



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ROTAVIRUS PORCINO
MEDIANTE RT-PCR PUNTO FINAL EN PRODUCCIONES
PORCINAS DEL ESTADO DE MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARTHA SELENE QUINTANA SÁNCHEZ

Asesores:

Dr. José Iván Sánchez Betancourt

M.C. Saúl Reveles Félix

Asesor técnico: Dra. Claudia Mariana Pérez Rivera



Ciudad Universitaria, Cd de Mx.

2020



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

A mis padres, Martha y Rodrigo. Gracias por todo el amor y la confianza que me han dado durante estos años, por darme la oportunidad de prepararme profesionalmente, el esfuerzo de todos estos años no valdría la pena sin el apoyo de ustedes. Saben que son mi motor para seguir siempre adelante. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser mi casa de estudios, por permitirme conocer gente muy inteligente y talentosa y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

A Lalo por siempre estar conmigo en las buenas y las malas, por ser mi compañero y mi confidente, gracias por motivarme y animarme para seguir esforzándome cuando las cosas se tornaban complicadas, sabes todo lo que significas en mi vida.

A mi familia, que siempre me ha apoyado de una u otra forma, cada uno de ustedes ha aportado un poquito para que haya concluido esta etapa, los quiero.

Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt por el tiempo y compromiso dedicado a este trabajo, por el apoyo incondicional que me ha brindado desde que inicié el servicio social y por siempre motivarnos a alcanzar nuestras metas.

Al M. en C. Saúl Reveles Félix por todo el cariño, el apoyo, las risas y las enseñanzas, sabes que te quiero mucho, gracias por siempre llegar con una sonrisa y siempre darme ánimos.

A la Dr. Claudia Mariana Pérez Rivera por la hospitalidad y cariño que siempre me has brindado, por apoyarme en el laboratorio y en los muestreos y compartir tu conocimiento conmigo, eres una pieza clave en este trabajo.

A mis Sinodales: la MVZ. María del Carmen Mercado García, MVZ Juvencio García Sánchez, MVZ Ninnet Evelyn Gómez Romero, MVZ José Juan Martínez Maya por dedicar parte de su tiempo en la revisión de mi tesis y por sus aportaciones.

A la MVZ Amaranta Velázquez por ser mi hermanita del laboratorio, por las pláticas, las aventuras y las risas que pasamos mientras desarrollábamos nuestras tesis, te quiero.

Al Grupo de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, por la amistad, enseñanzas y aportaciones en los seminarios. Saúl, Mariana Pérez, Mariana García, Carmen, Mary, Amaranta, Manuel, Majo, Brenda, Alef, Jaqueline y René, muchas gracias.

Al Dr. José Manuel Saavedra Montañez y la Dra. María José Martínez Mercado por apoyarme con la interpretación de mis resultados y por el tiempo que dedicaron en compartir conmigo sus conocimientos.

A mis amigos: Mónica, Tania, Eddy, Ribanni, Rubí, que sin duda siempre hicieron las clases y el tiempo de estudio más ameno, por las aventuras, su amistad y su apoyo en todo momento, los quiero mucho.

A la Asociación IPVS México 2014 y al proyecto CONACYT CB-254244 por proporcionar los recursos para la realización de esta tesis.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de cerdos por facilitarme trabajar dentro de sus instalaciones.

A la Unidad de Investigación de la FMVZ por permitirme hacer uso de sus equipos y trabajar dentro de sus instalaciones.

RESUMEN

Los rotavirus son de las principales causas de gastroenteritis virales en niños y animales en todo el mundo. Esta enfermedad se transmite vía oro-fecal y en lechones causan diarreas severas desde el primer día de nacidos hasta después del destete, así como deshidratación, fiebre y vómito. En México, esta enfermedad no se diagnóstica comúnmente, y se ha dejado de investigar teniendo estudios previos desde hace más de una década. El objetivo principal del presente trabajo fue identificar la presencia del rotavirus porcino y determinar su frecuencia en granjas de traspatio y semitecnificadas del Estado de México. Para su diagnóstico, se llevó a cabo la estandarización de una RT-PCR de punto final la cual fue dirigida a un segmento del gen VP4. Se muestrearon 24 producciones porcinas, 16 de traspatio y 8 semitecnificadas, consiguiendo 140 muestras de heces de animales de 1 día hasta 2 meses de edad. Se obtuvieron cinco muestras positivas, dos de granjas semitecnificadas del municipio de Xonacatlán, las otras tres de granjas de traspatio en el municipio de Aculco, encontrando una frecuencia de 3.5% en el Estado de México. A partir de dos muestras positivas (una de cada producción) se realizó la secuenciación, obteniendo que ambas cepas pertenecían al Rotavirus porcino tipo A, genotipo P[7].

ABSTRACT

Rotavirus are the main cause of viral gastroenteritis in children and animals worldwide. This disease is transmitted by the fecal-oral route and in piglets causes severe diarrhea from the first day of birth until weaning, as well as dehydration, fever, and vomiting. In Mexico, this disease is not commonly diagnosed or researched, previous studies dated for more than a decade. The aim of this study was to identify the porcine rotavirus and to determinate its frequency in backyard and semi-technical farms in the State of Mexico. For the diagnosis a RT-PCR directed to a segment of the VP4 gene was standardized. A total of 24 pig productions (16 backyard and 8 semi-technical farms) were sampled. 140 feces samples from 1 day to 2 months piglets were obtained. The fecal samples were analyzed by means of the RT-PCR. Five positive samples were obtained, two of them from a semi-technical farm at the Xonacatlán municipality, the other three from a backyard farm in Aculco municipality. The frequency of porcine rotavirus in the State of Mexico was 3.5%. The two positive samples (one of each production) were sequenced and both strains belonged to the porcine Rotavirus type A, genotype P [7].

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| DEDICATORIA..... | II |
| AGRADECIMIENTOS..... | III |
| RESUMEN | V |
| ABSTRACT | VI |
| CONTENIDO..... | VII |
| LISTA DE FIGURAS | IX |
| LISTA DE CUADROS | X |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XI |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 2 |
| 1.2. Rotavirus..... | 5 |
| 1.3. Agente etiológico | 5 |
| 1.4. Clasificación de los Rotavirus | 7 |
| 1.5. Replicación viral | 8 |
| 1.6. Transmisión..... | 10 |
| 1.7. Signos clínicos y lesiones..... | 12 |
| 1.8. Diagnóstico..... | 13 |
| 1.8.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 13 |
| 1.8.2. Secuenciación..... | 15 |
| 1.8.3. Análisis electroforético mediante Bioanalizador | 16 |
| 1.9. Tratamiento y control | 16 |
| 1.10. Importancia en salud pública | 17 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 19 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 20 |
| 4. OBJETIVO GENERAL..... | 21 |
| 4.1. Objetivos específicos..... | 21 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| 5.1. Material biológico | 22 |
| 5.1.1. Virus control..... | 22 |
| 5.2. Muestras | 22 |
| 5.2.1. Muestreo..... | 22 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.2.2. | Obtención y manejo de las muestras..... | 23 |
| 5.2.3. | Procesamiento de las muestras | 23 |
| 5.3. | Estandarización de la RT-PCR..... | 24 |
| 5.3.1. | Diseño de oligonucleótidos..... | 24 |
| 5.3.2. | Extracción de ARN total | 25 |
| 5.3.3. | Características de la RT-PCR punto final | 26 |
| 5.3.4. | Electroforesis en geles de agarosa | 26 |
| 5.3.5. | Gradientes de temperatura de los oligonucleótidos | 27 |
| 5.3.6. | Diluciones de los Oligonucleótidos | 27 |
| 5.3.7. | Determinación de la amplificación con base en la concentración de ARN viral..... | 28 |
| 5.3.8. | Determinación de la especificidad | 29 |
| 5.4. | Análisis electroforético mediante bioanalizador | 30 |
| 5.5. | Secuenciación y análisis de secuencias..... | 31 |
| 6. | RESULTADOS | 32 |
| 6.1. | Estandarización de la RT-PCR punto final | 32 |
| 6.2. | Muestreo de las producciones porcinas del Estado de México..... | 34 |
| 6.3. | Identificación del Rotavirus porcino | 37 |
| 6.3.1. | RT-PCR punto final | 37 |
| 6.3.2. | Análisis electroforético en bioanalizador | 38 |
| 6.4. | Análisis filogenético | 39 |
| 7. | DISCUSIÓN | 42 |
| 8. | CONCLUSIONES | 46 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA | 47 |
| 10. | ANEXOS | 58 |
| 10.1. | ANEXO 1. Figuras de la optimización de la RT-PCR punto final | 58 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Replicación viral del Rv.

Figura 2.- Distribución de la muestra por los microcanales del chip.

Figura 3.- Reordenamiento de los Rotavirus.

Figura 4.- Condiciones de la estandarización de la RT-PCR punto final para RvP.

Figura 5.- Estandarización de la RT-PCR.

Figura 6.- Mapa del Estado de México.

Figura 7.- Electroforesis de la RT-PCR a muestras de la producción de Aculco, donde hubo positivas a RvP.

Figura 8.- Electroforesis mediante bioanalizador.

Figura 9.- Árbol filogenético dirigido al gen VP4, realizado a partir de la secuencia de nucleótidos.

Figura 10.- Árbol filogenético dirigido al gen VP4 con secuencias del Estado de México y de Norteamérica.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Frecuencias de RvP reportadas en diferentes países.

Cuadro 2.- Segmentos de ARN de Rotavirus.

Cuadro 3.- Clasificación del genoma completo de Rotavirus A

Cuadro 4.- Tamaño de muestra necesario para determinar la frecuencia en una población grande.

Cuadro 5.- Diseño de oligonucleótidos

Cuadro 6.- Protocolo de RT-PCR para los gradientes de temperatura.

Cuadro 7.- Diluciones de la concentración mínima y máxima detectables del virus.

Cuadro 8.- Datos de las producciones porcinas muestreadas.

Cuadro 9. Etapas y signos clínicos

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN : Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

AS: Ácido siálico

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

DcoVP: Deltacoronavirus Porcino

ddNTP's: Trifosfatos de dideoxinucleótidos

DEP: Diarrea Epidémica Porcina

DEPC: Dietil pirocarbonato

DLP: Double layered particle (Partícula de doble capa)

DNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatados

dsARN: ARN de doble cadena

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)

EUA: Estados Unidos de América

g: gravedades

GET: Gastroenteritis Transmisible

Ig: Inmunoglobulina

LI-DMZC: Laboratorio de investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos

MPM: Marcador de peso molecular

NCBI: National Center of Biotechnology Information

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

NSP: Non Structural Protein (Proteína no estructural)

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida)

Pb: Pares de bases

PBS: Phosphate Buffered Saline (solución salina amortiguadora de fosfatos)

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

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (Retro transcriptasa-Reacción en cadena de la polimerasa)

Rv: Rotavirus

RvP: Rotavirus porcino

TAE: Tris Acetato EDTA

TLP: Triple layered particle (Partícula de tres capas)

USA: United States of America

UV: Ultra violeta

vDEP: Virus de la Diarrea Epidémica Porcina

vGET: Virus de Gastroenteritis Transmisible

VP: Viral Protein (Proteína viral)

μl: Microlitros

μM: Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la porcicultura, las enfermedades causadas por patógenos (virus, bacterias y parásitos) han obtenido importancia debido a los sistemas semitecnificados y tecnificados que se tienen actualmente. En estos, las producciones porcinas albergan a un número elevado de animales en un espacio reducido, aumentando la densidad poblacional, y a su vez la susceptibilidad de los cerdos hacia diferentes enfermedades infecciosas de tipo respiratorias (influenza porcina, complejo respiratorio porcino, etc.), reproductivas (leptospira, brucelosis, etc.), digestivas (diarrea epidémica porcina, salmonelosis porcina, etc.) y sistémicas (síndrome reproductivo y respiratorio porcino, erisipela porcina, circovirus porcina, etc.)¹.

De las anteriores, las enfermedades entéricas en cerdos, son de los padecimientos más frecuentes, principalmente en neonatos, debido al desarrollo de su sistema digestivo que no se encuentra completamente maduro y los hace más susceptibles¹, por lo que se presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad, lo que a su vez provoca grandes pérdidas económicas que son consideradas de alto impacto en la porcicultura². Los agentes infecciosos causales de estas enfermedades pueden ser de origen bacteriano (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, entre otros), viral (virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la gastroenteritis transmisible, deltacoronavirus porcino, etc.) o parasitario (*Cystoisospora suis*, *Cryptosporidium suis*)³. De las cuales, las enfermedades causadas por virus son difíciles de controlar, en la mayoría de los casos teniéndolas dentro de la producción^{3,4}. En los últimos años las enfermedades virales que han tomado mayor importancia en la porcicultura debido al impacto que causan son: la diarrea epidémica porcina (DEP), la gastroenteritis transmisible (GET), y más recientemente la causada por el deltacoronavirus porcino (DCoVP)^{3,5}. Sin embargo, existen agentes a los que no se les ha dirigido interés, algunos de ellos debido a que no se han buscado o aislado en el país como: kobuvirus, bocavirus, adenovirus, sapovirus, entre otros^{4,6,7}, u otros que se han dejado de estudiar como el rotavirus porcino (RvP)². Este último se ha encontrado asociado a cuadros

diarreicos en lechones de manera independiente⁸, pero también se ha presentado en coinfecciones con otros virus entéricos, por ejemplo: kobuvirus⁹, vDEP¹⁰, DCoVP¹¹; o entre los diferentes grupos de RvP¹², desencadenando una mayor alteración patológica en los lechones¹³. El rotavirus (Rv) es un agente que se encuentra distribuido a nivel mundial, tanto en las distintas especies de animales domésticos (perros, bovinos, aves, caballos, ratones, conejos), como en humanos, provocando cuadros diarreicos importantes⁸. A nivel mundial, los rotavirus se consideran como la primer causa de diarreas en niños¹⁴, ocupando en México el segundo lugar, incluyéndola dentro de las enfermedades diarreicas agudas¹⁵.

1.1. Antecedentes

Los primeros reportes de los Rv se realizaron en Estados Unidos de América (EUA) en 1943 por Lighth y Hodes, los cuales encontraron que estos agentes eran los causantes de provocar diarreas en becerros. Cuatro años después fue estudiado en ratones por Cheever y Mueller, quienes encontraron que la infección se puede transmitir por contacto entre animales o por instalaciones y material contaminado¹⁶. Sin embargo, el virus fue aislado por primera vez hasta 1969, a partir de muestras de heces de bovino donde se logró el aislamiento en cultivo celular y se clasificó como un rotavirus tipo A¹⁷. El rotavirus humano fue descrito en Australia en 1973 al encontrar partículas virales en biopsias de intestino delgado de niños con cuadros diarreicos¹⁸. Cinco años más tarde Fleweth, Woode y Mc Nulty reconocieron que estos virus eran diferentes según la especie donde se encontraran ¹⁷. En la actualidad se ha identificado la presencia de los rotavirus en Japón, Taiwan, Brasil, EUA, México, Canadá, India, España, Dinamarca, Korea, África, entre otros, tanto en animales como en humanos^{19,20}.

Actualmente se han descrito cinco tipos de Rv en cerdos (A, B, C, E y H)^{21,22}. El primer reporte de RvP tipo A se realizó en 1975 (Inglaterra) por Woode y Bridge²³ y en 1982 descubren la patogenicidad de este virus en el ganado porcino, así como su impacto en la velocidad de crecimiento. Los RvP tipo C fueron aislados por primera vez en lechones en 1980²⁴ y 5 años después, se reportan los RvP tipo

B aislados de cerdos gnotobióticos²⁵. El RvP tipo H se ha descrito únicamente en Brasil, Estados Unidos y Japón²⁶, mientras que el RvP tipo E en Reino Unido en el año de 1985²⁷. Se ha descrito que el RvP tipo A, se encuentra relacionado en infecciones mixtas con otros agentes o con otros grupos de rotavirus, con o sin signos de diarreas¹.

No se sabe con certeza a partir de cuándo se encuentra circulando el RvP en la República Mexicana, sin embargo, se comenzó a trabajar con él desde el año 1985 en Sonora, donde se realizó el aislamiento y la caracterización del virus²⁸. En México, no se tienen muchos reportes sobre el RvP, y los pocos que hay, no son actuales. En el año 1996 se demostró la presencia de tres tipos de RvP (A, B y C) en el estado de Yucatán en muestras de heces de lechones con cuadros diarreicos²¹. De igual manera, en estudios realizados por García D (1998) y Socci E. (1999), se encontró su presencia en infecciones mixtas con bacterias como *Lawsonia intracellularis* y *E. coli*, respectivamente^{29,30}. En 1992, en un estudio realizado en Yucatán, se analizaron 170 muestras de lechones de 1 a 4 semanas de edad, detectando 15 positivas (8.8%) mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)³¹. En otro estudio realizado en el mismo estado durante el año 2004, se analizaron 243 muestras de materia fecal de cerdos mediante el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA) directo, encontrando que el 3.3% de las muestras fueron positivas para RvP tipo A³².

En estudios realizados en diferentes países y años también se ha determinado la frecuencia del Rotavirus porcino, encontrando datos muy variables. En el Cuadro 1 se citan algunos datos.

Cuadro 1. Frecuencias de RvP reportadas en diferentes países.

| País | Tipo y frecuencia de RvP (%) | Año | Tipo de prueba | Número de muestras | Referencia |
|----------------------------|---|------|---|--------------------|---|
| México | 8.8 | 1992 | PAGE (rotaforesis) | 170 | (Puerto, S <i>et al.</i> , 1992) ³¹ |
| México | 26 | 1996 | PAGE (rotaforesis) | 289 | (Puerto, M <i>et al.</i> , 1996) ²¹ |
| México | 16 | 1999 | PAGE (rotaforesis) | 180 | (Socci <i>et al.</i> , 1999) ²⁹ |
| Perú | 23.2 diarrea 2.7 sin diarrea | 2011 | PAGE (rotaforesis) | 142 | (Rojas <i>et al.</i> , 2011) ³ |
| EUA | RvA 63.6 RvB 46.6 RvC 57.8 | 2012 | RT-PCR | 173 | (Marthaler <i>et al.</i> , 2012) ³³ |
| Europa | Dinamarca:10. Eslovenia: 20. España: 27 diarrea 7 sin diarrea | 2012 | Dinamarca- ELISA Eslovenia- RT-PCR España- Inmunocromatografía y RT-PCR | 11016 | (Midgley <i>et al.</i> , 2012) ¹⁹ |
| Canadá | RvA 49 | 2013 | RT-PCR | 98 | (Lachapelle <i>et al.</i> , 2014) ³⁴ |
| EUA | RvA 9.4 | 2013 | RT-PCR | 371 | (Amimo, Vlasova and Saifa, 2013) ² |
| Brasil | RvA 27 | 2013 | RT-PCR | 63 | (Barbosa B, <i>et al.</i> ,2013) ³⁵ |
| EUA, México y Canadá | RvA 62 RvB 33 RvC 53 | 2014 | RT-qPCR | 7508 | (Marthaler <i>et al.</i> 2014) ³⁶ |
| Tailandia | RvA 20 | 2016 | RT-PCR | 491 | (Yodmeeklin <i>et al.</i> , 2016) ³⁷ |
| China | 0.31 | 2016 | RT-PCR | 314 | (Guo Z. <i>et al.</i> , 2016) ³⁸ |

1.2. Rotavirus

La rotavirus es una de las principales causas de diarrea en animales jóvenes y niños en todo el mundo. Este virus se transmite por vía oro-fecal y se replica en el intestino, causando la destrucción de los enterocitos, ocasionando diarrea y mala absorción de nutrientes, pudiendo ocasionar la muerte de los animales²². En los lechones, ésta enfermedad suele presentarse en los primeros días de vida hasta después del destete, disminuyendo la susceptibilidad a medida que el animal va creciendo, ya sea por la inmunidad adquirida o por la fisiología del animal⁸.

1.3. Agente etiológico

Los Rv pertenecen a la familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreovirinae*, son virus no envueltos de simetría icosaédrica, presentan un diámetro de entre 55 a 75nm³⁹ y pueden llegar hasta los 100nm⁴⁰. Su nombre se debe a que al observarse en el microscopio electrónico el virión se aprecia en forma de “rueda”. El virión maduro está compuesto por tres capas de proteínas (TLP, por sus siglas en inglés)⁴¹. La capa más externa está formada por la proteína VP4 y la VP7. La cápside está formada por 780 trímeros de glicoproteína VP7 y 60 espículas de VP4⁴⁰. La capa intermedia o partícula de doble capa (DLP, por sus siglas en inglés) está formada por 260 trímeros de VP6 (la proteína más abundante del virión) siendo esta una capa no infectante. La capa interna está formada por 60 dímeros de la proteína VP2 que rodea tanto al genoma como a las proteínas VP1 y VP3. Estas tres capas de proteínas rodean al genoma viral, conformado por aproximadamente 18,500 pares de bases, el cual se encuentran dividido en 11 segmentos de ARN de doble cadena (dsRNA)⁴⁰; por lo tanto, se clasifica dentro del grupo III de Baltimore. Los 11 segmentos codifican para seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y seis proteínas no estructurales (NSP1 – NSP5/6)²², los Rv tipo C no codifican para NSP6⁴¹ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Segmentos de ARN de Rotavirus. Tabla modificada de (López y Arias 2002)⁴²

| Segmento | Proteína a la que codifica | Tamaño del segmento (Pb) |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1 | VP1 | 3302 |
| 2 | VP2 | 2690 |
| 3 | VP3 | 2591 |
| 4 | VP4 | 2362 |
| 5 | NSP1 | 1581 |
| 6 | VP6 | 1356 |
| 7 | NSP3 | 1104 |
| 8 | NSP2 | 1059 |
| 9 | VP7 | 1062 |
| 10 | NSP4 | 751 |
| 11 | NSP5/NSP6 | 667 |

1.3.1. Proteínas estructurales

Se ha reportado que la proteína VP1 tiene actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN, la cual requiere de la proteína VP2 para su correcto funcionamiento. Además, se menciona que la proteína VP2 se encarga del empaquetamiento del genoma viral dentro de la nucleocápside. Se ha descrito que la proteína VP3 tiene funciones dentro de la transcripción del virus⁴². El papel de las proteínas VP4 y VP7 es la unión a los receptores en la superficie de la célula huésped y de su entrada, determinan el huésped, la virulencia, el tropismo, etc., además de que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes⁴². Al interactuar el virus con los jugos gástricos ocurre un proceso proteolítico que corta a VP4 en dos polipéptidos de menor tamaño (VP5 y VP8)⁴⁰. La proteína VP6 es la más abundante de todas, se ha descrito que su principal función es estructural; de

entre todas las proteínas la VP6 es la más inmunogénica, ya que estimula la producción de IgA en la mucosa del intestino delgado²⁰.

1.3.2. Proteínas no estructurales

Las principales funciones de las proteínas no estructurales son la síntesis de proteínas virales, replicación del genoma, empaquetamiento de los genes virales y la maduración de la partícula viral en el interior de la célula⁴². La NSP3 interacciona con un factor celular de iniciación de la traducción, lo que favorece la síntesis de proteínas virales. La proteína NSP1 bloquea la traducción de una parte de los ARNm virales y los conduce al viroplasma para la síntesis de la doble cadena⁴². A su vez, se sabe que las proteínas NSP2 y NSP5 son esenciales para la formación de los viroplasmos⁴⁰. Se ha descrito que la NSP4 es de gran importancia, debido a que sirve como un receptor intracelular para la unión de la VP6 y actúa como una enterotoxina viral⁸. Esta proteína es secretada por el virus aumentando los niveles de calcio intracelular, bloqueando la acción del citoesqueleto celular produciendo necrosis y lisis celular, causando diarrea por malabsorción en los animales⁴³. No se ha definido con certeza la función de la proteína NSP6 pero se ha reportado que interactúa con NSP5 y se localiza dentro del viroplasma ⁴¹

1.4. Clasificación de los Rotavirus

Se han descrito 10 grupos de Rv (A-J), los cuales están basados en la relación antigénica de la proteína VP6²², en cerdos se han encontrado cinco grupos (A, B, C, E y H), asociado los primeros cuatro a cuadros diarreicos^{12,22}. Dentro de todos los tipos de RvP, se ha demostrado que la infección por el tipo A es la de mayor ocurrencia en las producciones porcinas, representando hasta el 90% de los casos de diarreas por rotavirus en cerdos jóvenes¹. Este grupo también es considerado el más importante epidemiológica y clínicamente, ya que presenta mayor patogenicidad y prevalencia tanto en animales jóvenes y niños⁸.

Los rotavirus del grupo A se clasifican en diferentes genotipos y serotipos dependiendo las características de las proteínas VP4 y VP7 (serotipo P y serotipo G, respectivamente)⁴¹, ésta clasificación se basa en las reacciones inmunológicas que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes. El serotipo P (VP4) se refiere a la “Proteasa sensible” y el serotipo G (VP7) a la “glucoproteína”. Hasta la fecha se han descrito 27 serotipos tipo G diferentes y 37 del tipo P tanto para animales como en humanos²². En el 2008 se extendió la clasificación del genoma completo de acuerdo a las diferentes proteínas del virus (Cuadro 3.)⁴⁴.

Cuadro 3. Clasificación del genoma completo de Rotavirus A. Modificado de (Matthijnsens, et al, 2008⁴⁴).

| Proteína | Genotipo | Acrónimo |
|-----------------|-------------------------------|-----------------|
| VP7 | Glicoproteína | Gx |
| VP4 | Proteasa sensible | Px |
| VP6 | Cápside intermedia | Ix |
| VP1 | Polimerasa dependiente de ARN | Rx |
| VP2 | Proteína del núcleo | Cx |
| VP3 | Metiltransferasa | Mx |
| NSP1 | Interferón antagonista | Ax |
| NSP2 | NTPasa | Nx |
| NSP3 | Potenciador de la traducción | Tx |
| NSP4 | Enterotoxina | Ex |
| NSP5 | Fosfoproteína | Hx |

1.5. Replicación viral

El Rv para que pueda comenzar su ciclo de replicación debe unirse a su receptor localizado en la superficie de los enterocitos que forman las vellosidades del intestino delgado. En primer lugar, las espículas de VP4 interactúan con los receptores celulares que contienen ácido siálico (AS) o algunas integrinas ($\alpha 2\beta 1$,

$\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$); aunque se ha demostrado que no es necesaria la presencia de AS para que se una al receptor⁴².

Los Rv de origen animal presentan dos dominios en la proteína VP4, uno dependiente de AS (VP8) y uno independiente de AS (VP5), siendo interacciones secuenciales dentro de la unión a los receptores celulares; haciendo la relación Rv y del AS dependiente de VP4 y no de la especie de origen ⁴⁵. Se ha descrito que el gangliósido GM3 que contiene AS es el receptor para Rv de la cepa porcina OSU⁴⁵.

Se desconoce cómo se lleva a cabo la entrada del virus a la célula pero se ha reportado que es por endocitosis o por penetración directa^{40,45}, la tripsina juega un papel muy importante en este paso ya que facilita su entrada a la célula ⁴⁶. Una vez que entra la partícula viral (Figura 1), se solubilizan las proteínas externas (VP4 y VP7) debido a las bajas concentraciones de calcio en el endosoma, se internalizan al citoplasma celular dando lugar a los DLPs y activan la transcripción que depende de la ARN polimerasa⁴¹. La transcripción se lleva a cabo a partir de DLPs por medio de la transcriptasa viral de VP1 y de la guaniltransferasa de VP3. Los ARNs mensajeros sintetizados tienen dos funciones, como mensajeros para la traducción de las proteínas virales (estructurales y no estructurales) y como molde para la síntesis del ARN de doble cadena que continuará con la replicación del genoma viral⁴².

Una vez que se acumulan varios DLPs en el citoplasma de las células infectadas, se empaquetan en estructuras llamadas viroplasmos, donde se ha descrito que se lleva a cabo la replicación del ARN viral. Para que se formen los viroplasmos se requieren las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 ⁴¹. En estas estructuras se lleva a cabo el empaquetamiento del ARN, dándose la interacción de los 11 segmentos de ARN con las proteínas virales del núcleo para ser empaquetados en partículas individuales. Se ensamblan los DLPs, salen de los viroplasmos y se dirigen hacia el retículo endoplásmico, ahí las partículas entran envueltas, pero la envoltura se pierde cuando adquieren su tercera capa proteica (TLPs) conformada por VP4 y VP7. Una vez que se unen las proteínas de la capa externa, la partícula

que ya está compuesta por las tres capas restaura su infectividad dando lugar a la partícula madura y a su liberación por lisis celular o gemación.⁴¹.

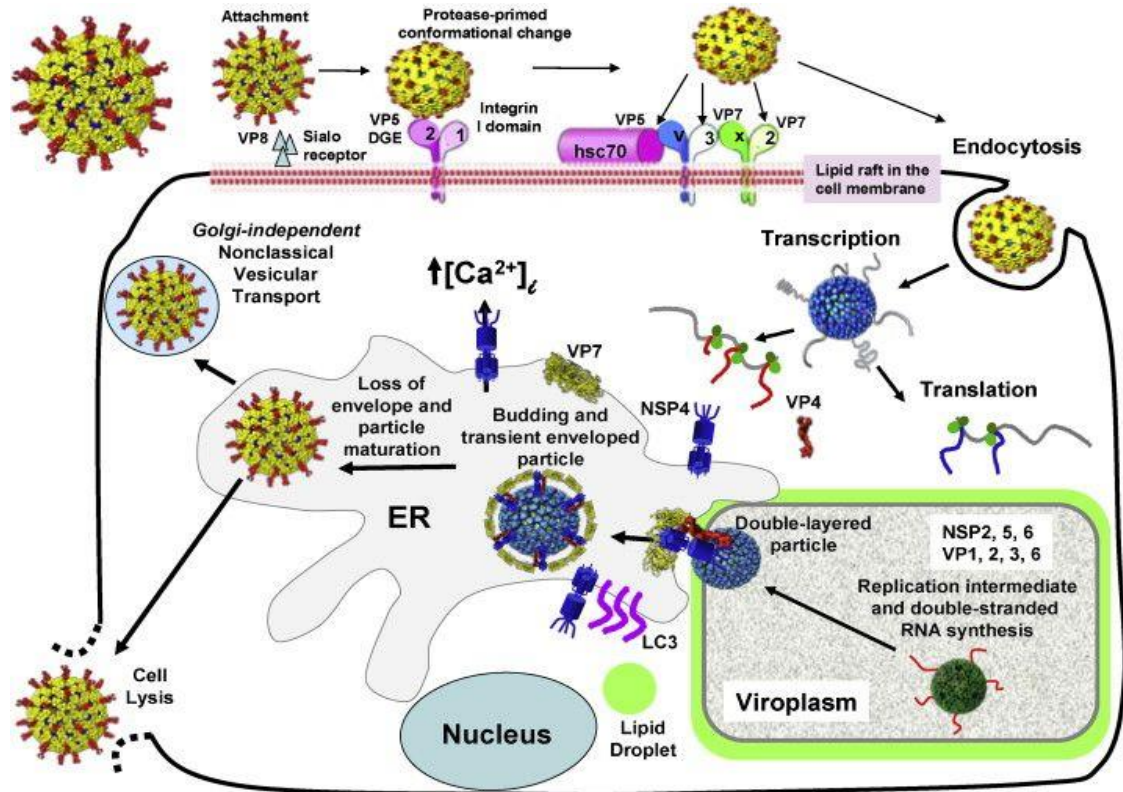


Figura 1. Replicación viral del Rv. Tomada de Estes and Greenberg, 2013⁴⁷

1.6. Transmisión

La transmisión de Rv se da por vía oro-fecal, puede ser de manera directa, ocurriendo por el contacto entre cerdos, o de forma indirecta, por medio de heces que se encuentren presentes en el alimento, instalaciones, camiones de transporte, entre otros⁴⁸. Afecta principalmente a cerdos lactantes de entre los 7 y 28 días de edad¹, aunque también se puede presentar después del destete⁴⁹. Una vez que ingresa el virus, pasa por el tracto digestivo hasta llegar al intestino delgado, donde infecta a los enterocitos⁵⁰. Se ha observado que el virus se puede

eliminar entre 1 y 14 días post infección²² y principalmente durante los cuadros diarreicos¹.

Se ha descrito que los Rv son muy resistentes a las condiciones medioambientales manteniendo su infectividad en heces hasta por 9 meses a temperatura ambiente¹. Los tipos de granjas, así como las instalaciones juegan un papel muy importante en la transmisión de los Rv debido a las deficiencias que se pudieran tener en cuanto a limpieza y medidas de bioseguridad en algunos tipos de sistemas.

Dentro de la porcicultura, las producciones porcinas se pueden clasificar de acuerdo a su tipo de producción (cría, destete, desarrollo y finalización, de ciclo completo), al número de animales (a gran escala, mediana y pequeña escala), al flujo de animales (flujo continuo, todo adentro todo afuera, etc.), al grado de intensividad (extensivo, intensivo, pastoril, etc.), o al grado de tecnificación (traspatio, semitecnificado, tecnificado) por mencionar algunos^{51,52}.

De acuerdo con el grado de tecnificación se describen los siguientes tres sistemas:

Sistema tecnificado. Este sistema se refiere a la porcicultura industrializada donde se llevan a cabo manejos en cuanto a nutrición, reproducción y sanitarios incluyendo el uso de programas informáticos para los registros de producción y equipos automatizados, así como un control estricto en animales, personal y bioseguridad. El destete generalmente se da a temprana edad, a los 21 días. El manejo zoonosanitario se basa en la prevención, las medidas de bioseguridad y la aplicación de inmunógenos⁵³.

Sistema semitecnificado. En este sistema se pueden tener algunas medidas similares al sistema tecnificado como el control en la reproducción; el uso de registros usualmente es de manera manual y la alimentación suele consistir en una dieta balanceada que generalmente se compra ya preparada. Algunos sistemas pueden tener medidas de bioseguridad como vados sanitarios,

desinfección de instalaciones periódicamente, ropa exclusiva para la producción o corrales de cuarentena. El destete se realiza entre los 21 a 28 días de edad⁵².

Sistema a pequeña escala o de traspatio. Consiste en granjas que tienen entre 1 y 50 reproductoras, generalmente se localizan en el traspatio de las viviendas en zonas urbanas o periurbanas, la lactación puede durar 28 días o más; en algunos casos no existen registros de producción ni control en cuanto a la reproducción y la alimentación, siendo ésta muy variable, desde desperdicios de frutas, verduras, tortillas, desperdicios de cocina y en algunos casos se combina con alimento comercial. En éstos sistemas las medidas de bioseguridad suelen no ser las más adecuadas para prevenir y controlar la entrada de agentes infecciosos^{52,53}.

1.7. Signos clínicos y lesiones

El periodo de incubación oscila de las 18 a las 96 horas¹. El cuadro clínico de la infección por RvP presenta límites amplios, puede ir desde cursar de manera asintomática o subclínica³, hasta presentar lechones con diarreas acuosas severas, vómitos, deshidratación, depresión y fiebre, acompañadas de una rápida pérdida de peso, ocasionando un retardo en el crecimiento^{22,54}. El virus puede alcanzar tasas muy variables de morbilidad, menores al 20% hasta 70% y de mortalidad desde el 7% hasta 20%, dependiendo de factores como desnutrición, cambios de temperatura, dosis del virus, edad de los cerdos, inmunidad de los lechones y presencia de coinfecciones^{1,55}.

Se presenta principalmente en cerdos desde el primer día de nacidos hasta el día 41 o cerdos recién destetados, esto ocurre debido a que la regeneración de las vellosidades intestinales es más lenta en lechones, por lo cual se presenta mala absorción, que lleva a la desnutrición, provocando las lesiones más severas entre los días 1-14 de edad. Cuando se presenta la infección únicamente por Rv, las diarreas pueden ser ligeras, limitándose a 2 o 3 días, pero cuando hay coinfecciones con otros virus, parásitos o bacterias la diarrea suele ser más severa y aumenta la mortalidad y morbilidad¹.

Microscópicamente se observa lisis de los enterocitos, atrofia de las vellosidades e infiltración de células mononucleares en la lámina propia^{22,49}. Macroscópicamente se observa el intestino delgado distendido, las paredes adelgazadas y flácidas con líquido amarillento¹. Se ha observado que el RvP tipo A, genera mayor atrofia en las vellosidades del intestino, así como diarreas más severas¹.

1.8. Diagnóstico

Debido a la gran similitud con otras enfermedades entéricas de etiología viral, es necesario realizar el diagnóstico en el laboratorio a partir de muestras de intestino o heces, ya que podría confundirse con otras enfermedades². Para el diagnóstico de RvP se pueden utilizar diferentes tipos de técnicas, la identificación del virus se puede realizar por observación directa por microscopía electrónica, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), la RT-PCR⁵⁶, la técnica de aglutinación en látex⁵⁷, RT-PCR en tiempo real⁵⁸, aislamiento viral⁵⁹. Sin embargo, para la detección de anticuerpos se realizan técnicas como la ELISA³⁹ e inmunocromatografía⁵. En México únicamente se realiza el diagnóstico de RvP mediante la técnica de RT-PCR en muy pocos laboratorios⁶⁰.

1.8.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, es una reacción enzimática *in vitro* que permite la amplificación de un segmento específico de la cadena de ADN que sirve como molde, mediante el uso de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar nuevas cadenas de ADN⁶¹. Este proceso se realiza durante varios ciclos dentro de un termociclador que aumenta y disminuye la temperatura en ciclos puntuales. Es un procedimiento rápido, de alta sensibilidad, específico y fácil de reproducir y analizar⁶².

Los elementos de la PCR son: los oligonucleótidos, la enzima, el ADN blanco, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), magnesio, amortiguador y H₂O libre de nucleasas. Los oligonucleótidos son secuencias de nucleótidos de entre 15 a 30 pares de bases que delimitan la

secuencia blanco que se desea amplificar. Los dNTPs son las bases nitrogenadas con las que el ADN polimerasa completará la cadena de ADN. El amortiguador es usado como medio para la reacción, el magnesio actúa como cofactor enzimático y el agua se usa como diluyente⁶³. Cuando se trata de material genético ARN (ya sea mensajero o viral), se emplea la técnica de transcripción reversa (RT) adicional a la reacción común de PCR, en el cual la enzima transcriptasa reversa se encarga de generar una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir del ARN molde^{64,65}.

La PCR se compone de tres etapas que conforman un ciclo (desnaturalización, hibridación o alineamiento y extensión), durante la etapa de desnaturalización, el termociclador aumenta su temperatura a 95°C durante 20-30 segundos lo que provoca que las cadenas de ADN se separen quedando como cadenas sencillas. Durante la fase de alineamiento, los oligonucleótidos se alinean a sus dNTPs correspondientes en la cadena molde, a una temperatura entre 40-60°C. Posteriormente en la fase de extensión la temperatura sube a 72°C donde la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa agregando los dNTPs a partir de la cadena de oligonucleótidos en dirección 5´ a 3´⁶⁶. Una vez completado el número de ciclos deseados de la PCR, al producto que se obtiene se le llama amplicón⁶⁴.

Para visualizar el amplicón es necesario hacer una electroforesis. Ésta se realiza en geles de agarosa o acrilamida y permite separar los fragmentos del amplicón por su tamaño. La agarosa y la acrilamida forman una especie de red por donde pasan las moléculas de ADN (carga negativa) hacia el polo contrario (carga positiva), ocasionando que los fragmentos se separen y se agrupen de acuerdo a el tamaño de sus moléculas, formando bandas en el gel⁶⁶. Para visualizar los amplicones dentro del gel es necesario usar alguna sustancia de tinción (Por ejemplo: Gel Red (Biotium), SYBR Green (Invitrogen), bromuro de etidio, entre otros) que se intercale en las bases de ADN y al observarlo bajo luz UV cause fluorescencia.

Para los RvP se han desarrollado técnicas de diagnóstico como la RT-PCR punto final o RT-PCR en tiempo real dirigidas a los genes VP4, VP7, VP6 y NSP4 principalmente^{34,36,38,67}.

1.8.2. Secuenciación

La secuenciación es una técnica que se describió por primera vez por Maxam y Gilbert por el “método de degradación química” en el año de 1977 y posteriormente por Frederick Sanger por el “método enzimático”⁶⁸. El objetivo de esta es determinar en qué orden se disponen las cuatro bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Timina y Citosina) del ADN. En el método químico se somete la molécula a distintas reacciones químicas para fragmentarla y posteriormente se separan los fragmentos mediante una electroforesis en gel⁶⁹. Por otro lado, en el método enzimático se generan fragmentos de ADN de diferentes tamaños usando trifosfatos de dideoxinucleótidos (ddNTPs) de cada uno por separado, así al observar el patrón de bandeo en un gel de poliacrilamida se logra deducir la secuencia⁷⁰. En la actualidad, existen diferentes tipos de secuenciación como los métodos convencionales (método Sanger), o los de nueva generación (Ion torrent)⁷¹.

Una vez obtenidas las secuencias, estas se pueden analizar con diferentes programas para proporcionar información acerca de la secuencia encontrada, o del organismo en cuestión. Se puede realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas por medio de algunos softwares como: Clustal W, Bioedit o BLAST, en los cuales podemos observar las variaciones que presenten las secuencias de estudio con algunas otras de referencia, también se puede hacer el análisis filogenético para obtener información de los parentescos de las secuencias con las de algunos otros microorganismos, estos análisis se pueden realizar por medio de softwares como por ejemplo MEGA, PAUP y Phylip⁷².

1.8.3. Análisis electroforético mediante Bioanalizador

El bioanalizador es un equipo en el cual se puede realizar la electroforesis en un micro chip de manera más rápida y automatizada, ocupando una mínima cantidad de muestra y probando hasta 11 muestras a la vez⁷³.

En esta técnica, la muestra se desplaza desde el pocillo por los microcanales del chip y se va separando mediante cargas eléctricas (Figura 2). Los componentes se detectan mediante fluorescencia y se traduce en imágenes en forma de gel (bandas) y en electroferogramas (picos)⁷⁴.

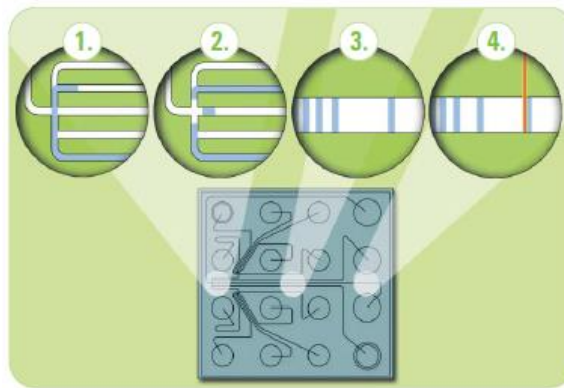


Figura 2. Distribución de la muestra por los microcanales del chip, tomada de Agilent 2010⁷⁴

1.9. Tratamiento y control

El tratamiento y el control de RvP en el mundo no está muy estudiado, en algunas producciones porcinas las infecciones causadas por este virus cursan de forma subclínica o de forma más leve, por lo tanto el desarrollo de la enfermedad estará dada por la inmunidad que reciben los lechones de sus madres y por la bioseguridad de la granja³³. Debido a la gran diversidad de las cepas de Rv, principalmente las del grupo A², las vacunas actuales enfrentan grandes desafíos que comprometen su eficacia⁵⁹. No existe un tratamiento para la infección por RvP por lo que las medidas que se toman se basan principalmente en reemplazar los

líquidos y la pérdida de electrolitos para combatir la deshidratación, así como mantener a los animales en un lugar seco y confortable, con la finalidad de evitar infecciones secundarias por bacterias, se recomienda administrar antibióticos^{1,55}. En la actualidad existe una vacuna para cerdos llamada ProSystem® Rota (Intervet Inc./Merck Animal Health), de virus vivo modificado con dos serotipos de rotavirus grupo A, pero solo tiene licencia en EUA².

Debido a la falta de vacunas comerciales de Rv para cerdos, se han tomado otras medidas de control como lo es el *feedback* que se usa como un tratamiento preventivo⁷⁵. Este es un macerado de intestinos y materia fecal que se les administra de forma oral a las cerdas entre 4 y 8 semanas antes del parto para estimular la síntesis de anticuerpos maternos, proporcionando inmunidad pasiva a los lechones por medio del calostro y la leche³³. Aunque es una medida de control eficiente, se deben tener ciertas consideraciones al administrar a las cerdas el *feedback* ya que podría inocularse otro virus o bacteria indeseados⁷⁶. El Rv se puede inactivar con etanol al 70%, glutaraldehído al 2%, cloro, fenoles, hipoclorito de sodio, por mencionar algunos¹. La mejor manera de controlar y prevenir el virus es mejorar la bioseguridad dentro de la granja¹.

1.10. Importancia en salud pública

Los Rv tienen distribución mundial, y afecta una gran cantidad de especies animales, inclusive el humano, en donde se ha observado que la prevalencia más alta se da en los meses fríos⁷⁷. Algunos autores señalan el posible potencial que tienen algunas cepas del virus como agentes zoonóticos²².

En varios países como España, Italia y Taiwán, por mencionar algunos, han encontrado serotipos de origen animal (principalmente porcino y bovino) en cepas de rotavirus humano, lo que refuerza la posible transmisión entre especies, planteando un problema de salud pública^{19,78}.

La transmisión entre especies también se ha descrito que es un mecanismo para generar nuevas cepas de Rv⁷⁹.

Actualmente se han reportado reordenamientos genéticos entre los Rv de diferentes especies como cerdos, humanos y bovinos (figura 3)⁸, así como infecciones mixtas entre los mismos Rv, principalmente entre los tipos A, B y C¹². Los Rv del grupo A siguen siendo los más importantes en cuanto a prevalencia y patogenicidad tanto en animales y humanos a comparación de los Rv del grupo C que causan menos del 5% de las hospitalizaciones en niños⁸⁰.

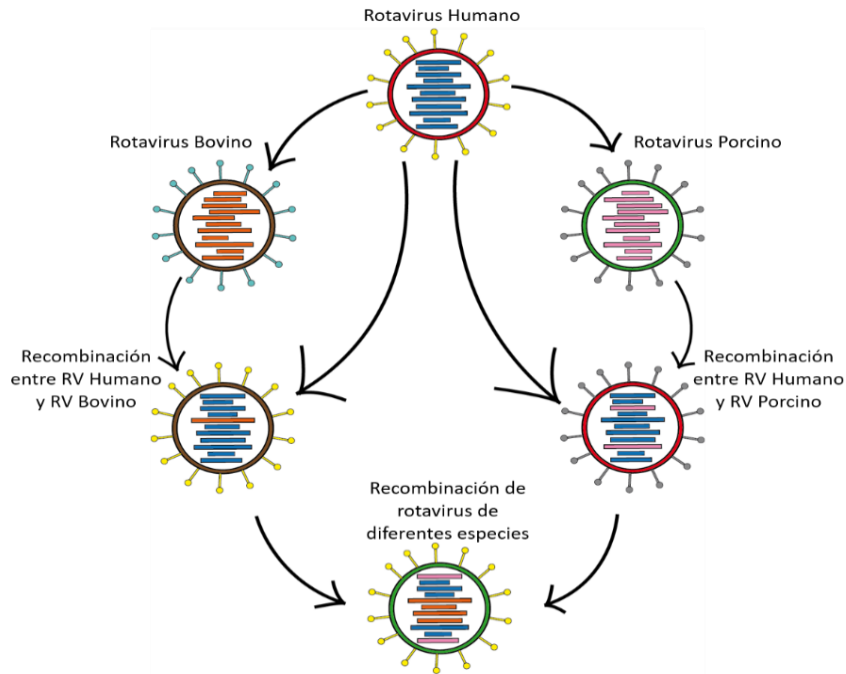


Figura 3. Reordenamiento de los Rotavirus. Modificada de Malik, et al. 2004⁸

2. JUSTIFICACIÓN.

A partir del año 2014, la porcicultura en México se ha visto afectada en gran medida por los coronavirus entéricos, sin embargo, no se tiene información actualizada sobre rotavirus porcino (RvP). En otros países se ha descrito la circulación de RvP en coinfecciones con otros virus o bacterias, así como potencial zoonótico que tienen algunas cepas y su importancia en la salud pública. Por tal motivo, es necesario conocer si este virus se encuentra circulando en las producciones porcinas de traspatio y semitecnificadas, donde se hayan presentado brotes entéricos durante los últimos dos años, para tener un panorama claro acerca del estatus de esta enfermedad en el Estado de México y generar información que permita implementar medidas preventivas.

3. HIPÓTESIS

Las enfermedades entéricas generadas por coronavirus que han afectado a los cerdos en los últimos años pueden estar encubriendo la presencia del rotavirus porcino en producciones semitecnificadas y de traspatio del Estado de México.

Por tal motivo, se esperan encontrar muestras positivas a rotavirus porcino en lechones con diarreas.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de rotavirus porcino y determinar su frecuencia en producciones porcinas de traspatio y semitecnificadas del Estado de México.

4.1. Objetivos específicos

- Estandarización de la prueba de RT-PCR punto final para el diagnóstico de rotavirus porcino.
- Identificar rotavirus porcino en muestras de heces por medio de la RT-PCR.
- Determinar la frecuencia del rotavirus porcino en granjas porcinas de traspatio y semitecnificadas en el Estado de México.
- Realizar el análisis filogenético.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

5.1.1. Virus control

Para el presente trabajo se utilizó la cepa comercial Porcine Rotavirus (ATCC® VR-892™) de rotavirus porcino, que pertenece a la cepa OSU, una cepa virulenta de origen intestinal, originaria de Ohio, Estados Unidos con la cual se realizó la estandarización de la RT-PCR punto final.

5.2. Muestras

5.2.1. Muestreo

Se realizó el muestreo en producciones porcinas de traspatio y semitecnificadas del Estado de México. El tamaño de muestra utilizado para este estudio fue de 139, y se obtuvo mediante el método de Mateu y Casal, el cual se calcula tomando en cuenta el nivel de confianza que en este caso fue del 95% y el error admitido que fue del 5% con una frecuencia esperada del 10% (Cuadro 4).

- ✓ Las muestras de heces se obtuvieron de cerdos de un día hasta dos meses de edad.
- ✓ Se muestrearon granjas de traspatio y semitecnificadas que tenían antecedentes de problemas gastroentéricos en los últimos dos años.
- ✓ Se tomaron muestras del 10-15% de la población de cerdos presentes en la producción porcina.

El periodo del muestreo fue del mes de octubre de 2018 a febrero de 2019.

Cuadro 4. Tamaño de muestra necesario para determinar la frecuencia en una población grande. Con un nivel de confianza del 95% (cuadro tomado de Mateu y Casal, 2003)⁸¹.

| Frecuencia esperada | Precisión o error | | | | | |
|---------------------|-------------------|-----|-----|------------|-------|-------|
| | 25% | 20% | 10% | 5% | 3% | 1% |
| 5% | 3 | 5 | 19 | 73 | 292 | 1,825 |
| 10% | 6 | 9 | 35 | 139 | 554 | 3,458 |
| 15% | 8 | 13 | 49 | 196 | 784 | 4,899 |
| 20% | 10 | 16 | 62 | 246 | 984 | 6,147 |
| 25% | 12 | 19 | 73 | 289 | 1,153 | 7,203 |
| 30% | 13 | 21 | 81 | 323 | 1,291 | 8,068 |
| 35% | 14 | 22 | 88 | 350 | 1,399 | 8,740 |
| 40% | 15 | 24 | 93 | 369 | 1,476 | 9,220 |
| 45% | 16 | 24 | 96 | 381 | 1,522 | 9,508 |
| 50% | 16 | 25 | 97 | 385 | 1,537 | 9,604 |

5.2.2. Obtención y manejo de las muestras

Las muestras de heces se obtuvieron mediante el uso de hisopos rectales. Una vez tomado, fue colocado en un microtubo de 1.5 ml con solución PBS (*Phosphate Buffered Saline*, por sus siglas en inglés), y colocado en una hielera, manteniendo la temperatura a 4°C, hasta su llegada al laboratorio⁴.

5.2.3. Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron en el laboratorio de investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (LI-DMZC) las cuales se acomodaron por número de granja y se procesaron de la siguiente manera:

1.- Las muestras se homogenizaron mediante el uso del vortex durante 15 segundos aproximadamente, con la finalidad de desprender las partículas fecales del hisopo.

- 2.- Se sacó el hisopo del tubo, presionándolo en la pared de este para obtener el máximo líquido posible.
- 3.- Se clarificó la muestra por medio de centrifugación a 4000 rpm (1789g) durante 10 minutos a 4°C.
- 4.- Se recolectó el sobrenadante colocándolo en un microtubo nuevo, con la finalidad de desechar la materia orgánica sedimentada.
- 5.- El microtubo con el sobrenadante se resguardó en congelación a -70°C, hasta su posterior uso.

5.3. Estandarización de la RT-PCR

5.3.1. Diseño de oligonucleótidos

Se realizó el diseño de los oligonucleótidos dirigidos al segmento 4 que pertenece a la proteína estructural VP4, a partir de cepas de referencia reportadas en el Genbank del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, U.S. National Library of Medicine), tomando como referencia la cepa OSU/1975 (Número de acceso KR052770.1). Una vez obtenida la secuencia de los posibles oligonucleótidos se probó su especificidad por medio de la herramienta del BLAST del NCBI. Cuando se obtuvieron los oligonucleótidos con las características óptimas, se mandaron sintetizar a la empresa Oligo t4® (T4 oligo®, <http://t4oligo.com/home/>).

Cuadro 5. Diseño de oligonucleótidos.

| VP4 | Secuencia | Longitud | Temperatura | Longitud del producto |
|---------|--------------------------|----------|-------------|-----------------------|
| Forward | GGTCCATTCGCACAAACAG | 19 | 57.23 | 765 |
| Reverse | TGACCATTTGTATCCTAATCCTCC | 24 | 57.81 | |

5.3.2.Extracción de ARN total

Se realizó la extracción del ARN total para el virus de referencia, así como para cada una de las muestras de heces, mediante el método de isotiocinato de guanidina-fenol-cloroformo, con el reactivo Trizol® LS reagent (Life technologies Carp., Carlsbad, CA, USA), el protocolo se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante, como se muestra a continuación:

- 1.- Se agregó 500 microlitros (μ l) de muestra y 500 microlitros (μ l) de Trizol en un microtubo de 1.5 ml.
- 2.- Se incubó durante 10 minutos a 4°C.
- 3.- Se agregaron 200 microlitros de cloroformo al 100%, frío (4°C).
- 4.- Se homogenizó en vortex vigorosamente durante aproximadamente 15 segundos.
- 5.-Se incubó durante 5 minutos a 4°C.
- 6.- Se centrifugó a 12 000 rpm (16099g) durante 15 minutos a 4°C.
- 7.-Se separó la fase acuosa (que contiene el ARN) en otro microtubo, sin arrastrar la fase fenólica o fase orgánica (que contiene el DNA).
- 8.- Se adicionó un volumen igual de isopropanol frío (500 microlitros) al microtubo.
- 9.- Se incubó durante 2 horas, a -20°C.
- 10.- Se centrifugó a 12 000 rpm (16099g) durante 10 minutos a 4°C.
- 11.- Se decantó el isopropanol y se lavó la pastilla de ARN con 200 microlitros de etanol al 70%, preparado en agua DEPC.
- 12.- Se centrifugó a 12 000 rpm (16099g) por 10 minutos a 4°C.
- 13.- Se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla durante 5 horas.
- 14.- Se suspendió la pastilla de RNA en 30 microlitros de agua DEPC.

5.3.3. Características de la RT-PCR punto final

Se llevó a cabo la estandarización de la RT-PCR punto final, dirigida hacia el gen VP4, utilizando el kit OneStep de Qiagen®, siguiendo las especificaciones del fabricante (inserto de Qiagen® del kit, cat. 52906). Se realizó la optimización de los reactivos a un volumen final de 10 µL por reacción. Para cada reacción se utilizó: 2.9 µl de H₂O, 2 µl de Buffer Q, 2 µl de Buffer 5x, 0.4 µl de dNTPs (10 µM), 0.4 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 µM (Forward / Reverse), 0.4 µl de Enzima y 1.5 µl de muestra, utilizando el termociclador Multigene Optimax® (Labnet international Inc.).

5.3.4. Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización del amplicón se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Para preparar la agarosa se siguieron los siguientes pasos:

- 1.- Se agregaron 2.5gr de agarosa grado molecular (Vivantis) en 97.5ml de TAE concentración 1X (50X TAE Electrophoresis Buffer, Thermo scientific) y se calentó la mezcla en horno de microondas para disolver la agarosa.
- 2.- Una vez disuelta la agarosa se le agregó 1 µl de Gel Red® (Biotium) por cada 15ml (para hacer medio gel) o 2 µl en 25 ml de la mezcla de agarosa (para hacer un gel completo).
- 3.- Ya que se agregó el Gel Red® se homogenizó mediante vortex para mezclar, posteriormente se colocó en el molde junto con el peine que forma los pocillos y se dejó solidificar cubriéndolo de la luz.
- 4.- En la cámara de electroforesis se colocó el buffer TAE, se puso el gel ya solidificado y se le quitó el peine.
- 5.- En cada uno de los pocillos se colocaron 5 µl del producto obtenido de la RT-PCR mezclado con Buffer de carga y con el marcador de peso molecular (MPM) 100pb DNA Ladder (Invitrogen™).
- 6.- Se dejó correr la cámara de electroforesis (Bio rad, PowerPac Basic) durante 50 minutos a 85 voltios.

7.- Por último, se realizó la visualización del gel mediante luz UV, en un Fotodocumentador (Kodak Gel Logic 112 Transilluminator).

5.3.5. Gradientes de temperatura de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se reconstituyeron quedando a una concentración de 100µM en 400ml. Sin embargo, se manejó una solución de trabajo a una concentración de 10µM, para quedar en concentración final por reacción de 0.4µM cada oligonucleótido. Se realizó un protocolo de RT-PCR (Cuadro 6) para determinar la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, los gradientes de temperatura se manejaron de los 53°C hasta los 58°C.

Cuadro 6. Protocolo de RT-PCR para los gradientes de temperatura.

| Proceso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|-------------|--------|
| RT | 50°C | 30 minutos | 1 |
| Desnaturalización inicial | 94°C | 15 minutos | 1 |
| Desnaturalización | 94°C | 30 segundos | 35 |
| Alineamiento | 53°C – 58°C | 30 segundos | |
| Extensión | 72°C | 1 minuto | |
| Extensión final | 72°C | 7 minutos | 1 |

5.3.6. Diluciones de los Oligonucleótidos

A partir de la solución stock de los oligonucleótidos (100 µM) se generó la solución de trabajo a una concentración de 10 µM para cada uno. Las diluciones de oligonucleótidos se realizaron con base en la concentración final dentro del volumen total de la reacción, de 0.1 µM hasta 0.8 µM, con el fin de determinar la concentración en la que se observaba la amplificación.

5.3.7. Determinación de la amplificación con base en la concentración de ARN viral

5.3.7.1. Cuantificación del ARN viral

La cuantificación se realizó con el equipo Qubit 2.0 Fluorometer (Life technologies), con el kit Qubit® dsRNA HS Assay, siguiendo las especificaciones del fabricante.

1.- Se realizó una solución de trabajo 1:200, se mezcló 199µl de la solución RNA HS buffer y se agregó 1µl de la solución Qubit RNA HS Reagent, esto para cada reacción.

2.- Para los tubos estándares se colocó 190 µl de la solución de trabajo y 10 µl de cada estándar y se mezcló mediante pipeteo sin hacer burbujas.

3.- Para los tubos de las muestras se colocaron 199 µl de la solución de trabajo y 1 µl de cada muestra y se mezcló mediante pipeteo sin hacer burbujas.

4.- Incubación de todos los tubos por 2 minutos a temperatura ambiente y sin darles la luz directamente.

5.- Cuantificación usando el equipo Qubit 2.0 Fluorometer (Life technologies).

5.2.7.2. Amplificación de diluciones del ARN viral

Para determinar la cantidad mínima detectable y la concentración máxima detectable del virus comercial (ATCC), se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos totales, obteniendo una concentración de 4.4 ng/µl.

Se hicieron diluciones a partir de esta cuantificación quedando de la siguiente manera (cuadro 7):

Cuadro 7. Diluciones de la concentración mínima y máxima detectable del virus.

| Volumen final de 4 µl | | |
|-----------------------------|-----------|-----------------------------|
| Purificación del Virus (µl) | Agua (µl) | Concentración final (ng/µl) |
| 4.4 | 0 | 4.4 |
| 3.6 | 0.4 | 4 |
| 3.2 | 0.8 | 3.5 |
| 2.7 | 1.3 | 3 |
| 2.3 | 1.7 | 2.5 |
| 1.8 | 2.2 | 2 |
| 1.4 | 2.6 | 1.5 |
| 0.9 | 3.1 | 1 |
| 0.45 | 3.55 | 0.5 |

5.3.8. Determinación de la especificidad

Con la finalidad de determinar la especificidad *in silico* de los oligonucleótidos, se utilizó el programa en línea BLAST del NCBI para comparar la similitud entre el par de oligonucleótidos con las secuencias reportadas en el NCBI, para la prueba de especificidad *in vivo* se realizó una RT-PCR punto final al material genético (ARN o ADN) de diversos agentes patógenos de cerdos, principalmente aquellos que causan un cuadro entérico. Incluyendo al virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la gastroenteritis transmisible porcina, deltacoronavirus porcino, circovirus porcino tipo 2, virus de influenza (A/H1N1 y A/H3N2), virus del PRRS, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, que fueron donados por el Laboratorio de investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (LI-DMZC) y el Laboratorio de investigación del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública.

5.4. Análisis electroforético mediante bioanalizador

Se analizaron las muestras de ARN provenientes de los hisopos rectales mediante el equipo Bioanalizador Agilent 2100® (Agilent Technologies), usando el kit Agilent RNA 6000 Pico, para realizar el análisis electroforético de Rotavirus porcino.

Siguiendo las especificaciones del fabricante:

- 1.- Los reactivos se atemperaron 30 minutos antes de su uso.
- 2.- Se desnaturalizaron las muestras junto con el RNA Ladder 2 minutos por 70°C y se dejaron enfriar en hielo.
- 3.- Se agregaron 90 µl de agua libre de RNAsas al RNA Ladder y se prepararon alícuotas en microtubos de 0.5 ml, para su almacenamiento a -70°C.
- 4.- Se colocaron 550 µl de RNA Pico Gel Matrix (rojo) en la columna con filtro y se centrifugó a 1500 g por 10 minutos.
- 5.- Se realizaron alícuotas de 65 µl del gel filtrado en microtubos de 0.5ml y se almacenaron en refrigeración a 4°C.
- 6.- Para preparar el gel se agregó 1 µl del Nano Dye Concentrate (azul) previamente mezclado, a una alícuota con 65 µl del gel filtrado y se homogenizó en el vortex.
- 7.- Una vez preparado el gel se centrifugó a 13000g por 10 minutos (una vez preparado solo dura 1 día).
- 8.- Se colocó un chip nuevo en la base y se colocaron 9µl del preparado en las marcas correspondientes.
- 9.- En los 11 pozos de las muestras y el del Ladder se agregó 5µl del RNA Marker (verde).
- 10.- Se agregó 1µl del Ladder en el pozo asignado, así como 1µl de cada muestra en los 11 pozos correspondientes, en los pozos donde no hubo muestra se colocó 1µl de RNA Marker.
- 11.- De manera horizontal se agitó el chip mediante el vortex 1 minuto a 2400 rpm y se colocó en el bioanalizador para su lectura.

5.5. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación se realizó en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por medio del método SANGER; se envió el par de oligonucleótidos (forward y reverse) de cada muestra a una concentración de 10 μ M. Se utilizó un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem, Foster City USA). Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos se observó la calidad mediante el programa bioedit sequence alignment editor 7.2.6, y se editaron los errores de nucleótidos no definidos en los electroferogramas de la lectura original. Posteriormente, a partir de secuencias reportadas en el GenBank se realizó el alineamiento y la construcción del árbol filogenético empleando el programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics analysis), mediante el modelo Neighbor-Joining (NJ) se calculó utilizando 1000 repeticiones de bootstrap. Los genotipos P para el gen vp4 se asignaron a cada muestra después del análisis de las secuencias mediante la herramienta RotaC 2.0 en línea⁸².

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización de la RT-PCR punto final

Para la estandarización de la RT-PCR se sometieron los oligonucleótidos a gradientes de temperatura de 53°C hasta los 58°C, donde se observó la amplificación desde los 54°C hasta los 58°C (Anexo 1, figura 1), por lo cual se decidió trabajar con la temperatura media, que fue de 56°C.

Las condiciones de la RT-PCR estandarizada quedaron de la siguiente manera: un ciclo para la desnaturalización inicial a 97°C por 3 minutos, un ciclo a 50°C por 30 minutos para la RT, un ciclo para la desnaturalización a 94°C por 15 minutos; posterior a esto, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 30 segundos y extensión a 72°C por un minuto; por último un ciclo a 72°C por 7 minutos para la extensión final y las muestras se mantuvieron en el termociclador a 4°C (Figura 4).

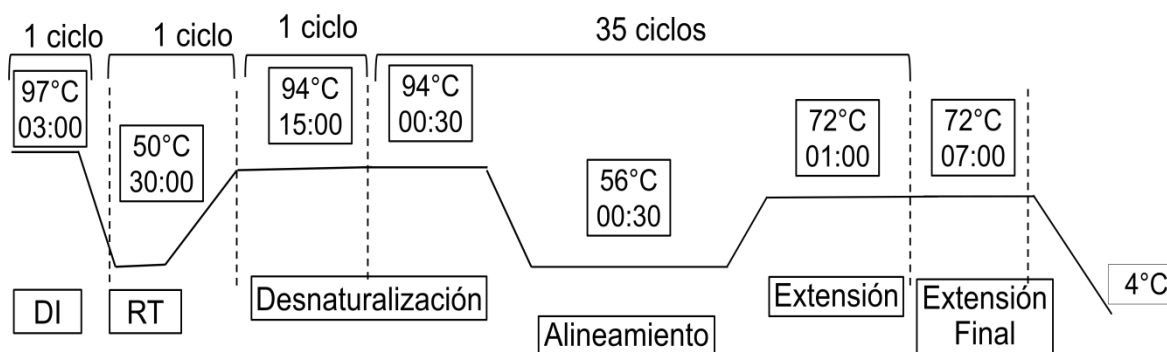


Figura 4. Condiciones de la estandarización de la RT-PCR punto final para RvP.

La dilución de trabajo para cada uno de los oligonucleótidos (Forward y Reverse) quedó a una concentración de 10 μM y las diluciones finales dentro de la reacción se prepararon desde 0.1 μM hasta 0.8 μM . Se obtuvo la amplificación desde la concentración de oligonucleótidos de 0.4 μM hasta 0.7 μM y se decidió manejar una concentración final de trabajo de 0.4 μM (Anexo 1, figura 2).

Para obtener la cantidad mínima y máxima detectable, se realizaron diluciones a diferentes concentraciones del material biológico (RNA viral); la concentración inicial del virus fue de 4.4 ng/μl y se manejó la dilución de los oligonucleótidos a 0.4 μM. Se observó que a 2.5 ng/μl no se observan bandas inespecíficas, en comparación con las otras diluciones (Anexo 1, figura 3)

En prueba de especificidad se hizo la RT-PCR a diversos agentes causantes de cuadros entéricos, tanto bacterias como virus; sin obtener ninguna amplificación en los carriles de los agentes etiológicos, demostrando que el diseño de los oligonucleótidos es específico de RvP (Anexo 1, figura 4).

Una vez estandarizados todos los parámetros anteriores, y el protocolo de las condiciones, la RT-PCR quedó con un volumen de reacción de 10 μl, con los siguientes reactivos: 1.5 μl de RNA, 2 μl de buffer Q, 2 μl de buffer RT, 0.4 μl de dNTPs, 0.4 μl de cada oligonucleótido a 10 μM, 0.4 μl de mix enzimas y 3.3 μl de agua libre de nucleasas (Figura 5).

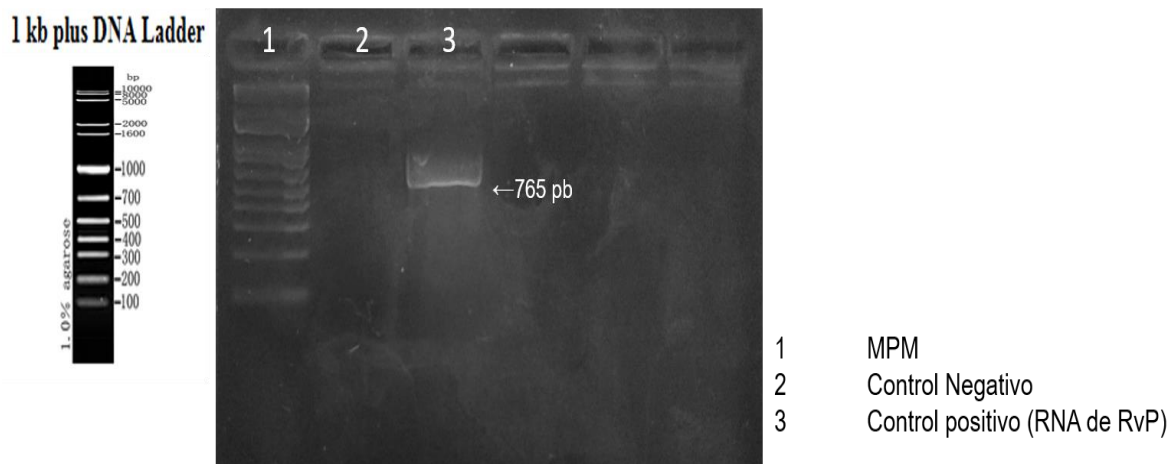


Figura 5. Estandarización de la RT-PCR. Gel de agarosa al 2.5 %, teñido con Gel Red, como MPM (Marcador de peso molecular) se usó 1Kb plus (Invitrogen®). Condiciones de electroforesis: 50 minutos por 85 voltios. En el carril 3 se observa el amplicón de RvP con un peso de 765pb.

6.2. Muestreo de las producciones porcinas del Estado de México.

Se analizaron 140 muestras de heces provenientes de 11 municipios del Estado de México, siendo: Aculco, Atenco, Chiautla, Chiconcuac, Jilotepec, Papalotla, Tepetlaoxtoc, Texcoco, Oztolotepec, Xonacatlán y Zumpango (figura 6), en cada granja se recolectaron muestras del 10% de la población total.

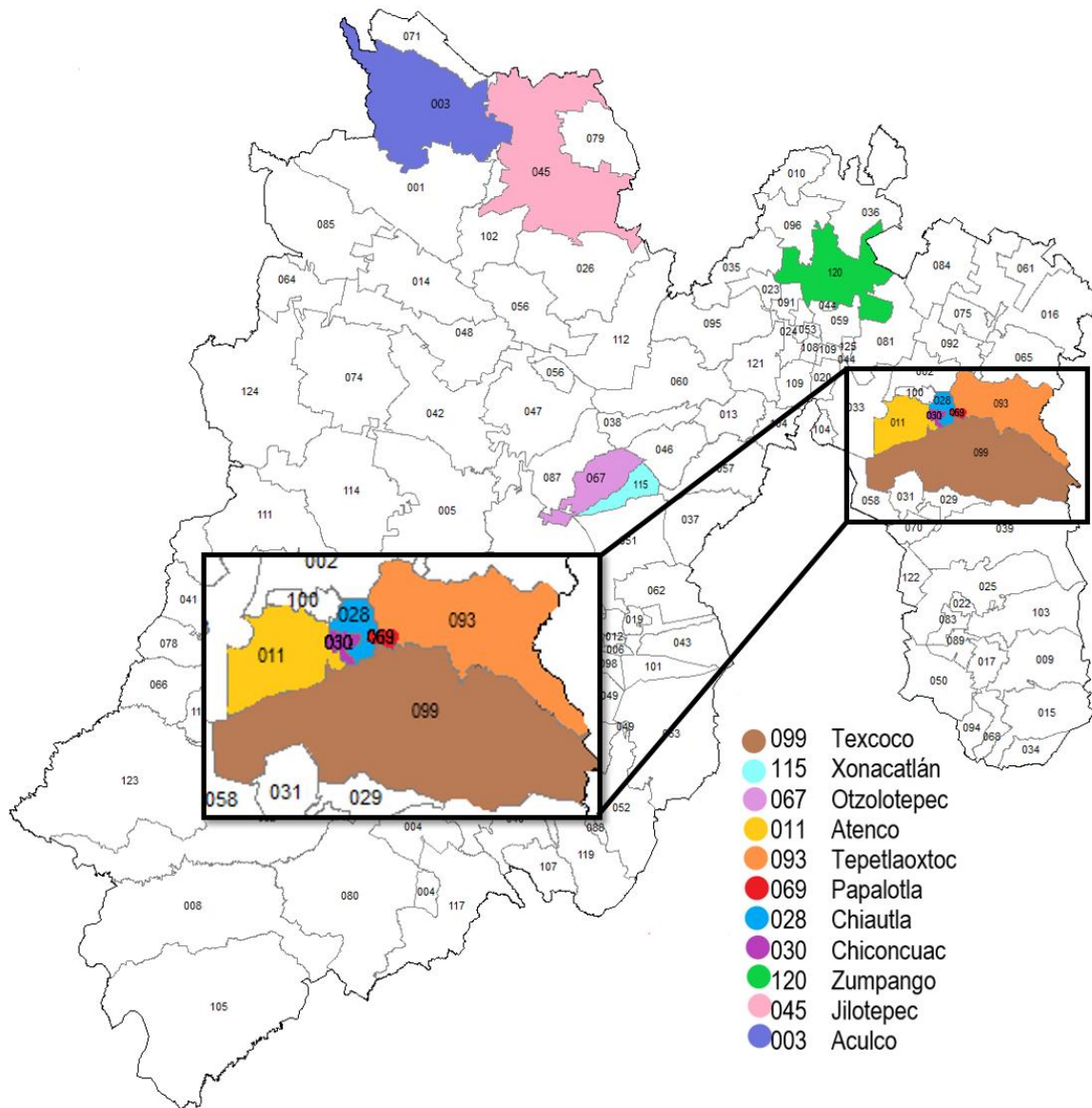


Figura 6. Mapa del Estado de México. En color se aprecian los diferentes municipios muestreados.

De los 11 municipios muestreados, se obtuvieron un total de 24 producciones porcinas, las cuales cumplían con los criterios de muestreo. De éstas 24, 16 fueron de traspatio y 8 semitecnificadas. Se observó que el 70% de las granjas tenían la presencia de perros, gallinas, bovinos, gatos, caballos y conejos.

Cuadro 8. Datos de las producciones porcinas muestreadas.

| Identificación | Municipio | Tipo | Total de cerdos | Otras especies |
|-----------------------|---------------------|-----------------|------------------------|------------------------------|
| IPVS-18-23 | Aculco | Traspatio | 46 | Conejos y perros |
| AIPVS-18-24 | | Traspatio | 69 | Perros, borregos y gatos |
| IPVS-18-25 | | Traspatio | 71 | Gallinas, bovinos y caballos |
| IPVS-18-26 | | Traspatio | 25 | Gallinas |
| IPVS18-15 | Atenco | Semitecnificado | 58 | Gallinas |
| IPVS18-10 | San Andrés Chiautla | Traspatio | 14 | Perros y borregos |
| IPVS18-11 | | Traspatio | 22 | Perros y borregos |
| IPVS18-14 | Chiconcuac | Traspatio | 14 | Gallinas |
| IPVS18-01 | Jilotepec | Semitecnificado | 97 | Bovinos |
| IPVS18-02 | | Traspatio | 12 | - |
| IPVS18-03 | | Traspatio | 11 | - |
| IPVS18-18 | Papalotla | Semitecnificado | 64 | Gallinas |
| IPVS18-19 | | Semitecnificado | 30 | - |

| Identificación | Municipio | Tipo | Total de cerdos | Otras especies |
|----------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------------------|
| IPVS18-20 | Papalotla | Traspatio | 27 | Bovinos y perros |
| IPVS18-21 | | Traspatio | 20 | Gallinas, perros y gatos |
| IPVS18-09 | | Traspatio | 12 | Conejos y yegua |
| IPVS18-12 | Tepetlaoxtoc | Traspatio | 100 | Perros |
| IPVS18-16 | | Semitecnificado | 79 | Caballos |
| IPVS18-22 | Texcoco | Traspatio | 7 | Perros y gallinas |
| IPVS18-27 | Otzolotepec | Traspatio | 7 | - |
| IPVS18-05 | Xonacatlán | Semitecnificado | 50 | - |
| IPVS18-06 | | Traspatio | 24 | - |
| IPVS18-13 | | Semitecnificado | 129 | Gallinas, perros y conejos |
| IPVS18-04 | Zumpango | Semitecnificado | 50 | - |
| Total | 11 municipios | 24 producciones | 140 | - |

La información recolectada indica que del total de los animales muestreados (140), 54 pertenecían a la etapa de lactación (38.6%) mientras que 86 eran de la etapa de destete (61.4%). Sin embargo, el mayor número de animales con diarrea se encontró en la etapa de lactancia con 34 animales en comparación con la etapa de destete que hubo 27 (Cuadro 9). De los dos tipos de granja muestreados en este estudio, en las de tipo semitecnificado se presentaron diarreas en 6 granjas de las 8 totales, dando un total de 38 animales con cuadro entérico. De las 16 granjas de

traspatio solo en 4 se encontraron animales con cuadros clínicos, sin embargo, de estas 4 se obtuvieron 23 muestras de diarrea (Anexo 2, Tabla 1).

Cuadro 9. Etapas y signos clínicos.

| Etapa | Animales con diarreas | Animales sin cuadro clínico | Total | Total (%) |
|-----------|-----------------------|-----------------------------|-------|-----------|
| Lactación | 34 | 20 | 54 | 38.6% |
| Destete | 27 | 59 | 86 | 61.4% |
| Total | 61 | 79 | 140 | 100% |

6.3. Identificación del Rotavirus porcino

6.3.1. RT-PCR punto final

Se realizó la prueba de RT-PCR punto final a las 140 muestras de heces, obteniendo la amplificación del gen VP4 de RvP en 5 muestras, teniendo como resultado un 3.5% de animales positivos; 3 de estas pertenecen a una producción del municipio de Aculco, mientras que las otras 2 a una producción del municipio de Xonacatlán. En la figura 7 se puede observar la electroforesis realizada a un lote de muestras del municipio de Aculco.

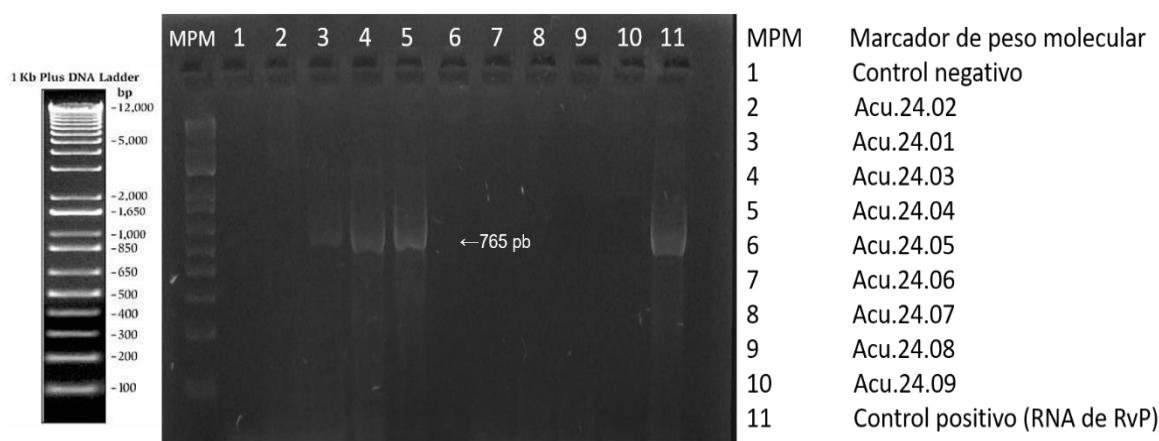


Figura 7. Electroforesis de la RT-PCR a muestras de la producción de Aculco, donde hubo positivas a RvP. Gel de agarosa al 2.5 %, teñido con Gel Red, como MPM se usó 1Kb plus (Invitrogen®). Condiciones de electroforesis: 50 minutos por 85 voltios. En los carriles 3, 4 y 5 se observan las muestras positivas.

De las 5 muestras positivas, 3 pertenecían a la etapa de lactación en animales que presentaban diarreas, 1 a la etapa de destete con presencia de diarrea y 1 a la etapa de destete sin cuadro clínico. Las muestras positivas fueron de granjas que tenían presencia de otros animales dentro de las mismas instalaciones donde se encontraban los cerdos.

6.3.2 Análisis electroforético en bioanalizador

Se realizó el análisis del patrón electroforético con el equipo Bioanalizador Agilent 2100® (Agilent Technologies) usando el kit Agilent RNA 6000 Pico, donde se observó que la muestra de virus de referencia (Porcine Rotavirus ATCC® VR-892™) no presentaba las 11 bandas descritas en la rotaforesis⁸³. Sin embargo, se puede observar que sí se detectaron fragmentos de tamaño similar al de los segmentos de rotavirus que van de los 600 pb hasta los 3000 pb. Tomando en cuenta los resultados, se llevó a cabo el análisis de las muestras de heces que resultaron positivas mediante la RT-PCR punto final, encontrando patrones semejantes a los fragmentos del virus de referencia (Figura 8).

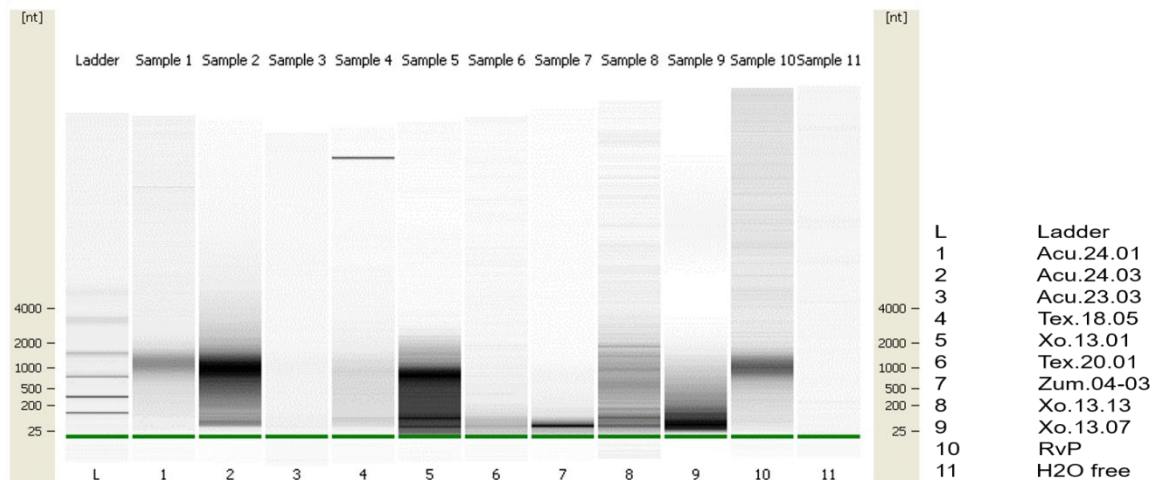


Figura 8. Electroforesis mediante Bioanalizador. En el carril 10 podemos observar el virus de referencia de RvP ATCC® VR-892™, del carril 1 al 9 son muestras de heces, donde las muestras de los carriles 1, 2 y 5 salieron positivas a la RT-PCR, alcanzando pesos entre los 600 a los 2500 nucleótidos.

6.4. Análisis filogenético

Se obtuvieron dos secuencias de nucleótidos, fragmentos del gen VP4 del rotavirus porcino, una secuencia de una producción de Xonacatlán (RVP/MEX/EDOMEX/LI-DMZC/Xo-13/2019), con una longitud de 753 nucleótidos que codifican para 251 aminoácidos; al igual que otra de una producción de Aculco (RVP/MEX/EDOMEX/LI-DMZC/Acu-24/2019), con una longitud de 716 nucleótidos (238 aminoácidos). Al realizar el análisis en la herramienta BLAST del NCBI, se observó que la secuencia RVP/MEX/EDOMEX/LI-DMZC/Xo-13/2019 presentaba una identidad de 92.1% a 91.6% con secuencias reportadas de rotavirus porcino y bovino. Por otro lado, la secuencia de RVP/MEX/EDOMEX/LI-DMZC/Acu-24/2019 presentó una identidad del 91.8% a 91.3% con secuencias reportadas de rotavirus porcino y bovino. Para la asignación de los genotipos de las dos muestras, se utilizó el programa RotaC 2.0 (<http://rotac.regatools.be/>) encontrando que ambas secuencias pertenecen al genotipo P[7].

El árbol filogenético se realizó mediante el método de Neighbor-joining con el modelo de Kimura 2 parámetros y un bootstrap de 1000. Los resultados obtenidos en el análisis filogenético nos muestran que la secuencia obtenida de Xonacatlán y la secuencia de Aculco se agrupan dentro de un mismo clado, junto a clados de secuencias originarias del continente americano como Canadá y Estados Unidos (Figura 9 y 10).

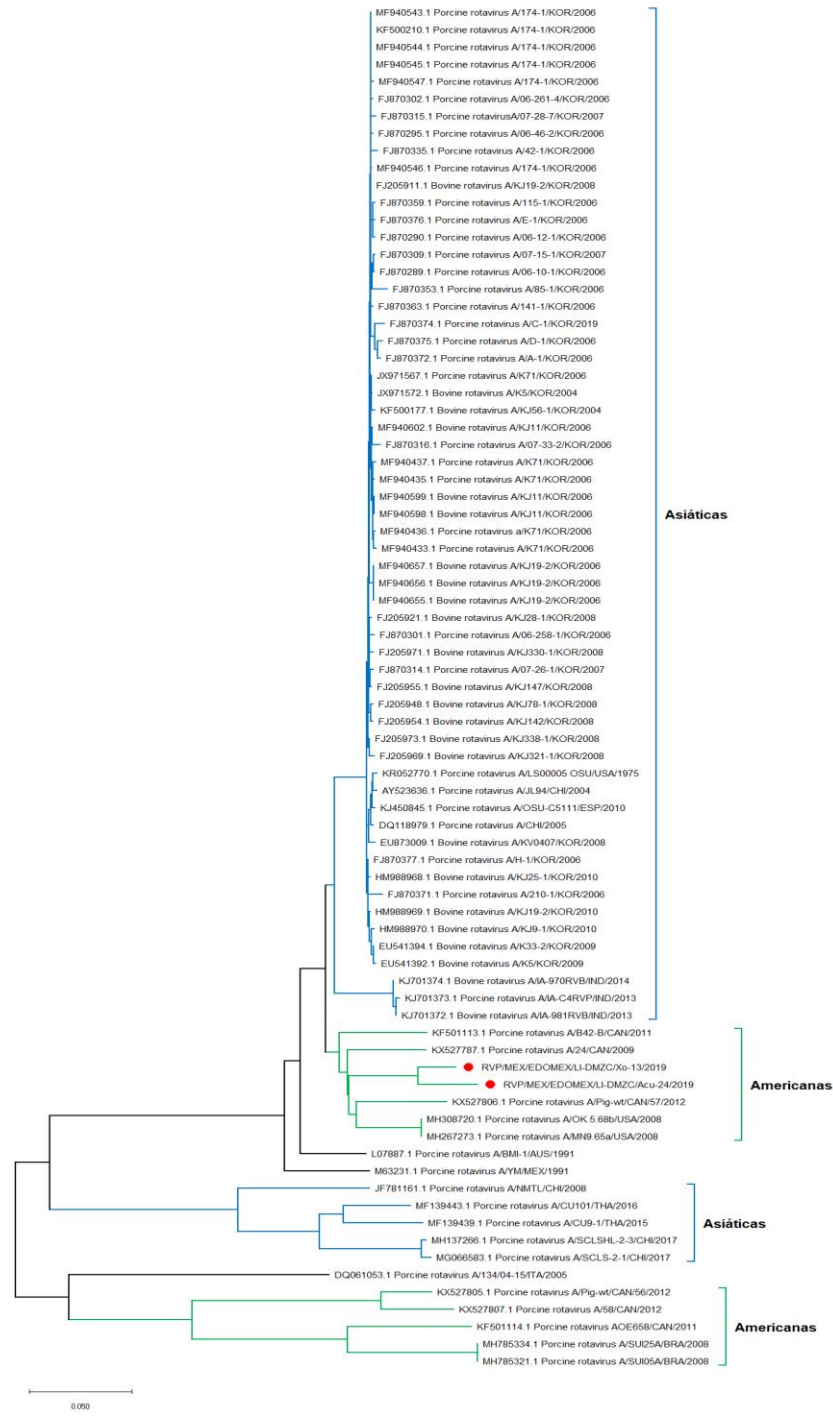


Figura 9. Árbol filogenético dirigido al gen VP4, realizado a partir de la secuencia de nucleótidos. Se usó el método de Neighbor-joining con el modelo de Kimura 2 parámetros, con un bootstrap de 1000. En círculos de color rojo se observan las secuencias obtenidas a partir de las granjas del Estado de México.

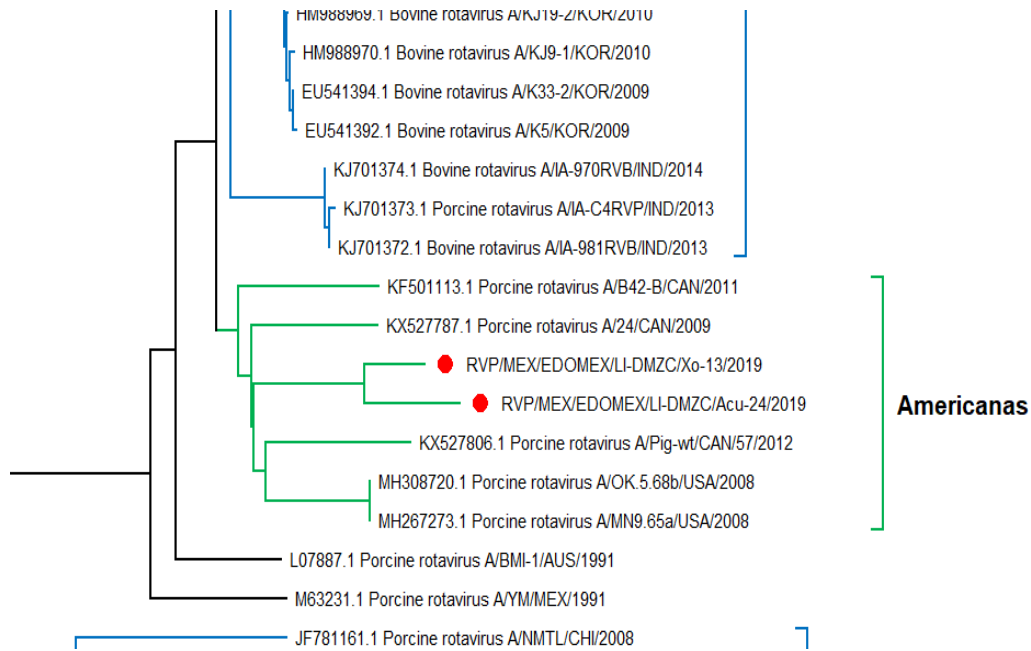


Figura 10. Árbol filogenético dirigido al gen VP4 con secuencias del Estado de México y de Norteamérica. Se usó el método de Neighbor-joining con el modelo de Kimura 2 parámetros, con un bootstrap de 1000. En líneas verdes se observan las cepas norteamericanas y con círculos rojos se observan las secuencias obtenidas del Estado de México.

7. DISCUSIÓN

Las enfermedades entéricas en los cerdos son de los padecimientos más frecuentes en producciones porcinas, causando pérdidas económicas debido al costo de los tratamientos, retraso en el crecimiento de los lechones y muerte. Dentro de las enfermedades de etiología virales se les ha dado mayor importancia a la diarrea epidémica porcina, la gastroenteritis transmisible y actualmente al deltacoronavirus porcino², quitándole interés a otros agentes como al rotavirus porcino. El diagnóstico se dirige principalmente a identificar el agente viral, con técnicas como la RT-PCR^{33,56,84}; en el presente estudio se estandarizó una RT-PCR punto final dirigida a la detección de RVP tipo A; en México el diagnóstico se realiza mediante la misma técnica⁶⁰ pero de manera experimental se realizan técnicas como ELISA³² y PAGE²¹. En otros países adicionalmente se utilizan técnicas como el aislamiento viral⁵⁹, RT-PCR tiempo real o microscopía electrónica⁵⁸ para la identificación del virus. En trabajos previos se ha descrito que la RT-PCR detecta otros genes del virus como por ejemplo VP7 y VP6^{19,85}. En el presente trabajo la estandarización de la RT-PCR se dirigió hacia el segmento 4, que codifica para la proteína VP4. El gen de VP4 se utiliza para la clasificación de los serotipos del Rv tipo A²⁰, incluyendo los de origen porcino, debido a esto se decidió hacer la identificación de este gen; de igual forma se ha reportado que el gen VP7 participa en esta misma clasificación³⁴. Se ha descrito que una prueba de RT-PCR puede detectar hasta 10 pg/μl de RNA presente en una reacción⁸⁶, en este trabajo se encontró la amplificación a partir de las concentraciones de 4.4 ng/μl hasta 0.5 ng/μl.

Debido a que en cerdos existen varios agentes etiológicos que causan enfermedades gastrointestinales con los mismos signos clínicos, como son el vDEP, vGET, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, deltacoronavirus porcino, *Enterococcus faecalis*, por mencionar algunas^{4,33}, es necesario realizar un diagnóstico diferencial mediante técnicas de laboratorio. Hay agentes que se han encontrado que se pueden eliminar en heces como circovirus porcino tipo 2⁸⁷, virus de influenza (A/H1N1 y A/H3N2), virus del PRRS^{88,89} y algunos otros que

forman parte de la microbiota normal del tracto digestivo como *Bacillus*⁹⁰, *Klebsiella pneumoniae*⁹¹ y *Pseudomonas spp.*, por lo que se decidió realizar la prueba de especificidad *in-vitro* ocupando éstos agentes, pudiendo determinar que la RT-PCR punto final estandarizada, no presentaba inespecificidad con ninguno de estos microorganismos.

Los rotavirus porcinos se presentan con mayor frecuencia en animales de entre 1 día de nacidos hasta los 40 días o recién destetados¹, para el muestreo se contempló tomar muestras de heces de lechones de 1 día de nacidos hasta los 2 meses de edad, esto se determinó debido a que se ha descrito que el virus se elimina hasta el día 14 post-infección²². La infección por los Rv se presenta principalmente en temporadas frías o en invierno en climas templados, mientras que en climas tropicales la infección permanece igual el resto del año²⁰, el muestreo para el presente trabajo se realizó durante los meses de otoño – invierno (2018-2019) en el Estado de México que tiene un clima templado subhúmedo, con una temperatura que oscila entre 3°C a 25°C ⁹².

Para el diagnóstico de Rv se obtuvieron muestras de producciones de tipo semitecnificadas y de traspatio debido a que son sistemas en los cuales las medidas de bioseguridad no siempre son las adecuadas⁵³, y se pudiera contar con la presencia y circulación del virus dentro de la producción. El tamaño de muestra utilizado para este estudio fue de 139, se obtuvo mediante el método de Mateu y Casal, el cual se calcula tomando en cuenta el nivel de confianza que en este caso fue del 95% y el error admitido que fue del 5% con una frecuencia esperada del 10%⁸¹. En cada producción se muestreo del 10 al 15% del total de los cerdos presentes en la explotación, donde se obtuvieron un total de 140 muestras de heces, siendo estas, de animales con cuadros entéricos, como de animales asintomáticos, ya que se ha reportado que durante el cuadro clínico de la infección por RvP se presentan signos como: diarreas acuosas, vómitos, fiebre, deshidratación y depresión en los lechones; aunque también la infección puede cursar de manera asintomática o subclínica³. Tomando esto en cuenta se recolectaron 79 (56.4%) muestras de animales sin diarreas, así como 61 (43.6%)

de animales que presentaban un cuadro entérico al momento del muestreo; encontrando 4 muestras positivas a RvP en cerdos con diarreas y 1 en un cerdo sin cuadro entérico.

De las 24 producciones porcinas que se visitaron el 70% tenía otro tipo de animales como bovinos, gallinas, perros, gatos, caballos, borregos y conejos, incluyendo la de Aculco que tenía perros, gatos y borregos y la granja de Xonacatlán con gallinas, perros y conejos, esto pudiendo aumentar los factores de riesgo para la propagación del virus de una especie a otra, así como hacia los cerdos, esto debido a que los rotavirus han sido identificados y aislados en estas especies^{32,80}. Adicional a esto, en la mayoría de las producciones muestreadas, principalmente en las de traspatio, las personas tienen un contacto estrecho con los cerdos, pudiendo ser un factor en el aumento del potencial zoonótico del virus^{8,80}.

En el presente estudio se demostró la presencia del RvP en dos municipios del Edo. de México (Xonacatlán y Aculco). En México, existen antecedentes donde se ha identificado el virus circulando en el estado de Yucatán (1996 y 2004), donde se colectaron muestras de materia fecal en granjas “ejidales”, determinando su presencia mediante la técnica de PAGE^{21,31}, al igual que en Sonora en 1988 se aisló un rotavirus de una muestra de heces de un lechón con diarrea²⁸. Existen estudios donde se ha demostrado la identificación de Rv bovino en muestras de heces en diferentes estados como Baja California, Chihuahua, Durango, Jalisco, Aguascalientes, Veracruz, Hidalgo, Querétaro, Tabasco y Chiapas⁹³, así como Rv canino en el Estado de México provenientes de perros sin vacunar de diferentes edades⁷⁹. En niños se conoce la circulación del rotavirus en toda la República Mexicana⁹⁴, presentándose generalmente entre el 60% y el 80% en niños menores de un año⁹⁵.

Se encontró una frecuencia del 3.5% de animales positivos a RvP, de muestras provenientes de lechones del Estado de México. En México no se tiene información reciente acerca del RvP, de los últimos trabajos realizados se encontró una frecuencia de 3.3% en muestras de materia fecal mediante la técnica

de ELISA³². En otros países se han realizado estudios más recientes encontrando frecuencias muy variables, por ejemplo, en Canadá se han encontrado frecuencias del 49% mediante RT-PCR³⁴, en Perú del 23.2% de Rv en animales con cuadros diarreicos y un 2.7% en animales sin diarreas³, lo cual coincide con los resultados aquí encontrados, en EUA se han encontrado frecuencias que van del 9.4% hasta el 63.6% mediante RT-PCR^{2,33}, en Brasil se tiene una frecuencia del 27% también mediante la técnica de RT-PCR³⁵. En otros continentes se han encontrado frecuencias como el 0.31% en China³⁸, 20% en Tailandia³⁷, 10% en Dinamarca, 7% en España, entre otros¹⁹.

Como método para confirmar que efectivamente los resultados de la RT-PCR punto final eran verídicos se decidió realizar electroforesis mediante el equipo Bioanalizador para observar el patrón electroforético de los 11 segmentos del rotavirus como se ha reportado en la literatura^{25,28}; se trabajó con las muestras de heces que resultaron positivas a la RT-PCR, sin embargo, no se pudo observar el patrón electroforético mediante esta técnica.

Se obtuvieron las secuencias de dos muestras positivas, una de cada producción que fue positiva hacia el RvP, y se realizó el análisis filogenético mediante el método de Neighbor-joining con el modelo de Kimura 2 parametros, como se ha descrito previamente en algunos estudios, para determinar las secuencias que presenten una mayor similitud entre ellas^{33,37,96,97}. En el árbol filogenético se observa que las dos secuencias reportadas en este estudio se agrupan en el mismo clado, cerca de secuencias de RvP que pertenecen a Canadá y Estados Unidos de los años 2008 al 2012. Las secuencias de rotavirus presentes en el análisis pertenecientes a bovinos y porcinos originarias de Corea se agruparon en un mismo grupo, sugiriendo que presentan una alta homología entre ellas; en trabajos previos se ha descrito que las secuencias de porcinos suelen agruparse en clados junto con secuencias de bovinos y humano^{2,12,35,98}, esto pudiera deberse al estrecho contacto que existe entre estas especies, como se encontró en este estudio. Se caracterizaron las dos secuencias del estado de México obteniendo

que ambas pertenecían al genotipo P[7], uno de los genotipos del gen VP4 de RvP tipo A, que se reportan con mayor frecuencia en cerdos^{8,19,78}.

8. CONCLUSIONES

- Se estandarizó una RT-PCR punto final para la identificación del rotavirus porcino, dirigida para amplificar una parte del segmento VP4.
- Se identificaron cinco muestras positivas a RvP con la RT-PCR punto final en dos producciones de dos municipios del Estado de México.
- La frecuencia encontrada dentro del presente estudio en el Estado de México fue del 3.5% mediante la técnica de RT-PCR punto final.
- Se obtuvo la genotipificación de dos secuencias obtenidas en el presente trabajo, clasificándolas dentro del RvP tipo A, genotipo P[7].
- Al realizar el árbol filogenético, las dos muestras secuenciadas de agruparon en el mismo clado junto a un grupo de cepas norteamericanas.

El presente trabajo nos ofrece un panorama acerca de la presencia y de la circulación de Rotavirus porcino en el Estado de México, sin embargo, hace falta monitorear también las granjas de tipo tecnificado para obtener datos completos de esta enfermedad en las producciones porcinas, no obstante, éste trabajo nos abre la posibilidad para seguir estudiando esta enfermedad en otros tipos de unidades de producción y en otros estados de la república mexicana.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Diseases of Swine. 10th Ed. 2013;53(9):0-3630. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. Amimo JO, Vlasova AN, Saifa LJ. 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):1142-1151. doi:10.1128/JCM.03193-12
3. Rojas MM, Manchego A, Rivera G. H, Falcón N, Ramírez M, Sandoval N. Asociacion entre rotavirus y la presencia de diarrea en lechones de granjas tecnificadas. 2011;22(3):253-260.
4. Valkó A, Marosi A, Cságola A, Farkas R, Rónai Z, Dán Á. Frequency of diarrhoea-associated viruses in swine of various ages in Hungary. *Acta Vet Hung.* 2019;67(1):140-150. doi:10.1556/004.2019.016
5. Kang JH, Kwon DH, Chung TW, et al. Development of a simple and rapid immunochromatographic strip test for diarrhea-causative porcine rotavirus in swine stool. *J Virol Methods.* 2007;146(1-2):74-79. doi:10.1016/j.jviromet.2007.06.002
6. Collins PJ, Martella V, Buonavoglia C, O'Shea H. Detection and characterization of porcine sapoviruses from asymptomatic animals in Irish farms. *Vet Microbiol.* 2009;139:176-182. doi:10.1016/j.vetmic.2009.05.013
7. Gong S, Qiao M, Tian L, Chen KP, Zhang CX, Meng D. Molecular detection and genetic diversity of porcine bocavirus in piglets in China. *Acta Virol.* 2018:343-349. doi:10.4149/av
8. Malik YS, Kumar N, Sharma K, et al. Rotavirus diarrhea in piglets: A review on epidemiology, genetic diversity and zoonotic risks. *Indian J Anim Sci.* 2014;84(10):1035-1042.

9. Jackova A, Sliz I, Mandelik R, et al. Porcine kobuvirus 1 in healthy and diarrheic pigs: Genetic detection and characterization of virus and co-infection with rotavirus A. *Infect Genet Evol.* 2017;49:73-77. doi:10.1016/j.meegid.2017.01.011
10. Song DS, Kang BK, Oh JS, et al. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18:278-281.
11. Mai K, Feng J, Chen G, et al. The detection and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus from Guangdong Province in Southern China. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65(1):166-173. doi:10.1111/tbed.12644
12. Molinari BLD, Possatti F, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. *Vet Microbiol.* 2016;193:125-132. doi:10.1016/j.vetmic.2016.08.014
13. Hu H, Jung K, Vlasova AN, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States. *J Clin Microbiol.* 2015;53(5):1537-1548. doi:10.1128/JCM.00031-15
14. OMS. Rotavirus. <https://www.who.int/immunization/diseases/rotavirus/es/>. Published 2015.
15. Epidemiológica SN de V. Boletín epidemiológico, Generalidades De Las Siete Principales Causas De Morbilidad En México 2005-2012. 2013;30. file:///C:/Users/ekt4614/Downloads/boletin epidemiologico sem 42 oct 2013.pdf.
16. F. Sargent Cheever JHM. Epidemic diarrheal diseases of suckling mice. *J Natl Cancer Inst.* 1946;20(5):405-415. doi:10.1093/jnci/20.5.861
17. Woode GN, Bridger JC, Jones JM, et al. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of

- children, calves, piglets, mice, and foals. *Infect Immun*. 1976;14(3):804-810.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC420956/pdf/iai00225-0208.pdf>.
18. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa From Children With Acute Non-Bacterial Gastroenteritis. *Lancet*. 1973;302(7841):1281-1283. doi:10.1016/S0140-6736(73)92867-5
 19. Midgley SE, Bányai K, Buesa J, et al. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol*. 2012;156(3-4):238-245. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.027
 20. Luchs A, Timenetsky M do CST. Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Einstein (São Paulo)*. 2016;14(2):278-287. doi:10.1590/S1679-45082016RB3582
 21. Puerto, M S, Polanco G, Alvarez M, Puerto, M F. Clasificación De Rotavirus en granjas porcinas del estado de Yucatán. 1996.
 22. Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses*. 2017;9(3):1-27.
doi:10.3390/v9030048
 23. Bridger C, Woode GN. Transmission of human rotaviruses to gnotobiotic piglets. 1975;8:565-569.
<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/8/4/medmicro-8-4-565.pdf?expires=1556523126&id=id&accname=guest&checksum=661F32419EBD8DC332C758772DB9F5F5>.
 24. Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-Like, Calicivirus-Like, and 23-nm Virus-Like Particles Associated with Diarrhea in Young Pigs. *J Clin Microbiol*. 1980;12(1):105-111.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC273530/>.

25. Theil KW, Saif LJ, Moorhead PD, Whitmoyer RE. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): Characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. *J Clin Microbiol.* 1985;21(3):340-345.
26. Pigs D, Marthaler D, Rossow K, et al. Widespread Rotavirus H in domesticated pigs, United States. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(7):1195-1198. doi: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2007.140034>
27. Pedley S, Bridger JC, Chasey D, Mc Crae A. Definition of Two New Groups of Atypical Rotaviruses. *J Gen Virol.* 1985;67:131-137. doi:10.1099/0022-1317-67-1-131
28. Ruiz AM, Lopez I V, Lopez S, Espejo RT, Arias CF. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *J Virol.* 1988;62(11):4331-4336. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2845146>.
29. Socci E, Diosdado V, Carrera S, Arriaga D, Morrilla G. Patrones De Excrecion de Rotavirus y Lawsonia intracelluraris en seis granjas de ciclo completo. 1999.
30. García D, Munguía J, González W. Evaluacion del impacto productivo en el tratamiento preventivo para rotavirus porcino en cerdos de maternidad a base de inmunoglobulinas de origen aviar específicas para Rotavirus, Isospora suis, E. coli y Gastroenteritis. *Memorias AMVEC.* 1998:1.
31. Puerto, S M, Polanco G, Alvarez M, Puerto, M F. Deteccion De Rotavirus en lechones lactantes de granjas localizadas en el Estado de Yucatán. *Memorias AMVEC.* 1992.
32. Polanco G, González M, Manzano L, Cámara J, Puerto M. Rotavirus en animales asintomáticos: Detección y clasificación antigénica. *Arch Med Vet.* 2004;1(XXXVI). doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2004000100007>
33. Marthaler D, Rossow K, Gramer M, et al. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology.* 2012;433(1):85-

96. doi:10.1016/j.virol.2012.07.006
34. Lachapelle V, Sohal JS, Lambert MC, et al. Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada. *Arch Virol*. 2014;159(7):1771-1779.
doi:10.1007/s00705-013-1951-9
35. Barbosa BRP, Bernardes NTCG, Beserra LAR, Gregori F. Molecular characterization of the porcine group a rotavirus NSP2 and NSP5/6 genes from São Paulo State, Brazil, in 2011/12. *Sci World J*. 2013;2013.
doi:10.1155/2013/241686
36. Marthaler D, Homwong N, Rossow K, et al. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J Virol Methods*. 2014;209:30-34.
doi:10.1016/J.JVIROMET.2014.08.018
37. Yodmeeklin A, Khamrin P, Chuchaona W, et al. Analysis of complete genome sequences of G9P[19] rotavirus strains from human and piglet with diarrhea provides evidence for whole-genome interspecies transmission of nonreassorted porcine rotavirus. *Infect Genet Evol*. 2016;47:99-108.
doi:10.1016/j.meegid.2016.11.021
38. Guo ZJ, Zhu YM, Li GH, Chen KP, Zhang CX. The rate of co-infection for piglet diarrhea viruses in China and the genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus and porcine kobuvirus. *Acta Virol*. 2016;2007:101-106. doi:10.4149/av
39. Zhu J, Yang Q, Cao L, et al. Development of porcine rotavirus vp6 protein based ELISA for differentiation of this virus and other viruses. *Virology*. 2013;10:1-9. doi:10.1186/1743-422X-10-91
40. Rojas M, Ayala-Breton C, Lopez S. Biología Molecular De Rotavirus : Una Mirada a Través De La Interferencia De Rna. *Mensaje Bioquímico*. 2008;XXXII:149-162.
41. Desselberger U. Rotaviruses. In: Desselberger U, ed. *Virus Research*. Vol

190. Science Direct; 2014:75-96. doi:10.1016/j.virusres.2014.06.016
42. López S, Arias CF. Los Rotavirus. In: Martínez Romero E, Martínez Romero JC, eds. *Microbios En Linea*. Cuernavaca, Morelos. México; 2002. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap17/>.
43. Ramig RF. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol*. 2004;78(19):10213–20. doi:10.1128/JVI.78.19.10213
44. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, et al. Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains □ †. *J Virol*. 2008;82(7):3204-3219. doi:10.1128/JVI.02257-07
45. Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells : a Versaillesque dance. 2004;12(6). doi:10.1016/j.tim.2004.04.003
46. Martí E, Chicho FJ, Gonza F, et al. New Insights into Rotavirus Entry Machinery : Stabilization of Rotavirus Spike Conformation Is Independent of Trypsin Cleavage. 2014;10(5). doi:10.1371/journal.ppat.1004157
47. Estes M, Greenberg H. Rotaviruses. *Fields Virol*. 2013:1347-1401.
48. Sail LJ, Rosen BI, Shien-young K. Cell culture propagation of roteviruses. *Tissue Cult methods*. 1988;11(66648):147-156.
49. Berrios P, Pinochet L, Ávalos P, Cuevas L. Presencia de Rotavirus en cerdos lactantes con Síndrome Diarreico. *Av en Ciencias Vet*. 1989;4(2):1-7.
50. Isa P, Arias CF, López S. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J*. 2006;23(1-2):27-37. doi:10.1007/s10719-006-5435-y
51. Sistemas T, De DC, El S, Intensividad GDE. Sistemas de Producción porcina en la República Argentina. 2012;Unidad 1:1-24. <https://ppryc.files.wordpress.com/2012/06/sistemas-de-produccic3b3n-porcina1.pdf>.

52. Barrios M. C. Propuesta de un sistema de producción híbrido alternativo para porcicultura a mediana y pequeña escala. 2015.
<http://132.248.9.195/ptd2015/marzo/0726733/Index.html>.
53. Montero L. E, Martínez G. R, Herradora L. M, et al. *Alternativas Para La Producción Porcina a Pequeña Escala*. 1°. Ciudad de México; 2015.
http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Alternativas_Porcina.pdf.
54. Milena A, Uribe E. Detección de rotavirus por medio de la técnica de RT-PCR en muestra de compost elaborado a partir de biosólidos y residuos vegetales. 2008.
55. Gp HRW, Shao L, Fischer DD, et al. Comparative In Vitro and In Vivo Studies of Porcine Rotavirus. 2016;90(1):142-151. doi:10.1128/JVI.02401-15.Editor
56. Winiarczyk S, Paul PS, Mummidi S, Panek R, Gradzki Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. *J Vet Med Ser B*. 2002;49(8):373-378. doi:10.1046/j.1439-0450.2002.00572.x
57. Bio-Rad. *Pastorex Rotavirus, Aglutinación En Látex*. Francia; 2010.
58. Soltan MA, Tsai YL, Lee PYA, et al. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *J Virol Methods*. 2016;235:99-104. doi:10.1016/j.jviromet.2016.05.006
59. Silva FDF, Espinoza LRL, Tonietti PO, Barbosa BRP, Gregori F. Whole-genomic analysis of 12 porcine group A rotaviruses isolated from symptomatic piglets in Brazil during the years of 2012-2013. *Infect Genet Evol*. 2015;32:239-254. doi:10.1016/j.meegid.2015.03.016
60. IASA Sanfer. Catálogo de servicios. 2018:1-24.
<https://sanfersaludanimal.com.mx/wp->

content/uploads/2018/06/3698_ListaIASA_TA_07_ALTA.pdf.

61. Atawodi S, Atawodi J, Dzikwi A. Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. *Sahel Med J*. 2011;13(2).
doi:10.4314/smj2.v13i2.64834
62. Sánchez IR, Saldaña HB. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Cienc UANL*. 2004;7. <http://eprints.uanl.mx/610/>.
63. Joshi M, Deshpande JD. Polymerase Chain Reaction : Methods , Pr. *Int J Biomed Res*. 2010;1(5):81-97. doi:<http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
64. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;2(5):70-78. doi:10.1157/13059826
65. Biotecnología EN, Elsa SR. Biotecnología métodos físicos-químicos PCR. 2004.
66. Asuar LE. Guía práctica sobre la técnica de PCR. :517-540.
67. Akimkin V, Bindel F, Hoferer M, et al. One-step RT-qPCR with an internal control system for the detection of turkey rotaviruses in faecal samples. *J Virol Methods*. 2011;177(1):112-117. doi:10.1016/j.jviromet.2011.07.007
68. Of E, Analysis G. Secuenciación del ADN. *Nature*. 2010;724(2009):719-724.
69. Carrilho E, Kist TBL, Franc LTC. A review of DNA sequencing techniques. 2002;2:169-200.
70. De Necochea Campion R, Canul Tec JC. Secuenciación De Ácidos Nucleicos. 2004:9.
http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf.
71. Rojas P. Seminario de Mejoramiento Genético de Plantas I Tema : Métodos de Secuenciación de ADN Alumno : Percy Rojas Domínguez Código : 20180576 Profesor : Dr . Jorge Jiménez 2018 - I. 2018;(July).

doi:10.13140/RG.2.2.35313.17760

72. Madrigal-Valverde KA. Uso de herramientas para alineación de secuencias y creación de árboles filogenéticos para la determinación de especies. *Rev Tecnol en Marcha*. 2017;30(5):30. doi:10.18845/tm.v30i5.3218
73. Agilent. Agilent 2100 Bioanalyzer User's Guide for Molecular Assays. 2001. <http://www.webcitation.org/6LUOQQnc4>.
74. Bioanalizador Agilent 2100.
75. Pinilla J, Geiger J, Williams N, Piva J, Kummer R. Principios Básicos en el Manejo de los Reemplazos y las Cerdas. 2007:1-49. <http://www.picperu.com/pdf/MANUAL DE LA HEMBRA PIC Julio 2007.pdf>.
76. Quintero R V. Puntos clave para la prevención, diagnóstico y control del virus de la diarrea epidémica porcina (DEP) y Deltacoronavirus. www.porcicultura.com. <https://www.porcicultura.com/destacado/Puntos-clave-para-la-prevencion%2C-diagnostico-y-control-del-virus-de-la-diarrea-epidemica-porcina-%28DEP%29-y-Deltacoronavirus>. Published January 2018.
77. Cook SM, Glass RI, Lebaron CW, Ho M. Global seasonality of rotavirus infections. 1990;66(5059):171-177.
78. Hwang KP, Wu FT, Bányai K, et al. Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children. *J Med Microbiol*. 2012;61(PART7):990-997. doi:10.1099/jmm.0.042499-0
79. Ortega AF, Martínez-Castañeda JS, Bautista-Gómez LG, Muñoz RF, Hernández IQ. Identification of co-infection by rotavirus and parvovirus in dogs with gastroenteritis in Mexico. *Brazilian J Microbiol*. 2017;48(4):769-773. doi:10.1016/j.bjm.2017.03.008
80. Martella V, Bányai K, Matthijssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):246-255. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.028

81. Mateu E, Casal J. Tamaño de la muestra. *Rev Epidemiol Med Prev.* 2003;8-14.
82. Maes P, Matthijnsens J, Rahman M, Ranst M Van. RotaC : A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009;4:2-5. doi:10.1186/1471-2180-9-238
83. Gyamfi J, Awuah E, Armah G, Larbi J. Genomic RNA electropherotypes of group rotaviruses detected in children with diarrhoea in Pramso, Ghana. *Eur J Biol.* 2015;3(5):30-39. <http://www.eajournals.org/wp-content/uploads/Genomic-Rna-Electropherotypes-Of-Group-Rotaviruses-Detected-In-Children-With-Diarrhoea-In-Pramso-Ghana.pdf>.
84. Kumar M, Bhilegaonkar KN, Agarwal RK. Prevalence and characterization of rotavirus from faecal samples of children and animals. *Indian J Anim Sci.* 2011;81(10):993-999.
85. Thongprachum A, Chaimongkol N, Khamrin P, Pantip C. A novel multiplex RT-PCR for identification of VP6 subgroups of human and porcine rotaviruses. *J Virol Methods.* 2010;168(1-2):191-196. doi:10.1016/j.jviromet.2010.05.013
86. PCR Applications Manual 3 rd edition.
87. Herbst W, Hermann W. Detection of virus particles resembling circovirus and porcine circovirus 2a (PCV2a) sequences in feces of dogs. *Sciencedirect.* 2017. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528817300693?via%3Dihub>.
88. Minodier L, Charrel RN, Ceccaldi P, et al. Prevalence of gastrointestinal symptoms in patients with influenza , clinical significance , and pathophysiology of human influenza viruses in faecal samples : what do we know ? *Virology J.* 2015:1-9. doi:10.1186/s12985-015-0448-4
89. Moreno V, Di N. Evaluation of the Pathogenicity and Transmissibility of a Chilean Isolate of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.

- 2008;55:115-124. doi:10.1111/j.1865-1682.2007.00991.x
90. Giraldo-carmona J, Narváez-solarte W, Díaz-lópez E. Probióticos en cerdos: resultados contradictorios. *Biosalud*. 2015;14(1):81-90.
doi:10.17151/biosa.2015.14.1.9
 91. Wei H, Shen J, Pang X, Ding D, Zhang Y, Zhang B. Fatal Infection in Human Flora-Associated Piglets Caused by the Opportunistic Pathogen *Klebsiella pneumoniae* from an Apparently Healthy Human Donor. 2008:4-6.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jyms/70/7/70_7_715/_pdf/-char/en.
 92. INEGI. Cuéntame de México. <http://cuentame.inegi.org.mx>.
 93. Rodríguez-limas WA, Flores-samaniego B, De G, Ramírez OT, Palomares LA. Genotypification of bovine group A rotavirus in México. *Elsevier Sci*. 2009;27:6411-6414. doi:10.1016/j.vaccine.2009.06.022
 94. SINAVE. *Boletín Epidemiológico, Semana 24*. Vol 34.; 2019.
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/471274/sem24.pdf>.
 95. States M, Strategic WHO, Group A, Who A, Le E. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2013;(5):49-64.
 96. Peña C. Métodos de inferencia filogenética. *Rev peru biol*. 2011;18(182):265-267. doi:10.15381/rpb.v18i2.243
 97. Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Tsunemitsu H. Analysis of the excretion dynamics and genotypic characteristics of rotavirus A during the lives of pigs raised on farms for meat production. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):2009-2017.
doi:10.1128/JCM.06815-11
 98. Jing Z, Zhang X, Shi H, et al. A G3P[13] porcine group A rotavirus emerging in China is a reassortant and a natural recombinant in the VP4 gene. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65(2):e317-e328. doi:10.1111/tbed.12756

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1. Figuras de la optimización de la RT-PCR punto final

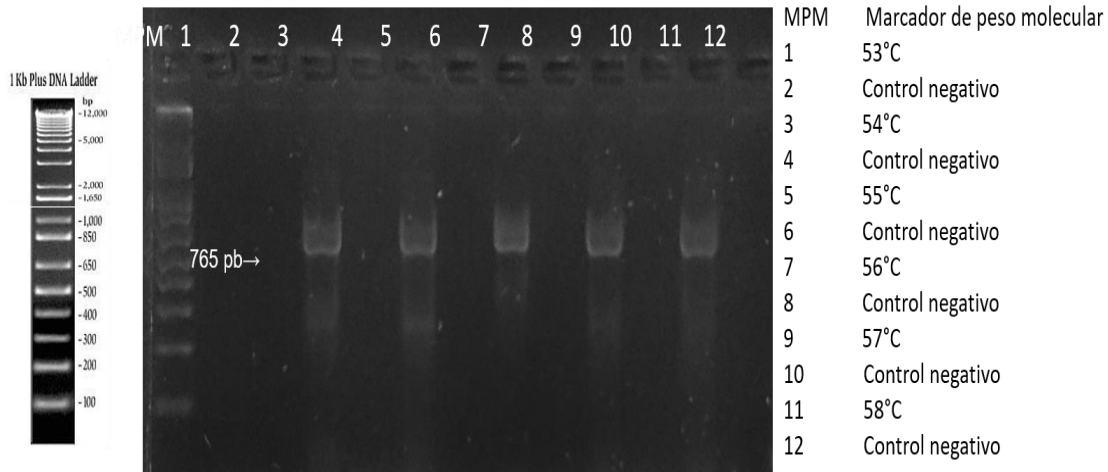


Figura 1. Gradientes de temperatura para el gen VP4. Gel de agarosa al 2.5% teñido con Gel Red, como MPM se usó 100bp (Invitrogen®). Condiciones de electroforesis: 50 minutos por 85 voltios.

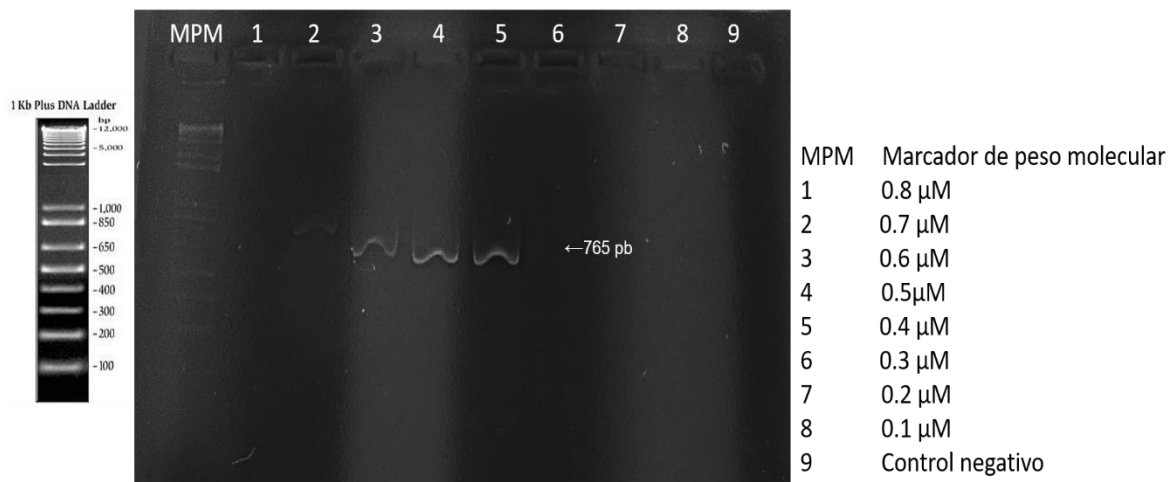


Figura 2. Dilución de Oligonucleótidos para el gen VP4. Gel de agarosa al 2.5% teñido con Gel Red, como MPM se usó 100bp (Invitrogen®). Condiciones de electroforesis: 50 minutos por 85 voltios.

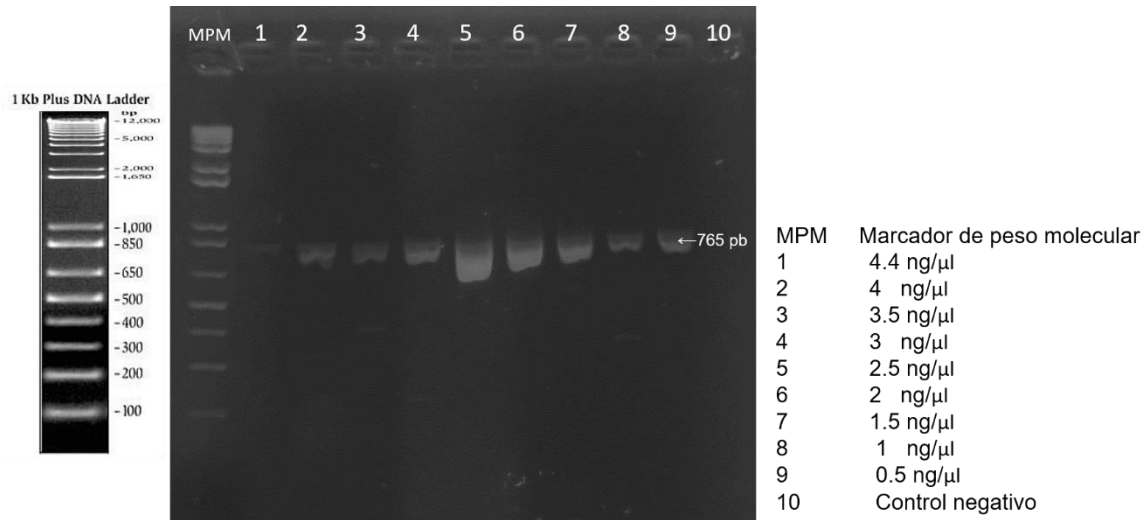


Figura 3. Detección de la concentración del ARN viral. Gel de agarosa al 2.5% teñido con Gel Red, como MPM se usó 1Kb plus (Invitrogen®). Condiciones de electroforesis: 50 minutos por 85 voltios. Donde se observa que en todas las concentraciones se logra la amplificación.

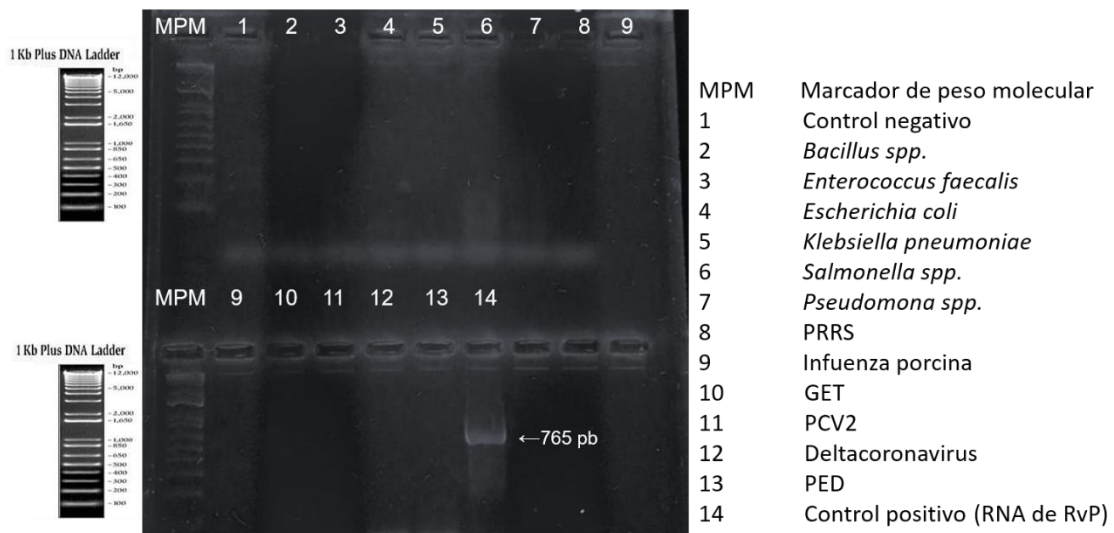


Figura 4. Prueba de especificidad. Gel de agarosa al 2.5% teñido con Gel Red, como MPM se usó 1kb plus (Invitrogen®). Condiciones de electroforesis: 50 minutos por 85 voltios.