



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTANDARIZACIÓN, EVALUACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA  
TÉCNICA RT-PCR MÚLTIPLE PARA EL DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DE DIARREA EPIDÉMICA PORCINA (DEP),  
GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE DEL CERDO (GET) Y  
ROTAVIROSIS PORCINA (RVP)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

**MONTSERRAT AMARANTA VELÁZQUEZ VÁZQUEZ**

ASESORES

M.V.Z., PhD., cert. Pedro Juan Bautista de la Salle Fernando Pradal  
Roa

M. V. Z., M. en C. Claudia Mariana Pérez Rivera  
M. V. Z., M. en C. Saúl Reveles Félix

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., agosto de 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.

## DEDICATORIA

*Estoy orgullosa de que hayas sido perseverante y resiliente no sólo en este proyecto, sino a lo largo de tu vida. Me enorgullece que, a pesar de que la adversidad y las dudas se hicieran presentes en estos 25 años no desistieras. Estoy orgullosa de que enfrentarás a las personas que cuestionan tu inteligencia y tu potencial, que atacan la forma en la que te expresas, que intentan arrebatarte tus virtudes y tu honor porque temen a todo lo que es distinto a ellos, estoy orgullosa de que demuestres que todos ellos están mal. En estos dos años en los que estuviste elaborando este trabajo creciste, te fortaleciste y aprendiste de tus errores, pero sobre todo de ti misma, y por eso esta tesis está dedicada a ti, Montserrat Amaranta Velázquez Vázquez. Que sea un recordatorio de que no hay nada que no puedas alcanzar.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Carmen Vázquez y Manuel Velázquez. Sin su amor, su dedicación, sus sacrificios, su disciplina, su fe y su esperanza yo no sería la persona que logré ser. Este trabajo, esta carrera y este amor por la vida es gracias a ustedes. A lo largo de casi 25 años hemos logrado esto juntos, han logrado que este pequeño ser humano alcanzara una de sus mayores metas, me formaron en todos los sentidos y me dieron la confianza de hacer un trabajo de esta magnitud, nunca dudaron de mí y me dieron fuerzas cuando más lo necesité, incluso cuando ustedes no tenían idea de lo que pudiera o no pasar. Este trabajo no sólo es mío, es de los tres, pues no hay un yo sin ustedes dos. Nuestra pequeña familia ha trascendido, hemos sobrellevado muchos problemas juntos, hemos salido adelante, y hoy, gracias a todo lo que han hecho por mí, tenemos un logro más.

A mi familia: Alicia Martínez, Manuel Velázquez del Olmo, Aurora Vázquez, Lucía Vázquez, Rosa María Vázquez, Dulce Vázquez, Miguel Gómez (mi primo y mi tío), Gloria Velázquez, Rocío Velázquez, Patricia Velázquez, Laura Gómez, Demetrio Gil, Karla Gil, José María Gil, Luisa Vázquez e Ingrid Altamirano, pues quién necesita un equipo de porristas teniéndolos a ustedes. Gracias por todo el apoyo, el cariño y los consejos que me han dado.

A la Asociación IPVS México 2014, por proveer el recurso económico para poder llevar a cabo este proyecto. A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pues es mi segundo hogar y me permitió estudiar la carrera que tanto me apasiona. A la Unidad de Investigación de la facultad, por brindarme las muestras que necesité en mi proyecto de tesis, y al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, por permitirme desarrollar la tesis en sus instalaciones.

A Mariana Pérez Rivera y Saúl Reveles, no sólo fueron mis asesores, también son mis amigos y mi familia del equipo de investigación. Ustedes se encargaron de mi formación académica luego de finalizar mis créditos, me dieron muchísimos ánimos y cariño, me enseñaron cómo preparar una PCR y cómo ser una mejor versión de mí, me trataron con amor y me ayudaron a tener mucha más confianza

en todos los sentidos; en pocas palabras fueron mis papás postizos durante dos años. A Selene Quintana, mi amiga, mi confidente y “la CÑORA”, me ayudaste mucho en mis momentos de crisis y fuiste mi cómplice en muchas ocasiones. Los tres fueron y son mi familia, y este trabajo no pudo haberse concretado sin ustedes, y no hay día en el que no le agradezca a la vida por haberlos conocido. Los adoro y me da gusto haber formado el lazo que tenemos ahora.

Al Dr. Pedro Pradal Roa y al Dr. Ivan Sánchez Betancourt, que fueron una pieza clave en todo este trabajo, pues el primero despertó mi interés en la virología, y el segundo me brindó todo lo necesario para poder llevar a cabo este gran proyecto, espero poder ser tan brillante como ustedes. Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza, por brindarme uno de los controles positivos para estandarizar la prueba.

A Ali Carbajal, el pequeño koala. Nos conocimos hace casi dos años, pero te adoro y te admiro demasiado. Este año hemos caminado juntas, hemos crecido y hemos vivido muchísimas cosas, hemos resistido y solucionado problemas, eres el refugio cuando las cosas comienzan a caerse, me has impulsado cuando más lo he necesitado, me has dado fuerza y confianza, crees en mí, incluso cuando yo no lo hago, y tu apoyo ha sido de los más importantes, pues me das esperanza, cariño y alegría, te quiero muchísimo y espero seguir compartiendo mucha más vida contigo, pues es difícil pensar en el futuro sin alguien tan importante como tú.

A Jessica Martínez, Sofía Cruz e Izamar Romero, mis amigas de la preparatoria, ustedes son la prueba fehaciente de que las amistades sobreviven al tiempo si hay cariño. A Yordy Negrete, Guillermo Segura, Mariana Elizarrarás, Dennise Lezama, Citlalli López, Caro Cervantes, Cecilia Montoya, Mariana Calles, Angélica López, Cynthia Vázquez, Vanessa Hernández, Rigell Calderón, Verónica Camargo, Caro Leyva, Karla Solórzano, Lorena Adaya, Laura Vázquez y Víctor Roldán, mis amigos de la carrera, que me apoyaron durante los 5 años de carrera y los dos de titulación, gracias por tolerarme y quererme, nos falta mucho camino por delante. Finalmente, agradezco a Naomi Salgado, seré breve, sabes perfectamente que fuiste, eres y serás un apoyo y un pilar en mis proyectos, aprecio mucho todo lo que has hecho por mí, somos un equipo y te quiero mucho.

## RESUMEN

Las enfermedades entéricas son un problema común en todas las unidades de producción porcina, las cuales pueden ser causadas por parásitos, bacterias, virus o toxinas. La manifestación clínica más evidente de estas patologías es la diarrea, y dentro de las enfermedades virales que afectan el tracto gastrointestinal de los cerdos se encuentran la Diarrea Epidémica Porcina, la Gastroenteritis Transmisible del Cerdo y la Rotavirus Entérica Porcina. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y estandarizar una prueba de RT-PCR múltiplex para el diagnóstico de las enfermedades producidas por los tres virus anteriormente mencionados. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para estos microorganismos, se obtuvieron controles positivos para la estandarización de la prueba y se purificó el material genético de éstos. Posteriormente se estandarizaron las RT-PCR simples para cada virus, estableciendo las temperaturas ideales de alineación de los oligonucleótidos, determinando las concentraciones mínima y máxima detectable de los agentes en cuestión. Se estandarizó la RT-PCR múltiplex, se determinaron las condiciones óptimas de amplificación, así como la especificidad de la prueba. Se determinó que la RT-PCR múltiplex detecta  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  y  $3 \times 10^{11}$  copias de material genético del virus de Diarrea Epidémica Porcina, del virus de Gastroenteritis Transmisible del Cerdo y del Rotavirus Porcino, respectivamente, siendo específica para estos tres virus. Finalmente, se emplearon 100 muestras de campo de hisopos rectales de cerdos, provenientes de 10 estados de la República Mexicana para verificar la efectividad de la prueba, donde se encontró que la frecuencia de casos positivos fue del 8% para DEP, 0% para GET y 3% para RVP.

**Palabras claves:** Enfermedades entéricas en cerdos; Diarrea Epidémica Porcina; Gastroenteritis Transmisible del Cerdo; Rotavirus Entérica Porcina; República Mexicana; RT-PCR múltiplex.

## ABSTRACT

Enteric diseases are a common problem in swine herds, which are produced by parasites, bacteria, viruses and toxins. The most apparent clinical manifestation of these pathologies is diarrhea, and within the viral diseases that affect the gastrointestinal tract of pigs we can point out the Porcine Epidemic Diarrhea (PED), the Transmissible Gastroenteritis (TGE) and the Porcine Enteric Rotavirus (PRV). The aim of the present study was to develop and to standardize a multiplex RT-PCR for the diagnosis of the three viral diseases previously mentioned. Specific primers were designed for these microorganisms, positive controls were obtained for the standardization of the test, and the genetic material of the viruses was purified. Subsequently, a RT-PCR for each virus was standardized, the optimal annealing temperature of the primers was established, and the minimum and maximum concentration from each virus was determined. The multiplex RT-PCR was standardized, the optimal conditions for amplifications were determined, as well as the specificity of the test. We determined that the multiplex RT-PCR detects  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  and  $3 \times 10^{11}$  copies of genetic material from the Porcine Epidemic Diarrhea virus (PEDv), the Transmissible Gastroenteritis virus (TGEv) and the Porcine Rotavirus (PRv), respectively. Therefore, the test is specific for each of the viruses. Finally, 100 samples from 10 states of Mexico were used to verify the effectivity of the test. Similarly, we found that the frequencies of positive cases were 8% for PED, 0% for GET and 3% for PRV.

**Keywords:** Pig's enteric diseases; Porcine Epidemic Diarrhea; Transmissible Gastroenteritis; Porcine Enteric Rotavirus; Mexico; multiplex RT-PCR; diarrhea; swine; viral diseases.

## CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
RESUMEN .....	V
ABSTRACT .....	VI
CONTENIDO.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XIV
LISTA DE CUADROS .....	XV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. CORONAVIRUS .....	1
1.1.1. Antecedentes.....	2
1.1.2. Estructura .....	3
1.1.3. Patogenia .....	7
1.1.3.1. Gastroenteritis Transmisible del Cerdo .....	7
1.1.3.2. Diarrea Epidémica Porcina.....	8
1.1.4. Replicación .....	8
1.2. ROTAVIRUS .....	9
1.2.1. Antecedentes.....	9
1.2.2. Estructura .....	10
1.2.3. Patogenia .....	13

1.2.4. Replicación .....	13
1.3. Signos .....	14
1.4. Lesiones.....	16
1.5. Tratamiento, Control y Vacunación .....	16
1.6. Diagnóstico .....	17
1.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
1.6.1.1. PCR en tiempo real .....	21
1.6.1.2. PCR anidada .....	21
1.6.1.3. PCR Transcriptasa Reversa.....	21
1.6.1.4. PCR <i>in situ</i> .....	22
1.6.1.5. PCR Múltiplex.....	22
1.6.2. Características de los oligonucleótidos.....	22
1.7. Presencia de coinfecciones .....	23
2. JUSTIFICACIÓN .....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVO GENERAL .....	27
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
5.1. Obtención del virus.....	28
5.2. Diseño de oligonucleótidos .....	28
5.3. Purificación del material genético.....	29
5.4. Estandarización de las RT-PCR punto final simples .....	30
5.4.1. Optimización de las condiciones de las RT-PCR punto final simples	31
5.5. Electroforesis .....	31

5.6.	Determinación de la concentración mínima y máxima detectable de las RT–PCR punto final simples.....	32
5.6.1.	Purificación de la banda amplificada .....	32
5.6.2.	Cuantificación de la banda amplificada .....	33
5.6.3.	Concentración mínima y máxima detectable .....	33
5.7.	Estandarización de la RT–PCR múltiplex.....	33
5.7.1.	Optimización de reactivos y condiciones de la RT–PCR múltiplex....	34
5.8.	Determinación de la especificidad de la RT–PCR múltiplex.....	34
5.9.	Diagnóstico por RT–PCR múltiplex en muestras de campo.....	34
6.	RESULTADOS.....	36
6.1.	Estandarización de las RT–PCR punto final simples .....	36
6.1.1.	Diseño de oligonucleótidos .....	36
6.1.2.	Gradientes de temperatura .....	36
6.1.2.1.	RT–PCR para el vDEP .....	36
6.1.2.2.	RT–PCR para el vGET .....	37
6.1.2.3.	RT–PCR para el RvP .....	38
6.1.3.	Optimización de los oligonucleótidos .....	39
6.1.3.1.	Oligonucleótidos para el vDEP .....	39
6.1.3.2.	Oligonucleótidos para el vGET.....	39
6.1.3.3.	Oligonucleótidos para el RvP .....	40
6.1.4.	Concentración mínima y máxima detectable de las RT–PCR punto final simples .....	41
6.1.4.1.	Concentración mínima y máxima detectable del vDEP.....	41
6.1.4.2.	Concentración mínima y máxima detectable del vGET.....	42
6.1.4.3.	Concentración mínima y máxima detectable del RvP .....	43
6.2.	Estandarización de la RT–PCR múltiplex.....	43

6.3. Especificidad de la RT-PCR múltiplex.....	45
6.4. Diagnóstico por RT-PCR múltiplex en muestras de campo.....	46
7. DISCUSIÓN .....	48
8. CONCLUSIONES .....	52
9. REFERENCIAS.....	53
10. ANEXOS .....	67
10.1. Anexo 1. Secuencias de referencia .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ L: Microlitro.

$\mu$ M: Micromolar.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APN: Aminopeptidasa N.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

Cx (-): Control negativo.

DEP: Diarrea epidémica porcina.

DIA: Diarrea infecciosa aguda.

DLP: Partículas de doble capa.

dNTPs: Desoxirribonucleosidos trifosfatos.

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

GC: Guanina-Citocina.

GET: Gastroenteritis transmisible del cerdo.

IDT: Integrated DNA Technologies.

IF: Inmunofluorescencia.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina M.

IIBO: Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Kb: Kilobases (1000 bases nucleotídicas).

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis.

mL: Mililitro.

MPM: Marcador de peso molecular.

NCBI: National Center of Biotechnology Information.

ng: Nanogramo.

NSP: Proteína no estructural (non structural protein).

OIE: World Organisation for Animal Health (Organización Mundial de Sanidad Animal).

ORF: Marco de lectura abierto (Open Reading Frame).

PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en geles de poliacrilamida).

pb: Pares de bases nucleotídicas.

PCR: Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

Pol: ARN polimerasa dependiente de ARN.

RE: Retículo endoplásmico.

RER: Retículo endoplásmico rugoso.

RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa).

RVA: Rotavirus del grupo A.

RVP: Rotavirus porcino.

RvP: Rotavirus porcino.

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

TLP: Partículas de triple capa.

Tm: Temperature melting (temperatura de hibridación).

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

vDEP: Virus de la diarrea epidémica porcina.

vGET: Virus de la gastroenteritis transmisible del cerdo.

VP: Proteína viral (viral protein).

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Mapa de los estados de la República Mexicana muestreados.....	35
Fig. 2. Electroforesis de los gradientes de temperatura del vDEP.....	37
Fig. 3. Electroforesis de los gradientes de temperatura del vGET.....	38
Fig. 4. Electroforesis de los gradientes de temperatura del RvP.....	38
Fig. 5. Electroforesis de los gradientes de concentración de oligonucleótidos del vDEP.....	39
Fig. 6. Electroforesis de los gradientes de concentración de oligonucleótidos del vGET.....	40
Fig. 7. Electroforesis de los gradientes de concentración de oligonucleótidos del RvP.....	40
Fig. 8. Electroforesis de la concentración mínima y máxima detectable del vDEP.....	42
Fig. 9. Electroforesis de la concentración mínima y máxima detectable del vGET.....	42
Fig. 10. Electroforesis de la concentración mínima y máxima detectable del RvP.....	43
Fig. 11. Electroforesis de la RT-PCR múltiplex.....	45
Fig. 12. Electroforesis de la prueba de especificidad de la RT-PCR múltiplex (1° parte).....	45
Fig. 13. Electroforesis de la prueba de especificidad de la RT-PCR múltiplex (2° parte).....	46

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características de los Coronavirus.....	4
Cuadro 2. Características de Rotavirus.....	11
Cuadro 3. Condiciones de la RT-PCR en el termociclador. ....	31
Cuadro 4. Oligonucleótidos diseñados para la RT-PCR múltiplex.....	36
Cuadro 5. Cuantificación de los productos amplificados de cada virus.....	41
Cuadro 6. Número total de copias presentes en el producto amplificado.....	41
Cuadro 7. Optimización de reactivos para la RT-PCR múltiplex.....	44
Cuadro 8. Concentraciones finales de los virus para la RT-PCR múltiplex.....	44
Cuadro 9. Resultados de las muestras de campo.....	47

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades entéricas son un problema común en todas las etapas de la producción porcina moderna en todo el mundo. La diarrea es una manifestación clínica de uno de los complejos más frecuentes de enfermedades del cerdo. Diferentes tipos de agentes pueden producir diarrea, entre ellos hay virales, parasitarios, bacterianos y tóxicos, y en varias ocasiones no sólo un agente etiológico es el causante de esta manifestación clínica (Carranza, A.I. y col., 2006). Dentro de las enfermedades virales que afectan el sistema digestivo de los cerdos, destacan la Gastroenteritis Transmisible (GET), la Diarrea Epidémica Porcina (DEP) y la Rotavirus Porcina (RVP) (Crouch, C.F., 1985; Piñeros, R. y Mogollón D., 2015; Vlasova, A.N., *et al.*, 2017). La importancia de estas tres enfermedades radica en las pérdidas económicas en los meses posteriores al ingreso de éstas a la producción, pues de forma general ocurre un incremento del porcentaje de mortalidad, retraso en el crecimiento y mala conversión alimenticia; lo anterior se traduce en gastos por medicación, limpieza, lavado y desinfección de las instalaciones, así como los costos por mano de obra (Berrios, P. y col., 1989; Batista, E.R. y col., 2005; OIE, 2014). El diagnóstico correcto comienza con la historia clínica completa y necropsia, sin embargo, debido a la similitud de los signos y de las lesiones ocasionadas por las enfermedades mencionadas anteriormente es necesario realizar pruebas diagnósticas para conocer con precisión el agente y/o agentes causales (Larson, L.A. and Schwartz, K.J., 1987).

## 1.1. CORONAVIRUS

Los coronavirus pertenecen al orden de los *Nidovirales*, suborden *Cornidovirineae*, dentro del cual se encuentra la familia *Coronaviridae*, de la que se deriva la subfamilia *Orthocoronavirinae* y ésta a su vez comprende los géneros *Alfa*, *Beta*, *Gamma* y *Deltacoronavirus*. El virus de Diarrea Epidémica Porcina (vDEP) y el virus de Gastroenteritis Transmisible del Cerdo (vGET) se encuentran en el género *Alfacoronavirus*, sin embargo, el vDEP pertenece al subgénero de los *Pedacovirus*, y el vGET se clasifica dentro de los *Tegacovirus* (Piñeros, R. y Mogollón, D., 2015; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2018).

### **1.1.1. Antecedentes**

La GET fue descrita por primera vez en Estados Unidos de Norteamérica en 1946 por Doyle y Hutchings (Doyle, L.P. and Hutchings, L.M., 1946) Con los estudios realizados en ese año se demostró la naturaleza viral de la misma por medio de la inoculación del virus a cerdos jóvenes, en los cuales producía una alta mortalidad (Batista, E.R. y col., 2005; Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012). Posteriormente el virus se detectó en Japón, en el año de 1956, y en Inglaterra en 1957 (Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012). Aunque no se sabe con certeza cuándo apareció GET en México, hay evidencia de que desde 1965 está presente en el país. El Laboratorio Central de Diagnóstico del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias realizó el primer diagnóstico de un brote de la enfermedad que afectó algunas producciones de Morelia, Michoacán, y en ese mismo año, se reportó información de brotes en otros lugares del país, como en el norte de la Ciudad de México. Entre 1966 y 1968, se reportaron brotes de la enfermedad en Jalisco y varias partes de la Ciudad de México; posteriormente, en 1989, GET se extendió en todo el país. A pesar de esto, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) indica que el primer reporte de GET en México ocurrió en 1996 (Ramírez, N.R., 1981; Batista, E.R. y col., 2005).

Por su parte, la DEP se identificó y se notificó por primera vez en Reino Unido (Lee, C., 2015). El primer nombre que se le designó a esta enfermedad fue Diarrea Viral Epidémica. Su presentación clínica es similar a la de GET, sin embargo, los lechones de más de 4 semanas de edad no tenían signología, lo que hizo suponer que se trataba de un nuevo agente patógeno (Pensaert, M.B., 2012). En 1978, el vDEP fue reproducido de forma experimental en cerdos de distintas edades, administrándolo vía oral, y por medio de microscopía electrónica se visualizaron partículas virales en heces y epitelio intestinal de los animales infectados. En ese mismo año, en Bélgica, se detectaron partículas virales de coronavirus en contenido intestinal de cerdos con cuadro entérico durante un brote de diarrea ocurrido en 1977; la diarrea fue reproducida de forma experimental y se aisló una cepa, nombrada CV777, que más tarde se diagnosticaría como DEP. Durante los años 80's y 90's, se observaron brotes poco frecuentes en Europa,

pero el virus continuó esparciéndose a Asia, en donde fue diagnosticada por primera vez en el año 2000, específicamente en Corea del Sur, y en 2005 la enfermedad arribó a China. Hasta ese momento, la enfermedad había persistido de forma endémica en la población porcina, y poco a poco fue perdiendo importancia a medida que los brotes fueron disminuyendo, esto debido a la adquisición de inmunidad natural por la circulación del virus. Sin embargo, en el año 2010 comenzaron a haber brotes en China con cuadros clínicos más severos, causando pérdidas económicas importantes (Jung, K. and Saif, L.J., 2015; Lin, C.M., *et. al.*, 2016; Song, D.S. and Park, B., 2012). En 2013 apareció el virus por primera vez en EEUU, y posteriormente la enfermedad ingresó a México ese mismo año, el Laboratorio de Investigación Aplicada S.A. de C.V. confirmó el primer caso a partir de un ensayo inmunocromatográfico el 30 de julio de 2013, y más adelante, el 8 de agosto, la Comisión México–Americana para la Erradicación de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas corroboró el diagnóstico por medio de la técnica de PCR (Ávalos, G.P., 2013; Trujillo, O.M.E., 2016). Los primeros cerdos afectados fueron de los estados de Jalisco y Michoacán, y para agosto de 2014 la DEP ya se había extendido a todas las regiones porcícolas importantes del país, con excepción de Yucatán, por lo cual, la Dirección General de Salud Animal–SENASICA (SAGARPA) reconoció la presencia del virus en México en mayo de 2014 (Águila, R., 2014; Lee, C., 2015; Rivera-Benítez, J. y col., 2015; Trujillo, O.M.E., 2016).

### **1.1.2. Estructura**

El tamaño del vGET y el vDEP es aproximadamente de 28 Kb. Son virus pleomórficos, y su estructura es similar, debido a que poseen múltiples marcos de lectura abiertos, también llamados ORF (Open Reading Frame, por sus siglas en inglés), de los cuales cuatro son genes estructurales que codifican para las proteínas S, M, E y N. Asimismo, tres ORF's codifican para proteínas no estructurales, y son ORF1a, ORF1b y ORF3. El ORF1a codifica dos proteasas virales, así como replicasas, mientras que el ORF1b codifica para la polimerasa y la helicasa viral (Piñeros, R. y Mogollón, D., 2015; Song, D.S. and Park, B., 2012; Song, Z., *et. al.*, 2016; Yount, B., *et. al.*, 2000; Kocherhans, R., *et. al.*, 2001).

**Cuadro 1. Características de los Coronavirus**

Gen	Tamaño aproximado	Proteína codificada	Función de la proteína
ORF1 a	12053 pb* (vGET)  12354 pb** (vDEP)	NSP1	Es antagonista del interferón, degrada el ARNm de la célula huésped, inhibe la traducción y detiene el ciclo celular (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP2	No se conoce exactamente su función, pero se asocia con el complejo replicasa/transcriptasa (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP3	Es una proteinasa similar a la papaína, participa en el procesamiento de poliproteínas, en el proceso de unión del ARN durante la replicación y en la formación de vesículas de doble membrana; es antagonista del interferón (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP4	No se conoce su función con exactitud, se especula que participa en la formación de vesículas de doble membrana (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP5	Es la proteinasa principal, participa en el procesamiento de poliproteínas (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP6	Se desconoce su función, pero se asocia con la formación de vesículas de doble membrana (International Committee on

			Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP7	Participa en la unión del ARN monocatenario sentido negativo (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP8	Forma el supercomplejo hexadecamérico con NSP7 (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP9	Participa en la unión del ARN monocatenario sentido negativo y se asocia con el complejo replicasa/transcriptasa (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP10	Se asocia con el complejo replicasa/transcriptasa y estimula la actividad de metiltransferasa de la NSP16 (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP11	No se conoce su función (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
<b>ORF1 b</b>	8037*–8039** pb	NSP12	Es una ARN polimerasa dependiente de ARN (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP13	Es una helicasa y 5' trifosfatasa (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP14	Es una 3' 5' exorribonucleasa, necesaria para el buen funcionamiento de la ARN polimerasa dependiente de ARN y es una guanin–N7–metiltransferasa, que forma el extremo cap del ARN (International Committee on Taxonomy of Viruses,

			2011).
		NSP15	Es una endorribonucleasa (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
		NSP16	Es una ribosa-2'-O-metiltransferasa, necesaria para la formación del extremo cap del ARN (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).
<b>ORF3</b>	Se divide en ORF3a (219 pb <sup>***</sup> ) y ORF3b (735 pb <sup>***</sup> ) (vGET)*  675 pb <sup>***</sup> (vDEP)**	–	En el caso del vGET, este marco de lectura abierto juega un papel importante al incrementar o disminuir la virulencia y el tropismo del virus, dependiendo de la presencia o ausencia de deleciones en el genoma de éste (Zhang, X., <i>et. al.</i> , 2017). El ORF3 provee al vDEP la capacidad de adaptarse a modelos <i>in vitro</i> , y a nivel experimental se utiliza para disminuir la virulencia; se piensa que la proteína ORF3 funge como un canal de iones (Song, D.S. and Park, B., 2012; Lee, C., 2015; Kocherhans, R., <i>et. al.</i> , 2001).
<b>S</b>	4152 pb <sup>***</sup>	Spike	Interactúa con los receptores celulares durante el ingreso del virus a la célula y estimula la inducción de anticuerpos neutralizantes en el huésped; asimismo, está asociada con la adaptación a cultivos celulares y la atenuación del virus (Gerdt, V. and Zakhartchouk, A., 2017; Lee, C., 2015).
<b>M</b>	231 pb <sup>***</sup>	De membrana	Es la más abundante, se encarga del proceso de ensamblaje viral y de producción de anticuerpos neutralizantes e interferón $\alpha$ (Song, D.S., and Park, B., 2012; Lee, C., 2015). La región de la

			proteína M en el genoma de los coronavirus es la más conservada (Masters, P.S, 2006)
<b>E</b>	681 pb***	De envoltura	Es responsable del ensamblaje del virión, además de regular la expresión de la interleucina 8 y, junto con la proteína N induce estrés del retículo endoplásmico (Lee, C., 2015; Gerdts, V. and Zakhartchouk, A., 2017). En conjunto con la proteína M, la proteína E forma pseudopartículas, que exhiben una actividad interferogénica similar a la realizada por viriones completos (Song D.S. and Park, B., 2012).
<b>N</b>	1326 pb***	De nucleocápside	Se une al ARN del virión y provee una estructura básica para la nucleocápside helicoidal, la cual protege el genoma viral; los epítomos de la proteína N son capaces de inducir inmunidad celular (Song, D.S. and Park, B., 2012). Esta proteína antagoniza la producción de interferón como parte de sus estrategias de evasión del sistema inmune (Lee, C., 2015).

\*Fuente: Fan, B., *et. al.*, 2017

\*\*Fuente: Zhang, X., *et. al.*, 2017

\*\*\*Fuente: Yang, D.Q., *et. al.*, 2014.

### 1.1.3. Patogenia

#### 1.1.3.1. Gastroenteritis Transmisible del Cerdo

La enfermedad se manifiesta mayormente en el periodo posterior al parto, causando pérdidas remarcables. Su transmisión es vía fecal-oral, y existen dos formas de presentación de la enfermedad, la epidémica y la endémica. En la epidémica, cerdos de todas las edades se ven afectados y la enfermedad se

propaga rápidamente; usualmente la enfermedad se observa en la época de invierno y los signos varían de acuerdo con la edad de los cerdos. La mortalidad en cerdos lactantes es casi del 100%, sin embargo, las cerdas también se ven afectadas, ya que cursan con agalactia y anorexia. En el caso de la presentación endémica, es decir que la enfermedad se observa en sitios en donde el agente persiste, la enfermedad se propaga lentamente y el sistema inmune de los cerdos está preparado para resistir la infección, por lo que la severidad del cuadro clínico es menor, además, las hembras proveen de inmunidad a los lechones vía calostro, por lo que la mortalidad en maternidad varía del 10 al 20%. El vGET destruye el epitelio intestinal, impidiendo la absorción de nutrientes y causando diarrea, así como pérdida de condición corporal (Muley, T., 2012; Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012).

#### **1.1.3.2. Diarrea Epidémica Porcina**

Al ingresar el vDEP a los enterocitos, estos rápidamente sufren de necrosis y las vellosidades intestinales se atrofian, causando nula absorción de nutrientes y diarrea. En casos severos, el virus afecta las células de las placas de Peyer del intestino grueso (Jung, K. and Saif, L.J., 2015; Pensaert, M.B., 2012).

#### **1.1.4. Replicación**

El ciclo de replicación de los coronavirus ocurre en el citoplasma de los enterocitos. Para poder ingresar a la célula, las espículas del virión interactúan con el receptor que se encuentra en la membrana plasmática, ocurriendo así una fusión de membranas; se cree que el receptor para ambos virus es la proteína aminopeptidasa N (APN), que es una proteína transmembranal presente en los enterocitos (Lee, C., 2015; Lai, M.M.C. and Holmes, K.V., 2007). Una vez que el virus ingresa a la célula, el genoma es desnudado en el citoplasma, entrando así en contacto con los ribosomas, en estos se traduce el ORF1ab del ARN genómico viral a una poliproteína, que produce una ARN polimerasa (pol) dependiente de ARN y otras proteínas involucradas en la síntesis de ARN viral (Lee, C., 2015). Los productos Pol utilizan el ARN genómico como secuencia molde para la síntesis de ARN de cadena simple en sentido negativo, el cual es utilizado para

sintetizar ARN genómico y ARNm subgenómicos; aún no se sabe con certeza cuál es el mecanismo de síntesis de los ARNm subgenómicos (Lai, M.M.C. and Holmes, K.V., 2007). Los ARNm se traducen para la producción de las diferentes proteínas que integran al virión (Masters, P.S, 2006). La proteína N y el ARN genómico recién sintetizado se ensamblan, formando nucleocápsides helicoidales, mientras que la proteína M se inserta en el retículo endoplásmico (RE) y se ancla al aparato de Golgi, esta proteína se une a la nucleocápside en el espacio entre el retículo endoplásmico rugoso (RER) y el aparato de Golgi (Lai, M.M.C. and Holmes, K.V., 2007). Del mismo modo, la proteína E se transporta a través del RE al aparato de Golgi, en donde interactúa con la proteína M para desencadenar la formación de los viriones. La proteína S se traduce, se inserta en el RER y se transportan al aparato de Golgi; inicialmente esta proteína está glicosilada, luego se trimeriza y sufre modificaciones adicionales (Lai, M.M.C. and Holmes, K.V., 2007; Masters, P.S, 2006). Algunas proteínas S se asocian con la proteína M y se incorporan a las partículas virales maduras, mientras que las proteínas S excedentes que no se incorporan a los viriones viajan a la membrana plasmática, en donde pueden participar en la fusión célula-célula. Finalmente, los viriones son liberados por exocitosis, y éstos pueden permanecer adsorbidos en la membrana plasmática de células infectadas (Lee, C., 2015; Lai, M.M.C. and Holmes, K.V., 2007; Masters, P.S, 2006).

## **1.2. ROTAVIRUS**

Los rotavirus son la causa principal de diarrea neonatal en varias especies (Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012), pertenecen a la familia *Reoviridae* y subfamilia *Sedoreovirinae* (Polanco, G. y col., 1997; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2018).

### **1.2.1. Antecedentes**

Los rotavirus fueron identificados por primera vez en terneros, y posteriormente en humanos y otras especies. Por medio de la interacción del rotavirus bovino con los cerdos se comprobó que éstos últimos también pueden adquirir la enfermedad (Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012). Los rotavirus se clasifican en al menos 9

grupos distintos (rotavirus tipo A–I), pero sólo 5 grupos afectan al cerdo (A, B, C, E y H), de los cuales únicamente 3 de ellos causan diarrea (A, B y C) (Vlasova, A.N., *et. al.*, 2017). Sin embargo, los rotavirus del grupo A (RVA) son los principales agentes causantes de la diarrea infecciosa aguda (DIA) en cerdos (Polanco, G.y col., 1997). El rotavirus porcino (RvP) fue asociado inicialmente a diarreas del cerdo en 1976, y es causa de diarrea en la mayoría de los países (Rojas, M. y col., 2011). A pesar de que no se tiene registro del año en el que RvP comenzó a afectar a los cerdos en las producciones porcinas de México, a principios de la década de 1980 se reportaron tres cepas distintas del virus, provenientes de Jalisco, Sonora y Estado de México; al realizar la inoculación de éstas en lechones, se comprobó que eran patógenas, pues los cerdos desarrollaron vómito, diarrea y baja mortalidad (Ruiz-Morales, A. y col., 1984). En 1992, se detectaron muestras positivas a RvP en el estado de Yucatán, lo cual podría ser un indicativo de que el virus se podría encontrar distribuido en todo el país (Puerto, M. y col., 1992). La transmisión de la RVP es vía fecal-oral; el virus se replica en los enterocitos del intestino delgado (Berrios, P. y col., 1989).

### **1.2.2. Estructura**

Los rotavirus tienen forma esférica y poseen una doble cápside (Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 1999). El genoma del virus consiste en 11 segmentos de doble cadena de ARN, que codifican para 11 proteínas distintas, 6 estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y 5 no estructurales (NSP1–NSP5/6), y su tamaño es de aproximadamente 18 Kb (Polanco, G. y col., 1997; Estes, M.K. and Cohen, J., 1989).

**Cuadro 2. Características de los Rotavirus**

<b>Gen</b>	<b>Tamaño aproximado*</b>	<b>Proteína(s) codificada(s)</b>	<b>Función de la proteína</b>
<b>Segmento 1</b>	3302 pb	VP1	ARN polimerasa viral (Rojas, M. y col., 2008).
<b>Segmento 2</b>	2690 pb	VP2	Estimula la actividad de la enzima ARN polimerasa viral (VP1) (McDonald, S.M. and Patton, J.T., 2011).
<b>Segmento 3</b>	2591 pb	VP3	Enzima protectora viral, con actividad de la fosfodiesterasa, guanililtransferasa y metilasa; junto con las proteínas VP1, NSP2 y NSP5 ayudan a un proceso activo de entrada del ARNm (Rojas, M. y col., 2008).
<b>Segmento 4</b>	2362 pb	VP4	Ataque celular, penetración celular, hemaglutinación, formación de anticuerpos neutralizantes y unión al receptor, así como adhesión vírica y desestabilizante de membranas. Esta proteína determina el rango de huésped, virulencia, tropismo e inducción de inmunidad protectora (Nejmeddine, M., <i>et. al.</i> , 2000; Rojas, M. y col., 2008).
<b>Segmento 6</b>	1356 pb	VP6	Es una partícula esencial en la transcripción del genoma viral y participa en la regulación de la traducción de los ARNm virales, es una proteína altamente conservada, antigénica e inmunogénica (Ward, R.L. and McNeal, M.M, 2010).
<b>Segmento 7, 8 o 9, dependiendo de la cepa de</b>	1062 pb	VP7	Es la proteína externa más abundante; se encarga de mediar el ataque y el ingreso del virus a las células. Es altamente inmunogénica, induce la

<b>rotavirus</b>			formación de anticuerpos neutralizantes y junto con la proteína VP4, activa la respuesta inmune humoral (Ludert, J.E., <i>et. al.</i> , 2002).
<b>Segmento 5</b>	1611 pb	NSP1	Restringe el rango del huésped para contrarrestar la respuesta inmune e impide la apoptosis durante las primeras etapas de la infección para promover el crecimiento viral (Hu, L., <i>et. al.</i> , 2013).
<b>Segmento 8</b>	1059 pb	NSP2	Formación de viroplasmos, participa en la replicación y empaquetamiento del ARN e interactúa con proteínas estructurales presentes en los viroplasmos, como la proteína VP2 (Hu, L., <i>et. al.</i> , 2013).
<b>Segmento 7</b>	1104 pb	NSP3	Regula la traducción del ARNm del virus y evita su degradación (Hu, L., <i>et. al.</i> , 2013).
<b>Segmento 10</b>	751 pb	NSP4	Participa en el ensamblaje y la maduración del virus, en la ruptura de la membrana celular e inhibe la absorción celular del sodio y la remodelación de las redes de microtúbulos celulares y actina. Es un componente esencial en la replicación, transcripción y morfogénesis, y es una enterotoxina viral (moviliza el calcio intracelular y provoca un balance negativo de electrolitos → diarrea) (Hu, L., <i>et. al.</i> , 2013).
<b>Segmento 11</b>	667 pb	NSP5/6	Formación de viroplasmos, regula la actividad de la proteína NSP2 con el ARN y participa en la replicación viral (Hu, L., <i>et. al.</i> , 2013).

\*Fuente: Rojas, M. y col., 2008; McDonald, S.M. and Patton, J.T., 2011; Nejmeddine, M., *et. al.*, 2000; Ward, R.L. and McNeal, M.M, 2010; Ludert, J.E., *et. al.*, 2002; Hu, L., *et. al.*, 2013.

### **1.2.3. Patogenia**

El RvP se replica principalmente en el citoplasma de las células epiteliales del intestino delgado y con menor frecuencia en las células M de las placas de Peyer y las células del ciego y colon. La replicación del virus resulta en la muerte celular y atrofia de las vellosidades. El daño provocado por el virus está relacionado con la edad del cerdo, afectando en mayor medida a cerdos jóvenes. La diarrea comienza luego del daño causado en el tracto gastrointestinal (atrofia de vellosidades y muerte celular), teniendo como consecuencia la mala absorción de nutrientes y disminución de la condición corporal (Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012).

### **1.2.4. Replicación**

Primero, las partículas infecciosas del virus, es decir, las TLP (partículas de triple capa) interactúan con los receptores celulares de los enterocitos, los sialoglicanos, por medio de la proteína VP4 (Desselberger, U., 2014). Los rotavirus únicamente infectan las puntas de las vellosidades intestinales (Rojas, M. y col., 2008). Las proteínas VP4 del virus sufren un cambio conformacional con la finalidad de exponer a la proteína VP5 y que los dominios lipofílicos de esta última interactúen con la superficie celular de los enterocitos. El mecanismo por el que los rotavirus penetran a la célula no se conoce con exactitud, pero se cree que es por medio de endocitosis mediada por el receptor (Desselberger, U., 2014; Trask, S.D., *et. al.*, 2013). Durante el proceso de entrada, el virus pierde las proteínas de la capa externa, activando la transcripción que depende de la ARN polimerasa viral, liberando las partículas de doble capa (DLP) al citoplasma (Desselberger, U., 2014). Las DLP comienzan a transcribir el ARNm, el cual se utiliza para la traducción de proteínas virales y, en cuanto se obtienen suficientes de estas últimas, el genoma de ARN se replica y se empaqueta en DLP de nueva creación, que se emplean para la creación de viroplasmos, en donde se lleva a cabo la

replicación del genoma viral y la formación de los viriones (Desselberger, U., 2014; Rojas, M. y col., 2008). Las DLP se unen a la proteína NSP4, que funge como receptor del retículo endoplásmico (RE). Luego de la entrada a la célula, el virus utiliza los ribosomas de la célula para la síntesis de proteínas virales. Finalmente, los viriones son liberados por medio de lisis celular (Desselberger, U., 2014; Trask, S.D., *et. al.*, 2013).

### **1.3. Signos**

De forma general y posterior a su ingreso al organismo, las tres enfermedades causan deshidratación, acidosis, diarrea, vómito, pérdida de condición corporal, anorexia, fiebre y, en el caso de las hembras lactantes así como adultos, inapetencia y anorexia; estos signos, así como los porcentajes de morbilidad y mortalidad varían de acuerdo a las medidas de bioseguridad de cada una de las producciones (Piñeros, R. y Mogollón, D., 2015; Jung, K. and Saif, L.J., 2015; Berrios, P. y col., 1989; Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012; Pensaert, M.B., 2012; Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012).

En los 90's, se consideraba que la severidad de los signos clínicos, así como la velocidad de diseminación de la GET era mayor en comparación con la DEP y la RVP, sin embargo, en la actualidad, la DEP tiene un mayor impacto en las producciones porcinas, pues a partir del año 2010, la mortalidad incrementó al 50–90% en China, mientras que en América, ha causado grandes pérdidas económicas por los brotes explosivos ocurridos desde el año 2013 (Arguello, H. y col., 2016; Lee, C., 2015). La mayor parte de los cerdos menores a 7 días de edad mueren en 2–7 días luego de la presentación de los signos clínicos; los cerdos mayores a 3 semanas de edad suelen sobrevivir, pero permanecen débiles por tiempo indefinido. Los cerdos en crecimiento y finalización, así como en hembras de maternidad tienen inapetencia, la muerte en estos animales se debe principalmente a factores ajenos a la infección, como el estrés o infecciones secundarias; sin embargo, en las hembras lactantes se pueden observar signos más severos, es decir, fiebre, agalactia, inapetencia, vómito y diarrea. El periodo de incubación es corto, usualmente de 18 horas a 3 días. En caso de que se

presente la GET endémica o enzoótica, los signos son los mismos, pero con menor severidad en comparación con la GET epizoótica, disminuyendo la mortalidad (Burciaga, B.L, 2013; OIE, 2004; Piñeros, R. y Mogollón, D., 2015; Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012; Pensaert, M.B., 2012; Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012).

La DEP es similar a la GET, sin embargo, actualmente la diseminación del vGET es más lenta y la mortalidad en lechones es menor. En ambos casos, los lechones menores a una semana de edad suelen morir por deshidratación luego de 3 o 4 días de la infección, además, ambos virus pueden afectar a cerdos de cualquier etapa productiva, alcanzando así una morbilidad de hasta el 100% (Pensaert, M.B., 2012; Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012; Jung, K. and Saif, L.J., 2015; Estes, M.K., 2007). La mortalidad en lechones puede variar de 50 al 80%, y los cerdos mayores a una semana de edad pueden recuperarse de la infección, de 6 a 8 días luego de la observación de los signos clínicos. Luego del brote, la diarrea puede persistir por 2 o 3 semanas. Los signos clínicos se observan de 22 a 36 horas luego del ingreso del virus al organismo, y la enfermedad afecta con mayor frecuencia en lechones menores a una semana de edad (Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012; Jung, K. and Saif, L.J., 2015). La importancia de la DEP en México radica en sus porcentajes de morbilidad (100%) y de mortalidad (50 al 80%), tomando en cuenta estas cifras, se realizó un estudio en México en el año 2013, en donde se especula que cada cerda en producción pierde 3.78 lechones por camada, lo cual se traduce a una pérdida de \$300.00 pesos por lechón, dando un total de \$1,200.00 pesos mexicanos por cerda (Amador, J. y col., 2015), por lo que el impacto de la enfermedad no sólo se ve reflejado en el estatus zoonosario del país, sino que también tiene gran relevancia en la situación económica de la porcicultura en México (Lee, C., 2015).

El periodo de incubación de la RVP es de 12 a 24 horas, la diarrea persiste por 3 a 5 días, y en caso de que no haya una complicación bacteriana, las heces vuelven a la normalidad luego de 7 a 14 días. Cuando el agente primario es RvP, la mortalidad oscila entre el 10 al 50%, sin embargo, cuando se producen infecciones

secundarias este porcentaje suele elevarse hasta 50 o 100%. La mortalidad está relacionada con la edad de los cerdos; los cerdos de 7 a 21 días de edad tienen signos menos severos en comparación con los lechones menores a una semana de edad. La morbilidad es variable, normalmente del 10 al 20% (Rojas, M. y col., 2011; White, M., 2017; Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012).

#### **1.4. Lesiones**

Las lesiones causadas por los tres virus son similares. A la necropsia el intestino se encuentra inflamado, flácido, distendido y con las paredes adelgazadas, el estómago se aprecia distendido y lleno de leche indigesta. En el caso de la GET, la mucosa del estómago se encuentra congestionada y hay probabilidad de que en el 50% de los casos se aprecie el diafragma hemorrágico. Las lesiones son menos severas en animales de más de 21 días de edad. A nivel microscópico se observa la atrofia de las vellosidades intestinales que es menos marcada en la RVP, hay destrucción y exfoliación del epitelio, así como degeneración celular. Particularmente, en el caso de la RVP, se pueden apreciar viroplasmos dentro de las células por medio de microscopía electrónica (Berrios, P. y col., 1989; Ma, Y., *et al.*, 2015; Estrada, A. y Morilla, A., 1981; Piñeros, R. y Mogollón, D., 2015; Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012; Pensaert, M.B., 2012; Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012).

#### **1.5. Tratamiento, Control y Vacunación**

Los animales adultos suelen recuperarse sin tratamiento y en un periodo de 7 a 10 días en el caso de la DEP. De igual forma, las hembras lactantes se ven afectadas en los brotes epizooticos de la GET. Los cerdos adultos no suelen tener diarrea por rotavirus, sin embargo, el cuadro clínico en cerdos destetados puede complicarse si existen otros patógenos entéricos como *E. coli*, en donde los signos se exacerban. Por lo anterior, el tratamiento se enfoca en el uso de electrolitos en lechones y en los cerdos adultos afectados por cualquiera de estas tres enfermedades, así como el control de la diarrea, deshidratación e infecciones secundarias, ya que no existe un tratamiento para combatir la infección viral. Las medidas de prevención se basan en la bioseguridad, es decir, los métodos de

limpieza, lavado y desinfección de las instalaciones, control de los desplazamientos de cerdos, material y personal dentro de las instalaciones, cuarentena para los animales que ingresarán a la producción, control de la entrada y salida de vehículos y personas, utilización de ropa exclusivamente para trabajar dentro de la producción, registro de visitantes, baño obligatorio antes de ingresar a las instalaciones y manejo Todo Dentro–Todo Fuera en la explotación, entre otras (Batista, E.R. y col., 2005; OIE, 2014; Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012).

Las vacunas para las tres enfermedades en cuestión se basan en la inducción de inmunidad en hembras gestantes, para posteriormente ser transferida a los lechones por medio del calostro y la leche; este tipo de inmunidad se conoce como inmunidad lactogénica o inmunidad pasiva. Las inmunoglobulinas transferidas a los lechones por medio de la leche son las IgAs e IgMs, mientras que por calostro sólo se les provee de IgG. Gracias a la inmunidad lactogénica, las inmunoglobulinas llegan al intestino delgado, protegiendo a los lechones de forma eficaz (Gerdt, V. and Zakhartchouk, A., 2017; Vlasova, A.N., *et. al.*, 2017).

En los 90's, la GET fue responsable de muchas pérdidas económicas importantes alrededor del mundo, por lo que la industria farmacéutica desarrolló vacunas para abatir la enfermedad. La mayoría de las vacunas comerciales para esta enfermedad contienen virus atenuado. La vacuna de la DEP consiste en uso de virus completo inactivado formulado con un adyuvante (Gerdt, V. and Zakhartchouk, A., 2017). A pesar de que existen vacunas para la RVP, actualmente siguen en proceso los estudios para generar una vacuna eficaz, ya que las vacunas producidas hasta el momento generan una inmunidad débil e ineficaz (Vlasova, A.N., *et. al.*, 2017). Asimismo, se sabe que existen vacunas polivalentes de estas tres enfermedades, cuya efectividad sigue siendo dudosa (Gerdt, V. and Zakhartchouk, A., 2017).

## **1.6. Diagnóstico**

Las enfermedades infecciosas juegan un papel importante dentro de la medicina veterinaria y el sector primario, debido a que las pérdidas económicas causadas por éstas van desde el decremento de la producción hasta la muerte del ganado.

Para poder evitar lo anterior, es necesario realizar un diagnóstico adecuado, con la finalidad de implementar métodos efectivos de prevención y control de las patologías presentes en las unidades de producción porcina (Truszczynski, M.J., 1998).

Las pruebas de diagnóstico virológico se clasifican en dos grupos importantes, las pruebas directas y las indirectas. Las pruebas directas se enfocan en la detección del agente etiológico, dentro de éstas se encuentran las pruebas que visualizan la partícula viral o su efecto celular específico (las tinciones para microscopía de luz, la microscopía electrónica, el cultivo y el aislamiento viral), las pruebas para demostración de antígenos virales (los inmunoensayos como ELISA, o el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas por sus siglas en inglés) y las pruebas que evidencian la presencia del material genético viral, como los ensayos de amplificación genética (la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, y la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa o RT-PCR) e hibridación *in situ* (Crespo, M.P., 2000; Tapia, L.I., 2015).

Las pruebas indirectas son las técnicas serológicas para descubrir anticuerpos contra determinado agente viral, teniendo en cuenta que la exposición al agente produce una respuesta por parte del sistema inmune que genera la producción de anticuerpos específicos. Estos ensayos se pueden clasificar en tres grupos con base en la cuantificación de la reacción antígeno-anticuerpo. En el grupo A, se encuentran las pruebas que dependen de la capacidad del anticuerpo que se une al antígeno para ejercer alguna función no relacionada con el virus (fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, aglutinación por látex). El grupo B engloba las pruebas que miden la capacidad de los anticuerpos para bloquear la función viral específica (neutralización, inhibición de la hemaglutinación, inhibición de la neuraminidasa). Finalmente, el grupo C reúne a las pruebas que miden directamente la interacción antígeno-anticuerpo (ELISA indirecta, Western Blot, inmunofluorescencia indirecta) (Crespo, M.P., 2000; Tapia, L.I., 2015).

De forma general, el diagnóstico en laboratorio de estas tres enfermedades se realiza por medio de pruebas serológicas como la técnica de ELISA e

inmunohistoquímica, o por medio de pruebas para la identificación del agente, como aislamiento viral, microscopía electrónica o RT-PCR (Berrios, P. y col., 1989; Estrada, A. y Morilla, A., 1981; Piñeros, R. y Mogollón, D., 2015).

En México el diagnóstico de la DEP se realiza por medio de RT-PCR, seroneutralización, ELISA e inmunofluorescencia (IF) (Santiago, N. y Carreón, N.R., 2018; Yoon, K.J., 2013). Para la GET, las pruebas diagnósticas de elección son aislamiento viral, RT-PCR, microscopía electrónica, IF directa, y seroneutralización (Santiago, N. y Carreón, N.R., 2018; Burciaga, B.L, 2013). El diagnóstico de la RVP no se lleva a cabo de forma regular en laboratorios de diagnóstico, a pesar de esto, las pruebas en investigación realizadas en el país son microscopía electrónica, RT-PCR, histología, técnica de ELISA y reacción de aglutinación de partículas de látex recubiertas de anticuerpos (Figueroa, M.M., 2016). En otras especies existen pruebas de rutina para el diagnóstico de RvP, por ejemplo, en perros se realiza por medio de microscopía electrónica, RT-PCR punto final y rotaforesis con tinción de plata, mientras que en bovinos se utiliza la hemoaglutinación con látex, la técnica de ELISA y RT-PCR punto final (Flores, A., 2015; Rodríguez, W. y col., 2007). Finalmente, en humanos, el diagnóstico de rotavirus se lleva a cabo de acuerdo a los Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica de Rotavirus por Laboratorio, establecidos por la Secretaría de Salud, en donde se dictaminó que el diagnóstico de esta enfermedad sólo se realiza en los laboratorios pertenecientes a la Red de Laboratorios Estatales de Salud Pública, y las pruebas establecidas son la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), RT-PCR punto final, ELISA y rotaforesis (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, 2015).

### **1.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico viral. Esta técnica, implementada en el año de 1984 por Kary Mullis (Joshi, M. and Deshpande, J.D., 2010), consiste en una reacción enzimática *in vitro* que amplifica y multiplica millones de veces un

segmento específico de una secuencia de ADN en particular (Atawodi, S, *et. al.*, 2011).

El primer paso de la PCR es la mezcla de todos los reactivos, es decir, el ADN a analizar (secuencia blanco o templado), un par de oligonucleótidos, o iniciadores iniciadores, la ADN polimerasa, los desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) y un amortiguador de reacción, compuesto por Cloruro de Magnesio, TrisCl, Cloruro de Potasio, Sulfato de Amonio y ditiotreitól (Atawodi, S, *et. al.*, 2011; Qiagen, 2012). Posteriormente, las muestras son sometidas a distintas temperaturas en ciclos, llevados a cabo por un termociclador; estos ciclos ocurren en tres etapas principales, desnaturalización, hibridación y extensión. La desnaturalización es la etapa en donde las cadenas de ADN se separan por calor, normalmente a una temperatura de 95°C por 20 a 30 segundos, y el resultado de este proceso es el templado utilizado para el siguiente paso. En la hibridación, los iniciadores se alinean al extremo 3' del templado e hibridan con su secuencia complementaria, formando el complejo templado–iniciadores; para esto se necesita una temperatura, conocida como temperatura melting o de hibridación ( $T_m$ ), que depende de los pares de bases de los oligonucleótidos. Finalmente, en la extensión, la ADN polimerasa actúa sobre el complejo y comienza su función catalítica, agregando dNTP's para crear cadenas completas de ADN a una temperatura que oscila entre los 65 y 72°C, dependiendo de la ADN polimerasa empleada; la extensión de las cadenas es en dirección a la síntesis del ADN (de 5' a 3'). Al final de la reacción, los amplicones estarán listos para analizarse (Tamay de Dios, L. y col., 2013). Es una prueba altamente específica (detecta únicamente el material genético del organismo a la que va dirigida) y muy sensible (puede detectar  $0.5 \times 10^3$  copias de material genético) (Atawodi, S, *et. al.*, 2011; Roche Diagnostics, 2006).

Existen varios tipos de PCR. A continuación, se mencionarán algunas de las variantes de la PCR (Wilczynski, S.P, 2008).

### **1.6.1.1. PCR en tiempo real**

Esta técnica fue desarrollada inicialmente como una variante de la PCR convencional, sin embargo, los resultados de la PCR en tiempo real son arrojados durante cada uno de los ciclos llevados a cabo en el termociclador. El objetivo de la PCR en tiempo real es la detección y cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos por medio de fluorescencia. Los resultados se visualizan en curvas de amplificación, las cuales indican en qué ciclo de la reacción las muestras comenzaron a fluorescer (Tamay de Dios, L. y col., 2013; Loftis, A. and Reeves, W., 2012).

### **1.6.1.2. PCR anidada**

En este tipo de PCR se utilizan dos pares de oligonucleótidos. El primer par amplificará una secuencia determinada, como en una PCR simple. Posteriormente se realizará una segunda PCR utilizando como templado el producto de la primera, de esta forma, el segundo par de oligonucleótidos se alineará en un sitio determinado de éste, amplificando una secuencia más corta, con el propósito de incrementar la sensibilidad y especificidad de la prueba (Marmioli, N. and Maestri, E., 2007; Wilczynski, S.P, 2008).

### **1.6.1.3. PCR Transcriptasa Reversa**

La PCR Transcriptasa Reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) fue diseñada para amplificar o identificar secuencias de ARN. La técnica se basa en la creación de una cadena complementaria a la secuencia de ARN a analizar por medio de la enzima transcriptasa, es decir, el ARN tiene la función de templado, y posteriormente se sintetiza una segunda cadena con ayuda de una polimerasa, creando así una doble cadena de ADN, llamada ADN complementario (ADNc) (Tamay de Dios, L. y col., 2013; Marmioli, N. and Maestri, E., 2007).

Esta técnica es sumamente sensible y específica, y puede detectar pequeñas cantidades de ARN. La reacción puede llevarse a cabo en un solo paso, o bien, primero se realiza la RT y luego la PCR (Ferreira, C., *et. al.*, 2004).

#### **1.6.1.4. PCR *in situ***

En este tipo de PCR, el material genético es amplificado directamente de tejidos o células, los cuales deben ser fijados y permeabilizados para conservar la morfología celular y permitir el acceso de los reactivos de la PCR al material genético; el amplicón se visualiza por hibridación (Wilczynski, S.P, 2008).

#### **1.6.1.5. PCR Múltiplex**

La PCR múltiplex o PCR múltiple consiste en la realización de una sola prueba diagnóstica para la identificación de dos o más agentes etiológicos por medio del empleo de varios pares de oligonucleótidos que hibriden con el material genético de los distintos microorganismos a detectar, conservando la alta sensibilidad, especificidad y precisión de una PCR convencional (Nguyen, T.T., *et. al.*, 2016). Esta prueba sigue la misma metodología de una PCR simple, sin embargo, se debe estandarizar la prueba para establecer una temperatura en la que todos los oligonucleótidos a emplear se hibriden con sus correspondientes templados. Esta prueba se lleva a cabo en un solo tubo. Asimismo, por medio de la prueba múltiplex se reducen los costos y el tiempo empleado en el diagnóstico de los diferentes microorganismos, debido a que se realiza la detección de varios agentes en una sola reacción (Song, D.S., *et. al.*, 2006; Wilczynski, S.P, 2008).

#### **1.6.2. Características de los oligonucleótidos**

El tamaño ideal de los oligonucleótidos es de 18 a 22 pb; este tamaño es lo suficientemente grande para que los oligonucleótidos sean específicos y lo suficientemente corta para que éstos se alineen fácilmente a la secuencia blanco. La temperatura de alineamiento debe oscilar entre los 52 y 58°C debido a que si la temperatura es menor a 50°C la PCR puede arrojar resultados inespecíficos, por otro lado, si la temperatura es mayor a 60°C el alineamiento será insuficiente entre los oligonucleótidos y su secuencia blanco, lo cual dará como resultado un bajo rendimiento del producto de la PCR. Finalmente, para la elección de los pares de oligonucleótidos se debe considerar el porcentaje de guanina–citocina (GC%) que éstos tienen, que tiene que ser del 40 y 60%, esto debido a que los enlaces entre estas dos bases son los que le dan mayor estabilidad a la unión entre los

oligonucleótidos y el templado; este porcentaje está relacionado con la temperatura de alineamiento, pues a mayor GC%, mayor temperatura (PREMIER Biosoft, 2018).

### **1.7. Presencia de coinfecciones**

Las coinfecciones se definen como las infecciones que ocurren de forma simultánea en un huésped, ocasionadas por dos o más patógenos (Descriptores en Ciencias de la Salud: DeCS, 2017). A nivel mundial se han estudiado y descrito varios tipos de coinfecciones que pueden ocurrir en los cerdos, entre las cuales se encuentran las siguientes que involucran patógenos del tracto gastrointestinal: *Salmonella* spp. con Circovirus porcino tipo 2 (Wayne, S.R., *et. al.*, 2007), Kobuvirus porcino con vDEP, vGET, RvP o *E. coli* (Zhang, D., *et. al.*, 2014), RvP con Norovirus y Sapovirus porcinos (Funk, J.A., *et. al.*, 2006), entre rotavirus de distintos tipos (rotavirus porcino tipo A con el tipo B o con el C) (Janke, B.H., *et. al.*, 1990), Bocavirus porcino con vDEP, RvP o vGET (Zhang Q., *et. al.*, 2013), vDEP con *E. coli*, vGET con *E. coli* F4 (cepa enterotoxigénica) (Xia, L., *et. al.*, 2017), vDEP con Circovirus porcino tipo 2 (Jung, K. and Saif, L.J., 2015), Deltacoronavirus porcino con RvP, vDEP, vGET o vGET y vDEP (Jung, K., *et. al.*, 2016), vDEP con Kobuvirus y Sapovirus porcinos, Kobuvirus con Sapovirus porcinos (Wang, C., *et. al.*, 2016), y vDEP con RvP o vGET (Zhang, Q., *et. al.*, 2013; Jung, K. and Saif, L.J., 2015).

Hasta el momento no se conoce con exactitud si las coinfecciones entre vGET con RvP o vDEP exacerban el cuadro clínico digestivo (Zhang, Q., *et. al.*, 2013; Jung, K. and Saif, L.J., 2015), sin embargo, se ha documentado que la presencia simultánea del RvP y el vDEP en el tracto gastrointestinal de los cerdos no ocasiona la presentación de lesiones más severas en comparación con una infección de vDEP debido a que la pérdida de las vellosidades intestinales de los enterocitos es muy similar en ambos casos a nivel microscópico (Jung, K., *et. al.*, 2008). En cuanto a las interacciones entre vDEP y vGET respecta, se han reportado al menos dos secuencias de cepas recombinantes de estos dos coronavirus, de las cuales no se han estudiado la signología y las lesiones que

éstas pueden causar; se especula que en ambos casos la recombinación se llevó a cabo por coinfecciones (Boniotti, M.B., *et. al.*, 2016; Akimkin, V., *et. al.*, 2016).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años se ha identificado la presencia de los vDEP, vGET y RvP en las distintas producciones porcinas a nivel mundial provocando implicaciones diferentes dependiendo del virus, sin embargo, se desconoce la situación zoonosanitaria actual de las tres enfermedades en México, por lo cual una RT-PCR múltiple nos permitirá llevar a cabo el diagnóstico de manera rápida, eficaz y oportuna.

### **3. HIPÓTESIS**

Debido a la similitud en los signos y las lesiones causados por el vDEP, vGET y RvP, una RT-PCR múltiplex permitirá su diagnóstico de forma más eficaz y eficiente, con lo que se podrá identificar la presencia de uno, dos o los tres virus en una sola muestra ya sea de heces o hisopo rectal.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar y estandarizar una prueba de RT–PCR múltiplex para el diagnóstico de los virus causales de la Diarrea Epidémica Porcina, la Gastroenteritis Transmisible del Cerdo y la Rotavirus Porcina.

### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ♠ Diseñar oligonucleótidos específicos para el vDEP, vGET y RvP.
- ♠ Estandarizar la RT–PCR para cada uno de los virus.
- ♠ Determinar las concentraciones mínima y máxima detectables de las RT–PCR simples.
- ♠ Estandarizar la RT–PCR múltiplex para el vDEP, vGET y RvP.
- ♠ Determinar la especificidad de la RT–PCR múltiplex.
- ♠ Realizar el diagnóstico del vDEP, vGET y RvP a partir muestras de heces o hisopos rectales de cerdos, por medio de la RT–PCR múltiplex.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Obtención del virus**

El vDEP fue proporcionado por el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), proveniente de aislamientos previos a la elaboración de esta tesis. El vGET fue proporcionado por el doctor Humberto Ramírez Mendoza del Departamento de Microbiología de la FMVZ. En el caso del RvP, se trabajó con la cepa virulenta OSU (inserto de American Type Culture Collection–ATCC®: Porcine Rotavirus VR ATCC® VR–892™).

### **5.2. Diseño de oligonucleótidos**

Previo al diseño de los oligonucleótidos se alinearon 30 secuencias del segmento 8 del genoma del RvP (Anexo 1) con la finalidad de observar si este gen es conservado o variable mediante el uso del software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) y siguiendo el manual de usuario del programa (Kumar, S., *et. al.*, 2018); las secuencias se descargaron del GenBank del NCBI (National Center of Biotechnology Information) en formato FASTA, siguiendo las instrucciones de la plataforma en línea y posteriormente se cargaron en MEGA, en donde se realizó el alineamiento por medio del método Clustal W. Se identificaron las zonas conservadas de los genes (señaladas mediante asteriscos). Tomando en cuenta los datos arrojados por el software, se decidió diseñar los oligonucleótidos a partir del segmento 8 que codifica para la proteína NSP2, en el caso del RvP. Mientras que, para el diseño de los oligonucleótidos del vGET y vDEP se empleó como gen blanco al gen M, el cual se verificó si es un gen conservado en ambos casos alineando 30 secuencias de cada virus en el software MEGA (Anexo 1).

Una vez que se determinaron los genes blanco, se procedió al diseño de los oligonucleótidos, para lo cual se utilizó la herramienta PRIMER BLAST del NCBI, tomando como temperatura de alineamiento ideal 56°C, o bien, que se encontrara entre 54 y 57°C, y que el porcentaje de Guanina–Citocina se encontrara entre el 40 y 50%.

De igual forma, se establecieron rangos de tamaños para los amplicones que se obtendrían en la RT-PCR para la clara diferenciación de los virus en la electroforesis. Así, se estableció que el amplicón del vDEP fuera de 141 pares de bases, el del vGET de 376 pares de bases y el del RvP de 701 pares de bases.

### **5.3. Purificación del material genético**

Antes de la estandarización de la prueba RT-PCR, se realizó la purificación del ARN de los virus por medio del método de isotiocinato de guanidina/fenol cloroformo, mediante el siguiente protocolo:

1. En un microtubo de plástico de 1.5 mL se colocaron 500  $\mu$ L de la muestra a purificar, y se le adicionaron 500  $\mu$ L de Trizol® (inserto de Invitrogen© del reactivo, cat. 15596026).
2. Se incubó durante 10 minutos a 4°C en el refrigerador REVCO (ThermoFisher Scientific™; Núm. de cat.: RCRF252A14).
3. Se agregaron al microtubo 200  $\mu$ L de cloroformo frío (4°C) al 100%.
4. El microtubo se agitó en el vórtex Genie 2 modelo G560 (Scientific Industries™; Núm. de cat.: 0K-0500-902) por aproximadamente 15 segundos.
5. La dilución se incubó durante 5 minutos a 4°C en el refrigerador REVCO.
6. La dilución se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C en la centrífuga Sorvall ST 16 (ThermoFisher Scientific™; Núm. de cat. 75004240). Posterior a la centrifugación, en el microtubo se observaron la fase acuosa (fase transparente que contiene el RNA), la interfase y la fase orgánica a simple vista.
7. Con la micropipeta Pipetman Classic™ P1000 (Gilson™) se separó la fase acuosa y se colocó en otro microtubo de plástico de 1.5 mL. Se desecharon las otras fases en el contenedor de residuos químicos líquidos correspondiente.
8. Con la micropipeta de 1 mL se adicionó un volumen igual al de la muestra, de isopropanol frío a la fase acuosa, formando una dilución nueva.

9. La nueva dilución se incubó durante 2 horas, a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el congelador del refrigerador REVCO.
10. La dilución se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en la centrífuga Sorvall ST 16, formando una pastilla sólida en el fondo del microtubo de plástico que corresponde al RNA necesario para la RT-PCR.
11. Se decantó el isopropanol en el contenedor de residuos químicos líquidos correspondiente y se lavó la pastilla de RNA contenida en el precipitado del microtubo de plástico con 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% por el método de pipeteo.
12. El microtubo con la pastilla se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en la centrífuga Sorvall ST 16.
13. Se decantó el etanol en el contenedor de residuos químicos líquidos correspondiente y la pastilla se dejó secar completamente por aproximadamente 24 horas dentro del microtubo de plástico.
14. Dentro del microtubo de plástico se suspendió la pastilla de RNA en 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

Al final se obtuvieron 20  $\mu\text{L}$  de material genético, que se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el ultra congelador vertical REVCO™ UxF (ThermoFisher Scientific™; Núm. de cat.: 315673H01) hasta su posterior uso.

#### **5.4. Estandarización de las RT-PCR punto final simples**

El kit que se utilizó para todas las RT-PCR fue el kit OneStep de Qiagen®, siguiendo las especificaciones del fabricante (inserto de Qiagen® del kit, Núm. de cat. 210212). Se optimizaron los reactivos a un volumen total de 10  $\mu\text{L}$  por reacción, de los cuales 3.3  $\mu\text{L}$  corresponden a agua libre de RNAsas, 2  $\mu\text{L}$  al buffer Q, 2  $\mu\text{L}$  al buffer, 0.4  $\mu\text{L}$  a los desoxitribonucleótidos trifosfatos (dNTP's), 0.4  $\mu\text{L}$  a la mix de enzimas y 0.4  $\mu\text{L}$  a los oligonucleótidos.

### 5.4.1. Optimización de las condiciones de las RT-PCR punto final simples

Con la finalidad conocer la temperatura de alineamiento ideal de cada par de oligonucleótidos de los virus, se realizaron gradientes de temperatura de 54 a 59°C. Para ello se utilizó el termociclador Multigene™ Optimax de Labnet International (Núm. de cat.: TC9610) con el siguiente protocolo:

**Cuadro 3. Condiciones de la RT-PCR en el termociclador**

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Acción
1	97°C	3 minutos	Primera desnaturalización (necesaria para desnaturalizar la doble cadena de RNA de RvP) (Kirkwood, C., 2010)
1	50°C	30 minutos	Transcripción reversa
1	94°C	15 minutos	Desnaturalización inicial
35	94°C	30 segundos	Desnaturalización
	Gradientes (54–59°C)	35 segundos	Alineamiento
	72°C	1 minuto	Extensión
1	72°C	7 minutos	Extensión final
1	15°C	∞*	Conservación de las muestras

\* ∞ = infinito.

Se realizaron gradientes de concentración de los oligonucleótidos para determinar la concentración óptima para la amplificación del fragmento esperado y en la que a su vez se mostraran menos residuos; las concentraciones finales a utilizar por reacción fueron de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8 µM de cada uno de los oligonucleótidos.

### 5.5. Electroforesis

Los resultados se observaron por medio de la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 2.5% (Agarose Molecular Biology Grade, Vivantis). Una vez

solubilizada la agarosa, se agregaron 15 mL en un tubo universal de 50 mL y se le adicionó 1  $\mu$ L de Gel Red® (Biotium), el cual le provee la propiedad de fluorescencia al gel. Ya polimerizado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis (CLP Bioscience Modelo 75.710) con amortiguador TAE (50X TAE Electrophoresis Buffer, ThermoFisher Scientific™) (40 mM de Tris base, 20 mM de ácido acético y 1mM de EDTA). Se agregaron 5 $\mu$ L de muestra con 1  $\mu$ L de buffer de Azul de Bromofenol 6X (25 mg de Azul de Bromofenol, 3 mL de Glicerol aforado a 10 mL con agua destilada estéril) en cada pocillo, y 2  $\mu$ L de marcador de peso molecular (Invitrogen™ 100 bp DNA Ladder; Núm. de catálogo: 15628019) en un pocillo independiente. Posteriormente, se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder (BIO-RAD Power PAC 300), ajustándola a 80 Volts por 60 minutos y al término se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Kodak Gel Logic 112, con cámara Kodak Molecular Imaging Software V.5.0.1.27 Standard Edition 2008).

## **5.6. Determinación de la concentración mínima y máxima detectable de las RT-PCR punto final simples**

### **5.6.1. Purificación de la banda amplificada**

A partir del gel de agarosa se realizó la purificación de la banda de amplificación de cada una de las reacciones mediante el kit QIAquick® Gel Extraction Kit de Qiagen©, siguiendo las especificaciones del fabricante (inserto de Qiagen© del kit, cat. 28704), obteniendo como volumen final 50  $\mu$ L de la muestra. El protocolo a seguir, el cual es establecido por la empresa, fue el siguiente:

1. Se extrajo el fragmento del amplicón del gel de agarosa con un bisturí limpio y estéril.
2. Se pesó el fragmento del amplicón en un microtubo de plástico de 1.5 mL. Se agregaron 3 volúmenes de buffer QG por un volumen de gel, considerando que 100 mg de gel equivalen a 100  $\mu$ L.

3. Se incubó a 50°C por alrededor de 10 minutos hasta que la agarosa se disolvió en el buffer QG. Con el vórtex se mezcló la muestra cada 2 minutos para ayudar a disolver el gel.
4. Se agregó un volumen de isopropanol a la muestra y se mezcló por pipeteo.
5. Se colocó una columna limpia en un microtubo de colecta, se vació la muestra en la columna y se centrifugó por un minuto a 8,000 rpm.
6. Se colocó la columna en un microtubo de colecta nuevo, se agregaron 500 µL de buffer QG y se centrifugó por un minuto a 8,000 rpm.
7. Se colocó la columna en un microtubo de colecta nuevo. Para el lavado, se agregaron 750 µL de buffer PE y se centrifugó por un minuto a 8,000 rpm.
8. Se colocó la columna en un microtubo de 1.5 mL.
9. Para eluir, se agregaron 50 µL de buffer EB, se dejó incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto.

### **5.6.2. Cuantificación de la banda amplificada**

Se cuantificaron los amplicones en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO) de la UNAM, por medio del equipo Nanodrop® (ThermoFisher Scientific™), el cual mide la concentración de las muestras a partir de 1 µL por medio de espectrofotometría.

### **5.6.3. Concentración mínima y máxima detectable**

Por medio del software DNA Calculator se determinó el número total de copias, el cual requiere de la cuantificación en nanogramos por microlitro (ng/µL) del amplicón purificado y de la secuencia del mismo. Se analizaron los datos arrojados por el programa y se determinó que la concentración máxima de cada uno de los virus a utilizar fuera de 20,000,000 000 de copias. A partir de ésta se realizaron diluciones décuples seriadas: 20,000,000,000; 2,000,000,000; 200,000,000; 20,000,000; 2,000,000; 200,000; 20,000; 2,000 y 200 copias.

## **5.7. Estandarización de la RT–PCR múltiplex**

Considerando los resultados anteriores, se prosiguió a la estandarización de la prueba RT–PCR múltiplex empleando cada uno de los virus (vDEP, vGET y RvP),

así como sus respectivos pares de oligonucleótidos, todo dentro de una sola reacción.

### **5.7.1. Optimización de reactivos y condiciones de la RT-PCR múltiplex**

Se realizó el ajuste de la concentración de los oligonucleótidos y de los virus, así como de los reactivos empleados con la finalidad de no utilizar un excedente de éstos y que las bandas formadas en la RT-PCR se visualicen de forma clara. También se realizó la prueba múltiplex con gradientes de temperatura de alineamiento, en la que se determinó la amplificación correcta de todos los virus buscados tomando en cuenta los resultados de las RT-PCR simples.

### **5.8. Determinación de la especificidad de la RT-PCR múltiplex**

Se verificó la especificidad *in silico* de los oligonucleótidos por medio del sistema de análisis BLAST del banco de datos del NCBI. Asimismo, gracias al software en línea OligoAnalyzer 3.1 de la empresa Integrated DNA Technologies (IDT), se verificó que cada par de oligonucleótidos no formara dímeros. Posteriormente, con la finalidad de determinar la especificidad *in-vitro* de la prueba se realizó la RT-PCR múltiplex a los siguientes agentes infecciosos: *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, Circovirus Porcino tipo 2, virus de Influenza Porcina y virus de PRRS.

### **5.9. Diagnóstico por RT-PCR múltiplex en muestras de campo**

Finalmente se emplearon 100 muestras de hisopos rectales de cerdos adultos del año 2017, proporcionadas por la Unidad de Investigación de la FMVZ, las cuales provienen de 10 estados de la República Mexicana (Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sonora, Veracruz y Yucatán; Figura 1), de cada estado se tomaron 10 muestras aleatoriamente.

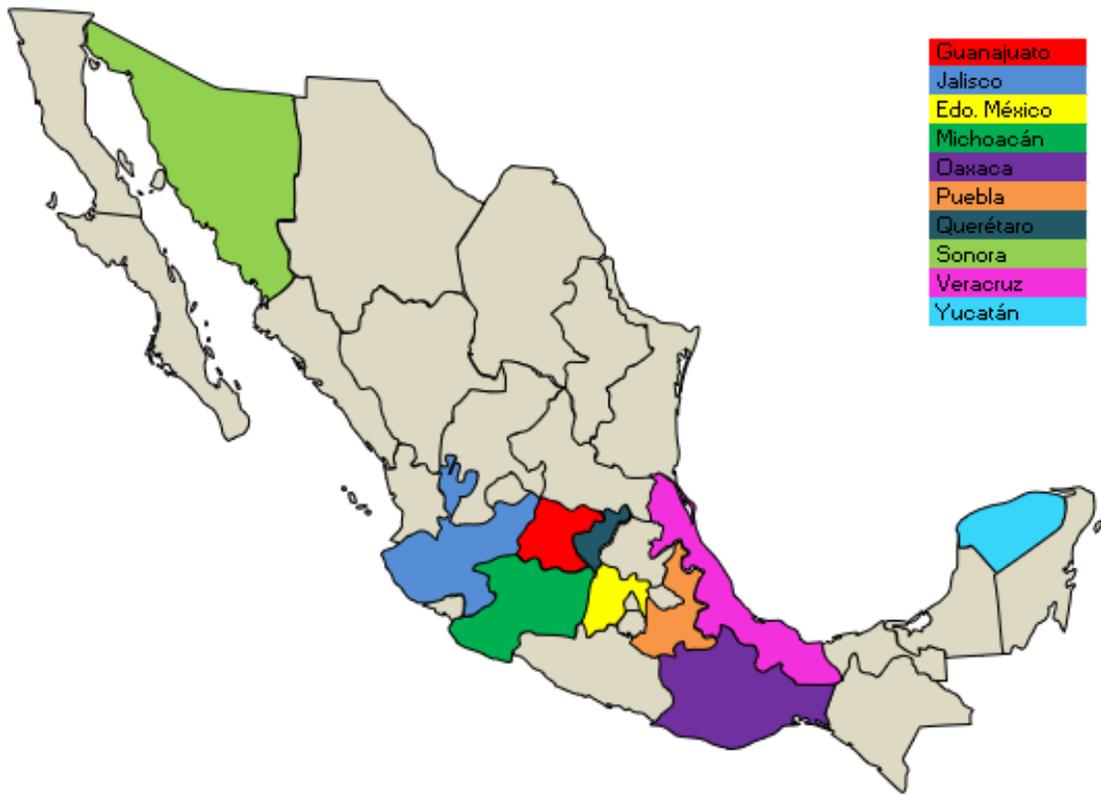


Fig. 1. Mapa de los estados de la República Mexicana muestreados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estandarización de las RT-PCR punto final simples

#### 6.1.1. Diseño de oligonucleótidos

Se tomó como gen blanco al gen M en el caso de los Coronavirus, y, de acuerdo con los alineamientos realizados con las distintas secuencias del RvP, se observó que el gen NSP2 es altamente conservado, por lo que se decidió emplear estos genes para la síntesis de los oligonucleótidos:

**Cuadro 4. Oligonucleótidos diseñados para la RT-PCR múltiplex**

	Oligonucleótido	Temperatura de alineamiento	Producto esperado	Gen	Secuencia de referencia
<b>Virus de la Diarrea Epidémica Porcina</b>					
F	TCAATAGCATTTCGGTTGTGG	56.12°C	141 pb	M	KJ645700 (MX)
R	GTGTTAGCGTTACACCAGTT	56.02°C			
<b>Virus de la Gastroenteritis Transmisible del Cerdo</b>					
F	ATTCAGCTGGTTCGTGTATG	55.85°C	376 pb	M	KX900402 (MX)
R	GTCGATGTTTCATACCACCTG	55.96°C			
<b>Rotavirus Porcino tipo A</b>					
F	GGCTGAGCTAGCTTGCT	56.51°C	701 pb	Segmento 8	KR052763 (USA)
R	AGAGTTGTAAATATTCATCAGTTGC	56.58°C			

#### 6.1.2. Gradientes de temperatura

##### 6.1.2.1. RT-PCR para el vDEP

Al realizar la electroforesis, se observó que la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos para este virus fue de 55°C. El rango de temperaturas fue de 54 a 59°C (Figura 2).

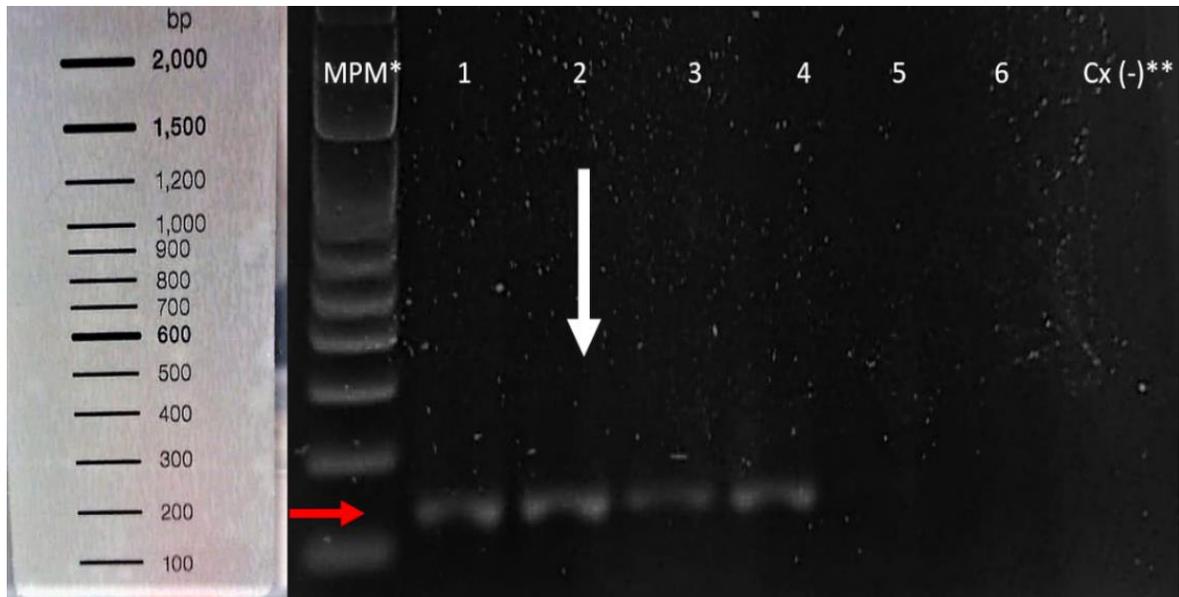


Fig. 2. Electroforesis de los gradientes de temperatura del vDEP. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1-6: gradientes de temperatura. Cx(-) = Control negativo\*\*.

### 6.1.2.2. RT-PCR para el vGET

El rango de temperatura de alineamiento fue de 54 a 59°C. Los oligonucleótidos del vGET se alinearon a todas las temperaturas que se programaron en el termociclador:

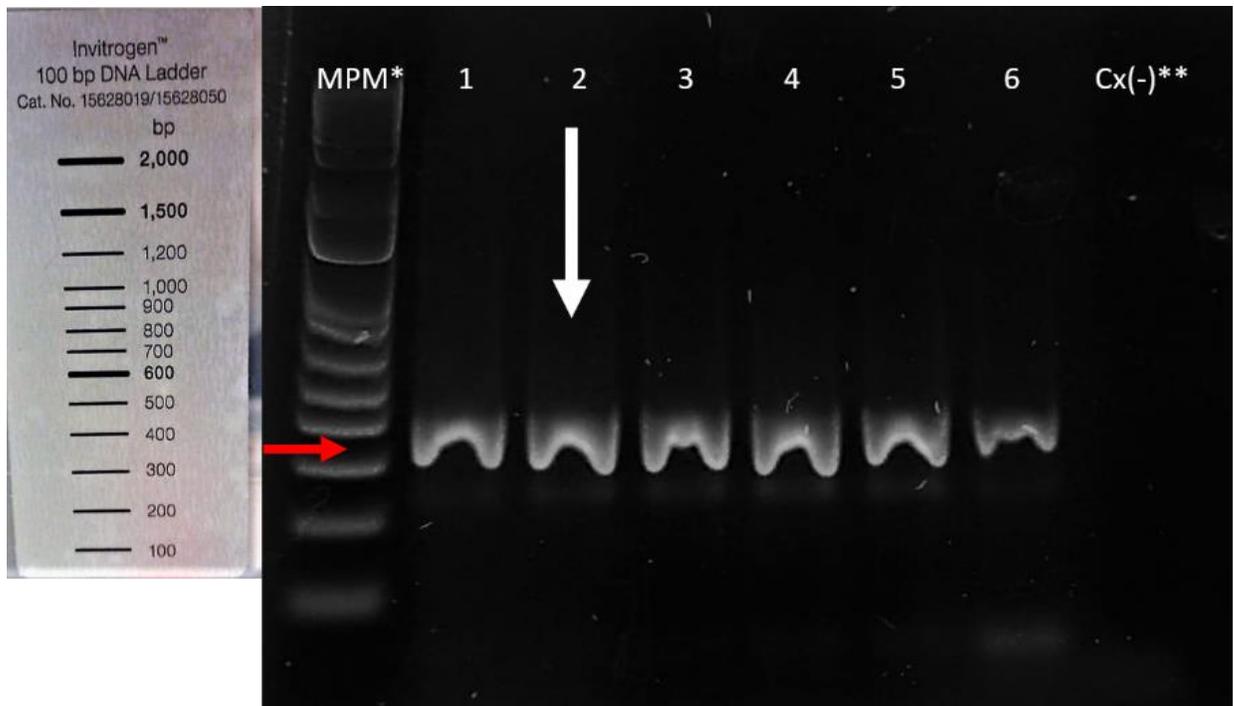


Fig. 3. Electroforesis de los gradientes de temperatura del vGET. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1–6: gradientes de temperatura. Cx(-) = Control negativo\*\*.

### 6.1.2.3. RT-PCR para el RvP

En el gel se pudo apreciar que los oligonucleótidos para el RvP se alinean a todas las temperaturas que se programaron en el termociclador.

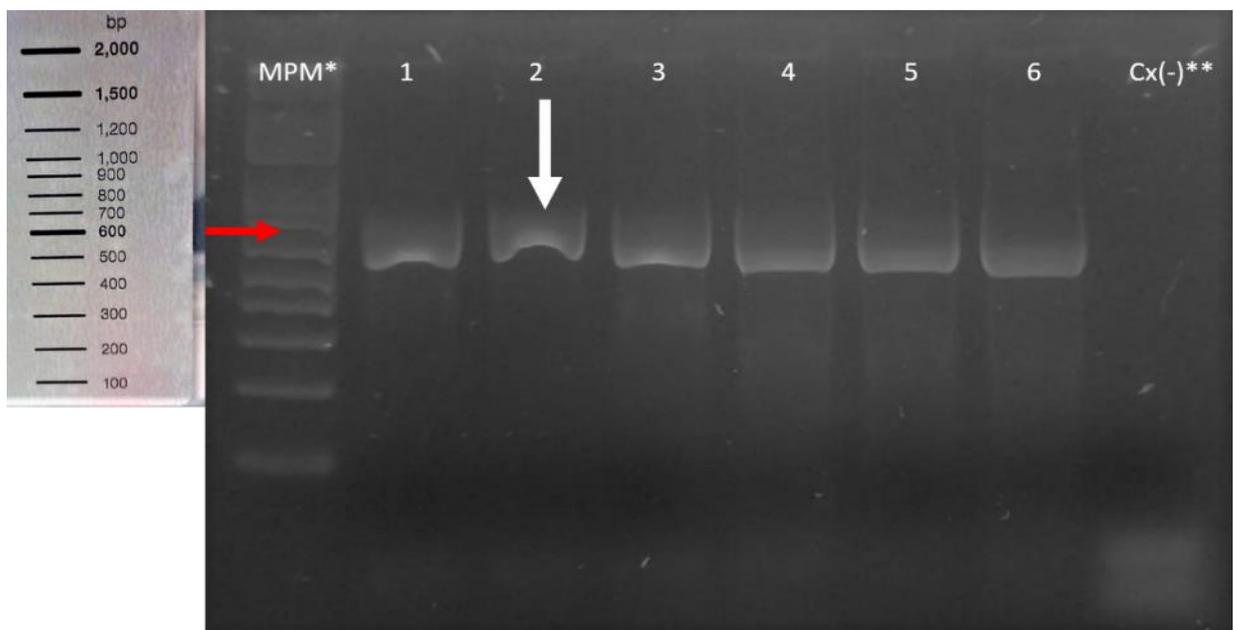


Fig. 4. Electroforesis de los gradientes de temperatura del RvP. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1–6: gradientes de temperatura. Cx(-) = Control negativo\*\*.

### 6.1.3. Optimización de los oligonucleótidos

Una vez que establecida la temperatura de alineación para los oligonucleótidos (55°C), se realizó el ajuste de la concentración de cada uno de ellos.

#### 6.1.3.1. Oligonucleótidos para el vDEP

De acuerdo con lo observado en el gel de agarosa, lo más indicado fue utilizar la concentración de 0.4  $\mu\text{M}$ , pues a esta concentración, los residuos de oligonucleótidos eran mínimos y el amplicón se visualizaba adecuadamente, sin embargo, la reacción se puede llevar a cabo desde 0.3 hasta 0.8  $\mu\text{M}$ .

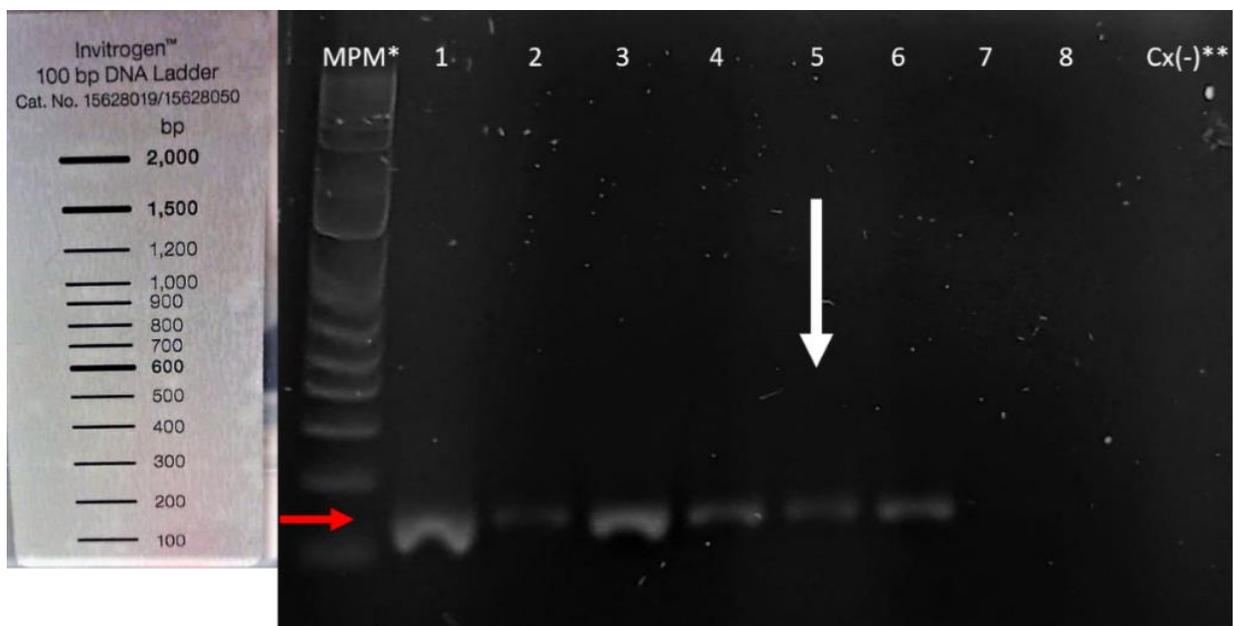


Fig. 5. Electroforesis de los gradientes de concentración de oligonucleótidos del vDEP. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1–8: gradientes de concentración (0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1  $\mu\text{M}$ ). Cx(-) = Control negativo\*\*.

#### 6.1.3.2. Oligonucleótidos para el vGET

Los resultados indicaron que la concentración de oligonucleótidos era indiferente para realizar la prueba, tomando en cuenta el rango utilizado, sin embargo, es preferible emplear la concentración de 0.4  $\mu\text{M}$ , pues con ello el amplicón se visualizó adecuadamente y los residuos de los oligonucleótidos eran casi imperceptibles.

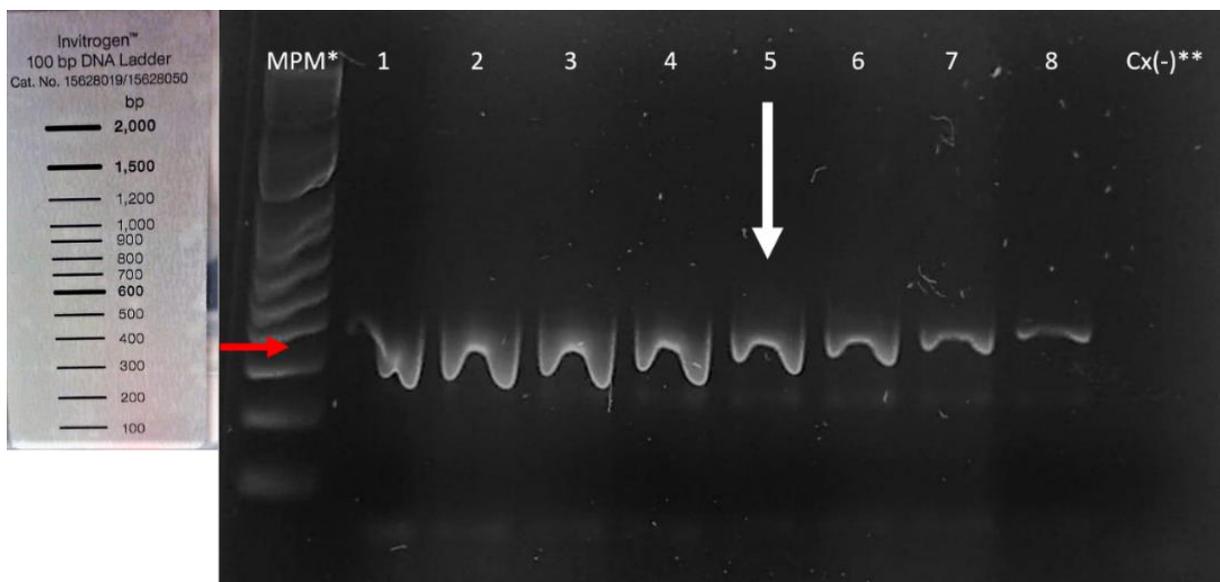


Fig. 6. Electroforesis de los gradientes de concentración de oligonucleótidos del vGET. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1–8: gradientes de concentración (0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1  $\mu\text{M}$ ). Cx(-) = Control negativo\*\*.

### 6.1.3.3. Oligonucleótidos para el RvP

A pesar de que la reacción puede realizarse empleando cualquier concentración de oligonucleótidos dentro del rango establecido, el valor adecuado fue 0.1  $\mu\text{M}$ , ya que a las demás concentraciones el amplicón se veía corrido y se apreciaba el peso real del mismo; también se observó que a 0.1  $\mu\text{M}$  los residuos de oligonucleótidos eran mínimos.

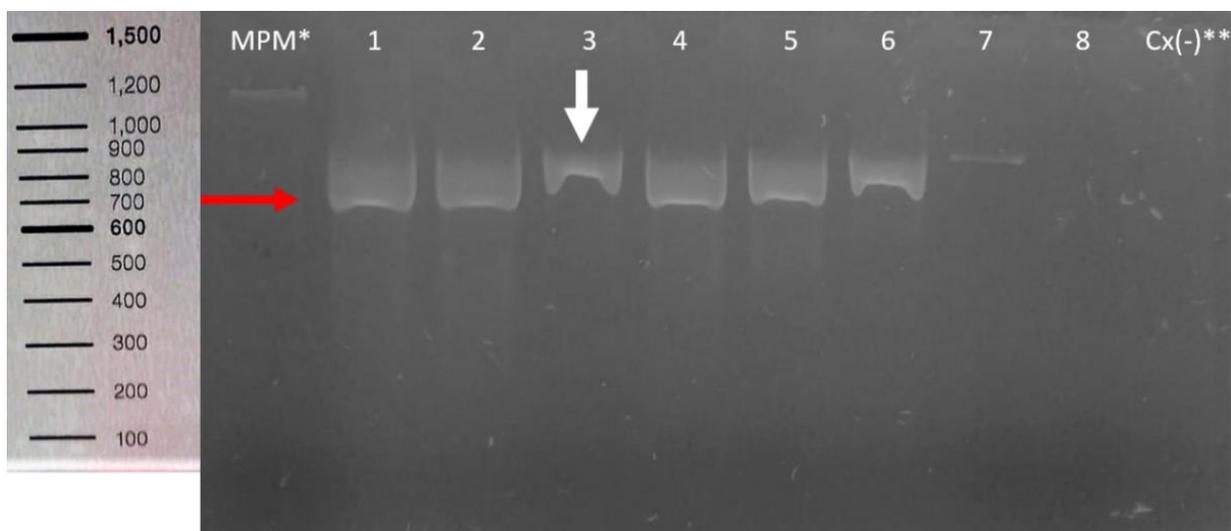


Fig. 7. Electroforesis de los gradientes de concentración de oligonucleótidos del RvP. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1–8: gradientes de concentración (0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1  $\mu\text{M}$ ). Cx(-) = Control negativo\*\*.

#### 6.1.4. Concentración mínima y máxima detectable de las RT-PCR punto final simples

Los resultados de la cuantificación fueron los siguientes:

**Cuadro 5. Cuantificación de los productos amplificados de cada virus**

Producto amplificado	Cuantificación
vDEP	12.1 ng/ $\mu$ L
vGET	39.2 ng/ $\mu$ L
RvP	15.6 ng/ $\mu$ L

Con base en las cuantificaciones obtenidas, por medio del software DNA Calculator, se obtuvo el número total de copias de cada amplicón:

**Cuadro 6. Número total de copias presentes en el producto amplificado**

Producto amplificado	Número de copias
vDEP	84 198 509 017.48 copias
vGET	101 608 725 404.85 copias
RvP	21 662 390 529.6 copias

Una vez obtenidas las cuantificaciones se procedió a determinar la concentración mínima y máxima detectable. Los resultados fueron los siguientes:

##### 6.1.4.1. Concentración mínima y máxima detectable del vDEP

Se observó que, en el pocillo de 2,000,000 de copias, el producto se visualizaba mejor, pues el tamaño del producto era el esperado y la banda se veía más clara, sin embargo, a 20,000,000 de copias el producto también se pudo visualizar, por lo que se pudiera utilizar cualquiera de estas dos diluciones. De igual manera, se determina que la concentración mínima detectable fue de 200,000 copias.

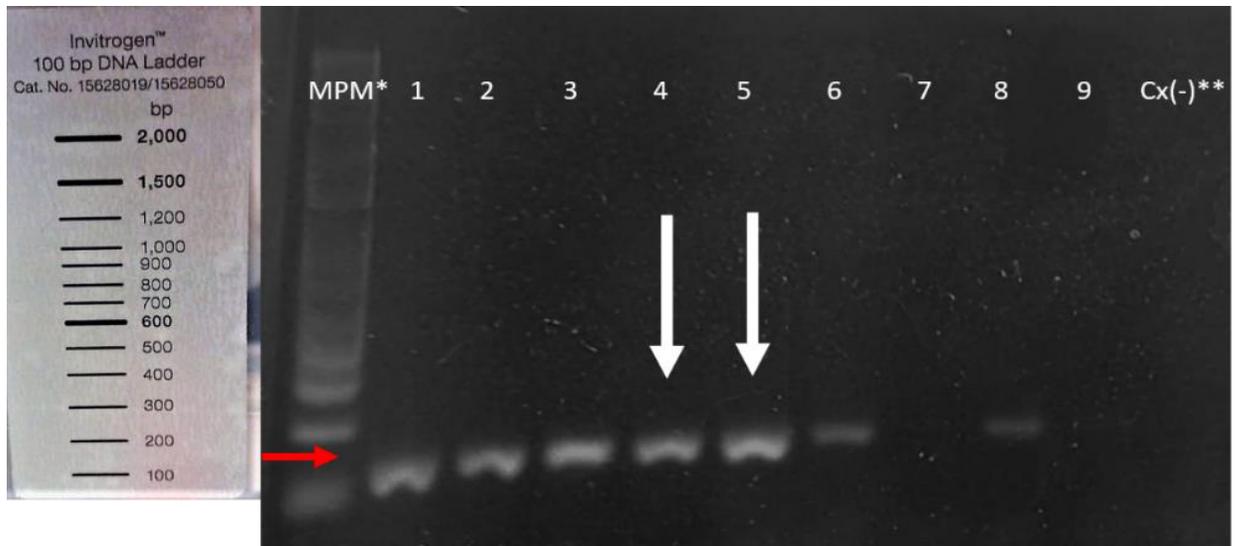


Fig. 8. Electroforesis de la concentración mínima y máxima detectable del vDEP. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1–9: diluciones décuples seriadas del material genético ( $2 \times 10^{10}$ – $2 \times 10^2$  copias). Cx(-) = Control negativo\*\*.

#### 6.1.4.2. Concentración mínima y máxima detectable del vGET

Con base en lo observado en el gel de electroforesis, las diluciones en donde se visualizó mejor el amplicón fueron de 200,000,000 y 20,000,000 copias, ya que el tamaño de ambos productos fue el esperado y el barrido era menor, en consideración con las diluciones de mayor concentración. La concentración mínima detectable fue de 200 copias.

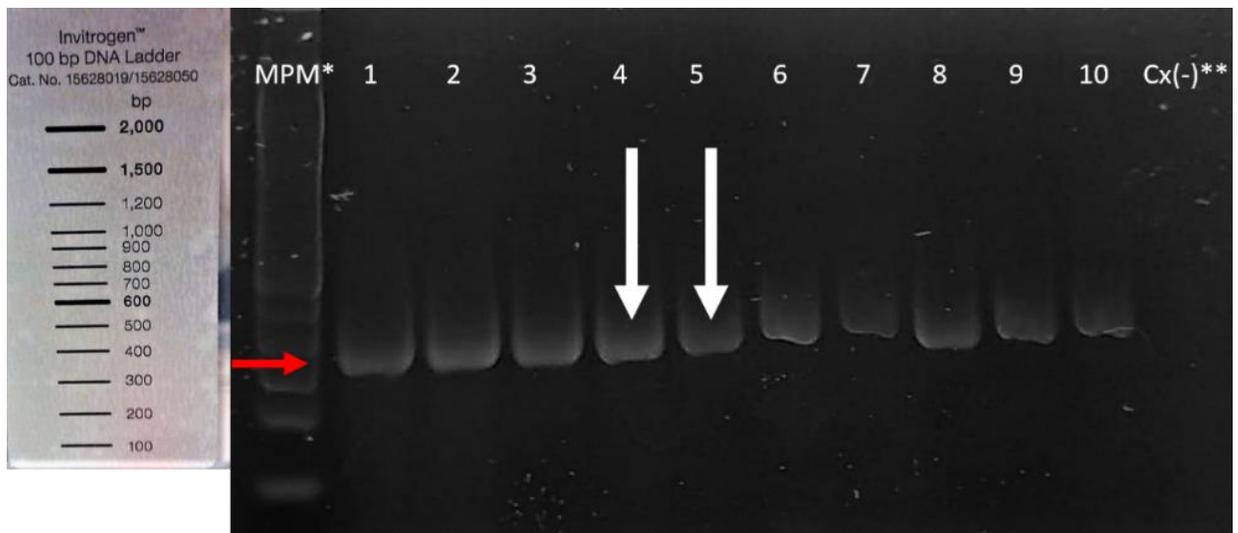


Fig. 9. Electroforesis de la concentración mínima y máxima detectable del vGET. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1: concentración inicial del virus, carril 2–10: diluciones décuples seriadas del material genético ( $2 \times 10^{10}$ – $2 \times 10^2$  copias). Cx(-) = Control negativo\*\*.

### 6.1.4.3. Concentración mínima y máxima detectable del RvP

De acuerdo con el gel de electroforesis, se determinó que la concentración óptima del virus para la RT-PCR fue de 20,000,000 copias, pues el barrido fue menor y el producto fue del tamaño esperado. Considerando el tamaño de los amplicones, la concentración mínima detectable fue de 2,000,000 de copias.

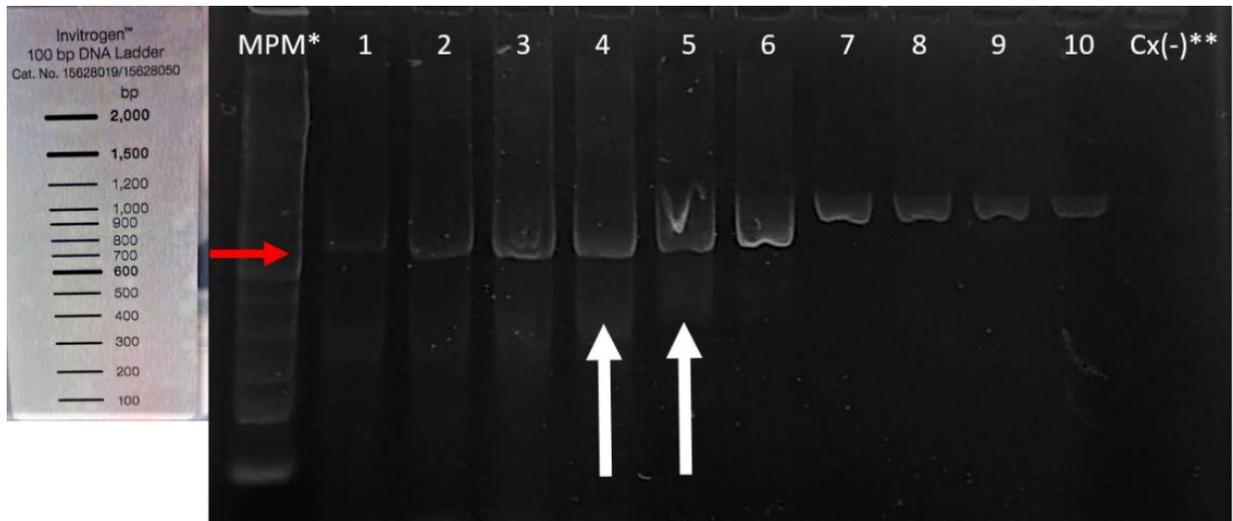


Fig. 10. Electroforesis de la concentración mínima y máxima detectable del RvP. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1: concentración inicial del virus, carril 2-10: diluciones decuples seriadas del material genético ( $2 \times 10^{10}$ – $2 \times 10^2$  copias). Cx(-)\*\* = Control negativo\*\*.

## 6.2. Estandarización de la RT-PCR múltiplex

Considerando los resultados anteriores y siguiendo con el protocolo previamente indicado (Cuadro 3), se determinó que la temperatura de alineamiento a utilizar fuera la de 55°C. De igual manera, se realizó el ajuste de los reactivos:

**Cuadro 7. Optimización de reactivos para la RT-PCR múltiplex**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Agua libre de nucleasas	0 $\mu$ L
Buffer Q	2 $\mu$ L
Enzima RT	2 $\mu$ L
dNTP's	0.4 $\mu$ L
Oligonucleótidos	0.4 $\mu$ L de cada uno (total: 2.4 $\mu$ L)
Enzima polimerasa	0.4 $\mu$ L
Virus	1 $\mu$ L de cada virus

Asimismo, se tomaron en cuenta las concentraciones mínimas detectables de vDEP y vGET, y se empleó la concentración máxima de RvP, por lo que para la RT-PCR múltiplex las concentraciones de cada virus fueron las siguientes:

**Cuadro 8. Concentraciones finales de los virus para la RT-PCR múltiplex**

<b>Virus</b>	<b>Concentración</b>
<b>vDEP</b>	2,000,000 de copias
<b>vGET</b>	20,000,000 de copias
<b>RvP</b>	297,857,869,782.04 copias

Luego de varios ensayos probando las concentraciones de los oligonucleótidos en la reacción múltiplex, se estableció que los iniciadores se emplearían a 0.4  $\mu$ M para vDEP y vGET, y a 0.8  $\mu$ M para RvP.

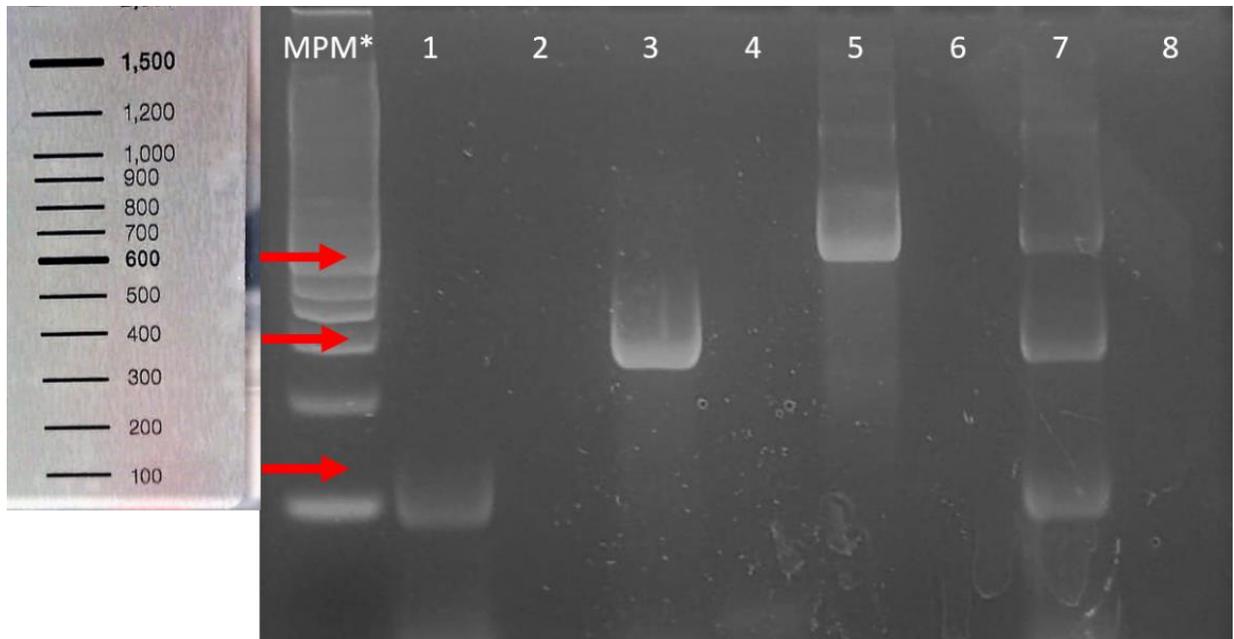


Fig. 11. Electroforesis de la RT-PCR múltiplex. Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). Carril 1: vDEP, carril 3: vGET, carril 5: RvP, carril 7: RT-PCR múltiplex, carril 2, 4, 6 y 8: Cx(-) = controles negativos\*\*.

### 6.3. Especificidad de la RT-PCR múltiplex

Al realizar la RT-PCR múltiplex empleando los controles positivos y patógenos diversos, se determinó que la prueba era específica para los tres virus en cuestión, pues únicamente se obtuvieron los amplicones esperados de vDEP, vDEP y RVP.

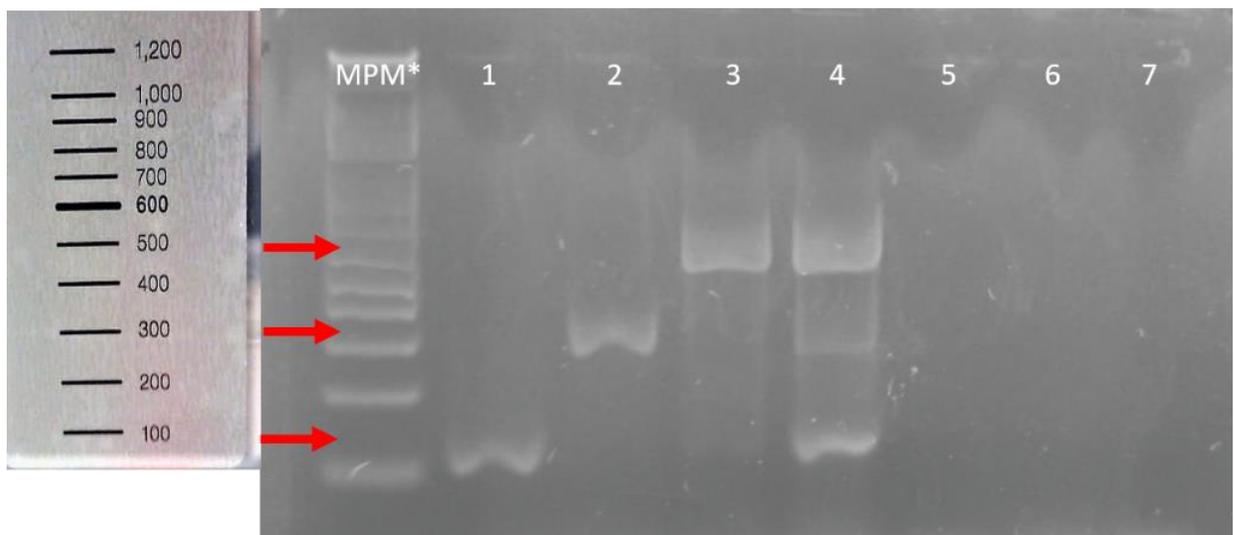


Fig. 12. Electroforesis de la prueba de especificidad de la RT-PCR múltiplex (1° parte). Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). 1: vDEP, 2: vGET, 3: RvP, 4: RT-PCR múltiplex, 5: Cx(-) = control negativo, 6: *Salmonella* spp., 7: *Bacillus* spp.

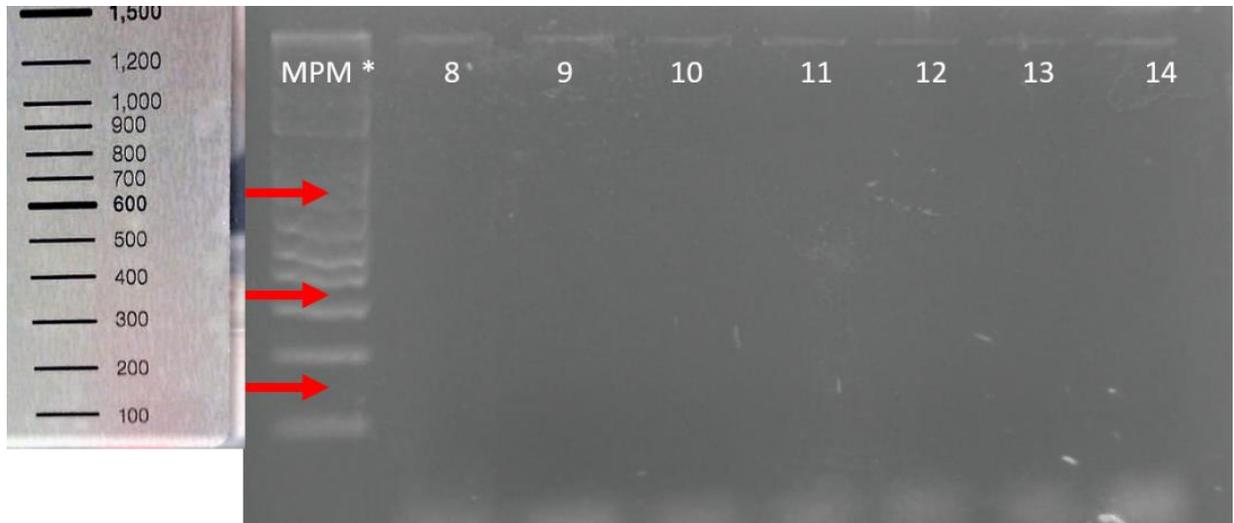


Fig. 13. Electroforesis de la prueba de especificidad de la RT-PCR múltiplex (2° parte). Gel de agarosa al 2.5%, teñido con RedGel®. Marcador de peso molecular\* (100bp DNA Ladder, Invitrogen). 8. *Escherichia coli*, 9. *Pseudomonas* spp, 10. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 11. *Enterococcus faecalis*, 12. Circovirus porcino tipo 2, 13. Virus de Influenza porcina, 14. vPRRS.

#### 6.4. Diagnóstico por RT-PCR múltiplex en muestras de campo

Se realizó la RT-PCR múltiplex para las 100 muestras de campo; en el siguiente cuadro se aprecian los casos positivos de DEP, GET y RVP, en donde se muestra que únicamente se detectaron 8 muestras positivas a vDEP y 3 a RvP, lo que indica una frecuencia de casos positivos del 8 y 3%, respectivamente.

**Cuadro 9. Resultados de las muestras de campo**

<b>Estado</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Muestras positivas</b>		
		<b>vDEP</b>	<b>vGET</b>	<b>RvP</b>
<b>Edo. México</b>	10	0	0	3
<b>Guanajuato</b>	10	0	0	0
<b>Jalisco</b>	10	0	0	0
<b>Michoacán</b>	10	3	0	0
<b>Oaxaca</b>	10	0	0	0
<b>Puebla</b>	10	0	0	0
<b>Querétaro</b>	10	0	0	0
<b>Sonora</b>	10	0	0	0
<b>Veracruz</b>	10	5	0	0
<b>Yucatán</b>	10	0	0	0
<b>TOTAL</b>	100	8	0	3

## 7. DISCUSIÓN

Las enfermedades virales entéricas son un problema común en cualquier tipo de producción porcina, siendo DEP la de mayor importancia en México, con una frecuencia de casos positivos del 16% en el país en el año 2016 (Carranza A.I. y col., 2006; Sánchez, J.A., 2017). El último reporte emitido de forma oficial de GET en México es de mayo de 2018. Sin embargo, desde 1998 el impacto de la enfermedad ha disminuido pues en ese año se notificaron las últimas muertes ocasionadas por este virus a la OIE (World Organisation for Animal Health, 2018; World Organisation for Animal Health, 1998). Asimismo, la última prevalencia encontrada del RvP en México fue del 73.3% del año 2009 a 2011 (Vlasova, A.N., *et. al.*, 2017).

El diagnóstico de las tres enfermedades en México suele realizarse con kits comerciales que usualmente provienen de otros países, por lo que no se contemplan las cepas que circulan en México (Santiago, N. y Carreón, N.R., 2018; Figueroa, M.M., 2016). En el presente trabajo se estandarizó una RT-PCR múltiplex con base en las diversas cepas que circulan en el continente americano y que han sido reportadas en el GenBank, tomando en cuenta principalmente las mexicanas.

El gen seleccionado como secuencia molde para la elaboración de los oligonucleótidos de vDEP y vGET fue el gen M, pues de acuerdo con la literatura, es el gen más conservado en ambos Coronavirus (Masters, P.S., 2006); asimismo, se ha reportado que el gen N y el ORF1 también presentan regiones con un alto porcentaje de similitud entre las distintas cepas de ambos virus, por lo que se han empleado como secuencias molde para la estandarización de una PCR (Masters, P.S., 2006; Holmes, K.V., 2007). Se realizaron alineamientos con 30 secuencias del RvP para encontrar las regiones más conservadas del genoma de éste; considerando los resultados de los alineamientos, se seleccionó el segmento 8, que codifica para la proteína NSP2, sin embargo, se sabe que en el genoma de este virus el segmento 4, que da origen a la proteína VP4, tiene regiones

conservadas, y por tanto es empleado para pruebas diagnósticas (Estes, M.K. and Cohen, J., 1989) de igual manera se sabe que el segmento 11, correspondiente a la proteína NSP5, y el segmento 6, que codifica para la proteína VP6 son altamente conservados (Afrikanova, I., *et. al.*, 1996; Ward, R.L. and McNeal, M.M, 2010).

Se ha descrito que la PCR puede detectar al menos  $1 \times 10^3$  copias de material genético, esto sin tomar en cuenta las enzimas que se pueden emplear, las cuales dan una mayor sensibilidad a la técnica pudiendo llegar a ser de hasta  $0.5 \times 10^3$  copias de material genético (Roche Diagnostics, 2006). Existen distintos protocolos de PCR, por ejemplo, Uribe, V. y col. (2015) detectaron un virus RNA a partir de  $5 \times 10^3$  copias de material genético. Por otro lado, Elnifro, E.M. y col. (2000) elaboraron una RT-PCR múltiplex, en la que se puede detectar un producto a partir de  $1 \times 10^3$  copias. Asimismo, Zhu, Y., *et. al.* (2017), detectaron los vDEP y vGET a partir de  $7.6 \times 10^2$  y  $8.5 \times 10^2$  copias respectivamente; mientras que en las RT-PCR simples estandarizadas en el presente trabajo se pudo amplificar el material genético desde  $2 \times 10^5$  (vDEP) y  $0.2 \times 10^3$  copias (vGET). La concentración mínima detectable de RvP fue de  $2 \times 10^6$  copias, sin embargo, a pesar de que se han estandarizado distintos protocolos de PCR para la detección de este virus, no existen datos específicos del número de copias que la técnica puede amplificar (Amimo, J.O., *et. al.*, 2013). Al realizar la RT-PCR múltiplex se determinó que la concentración mínima detectable ideal para los tres virus en cuestión era de  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$  y  $2.97 \times 10^9$  copias para vDEP, vGET y RvP respectivamente, lo cual es un valor muy alto en comparación con otras pruebas múltiplex, pues se ha reportado que los virus se detectan a partir de  $1.74 \times 10^3$  (vGET),  $2.1 \times 10^2$  (vDEP) y  $1.26 \times 10^3$  (RvP) copias en una sola reacción (Zhao, J., *et. al.*, 2013). Si bien la concentración mínima detectable en la múltiplex ya estandarizada por Zhao, J., *et. al.* en el año 2013 es mucho más baja, ésta fue realizada en China, mientras que la prueba presentada en esta tesis se enfoca en cepas americanas teniendo una utilidad práctica mayor en México.

Por otra parte, dentro del complejo digestivo porcino se ha descrito la presencia de diferentes patógenos en heces que también pueden contaminar las muestras tomadas o encontrarse en el ambiente, entre los cuales destacan *Salmonella* spp., *E. coli*, *Enterococcus faecalis* y menos frecuentemente *Klebsiella pneumoniae* (Wilcock, B.P., 1979; Schwartz, K.J., 1999; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2010; Fry-Bravo, M.P., 2004); asimismo en el tracto gastrointestinal de los cerdos también se encuentra *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. que pueden fungir como patógenos oportunistas siendo parte del microbiota intestinal (Giraldo-Carmona, J. y col., 2015; Looft, T., *et. al.*, 2014). Se ha descrito también que el Circovirus Porcino tipo 2 y el virus de Influenza Porcina son agentes que se excretan por heces (Shan, T., *et. al.*, 2011; Easterday, B.C. and Van Reeth, K., 2012; Lukert, P.D. and Allan, G.M., 2012). Por lo tanto, considerando que estos agentes se encuentran en las muestras que se analizan para el diagnóstico de la DEP, la GET y la RVP, se incluyeron estos microorganismos para determinar la especificidad de la RT-PCR múltiple.

En el presente estudio de las 100 muestras testeadas se pudo obtener la amplificación de 8 (vDEP), 0 (vGET) y 3 (RvP) productos. Se han realizado distintos estudios para la determinación de la frecuencia de casos positivos al vDEP en México, en uno de ellos se menciona que en el año 2016 fue del 16% (Sánchez, J.A., 2017), sin embargo, de acuerdo con Lara Romero, R. y col. (2017), quienes evaluaron muestras provenientes de los estados de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Puebla, Sonora y Veracruz, este valor fue de 88.8% en el mismo año, lo cual discrepa bastante en comparación con el porcentaje de casos positivos en este trabajo, que fue de 8%.

En 1977 se llevó a cabo un estudio en Monterrey (Nuevo León), México, en donde la frecuencia de casos positivos a GET de los cerdos de esa región fue aproximadamente del 60% (Ramírez, N.R., 1981). Actualmente no se conoce la frecuencia de casos positivos de esta enfermedad en México, sin embargo, se sabe que en Estados Unidos de Norteamérica la prevalencia del vGET fue de menos del 0.1% en el año 2018 (Chen, F., *et. al.*, 2019), por lo que los resultados

obtenidos a partir de las muestras en este trabajo coinciden con lo reportado previamente.

En cuanto a la prevalencia de RvP, ésta puede variar del 3.3 al 67.3% a nivel mundial sin considerar las variaciones climáticas o etapas productivas (Vlasova, A.N., *et. al.*, 2017), sin embargo, en 2015 se reportó una frecuencia de casos positivos de 73.3% en México (Homwong, N., *et. al.*, 2016), porcentaje que difiere en gran medida con el resultado del presente trabajo, que fue del 3%.

Un factor importante por considerar en cuanto a las muestras de campo es que éstas son de animales adultos, no obstante DEP, GET y RVP afectan principalmente a lechones y cerdos recién destetados (Burciaga, B.L, 2013; OIE, 2004; Piñeros, R. y Mogollón, D., 2015; Paul, P.S. and Stevenson, G.W, 2012; Pensaert, M.B., 2012; Saif, L.J. and Wesley, R.D., 2012). Asimismo, se desconoce en qué momento se tomaron las muestras, por lo que se debe recalcar que éstas deben recolectarse en el periodo de excreción del virus, pues la PCR detecta partículas virales, las cuales están presentes de 7 a 9 días (vDEP), de 8 horas a 3 días (vGET) y 7 días (RvP) luego de la presentación de los signos clínicos (Piñeros, R. y Mogollón, D., 2015; **Fu and Hampson, 1987**).

Asimismo, se ha reportado la presencia de coinfecciones de vGET, vDEP y RvP (Zhang, Q., *et. al.*, 2013; Jung, K. and Saif, L.J., 2015); en el presente trabajo se encontró un 0% de coinfecciones entre estos patógenos, no obstante, estos resultados no son determinantes para descartar la presencia de coinfecciones en los cerdos en México, pues el número de muestras no fue representativo.

## 8. CONCLUSIONES

- ♣ En el presente estudio se estandarizaron las RT–PCR punto final simples para cada uno de los virus (vDEP, vGET y RvP), seleccionados por su importancia en la salud intestinal de los cerdos.
- ♣ Se logró la optimización y estandarización de la RT–PCR múltiplex para los tres virus en cuestión, la cual es altamente sensible y específica, abarata costos, es rápida y es capaz de detectar coinfecciones.
- ♣ Por medio de la prueba múltiplex se determinó la frecuencia de casos positivos en 3 de los 10 estados de la República Mexicana empleando 100 muestras obtenidas por medio de hisopos rectales.
- ♣ Se determinó la presencia del vDEP en muestras fecales de cerdos provenientes de los estados de Veracruz y Michoacán, mientras que RvP únicamente se encontró presente en muestras del Estado de México. Asimismo, no se observó la presencia de vGET en ninguna muestra fecal porcina de los estados evaluados.
- ♣ La frecuencia de casos positivos fue de 8% para el vDEP, 0% para el vGET y 3% para el RvP.
- ♣ Los resultados obtenidos en el presente estudio probablemente están relacionados con el número de muestras procesadas, por lo tanto, se considera necesario expandir la  $n$  para obtener mayor conocimiento del estatus zoonosario de estas enfermedades en la población de cerdos en México y llevar a cabo evaluaciones periódicas para verificar constantemente su impacto en la eficiencia productiva y la participación en el abastecimiento de proteína de origen animal para la población humana de nuestro país.

## 9. REFERENCIAS

- ♣ Carranza, A.I., Corrales, J.P. y Ambrogi, A. *Enfermedades que producen diarrea en cerdos en las etapas de desarrollo y terminación. Memorias del V° Congreso de Producción Porcina del Mercosur; 22–24 de mayo de 2006–Córdoba, Argentina.* 2006; 1–6. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/>
- ♣ Crouch, C.F. *Vaccination against enteric rota and coronaviruses in cattle and pigs: Enhancement of lactogenic immunity.* *Vaccine.* 1985; 3 (4): 284–91.
- ♣ Piñeros, R. y Mogollón, D. *Coronavirus en porcinos: importancia y presentación del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en Colombia.* *Rev. Med. Vet. (Bogotá).* 2015; 29: 73–89. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-93542015000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542015000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- ♣ Vlasova, A.N., Amimo, J.O. and Saif, L.J. *Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies.* *Viruses.* 2017; 9 (3): 1–27.
- ♣ Berrios, P., Pinochet, L., Ávalos, P. y Cuevas, L. *Presencia de Rotavirus en cerdos lactantes con Síndrome Diarreico.* *Avances en Ciencias Vet.* 1989; 4: 1–7.
- ♣ Batista, E.R., Valle, M.B. y Martell, A.B. *Gastroenteritis Transmisible del Cerdo: un reto de la industria porcina (Transmissible Gastroenteritis of the Pig: a challenge of the pig industry).* *Rev. Electrónica Vet.* 2005; 6: 1–11.
- ♣ OIE. *Infección por el virus de Diarrea Epidémica Porcina.* Ficha Técnica de la OIE 2014: 1–4.
- ♣ Larson, L.A. and Schwartz, K.J. *Differential diagnosis of baby pig diarrhea.* *Iowa State Univ. Vet.* 1987; 49 (2): 84–90.
- ♣ International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy.* ICTV. 2018. Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

- ♠ Doyle, L.P. and Hutchings, L.M. *A Transmissible Gastroenteritis in pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1946; 108: 257–9. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19472201137>
- ♠ Ramírez, N.R. *Algunos aspectos importantes de la Gastroenteritis Transmisible de los cerdos (GTC) en México. Ciencia Vet.* 1981; 3.
- ♠ Saif, L.J. and Wesley, R.D. *Transmissible Gastroenteritis and Porcine Respiratory Coronavirus.* En: Zimmerman J., Karriker L., Ramírez A. and Schwartz K., editors. *Diseases of Swine.* Wiley–Blackwell, 10th edition. 2012. Chapter 24, Transmissible Gastroenteritis and Porcine Respiratory Coronavirus; section 2, Viral Diseases; 295–325.
- ♠ Lee, C. *Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. Virol. J.* 2015; 12 (1): 193. Disponible en: <http://www.virologyj.com/content/12/1/193>
- ♠ Pensaert M.B. *Porcine Epidemic Diarrhea.* En: Zimmerman J., Karriker L., Ramírez A. and Schwartz K., editors. *Diseases of Swine.* Wiley–Blackwell, 10th edition. 2012. Chapter 16, Porcine Epidemic Diarrhea; section 2, Viral Diseases; 179–185.
- ♠ Jung, K. and Saif, L.J. *Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. Vet. J.* 2015; 204 (2): 134–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.017>
- ♠ Lin, C.M., Saif, L.J., Marthaler, D. and Wang Q. *Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. Virus Res.* 2016; 226: 20–39. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.023>
- ♠ Song, D.S. and Park, B. *Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. Virus Genes.* 2012; 44 (2): 167–75.
- ♠ Ávalos, G.P. *Situación Actual de la Diarrea Epidémica Porcina y Estrategias de Control en Granjas Porcinas. Porcicultura.* 2013.

- ♠ Trujillo, O.M.E. *Impacto reproductivo del virus de Diarrea Epidémica Porcina. Memorias de la XVI Reunión Anual en Producción Porcina de la Asociación Porcina de Cajeme, A.C; mayo de 2016–México.* 2016.
- ♠ Águila R. *Impacto Económico en granja de la DEP: Afectación de la rentabilidad y liquidez. XXIII International Pig Veterinary Society Memoirs; 8–11 de junio de 2014–Cancún, Quintana Roo, México.* 2014; 1–13.
- ♠ Rivera-Benítez, J, Gómez-Núñez, L, Diosdado, V, Socci, E, De la Luz, A, Quintero, V, Valera, GE y Martínez, L.A.C. *Detección de nuevos Coronavirus causantes de diarreas agudas en cerdos lactantes. Memorias de la LI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 25–27 de noviembre de 2015–Estado de México, México.* 2015; 1 (1): 166–7.
- ♠ Song, Z., Dai, X., Ye, C., Li, Y., Wang, L. and Hu, Y. *Morphogenesis and proliferative rule of porcine transmissible gastroenteritis virus in porcine intestinal epithelial cells. J. Virol. Methods.* 2016; 238: 6–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.09.018>
- ♠ Yount, B., Curtis, K.M. and Baric, R.S. *Strategy for Systematic Assembly of Large RNA and DNA Genomes: Transmissible Gastroenteritis Virus Model. J. Virol.* 2000; 74 (22): 10600–11.
- ♠ Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M. and Tobler, K. *Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. Virus Genes.* 2001; 23 (2): 137–44.
- ♠ International Committee on Taxonomy of Viruses. *Family: Coronaviridae. ICTV Ninth Report.* 2011. Disponible en: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/222/coronaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae)
- ♠ Zhang, X., Zhu, Y., Zhu, X., Shi, H., Chen, J., Shi, D., Yuan, J., Cao, L., Liu J., Dong, H., Jing, Z., Zhang, J., Wang, X. and Feng, L. *Identification of a natural recombinant transmissible gastroenteritis virus between Purdue and Miller clusters in China. Emerg Microbes & Infect.* 2017; 6 (8): e74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2017.62>

- ♠ Fan, B., Jiao, D., Zhao, X., Pang, F., Xiao, Q., Yu, Z., Mao, A., Guo, R., Yuan, W., Zhao, .P, He, K. and Li, B. *Characterization of Chinese Porcine Epidemic Diarrhea virus with novel insertions and deletions in genome*. *Sci. Rep.* 2017; 7: 1–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44209>
- ♠ Yang, D.Q., Ge, F.F., Ju, H.B., Wang, J., Liu, J., Ning, K., Liu, P.H., Zhou, J.P. and Sun, Q.Y. *Whole-genome analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) from eastern China*. *Arch. Virol.* 2014; 159 (10): 2777–2785.
- ♠ Gerdts, V. and Zakhartchouk, A. *Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses*. *Vet. Microbiol.* 2017; 206: 45–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.029>
- ♠ Masters P.S. *The Molecular Biology of Coronaviruses*. *Adv. Virus Res.* 2006; 65 (6): 193–292.
- ♠ Muley T. *The possible role of Transmissible Gastroenteritis Virus (TGE) and Porcine Respiratory Coronavirus (PRCV) in the mortality of Ugandan backyard piglets* [Tesis]. [Suecia]: Swedish University of Agricultural Sciences; 2012.
- ♠ Lai, M.M.C. and Holmes, K.V. *Coronaviridae: The Viruses and Their Replication*. En: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Martin M.A., Lamb R.A., Roizman B. and Straus S.E., editors. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 5th edition. 2007. Chapter 35, Coronaviridae: The Viruses and Their Replication; 955–969.
- ♠ Paul P.S. and Stevenson G.W. *Rotavirus and Reovirus*. En: Zimmerman J., Karriker L., Ramírez A. and Schwartz K., editors. *Diseases of Swine*. Wiley–Blackwell, 10th edition. 2012. Chapter 21, Rotavirus and Reovirus; section 2, Viral Diseases; 255–267.
- ♠ Polanco, G., Baeza, M., Cámara, J., Puerto, M., González, R. y Puerto. F. *Transmisión natural de rotavirus entre humanos y animales*. *Biomed.* 1997; 8 (1): 9–13.

- ♣ Rojas, M., Manchego, S.A., Rivera, G.H., Falcón, P.N., Ramírez, V.M. y Sandoval, C.N. *Asociación entre rotavirus y la presencia de diarrea en lechones de granjas tecnificadas. Revista Invest. Vet. Perú.* 2011; 22: 253–260.
- ♣ Ruiz-Morales, A., Martínez-Sosa, A., Martell, M., Aguilar, A. y Morilla, A. *Aislamiento de Rotavirus y Pararotavirus a partir de heces de lechones diarreicos. Memorias del XIX Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos A.C.; 11–14 de julio de 1984–Sinaloa, México.* 1984; 114–115.
- ♣ Puerto, M., Puerto, F., Álvarez, M., Polanco, G., Gómez, M. y González, M. *Detección de Rotavirus en lechones lactantes de granjas localizadas en el estado de Yucatán. Memorias del XXVII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos A.C.; 8–12 de julio de 1992–Guerrero, México.* 1992; 114–115.
- ♣ Estes, M.K. and Cohen, J. *Rotavirus gene structure and function. Microbiol. Rev.* 1989; 53 (4): 410–49. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=372748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- ♣ Rojas, M., Ayala-Breton, C. y López, S. *Biología Molecular De Rotavirus: Una mirada a través de la interferencia de RNA. Mensaje Bioquímico.* 2008; XXXII: 149–62.
- ♣ McDonald, S.M. and Patton, J.T. *Rotavirus VP2 Core Shell Regions Critical for Viral Polymerase Activation. J. Virol.* 2011; 85 (7): 3095–105. Disponible en: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02360-10>
- ♣ Nejmeddine, M., Trugnan, G., Sapin, C., Kohli, E., Svensson, L., Lopez, S. and Cohen, J. *Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells. J. Virol.* 2000; 74 (7): 3313–20. Disponible en: <http://jvi.asm.org/content/74/7/3313>
- ♣ Ward, R.L. and McNeal, M.M. *VP6: A candidate rotavirus vaccine. J. Infect. Dis.* 2010; 202 Suppl: S101–7. Disponible en: [https://academic.oup.com/jid/article/202/Supplement\\_1/S101/829498](https://academic.oup.com/jid/article/202/Supplement_1/S101/829498)

- ♣ Ludert, J.E., Ruiz, M.C., Hidalgo, C. and Liprandi, F. *Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. J. Virol.* 2002; 76 (13): 6643–51. Disponible en:  
<http://jvi.asm.org/content/76/13/6643.full>
- ♣ Hu, L., Crawford, S.E., Hyser, J.M., Estes, M.K. and Prasad, B.V.V. *Rotavirus non-structural proteins: Structure and Function. Curr. Opin. Virol.* 2013; 2 (4): 380–8. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3422752/>
- ♣ Desselberger, U. *Rotaviruses. Virus Res.* 2014; 190: 75–96. Disponible en:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170214002640>
- ♣ Trask, S.D., McDonald, S.M. and Patton, J.T. *Structural insights into the Coupling of Virion Assembly and Rotavirus Replication. Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 10 (3): 165–77.
- ♣ Arguello, H., de Nova, P., Rubio, P. y Carvajal, A. *Diarrea Epidémica Porcina: Nuevos desafíos de una vieja conocida. Albeitar.* 2016; Disponible en:  
<https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/15062/articulos-porcino/diarrea-epidemica-porcina:-nuevos-desafios-de-una-vieja-conocida.html>
- ♣ Burciaga, B.L. *Gastroenteritis Trasmisible en Cerdos [Tesis]. [México]: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2013.*
- ♣ OIE. *Gastroenteritis Transmisible. Manual de la OIE sobre Animales Terrestres.* 2004; (40): 851–61.
- ♣ Estes, M.K. *Rotaviruses and Their Replication.* En: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. and Straus, S.E., editors. *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins, 5th edition. 2007. Chapter 54, Rotaviruses and Their Replication; 1426–1454.
- ♣ Amador, J., Nava, J., Trujillo, O.M.E. y Ramírez, V.Q. *Efectos económicos de la Diarrea Epidémica (PED) en México. Porcicultura.* 2015; 1–3. Disponible en:  
[http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos-interior.asp?cve\\_art=1297](http://www.porcicultura.com/porcicultura/home/articulos-interior.asp?cve_art=1297)

- ♣ White, M. *Pig Health - Rotaviral Diarrhoea*. *Natl. Anim. Dis. Inf. Serv.* 2017; 1–3.
- ♣ Ma, Y., Zhang, Y., Liang, X., Lou, F., Oglesbee, M., Krakowka, S. and Li, J. *Origin, evolution, and virulence of porcine Deltacoronaviruses in the United States*. *mBio*. 2015; 6: 1–13.
- ♣ Estrada, A. y Morilla, A. *Gastroenteritis transmisible de los cerdos*. *Cienc. Vet.* 1981; 3: 11.
- ♣ Truszczynski, M.J. *The role and importance of veterinary laboratories in the prevention and control of infectious diseases of animals*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1998; 17 (2): 405–10. Disponible en:  
<http://www.oie.int/doc/ged/D9462.PDF>
- ♣ Crespo, M. P. *El diagnóstico viral por el laboratorio*. *Colomb. Med.* 2000; 31 (3): 135–50.
- ♣ Tapia, L.I. *Laboratorio de Virología en la Práctica Clínica*. *Rev. Méd. Clínica Las Condes*. 2015; 26 (6): 744–52. Disponible en:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864015001509>
- ♣ Santiago, N y Carreón, N.R. *Técnicas diagnósticas para los virus de Gastroenteritis Transmisible y Diarrea Epidémica Porcina. Los Porcicultores y su entorno*. BM Editores. 2018. Disponible en:  
<https://bmeditores.mx/porcicultura/articulos/salud-y-prevencion-del-cerdo/enfermedades-y-tratamientos-en-porcicultura/tecnicas-diagnosticas-para-los-virus-de-gastroenteritis-transmisible-y-diarrea-epidemica-porcina-1688>
- ♣ Yoon, K.J. *Actualidades en el control de PED*. Pre-Congreso IASA-AMVEC, La Piedad, Michoacán, México. 2013; 5. Disponible en:  
<http://www.iasa.com.mx/spa/congresos/lapiedad/PED-Yoon.pdf>
- ♣ Figueroa, M.M. *Manual de enfermedades de los cerdos* [Tesis]. [México]: Universidad Autónoma del Estado de México; 2016.
- ♣ Flores, A. *Identificación de Parvovirus, Rotavirus y Coronavirus en perros con Gastroenteritis* [Tesis]. [México]: Universidad Autónoma del Estado de México; 2015.

- ♠ Rodríguez, W., Ramírez, O. y Palomares, L. *Identificación de genotipos de Rotavirus Bovino prevalentes en México como herramienta para el desarrollo de una vacuna recombinante. BioTecnología.* 2007; 10 (1): 34–41.
- ♠ Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud. *Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica del Rotavirus por Laboratorio* [Internet]. 2015. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/65736/Lineamientos\\_para\\_la\\_vigilancia\\_epidemiologica\\_de\\_rotavirus.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/65736/Lineamientos_para_la_vigilancia_epidemiologica_de_rotavirus.pdf)
- ♠ Joshi, M. and Deshpande, J.D. *Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. Int. J. Biomed. Res.* 2010; 1 (5): 81–97. Disponible en: [www.ssjournals.com](http://www.ssjournals.com)
- ♠ Atawodi, S, Atawodi, J and Dzikwi, A. *Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. Sahel. Med. J.* 2011; 13 (2): 54–63. Disponible en: <http://www.ajol.info/index.php/smj2/article/view/64834>
- ♠ Qiagen. *QIAGEN OneStep RT - PCR Handbook.* 2012. Section: QIAGEN OneStep RT–PCR Procedure; 9.
- ♠ Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Tecnol. Salud.* 2013; 2 (2): 70–78.
- ♠ Roche Diagnostics. *PCR Applications Manual.* Evolution (NY). 2006; 340.
- ♠ Wilczynski, S.P. *Molecular Biology.* En: Waever, R.F, editor. *Molecular Biology. Modern Surgical Pathology.* Elsevier, 2nd edition; 2008. Chapter 7, Molecular Biology; 85–120. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123785947#anncp2>
- ♠ Loftis, A. and Reeves, W. *Principles of Real–Time PCR.* En: Wang, C., Kaltenboeck, B. and Freeman M.D., editors. *Veterinary PCR Diagnostics.* Bentham Science Publishers, 1st. edition; 2012. Chapter 1, Principles of Real–Time PCR; 3–17. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/50486/volume/1>

- ♣ Marmiroli, N. and Maestri, E. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. En: Picó, Y, editor. *Food Toxicants Analysis*. Elsevier, 1st. edition; 2007. Chapter 6, Polymerase Chain Reaction (PCR); 147 – 187. Disponible en:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444528438500079>
- ♣ Ferreira, C., Thiemy, V., Moreira, M., Schippers, D. and Greene, A. *Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction: Principles and Applications in Dentistry*. *J. Appl. Oral. Sci.* 2004; 12 (1): 1–11.
- ♣ Nguyen, T.T., Van Giau, V. and Vo, T.K. *Multiplex PCR for simultaneous identification of E. coli O157:H7, Salmonella spp. and L. monocytogenes in food*. *3 Biotech.* 2016; 6 (2): 1–9.
- ♣ Song, D.S., Kang, B.K., Oh, J.S., Ha, G.W., Yang, J.S., Moon, H.J., Jang, Y.S. and Park, B.K. *Multiplex Reverse Transcription-PCR for Rapid Differential Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, Transmissible Gastroenteritis Virus, and Porcine Group A Rotavirus*. *J. Vet. Diag. Invest.* 2006; 18: 278–81.
- ♣ PREMIER Biosoft. *PCR Primer Design Guidelines* [Internet]. 2018. Disponible en:  
[http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html)
- ♣ Descriptores en Ciencias de la Salud: DeCS. *Coinfección* [Internet]. Sao Paulo: BIREME/OPS/OMS. 2017. Disponible en:  
[http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&task=exact\\_term&previous\\_page=homepage&interface\\_language=e&search\\_language=e&search\\_exp=coinfecci%F3n](http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&task=exact_term&previous_page=homepage&interface_language=e&search_language=e&search_exp=coinfecci%F3n)
- ♣ Wayne, S.R. and Gebreyes, W.A. *Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007; 244–250 (2).
- ♣ Zhang, D., Yang, Z., Lin, W., Yang, H., Yu, E., Qin, A. and Yang, H. *Genetic characterization of porcine kobuvirus and detection of coinfecting pathogens in diarrhetic pigs in Jiangsu Province, China*. *Arch. Virol.* 2014; 159 (12): 3407–12.

- ♠ Funk, J.A., Wang, Q.H., Zhang, W., Saif, L.J. and Souza, M. *Prevalence of Noroviruses and Sapoviruses in Swine of Various Ages Determined by Reverse Transcription-PCR and Microwell Hybridization Assays. J. Clin. Microbiol.* 2006; 44 (6): 2057–62.
- ♠ Janke, B.H., Nelson, J.K., Benfield, D.A. and Nelson, E.A. *Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. J. Vet. Diagnostic Investig.* 1990; 2 (4): 308–11.
- ♠ Zhang, Q., Hu, R., Tang, X., Wu, C., He, Q., Zhao, Z. Chen, H. and Wu, B. *Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China. Arch. Virol.* 2013; 158 (8): 1631–6.
- ♠ Xia, L., Dai, L., Yu, Q. and Yang, Q. *Persistent Transmissible Gastroenteritis Virus Infection Enhances Enterotoxigenic Promoting Epithelial-Mesenchymal Transition in Intestinal Epithelial Cells. J. Virol.* 2017; 91 (21): 1–12.
- ♠ Jung, K., Hu, H. and Saif, L.J. *Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. Virus. Res.* 2016; 226: 50–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.009>
- ♠ Wang, C., Lan, X. and Yang, B. *Molecular Epidemiological Investigation of Porcine kobuvirus and Its Coinfection Rate with PEDV and SaV in Northwest China. Biomed. Res. Int.* 2016; 2016: 1–6.
- ♠ Jung, K., Kang, B.K., Lee, C.S. and Song, D.S. *Impact of porcine group A rotavirus co-infection on porcine epidemic diarrhea virus pathogenicity in piglets. Res. Vet. Sci.* 2008; 84 (3): 502–6.
- ♠ Boniotti, M.B., Papetti, A., Lavazza, A., Alborali, G., Sozzi, E., Chiapponi, C., Faccini, S., Bonilauri, P., Cordioli, P. and Douglas, M. *Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric coronavirus, Italy. Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22 (1): 83–7.

- ♠ Akimkin, V., Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Höper, D., Jenckel, M. and Pohlmann, A. *New Chimeric Porcine Coronavirus in Swine Feces, Germany, 2012. Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22 (7): 1314–1315.
- ♠ Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biol. Evol.* 2018; 35: 1547–1549.
- ♠ Kirkwood, C. *Rotavirus*. En: Schuller, M., Sloots, T.P., James, G.S., Halliday, C.L. and Carter, I.W.J., editors. *PCR for Clinical Microbiology*. Springer, 1st. edition. 2010. Chapter 54, Rotavirus; 325–330.
- ♠ Sánchez J.A. *Estrategias actuales para el control de la Diarrea Epidémica Porcina en México. Porcicultura*. 2017. Disponible en:  
<https://www.porcicultura.com/destacado/Estrategias-actuales-para-el-control-de-la-Diarrea-Epidémica-porcina-en-México>
- ♠ World Organisation for Animal Health. *Gastroenteritis transmisible* [Internet]. WAHIS Interface. 2018. Disponible en:  
[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail)
- ♠ World Organisation for Animal Health. *Situación zoonosaria de la Gastroenteritis transmisible: América, 1998* [Internet]. HandiSTATUS II. 1998. Disponible en:  
[http://web.oie.int/hs2/sit\\_mald\\_cont.asp?c\\_mald=79&c\\_cont=2&annee=1998](http://web.oie.int/hs2/sit_mald_cont.asp?c_mald=79&c_cont=2&annee=1998)
- ♠ Holmes, K.V. *Coronaviruses*. En: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. and Straus, S.E., editors. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 5th edition. 2007. Chapter 36: Coronaviruses; 970–983.
- ♠ Afrikanova, I., Miozzo, M.C., Giambiagi, S. and Burrone, O. *Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. J. Gen. Virol.* 1996; 77 (9): 2059–65.

- ♣ Uribe, V., Gayosso, V. y Alonso, R. *Estudio comparativo del diagnóstico del virus del PRRS por RT-PCR, PCR anidada y RT-PCR en tiempo real. Ergomix.* 2015. Disponible en:  
<https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/estudio-comparativo-diagnostico-virus-t32611.htm>
- ♣ Elnifro, E.M., Cooper, R.J., Klapper, P.E., Yeo, A.C. and Tullo, A.B. *Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of viral and chlamydial keratoconjunctivitis. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41 (7): 1818–1822.
- ♣ Zhu, Y., Liang, L., Luo, Y., Wang, G., Wang, C., Cui, Y., Ai, X. and Cui, S. *A sensitive duplex nanoparticle-assisted PCR assay for identifying porcine epidemic diarrhea virus and porcine transmissible gastroenteritis virus from clinical specimens. Virus Genes.* 2017; 53 (1): 71–6.
- ♣ Amimo, J.O., Vlasova, A.N. and Saif, L.J. *Detection and genetic diversity of porcine group a rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: Predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (4): 1142–51.
- ♣ Zhao, J., Shi, B.J., Huang, X.G., Peng, M.Y., Zhang, X.M., He, D.N., Pang, R., Zhou, B. and Chen, P.Y. *A multiplex RT-PCR assay for rapid and differential diagnosis of four porcine diarrhea associated viruses in field samples from pig farms in East China from 2010 to 2012. J. Virol. Methods.* 2013; 194 (1–2): 107–12. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.008>
- ♣ Wilcock, B.P. *Experimental Klebsiella and Salmonella infection in neonatal swine. Can. J. Comp. Med.* 1979; 43 (2): 200–6. Disponible en:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1319918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- ♣ Schwartz, K.J. *Salmonellosis.* En: Zimmerman, J., Karriker, L., Ramírez, A., Schwartz, K., editors. *Diseases of Swine.* Wiley–Blackwell, 10th edition. 2012. Chapter 39: Salmonellosis; section 3: Bacterial Diseases; 535–551.

- ♣ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, Instituto Nacional Tecnológico. *Principales Enfermedades de los Cerdos*. Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA); 2010; 51.
- ♣ Fry-Bravo, M.P. *Aislamiento de Escherichia coli y de Enterococcus spp. desde el contenido rectal de bovinos* [Tesis]. [Chile]: Universidad Austral de Chile; 2004.
- ♣ Giraldo-Carmona, J., Narváez-Solarte, W., Díaz-López, E. *Probióticos En Cerdos: Resultados Contradictorios*. *Rev. Biosalud*. 2015; 14 (2): 143–50.
- ♣ Looft T., Allen H.K., Cantarel B.L., Levine U.Y., Bayles D.O., Alt D.P., Henrissat B., Stanton T.B. *Bacteria, phages and pigs: The effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations*. *ISME J*. 2014; 8 (8): 1566–76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.12>
- ♣ Shan, T., Li, L., Simmonds, P., Wang, C., Moeser, A. and Delwart, E. *The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm*. *J. Virol*. 2011; 85 (22): 11697–708.
- ♣ Easterday, B.C. and Van Reeth, K. *Swine Influenza*. En: Zimmerman, J., Karriker, L., Ramírez, A. and Schwartz, K., editors. *Diseases of Swine*. Wiley–Blackwell, 10th edition. 2012. Chapter 22: Swine Influenza; section 2: Viral Diseases; 277–290.
- ♣ Lukert, P.D. and Allan, G.M. *Porcine Circovirus*. En: Zimmerman, J., Karriker, L., Ramírez, A. and Schwartz, K., editors. *Diseases of Swine*. Wiley–Blackwell, 10th edition. 2012. Chapter 8: Porcine Circovirus; section 2: Viral Diseases; 119–124.
- ♣ Lara-Romero, R., Gómez-Núñez, L., Cerriteño-Sánchez, J.L., Márquez-Valdelamar, L., Mendoza-Elvira, S., Ramírez-Mendoza, H. y Rivera-Benítez, J.F. *Molecular characterization of the spike gene of the Porcine Epidemic Diarrhea virus in Mexico, 2013–2016*. *Virus Genes*. 2018; 54 (2): 215–24. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1528-x>

- ♣ Chen, F., Knutson, T.P., Rossow, S., Saif, L.J. and Marthaler, D.G. *Decline of transmissible gastroenteritis virus and its complex evolutionary relationship with porcine respiratory coronavirus in the United States. Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 3953. Disponible en:  
<http://www.nature.com/articles/s41598-019-40564-z>
- ♣ Homwong, N., Diaz, A., Rossow, S., Ciarlet, M. and Marthaler, D. *Three-Level Mixed-Effects Logistic Regression Analysis Reveals Complex Epidemiology of Swine Rotaviruses in Diagnostic Samples from North America. PLoS One.* 2016; 11 (5).
- ♣ Fu, Z.F. and Hampson, D.J. *Group A rotavirus excretion patterns in naturally infected pigs. Res. Vet. Sci.* 1987; 43 (3): 297–300.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Anexo 1. Secuencias de referencia

Secuencias utilizadas para la elaboración de los oligonucleótidos de Rotavirus porcino tipo A

- Gen blanco: Segmento 8.

No. de acceso en GenBank	Cepa	País de origen	Año
KR052763	LS00005_OSU	Estados Unidos de Norteamérica	1975
KR052763	LS00006_OSU	Estados Unidos de Norteamérica	1975
KJ482274	ROTA01	Brasil	2013
KJ482280	ROTA07	Brasil	2013
KJ482283	ROTA10	Brasil	2013
KJ482289	ROTA17	Brasil	2013
KP231502	ROTA22	Brasil	2013
KJ482294	ROTA31	Brasil	2013
KC113255	ND	China	2009
KU739908	1-4	Taiwán	2015
KU739913	2-1	Taiwán	2015
KU739933	3-17	Taiwán	2015
KU739943	3-18	Taiwán	2015
KU739953	3-20	Taiwán	2015
KU739963	4-1	Taiwán	2015
AB924091	BU2	Japón	2014
AB924102	BU8	Japón	2014
AB924113	BU9	Japón	2014

<b>AB972863</b>	P343	Tailandia	1991
<b>AB779641</b>	CMP48	Tailandia	2008
<b>KU363136</b>	CMP-015-12	Tailandia	2012
<b>GU199195</b>	RU172	India	2002
<b>JF781165</b>	NMTL	China	2008
<b>JF796697</b>	PRG9235	Corea del Sur	2006
<b>JF796708</b>	PRG921	Corea del Sur	2006
<b>JF796719</b>	PRG942	Corea del Sur	2006
<b>JF796730</b>	PRG9121	Corea del Sur	2006
<b>KJ126815</b>	LLP48	China	2008
<b>KY053215</b>	ET8B	San Cristóbal y Nieves	2015
<b>MF462317</b>	LNCY	China	2016

\*ND = No determinado

### **Secuencias utilizadas para la elaboración de los oligonucleótidos del virus de Gastroenteritis Transmisible del Cerdo**

- Gen blanco: Gen M.

<b>No. de acceso en GenBank</b>	<b>Cepa</b>	<b>País de origen</b>	<b>Año</b>
<b>KX900402</b>	TGEV/Mex/145/2008	México	2008
<b>KX499468</b>	TGEV AHHF	China	2015
<b>DQ443743</b>	SC-Y	China	2016
<b>DQ201447</b>	TS	China	2016
<b>HQ462571</b>	WH-1	China	2016
<b>KX083668</b>	Isolate HE-1	China	2015
<b>FJ755618</b>	H16	China	1973
<b>KT696544</b>	JS2012	China	2012

<b>KU729220</b>	TH-98	China	1998
<b>HM776941</b>	Isolate AYU	China	2009
<b>KP202848</b>	Isolate SHXB	China	2013
<b>KC962433</b>	Isolate TGEV-HX	China	2012
<b>KX900411</b>	TGEV/USA/SouthDakota154/2014	Estados Unidos de Norteamérica	2014
<b>KX900410</b>	TGEV/USA/Minnesota153/2014	Estados Unidos de Norteamérica	2014
<b>KX900408</b>	TGEV/USA/Wisconsin151/2014	Estados Unidos de Norteamérica	2014
<b>KX900406</b>	TGEV/USA/Illinois149/2013	Estados Unidos de Norteamérica	2013
<b>KX900404</b>	TGEV/USA/Oklahoma147/2012	Estados Unidos de Norteamérica	2012
<b>KX900401</b>	TGEV/USA/Tennessee144/2008	Estados Unidos de Norteamérica	2008
<b>KX900400</b>	TGEV/USA/Iowa143/2008	Estados Unidos de Norteamérica	2008
<b>KX900399</b>	TGEV/USA/NorthCarolina142/2007	Estados Unidos de Norteamérica	2007
<b>KX900394</b>	TGEV/USA/HB/1988	Estados Unidos de Norteamérica	1988
<b>KX900393</b>	TGEV/USA/Z/1986	Estados Unidos de Norteamérica	1986
<b>DQ811788</b>	Attenuated Purdue P115	Estados Unidos de Norteamérica	2006
<b>DQ811789</b>	Virulent Purdue	Estados Unidos de Norteamérica	1952
<b>DQ811785</b>	Miller M6	Estados Unidos de Norteamérica	2006
<b>KX900409</b>	TGEV/USA/Minnesota152/2014	Estados Unidos de Norteamérica	2014

<b>KX900407</b>	TGEV/USA/Minnesota150/2013	Estados Unidos de Norteamérica	2013
<b>KX900403</b>	TGEV/USA/Illinois146/2008	Estados Unidos de Norteamérica	2008
<b>KX900398</b>	TGEV/USA/Minnesota141/2007	Estados Unidos de Norteamérica	2007
<b>KX900397</b>	TGEV/USA/NorthCarolina140/2007	Estados Unidos de Norteamérica	2007

**Secuencias utilizadas para la elaboración de los oligonucleótidos del virus de Diarrea Epidémica Porcina**

- Gen blanco: Gen M.

<b>No. de acceso en GenBank</b>	<b>Cepa</b>	<b>País de origen</b>	<b>Año</b>
<b>KJ645700</b>	MEX/124/2014	México	2014
<b>KR265766</b>	MEX/Mexico329/2014	México	2014
<b>MH004412</b>	ND	México	2016
<b>MH004416</b>	ND	México	2017
<b>MH006957</b>	ND	México	2013
<b>MH006963</b>	ND	México	2013
<b>MH013465</b>	ND	México	2017
<b>MH004419</b>	ND	México	2017
<b>MH006961</b>	ND	México	2014
<b>LC063823</b>	ND	Japón	2014
<b>KY929405</b>	ND	Taiwán	2015
<b>KY929406</b>	ND	Taiwán	2016
<b>KR873434</b>	KNU-141112-P5	Corea del Sur	2014
<b>KP728470</b>	SQ2014	China	2014

<b>KP765609</b>	FL2013	China	2013
<b>KU847996</b>	ZL29	China	2015
<b>KU982969</b>	PEDV/USA/Iowa127/2015	Estados Unidos de Norteamérica	2015
<b>KU982972</b>	PEDV/USA/Minnesota129/2015	Estados Unidos de Norteamérica	2015
<b>KU982975</b>	PEDV/USA/Missouri130/2015	Estados Unidos de Norteamérica	2015
<b>KT591944</b>	USA/2014/IL/20697_P7	Estados Unidos de Norteamérica	2013
<b>KT860508</b>	USA/IL20697/2014_P5	Estados Unidos de Norteamérica	2013
<b>KR078299</b>	PC21A	Estados Unidos de Norteamérica	2013
<b>KR078300</b>	PC177	Estados Unidos de Norteamérica	2013
<b>KR265761</b>	USA/Hawaii/2014	Estados Unidos de Norteamérica	2014
<b>KR265831</b>	ND	Canadá	2014
<b>KU569509</b>	ND	Colombia	2014
<b>KR873435</b>	KNU-141112-P10	Corea del Sur	2014
<b>KR061458</b>	Italy/7239/2009	Italia	2009
<b>LM645058</b>	ND	Alemania	2014
<b>KR011756</b>	ND	Francia	2014

\*ND = No determinado