI (figura 28, panel E).

A los 6 y 9 DPI, al menos el 80% de los glomérulos renales de los lechones de este mismo grupo experimental mostraron inmunorreactividad al vDEP, probablemente en las células mesangiales, las cuales fagocitan la membrana basal glomerular para mantener su renovación permanente (figura 29, páneles C al F).

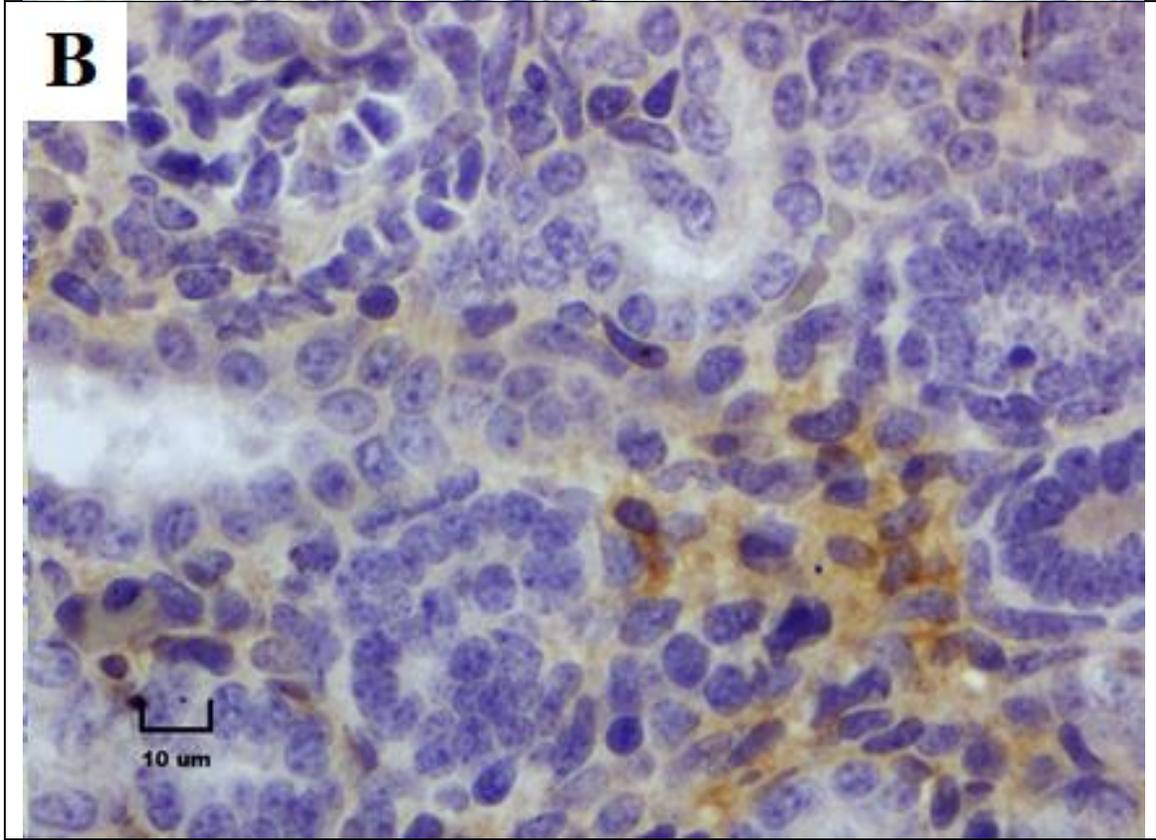
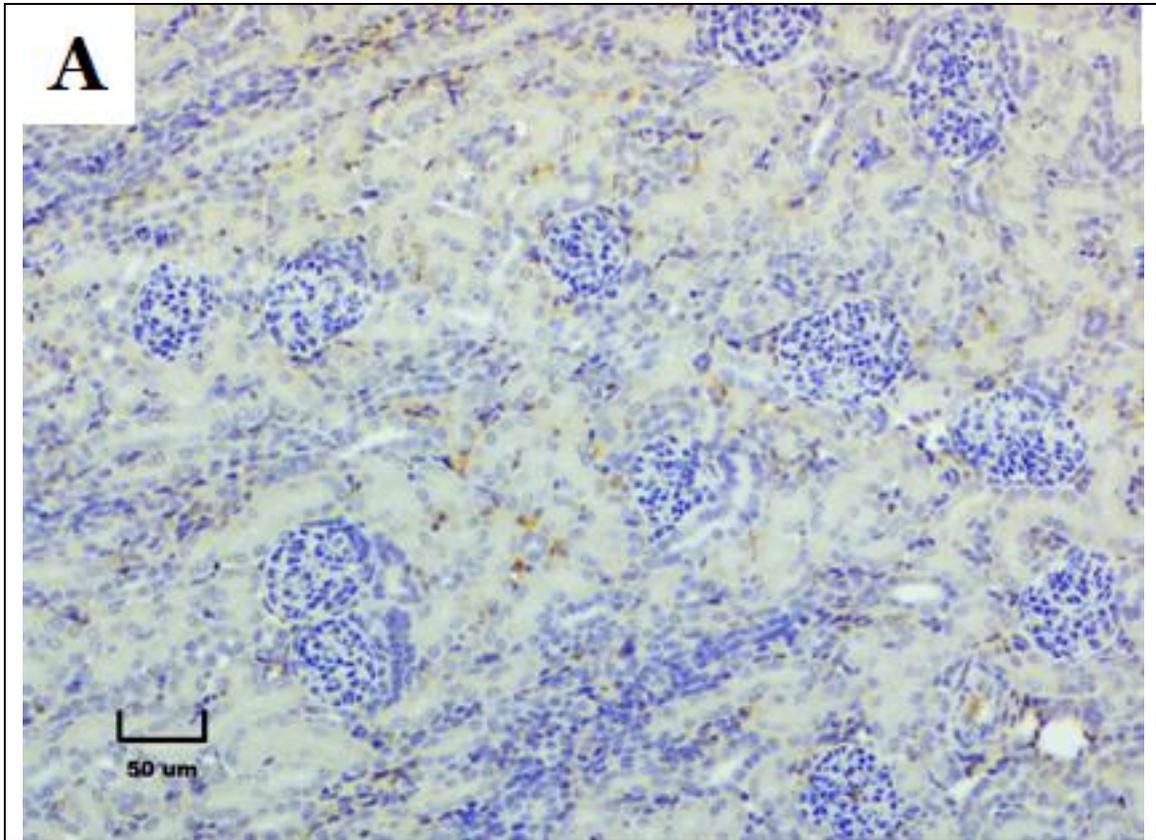
Además, se detectó inmunorreactividad al vDEP en un lechón a los 3 DPI en células de la región paracortical de linfonodo mesentérico (poblada de células dendríticas y linfocitos T) y en el centro germinal de un nódulo linfoide secundario (figura 30). La presencia de esto sugiere que se realizó la presentación antigénica por las células dendríticas y activación de células T cooperadoras. Algunas células T cooperadoras activadas migran al nódulo linfoide (células T cooperadoras foliculares) para activar a células B, las cuales se diferenciarán a células plasmáticas productoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria.

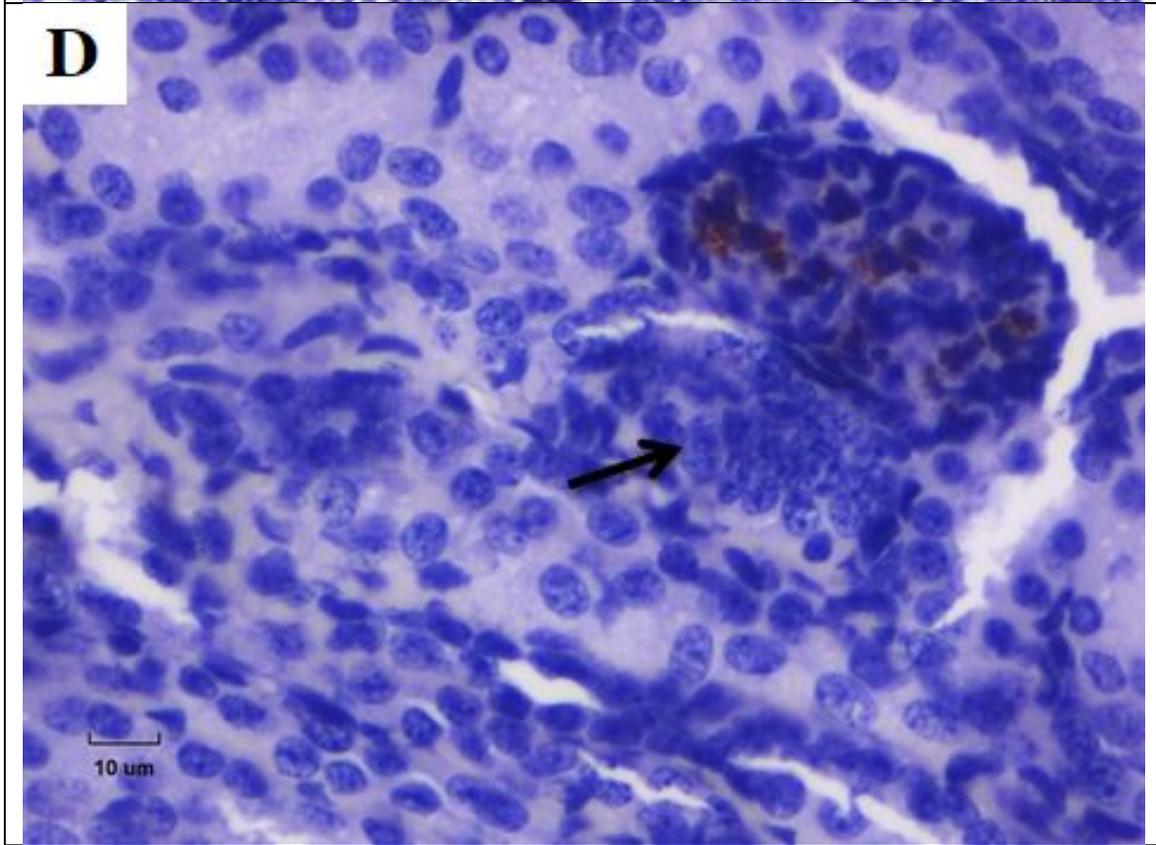
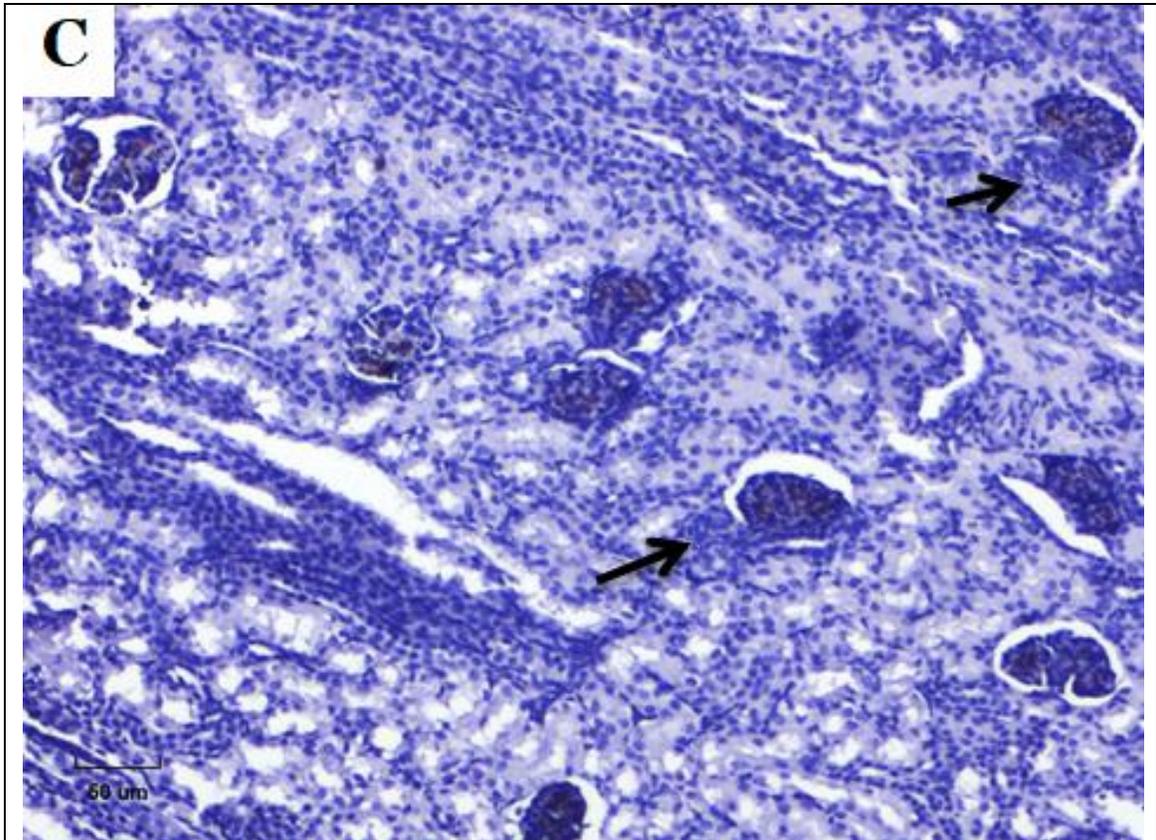


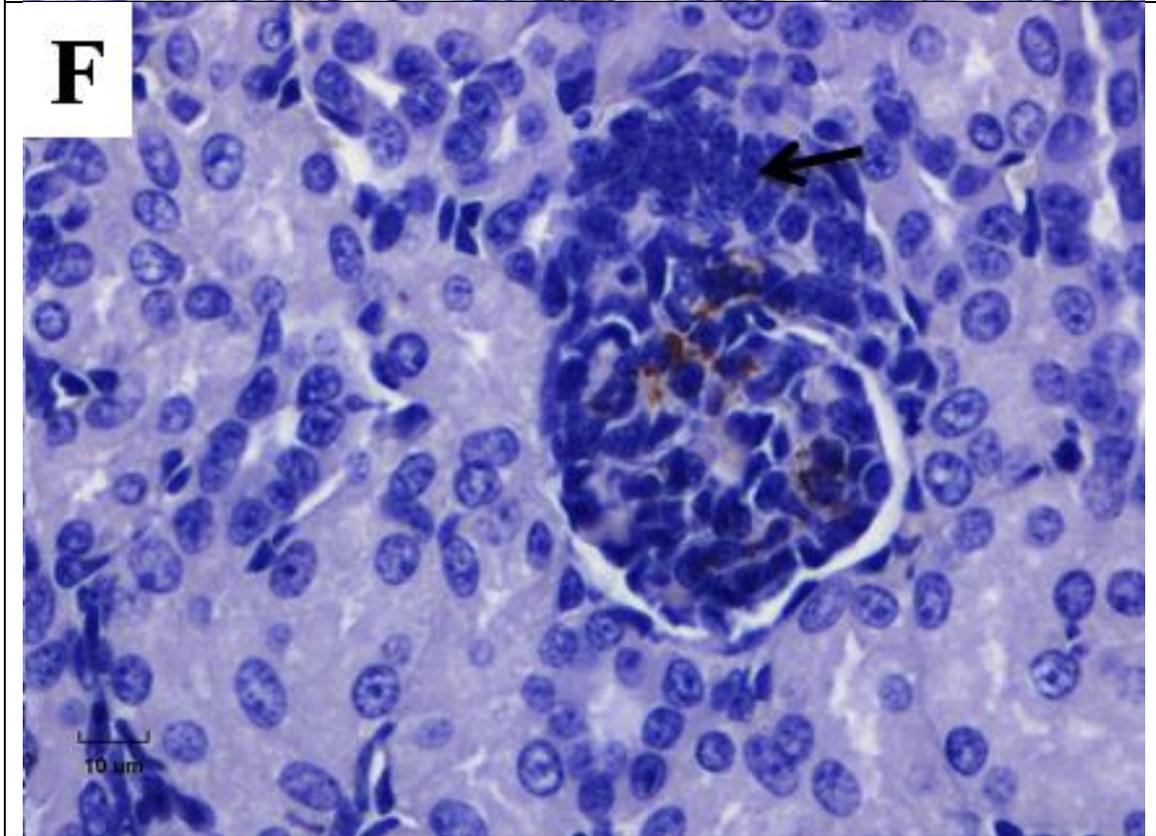
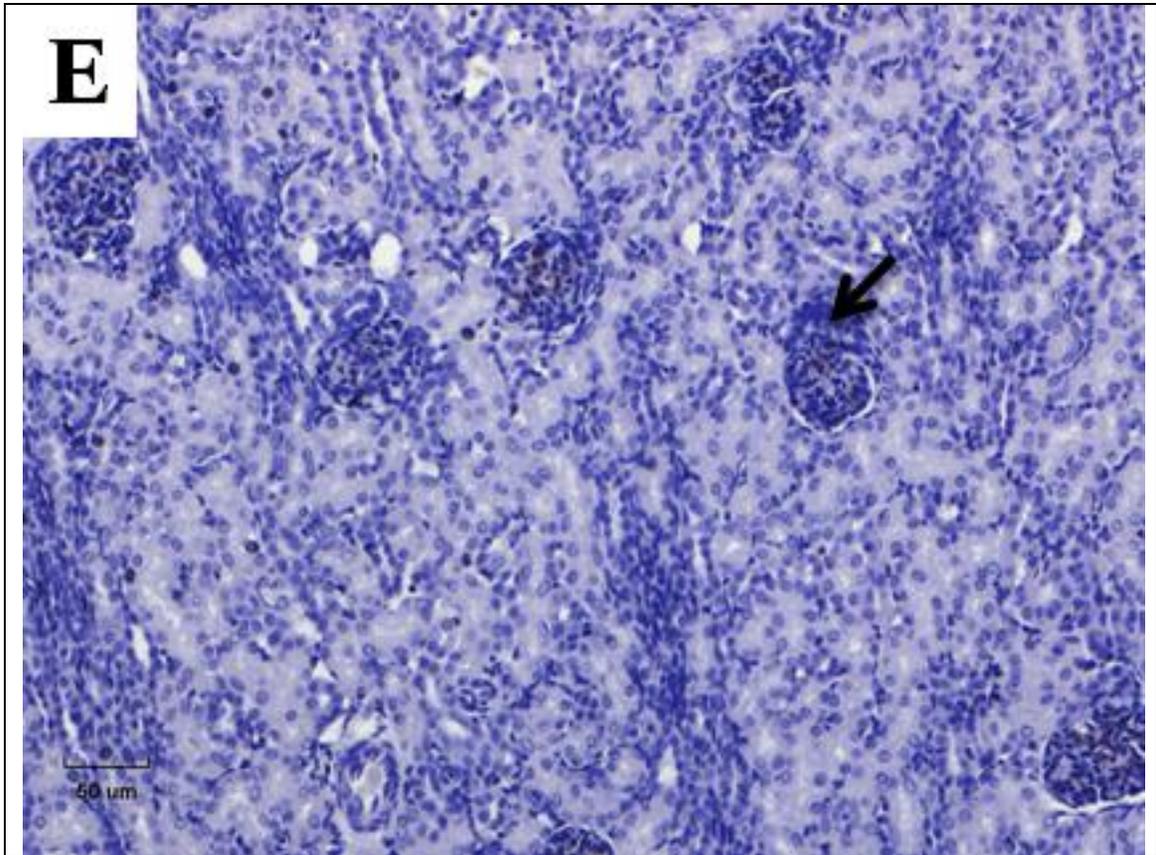




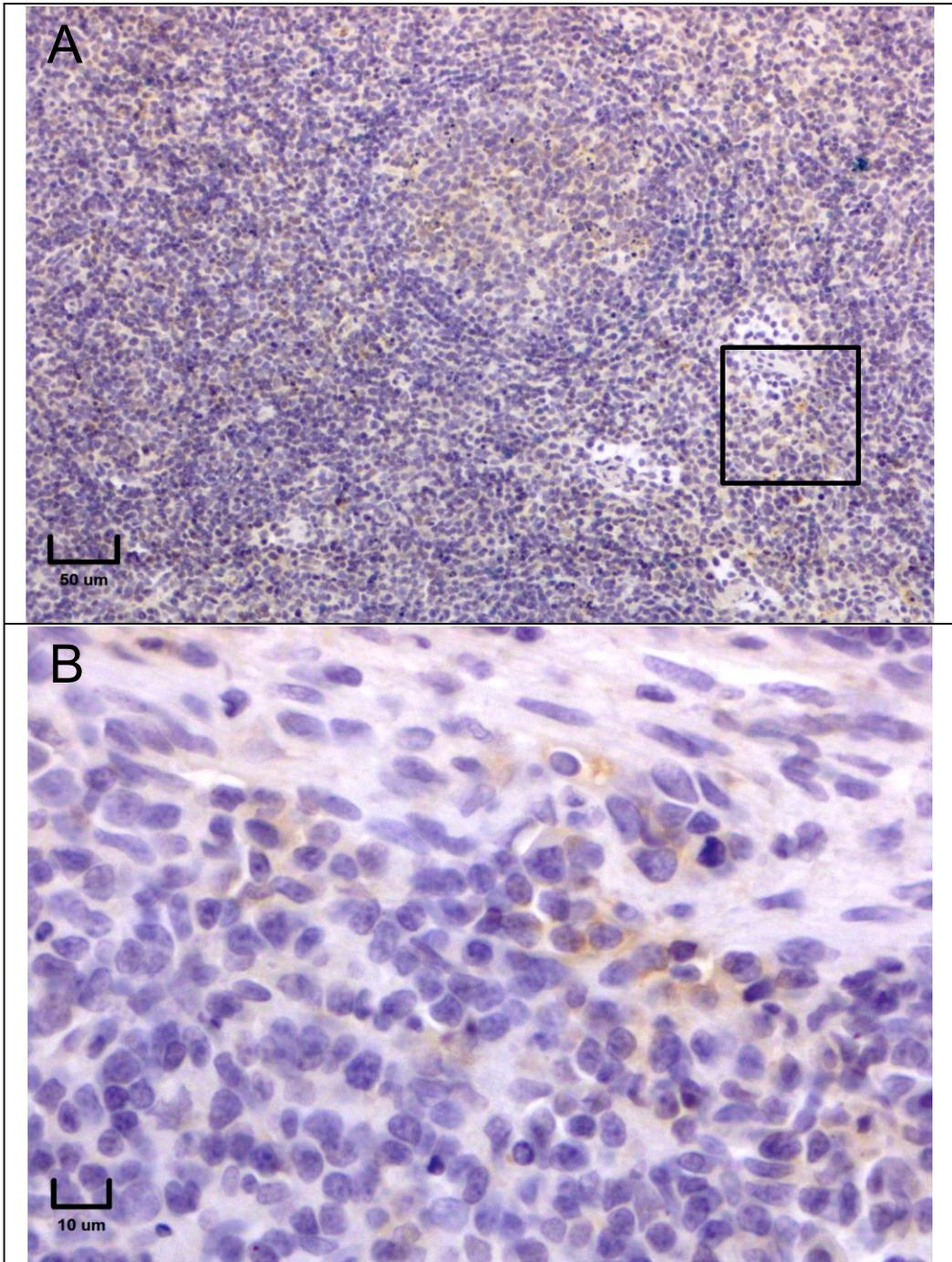
**Figura 28. Inmunorreactividad en enterocitos de yeyuno de lechones del G4-NE-INDEL.** Los enterocitos de extremo apical de las vellosidades yeyunales presentaron inmunorreactividad citoplasmática al vDEP desde los 3 DPI (A-B) hasta los 9 DPI (E-F), que aumentó su número con el paso del tiempo. Nótese que en la parte inferior de la fotomicrografía A, hay numerosas glándulas intestinales y que aquí la inmunorreactividad al vDEP es casi nula. Se puede observar el acortamiento de las vellosidades (C-D, 6 DPI) y la desepitelización del extremo apical (E-F, 9 DPI).

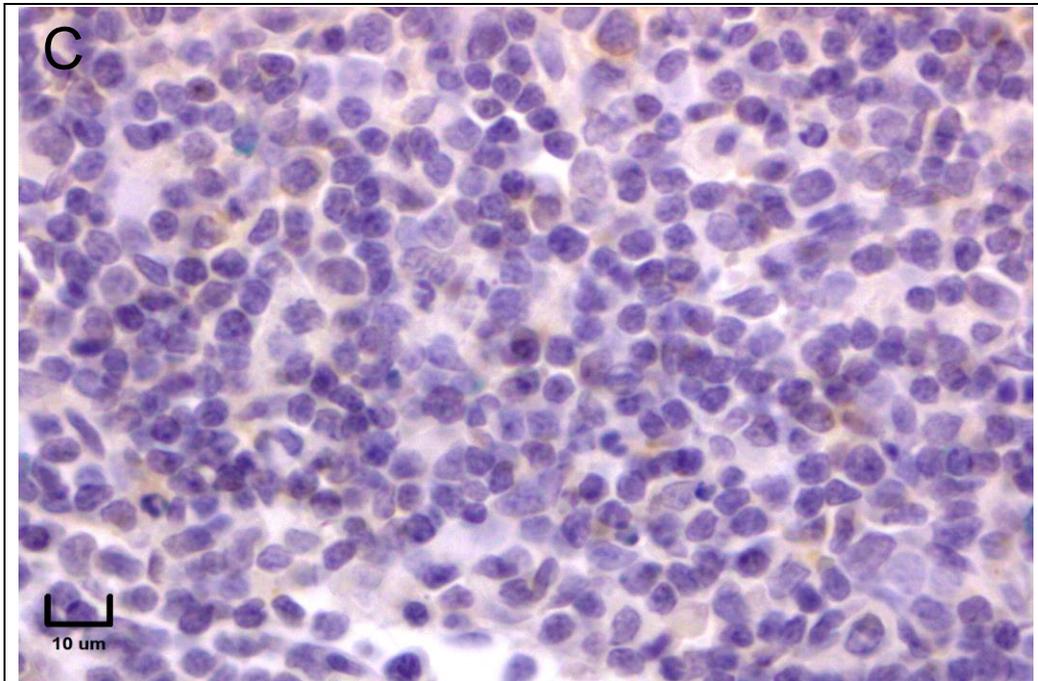






**Figura 29. Detección de inmunorreactividad en riñones de lechones infectados con vDEP.** En el G1-E-EP se observó inmunorreactividad en las células intersticiales y quizá en algunas células epiteliales de los túbulos proximales y distales a los 6 DPI (A-B); mientras que en el G4-NE-INDEL al menos el 80% de los glomérulos renales mostraron inmunorreactividad al vDEP, probablemente en las células mesangiales o del mesangio intraglomerular, las cuales fagocitan la membrana basal glomerular para mantener su renovación permanente. (C-D, 6 DPI y E-F, 9 DPI). En algunos campos microscópicos fue posible observar la mácula densa en aposición al mesangio extraglomerular, lo cual podría interpretarse erróneamente como la formación de sincitios (C-F, flechas).





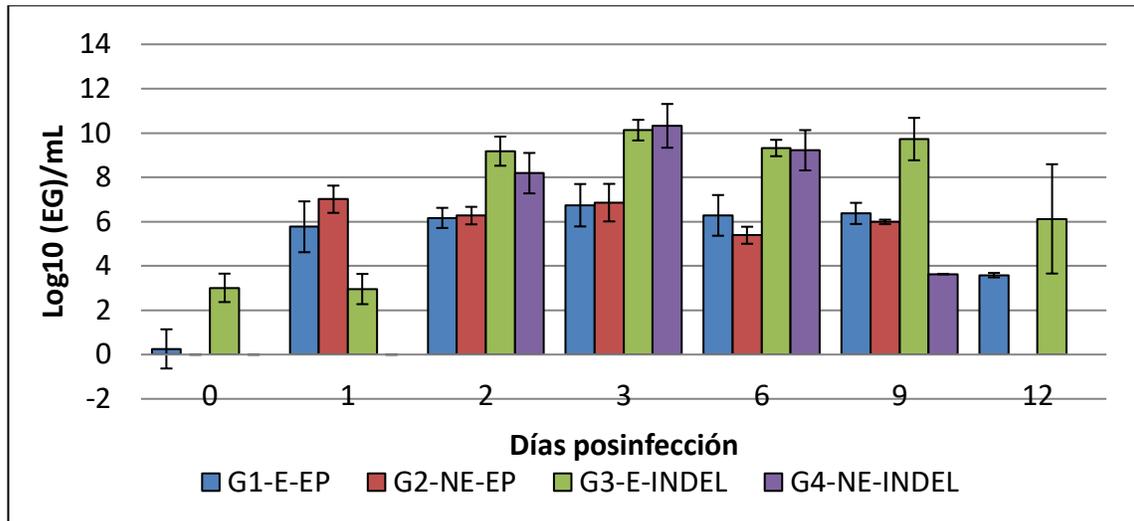
**Figura 30. Inmunorreactividad en linfonodos mesentéricos de lechón a los 3 DPI del G4-E-INDEL.** A) Fotomicrografía de un linfonodo mesentérico, sitio de drenaje de la linfa de las vellosidades y glándulas intestinales. Obsérvese que células de la región paracortical (B) (poblada de células dendríticas y linfocitos T) muestra inmunorreactividad al vDEP al igual que el centro germinal del un nódulo linfoide secundario (C). La presencia de éstos sugiere que ha habido presentación antigénica por las células dendríticas y activación de células T cooperadoras. Algunas células T cooperadoras activadas migran al nódulo linfoide (células T cooperadoras foliculares) para activar a células B, las cuales se diferenciarán a células plasmáticas productoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria.

### VII.5. Excreción y carga viral

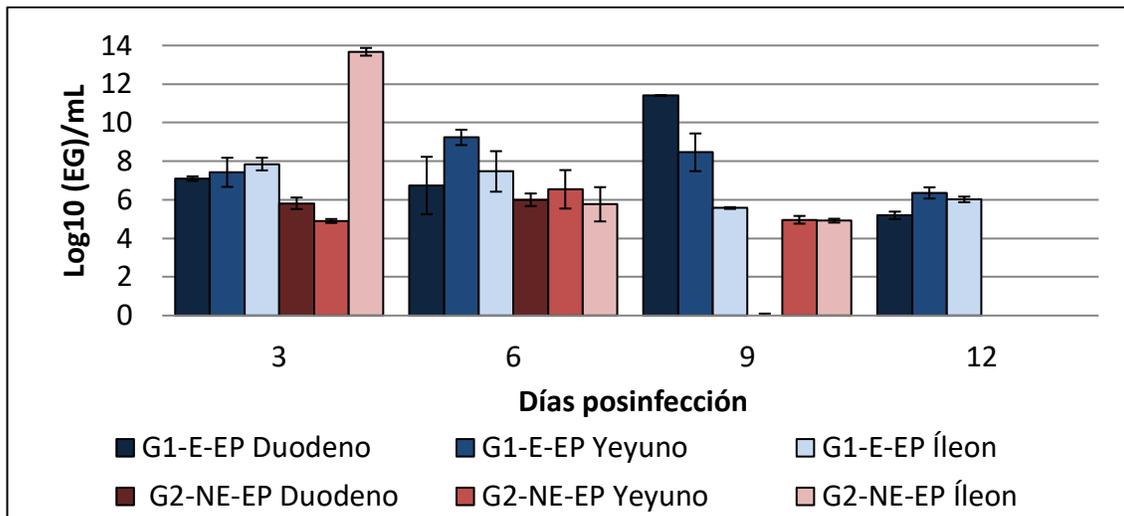
La carga viral detectada en hisopados rectales fue de 2.0 a 11.81 Log<sub>10</sub> EG/mL. Los G1-E-EP y G2-NE-EP excretaron una carga viral de 3.06 a 9.21 Log<sub>10</sub> EG/mL y 5.38 a 8.96 Log<sub>10</sub> EG/mL, respectivamente, mientras que los G3-E-INDEL y G4-NE-INDEL presentaron una excreción viral de 2.0 a 11.73 Log<sub>10</sub> EG/mL y 3.63 a 11.81 Log<sub>10</sub> (EG)/mL, respectivamente (figura 33).

Sin embargo, la carga viral en intestino delgado fue mayor que la detectada en hisopados rectales (figuras 34 y 35). Los G1-E-EP y G2-NE-EP presentaron

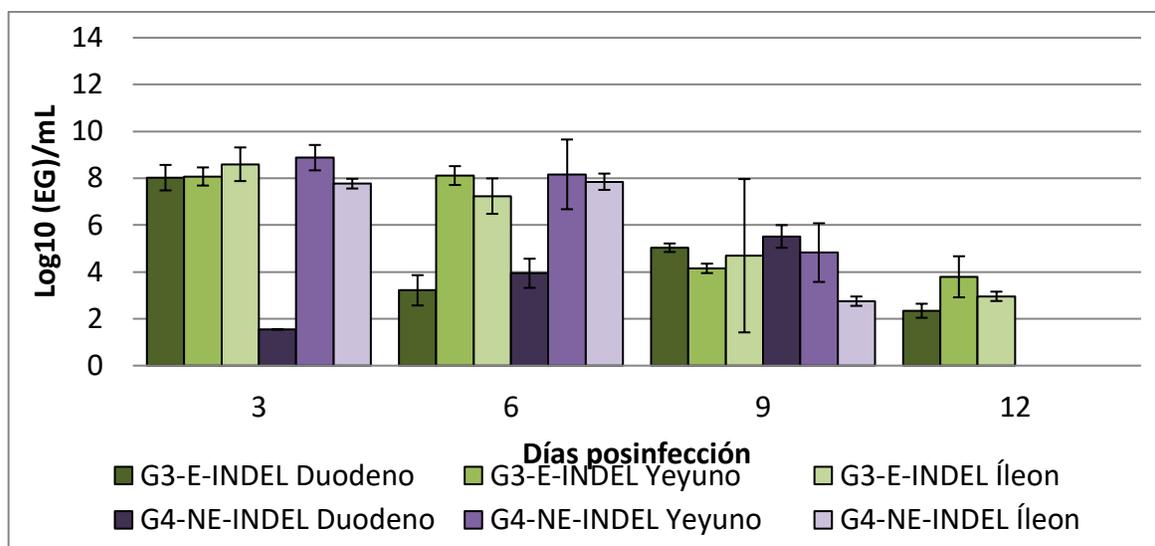
carga viral en intestino delgado de 1.6 a 13.7 Log<sub>10</sub> EG/mL (figura 34), mientras que los G3-E-INDEL y G4-NE-INDEL presentaron 1.5 a 8.9 Log<sub>10</sub> EG/mL (figura 35). En los cuatro grupos experimentales, la mayor carga viral en hisopados rectales e intestino delgado se detectó durante los 6 DPI.



**Figura 31. Carga viral en hisopados rectales de lechones infectados con dos cepas del vDEP.**



**Figura 32. Carga viral en intestino delgado de lechones infectados con una cepa epidémica del vDEP.**



**Figura 33. Carga viral en intestino delgado de lechones infectados con una cepa INDEL del vDEP.**

**Cuadro 8. Análisis estadístico que presenta la probabilidad para los factores: tipo de cepa y estado de exposición sobre la excreción viral en hisopados rectales ( $p \leq 0.05$ ).**

Variable	Valor de p
Tipo de cepa	0.2359
Estado de exposición	0.1340
Interacción cepa y estado de exposición	0.2418

**Cuadro 9. Análisis estadístico que presenta la probabilidad para los factores: tipo de cepa y estado de exposición sobre la excreción viral en duodeno ( $p \leq 0.05$ ).**

Variable	Valor de p
Tipo de cepa	0.0567*
Estado de exposición	0.0467*
Interacción cepa y estado de exposición	0.4559

**Cuadro 10. Análisis estadístico que presenta la probabilidad para los factores: tipo de cepa y estado de exposición sobre la excreción viral en yeyuno ( $p \leq 0.05$ ).**

Variable	Valor de p
Tipo de cepa	0.2304
Estado de exposición	0.9665
Interacción cepa y estado de exposición	0.0519*

**Cuadro 11. Análisis estadístico que presenta la probabilidad para los factores: tipo de cepa y estado de exposición sobre la excreción viral en íleon ( $p \leq 0.05$ ).**

Variable	Valor de p
Tipo de cepa	0.5163
Estado de exposición	0.6895
Interacción cepa y estado de exposición	0.9902

Se realizó un análisis factorial 2 x 2 para identificar el efecto que tuvieron los factores tipo de cepa y estado de exposición de los lechones infectados con el vDEP, sobre la excreción viral en hisopados rectales y cuantificación de carga viral en los diferentes segmentos de intestino delgado. Con los datos obtenidos se determinó que no hay evidencia estadística suficiente ( $p\text{-value} > 0.05$ ) de que el tipo de cepa y el estado de exposición de los lechones infectados con el vDEP tengan efecto sobre la excreción viral detectada en hisopados rectales (cuadro 8), lo que indica que la excreción viral en heces no está asociada con el tipo de cepa circulante y el estado de exposición previa de los individuos infectados.

Sin embargo, con el mismo análisis estadístico se determinó que los factores, de manera independiente, sí tienen efecto sobre la carga viral en duodeno ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ) (cuadro 9). Por el contrario, en yeyuno se determinó que los datos observados proporcionan evidencia de una asociación estadística entre la cepa de infección y el estado de exposición de los lechones, lo que indica que la carga viral en yeyuno tiene un efecto tanto por la cepa viral como de la presencia previa del vDEP (cuadro 10).

## VIII. DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado que los cerdos neonatos son más susceptibles a la infección por el vDEP que los cerdos adultos, ya que los neonatos poseen un pH gástrico alcalino por la ingesta de leche, lo que provee un ambiente favorable para la replicación del virus, induciendo cuadros clínicos y lesiones de mayor severidad, que son favorecidos por la lenta renovación de epitelio intestinal que dura entre cinco a siete días; además, los cerdos neonatos tienen poco control para el mantenimiento del balance hídrico y su sistema inmunológico es inmaduro, todo esto en conjunto los hace altamente susceptibles a la infección del vDEP (Jung et al., 2015; Thomas et al., 2015). Por lo anterior, en el presente estudio se seleccionó un modelo de lechón neonato susceptible (con y sin exposición previa al vDEP) de 5 días de edad para la evaluación de la patogenicidad de dos cepas del vDEP.

En México, la primer cepa del vDEP que se identificó se caracterizó por su alta virulencia y rápida diseminación (Trujillo et al., 2016). Sin embargo, no se ha valorado de forma experimental la virulencia de las diferentes cepas circulantes en nuestro país, por lo que en el presente estudio se evaluó la patogenicidad de dos cepas del vDEP, aisladas a partir de muestras de dos brotes ocurridos en México.

Los análisis filogenéticos han agrupado al vDEP en dos genogrupos diferentes, G1 y G2, este último considerado como altamente virulento; cada genogrupo está dividido en subgrupos a y b. Además, se han identificado cepas que presentan inserciones o deleciones en el gen S, llamadas cepas S-INDEL. La cepa epidémica PEDV/MEX/MICH/01/2013 se agrupa con la cepa USA/Indiana34/2013 y la PC21A, los análisis filogenéticos de sus genomas completos los agrupan en el genogrupo G2b junto con otras cepas estadounidenses. Por otra parte, la cepa INDEL PEDV/MEX/VER/01/2014 se clasificó en el grupo INDEL, que está integrado por las cepas identificadas en Europa y América, como la cepa OH851 y la cepa Iowa106 (Chen et al., 2016). Con dichos análisis se ha demostrado que al menos dos genogrupos genéticamente diferentes del vDEP han estado circulando en México (Lara-Romero et al., 2018).

Los G1-E-EP y G2-NE-EP inoculados con la cepa epidémica presentaron diarrea durante todo el experimento, el cuadro clínico fue más severo durante los primeros 4 DPI, que se caracterizó por diarrea acuosa, vómito, hipotermia y anorexia; esto es similar a lo que se describió previamente en un estudio de infección experimental con una cepa epidémica de EEUU, en el cual los animales presentaron diarrea acuosa severa e hipotermia (Lin et al., 2015).

En otro estudio, lechones infectados experimentalmente con una cepa INDEL originaria de EEUU presentaron diarrea líquida durante los primeros 3 DPI y presentaron hipotermia durante 1 a 6 DPI. Esto difiere con el presente estudio, en el que los lechones que fueron infectados con la cepa INDEL sólo presentaron diarrea pastosa durante los primeros 6 DPI y presentaron hipotermia después de los 6 DPI. De estos, el G4-NE-INDEL, que no poseía inmunidad lactogénica previa, presentó estos signos por tiempo más prolongado. Por lo tanto, la dosis del inóculo, el estado inmunológico de los animales, los polimorfismos nucleotídicos entre las cepas epidémicas y S-INDEL podrían contribuir a las variaciones observadas entre los estudios (Lin et al., 2015).

En el examen macroscópico de los lechones infectados experimentalmente con la cepa PC21A del vDEP, se observó el estómago lleno de leche cuajada, posiblemente debido a la reducción de la peristalsis intestinal, paredes intestinales y colónicas delgadas y transparentes, con acumulación de grandes cantidades de líquido amarillento en la luz intestinal; las lesiones histológicas incluyeron yeyunitis atrófica severa, difusa aguda y vacuolación leve de enterocitos y edema subepitelial en ciego y colon. Sin embargo, otros órganos no presentaron lesiones (Jung et al., 2015). En el presente estudio, durante la necropsia se identificaron paredes intestinales pálidas y transparentes con acumulación de gas y heces acuosas amarillentas principalmente en intestino delgado; asimismo, los demás órganos presentaron alteraciones durante la inspección, que fueron confirmadas durante el análisis histológico, lo que sugiere que la cepa epidémica mexicana PEDV/MEX/MICH/01/2013 tiene tropismo por el intestino delgado y otros órganos, con lo que se puede inferir que se produjo la falla sistémica y un cuadro clínico más complejo que el que producen otras cepas del vDEP del mismo genogrupo.

En un estudio comparativo entre la cepa S-INDEL Iowa106 y la cepa del genogrupo epidémico G2b PC21A, los cerdos inoculados no presentaron diferencias en las lesiones durante la inspección macroscópica, caracterizadas por paredes del intestino delgado transparentes y delgadas, sin lesiones importantes en otros órganos principales; el examen microscópico reveló enteritis subaguda extensa con acortamiento y fusión de las vellosidades, vacuolización y exfoliación de enterocitos (Lin et al., 2015). Sin embargo, en el presente estudio los cerdos inoculados con la cepa INDEL presentaron lesiones intestinales menos severas que los cerdos inoculados con la cepa epidémica.

Adicionalmente, en el presente estudio se observaron lesiones macroscópicas severas y datos histopatológicos que indican daño sistémico en los cuatro grupos experimentales. La disminución en el volumen sanguíneo conlleva hipotensión cardíaca que da como resultado una perfusión inadecuada de los órganos, hipoxia y puede conducir a disfunción o muerte del tejido. La presencia de riñones cianóticos e infartos en hígado sugiere la escasa perfusión y transporte de oxígeno hacia estos órganos, esto debido posiblemente por la congestión pulmonar generalizada y la deshidratación severa que produjeron insuficiencia cardiorrespiratoria y disminución del transporte de oxígeno en la sangre (Kumar et al., 2010). Con estos datos se puede inferir que las cepas circulantes en México tienen distribución hacia otros órganos y que pueden comprometer el funcionamiento sistémico de un individuo susceptible naturalmente infectado.

En un estudio en el que se comparó una cepa epidémica y una cepa INDEL del vDEP, se identificó la distribución de antígenos virales por IHQ. En los grupos inoculados con la cepa INDEL se identificó que el virus se distribuía entre el 30% y el 50% de las vellosidades del yeyuno de los lechones infectados y no se ubicó en las criptas, mientras que la cepa epidémica se distribuyó en más del 60% de las vellosidades yeyunales y también se identificó en criptas (Chen et al., 2016; Lin et al., 2015). En el presente estudio, los grupos inoculados con la cepa INDEL presentaron una distribución de antígenos virales en 30 al 60% de las vellosidades yeyunales y no se detectó en criptas, mientras que la cepa epidémica se distribuyó

desde el 30% hasta más del 60% en las vellosidades intestinales de yeyuno y se identificó en colon ascendente.

Los G3-E-INDEL y G4-NE-EP presentaron mayor excreción viral, no obstante, presentaron un cuadro clínico menos severo y menor carga viral en intestino delgado, con lo cual se puede inferir que la cepa INDEL tiene menor adaptación para replicarse en intestino de lechón y menor virulencia, con respecto a la cepa epidémica. La detección de mayor carga viral en intestino delgado coincide con los signos y lesiones más severos identificados durante el presente estudio; estos resultados coinciden con un estudio realizado en lechones, en el que se comparó la virulencia de dos cepas aisladas en EEUU en el cual se detectó mayor carga viral en intestino delgado en cerdos inoculados con la cepa INDEL en comparación con cerdos inoculados con la cepa epidémica (Jung y Saif, 2015, Lin et al., 2015).

Es importante destacar que en la literatura no se había descrito que el vDEP produjera lesiones fuera de intestino delgado y colon, ni se habían identificado antígenos virales en órganos como linfonodos y riñón, lo que hace evidente la necesidad de realizar estudios, como el presente, de las diferentes cepas circulantes en el país para identificar el potencial de riesgo hacia individuos susceptibles, además del aporte hecho para comprender mejor la patogenia y respuesta humoral hacia el vDEP.

## **IX. CONCLUSIONES**

La virulencia de la cepa INDEL PEDV/MEX/VER/01/2014 es menor que la de la cepa epidémica PEDV/MEX/MICH/01/2013 de México, sin embargo, la infección causó mortalidad y lesiones severas en los individuos más susceptibles (sin exposición previa al vDEP).

Los cerdos sin exposición previa a vDEP fueron más susceptibles que los que fueron previamente expuestos a este virus, lo que muestra la importancia de la ingesta de calostro y leche para la transferencia de inmunidad lactogénica al lechón.

La severidad del cuadro clínico provocado por el vDEP depende de la cepa viral, el estado inmunológico del lechón, entre otras variables.

Las lesiones macroscópicas severas, los datos histopatológicos y los antígenos virales identificados en los órganos de sistema digestivo, respiratorio, urinario y linfático de los lechones infectados con la cepa epidémica y la cepa INDEL circulantes en México, indican daño sistémico y sugieren cambios adaptativos y modificaciones en el tropismo del vDEP.

La carga viral del vDEP en yeyuno proporcionó evidencia de una asociación estadística entre la cepa de infección y el estado de exposición de los lechones.

## X. REFERENCIAS

1. Alonso C, Raynor PC, Davies PR, Torremorell M. (2015). Concentration, Size Distribution, and Infectivity of Airborne Particles Carrying Swine Viruses. *PLoS ONE* 10(8): e0135675.
2. Alonso, C., Goede, D. P., Morrison, R. B., Davies, P. R., Rovira, A., Marthaler, D. G., & Torremorell, M. (2014). Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Veterinary Research*, 45 (1), 73.
3. Aluja, A. S. y Constantino-Casas, F. (2002). Técnicas de necropsia de los animales domésticos. Ed. Manual Moderno. México, 3:49-62.
4. Buchwalow, I. B., Bôcker, W. (2010). *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Ed. Springer. Alemania: 1-67.
5. Burlison, F., Chambers, T. M., Wiedbrauk, D. L. (1992). *Virology: A laboratory manual*. Academic Press Ed. California. 125-129.
6. Carvajal, A. Argüello, H., Martínez-Lobo, F. J., Costillas, S., Miranda, R., G de Nova, P. J., Rubio, P. (2015). Porcine epidemic diarrhea: new insights into an old disease. *Porcine Health Management*. 1:12.
7. Chang, S., Bae, J. L., Kang, T. J., Kim, J., Chung, G. H., Lim, C. W., Laude, H., Yang, M. S., Jang, Y. S. (2002). Identification of the Epitope Region Capable of Inducing Neutralizing Antibodies against the Porcine Epidemic Diarrhea Virus. *Mol. Cells*, 14(2): 295-299.
8. Chen J., Wang, C., Shi, H., Qiu, H., Liu, S., Chen, X., Zhang, Z., Feng, L. (2010). Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Arch. Virol*. 155:1471–1476.
9. Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J. T., Stensland, W. R., Pillatzki, A. E., Gauger, P. C., Schwartz, K. J., Madson, D., Yoon, K. J., Stevenson, G. W., Burrough, E. R., Harmon, K. M., Main, R. G., Zhang, J. (2014) Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol*, 52(1):234-43.
10. Davies, P. R. (2015). The dilemma of rare events: Porcine epidemic diarrhea virus in North America. *Preventive Veterinary Medicine*. 122: 235–241.
11. Deng, F., Ye, G., Liu, Q., Navid, M., Zhong, X., Li, Y., Wan, C., Xiao, S., He, Q., Fu, Z., Peng, G. (2016). Identification and comparison of receptor binding characteristics of the spike protein of two porcine epidemic diarrhea virus strains. *Viruses*, 8: 55.
12. Diel, D., Lawson, S., Okda, F., Singrey, A., Clement, T., Fernandes, M., Hennings, J., Nelson, E. (2016). Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Research*, 226: 60–70.
13. Ducatelle, W., Coussement, P., Debouck P. y Hooren, J. (1982). Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron Microscopic Study. *Vet. Pathol.*: 57-66
14. Farrell, E. R. (2010). *RNA Methodologies*. 4<sup>a</sup> ed., Academic Press.

15. Hoffmann, M., Wyler, R. (1989). Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDv). *Vet. Microbiol.* 20: 131-142.
16. Hoffmann M., Wyler R. (1988). Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol.* 26(11): 2235–2239.
17. Huan, C., Wang, Y., Ni, B., Wang, R., Huang, L., Ren, X. F., Tong, G. Z., Ding, C., Fan, H. J., Mao, X. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus uses cell-surface heparan sulfate as an attachment factor. *Arch. Virol.* 160:1621–1628.
18. Huang Y. W., Dickerman, A. W., Piñeyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., Meng, X. J. (2013). Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* 4(5):00737-13.
19. Jung, K., Annamalai, T., Lu, Z. & Saif, L. J. (2015). Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. *Vet Microbiol* 178, 31–40.
20. Jung, K., Saif, L. J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology,
21. Kumar, G. L. (2009). Immunohistochemical (IHC) staining methods: Education guide. Ed. Dako. EEUU: 1-41.
22. Kumar, V., Abbas, A. K., y Aster, J. C. (2010). Robbins and Cotran pathologic basis of disease (Eighth edition.). Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders.
23. Langel, S. N., Paim, F. Ch., Lager, K. M., Vlasova, A. N. Saif, L. J. (2016). Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDv): Historical and current concepts. *Virus Research.* 226 93–107.
24. Lara-Romero, R., Gómez-Núñez, L., Cerriteño-Sánchez, J. L., Márquez-Valdelamar, L., Mendoza-Elvira, S. et al. (2018). Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013–2016. *Virus Genes.* 54 (2): 215-224.
25. Lee, Ch. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J.* 22; 12:193.
26. Li B. X., Ge, J. W., Li, Y. J. (2007). Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology.* 365: 166–172. 10.1016/j.virol.2007.03.031
27. Li, R., Qiao, S., Yang, Y., Su, Y., Zhao, P., Zhou, E., Zhang, G. (2014). Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in central China based on the ORF3 gene and the main neutralization epitopes. *Arch Virol.* 159:1057–1065.
28. Li, W., Luo, R., He, Q., van Kuppeveld, F. J. M., Rottier, P. J. M., Bosch, B. J. (2017). Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry. *Virus Research* 235: 6–13.
29. Li, W., van Kuppeveld, F. J. M., He, Q., Rottier, P. J. M., Bosch, B. J. (2016) Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res.* 2; 226:117-127.
30. Lin, C. M., Annamalai, T., Liu, X., Gao, X., Lu, Z., El-Tholoth, M., Wang, Q. (2015). Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. *Veterinary Research*, 46, 134.

31. Lin, C. M., Saif, L. J., Marthaler, D., Wang, Q. (2016). Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Res.* 2;226:20-39
32. Liu, B., Shi, H., Chen, J., Zhang, X., Ji, Z., et al. (2017). Neutralization of genotype 2 porcine epidemic diarrhea virus strains by a novel monoclonal antibody. *Virology* 507: 257–262.
33. Lowe J., Gauger, P., Harmon, K., Zhang, J., Connor, J. et al. (2014). Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection. *United States Emerg Infect Dis.* 20:872–4.
34. Madson D. M., Magstadt, D. R., Arruda, P. H., Hoang, H., Sun, D. et al. (2014) Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/ 2013) in 3-week-old weaned pigs. *Vet Microbiol.* 174: 60–68.
35. Matsuyama S, Taguchi F. (2009). Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *J. Virol.* 83:11133–11141.
36. Millet, J. K., Whittaker, G. R. (2015). Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, 202: 120–134.
37. Olanratmanee, E. O., Kunavongkrit, A., Tummaruk, P. (2010). Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Animal Reproduction Science* 122: 42–51.
38. Park, J. E., Cruz, D. J. M., Shin, H. J. (2010) Trypsin-induced hemagglutination activity of porcine epidemic diarrhea virus. *Arch Virol.* 155: 595.
39. Plumb, D. C. (2010). *Manual de farmacología veterinaria.* E. Intermedica. 6ta Ed. Buenos Aires. 142-143, 1087-1091.
40. Prophet, E. B. (1995). *Métodos histológicos.* Ed. AFIP. EEUU. 280 p.
41. Saif, L. J., Pensaert, M. B., Sestack, K, Yeo, S. G., Jung, K. Corona viruses. In: Straw B. E., Zimmerman J. J., Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson G. W., editors. *Diseases of Swine.* Ames: Wiley-Blackwell; 2012. p. 501–24.
42. Song, D., Moon, H., Kang, B. (2015). Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res.* 4(2):166-76.
43. Song, D., Kang, B. K., Lee, S. S., Yang, J. S., Moon, H. J. et al. (2006). Use of an internal control in a quantitative RT-PCR assay for quantitation of porcine epidemic diarrhea virus shedding in pigs. *Journal of Virological Methods* 133: 27–33.
44. Stott, C. Temeeyasen, G., Tripipat, T., Kaewprommal, P., Tantituvanont, A. et al. (2017). Evolutionary and epidemiological analyses based on spike genes of porcine epidemic diarrhea virus circulating in Thailand in 2008–2015. *Infection, Genetics and Evolution.* 50: 70–76.
45. Thomas, J. T., Chen, Q., Gauger, P. C., Giménez-Lirola, L. G., Sinha, A., Harmon, K. M., Madson, D. M., Burrough, E. R., Magstadt, D. R. et al. (2015). Effect of porcine epidemic diarrhea virus infectious doses on infection outcomes in naïve conventional neonatal and weaned pigs. *PLoS One* 10, e0139266.
46. Trujillo-Ortega, M. E., Beltrán-Figueroa, R., García-Hernández, M. E., Juárez-Ramírez, M., Sotomayor-González, A. et al. (2016). Isolation and

- characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Veterinary Research*. 12:132.
47. Van Reeth, K., Pensaert, M. (1994). Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Vet. Rec.*135:594–597.
  48. Wang, L., Zhang, Y., Byrum, B. (2014). Development and evaluation of a duplex real-time RT-PCR for detection and differentiation of virulent and variant strains of porcine epidemic diarrhea viruses from the United States. *J Virol Methods*: 207 154–157.
  49. Wicht, O., Li, W., Willems, L., Meuleman, T. J., Wubbolts, R. W., van Kuppeveld, F. J. M., Bosch, B. J. (2014). Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. *Journal of Virology*. 88 (14), 7952–7961.
  50. Zamolodchikova, T. S. (2012). Serine proteases of small intestine mucosa localization, functional properties, and physiological role. *Biochemistry*. 77:820–829.
  51. Zhang, Q., Yoo, D. (2016). Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling. *Virus Research* 226: 128–141.