



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**CARACTERIZACIÓN DEL VIROMA DE CERDOS POSITIVOS AL VIRUS DE LA
DIARREA EPIDÉMICA PORCINA EN MÉXICO**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
MONTSERRAT ELEMI GARCÍA HERNÁNDEZ**

**TUTORA PRINCIPAL
Rosa Elena Sarmiento Silva
Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia, UNAM**

**COMITÉ TUTORAL
María Elena Trujillo Ortega
Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia UNAM
Carlos Sandoval Jaime
Instituto de Biotecnología, UNAM**

Ciudad Universitaria, CD MX. OCTUBRE 2022



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.

Agradecimientos

Quisiera agradecer al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada durante la realización del doctorado.

A mi Comité tutor, la Dra. María Elena Trujillo Ortega y el Dr. Carlos Sandoval Jaime por su paciencia, atención y orientación durante la elaboración de este trabajo.

A los miembros del jurado: la Dra. María Elena Trujillo Ortega, Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada, Dr. Hugo Ramírez Álvarez, y la Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira por sus valiosos comentarios que me ayudaron a enriquecer la tesis.

Al Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán y a la Dra. María Gabriela Guerrero Ruiz de la Unidad de Análisis Bioinformáticos del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM por la orientación y asesoría en los análisis bioinformáticos, esta tesis no habría sido posible sin su apoyo, así como a la Dra. Blanca Taboada Ramírez.

A la Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada y al CMN 20 de Noviembre-ISSSTE por su colaboración indispensable en los análisis de laboratorio, así como brindarme sus conocimientos y amistad.

A la MC. Liliana Manuela Valdés Vázquez, MC. Elvia Lazo, MC. Susana Juárez y MC Selene Fernández Hernández por su ayuda en el trabajo de laboratorio. Gracias a todos los miembros del Laboratorio de Virología de la FMVZ.

Financiamiento otorgado por el proyecto PAPIIT-IN221218

Debo agradecer de manera especial a mi asesora, la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por permitirme ser parte de este proyecto y por su apoyo, confianza, conocimiento y darme su orientación en cada paso de esta y muchas etapas.

Resumen

Desde 2013, los brotes provocados por el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) han causado pérdidas económicas para la producción porcina. La presencia de variantes virales intrahuésped, la compartimentación y la coinfección con otros patógenos podrían afectar la virulencia y la respuesta inmune a la infección.

Los informes de coinfección del PEDV con otros virus destacan la importancia de las interacciones virales en el desarrollo de la enfermedad. Usando secuenciación de siguiente generación, se analizaron las secuencias virales presentes en muestras tomadas de lechones con diarrea aguda y se exploraron las posibles interacciones entre PEDV y otros patógenos menos reportados. La coinfección de PEDV con Kobuvirus porcino se detectó en el 36,4% de las muestras. Se obtuvieron genomas completos de Coronavirus y Kobuvirus Porcino, así como un genoma parcial de Sapovirus Porcino. Los resultados filogenéticos mostraron que la agrupación de estas cepas corresponde a una relación geográfica.

Para investigar la variación intrahuésped de las secuencias del PEDV, se examinó el gen codificante de la proteína Spike (S), amplificado directamente de diferentes órganos pertenecientes a animales positivos. Usando el protocolo descrito por DIEP et al 2017 que consiste en una rt-PCR, se analizaron las secuencias presentes en diferentes tejidos de 5 cerdos positivos. Se encontró al menos una secuencia con deleciones genómicas coexistiendo con cepas con un gen S intacto en las muestras de dos intestinos y una tonsila. Los tamaños de las deleciones variaron entre 612 nt y 185 nt y estaban en diferentes posiciones en el gen S. Se detectaron mutaciones puntuales en riñones y ganglios linfáticos del mismo animal. Este es el primer reporte completo de genoma y aislamiento de Kobuvirus Porcino en México, así como el primer análisis filogenético para Sapovirus Porcino en el país. La presencia de variantes de deleción en el gen S sugiere una alta incidencia de virus defectuosos in vivo.

Palabras clave

Cerdos, Coronavirus, PEDV, Diarrea

Abstract

Since the end of 2013, outbreaks caused by the Porcine Epidemic Diarrhea virus (PEDv) have caused economic losses for the swine industry. The presence of intrahost viral variants, compartmentalization, and coinfection with other pathogens could affect virulence and the immune response to infection.

Reports of PEDv coinfection with other viruses highlight the importance of viral interactions in disease development. Using next-generation sequencing, viral sequences present in samples taken from piglets with acute diarrhea were analyzed and possible interactions between PEDv and other less reported pathogens were explored. Coinfection of PEDv with porcine Kobuvirus was detected in 36.4% of the samples. Complete genomes of Porcine Coronavirus and Kobuvirus were obtained, as well as a partial genome of Porcine Sapovirus. The phylogenetic results showed that the grouping of these strains corresponds to a geographical relationship.

To investigate the intrahost variation of PEDv sequences, the gene encoding the Spike (S) protein, directly amplified from different organs belonging to positive animals, was examined. Using the protocol described by DIEP et al 2017, which consists of an rt-PCR, the sequences present in different tissues of 5 positive pigs were analyzed. At least one sequence with genomic deletions was found coexisting with strains with an intact S gene in samples from two intestines and one tonsil. Deletion sizes ranged from 612 nt to 185 nt and were at different positions in the S gene. Point mutations were detected in kidneys and lymph nodes from the same animal.

This is the first complete report of the genome and isolation of Porcine Kobuvirus in Mexico, as well as the first phylogenetic analysis for Porcine Sapovirus in the country. The presence of deletion variants in the S gene suggests a high incidence of defective viruses *in vivo*.

Key Words

Coronavirus, Swine, Pig, Diarrhea

Contenido

PORTADA	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT	III
CONTENIDO.....	IV
LISTA DE CUADROS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.2 LA FAMILIA <i>CORONAVIRIDAE</i>	1
1.3 DIARREA EPIDÉMICA PORCINA.....	2
1.3.1 <i>Etiología</i>	2
1.3.2 <i>Ciclo de replicación</i>	7
1.3.3 <i>Epidemiología</i>	9
1.3.4 <i>Transmisión y patogenia</i>	12
1.3.5 <i>Control y profilaxis</i>	13
1.4 ENFERMEDADES EMERGENTES EN CERDOS	14
CAPÍTULO 1	16
2.1 ANTECEDENTES	17
2.2 JUSTIFICACIÓN.....	17
2.3 HIPÓTESIS	17
2.4 OBJETIVO GENERAL	17
2.5 OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
2.6 MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.7 RESULTADOS.....	22
2.8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	31
CAPÍTULO 2	34
3.1 ANTECEDENTES	35
3.2 JUSTIFICACIÓN.....	35
3.3 HIPÓTESIS	36
3.4 OBJETIVO GENERAL	36
3.5 OBJETIVOS PARTICULARES:.....	36
3.6 MATERIAL Y MÉTODOS	36
3.7 RESULTADOS.....	38
3.8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	42
DISCUSIÓN GENERAL.....	44
CONCLUSIÓN GENERAL	45

ANEXO 1. MOLECULAR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA
VIRUS AND PORCINE AICHIVIRUS C COINFECTION IN MÉXICO..... 46

REFERENCIAS..... 47

Lista de Cuadros

CUADRO 1:	AGENTES VIRALES REPORTADOS EN COINFECCIÓN CON PEDV.....	15
CUADRO 2:	INICIADORES Y Sonda USADOS EN EL PROTOCOLO DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DEL PEDV.....	19
CUADRO 3:	NÚMERO DE LECTURAS MAPEADAS Y CONTIGS ENSAMBLADAS PARA MUESTRAS DE TEJIDO DE CERDOS DIARREICOS. FAMILIAS VIRALES PORCINAS IDENTIFICADAS EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS.....	23
CUADRO 4:	IDENTIDADES PORCENTUALES DE SECUENCIAS ENSAMBLADAS CON REFERENCIAS.	24
CUADRO 5:	INICIADORES Y Sonda USADOS EN EL PROTOCOLO PARA PCR.....	37
CUADRO 6:	ANÁLISIS DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE GEN N DE PEDV EN TEJIDOS DE ANIMALES NATURALMENTE INFECTADOS.....	38
CUADRO 7:	LOS PORCENTAJES DE SIMILITUD PAREADA A NIVEL DE NUCLEÓTIDOS DE SECUENCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ANIMAL 103H SIN CONSIDERACIÓN DE GAPS.....	40

_Toc115815326

Lista de Figuras

FIGURA 1.	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ESTRUCTURA DE UNA PARTÍCULA VIRAL DE ALPHACORONAVIRUS (BERGMANN & SILVERMAN, 2020). DISPONIBLE EN: HTTP:// HTTPS://WWW.CCM.ORG/CONTENT/EARLY/2020/05/12/CCM.87A.20047	5
FIGURA 2.	CICLO DE REPLICACIÓN DE PEDV, SE OBSERVAN LOS ARN SUBGENÓMICOS Y SUS PROTEÍNAS CODIFICADAS. OBTENIDO DE: HTTPS://VIROLOGYJ.BIOMEDCENTRAL.COM/ARTICLES/10.1186/S12985-015-0421-2/FIGURES/2	8
FIGURA 3.	RECONSTRUCCIÓN DE LAS VÍAS DE DISEMINACIÓN DE PEDV ENTRE PAÍSES, SE INDICAN LOS GENOTIPOS DETECTADOS EN CADA PAÍS (LEE, 2015). DISPONIBLE EN: HTTPS://VIROLOGYJ.BIOMEDCENTRAL.COM/ARTICLES/10.1186/S12985-015-0421-2	10
FIGURA 4.	ÁRBOL FILOGENÉTICO CONSTRUIDO PARTIR DEL GEN S DE PEDV, SE DIVIDEN LAS CEPAS EMERGENTES. LA SECUENCIA OBTENIDA EN MÉXICO 2014 SE ENCUENTRA EN EL GRUPO 2B NO-INDEL. CONSTRUIDA POR HU ET AL 2021 (VU ET AL., 2021). DISPONIBLE EN: HTTPS://WWW.MDPI.COM/2076-0817/10/11/1479/HTM	11
FIGURA 5.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR POR RT-PCR PARA DETECCIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS A PEDV, PKV, PDCOV Y LA COINFECCIÓN POR PEDV/PKV. PORCENTAJE POR ESTADO.....	22
FIGURA 6.	ÁRBOL FILOGENÉTICO UTILIZANDO SECUENCIAS COMPLETAS DEL GENOMA DE PEDV. EL ÁRBOL SE INFIRIÓ USANDO EL MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD Y EL MODELO GTR CON DISTRIBUCIÓN GAMMA Y SOPORTE DE RAMA SIMILAR A SH USANDO EL SOFTWARE PHYML V3.3.21.	26
FIGURA 7.	ÁRBOL FILOGENÉTICO UTILIZANDO CDS COMPLETOS DE PKV. EL ÁRBOL SE INFIRIÓ USANDO EL MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD Y EL MODELO GTR CON DISTRIBUCIÓN GAMMA Y SOPORTE DE RAMA SIMILAR A SH USANDO EL SOFTWARE PHYML V3.3.21. LA SECUENCIA OBTENIDA EN ESTE ESTUDIO ESTÁ MARCADA EN COLOR ROJO.	28
FIGURA 8.	ÁRBOL FILOGENÉTICO PARA LA REGIÓN QUE CODIFICA LA CÁPSIDE DEL SAPOVIRUS PORCINO. EL ÁRBOL SE INFIRIÓ USANDO EL MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD Y EL MODELO GTR CON DISTRIBUCIÓN GAMMA Y SOPORTE DE RAMA SIMILAR A SH USANDO EL SOFTWARE PHYML V3.3.21. LA SECUENCIA OBTENIDA EN ESTE ESTUDIO ESTÁ MARCADA EN COLOR.	29
FIGURA 9.	EFECTO CITOPÁTICO OBSERVADO EN CULTIVO CELULAR DESPUÉS DE LA INFECCIÓN CON EL PKV 5 DÍAS POST-INFECCIÓN. A) CÉLULAS VERO SIN INFECTAR B) CÉLULAS VERO INFECTADAS CON EL PKV EN EL PASE 9.....	30
FIGURA 10.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO CONSTRUIDO CON EL MÉTODO DE MÁXIMA SIMILITUD DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS OBTENIDAS DEL GEN S A PARTIR DE UN BROTE EN CERDOS EN EL ESTADO DE MÉXICO EN EL 2018. ÁRBOL BASADO EN EL MODELO TAMURA-NEI Y DISTRIBUCIÓN GAMMA CON 100 REPETICIONES DE BOOTSTRAPS CONSTRUIDO CON EL SOFTWARE MEGA7.	39
FIGURA 11.	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DEDUCIDAS DE AMINOÁCIDOS OBTENIDAS DIRECTAMENTE DE TEJIDOS PROVENIENTES DEL BROTE PROVOCADO POR EL PEDV OCURRIDO EN EL ESTADO DE MÉXICO. SE MUESTRA LA DELECIÓN ENCONTRADA EN TONSILA COMO SECUENCIA SEPARADA.	41

Abreviaturas

PEDv:	Virus de la Diarrea Epidémica Porcina
GETv:	Virus de la Gastroenteritis Transmisibile
PRCoV:	Virus del Coronavirus Respiratorio Porcino
SADS-CoV:	Coronavirus del Síndrome de Diarrea Aguda Porcina
PDCoV:	Deltacoronavirus Porcino
ORF:	Marco de lectura abierto
Nsp:	Proteínas no estructurales
RTC:	Complejo replicasa-transcriptasa
AcN:	Anticuerpos neutralizantes
pAPN:	Proteína transmembranal aminopeptidasa N
NGS:	Secuenciación de siguiente generación
PAstV:	Astrovirus
PCV:	Circovirus
PKV:	Kobuvirus Porcino tipo 1 (Aichivirus C)
PSaV:	Sapovirus
PSV:	Sapelovirus porcino
GARV:	Rotavirus A
FCoV:	Coronavirus Felino

Introducción

1.1 Antecedentes

La Diarrea Epidémica Porcina (PED) es un tipo de enteritis viral que tiene como principal signo la diarrea, además de vómito, anorexia, deshidratación y pérdida de peso. A pesar de que el agente causal de la PED puede infectar a porcinos de cualquier edad, la severidad del cuadro clínico depende en gran medida de la edad del animal, siendo los más afectados los cerdos neonatos en los cuales tiene una alta mortalidad; debido a esto, la enfermedad tiene un fuerte impacto económico sobre las producciones afectadas (D. Song, Moon, & Kang, 2015).

El virus fue reportado por primera vez en 1971 (Oldham, 1972) y aislado a partir de un brote ocurrido en Bélgica en 1976 (Pensaert & de Bouck, 1978), desde entonces brotes esporádicos han ocurrido en diferentes países europeos. En Asia se ha convertido en una enfermedad de gran impacto económico desde el primer brote ocurrido en China en 2010 (Jinghui & Yijing, 2005; Kusanagi et al., 1992; Kweon et al., 1993), el cual provocó cuadros clínicos de mayor gravedad que los ocurridos en Europa. En Mayo de 2013 se reportó un brote de PEDv por primera vez en el continente americano en el estado de Iowa, Estados Unidos, seguido por brotes en Canadá y México, donde Trujillo-Ortega et al., 2016 describieron por primera vez un brote en el Estado de México. Desde entonces la enfermedad ha tomado importancia como un problema en la producción porcina a nivel mundial.

1.2 La familia *Coronaviridae*

La familia *Coronaviridae* incluye virus envueltos de genoma ARN lineal de cadena sencilla y sentido positivo de hasta 32 kb de longitud y con una de simetría helicoidal (de Groot et al., 2012).

La subfamilia *Orthocoronavirinae* está dividida en cuatro géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (de Groot et al., 2012). En porcinos, han sido identificados seis miembros de esta subfamilia: Los virus de Diarrea Epidémica Porcina (PEDv), Gastroenteritis Transmisible (GETv) y el Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCoV) que pertenecen al género *Alphacoronavirus*, al igual que el virus responsable del Síndrome de Diarrea Aguda Porcina (SADS-CoV) este virus fue identificado recientemente en animales en China con una signología similar a la provocada por PEDv (Gong et al., 2017; Q. Wang, Vlasova, Kenney, & Saif, 2019).

El virus GET infecta células epiteliales del intestino delgado y es clínicamente indistinguible de PEDv, teniendo una prevalencia baja (0.1%) en Estados Unidos, tiene un alto grado de similitud con PRCoV por lo que se cree que ambos virus comparten un origen en común, con la diferencia que PRCoV también infecta a células del tracto respiratorio provocando enfermedad respiratoria (F. Chen, Knutson, Rossow, Saif, & Marthaler, 2019).

El virus de Encefalomiелitis Hemoaglutinante Porcina pertenece al género *Betacoronavirus*; infecta tejidos respiratorios y neuronales y provoca vómito y problemas neurológicos en lechones, ha sido reportado en Norteamérica aunque se cree que la mayoría de los casos son subclínicos (Mora-Díaz, Piñeyro, Houston, Zimmerman, & Giménez-Lirola, 2019).

El Deltacoronavirus Porcino (PDCoV) fue reportado en Hong Kong en 2012 y en América en febrero de 2014, este virus tiene tropismo entérico causando diarrea moderada con una mortalidad menor al 40% en lechones (Jung et al., 2015).

1.3 Diarrea Epidémica Porcina

1.3.1 Etiología

El agente etiológico de la diarrea epidémica porcina es un virus miembro de la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* del género *Alphacoronavirus*. La partícula viral

consiste en una envoltura lipídica de aproximadamente 130 nm de diámetro que cubre una cápside helicoidal que protege el genoma (Figura 1). El genoma consiste de una cadena ARN en sentido positivo de aproximadamente 28 kb de longitud y contiene siete marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para poliproteínas virales no estructurales 1a y 1b, y proteínas estructurales (S, espícula; E, envoltura; M, membrana; N, nucleocápside y ORF3) (D. Song & Park, 2012):

ORF1a/b El ORF 1 codifica para dos precursores poliproteícos pp1a y pp1ab, los cuales son procesados por proteasas similares a la papaína y serina para dar lugar a proteínas no estructurales (Nsp1-16), muchas de estas interactúan para formar el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) responsable de la replicación del ARN viral y la transcripción de los ARN subgenómicos. Además de estas funciones en la replicación, algunas Nsp están involucradas en antagonizar la respuesta inmune innata del huésped (D. Song & Park, 2012).

S (Spike) La proteína S es la responsable de la unión del virus con el receptor celular y de la fusión con la membrana plasmática de la célula hospedera, es una glicoproteína de membrana tipo I que contiene epítomos de unión a anticuerpos neutralizantes (Shirato, Matsuyama, Ujike, & Taguchi, 2011; D. Song & Park, 2012).

ORF3 El ORF3 codifica para una proteína accesoria que forma un canal iónico y que se ha relacionado con estrés en retículo endoplásmico y autofagia en la célula hospedera. Mutaciones en este gen producidos por pasajes seriales en cultivo celular se han relacionado con una reducción de la virulencia (Si et al., 2020; Zou et al., 2019) y su delección completa resulta

en cuadros clínicos menos severos en cerdos infectados experimentalmente y una formación de placas reducida en cultivo celular (Beall et al., 2016).

E (Envoltura) La proteína E juega un papel importante durante la gemación del virión. Interactúa con las proteínas M y N e incrementa la producción de IL-8 (Xu et al., 2013).

M La proteína M es la proteína estructural más abundante, está relacionada con el ensamblaje viral, e induce el arresto de la célula en la fase S del ciclo celular inhibiendo la transcripción de Ciclina A (XU et al., 2015).

N Es una fosfoproteína asociada al genoma viral y necesaria para la encapsidación del mismo formando la cápside viral. Antagoniza la producción de IFN- β . Es altamente inmunogénica y conservada. Su sobreexpresión produce arresto del ciclo celular (Ding et al., 2014).

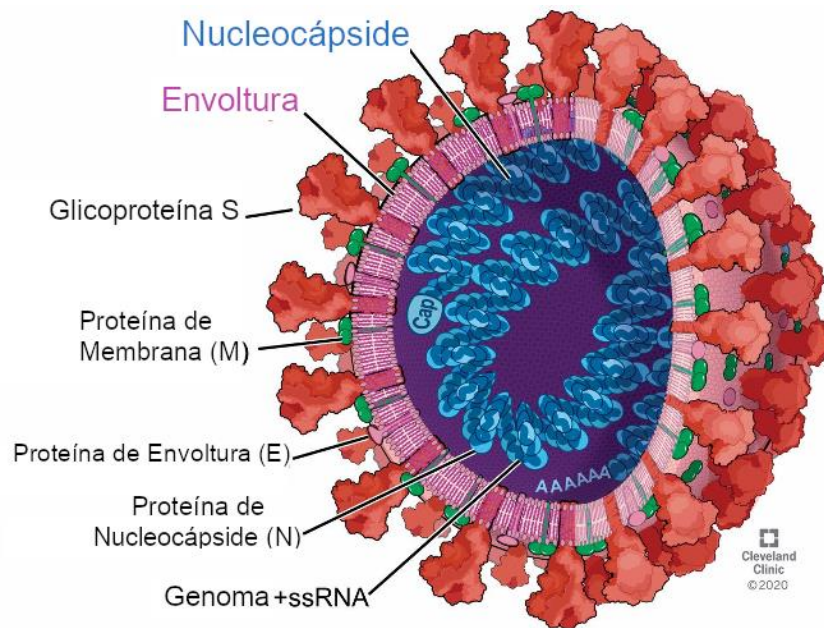


Figura 1. Representación gráfica de la estructura de una partícula viral de Alphacoronavirus (Bergmann & Silverman, 2020). Disponible en: <http://https://www.ccm.org/content/early/2020/05/12/ccjm.87a.20047>

Dentro de las proteínas del virus de la PED, la proteína Spike es considerada como la proteína viral de mayor antigenicidad, induce la producción de anticuerpos neutralizantes y es utilizada en el desarrollo de ensayos diagnósticos y en el desarrollo de nuevas vacunas, así como una de las más utilizadas en estudios filogenéticos para este grupo de este virus (Bosch, van der Zee, de Haan, & Rottier, 2003). La proteína Spike está dividida en dos subunidades: la subunidad N-terminal (S1) y la C-Terminal (S2). S1 se une al receptor celular mientras que la subunidad S2 es responsable de la actividad fusogénica durante la entrada del virión a la célula y contiene una región transmembranal (Shirato et al., 2011). Se han identificado epítopos de unión a anticuerpos neutralizantes (AcN) en la subunidad S1 en los aminoácidos 497-636 (dominio COE), 752-759 (SS2), 768-776 (SS6) y 1368-1374 (2C10) (Chang et al., 2019; Sun et al., 2008).

Estudios moleculares del gen S sugieren que el virus puede ser clasificado en dos grupos (G1 y G2) y cuatro subgenotipos (S. J. Park et al., 2007). El subgrupo “a” del G1 (G1a) incluye virus que circularon por Europa y Asia antes del año 2010. Por el contrario, los virus detectados en los brotes más graves de PEDv en Asia después al año 2010 así como en gran número de granjas en los EE. UU. pertenecen al G2 en los subgrupos 2a y 2b (G2a y G2b). El subtipo G1b incluye aislados que presentan deleciones e inserciones (cepas INDEL) en el gen que codifica para la proteína S y se ha propuesto que derivarían de la recombinación entre aislados del genotipo 1a con aislados del genotipo 2b (Boniotti et al., 2016; Huang et al., 2013).

Cambios a nivel de aminoácidos en los epítopos de la proteína S se han relacionado con la aparición de nuevos brotes (W. Li et al., 2012; S. J. Park et al., 2007). En EU dentro del primer año luego de la aparición del brote, se detectó la presencia de una variante del virus denominada S-INDEL la cual presentaba múltiples deleciones e inserciones en el gen S

(Vlasova et al., 2014), estas modificaciones en el genoma viral se relacionaban con un cuadro clínico de menor severidad en lechones (L. Wang, Byrum, & Zhang, 2014). Se ha demostrado que una exposición previa de cerdas a cepas S-INDEL, aumenta la sobrevivencia de los lechones inoculados con una cepa virulenta de PEDv a un 100%, comparados con un 67% de sobrevivencia en lechones nacidos de cerdas no inoculadas; lo que indica que la inmunidad lactogénica generada en cerdas expuestas a cepas S-INDEL brinda protección contra las cepas más virulentas reduciendo la morbilidad a un 43% (Goede et al., 2015).

Además de las variaciones en el gen S entre virus circulantes, se han reportado variantes genéticas que coexisten en el hospedero, Diep, et al 2017 reportó la presencia de diferentes variantes en la misma muestra, encontrando variantes con deleciones en el gen S (582 nt y 648 nt) coexistiendo con variantes con el gen S completo (Diep, Norimine, Sueyoshi, Lan, & Yamaguchi, 2017). En cerdos infectados experimentalmente se ha reportado la presencia del virus en pulmón asociado a macrófagos alveolares, donde la secuencia del gen S mostró variaciones en la porción N terminal, lo que sugiere que estas mutaciones pueden afectar el tropismo viral de las cepas silvestres, permitiendo una infección en pulmón además de una infección intestinal. Aún no se tienen identificadas exactamente las mutaciones que podrían permitir este cambio en el tropismo (J.-E. Park & Shin, 2014).

La heterogeneidad de la población de virus PED dentro del hospedero puede tener otras implicaciones además de permitir la infección a diferentes líneas celulares, la diversidad poblacional ha sido relacionada a la eficacia viral. La generación de mutantes en poblaciones virales también permite una adaptación continua a la presión ejercida por el sistema inmune, permitiendo la generación de mutantes de escape. De esta forma, las interacciones entre estas mutantes, ya sean de cooperación o interferencia podrían determinar el comportamiento biológico del virus (X. Zhang et al., 2007).

1.3.2 Ciclo de replicación

Al inicio del ciclo de replicación las partículas virales se adhieren a la superficie de las células intestinales debido a la afinidad de la proteína S con el heparan sulfato celular. La proteína S es la proteína de entrada que se une al receptor celular, la proteína transmembranal aminopeptidasa N (pAPN) ha sido identificada como un posible receptor de entrada para PEDv (B. X. Li, Ge, & Li, 2007), sin embargo estudios recientes han demostrado que la eliminación de la expresión de pAPN en células susceptibles no tiene efecto en la infección, lo que sugiere que el virus podría estar utilizando alguna otra molécula como receptor (W. Li et al., 2017). La penetración ocurre por endocitosis mediada por clatrina y la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma la cual está mediada por cambios conformacionales de la proteína S, para que estos cambios ocurran, la proteína S debe ser activada proteolíticamente por una o más proteasas del hospedero como las catepsina L y B lisosomal o la tripsina extracelular (C. Liu et al., 2016).

Después de la desencapsidación, el genoma viral se libera en el citoplasma y se traduce inmediatamente para producir replicasas PPl_a y PP1_{ab} codificadas en el ORF1. Estas poliproteínas se escinden proteolíticamente en 16 nsps que comprenden el complejo de replicación y transcripción (RTC) que participa en la síntesis de ARN de cadena negativa utilizando el ARN genómico como molde (Lee, 2015).

Tanto las cadenas negativas de longitud completa como las de longitud subgenómica se producen y luego se utilizan para sintetizar el ARN genómico de longitud completa y ARN mensajeros subgenómicos de diferente longitud. Cada ARN mensajero subgenómico se traduce para producir solo la proteína codificada por el ORF en el extremo 5' del ARNm por lo que la traducción se realiza de manera anidada (Figura 2).

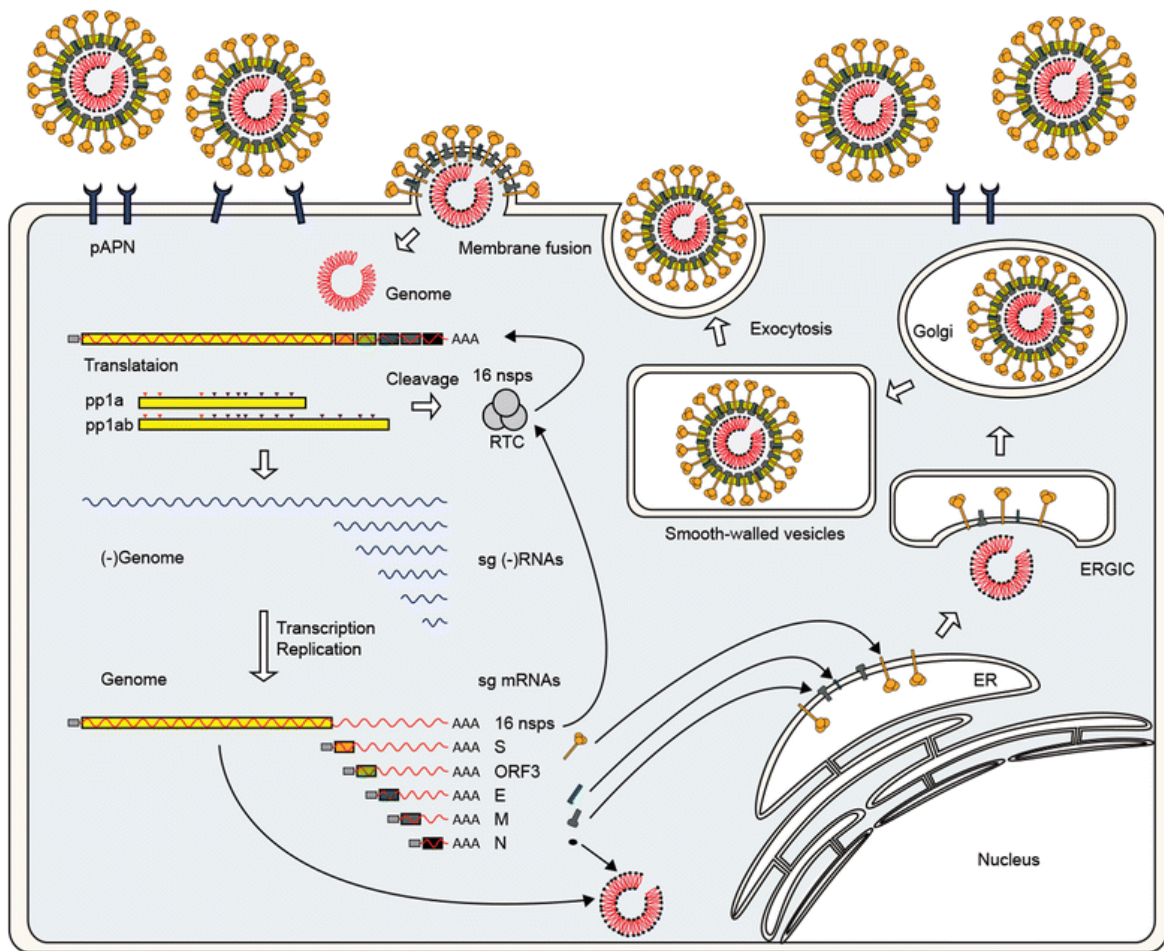


Figura 2. Ciclo de replicación de PEDv, se observan los ARN subgenómicos y sus proteínas codificadas. Obtenido de: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-015-0421-2/figures/2>

Las proteínas de la envoltura S, E y M se insertan en el retículo endoplásmico (RE) y se anclan en el aparato de Golgi. La proteína N interactúa con el ARN genómico recién sintetizado para formar la nucleocápside de simetría helicoidal. Los viriones se ensamblan durante la gemación de los complejos formados en el compartimento ER-Golgi (ERGIC) y luego se liberan mediante exocitosis (Lee, 2015). La muerte celular es una consecuencia de la infección viral, observándose antes la formación de células gigantes multinucleadas como

efecto citopático en el cultivo celular en presencia de tripsina; este efecto es provocado por la expresión de la proteína S viral fusogénica en la superficie de la célula (Lee, 2015).

1.3.3 Epidemiología

PED es considerada una enfermedad de distribución mundial provocando brotes en Asia de mayor severidad y frecuencia que los ocurridos en Europa. En 2007 y 2008 se presentó un brote en Tailandia que resultó en la pérdida del 100% de lechones neonatos en la mayoría de las granjas afectadas (D. Song & Park, 2012); en 2010-2012 brotes severos de PED ocurrieron en China incluso en animales vacunados con la cepa CV777, con mortalidades de moderadas a altas en lechones, lo cual sugiere una baja efectividad de la vacuna debido a las diferencias genéticas y antigénicas entre las variantes responsables de estos brotes y la cepa vacunal (W. Li et al., 2012; J. Wang et al., 2013).

Desde el año 2013 se reportaron brotes sospechosos a PEDv en Estados Unidos, México, Canadá y Brasil. En Estados Unidos, el impacto sobre la producción porcina asociado a la entrada y difusión del PEDv tuvo un costo económico aproximado de 900-1.800 millones de dólares durante el primer año (Paarlberg, 2014). Las variantes americanas identificadas estaban estrechamente relacionadas con las variantes Chinas (China/2012/AH2012) y fueron clasificadas dentro de los genotipos G2b y G1b (Figura 3) (Huang et al., 2013).

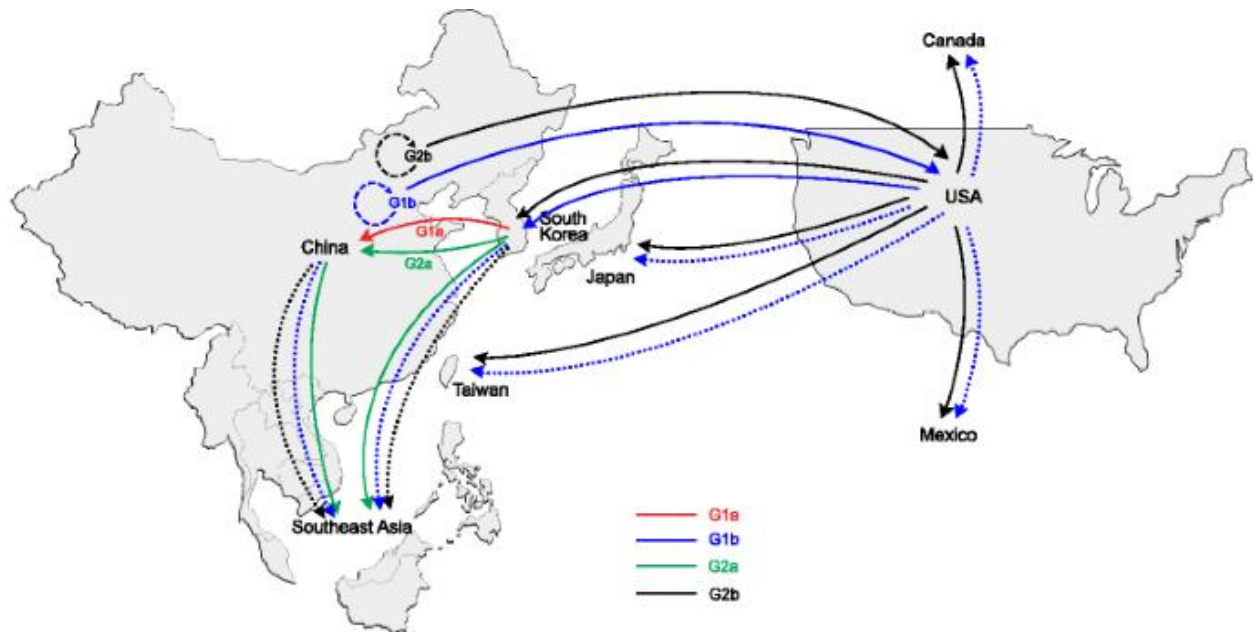


Figura 3. Reconstrucción de las vías de diseminación de PEDV entre países, se indican los genotipos detectados en cada país (Lee, 2015). Disponible en: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-015-0421-2>

En México, se comenzaron a reportar brotes desde febrero de 2013 y para el mes de agosto de 2014 muchas regiones porcícolas importantes se habían visto afectadas por la enfermedad, en mayo de 2015 SAGARPA notificó la presencia de la enfermedad en México ante la OIE. Amador, 2014 calculó pérdidas económicas de hasta 17% en 4 granjas mexicanas afectadas durante 2014 (Amador, 2015). Actualmente, los estados donde se reportan mayor número de casos positivos son Puebla, Jalisco, Veracruz y Aguascalientes. En el año 2016 fue reportada una prevalencia de 16% de un total de 2099 muestras (Sánchez & Carrera, 2017). Los genotipos identificados en el territorio nacional se asociaron al genotipo 2b y así como a cepas INDEL (Figura 4) (Lara-Romero et al., 2018; Reveles-Félix et al., 2020).

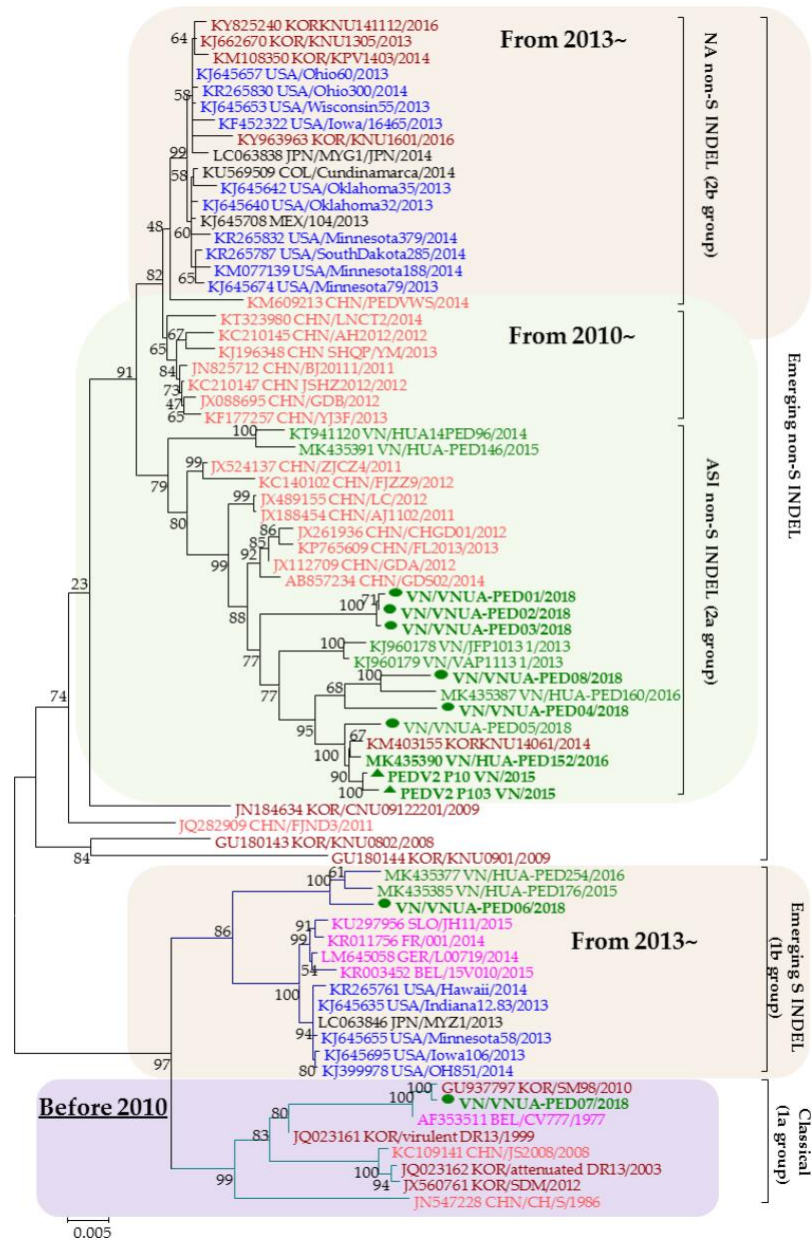


Figura 4. Árbol filogenético construido partir del gen S de PEDv, se dividen las cepas emergentes. La secuencia obtenida en México 2014 se encuentra en el grupo 2b no-INDEL. Construida por HU et al 2021 (Vu et al., 2021). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/11/1479/htm>

1.3.4 Transmisión y patogenicidad

La ruta fecal-oral es la principal vía de transmisión, aunque el virus también puede transmitirse por aerosoles con vía de entrada nasal (Y. Li et al., 2018). Vómito y heces son fuentes de contaminación de fómites como camiones de transporte y alimento (Alonso et al., 2014; Dee et al., 2014; Lowe et al., 2014). Algunos estudios han demostrado la presencia de ARN viral en muestras de leche de cerdas afectadas, sugiriendo una potencial ruta de transmisión vertical de PEDv (Jung & Saif, 2015; W. Li et al., 2012; Z.-L. Li et al., 2012).

Los enterocitos intestinales son el sitio primario de replicación del virus. Durante el período de incubación, cerdos infectados presentan enterocitos necrosados o en proceso de necrosis y vellosidades normales, luego de 1-3 días después de la presentación de diarrea los cerdos comienzan a presentar acortamiento de las vellosidades intestinales. El virus es citolítico y los enterocitos infectados mueren como resultado de la replicación viral, ocasionando atrofia de las vellosidades en el intestino delgado. La diarrea inducida por PEDv es una consecuencia de mala absorción debida a la pérdida de enterocitos (Jung et al., 2014).

Existen diferencias en la virulencia de las diferentes cepas del PEDv. Las cepas S-INDEL se asocian a una infección de menor virulencia, con un periodo de incubación más largo, un periodo de diarrea más corto, daño del intestino más focalizado y menor mortalidad (18 % frente al 55 % de los cerdos infectados) en comparación con lechones desafiados con cepas NO-INDEL americanas. Sin embargo, es importante señalar que tanto las cepas S-INDEL como la cepa europea cepa CV777 (Clásica), son también capaces de provocar cuadros diarreicos graves, con mortalidades que pueden llegar al 75 % de los lechones lactantes en las dos primeras semanas de vida. La excreción viral ocurre principalmente durante las primeras dos semanas, con un pico de excreción en los días 5-6 (Arguello, de Nova, Rubio, & Carvajal, 2016).

1.3.5 Control y profilaxis

Los lechones están protegidos hasta el día 13 de edad por los anticuerpos obtenidos del calostro de madres inmunizadas (de Arriba, Carvajal, Pozo, & Rubio, 2002), esta duración depende del título de anticuerpos IgA de la madre (Bae et al., 2003).

En Asia, donde la infección por el PEDv resulta en grandes pérdidas económicas la vacunación ha sido usada desde hace varios años, mediante el uso de vacunas atenuadas o inactivadas elaboradas con cepas de referencia. En América se desarrolló una vacuna de subunidades (Harrisvaccines, Iowa, USA) así como una vacuna inactivada (Zoetis, Florham Park, NJ, USA) con permiso temporal desde 2014, esta vacuna de aplicación intramuscular logró inducir un alto título de IgG en sangre en cerdas seronegativas, sin embargo, no se detectaron niveles altos de IgA en el calostro de estos animales (Langel, Paim, Lager, Vlasova, & Saif, 2016).

Aunque estas vacunas comerciales se consideran eficaces debido a que inducen la generación de anticuerpos circulantes y reducen la mortalidad en animales destetados y adultos, no todos los animales vacunados desarrollan una inmunidad lactogénica eficiente que protegería a los cerdos lactantes. Existen varios factores que podrían explicar la pobre inmunogenicidad lactogénica de las vacunas comerciales, principalmente el tipo de vacuna y la vía de inmunización. En un estudio realizado por Song y colaboradores en 2007 se demostró que la inoculación oral de cerdas seronegativas con PEDv atenuado elevó los niveles de IgA en el calostro y redujo la mortalidad de los lechones lactantes (13%) en comparación con la vía intramuscular (60%) (D. S. Song et al., 2007).

La recurrencia de PEDv en producciones inoculadas sugiere que el virus es tiene la capacidad de evadir las estrategias de inmunización disponibles actualmente. La aparición continua de nuevas cepas resalta la necesidad de nuevas vacunas basadas en el PEDv circulante actual.

Como una medida alternativa a el uso de vacunas comerciales, en algunas producciones se ha llevado a cabo la practica conocida como “Feedback”, la cual consiste en una inoculación directa con el virus de campo circulante obtenido de una muestra biológica sin ninguna atenuación previa. Debido a la falta de control y procesamiento de dicha muestra, esta práctica conlleva riesgos tales como el provocar una infección grave por PEDv o algún otro agente presente en la muestra, aumentar la virulencia del virus y diseminar la infección en la producción. A pesar de estos riesgos, este procedimiento es usado en lugares sin acceso a vacunas comerciales debido a la respuesta inmunitaria que generan; se han reportado diversos protocolos para el uso de feedback, Clement y colaboradores 2016 encontraron que la inoculación oral de un homogenado intestinal a las hembras de dos unidades productivas resultó en títulos neutralizantes de 1:160 a 1:640 en suero, y de 1:160 a 1:1280 en muestras de leche, así como anticuerpos detectables en el 90% de los lechones (Clement et al., 2016).

1.4 Enfermedades emergentes en cerdos

En las últimas décadas los reportes de nuevos agentes virales presentes en cerdos han ido en aumento, en gran parte, esto ha sido gracias las plataformas de secuenciación de siguiente generación (NGS) las cuales pueden ser aplicadas para identificar múltiples secuencias genómicas presentes en una muestra biológica, sin embargo, una de las limitaciones de esta tecnología es la incertidumbre respecto a si los microorganismos detectados contribuyen directamente al cuadro clínico que presente el animal.

Uno de los aspectos que se ha observado gracias a las NGS ha sido la presencia de dos o más patógenos en animales que presentan un cuadro clínico, lo cual ha levantado preguntas sobre la interacción y posibles efectos que estas coinfecciones pueden tener sobre el animal. La capacidad de las NGS de detectar secuencias de manera no específica también permite encontrar agentes virales no esperados en la muestra analizada, lo cual puede aprovecharse en un marco de diagnóstico, aunque la factibilidad de esta aplicación debe

analizarse dependiendo de cada caso debido al costo y tiempo de análisis (Guo, Ruan, Qiao, Deng, & Zhang, 2020; Jung, Kang, Lee, & Song, 2008; F. Zhang et al., 2019).

Existen varios ejemplos de casos donde se reporta la presencia simultánea de patógenos virales que han causado importantes brotes en unidades de producción porcinas; la coconfección con PEDv ha sido reportada para Astrovirus (PAstV), Circovirus (PCV), Aichivirus C (PKV-1), Sapovirus (PSaV), Sapelovirus porcino (PSV), Deltacoronavirus (PDCoV) y Rotavirus A (GARV) (Guo et al., 2020; Jung et al., 2008; F. Zhang et al., 2019), incluyendo infecciones mixtas con más de dos agentes (Q. Chen et al., 2018); estos reportes se enlistan en el cuadro 1. Para determinar el impacto de dichas coinfecciones sobre la severidad del cuadro clínico, Jung et al 2008 (Jung et al., 2008) comparó lechones inoculados únicamente con el PEDv o GARV (Rotavirus A) así como la combinación de ambos virus, sin poder encontrar alguna interacción de ambos virus en el intestino delgado de los cerdos, tampoco se encontró una diferencia significativa en el tamaño de las vellosidades intestinales entre el grupo inoculado con el PEDv y el inoculado con PEDv/ GARV; por otro lado la coinfección de PEDv con PDCoV en lechones resultó en un incremento de la severidad de la enfermedad demostrada por una eliminación fecal viral más prolongada y una disminución de las vellosidades intestinales comparado con los cerdos inoculados con PEDv o PDCoV solos, así como aumentos significativos de IFN- α e IL12 en los grupos inoculados con PEDv/PDCoV en comparación con los grupos inoculados individualmente (Saeng-chuto et al., 2021).

Cuadro 1: Agentes virales reportados en coinfección con PEDv.		
Agente viral coexistente con el PEDv	Prevalencia	Ref.
Kobuvirus Porcino	15-81.5%	(Sisay, Wang, Oka, & Saif, 2013)(Su et al., 2020)
Deltacoronavirus Porcino	51- 55.9%	(Dong et al., 2015)(Feng, Xu, & Zhu, 2020)
Rotavirus A	20.3-22-7%	(Su et al., 2020)(Cai et al., 2016)
Gastroenteritis Transmisible	5.78%	(Su et al., 2020)
Sapovirus Porcino	8.4%	(C. Wang, Lan, & Yang, 2016)
Astrovirus Porcino	40.9 %	(Cai et al., 2016)

Capítulo 1

Detección y caracterización molecular de la coinfección por el virus de la diarrea epidémica porcina y el Aichivirus C porcino en México.

2.1 ANTECEDENTES

En los últimos años una diversa variedad de patógenos virales se han identificado como agentes causales en cuadros de diarrea en cerdos. Entre estos agentes, han adquirido una importancia particular los miembros de la familia *Coronaviridae*: el virus de la Diarrea Epidémica Porcina (PEDv), el virus de la Gastroenteritis Transmisible (GETv), y el Deltacoronavirus Porcino (PDCoV). Existen otros ejemplos de virus asociados a casos de diarrea, como son el Aichivirus C (PKV-1), Sapovirus (PSaV) y Sapelovirus porcino (PSV), para los cuales hay reportes de infecciones mixtas con coronavirus porcinos; sin embargo, el papel que podrían tener en la aparición y severidad de diarreas aún necesita más estudios (Guo et al., 2020; Jung et al., 2008; F. Zhang et al., 2019).

2.2 JUSTIFICACIÓN

En México, el surgimiento de rebrotes en relacionados con la infección del PEDv en poblaciones porcinas inmunizadas sugiere una variabilidad genética entre los virus que afectan a las producciones porcícolas en el país y los virus vacunales, pero también podrían señalar a interacciones entre otros agentes que podrían afectar la respuesta a la inmunización y agudizar la patogenicidad de la infección por el PEDv.

2.3 HIPÓTESIS

La población de virus ARN presente en cerdos naturalmente infectados con el PEDv incluirá a otros virus patógenos asociados a cuadros diarreicos en porcinos.

2.4 OBJETIVO GENERAL

Identificar la población de virus de ARN proveniente de diferentes órganos de cerdos positivos a PED por medio de análisis moleculares, genómicos y metagenómicos.

2.5 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar la población de virus de ARN presentes de tejidos de cerdos naturalmente infectados por medio de análisis de secuenciación masiva.
2. Ensamblar los genomas de los virus identificados y analizar variantes virales por medio de herramientas bioinformáticas.
3. Realizar análisis filogenéticos de estos genomas con cepas de referencia con el software PhyML
4. Confirmar la presencia de coinfecciones en cerdos positivos a PEDv por medio de RT-PCR y aislamiento viral.

2.6 MATERIAL Y MÉTODOS

2.6.1 Colección de muestras

Se recolectaron muestras de 10 granjas diferentes en cuatro estados diferentes de México. En el momento del muestreo, todos los animales analizados presentaban signos clínicos compatibles con enfermedad gastrointestinal. Las granjas comerciales analizadas se ubicaron en el estado de Nuevo León, Guanajuato y Estado de México, mientras que las muestras recolectadas en el estado de Chiapas pertenecían a rebaños de cerdos de traspatio. Se recogieron 68 hisopos rectales de cerdos adultos y seis muestras de tejido intestinal de lechones de camadas que presentaban signos clínicos digestivos, las muestras se dividieron en alícuotas y se almacenaron en tubos de plástico estériles con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) a -80 °C.

2.6.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN de las muestras de tejido se realizó con el kit RNeasy Mini (n.º de catálogo 74.904 Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Aproximadamente 30 mg de muestras de tejido se rompieron en morteros congelados y Buffer RLT dentro de una cabina de flujo laminar. La cuantificación del ARN extraído se realizó con un kit de ensayo Qubit RNA HS (n.º de catálogo: Q32852 Invitrogen™, Hercules, CA, USA). Después de la extracción, cuantificación y evaluación de la calidad de las muestras, las extracciones se dividieron para su uso en pruebas moleculares y de secuenciación.

2.6.3 Análisis molecular por RT-PCR

Para la detección molecular de los virus analizados, el cDNA se sintetizó usando el kit VILO Superscript (Invitrogen, Hercules, CA, USA) y la detección se realizó usando Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Cat no: 11,304,011 Invitrogen™, Hercules, CA, USA). Para la detección del genoma de PEDv se usó el protocolo de RT-PCR en tiempo real reportado por la Universidad de Minnesota Veterinary Diagnostic Lab (Miller, Crawford, Lager, Kellner, & Brockmeier, 2016) en el termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher, USA) usando los iniciadores descritos en el cuadro 2.

Cuadro 2: Iniciadores y sonda usados en el protocolo de RT-PCR para detección del PEDv.	
N gene qRT-PCR	
PED_N_Forward-941	GAA TTC CCA AGG GCG AAA AT
PED_N_probe-963, FAM-BHQ	CGT AGC AGC TTG CTT CGG ACC CA
PED_N_Reverse-1028	TTT TCG ACA AAT TCC GCA TCT

Además de la detección molecular de PEDv, también se buscó la presencia de PKV usando el protocolo descrito por Liu et al. (X. Liu, Oka, & Wang, 2015) con los primers PK-F10 5'-GGTGGACTCATTGAGTAC-3' y PK-R10 5'-CCTCCCTGGGTGCA GCTTC-3. Las muestras fueron analizadas para la presencia de Deltacoronavirus usando el protocolo de Hu et al. Con

iniciadores 5'-CGCGTAATCGTGTGATCTATGT- 3' y 5'-CCGGCCTTTGAAGTGGTTAT-3' (Hu et al., 2015).

2.6.4 Secuenciación

La secuenciación de ARN de las muestras positivas se realizó en el centro de secuenciación de última generación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se midieron las concentraciones de ARN (espectrofotómetro de micro volumen Genova Nano 737,501, Jenway, Staffordshire, Reino Unido) y se construyeron bibliotecas de secuenciación con el kit de preparación de muestras de ARNm trenzado TruSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) con 5 uL de ARN. Luego, las muestras se secuenciaron en profundidad en el sistema Illumina NextSeq500, generando lecturas de extremos emparejados de 75 bases. Después de las evaluaciones de calidad realizadas por FASTQC (Babraham Bioinformatics, Reino Unido) y la eliminación del adaptador con Cutadapt v1.11, las lecturas se filtraron primero con el software Bowtie2 Alignment contra el genoma de referencia de *Sus scrofa* (GCF_000003025.6) para eliminar las secuencias provenientes del hospedero.

Los datos restantes se ensamblaron con SPAdes v3.12.0 (Centro de Biotecnología Algorítmica, San Petersburgo, Rusia) y el software SSPACE v3.0 (BaseClear B.V., Países Bajos). Las series de secuencias o lecturas que se superponen fueron ensambladas para formar los llamados "contigs", generando secuencias largas las cuales se sometieron a una clasificación taxonómica utilizando la canalización de clasificación metagenómica de Kraken (Wood, Lu, & Langmead, 2019). Para identificar los contigs correspondientes a genomas virales se usó la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLASTn) contra una base de datos de genomas virales obtenida del sitio web del NCBI (disponible en: <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>) (consultado el 20 de febrero de 2020). Finalmente, las lecturas originales se mapearon a los contigs virales utilizando el software BMap Alignment para verificar la cobertura. La predicción de eventos de recombinación homóloga se realizó utilizando RDP4 (Programa de

Detección de Recombinación). Los análisis se ejecutaron en las instalaciones del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

2.6.5 Análisis y caracterización de secuencias obtenidas por plataforma Illumina

Para los análisis filogenéticos las secuencias completas representativas de las familias virales fueron seleccionadas por CD-HIT-EST; en caso de estar disponibles, también se incluyeron secuencias reportadas en México. Las secuencias representativas y los genomas obtenidos se alinearon usando MAFFT v7.45 (Universidad de Osaka, Japón). Luego, los árboles filogenéticos obtenidos de los genomas completos fueron construidos usando el algoritmo de Máxima Similitud con SH-like para el soporte estadístico de las ramas con el software PhyML v3.3.21090321 (Université de Montpellier, Francia) (Guindon, Lethiec, Duroux, & Gascuel, 2005) y el programa iTOL v6.1.1 (University of Würzburg, Alemania) (Letunic & Bork, 2007), utilizando el modelo General Time Reversible seleccionado por el JModelTest v2.1.10 (University of Vigo, España) (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012).

2.6.6 Aislamiento viral

Para confirmar la presencia de los virus identificados por secuenciación, dos muestras intestinales que dieron positivo para los PKV y PEDv se propagaron por separado para el aislamiento del virus. Las muestras intestinales se prepararon como homogeneizados al 10 % en DMEM y se pasaron a través de filtros de 0,45 µm (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.). Los sobrenadantes resultantes se inocularon en células VERO (riñón de mono verde africano) cultivadas a 37 °C con 5 % de CO₂ en Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM; GIBCO, Gaithersburg, MD, EE. UU.). Para la valoración del efecto citopático (CPE) los cultivos infectados se observaron diariamente y se analizó la replicación viral mediante RT-PCR después de cada pase.

2.7 RESULTADOS

2.7.1 Análisis molecular por RT-PCR

Se detectó coinfección del PKV con PEDv en el 80% (8/10) de las producciones analizadas. Estas se ubicaban en los estados de Nuevo León, Chiapas y Estado de México. Todas las fincas presentaron manifestaciones clínicas al momento de la toma de muestras. De las muestras utilizadas en este estudio, el 51,4% (38/74) fueron positivas para PKV y el 67,6% (50/74) fueron positivas para PEDv. En general, se detectó coinfección entre los PKV y PEDv en el 36,4 % (27/74) de las muestras. La presencia del genoma del Deltacoronavirus solo se detectó en una finca ubicada en Guanajuato sin coinfección por PEDv o PKV (Figura 5).



Figura 5. Resultados del análisis molecular por RT-PCR para detección de muestras positivas a PEDv, PKV, PDCoV y la coinfección por PEDv/PKV. Porcentaje por estado.

2.7.2 Análisis metagenómico

Se seleccionaron muestras de PEDv positivas pertenecientes a dos lechones con signos clínicos agudos para la secuenciación de próxima generación. Después de la eliminación de lecturas de baja calidad, se obtuvo un promedio de 7,029,014 lecturas por muestra. Estas lecturas se ensamblaron y los contigs se anotaron taxonómicamente usando Kraken y BLASTn. Los resultados de Kraken mostraron la identificación de patógenos porcinos conocidos clasificados en las familias *Coronaviridae*, *Picornaviridae* y *Caliciviridae*. También se detectaron otros agentes virales de las familias *Tospoviridae*, *Bromoviridae* y *Marseilleviridae*. Los contigs ensamblados de los virus porcinos y su longitud se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3: Número de lecturas mapeadas y contigs ensambladas para muestras de tejido de cerdos diarreicos. Familias virales porcinas identificadas en las muestras analizadas							
Muestra	Lecturas iniciales	Lecturas filtradas	Contigs	Familias virales	No. de lecturas mapeadas	Longitud	Cobertura
205H	17,720,334	8,606,544	360	<i>Coronaviridae</i>	309,090	28,029	827.06
				<i>Picornaviridae</i>	186,517	8,116	1723.60
				<i>Caliciviridae</i>	402	2,977	10.13
103H	9,526,342	5,451,484	333	<i>Coronavirus</i>	119,986	28,034	321.00
				<i>Picornaviridae</i>	336	580	43.45

A nivel de especie, la muestra 205H, proveniente del Estado de México, mostró coinfección por los PEDv, PKV y PSaV; mientras que la muestra 103H, proveniente del mismo estado solo mostró evidencia de coinfección entre los PEDv y PKV, pero no presencia de PSaV. Para la muestra 205H, se ensamblaron dos genomas completos de PEDv (28.029 y 28.034 nt) además de una secuencia de longitud completa correspondiente al Kobuvirus Aichivirus C porcino (8.116 nt); para la muestra 103H, se ensambló un Aichivirus C porcino parcial (580 nt) y una secuencia parcial de Sapovirus porcino de 2.977 nt (Cuadro 4). Los análisis de BLASTn utilizando una base de datos del genoma viral de NCBI mostraron una alta cobertura e identidad entre los genomas de PEDv y una cepa de EE. UU. (número de acceso: KF272920.1).

Cuadro 4: Identidades porcentuales de secuencias ensambladas con referencias.					
Sample ID	Assembled Genome (AC Number)	Length (nt)	Subject Cover	Best Hit (BLASTn) (AC Number)	Perc. Identity (AC Number)
205H	EdoMex/205/2018 (MT490316.1)	28,029	99.97%	Porcine epidemic diarrhea virus strain USA/Colorado/2013 (KF272920.1)	99.66% (95.89%)
	EdoMex/2018/205 (MT211964.1)	8116	99.50%	Porcine kobuvirus isolate OH/RV11/2011 (MF506730.1)	90.66% (97.84%)
	EdoMex/2018/205 (MT726205.1)	2977	40.30%	Sapovirus GIII isolate p2 (KX688107.1)	91.13% (96.64%)
103H	EdoMex/103/2018 (MT490315.1)	28,034	99.99%	Porcine epidemic diarrhea virus strain USA/Colorado/2013 (KF272920.1)	99.66% (95.89%)
	NA	580	10%	Porcine kobuvirus strain KobuV/Pig-wt/ESP/P2B/2017 (MK962329.1)	95.86% (100%)

2.7.3 Análisis del genoma de Coronavirus Porcino

Para ambas muestras se ensamblaron genomas de Coronavirus de longitud completa, estas secuencias presentaron una identidad de 99,6% con respecto a las secuencias mexicanas locales. El análisis filogenético del genoma completo mostró que los genomas ensamblados se encuentran en un grupo con otras cepas mexicanas no INDEL previamente reportadas (Figura 6). El ORF3 de los dos genomas consistió en 224 aa, con una alta identidad de nucleótidos (99.8%) a las cepas locales y, como se esperaba de los resultados de filogenia, no tuvo la delección presente en las cepas atenuadas. Sin embargo, en el gen ORF3 las dos secuencias mostraron mutaciones a nivel de aminoácidos: V → A en la posición de aminoácido 21, V → I en el sitio 54, F → V en el aminoácido 80 y A → T en el aminoácido 100 de la proteína codificada en dicho gen.

El análisis del gen S de ambas muestras mostró una similitud a nivel de nucleótidos de 99,47–99,66 % y 99,42–99,78 % a nivel de aminoácidos con cepas locales (MH004420.1, KJ645708.1) y una identidad del 99,66 % nt y 96,64 % aa a la cepa de referencia CV777 (NC_003436.1), con la mayoría de los cambios de aminoácidos ubicados en el dominio S1. Además, se ubicaron las siguientes mutaciones entre regiones que contienen epítodos neutralizantes: L → F en aa 492, G → S en aa 594, A → E en aa 605, de la región COE y en la región del epítodo SD1 636–789: Y → S en aa 766, N → D en aa 707, N → S en aa 719, N → S en aa 724, y cambio Y → S en aa 766 de la proteína S del genoma de referencia CV777. Los genomas virales obtenidos se cargaron en la base de datos GenBank: MT490315 (103H), MT490316 (205H).

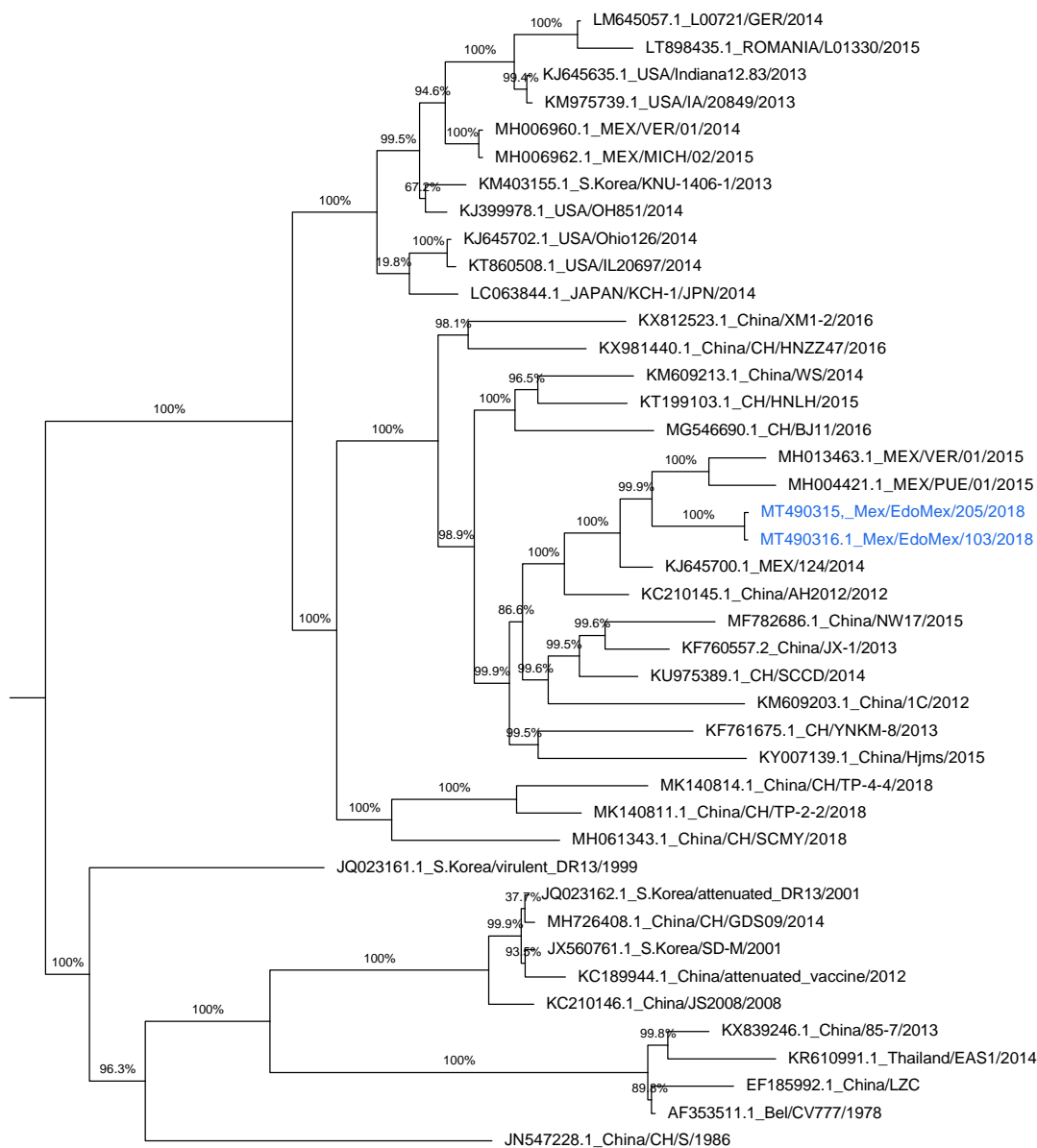


Figura 6. Árbol filogenético utilizando secuencias completas del genoma de PEDv. El árbol se infirió usando el método de máxima verosimilitud y el modelo GTR con distribución Gamma y soporte de rama similar a SH usando el software PhymI v3.3.21. Las secuencias obtenidas en este estudio están marcadas en color azul.

2.7.4 Análisis del genoma de Kobuvirus y Sapovirus Porcino

Se identificaron coinfecciones PEDv y Aichivirus C en las dos muestras analizadas. Se obtuvo una secuencia completa del genoma de Kobuvirus porcino (GenBank Accession no. MT211964) en la muestra 205H y también se generó un contig de 10% de longitud del genoma para la muestra 103H (Cuadro 4). El análisis filogenético basado en el gen que expresa la poliproteína completa reveló que la cepa detectada en este estudio formó un grupo con el aislado OH/RV11/2011 de EE. UU. Y Chgz/2015 (Figura 3). Los análisis de secuencia del gen que codifica la poliproteína revelaron un rango de identidad de nucleótidos entre 89.70-90.66% y una identidad de aminoácidos entre 96.91-97.84% para cepas de referencia de EE. UU. Y China (GenBank: MF506730.1, KC424640.1), respectivamente. El dúplex con motivo de 90 nt previamente reportado presente en cepas de Hungría, España y China y la inserción presente en la posición 135-137 nt de US/OH/RV50/2011 no estaban presentes en las secuencias ensambladas.

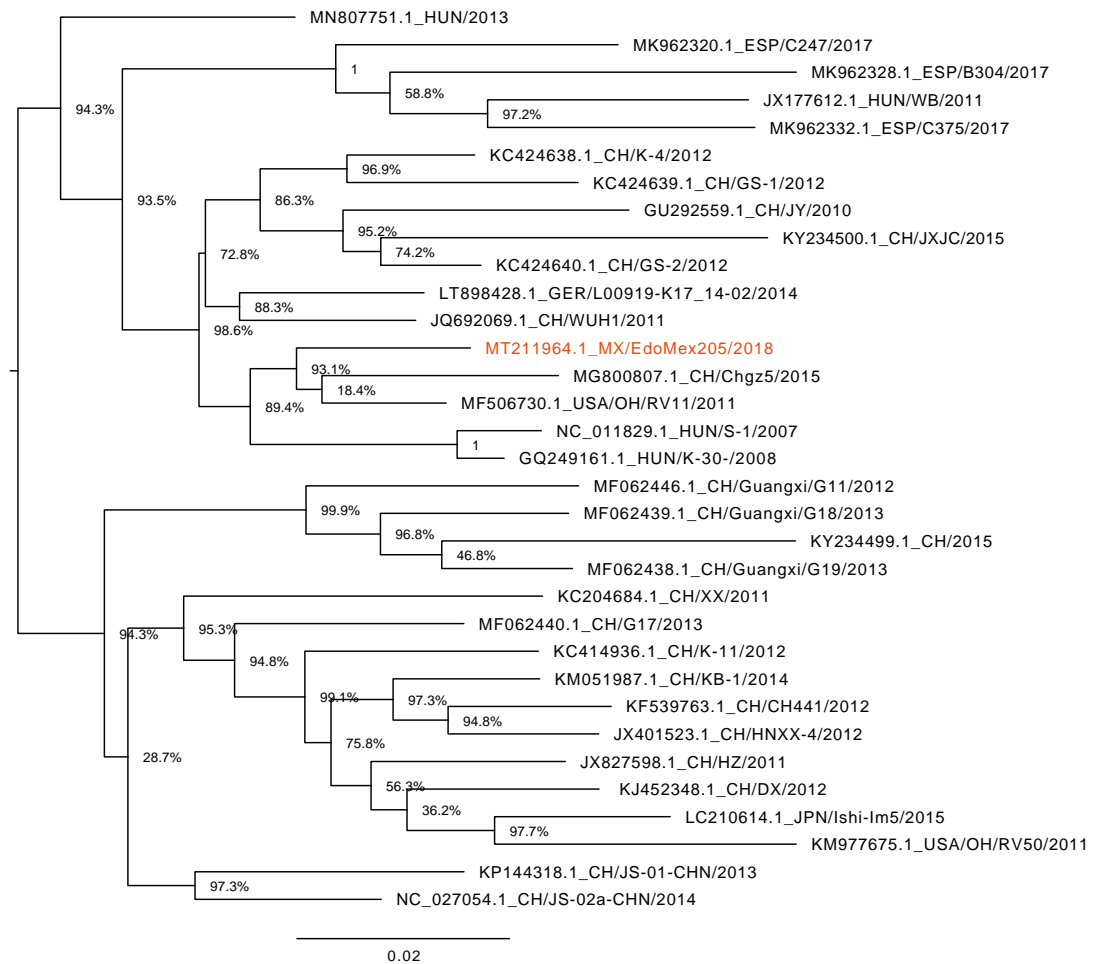


Figura 7. Árbol filogenético utilizando cds completos de PKV. El árbol se infirió usando el método de máxima verosimilitud y el modelo GTR con distribución gamma y soporte de rama similar a sh usando el software PhymI v3.3.21. La secuencia obtenida en este estudio está marcada en color rojo.

A partir de una de las muestras se ensambló una secuencia de 2.977 nt correspondiente al PSaV ORF 1 parcial y la totalidad de ORF 2, mostrando una alta similitud de nucleótidos (91.13%) a la secuencia de Sapovirus GIII disponible (KX688107.1). Para el VP2, la similitud fue del 93,36% a nivel de nucleótidos y del 97,08% a nivel de aminoácidos con respecto a la secuencia de EE. UU. 2015 (MK965901.1). El gen que codifica la cápside presentó una homología del 97% a nivel de aminoácidos con la cepa GIII 2019 USA

(MK965900.1). El análisis filogenético basado en la región del gen de la cápside de PSaV mostró una agrupación con muestras de EE. UU. y China (Figura 8).

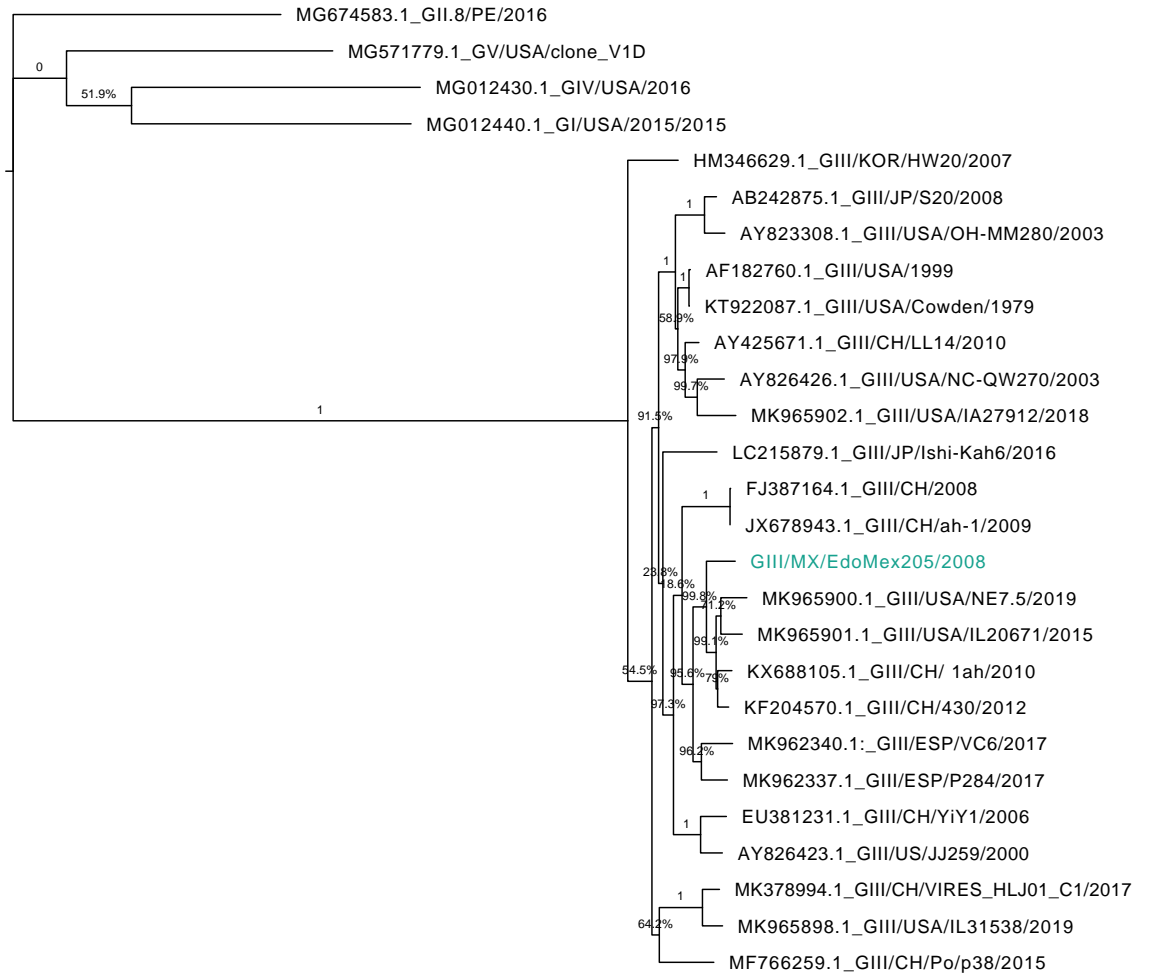


Figura 8. Árbol filogenético para la región que codifica la cápside del sapovirus porcino. El árbol se infirió usando el método de máxima verosimilitud y el modelo GTR con distribución gamma y soporte de rama similar a sh usando el software phymI v3.3.21. La secuencia obtenida en este estudio está marcada en color.

2.7.5 Aislamiento viral

Después de la infección en células VERO con inóculo positivo a PKV, se observó un efecto citopático 3 a 4 días después de la infección (p.i.) consistiendo principalmente en muerte y pérdida de la morfología celular. Después de cada recolección viral, el ARN de PKV se detectó consistentemente en dos aislamientos después de 9 pases. No se detectó ARN de coronavirus porcino en las células o sobrenadantes en pases en cultivo celular mediante la prueba de RT-PCR, y no se observó fusión celular ni sincitios característicos de la replicación de coronavirus porcino en los cultivos (Figura 9).

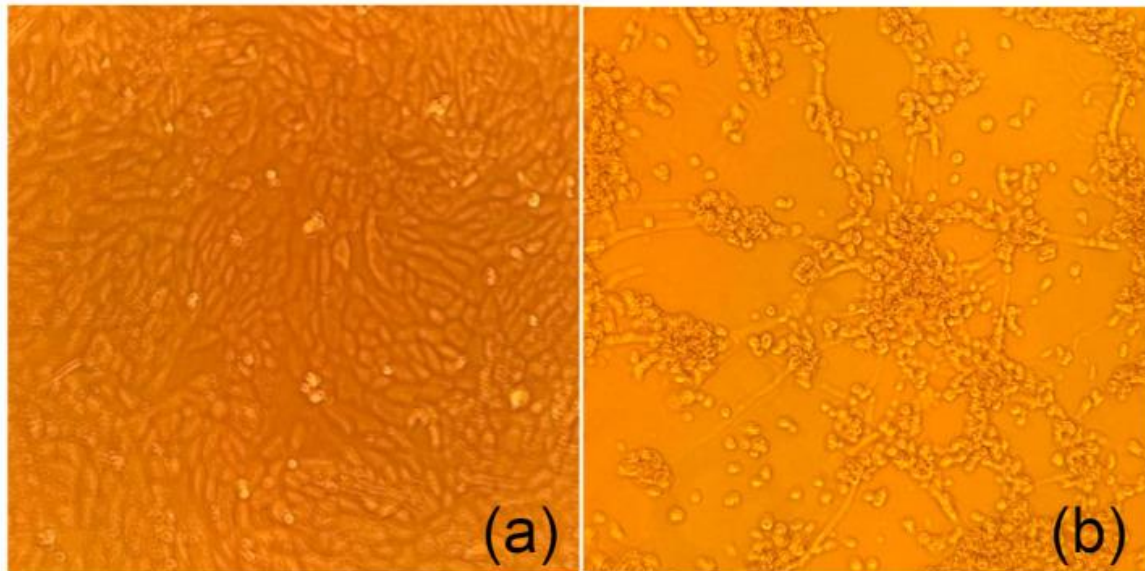


Figura 9. Efecto citopático observado en cultivo celular después de la infección con el PKV 5 días post-infección. A) células VERO sin infectar b) células VERO infectadas con el PKV en el pase 9.

2.8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Desde la introducción del PEDv en México en 2013, este ha convertido en uno de los principales agentes causantes de manifestaciones diarreicas en las producciones porcinas (Trujillo-Ortega et al., 2016). En el presente estudio fue posible identificar la coinfección de Coronavirus Porcino con PKV y PSaV en animales con diarrea severa. Aunque se identificó al PEDv como responsable de la mayoría de los brotes en las unidades de producción analizadas, pudimos identificar la presencia del PKV en la mayoría de estas granjas. Debido a la falta de reportes de estos virus relacionados a brotes de diarrea en México, estos no se habían considerado en las medidas de control y vigilancia en la granjas afectadas, por lo cual se desconoce la fecha aproximada de introducción de estos virus.

La presencia de ambos virus en piaras con signos clínicos similares podría indicar una alta asociación de la infección por el PKV con un cuadro diarreico, pero no necesariamente como el agente causal, ya que ninguna granja afectada fue únicamente positiva para PKV.

El PKV se ha detectado en cerdos con y sin signos clínicos (C. Wang et al., 2016), con la prevalencia más alta en lechones lactantes y un 40 % de positividad en lechones no diarreicos, según lo informado por Park, 2010 (S.-J. Park et al., 2010). Es posible que el PKV sea un patógeno oportunista en las gastroenteritis en cerdos cuando se produce una infección primaria por PEDv u otros patógenos; sin embargo, se desconocen los posibles efectos en el resultado de la enfermedad, los tiempos de recuperación y el aumento de peso diario en los animales supervivientes. Aunque la patogenia de la coinfección por PEDv y PKV sigue sin estar clara, Zhao et al 2016. informaron una mayor prevalencia de esta coinfección sobre la prevalencia de infecciones causadas únicamente por el PEDv en China, lo que podría indicar un posible mayor impacto y diseminación de los casos de coinfección (Zhao et al., 2016). Estos resultados coinciden con lo reportado por Wang et al en 2016 (C. Wang et al., 2016) quienes describen una prevalencia de 59.6% para la coinfección entre el PKV y el PEDv.

Aunque la única granja positiva para Deltacoronavirus en este estudio fue negativa para coinfecciones del PEDv con el PKV, las consecuencias de la coinfección entre PEDv y PDCoV resultó en una eliminación fecal de ambos virus más prolongada y con títulos virales más altos que en aquellos cerdos inoculados únicamente con uno de los dos virus (Saengchuto et al., 2021), así como una mayor expresión de citosinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α); estos resultados resaltan la importancia de investigar la prevalencia de estas interacciones entre miembros de la familia *Coronaviridae* así como con otros virus.

La clasificación taxonómica de los contigs ensamblados informó la presencia de miembros de las familias *Coronaviridae*, *Picornaviridae* y *Caliciviridae* en la muestra 205H. Sin embargo, no fue posible ensamblar genomas completos para PKV en la muestra 103H, ni tampoco no se detectó PSaV. La diferencia en los patógenos detectados puede derivar de la disparidad en la eficiencia de la secuenciación, ya que ambos animales se alojaban en la misma área. Análisis adicionales detectaron la presencia de virus ambientales coherentes con el tipo de muestra utilizada, probablemente originados en el contenido intestinal digerido. Este es el primer reporte del genoma completo y aislamiento del Kobuvirus Porcino en México, así como el primer análisis filogenético del PSaV porcino en el país. Estos resultados muestran la necesidad de realizar estudios con mayor número de muestras a lo largo del territorio nacional para estimar la prevalencia del PKV y el PSaV en unidades de producción porcina y las implicaciones clínicas de estas interacciones.

Durante un brote activo en una unidad de producción, el diagnóstico se restringe a una pequeña variedad de agentes ya identificados en la región geográfica; por lo tanto, es probable que los agentes más prevalentes como el PEDv, se investiguen y controlen, dejando sin diagnosticar posibles infecciones secundarias lo que podría generar complicaciones, en particular para el control basado en la inoculación por 'feedback'. Si bien la implementación de la metagenómica viral como una herramienta de diagnóstico regular podría ser

prohibitiva para la mayoría de las granjas debido a su costo, un análisis de NGS de muestras representativas de los animales de la región podría proporcionar una mejor perspectiva y comprensión de los virus y otros patógenos circulantes.

La publicación de los resultados obtenidos en este estudio se realizó en la revista “Viruses” en el año 2021 y se encuentra anexo al final de este documento como Anexo 1.

Capítulo 2

Mutaciones intrahospedero en el gen S del Virus de Diarrea Epidémica Porcina en cerdos infectados naturalmente

3.1 ANTECEDENTES

Estudios sugieren que los virus forman una población heterogénea durante una infección y que estas poblaciones varían genéticamente entre ellas. Se han encontrado secuencias distintas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y el virus de Hepatitis C entre diferentes compartimentos de tejidos o tipos celulares (Fulcher et al., 2004; Gismondi et al., 2013). En Coronavirus, el surgimiento del Coronavirus Respiratorio Porcino (PRCV) se ha asociado a una mutación de TGEV que provocó cambios en el tropismo viral a través de deleciones en el gen S. Durante una infección por PEDv, los enterocitos se consideran las principales células diana del virus, sin embargo, estudios donde se reporta la presencia de ARN viral en otros órganos, han demostrado la infección fuera del tracto gastrointestinal. Secuencias virales obtenidas de macrófagos alveolares han revelado mutaciones en el gen S que no se observaron en las poblaciones virales obtenidas de tejido intestinal, también, se han reportado variantes de PEDv que contienen deleciones en el gen S coexistiendo con virus de genoma completo en la misma muestra intestinal (Diep et al., 2017).

3.2 JUSTIFICACIÓN

En México, el surgimiento de rebrotes de la PED en poblaciones de cerdos inmunizadas sugiere una variabilidad genética del virus circulante en el país. Estudios sugieren que los virus forman poblaciones que pueden estar compartimentalizadas en los diferentes órganos y tejidos, no obstante, se ha generado poca información relacionada a la variabilidad intrahospedero en *Alphacoronavirus* Porcino. La existencia de poblaciones virales heterogéneas y compartimentalizadas que alberguen mutaciones en el gen S viral, podrían ser un mecanismo contribuyente a variabilidad antigénica, patogenicidad, cambios en el tropismo, evasión del sistema inmune y la adaptación viral *in vitro*

3.3 HIPÓTESIS

Las secuencias virales obtenidas a partir de los diferentes órganos positivos a PEDv contendrán mutaciones en el gen S que podrán relacionarse con los tejidos de origen.

3.4 OBJETIVO GENERAL

Identificar las mutaciones presentes en el gen S del Coronavirus Porcino obtenido a partir de diferentes órganos de animales naturalmente infectados, por medio de la secuenciación por el método de Sanger y análisis comparativos de las secuencias obtenidas.

3.5 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Identificar la presencia de PEDv en órganos provenientes de cerdos naturalmente infectados por medio de RT-PCR
2. Amplificar el gen S del Coronavirus Porcino en su totalidad
3. Purificar los amplicones obtenidos por peso molecular
4. Analizar la existencia de variaciones en el gen S presentes en tejidos de cerdos naturalmente infectados en secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación Sanger del gen S y utilizando diferentes herramientas bioinformáticas.

3.6 MATERIAL Y MÉTODOS

3.6.1 Recolección de Muestras

Se analizaron muestras de Intestino, estómago, pulmón, hígado, bazo, tonsilas, linfonodos inguinales y riñón provenientes de 5 cerdos naturalmente infectados por el PEDv durante un brote en el Estado de México en 2018. Estas muestras formaban parte del banco de muestras perteneciente al laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

3.6.2 Análisis molecular por RT-PCR

Para el monitoreo del aislamiento en cultivo celular se usó el protocolo de RT-PCR en tiempo real reportado por la Universidad de Minnesota Veterinary Diagnostic Lab en el termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher, USA). Los iniciadores utilizados se describen en el cuadro 5.

Cuadro 5: Iniciadores y sonda usados en el protocolo para PCR.	
N gene qRT-PCR	
PED_N_Forward-941	GAA TTC CCA AGG GCG AAA AT
PED_N_probe-963, FAM-BHQ	CGT AGC AGC TTG CTT CGG ACC CA
PED_N_Reverse-1028	TTT TCG ACA AAT TCC GCA TCT

3.6.3 Secuenciación del gen S de PEDv.

La secuenciación de la totalidad del gen S del virus se realizó mediante amplificación del gen usando un juego de cinco pares de iniciadores reportados por Diep et al., 2017 y su posterior secuenciación por el método Sanger. Los amplicones obtenidos fueron purificados usando el sistema de electroforesis E-gel de Invitrogen y enviados al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM para su secuenciación por el método de Sanger.

3.6.4 Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias completas del gen S fueron alineadas con secuencias

de referencia usando el algoritmo MAFFT, la homología entre las secuencias de nucleótidos y aminoácidos fue analizada usando Mega 7 (Molecular Evolutionary Analysis software). Los análisis filogenéticos fueron realizados por el método de máxima similitud bajo el modelo Tamura-Nei usando el software Mega 7.

3.7 RESULTADOS

3.7.1 Procesamiento y análisis molecular

Se evaluó la presencia de genoma viral en muestras de diferentes tejidos extra intestinales. En tres de los animales (103H, 205H y 604M) el genoma fue detectado en: intestino, estómago, pulmón, bazo, tonsilas, linfonodos inguinales y riñón en tres de los animales, mientras que dos cerdos destetados lo presentaron únicamente en el tracto gastrointestinal (Cuadro 6).

Cuadro 6: Análisis de RT-PCR para detección de gen N de PEDv en tejidos de animales naturalmente infectados.								
ID	Intestino	Riñón	Tonsila	Pulmón	Hígado	Estómago	L. Ing.	Bazo
205H	+	+	+	+	-	+	+	+
103H	+	+	+	+	-	+	+	+
604M	+	+	+	+	-	+	+	+
C1	+	-	+	+	-	+	-	+
C2	+	-	-	-	-	+	-	-

3.7.2 Secuenciación del gen S de PEDv

Con el fin de establecer el protocolo descrito por Diep et al 2017 para secuenciación, este se estandarizó usando muestras de intestino positivo proveniente del brote ocurrido en 2018 en Jilotepec, Estado de México. El análisis filogenético de estas secuencias mostró que el brote ocurrido en Estado de México en 2018 fue provocado por un PEDv genotipo 2b (Figura 10), teniendo las secuencias 103H y 205H una similitud de 99.66% y 99.38% respectivamente sobre el gen S de la secuencia reportada por Lara-Romero et al. proveniente de Jalisco en 2017 (número de acceso: MH004420.1).

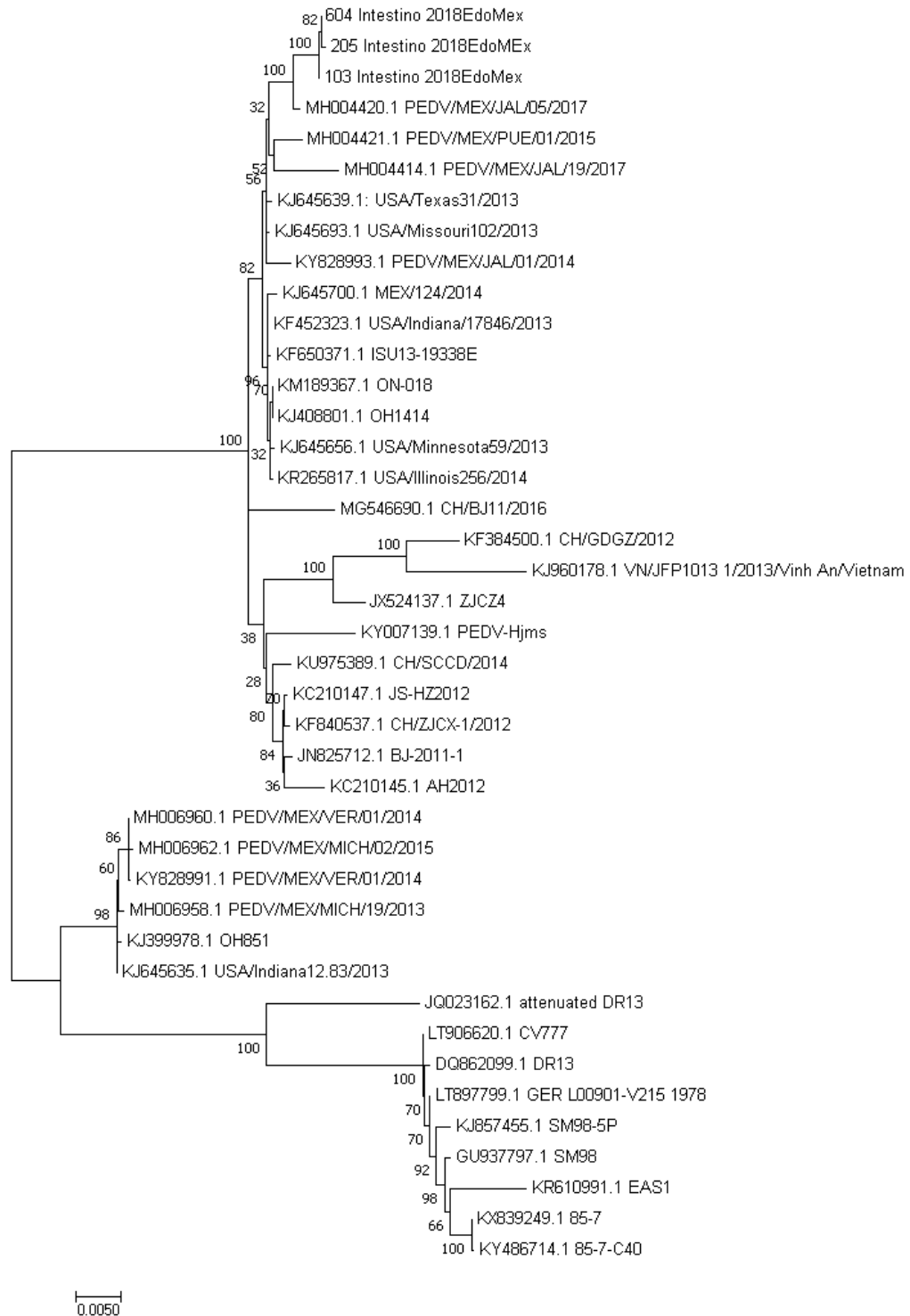


Figura 10. Análisis filogenético construido con el método de Máxima Similitud de las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen S a partir de un brote en cerdos en el Estado de

México en el 2018. Árbol basado en el modelo Tamura-Nei y distribución Gamma con 100 repeticiones de bootstraps construido con el software MEGA7.

3.7.3 Análisis de secuencias virales extraintestinales

Las secuencias virales obtenidas a partir de tejidos extraintestinales presentaron diferencias puntuales, cambios en aminoácidos y deleciones en el gen S al compararlas con las secuencias obtenidas del intestino del mismo animal. En total se encontró evidencia de dos secuencias con deleciones de 396nt y 612nt de longitud en intestino y una de 186nt en tonsila. El animal con identificación 103H mostró una variabilidad mayor que el resto de los animales. Los porcentajes de similitud a nivel de nucleótidos para el animal 103H se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7: Los porcentajes de similitud pareada a nivel de nucleótidos de secuencias obtenidas a partir del animal 103H sin consideración de gaps. * Secuencia de tonsila con deleción							
	Intestino	Pulmón	Bazo	Riñón	Tonsila	Tonsila_del *	LN_103
Intestino_103	100%	99.95%	100.00%	99.81%	99.78%	99.81%	99.88%
Pulmón_103	99.95%	100%	99.95%	99.90%	99.93%	99.81%	99.90%
Bazo_103	100.00%	99.95%	100%	99.95%	99.90%	99.81%	99.90%
Riñón_103	99.81%	99.90%	99.95%	100%	99.78%	99.78%	99.90%
Tonsila_103	99.78%	99.93%	99.90%	99.78%	100%	99.83%	99.78%
Tonsila_del_103*	99.81%	99.81%	99.81%	99.78%	99.83%	100%	99.69%
LN_103	99.88%	99.90%	99.90%	99.90%	99.78%	99.69%	100%

Para el animal 103H se observó la presencia de una secuencia con una deleción de 62 aa (186nt) en el genoma viral obtenido de una muestra de tonsila, la cual comienza desde la posición 586 aa de la proteína S, esta misma secuencia también presenta un cambio puntual que produce un cambio no sinónimo en la posición 698 de la proteína (S698F).

3.8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Para determinar el alcance de la variación intrahospedero del Virus de la Diarrea Epidémica Porcina durante una infección, primero se buscó el genoma viral en órganos fuera del tracto gastrointestinal, se detectó la presencia del virus en pulmón, bazo, tonsilas, linfonodos inguinales y riñón en los lechones en el área de maternidad, es importante mencionar que los dos animales en los cuales no se detectó genoma viral en tejidos extra-intestinales eran animales destetados que se albergaban en un área separada del resto de los cerdos analizados y presentaban un cuadro clínico menos severo lo que puede reflejar una etapa más temprana de la infección y por lo tanto, menor distribución viral.

El análisis de secuenciación indicó que las poblaciones virales encontradas en un mismo animal mostraban diversidad genética en sus genes S. Comparadas con las secuencias obtenidas a partir de intestino, la mayoría de las secuencias extraintestinales no presentaron cambios a nivel de aminoácidos a excepción de aquellas obtenidas de riñón y tonsilas. Al examinar el gen de la proteína Spike (S) obtenido en tonsilas, se identificaron variantes con deleciones y que coexistían con virus de gen S completo, esta deleción se encuentra dentro del dominio COE, una región identificada por Chang et al. 2019 (Chang et al., 2019) como inductora de anticuerpos neutralizantes y la cual ha sido detectada como una de las regiones más variables del gen S. Estas variantes no han sido reportadas para virus obtenido de tonsila, sin embargo, Diep et 2017 observaron mutaciones en esta misma región en virus obtenido directamente de pulmones e intestinos que también coincidían con virus completos (Diep et al., 2017; Van Diep et al., 2020). Aunque hay poca información sobre las consecuencias de estas mutaciones sobre el desempeño viral, los reportes antes mencionados han comprobado la infectividad en cultivo celular de virus con deleciones en el gen S; es posible que la deleción encontrada en este estudio tenga un papel en la evasión de la respuesta inmune debido a la relación del dominio COE con la generación de anticuerpos; en esta

región también se identificó el sitio de unión a Aminopeptidasa N (APN, a.a. 477–629), aunque los reportes de infección en células que no expresan APN indican que cambios en esta región no se traducen en un cambio en el tropismo (W. Li, van Kuppeveld, He, Rottier, & Bosch, 2016).

Otro de los cambios a nivel de proteína que se encontraron fue en la región N-terminal S1, sitio que fue identificado por Li et al 2016 (W. Li et al., 2016) como la región de unión al ácido siálico y un factor favorecedor de la entrada del virus a la célula; en estudios realizados con el TGEv identificaron deleciones y mutaciones puntuales en la región N-terminal del gen S en cepas atenuadas (Sanchez, Pascual-Iglesias, Sola, Zuñiga, & Enjuanes, 2019). El PRCoV es resultado de una mutación natural de TGEv que carece de tropismo entérico y contiene una deleción en esta misma región. Estos reportes resaltan la importancia de la región N-terminal del gen S sobre la virulencia y cambios de tropismo viral.

La presencia de variantes en un mismo hospedero ha sido reportada para otros Coronavirus como SARS-CoV2 MERS-CoV, TGEv, PEDv y Coronavirus HKU15 en cerdos, y FCoV en gatos, entre otros (Borucki et al., 2016; Hora et al., 2013; Y. Wang et al., 2021; Woo et al., 2017). Los resultados de este estudio mostraron la heterogeneidad intrahospedero de PEDv, así como una posible variante de evasión; aún se requieren más estudios para comprender completamente la variabilidad genética del virus relacionada a los tejidos de origen y los posibles efectos sobre mecanismo de infección por PEDv y su patogenia, al igual que los mecanismos exactos de las dinámicas dentro de la población viral intrahospedero.

Discusión General

En el presente trabajo se exploraron aspectos sobre la variabilidad viral presente en infecciones naturales, primero, explorando la diversidad de especies virales que podrían existir dentro de un cuadro infeccioso; el segundo aspecto fue investigar la variación presente dentro de una población viral y la posible compartimentalización ocurrida dentro los diferentes órganos infectados. Es posible que la dinámica viral y las interacciones entre poblaciones virales tengan un efecto sobre la patogenicidad que podría pasar desapercibida dentro de un contexto de producción o asumirse como un aumento de virulencia del virus reconocido como el agente causal, cuando en realidad es resultado de una sinergia entre poblaciones virales.

El uso de herramientas como la secuenciación de siguiente generación (NGS) son un instrumento valioso para la exploración de las poblaciones dentro del hospedero durante una infección, sin embargo, el seguimiento de los hallazgos usando técnicas *in vivo* es necesario para realmente reconocer los cambios y efectos de las poblaciones en el desempeño viral y virulencia, ya que el conocimiento que tenemos actualmente sobre los mecanismos de patogenicidad de PEDv aún es escaso, más aún durante una co-infección.

Conclusión General

Se detectó la presencia de dos agentes patógenos diferentes en muestras intestinales de cerdos positivos a PEDv y que presentaban como signología clínica: diarrea, vómito y deshidratación. Los resultados del análisis metagenómico mostraron la identificación de patógenos porcinos clasificados en las familias *Coronaviridae*, *Picornaviridae* y *Caliciviridae*, los cuales también son reconocidos como agentes causales de cuadros diarreicos individualmente; También se detectaron otros agentes virales de las familias *Tospoviridae*, *Bromoviridae* y *Marseilleviridae*.

Se lograron ensamblar genomas completos de Coronavirus y Kobuvirus Porcino. El análisis de las secuencias mostró asociación de los PKV y PSaV con muestras de USA y China. Esta asociación también es observada en las secuencias de PEDv, las cuales se ubican en el clúster formado por el genotipo 2b, no-INDEL.

Las secuencias obtenidas se cargaron en la base de datos GenBank: MT490315 (103H), MT490316 (205H) para PEDv, y MT211964.1 y MT490315.1 para el PKV.

Se confirmó la variación en secuencias de Coronavirus porcino obtenidas de diferentes órganos del mismo animal, estas mutaciones se encontraban sobre el gen S y principalmente dentro del extremo N-terminal de la región S1 de virus obtenidos en riñón y tonsila, la cual, además, presentó una delección de 62aa co-existiendo con virus de gen S completo. También se encontraron secuencias con delecciones en muestras de intestino de 396nt y 612nt de longitud.



Article

Molecular Detection and Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Porcine Aichivirus C Coinfection in México

Montserrat-Emeli García-Hernández ¹, María-Elena Trujillo-Ortega ², Sofía-Lizeth Alcaraz-Estrada ³, Luis Lozano-Aguirre-Beltrán ⁴, Carlos Sandoval-Jaime ⁵, Blanca Itzel Taboada-Ramírez ⁵ and Rosa-Elena Sarmiento-Silva ^{1,*}



Citation: García-Hernández, M.-E.; Trujillo-Ortega, M.-E.; Alcaraz-Estrada, S.-L.; Lozano-Aguirre-Beltrán, L.; Sandoval-Jaime, C.; Taboada-Ramírez, B.I.; Sarmiento-Silva, R.-E. Molecular Detection and Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Porcine Aichivirus C Coinfection in México. *Viruses* **2021**, *13*, 738. <https://doi.org/10.3390/v13050738>

Academic Editors: Douglas Gladue, Fernando Rodriguez and Manuel Borca

Received: 17 March 2021
Accepted: 14 April 2021
Published: 23 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Av.

Universidad #3000, Ciudad de México 04510, Mexico; elemi.gh@gmail.com

² Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Av. Universidad #3000, Ciudad de México 04510, Mexico; elenam@unam.mx

³ División de Medicina Genómica y Genética Clínica, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, Av. Félix Cuevas #540, Ciudad de México 03100, Mexico; sofia.alcaraz@issste.gob.mx

⁴ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca 62209, Mexico; llozano@ccg.unam.mx

⁵ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca 62209, Mexico; carlossj@ibt.unam.mx (C.S.-J.); btaboada@ibt.unam.mx (B.I.T.-R.)

* Correspondence: rosass@unam.mx; Tel.: +55-56225900 (ext. 33)

Abstract: Swine enteric viral infections are responsible for substantial economic losses in the pork industry worldwide. Porcine epidemic diarrhea (PEDV) is one of the main causative agents of diarrhea in lactating pigs, and reports of PEDV coinfection with other enteric viruses highlight the importance of viral interactions for disease presentation and outcomes. Using next-generation sequencing (NGS) and sequence analyses from samples taken from piglets with acute diarrhea, we explored the possible interactions between PEDV and other less reported pathogens. PEDV coinfection with porcine kobuvirus (PKV) was detected in 36.4% (27/74) of samples. Full genomes from porcine coronavirus and kobuvirus were obtained, as was a partial porcine sapovirus genome (PSaV). The phylogenetic results show the clustering of these strains corresponding to the geographical relationship. To our knowledge, this is the first full genome and isolation report for porcine kobuvirus in México, as well as the first phylogenetic analysis for porcine sapovirus in the country. The NGS approach provides a better perspective of circulating viruses and other pathogens in affected production units.

Keywords: porcine diarrhea; kobuvirus; coinfection

1. Introduction

Diarrheic diseases in swine have strong economic impacts on production units around the world. In recent years, porcine coronaviruses have represented some of the principal causes of these diseases; however, reports of naturally occurring coinfection of coronaviruses with other viral agents highlight the importance of less characterized viruses on disease severity and outcome [1,2].

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) induces an enteric disease with high mortality rates in suckling piglets characterized by acute diarrhea and severe dehydration. It was first identified in Europe in 1978 and in Asia in 1982. Since then, PEDV has had a great impact on the Asian swine industry. In May 2013, the presence of PEDV was reported in México along with the United States and Canada, resulting in heavy economic losses for the swine production units [3,4].

PEDV is a member of the *Coronaviridae* family, subfamily *Orthocoronavirinae*, and genus *Alphacoronavirus* and is an enveloped virus approximately 120 nm in diameter with a

Referencias

- Alonso, C., Goede, D. P., Morrison, R. B., Davies, P. R., Rovira, A., Marthaler, D. G., & Torremorell, M. (2014). Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Veterinary Research*, *45*(1), 73. <https://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1744488495124325>
- Amador, J. (2015, February). Efectos económicos de la Diarrea Epidémica (PED) en México. Retrieved from <https://www.porcicultura.com/destacado/Efectos-economicos-de-la-Diarrea-Epidemica-%28PED%29-en-Mexico>
- Arguello, H., de Nova, P. J. G., Rubio, P., & Carvajal, A. (2016). Diarrea epidémica porcina: nuevos desafíos de una vieja conocida. *SUIS*, *130*, 12–19.
- Bae, J. L., Lee, J. G., Kang, T. J., Jang, H. S., Jang, Y. S., & Yang, M. S. (2003). Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine*, *21*(25–26), 4052–4058. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00360-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00360-8)
- Beall, A., Yount, B., Lin, C.-M., Hou, Y., Wang, Q., Saif, L., & Baric, R. (2016). Characterization of a Pathogenic Full-Length cDNA Clone and Transmission Model for Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain PC22A. *MBio*, *7*(1), e01451-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01451-15>
- Bergmann, C. C., & Silverman, R. H. (2020). COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, *87*(6), 321–327. <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.20047>
- Boniotti, M. B., Papetti, A., Lavazza, A., Alborali, G., Sozzi, E., Chiapponi, C., ... Marthaler, D. (2016). Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric coronavirus, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(1), 83–87. <https://doi.org/10.3201/eid2201.150544>
- Borucki, M. K., Lao, V., Hwang, M., Gardner, S., Adney, D., Munster, V., ... Allen, J. E. (2016). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Intra-Host Populations Are Characterized by Numerous High Frequency Variants. *PLOS ONE*, *11*(1), e0146251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146251>
- Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M., & Rottier, P. J. M. (2003). The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *Journal of Virology*, *77*(16), 8801–8811. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>
- Cai, Y., Yin, W., Zhou, Y., Li, B., Ai, L., Pan, M., & Guo, W. (2016). Molecular detection of Porcine astrovirus in Sichuan Province, China. *Virology Journal*, *13*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0462-6>
- Chang, C.-Y., Cheng, I.-C., Chang, Y.-C., Tsai, P.-S., Lai, S.-Y., Huang, Y.-L., ... Chang, H.-W. (2019). Identification of Neutralizing Monoclonal Antibodies Targeting Novel Conformational Epitopes of the Porcine Epidemic Diarrhoea Virus Spike Protein. *Scientific Reports*, *9*(1), 2529. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39844-5>
- Chen, F., Knutson, T. P., Rossow, S., Saif, L. J., & Marthaler, D. G. (2019). Decline of transmissible gastroenteritis virus and its complex evolutionary relationship with porcine respiratory coronavirus in the United States. *Scientific Reports*, *9*(1), 3953. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40564-z>
- Chen, Q., Wang, L., Zheng, Y., Zhang, J., Guo, B., Yoon, K.-J., ... Li, G. (2018). Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. *Virology Journal*, *15*(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12985->

018-1001-z

- Clement, T., Singrey, A., Lawson, S., Okda, F., Nelson, J., Diel, D., ... Christopher-Hennings, J. (2016). Measurement of neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus in sow serum, colostrum, and milk samples and in piglet serum samples after feedback. *Journal of Swine Health and Production*, 24(3), 147–153. Retrieved from <http://www.aasv.org>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- de Arriba, M. ., Carvajal, A., Pozo, J., & Rubio, P. (2002). Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85(1–2), 85–97. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00417-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00417-2)
- de Groot, R., Baker, S., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A., Holmes, K., ... Ziebuhr, J. (2012). Coronaviridae. In *Virus Taxonomy* (pp. 806–828). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00068-9>
- Dee, S., Clement, T., Schelkopf, A., Nerem, J., Knudsen, D., Christopher-Hennings, J., & Nelson, E. (2014). An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naive pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept. *BMC Vet Res*, 10(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0176-9>
- Diep, N. Van, Norimine, J., Sueyoshi, M., Lan, N. T., & Yamaguchi, R. (2017). Novel Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Variants with Large Deletions in the Spike (S) Gene Coexist with PEDV Strains Possessing an Intact S Gene in Domestic Pigs in Japan: A New Disease Situation. *PLOS ONE*, 12(1), e0170126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170126>
- Ding, Z., Fang, L., Jing, H., Zeng, S., Wang, D., Liu, L., ... Xiao, S. (2014). Porcine Epidemic Diarrhea Virus Nucleocapsid Protein Antagonizes Beta Interferon Production by Sequestering the Interaction between IRF3 and TBK1. *Journal of Virology*, 88(16), 8936–8945. <https://doi.org/10.1128/JVI.00700-14>
- Dong, N., Fang, L., Zeng, S., Sun, Q., Chen, H., & Xiao, S. (2015). Porcine Deltacoronavirus in Mainland China. *Emerging Infectious Diseases*, 21(12), 2254–2255. <https://doi.org/10.3201/eid2112.150283>
- Feng, Y., Xu, Z., & Zhu, L. (2020). Prevalence and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Sichuan province, China. *Archives of Virology*, 165(12), 2883–2889. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04796-z>
- Fulcher, J. A., Hwangbo, Y., Zioni, R., Nickle, D., Lin, X., Heath, L., ... Zhu, T. (2004). Compartmentalization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 between Blood Monocytes and CD4 + T Cells during Infection. *Journal of Virology*, 78(15), 7883–7893. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.7883-7893.2004>
- Gismondì, M. I., Díaz Carrasco, J. M., Valva, P., Becker, P. D., Guzmán, C. A., Campos, R. H., & Preciado, M. V. (2013). Dynamic changes in viral population structure and compartmentalization during chronic hepatitis C virus infection in children. *Virology*, 447(1–2), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.09.002>
- Goede, D., Murtaugh, M. P., Nerem, J., Yeske, P., Rossow, K., & Morrison, R. (2015). Previous infection of sows with a “mild” strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a “severe” strain. *Veterinary Microbiology*, 176(1–2), 161–164. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.12.019>
- Gong, L., Li, J., Zhou, Q., Xu, Z., Chen, L., Zhang, Y., ... Cao, Y. (2017). A New Bat-HKU2–like Coronavirus in Swine, China, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), 1607–1609.

- <https://doi.org/10.3201/eid2309.170915>
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., & Gascuel, O. (2005). PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research*, *33*(Web Server), W557–W559. <https://doi.org/10.1093/nar/gki352>
- Guo, Z., Ruan, H., Qiao, S., Deng, R., & Zhang, G. (2020). Co-infection status of porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in pigs with watery diarrhea in Henan province, central China. *Microbial Pathogenesis*, *142*, 104047. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104047>
- Hora, A. S., Asano, K. M., Guerra, J. M., Mesquita, R. G., Maiorka, P., Richtzenhain, L. J., & Brandão, P. E. (2013). Intrahost Diversity of Feline Coronavirus: A Consensus between the Circulating Virulent/Avirulent Strains and the Internal Mutation Hypotheses? *The Scientific World Journal*, *2013*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/572325>
- Hu, H., Jung, K., Vlasova, A. N., Chepngeno, J., Lu, Z., Wang, Q., & Saif, L. J. (2015). Isolation and Characterization of Porcine Deltacoronavirus from Pigs with Diarrhea in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(5), 1537–1548. <https://doi.org/10.1128/JCM.00031-15>
- Huang, Y., Dickerman, A. W., Piñeyro, P., Li, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., & Meng, X.-J. (2013). Origin, Evolution, and Genotyping of Emergent Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains in the United States. *MBio*, *4*(5), 1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00737-13>. Editor
- Jinghui, F., & Yijing, L. (2005). Cloning and Sequence Analysis of the M gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus LJB/03. *Virus Genes*, *30*(1), 69–73. <https://doi.org/10.1007/s11262-004-4583-z>
- Jung, K., Hu, H., Eyerly, B., Lu, Z., Chepngeno, J., & Saif, L. J. (2015). Pathogenicity of 2 Porcine Deltacoronavirus Strains in Gnotobiotic Pigs. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(4), 650–654. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141859>
- Jung, K., Kang, B.-K., Lee, C.-S., & Song, D.-S. (2008). Impact of porcine group A rotavirus co-infection on porcine epidemic diarrhea virus pathogenicity in piglets. *Research in Veterinary Science*, *84*(3), 502–506. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.07.004>
- Jung, K., & Saif, L. J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.017>
- Jung, K., Wang, Q., Scheuer, K. A., Lu, Z., Zhang, Y., & Saif, L. J. (2014). Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(4), 662–665. <https://doi.org/10.3201/eid2004.131685>
- KUSANAGI, K., KUWAHARA, H., KATOH, T., NUNOYA, T., ISHIKAWA, Y., SAMEJIMA, T., & TAJIMA, M. (1992). Isolation and Serial Propagation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Cell Cultures and Partial Characterization of the Isolate. *Journal of Veterinary Medical Science*, *54*(2), 313–318. <https://doi.org/10.1292/jvms.54.313>
- Kweon, C. H., Kwon, B. J., Jung, T. S., Kee, Y. J., Hur, D. H., Hwang, E. K., ... An, S. H. (1993). Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. *Korean J Vet Res*, *33*(2), 249–254.
- Langel, S. N., Paim, F. C., Lager, K. M., Vlasova, A. N., & Saif, L. J. (2016). Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Research*, *226*, 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.016>
- Lara-Romero, R., Gómez-Núñez, L., Cerriteño-Sánchez, J. L., Márquez-Valdelamar, L., Mendoza-Elvira, S., Ramírez-Mendoza, H., & Rivera-Benítez, J. F. (2018). Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013–2016. *Virus Genes*, *54*(2), 215–224. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1528-x>
- Lee, C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus.

- Virology Journal*, 12(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0421-2>
- Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127–128. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>
- Li, B. X., Ge, J. W., & Li, Y. J. (2007). Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, 365(1), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.031>
- Li, W., Li, H., Liu, Y., Pan, Y., Deng, F., Song, Y., ... He, Q. (2012). New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), 1350–1353. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120002>
- Li, W., Luo, R., He, Q., van Kuppeveld, F. J. M., Rottier, P. J. M., & Bosch, B.-J. (2017). Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry. *Virus Research*, 235(February), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.03.018>
- Li, W., van Kuppeveld, F. J. M., He, Q., Rottier, P. J. M., & Bosch, B.-J. (2016). Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Research*, 226, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.031>
- Li, Y., Wu, Q., Huang, L., Yuan, C., Wang, J., & Yang, Q. (2018). An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine. *Nature Communications*, 9(1), 3811. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06056-w>
- Li, Z.-L., Zhu, L., Ma, J.-Y., Zhou, Q.-F., Song, Y.-H., Sun, B.-L., ... Bee, Y.-Z. (2012). Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in south China. *Virus Genes*, 45(1), 181–185. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0735-8>
- Liu, C., Ma, Y., Yang, Y., Zheng, Y., Shang, J., Zhou, Y., ... Li, F. (2016). Cell Entry of Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Is Activated by Lysosomal Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(47), 24779–24786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.740746>
- Liu, X., Oka, T., & Wang, Q. (2015). Genomic characterization of a US porcine kobuvirus strain. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1139-7>
- Lowe, J., Gauger, P., Harmon, K., Zhang, J., Connor, J., Yeske, P., ... Main, R. (2014). Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 872–874. <https://doi.org/10.3201/eid2005.131628>
- Miller, L. C., Crawford, K. K., Lager, K. M., Kellner, S. G., & Brockmeier, S. L. (2016). Evaluation of two real-time polymerase chain reaction assays for Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) to assess PEDV transmission in growing pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(1), 20–29. <https://doi.org/10.1177/1040638715621949>
- Mora-Díaz, J. C., Piñeyro, P. E., Houston, E., Zimmerman, J., & Giménez-Lirola, L. G. (2019). Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(53). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00053>
- Oldham, J. (1972). Letter to the editor. *Pig Farming.*, 10, 72–73.
- Paarlberg, P. L. (2014). Updated Estimated Economic Welfare Impacts of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV). *Dept. of A, Dept. A*, 1–38. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.174517>
- Park, J.-E., & Shin, H.-J. (2014). Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages. *Virus Research*, 191, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.038>
- Park, S.-J., Kim, H.-K., Moon, H.-J., Song, D.-S., Rho, S.-M., Han, J.-Y., ... Park, B.-K. (2010). Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea. *Archives of Virology*, 155(11), 1803–1811. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0774-1>

- Park, S. J., Moon, H. J., Yang, J. S., Lee, C. S., Song, D. S., Kang, B. K., & Park, B. K. (2007). Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Genes*, 35(2), 321–332. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0096-x>
- Pensaert, M. B., & de Bouck, P. (1978). A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of Virology*, 58(3), 243–247. <https://doi.org/10.1007/BF01317606>
- Reveles-Félix, S., Carreón-Nápoles, R., Mendoza-Elvira, S., Quintero-Ramírez, V., García-Sánchez, J., Martínez-Bautista, R., ... Sánchez-Betancourt, J. I. (2020). Emerging strains of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in Mexico. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(2), 1035–1041. <https://doi.org/10.1111/tbed.13426>
- Saeng-chuto, K., Madapong, A., Kaeoket, K., Piñeyro, P. E., Tantituvanont, A., & Nilubol, D. (2021). Coinfection of porcine deltacoronavirus and porcine epidemic diarrhea virus increases disease severity, cell tropism and earlier upregulation of IFN- α and IL12. *Scientific Reports*, 11(1), 3040. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82738-8>
- Sanchez, C. M., Pascual-Iglesias, A., Sola, I., Zuñiga, S., & Enjuanes, L. (2019). Minimum Determinants of Transmissible Gastroenteritis Virus Enteric Tropism Are Located in the N-Terminus of Spike Protein. *Pathogens*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010002>
- Sánchez, J. A., & Carrera, V. (2017). Estrategias actuales para el control de la Diarrea Epidémica porcina en México. Retrieved from <https://www.porcicultura.com/destacado/Estrategias-actuales-para-el-control-de-la-Diarrea-Epidémica-porcina-en-México>
- Shirato, K., Matsuyama, S., Ujike, M., & Taguchi, F. (2011). Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *Journal of Virology*, 85(15), 7872–7880. <https://doi.org/10.1128/JVI.00464-11>
- Si, F., Chen, B., Hu, X., Yu, R., Dong, S., Wang, R., & Li, Z. (2020). Porcine Epidemic Diarrhea Virus ORF3 Protein Is Transported through the Exocytic Pathway. *Journal of Virology*, 94(17). <https://doi.org/10.1128/JVI.00808-20>
- Sisay, Z., Wang, Q., Oka, T., & Saif, L. (2013). Prevalence and molecular characterization of porcine enteric caliciviruses and first detection of porcine kobuviruses in US swine. *Archives of Virology*, 158(7), 1583–1588. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1619-5>
- Song, D., Moon, H., & Kang, B. (2015). Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 4(2), 166. <https://doi.org/10.7774/cevr.2015.4.2.166>
- Song, D., & Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44(2), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0713-1>
- Song, D. S., Oh, J. S., Kang, B. K., Yang, J. S., Moon, H. J., Yoo, H. S., ... Park, B. K. (2007). Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Research in Veterinary Science*, 82(1), 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.03.007>
- Su, M., Li, C., Qi, S., Yang, D., Jiang, N., Yin, B., ... Sun, D. (2020). A molecular epidemiological investigation of PEDV in China: Characterization of co-infection and genetic diversity of S1-based genes. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3), 1129–1140. <https://doi.org/10.1111/tbed.13439>
- Sun, D., Feng, L., Shi, H., Chen, J., Cui, X., Chen, H., ... Tong, G. (2008). Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Veterinary Microbiology*, 131(1–2), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.022>
- Trujillo-Ortega, M. E., Beltrán-Figueroa, R., García-Hernández, M. E., Juárez-Ramírez, M., Sotomayor-González, A., Hernández-Villegas, E. N., ... Sarmiento-Silva, R. E. (2016). Isolation and

- characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0763-z>
- Van Diep, N., Chojookhuu, N., Fuke, N., Myint, O., Izzati, U. Z., Suwanruengsri, M., ... Yamaguchi, R. (2020). New tropisms of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in pigs naturally coinfecting by variants bearing large deletions in the spike (S) protein and PEDVs possessing an intact S protein. *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1111/tbed.13607>
- Vlasova, A. N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M. R., Rossow, K. D., Rovira, A., ... Saif, L. J. (2014). Distinct characteristics and complex evolution of pedv strains, North America, May 2013–February 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1620–1628. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140491>
- Vu, T. T. H., Yeom, M., Moon, H., Tran, T. N., Le, V. P., & Song, D. (2021). Characteristics and Pathogenicity of the Cell-Adapted Attenuated Porcine Epidemic Diarrhea Virus of the Non-S INDEL Cluster. *Pathogens*, 10(11), 1479. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111479>
- Wang, C., Lan, X., & Yang, B. (2016). Molecular Epidemiological Investigation of Porcine kobuvirus and Its Coinfection Rate with PEDV and SaV in Northwest China. *BioMed Research International*, 2016, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/7590569>
- Wang, J., Zhao, P., Guo, L., Liu, Y., Du, Y., Ren, S., ... Wu, J. (2013). Porcine Epidemic Diarrhea Virus Variants with High Pathogenicity, China. *Emerging Infectious Diseases*, 19(12), 2048–2049. <https://doi.org/10.3201/eid1912.121088>
- Wang, L., Byrum, B., & Zhang, Y. (2014). New Variant of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5), 917–919. <https://doi.org/10.3201/eid2005.140195>
- Wang, Q., Vlasova, A. N., Kenney, S. P., & Saif, L. J. (2019). Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Current Opinion in Virology*, 34, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.001>
- Wang, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, W., Zhang, Z., Chen, W., ... Zhao, J. (2021). Intra-host variation and evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 populations in COVID-19 patients. *Genome Medicine*, 13(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00847-5>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K., Tsang, C.-C., Lau, C. C. Y., Wong, P.-C., Chow, F. W. N., ... Yuen, K.-Y. (2017). Coronavirus HKU15 in respiratory tract of pigs and first discovery of coronavirus quasispecies in 5'-untranslated region. *Emerging Microbes & Infections*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.37>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- XU, X. G., ZHANG, H. L., ZHANG, Q., DONG, J., HUANG, Y., & TONG, D. W. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells. *Acta Virologica*, 59(03), 265–275. https://doi.org/10.4149/av_2015_03_265
- Xu, X., Zhang, H., Zhang, Q., Dong, J., Liang, Y., Huang, Y., ... Tong, D. (2013). Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression. *Virology Journal*, 10(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-26>
- Zhang, F., Luo, S., Gu, J., Li, Z., Li, K., Yuan, W., ... Tang, Y. (2019). Prevalence and phylogenetic analysis of porcine diarrhea associated viruses in southern China from 2012 to 2018. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 470. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2212-2>
- Zhang, X., Hasoksuz, M., Spiro, D., Halpin, R., Wang, S., Vlasova, A., ... Saif, L. J. (2007). Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and

- genetic changes after tissue culture adaptation. *Virology*, 363(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.018>
- Zhao, Z. P., Yang, Z., Lin, W. D., Wang, W. Y., Yang, J., Jin, W. J., & Qin, A. J. (2016). The rate of co-infection for piglet diarrhea viruses in China and the genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus and porcine kobuvirus. *Acta Virologica*. https://doi.org/10.4149/av_2016_01_55
- Zou, D., Xu, J., Duan, X., Xu, X., Li, P., Cheng, L., ... Cao, H. (2019). Porcine epidemic diarrhea virus ORF3 protein causes endoplasmic reticulum stress to facilitate autophagy. *Veterinary Microbiology*, 235, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.005>