

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTILÁN

**“Evaluación de diferentes protocolos de diagnóstico molecular para el virus
de la diarrea epidémica porcina en muestras clínicas.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Martínez Puebla Amaury Raúl

ASESOR:

Dr. José Francisco Rivera Benítez

COASESOR:

M.C. Luis Gómez Núñez

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación de diferentes protocolos de diagnóstico molecular para el virus de la diarrea epidémica porcina en muestras clínicas.

Que presenta el pasante: AMAURY RAÚL MARTÍNEZ PUEBLA

Con número de cuenta: 30602519-4 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Septiembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez	
VOCAL	M.V.Z. Mario Alberto Velasco Jiménez	
SECRETARIO	Dr. Miguel Angel Comejo Cortés	
1er. SUPLENTE	M.P.A. María Guadalupe Mondragón Olvera	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Jesús Arturo Sandoval Romero	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Virología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-MA INIFAP)

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

Agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer al gran grupo de personas, talentosas y generosas que me acogieron en el laboratorio del CENID-MA del INIFAP. Gracias Francisco y Luis por el apoyo recibido y la paciencia que me tuvieron, Jaz por presentarme el gran mundo de los virus, por enseñarme y transmitirme tus conocimientos, Flor, gracias por enseñarme a manejar las células y ayudarme tanto a saber cómo tratar y manejar a los chanchos, Roció por transmitirme tus enseñanzas en la técnica, por facilitarme el producto de tus esfuerzos, Dr Cerriteño sin tu ayuda no hubiera podido realizar mis experimentos, gracias por el conocimiento ofrecido. Gracias por su invaluable ayuda, por su paciencia y por su conocimiento, sin su apoyo no podría haber llegado a esta instancia.

Dedicatoria.

Después de tanto procrastinar, de buscar pretextos para no iniciar o simplemente pasarla por alto, pensando qué escribir en estas líneas que aun sin saber cómo plasmarlas, siempre ha estado claro a quién pertenecen.

Pilares.

“El hueso del atlas se llama así porque como en la mitología griega soporta todo un mundo” y es así como yo veo a aquellos que son importantes en mi vida, familia y amigos.

Martínez Puebla esos seres humanos que siempre me han apoyado, sostenido y me han enseñado la importancia de tener a tus seres queridos cerca; Raúl y Araceli, gracias por enseñarme a salir siempre adelante, a mantenerse unidos cuando las cosas son difíciles y, claro, por ser un gran ejemplo en muchos aspectos de la vida. Mariana, pues qué haría sin tu presencia en mi vida, peleando, regañando, comiendo, escuchando y apoyando; velando por mí desde mi primer día escolar hasta el gran paso de la universidad. Familia, nunca dejaré de agradecer tantos momentos de alegría, tantas sobremesas que se extendían más que la misma cena, pero, sobre todo, gracias por todo el amor y el apoyo que me han dado, en mis momentos más felices y en mis momentos más tristes, y claro por cuidarme de todas mis locuras; esto es por y para ustedes, los amo.

Claro, cómo podría no agradecer a la familia, la fiestera y loca, la peleonera pero siempre leal, la que siempre recuerdo con el sazón y la forma de comer de los Puebla y la de ese humor tan único y propio de los Martínez, a los cuales pertenezco orgulloso y presumo a cada oportunidad. Los quiero a todos.

La panadería, ese grupo de seres humanos y panes que hicieron mejor mi mundo

desde que los conocí, con quienes he pasado muchos de los mejores momentos Gerardo, Roberto, Lety, Mario, Eli, gracias por estar conmigo en grandes e importantes momentos, por ser ese refugio que uno muchas veces necesita del mundo, por compartir su mundo y por dejarme ser parte de él, en verdad son invaluable y los quiero.

Niña Regina, pensar que tan gran amistad surgiría de mandarte a lavar las mamilas, gracias por recordarme que tenía que terminar esto y ser la “hermana hermana” de Charly.

¿Qué fue la FESC para mí? Fue el lugar donde supe que podía, que me retó y donde me conocí a mí mismo; pero también fue donde conocí a personas invaluable. Maricruz, que ni me hablabas; Paty gracias por escuchar todas mis historias y penas; Ana, gracias por esos bailes; Selene porque aunque te caigo mal, caminar contigo es genial, rebasando gente lenta y aprovechando descuentos en comida; Liliana ir a trabajar al bioterio contigo era genial. Gracias por su amistad, por su escucha y compañía, las quiero mucho y son muy importantes para mí.

Enrique, gracias por todo lo que me has enseñado y no sólo la parte profesional, si no la parte humana, la relación entre los dueños y el médico, el pensar también en la situación de las personas y gracias a ello ser- empático con los dueños, y eso también es ser un buen veterinario.

No podría dejar de agradecer y recordar a todas las personas que me han acompañado a lo largo del camino, corta o larga la duración de la cada una de aquella compañía, han dejado un poco de su ser en mí y eso siempre lo voy a agradecer, las pláticas, las peleas, los bailes, los brindis, gracias por ser una

compañía invaluable en mi camino.

Xareni jamás hubiera apostado como fue que llegaste a mi vida, tan casual y tan genial; gracias por apoyarme, por presionarme a escribir, por escuchar mis quejas, por esas pláticas tan geniales y por mirarme como me miras, sin tu apoyo no podría haber terminado esto, gracias

Cómo olvidar a esos seres pequeños y locos: Ringo y Carlota, ya son luz y se han unido al universo, sé que no nos han dejado y rondan por la casa, vigilándonos y cuidándonos, tan juguetones y enojones como fueron en vida. Camila, qué te puedo decir; te has ganado el respeto de todos los que te conocen, con tanta fortaleza, con esas ganas de vivir sin importar nada, eres un gran ejemplo para todos. Quetzalli, llegaste sin planearlo, pero agradezco cada día el que lo hicieras, no imagino estos últimos años sin ti y tu cariño felino, gracias por ser como eres. Kika, perra tarada, toda barbera y "besucona", eres chida, y Cleo, aunque no me quieras eres la onda, odiando a todo el mundo. Gracias por su compañía por su presencia y amor tan puro, la vida es mejor gracias a su compañía.

A todos los animales que han sido parte de mi formación, directa e indirectamente, gracias por su sacrificio, porque sin ustedes no estaría aquí, ni existiría esta tesis; por todas sus enseñanzas. Prometo ser mejor y honrar sus vidas.

INDICE

1. Introducción.....	1
1.1 La especie porcina.....	1
1.1.1 Taxonomía.....	1
1.1.2 La producción porcina mundial.....	1
1.1.3 La producción en México y principales Estados productores	2
1.2 Principales enfermedades digestivas de los cerdos.....	2
1.2.1 Enfermedades digestivas bacterianas.....	2
1.2.2 Enfermedades digestivas parasitarias.....	3
1.2.3 Enfermedades digestivas virales.....	4
1.3 Diarrea epidémica porcina.....	5
1.3.1 Antecedentes históricos.....	5
1.3.2 Clasificación taxonómica.....	7
1.3.3 Ciclo de replicación.....	9
1.3.3.1 Receptor celular.....	9
1.3.3.2 Replicación viral.....	9
1.3.4 Patogenia.....	11
1.3.5 Cuadros clínicos.....	12
1.3.6 Epidemiología mundial.....	12
1.3.7 Epidemiología en México.....	13
1.4 Diagnóstico.....	13
1.4.1. Pruebas directas.....	14
1.4.2. Aislamiento viral.....	14
1.4.3. Microscopia electrónica.....	14
1.4.4 Detección molecular.....	15
1.4.5 RT-PCR.....	15
1.4.6 RT-PCR en tiempo real.....	17

1.4.7 Pruebas indirectas	20
1.4.8 ELISA.....	20
1.4.9. Ensayos de inmunofluorescencia	21
2. Justificación	22
3. Objetivos	23
3.1 Objetivos particulares	23
4. Hipótesis.....	24
5. Material y métodos	25
5.1 Diseño experimental	25
5.2 Muestras clínicas	25
5.3 Extracción de RNA	25
5.4 Análisis <i>in silico</i>	26
5.5 RT-PCR punto final.....	28
5.6 RT-PCR tiempo real.....	29
5.7 Cuantificación absoluta de la carga viral	30
5.8 Análisis estadístico	32
6. Resultados.	32
6.1. Análisis <i>in silico</i>	32
6.2 RT-PCR punto final.....	33
6.3. RT-PCR en tiempo real.....	34
6.3.1. Porcentaje de positividad	34
6.3.2. Valores de cuantificación (Cq)	35
6.3.3 Valores ajustados a Cq	36
6.3.4 Cuantificación absoluta por RT-PCR en tiempo real	41
6.3.4.1 Construcción de curvas de calibración	41
6.4 Análisis estadístico	47
7. Discusión.....	49

8. Conclusiones.....	53
9. Referencias.	54

I. Abreviaturas

SAGARPA	Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEP	Diarrea epidémica porcina
vDEP	Virus de la diarrea epidémica porcina
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
OIE	Organización mundial de sanidad animal
S	Espiga
N	Nucleocápside
E	Envoltura
M	Mátriz
ORF	Marco abierto de lectura
APN	Aminopeptidasa N
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
HL	Hisopo largo
HC	Hisopo corto
HO	Hisopo oral
ND	No determinado
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
HPI	Horas postinoculación

II. Lista de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Lista de cepas utilizadas para el análisis <i>in silico</i> de los iniciadores y sondas para las pruebas de RT-PCR en punto final y tiempo real	27
Cuadro 2. Porcentaje de del análisis <i>in silico</i>	33
Cuadro 3. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para las pruebas de RT-PCR punto final.	48
Cuadro 4. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para las pruebas de RT-PCR en tiempo real.	48

III. Lista de figuras

		pág.
Figura 1	Representación esquemática de las proteínas S y N	8
Figura 2	Ciclo de replicación del virus de la diarrea epidémica porcina	10
Figura 3	<i>Mecanismo de la sonda de hidrolisis</i>	18
Figura 4	<i>Mecanismo de la sonda beacon</i>	19
Figura 5	Genoma del virus de la diarrea epidémica porcina y sitios de amplificación para las distintas pruebas de RT-PCR en punto final y tiempo real.	30
Figura 6	Porcentaje de positividad en las pruebas de RT-PCR punto final	34
Figura 7	Porcentaje de positividad en las pruebas de RT-PCR tiempo real.	35
Figura 8	Valores de cuantificación (Cq) promedio obtenidos durante la fase experimental	36
Figura 9	Promedio de los valores ajustados a Cq del G1.	37
Figura 10	Promedio de los valores ajustados a Cq del G2.	38
Figura 11	Promedio de los valores ajustados a Cq del G3.	39
Figura 12	Promedio de los valores ajustados del G3, con muestras obtenidas por medio de hisopo rectal corto (HC).	40
Figura 13	Promedio de los valores ajustados obtenidos del grupo 3 con muestras de fluido oral colectadas por medio de hisopo oral (HO).	41
Figura 14	Curva de calibración de la prueba S1-INI.	42
Figura 15	Promedio de los valores de cuantificación del G1	43
Figura 16	Promedio de los valores de cuantificación del G2	44

Figura 17	Promedio de los valores de cuantificación del G3	45
Figura 18	Promedio de los valores de cuantificación del G3 con muestras rectales obtenidas por medio de hisopo corto.	46
Figura 19	Promedio de los valores de cuantificación del G3 con muestras de fluido oral obtenidas por medio de hisopo.	47

Resumen

En virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP) perteneciente a la familia de los coronavirus el cual afecta principalmente a animales menores a 7 días de edad, la capacidad para infectar a los enterocitos y células de las vellosidades del intestino delgado provoca el signo clínico característico de esta enfermedad; una diarrea aguda causada por mala absorción, esta enfermedad cuya mortalidad puede llegar al 100% en lechones, fue reportada en México por primera vez entre marzo de 2013 y agosto de 2014. El objetivo de este trabajo fue estandarizar y evaluar diferentes protocolos de identificación molecular para la detección del virus de la diarrea epidémica porcina que circula de forma natural en México empleando muestras de hisopos colectadas de cerdos infectados experimentalmente clasificados en tres grupos experimentales: **G1**, lechones inoculados (n = 5) con un inóculo de vDEP virulento (PEDV/MEX/PALOALTO/01/2016), identificado en lechones de seis semanas de edad; **G2**, lechones inoculados (n = 5) con la mezcla de un inóculo de vDEP virulento y variante (PEDV/MEX/PALOALTO/02/2016), identificado en lechones de ocho semanas; y **G3**, lechones inoculados (n = 7) con una cepa virulenta (PEDV/MEX/MICH/01/2015; No. GenBank: KY828995) de referencia, de las cuales se obtuvieron valores de sensibilidad de hasta 96% by de 66% para el gen N y S en las pruebas de RT-PCR en punto final, así como una sensibilidad de 88% y 100% en las pruebas de RT-PCR en tiempo real, así mismo los resultados con mayor eficiencia se obtuvieron a partir de la prueba estandarizadas a partir de cepas de circulación nacional aisladas en el laboratorio.

Abstract

The virus of porcine epidemic diarrhea (vDEP) belonging to the family of coronaviruses, mainly affects animals less than 7 days of age, the ability to infect the enterocytes and villi cells of the small intestine causes the characteristic clinical sign of this disease: an acute diarrhea caused by malabsorption; This disease whose mortality can reach 100% in piglets, was reported in Mexico for the first time between March 2013 and August 2014. The objective of this work was to standardize and evaluate different molecular identification protocols for the detection of the diarrhea virus porcine epidemic circulating naturally in Mexico using samples of swabs collected from experimentally infected pigs classified into three experimental groups: G1, inoculated piglets (n = 5) with a virulent vDEP inoculum (PEDV / MEX / PALOALTO / 01/2016) , identified in six-week-old piglets; G2, inoculated piglets (n = 5) with the mixture of a virulent and variant vDEP inoculum (PEDV / MEX / PALOALTO / 02/2016), identified in eight-week-old piglets; and G3, inoculated piglets (n = 7) with a virulent strain (PEDV / MEX / MICH / 01/2015; GenBank: KY828995) reference, of which sensitivity values of up to 96% and 66% were obtained for the N and S gene in the RT-PCR end-point tests, as well as a sensitivity of 88% and 100% in the RT-PCR tests in real time, likewise the results with greater efficiency were obtained from the standardized test from strains of national circulation isolated in the laboratory.

1. Introducción

La domesticación del cerdo, ocurrió aproximadamente hace 9000 años en el oriente medio, sin embargo, aún no se reconoce si las marcadas diferencias morfológicas con respecto de sus ancestros tienen un origen único o múltiple, ya que Darwin, reconoció dos formas de cerdos domésticos la europea (*Sus scrofa*) y la asiática (*Sus indicus*) (1).

1.1 La especie porcina

1.1.1 Taxonomía

El cerdo doméstico *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758) es un mamífero de la familia *suidae*, subfamilia *suidae*, del género *sus*, cuenta con 16 subespecies, con respecto al cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*) a lo largo del tiempo se ha extendido de manera importante, ocasionando así el surgimiento de nuevas razas y de líneas genéticas. En México, las razas con mayor presencia son: Landrace y Yorkshire, las cuales se caracterizan por presentar elevados estándares reproductivos; como una aptitud innata para la cría de lechones y el alto número de estos por parto. Mientras que las razas Duroc, Hampshire y Pietrain, se caracterizan por la buena calidad de carne, así como la adecuada conversión alimenticia que puede alcanzar 3:1, llegando a tener una ganancia de peso en promedio de 900 gramos al día (1,2).

1.1.2 La producción porcina mundial

La producción de cerdo a nivel mundial ha tenido un crecimiento de más del 2% entre el 2010 y 2014, reportando un total de 985 673 301 cabezas de cerdo a nivel mundial. China se ubica como el país con la mayor producción de cerdo ya que

representa un 48% de la producción total, la Unión Europea ocupa el segundo sitio con un 15.1%, Estados Unidos en tercer puesto con 6.8% y Brasil con 3.8% ubicándose en el cuarto puesto; México ocupa el octavo lugar a nivel mundial con el 1.6% de la producción mundial (3).

1.1.3 La producción en México y principales Estados productores

De acuerdo a datos proporcionados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) el inventario nacional de ganado porcino ha presentado un crecimiento de aproximadamente un 7% en relación al año 2006 ya que para el año 2015 datos preliminares refieren a una población de 16 364 459 cerdos en México. Los Estados de Jalisco, Sonora, Veracruz, Puebla y Yucatán ocupan los primeros cinco lugares a nivel nacional, representando en su conjunto el 54% del inventario nacional (2,4).

En México se reporta que se consume en promedio 16.6 kg de carne de cerdo por persona al año, considerando la producción porcina como una actividad de gran importancia por lo cual la identificación de pérdidas de producción de la misma toma gran relevancia por el impacto que representa. Estas causas pueden ser clasificadas en enfermedades respiratorias las cuales se presentan en un 60%, reproductivas en un 20%, músculo/esquelético un 9% y digestivas un 8% (5).

1.2 Principales enfermedades digestivas de los cerdos

1.2.1 Enfermedades digestivas bacterianas

Las enfermedades en el tracto gastrointestinal de los cerdos marcan una severa limitación en la eficiencia y producción de estos, durante la primera semana de edad los principales agentes patógenos asociados a estas enfermedades son

bacterias del género *Clostridium* (*Clostridium difficile*, *C. perfringens* A y C) así como *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. estos agentes patógenos, se caracterizan por la presencia de diarreas, que van desde pastosas (*Clostridium* spp.) hasta acuosas (*E. coli*) (6).

1.2.2 Enfermedades digestivas parasitarias

Entre los agentes parasitarios presentes en los cerdos se encuentran *Isoospora suis*, nematodos como *Ascaris suum*, *Strongyloides ransomii*, *Trichuris suis*.

La capacidad de *Isoospora suis* para causar diarreas en lechones lactantes se ha reportado ampliamente; se calcula que más del 70% de las camadas infectadas las presentan. Los signos clínicos asociados a estos parásitos se observan en animales de entre siete y 11 días de edad los cuales se observan como diarreas pastosas con tonos amarillentos o grisáceos, los lechones permanecen húmedos por las diarreas, presentan deshidratación. Los animales afectados suelen recuperarse teniendo una mortalidad reducida, sin embargo pueden dar paso a infecciones bacterianas y virales, complicando los cuadros clínicos (6,7).

El *Ascaris suum* se considera como el nematodo más abundante que se presenta en el intestino delgado de los cerdos. Las hembras pueden alcanzar una longitud de más de 40 cm mientras que los machos alcanzan una longitud de 25 cm aproximadamente encontrándose principalmente en el yeyuno de los animales; al competir directamente por los nutrientes se presenta una baja conversión alimenticia, así como obstrucciones en el intestino. Otros parásitos importantes son el *Macracanthorhynchus hirudinaceus* y *Strongyloides ransomi* (6,8).

1.2.3 Enfermedades digestivas virales

El Rotavirus un virus de la familia *Reoviridae*, es un virus no envuelto, de morfología icosaédrica, de aproximadamente 65 nm de diámetro, cuentan con una doble cadena de RNA. Es uno de los agentes infecciosos que se asocia con mayor frecuencia a gastroenteritis agudas en animales (hasta el 90% de la causa de diarreas en sistemas de producción comerciales) principalmente en individuos jóvenes (los dos primeros meses de vida); sin embargo la susceptibilidad de estos decrece conforme avanza su edad (6,9,10).

La principal vía de infección es por vía oral-fecal, el periodo de incubación es entre las 18 y 96 horas; en los que se han descrito diarrea pastosa blanquecina, en algunas ocasiones se puede presentar fiebre, la deshidratación usualmente es la causa de muerte, la cual se presenta en alrededor del 15% de los animales infectados (6,11).

El Astrovirus porcino es un virus miembro de la familia *Astroviridae*, del género *Mamastrovirus*, tiene un diámetro aproximado de 30 nm, no cuenta con envoltura, su genoma se compone por una cadena simple de RNA. Este virus se ha identificado en Reino Unido, Japón, Sudáfrica, Republica Checa y Hungría, los signos clínicos observados son diarrea severa, solo en presencia de patógenos secundarios (6).

La gastroenteritis transmisible es una enfermedad viral altamente contagiosa, descrita en 1946 en los Estados Unidos, para posteriormente ser descrita alrededor del mundo. En México concretamente se describió por primera vez en el año de 1965 de un brote proveniente del estado de Michoacán, el cual se

caracterizó por su alta mortalidad en lechones menores de 2 semanas. El virus de la gastroenteritis transmisible, está clasificado dentro del género de los *Coronavirus*, con morfología es circular pleomorfa, con un diámetro de entre 100 y 150nm, la envoltura externa es lipoproteína y su genoma viral está conformado por una cadena de RNA en sentido positivo (12). El periodo de incubación es de 16 a 24 horas, la lesión característica de la gastroenteritis transmisible es la atrofia de las vellosidades intestinales ocasionadas por el desprendimiento de las células epiteliales provocando la disminución en la superficie de absorción y con ello la aparición del principal signo clínico: una diarrea acuosa; así como una grave deshidratación. Sin embargo, en lechones menores a las dos semanas de vida también se observa vómito, así como debilidad, sin pérdida del apetito; en cerdas se puede presentar una ligera agalactia; a partir de las tres semanas de edad, los animales presentan cuadros clínicos más benignos con lo cual la mortalidad se reduce significativamente (6,12).

1.3 Diarrea epidémica porcina

1.3.1 Antecedentes históricos

En 1971 en Inglaterra se identificó la aparición de una enfermedad no descrita previamente causando brotes principalmente en invierno en granjas de crecimiento y engorda; esta enfermedad fue llamada como “diarrea viral epidémica” (13). En el año de 1977 por medio de inoculaciones experimentales de aislamientos provenientes de Bélgica, demostraron la característica enteropatógena del virus, por lo cual se propuso el nombre de “diarrea epidémica porcina” (DEP), el cual se conserva hasta estos días (6).

En Asia los primeros brotes de la enfermedad ocurrieron en China en el año de 1973, para posteriormente ser observada en Japón en el año de 1982. Esta enfermedad permaneció endémica con una prevalencia relativamente baja y con brotes aislados y esporádicos. Sin embargo en el año 2007 se presentó un brote severo en Tailandia. Así mismo en octubre del año 2010 emergieron brotes de DEP en diez provincias de China afectando principalmente a lechones menores de siete días de edad en los cuales se observó una elevada mortalidad, calculando la pérdida en más de un millón de lechones. En el caso de los verracos y las cerdas en producción se observaron signos digestivos en algunos animales lo cual contrastó con los brotes previamente reportados en Tailandia quienes describieron signos clínicos con diferentes grados de diarrea, así como una anorexia generalizada en animales de todas las edades (14–16).

En abril de 2013 se reportaron los primeros casos en América provenientes de granjas del estado de Iowa en los Estados Unidos en las cuales se identificaron cerdos de 24 horas de vida con diarrea amarillenta, con contenido de flóculos de leche sin digerir, se observó la presencia de vómito, los lechones presentaron una deshidratación severa y se observó la muerte de estos dentro de los dos días posteriores; en naves de gestación y crecimiento se presentó un 15% de casos de diarrea, anorexia y vómito. En el caso de México, el primer reporte oficial emitido por SAGARPA-SENASICA, hacia la OIE, se registró en mayo del 2014, con muestras obtenidas en el periodo de agosto de 2013 a mayo del año siguiente (2014), obteniendo una prevalencia del 30% en las muestras analizadas (14,17).

1.3.2 Clasificación taxonómica

Este virus pertenece al orden de los *Nidovirales*, cuya morfología se caracteriza por poseer envoltura, los virus de la familia *Coronaviridae*, muestran largas proyecciones que sobresalen de la envoltura estas se forman por trímeros de la proteína espiga (S); esta estructura les provee de su característica corona. Los coronavirus poseen una nucleocápside (N) la cual tiene simetría helicoidal (18).

El virus de la diarrea epidémica porcina es un virus envuelto, tiene un diámetro de entre 95 y 190 nm, cuenta con un genoma RNA en cadena sencilla y sentido positivo el cual mide 28 kilobases. El genoma viral cuenta con dos regiones no traducibles en los extremos 5' y 3', cuenta con siete marcos de lectura abierta de traducción (ORF) los cuales se encargan de codificar poliproteínas no estructurales, así como cuatro proteínas estructurales que son espiga (S), envoltura (E), matriz (M) y nucleocápside (N) (16).

La proteína S del virus es una glicoproteína esencial para el anclaje y fusión de la partícula viral en el hospedero, esta proteína tiene un ensamblaje en forma de trímero con una pequeña cola citoplasmática y una región transmembranal hidrofóbica; esta proteína se divide en dos dominios principales (S1 y S2); el dominio conocido como S1 tiene la función de anclaje y fusión del virus con su célula blanco (Figura 1) esta región juega un papel de suma importancia en la replicación del virus ya que la región N terminal de la proteína S es importante en el reconocimiento del receptor celular (aminopeptidasa N) para así ingresar en la célula blanco mediante fusión de membrana y subsecuentemente liberación del genoma viral dentro del citoplasma, para iniciar la replicación del virus; en

investigaciones recientes se ha identificado que otro de los receptores de este virus es el ácido siálico (16,19). La proteína N (nucleocápside), es una proteína fosforilada, la cual cumple con el papel de blindar el genoma, además está asociada con el ensamblaje de complejos de ribonucleoproteínas (Figura 1) (19).

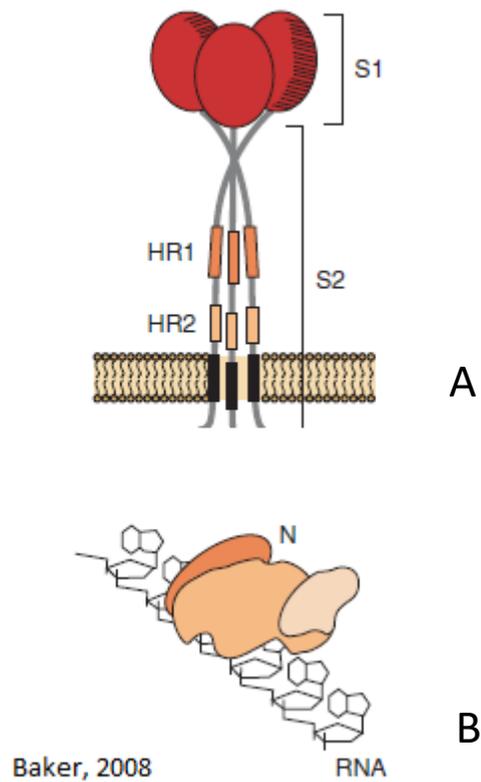


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas S y N. A) se observa la región S1 y S2, así como su ensamblaje en forma de trimerio. B) en la proteína N, se observan sus 3 dominios altamente conservados, modificada de Baker, 2008.

1.3.3 Ciclo de replicación

1.3.3.1 Receptor celular

La aminopeptidasa N (APN) es una glicoproteína transmembranal de tipo II, la cual es abundante en la membrana de enterocitos maduros realiza múltiples funciones biológicas incluyendo el metabolismo peptídico, así como la adhesión y la motilidad celular (20,21). Esta proteína funciona como un receptor y señalizador molecular en la superficie celular la cual está conformada por siete dominios con funciones independientes de los cuales el dominio 1 constituye la fracción citoplasmática formando una pequeña cola citoplasmática, en la región N terminal, el dominio 2 consiste en un segmento transmembranal el cual conecta directamente con el dominio 3, en los dominios 5 y 6, se encuentra alojada la actividad peptídica, mientras que en el dominio 7 se encuentra localizado el extremo C terminal (20).

1.3.3.2 Replicación viral

La replicación y transcripción de este virus tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas; comenzando en el momento en el que la glicoproteína S tiene contacto con su receptor celular, se fusiona con la membrana de su célula blanco por medio de endocitosis liberando así su material genético dentro del citoplasma. Una vez que el RNA viral es liberado en la célula este actúa como RNA mensajero y es traducido por los ribosomas inmediatamente produciendo así poliproteínas dependientes de polimerasa viral. La traducción del ORF1b depende del cambio de los marcos ribosómicos, por acción de la replicasa se generan 16 poliproteínas, no estructurales, así mismo fragmentos específicos del genoma son

traducidos formando las proteínas estructurales las cuales forman membranas al interior de la célula huésped para generar una doble membrana interna llamada vesícula donde se ha observado la síntesis de RNA viral. Es en este sitio donde los complejos de replicasa generan las proteínas virales, así como las estructuras secundarias (16,19).

La proteína N se inserta junto con el nuevo genoma sintetizado otorgándole su forma helicoidal, mientras que las proteínas M, E y S, se insertan en el retículo endoplásmico para trasladarse al aparato de Golgi, durante este tiempo se realiza el ensamblaje de la nueva partícula viral, para finalmente salir de la célula por medio de exocitosis, llevándose consigo componentes de la membrana celular (Figura 2) (16).

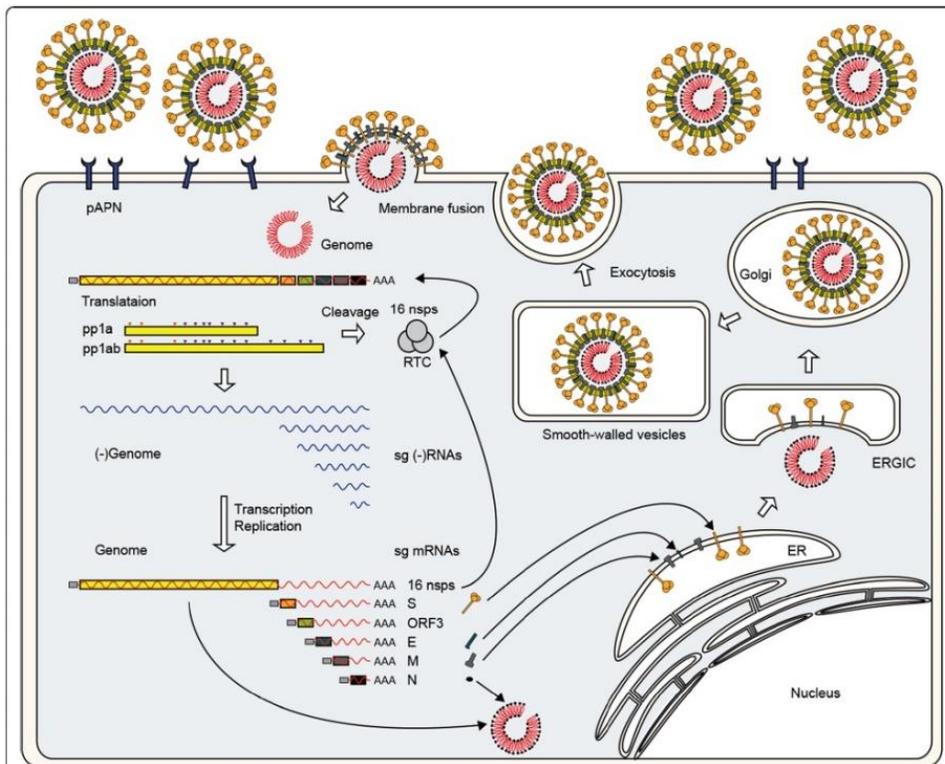


Figura 2. Ciclo de replicación del virus de la diarrea epidémica porcina (Tomado de Lee, 2015).

1.3.4 Patogenia

El tropismo del vDEP se encuentra dirigido a los enterocitos y células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado su principal forma de transmisión es la oro-fecal, sin embargo también se ha descrito su diseminación por medio de alimento, agua e instalaciones contaminadas. El periodo de incubación del virus es de 20 a 36 horas post infección, sin embargo la replicación viral inicia a partir de las 12 horas en el citoplasma de las células teniendo su mayor efecto a partir de las 24 horas, esta replicación conlleva la degeneración de los enterocitos y con ello la disminución de las vellosidades intestinales, reduciendo así la capacidad de absorción del intestino (6).

La diarrea que produce este virus se debe en gran medida a una mala absorción a consecuencia de la pérdida masiva de enterocitos los cuales en etapas de edad temprana su ciclo de reemplazo es de entre 5 a 7 días, así mismo se observa una baja en los niveles de calcio y de bicarbonato produciendo así una acidosis metabólica (22).

Macroscópicamente se pueden observar intestinos transparentes a partir del duodeno llegando en ocasiones hasta el colon, dentro del colon es común encontrar la presencia de líquido amarillento en el lumen; la presencia de leche en el estómago es ocasionada por una baja en la perístalsis intestinal; mientras que la anorexia se presenta en una etapa tardía posterior a la infección (22).

1.3.5 Cuadros clínicos

Los signos clínicos se han asociado a la edad de los cerdos: en lechones menores de siete días de edad se ha descrito mortalidad y morbilidad del 100%, observando principalmente diarrea acuosa severa, hipotermia y vómito que los conduce a la muerte; en cerdos mayores de dos semanas de edad se ha descrito mortalidad de entre 1 y 3 % y una morbilidad del 50% observando signos clínicos menos agresivos. En hembras en producción se han descrito signos clínicos como vómito y diarrea, además se han asociado problemas reproductivos, tales como disminución en la tasa de parición de las cerdas y un aumento en el número de lechones nacidos muertos (23,24).

1.3.6 Epidemiología mundial

En la década de 1970 se presentó por primera vez la DEP en el Reino Unido y Bélgica, en 1977 se aisló por primera vez obteniendo la cepa de referencia CV777. A inicios de 1990 se presentaron severos brotes de esta enfermedad en Corea del Sur y Japón, en esa misma década en Europa se observaron brotes esporádicos pero persistentes (6,25). Entre el año 2007 y el 2008 se presentaron severos brotes en Tailandia en esa región se identificó que el virus circulante estaba estrechamente relacionado con cepas procedentes de China, principalmente con la cepa Js-2004-2 (15). En mayo de 2013 se observaron los primeros casos en el continente americano, en Estados Unidos de América los brotes se difundieron a lo largo del país rápidamente, en un principio se identificó un virus con una alta homología genética con la cepa AH2012 proveniente de China, posteriormente y antes de un año de los primeros brotes se observó la aparición de la cepa OH851,

la cual presentaba múltiples deleciones e inserciones a lo largo del gen S (cepas S-INDEL) (14,25).

1.3.7 Epidemiología en México

Posterior al primer brote en Estados Unidos en mayo de 2014 se confirmó el primero caso de esta enfermedad en una granja de ciclo completo en Ontario, Canadá. En el caso de México se confirmó entre marzo de 2013 y agosto de 2014 durante 99 inspecciones sanitarias en 19 estados de la república incluyendo a la Ciudad de México; de los cuales Guanajuato, Jalisco y Puebla fueron los más visitados. Durante este periodo se obtuvieron 2309 muestras de las cuales el 30% fueron reportadas como positivas siendo el estado de Guanajuato el más afectado. En el año 2016 se clasificó como una enfermedad endémica y fue adjuntada dentro del grupo tres de la lista de enfermedades de reporte obligatorio (26,27).

1.4 Diagnóstico

Desde el primer brote de DEP ocurrido en 1971 en Inglaterra la enfermedad se ha diagnosticado con base en técnicas serológicas y moleculares. Las técnicas serológicas tienen la capacidad de detectar anticuerpos de un animal infectado por lo cual no se pueden utilizar al momento de observar cuadro clínico sugerente o de un brote agudo ya que se tiene que esperar a que el animal pueda activar una respuesta inmune y la detección de anticuerpos se lograría a partir del día siete post infección. En cambio las técnicas moleculares permiten realizar la detección del genoma viral desde el momento en que aparecen los primeros signos clínicos. Actualmente las herramientas de diagnóstico molecular brindan una detección rápida con una alta sensibilidad y especificidad, han sido utilizadas para realizar

estudios moleculares y poder determinar la circulación de nuevas variantes virales (28,29).

1.4.1. Pruebas directas

1.4.2. Aislamiento viral

Uno de los primeros pasos para establecer ensayos *in vitro*, virológica e inmunológicamente así como para evaluar la susceptibilidad y el sistema de cultivo celular adecuado para su replicación en el laboratorio es empleando células VERO, así como cultivos primarios de intestino y líneas celulares que expresen el receptor celular. El efecto citopático característico de este virus es la formación de sincitios, la replicación del virus es dependiente de la actividad proteolítica de una enzima. Comúnmente se ha utilizado tripsina exógena en el medio de cultivo con lo cual la eficiencia infectiva del virus aumenta, sin embargo a pesar de la potencialización de la actividad proteolítica la recuperación viral sigue siendo difícil y en bajas concentraciones, así mismo para confirmar el aislamiento viral es necesario el empleo de técnicas moleculares o microscópicas (29,30).

1.4.3. Microscopia electrónica

La clasificación de los virus en algunos grupos taxonómicos se ha basado a partir de una caracterización física, así como por su tamaño, su simetría y la presencia o ausencia de envoltura lipídica, por lo cual la microscopia electrónica ha sido referente en el reconocimiento de nuevos agentes virales. Una técnica utilizada especialmente en la identificación viral es la llamada microscopia electrónica inmunitaria la cual involucra la adición de suero inmune específico para el virus en suspensión para posteriormente ser observados mediante microscopia electrónica

los anticuerpos específicos para el virus, causan una aglutinación del mismo, facilitando así su observación. El fundamento de la tinción negativa en la microscopía electrónica, se basa al igual que en la óptica, de generar un contraste con sustancias que no permitan el paso de los electrones a través de estas mismas los más utilizados son el acetato de uranilo, soluciones de plomo y ácido fosfotúngstico (31,32).

1.4.4 Detección molecular

La técnica de uso más común es la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR). Esta técnica molecular tiene como fundamento la amplificación masiva *in vitro* por medio de enzimas y de una secuencia específica del RNA; durante una serie de ciclos repetidos la secuencia blanco es copiada fielmente, estos ciclos están compuestos a su vez por tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (33,34).

1.4.5 RT-PCR

La prueba de RT-PCR requiere una serie de compuestos indispensables para su realización, el templado el cual sirve como base para la síntesis de nuevas cadenas del mismo corresponde a la muestra de material genético (DNA), en caso en que las muestras contengan RNA, es necesaria la síntesis de cDNA, por medio de la transcripción reversa esto con ayuda de la transcriptasa reversa, enzima de origen viral a partir de los virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y el virus de la leucemia murina (MMLV-RT) y la polimerasa, proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* esta enzima es termoestable y mantiene su función a temperaturas altas (34,35).

La acción de síntesis de nuevas cadenas o de amplificación se lleva a cabo con ayuda de los iniciadores los cuales son secuencias de nucleótidos, que se van a unir a cada una de las secuencias de DNA que previamente fue separada. Su tamaño máximo es de 30 pares de bases las cuales tendrán que cumplir con una serie de requisitos para asegurar su correcto funcionamiento, entre ellos se encuentra la temperatura de fusión, la cual normalmente oscila entre 40 y 65 grados centígrados, estos iniciadores además tienen que tener un bajo o nulo grado de complementariedad esto con el fin de evitar la formación de dímeros entre los mismos iniciadores y con ello la formación de productos inespecíficos. Durante la prueba; la desnaturalización es la primer etapa, esta consiste en la separación de las cadenas de DNA por medio de altas temperaturas, esta temperatura oscila entre los 95 hasta los 97 grados centígrados; esto dependerá de la relación C-G, ya que al presentar una triple unión hidrogenada la temperatura aumentará directamente proporcionalmente a ésta así como el tiempo de esta reacción el cual tiene un periodo aproximado de 20 a 30 segundos. El siguiente paso de la reacción de PCR es la hibridación en esta fase la temperatura disminuye hasta un rango entre 40 y 60 grados centígrados esto con el fin de llevar a cabo la alineación de los iniciadores a sus correspondientes cadenas en el extremo 3' y 5', cabe señalar que el tiempo y la temperatura óptima, es específico e individual para cada uno de los iniciadores (36).

Durante la extensión, la cual corresponde a la tercera fase de la reacción, la temperatura aumenta hasta 72 grados centígrados, para permitir que la polimerasa, la cual, al ser una enzima termoestable, se active su funcionamiento a altas temperaturas. Debido a la acción de la polimerasa y a la utilización de los

nucleótidos disponibles en la mezcla de reacción las cadenas específicas de DNA se van formando, para así repetirse en cada uno de los ciclos (34,37,38).

1.4.6 RT-PCR en tiempo real.

A pesar que la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa ha sido una eficiente y sensible forma de detección del RNA del virus de la diarrea epidémica porcina, esta reacción cuenta con una serie de limitaciones como el tiempo empleado en la visualización posterior a la electroforesis en gel de agarosa, así como la imposibilidad de cuantificar la carga viral de las muestras (39), es por esto que esta técnica ha tenido mejoras y refinamiento dando como resultado la RT-PCR en tiempo real.

En la RT-PCR en tiempo real la amplificación así como la detección se lleva a cabo de manera simultánea sin necesidad de una acción posterior, empleando una base fluorescente con la cual se realizará la detección química en presencia del producto de RT-PCR esto sucede mediante el empleo de un termociclador con lector de fluorescencia. Los agentes generadores de fluorescencia y por lo cual permite realizar la lectura se dividen en dos tipos. Los agentes intercalantes (químicos no específicos) los cuales aumentan notablemente la fluorescencia en presencia de una cadena de DNA de doble hélice. Un ejemplo de estos agentes y el más utilizado es el SYBR green; el incremento en la cantidad de DNA por cada ciclo se traduce en un aumento proporcional en la fluorescencia, este tipo de agentes fluorescente presentan el inconveniente de baja especificidad ya que se unen de manera indistinta a cualquier doble cadena, por lo que para reducir esto la temperatura de fusión de los productos debe ser precisa, para asegurar en su

mayor parte la detección de la cadena blanco. Otros agentes fluorescentes de detección son las llamadas “sondas de hibridación específicas” (Figura 3), estos agentes utilizan sondas específicas para cada reacción de PCR, dichas sondas cuentan con dos fluorocromos denominados donador y aceptor respectivamente. Existen distintos tipos de sondas las llamadas lineales como es el caso de las sondas de hibridación en las cuales el fluorocromo donador se encuentra en el extremo 5´ y un aceptor en su extremo 3´, los cuales al estar íntegros y unidos emiten una menor fluorescencia que en el momento de su separación por la acción de la Taq polimerasa esta hidroliza el extremo 5´, produciendo la separación del fluorocromo y con ello se permite la captación de dicha fluorescencia; otro ejemplo de las sondas de hibridación específicas (40,41).

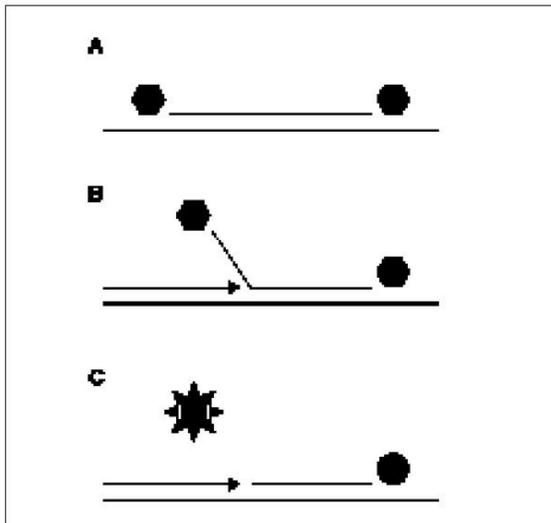


Figura 3. Mecanismo de la sonda de hidrólisis. Donde (A) durante el alineamiento de las sondas, la secuencias se alinean por complementariedad a su blanco, para posteriormente (B), con ayuda de la polimerasa, se hidroliza la región 5´ de la misma, liberando así el fluorocromo donador (C) y con ello se emite la fluorescencia (40).

En las moléculas beacon (Figura 4) la molécula donadora se encuentra en el extremo 5', mientras que la aceptora en el extremo 3', presentando además una estructura secundaria en forma de asa, en la que se encuentra la secuencia específica de DNA; una vez hidrolizada, las sondas se separan, permitiendo así la fluorescencia para su identificación (41).

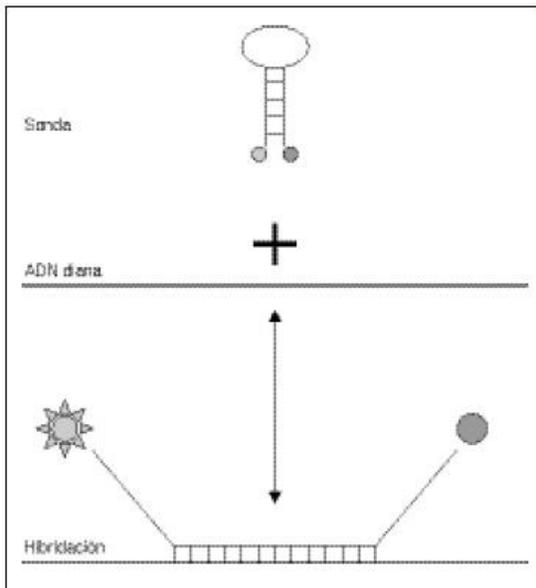


Figura 4. Mecanismo de la sonda beacon (40).

1.4.7 Pruebas indirectas

Un grupo de pruebas de gran utilidad para el diagnóstico de esta enfermedad son las llamadas serológicas son pruebas que se basan en identificar la respuesta inmune de los organismos para los agentes patógenos. Dentro de este grupo de pruebas se encuentra el ensayo inmunoenzimático (ELISA), la prueba de inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia, *Western blot*, entre otras pruebas, las cuales se basan en la reacción y especificidad de la unión antígeno-anticuerpo (42, 43).

1.4.8 ELISA

En los últimos años se han desarrollado pruebas de ELISA indirecta para la identificación de IgG e IgA, utilizando principalmente la fracción S1 de la proteína S, así como la proteína N, obtenidas de forma recombinante, este método diagnóstico permite una automatización del mismo (42). Esta prueba consiste fundamentalmente en la detección de anticuerpos específicos utilizando la reacción antígeno-anticuerpo, la detección depende del tipo de prueba que se realice. En el ELISA de captura al utilizar anticuerpos permite la detección de antígenos; mientras que las pruebas de ELISA indirecto permiten identificar la presencia de anticuerpos en las muestras. La obtención de un resultado se logra gracias a la acción enzimática entre un cromógeno y su sustrato (43).

1.4.9. Ensayos de inmunofluorescencia

Esta prueba se ha utilizado para detectar antígenos en un cultivo celular o en una muestra de tejido en este caso enterocitos de un animal sospechoso; el principio de esta reacción es la identificación antigénica por medio de la interacción antígeno-anticuerpo, la identificación intracelular del agente patógeno se realiza utilizando un conjugado fluorescente con un anticuerpo específico para el virus de la diarrea epidémica porcina para posteriormente ser visualizado gracias a un microscopio de fluorescencia (29).

2. Justificación

Asociado a que el vDEP causa un gran impacto productivo y económico en las producciones porcícolas nacionales, es necesario trabajar en la estandarización de pruebas de diagnóstico molecular que identifiquen los genotipos virales que circulan de forma natural en México y determinar así la funcionalidad de las pruebas experimentales y de referencia.

3. Objetivos

Estandarizar y evaluar diferentes protocolos de identificación molecular para la detección del virus de la diarrea epidémica porcina que circula de forma natural en México

3.1 Objetivos particulares

- Desarrollar y estandarizar un procedimiento de detección molecular cuantitativo para el diagnóstico del RNA del virus de la diarrea epidémica porcina
- Estandarizar y adaptar métodos de diagnóstico molecular de referencia para el diagnóstico del RNA del virus de la diarrea epidémica porcina
- Calcular la sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas de diagnóstico molecular
- Calcular los valores predictivos de las diferentes pruebas de diagnóstico molecular.

4. Hipótesis

El desarrollo de métodos de diagnóstico molecular, basado en cepas del virus circundante en el país, refleja mejores resultados que los métodos de referencia.

5. Material y métodos

5.1 Diseño experimental

La evaluación de las pruebas moleculares se realizó empleando muestras de hisopos colectadas de cerdos infectados experimentalmente. Los cerdos fueron inoculados con virus previamente aislados y se clasificaron en tres grupos experimentales: **G1**, lechones inoculados (n = 5) con un inóculo de vDEP virulento (PEDV/MEX/PALOALTO/01/2016), identificado en lechones de seis semanas de edad; **G2**, lechones inoculados (n = 5) con la mezcla de un inóculo de vDEP virulento y variante (PEDV/MEX/PALOALTO/02/2016), identificado en lechones de ocho semanas; y **G3**, lechones inoculados (n = 7) con una cepa virulenta (PEDV/MEX/MICH/01/2015; No. GenBank: KY828995) de referencia.

5.2 Muestras clínicas

Se colectaron muestras en los tres grupos experimentales empleando hisopos de poliéster de 15 cm de longitud (HL) (Sterile polyester tipped applicators, Puritan). En el G3 se colectaron además hisopos cortos de 5 cm de longitud (HC) e hisopos orales (HO) (aplicadores convencionales de punta de algodón). Todas las muestras fueron almacenadas en 1 ml de solución de fosfatos (PBS) contenida en microtubos de 1.5 ml e inmediatamente congeladas a -80° C (en vapor de nitrógeno líquido).

5.3 Extracción de RNA

Las muestras con los hisopos fueron descongeladas y sometidas a agitación mecánica por 15 segundos, se retiró la punta del hisopo y se empleó el

sobrenadante de PBS con el material biológico para la extracción de RNA. Se empleó el paquete comercial RNeasy Mini Kit® (QIAGEN). Se colectaron 350µl y se homogenizó con 350µl del reactivo de lisis. Posteriormente se siguieron las instrucciones de acuerdo a lo especificado por el fabricante. Se obtuvo un volumen total de 80µl de RNA total, se realizaron alícuotas en tubos con 10µl de RNA y fueron conservadas a -80°C. Durante cada análisis se descongeló una alícuota por prueba realizada.

5.4 Análisis *in silico*

Se realizó el análisis *in silico* de los iniciadores y las sondas utilizadas durante los experimentos, se empleó el programa Mega 6 para realizar alineamientos de 10 cepas obtenidas en el laboratorio (44), así como con cepas de referencia (27 cepas) como se muestra en el cuadro 1. Los alineamientos fueron empleados para comprobar la complementariedad de cada iniciador, además se verificó la temperatura de hibridación y la formación de dímeros.

Cuadro 1. Lista de cepas utilizadas para el análisis *in silico* de los iniciadores y sondas para las pruebas de RT-PCR en punto final y tiempo real.

Cepa DEP	No. GenBank	Cepa DEP	No. GenBank
ZJCZ4CHINA	JX524137	LC_CHINA	JX489155
VN/KCHY-310113/2013VIETNAM	KJ960180	L00721/GER/2014GERMANY	LM645057
USA/Indiana/17846/2013USA	KF452323	KNU-1406-1_SOUTH_KOREA	KM403155
USA/Colorado/2013USA	KF272920	IA1_USA	KF468753
strain_attenuated_DR13_SK	JQ023162	FR/001/2014_FRANCE	KR011756
SM98_SOUTH_KOREA	GU937797	CV777_BELGIUM	AF353511
SD-M_CHINA	JX560761	COL/Cundinamarca/2014_COL	KU569509
Poltava01/2014_UKRAINE	KP403954	CH/FJZZ-9/2012_CHINA	KC140102
PEDVCHINA	KC189944	CAN/Quebec334/2014_CANADA	KR265831
OH851_USA	KJ399978	AJ1102_CHINA	JX188454
MEX/Mexico329/2014MEXICO	KR265766	AH2012_CHINA	KC210145
MEX/124/2014MEXICO	KJ645700	7239/2009_ITALY	KR061458
MEX/104/2013MEXICO	KJ645708	13-019349_USA	KF267450
LZC_CHINA	EF185992	PEDV/MEX/SON/01/2014	KY828992
PEDV/MEX/VER/01/2014	KY82899	PEDV/MEX/JAL/01/2014	KY828993
PEDV/MEX/GTO/02/2014	KY828994	PEDV/MEX/MICH/01/2015	KY828995
PEDV/MEX/MICH/02/2015	KY828996	PEDV/MEX/JAL/01/2016	KY828997
PEDV/MEX/JAL/03/2016	KY828998	PEDV/MEX/MICH/01/2013	KY828999
PEDV/MEX/PUE/01/2016	KY829000.1		

5.5 RT-PCR punto final

Se emplearon iniciadores previamente reportados por Kim *et al.* (2007) y Chiou *et al.*, 2014 (45,46), para amplificar un fragmento de 338 pares de bases del gen N. Además, se emplearon dos pares de iniciadores de diseño propio dirigido al gen S, con un tamaño de 834 (S1) y 1135 (S1-2) pares de bases, respectivamente. Las reacciones se prepararon con una mezcla en volumen final de 10 µl más 3 µl de la muestra de RNA (en promedio 4.6 ng/µl); la mezcla de reacción se realizó empleando el paquete comercial *OneStep RT-PCR kit* (QIAGEN). Se utilizó en todos los casos la misma proporción en la mezcla de reacción; la cual consistió en 2.5 µl de *QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5X*, 0.5 µl de *QIAGEN OneStep RT-PCR enzyme mix* (*Omniscript*, *Sensiscript reverse transcriptase* y *HotStart Taq DNA polymerase*), 0.5 µl de mezcla de *dNTP's*, 0.5 µl de los iniciadores delantero y reverso (c/u), complementando con agua libre de RNAasas (5.5 µl) para ajustar un volumen de 10 µl de la mezcla, finalmente se adicionaron 3 µl de cada muestra, para generar un volumen total de 13 µl. Esta mezcla se realizó en tubos de 1.5 ml nuevos y estériles, se dio un pulso de agitación y posteriormente un pulso de centrifugación para llevar al fondo todo el contenido del mismo, posteriormente se trasladó a tubos para PCR de 0.2 ml, donde se llevó a cabo la reacción. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Axygen MaxyGene Thermal Cycler II*, bajo las siguientes constantes: retrotranscripción (50°C/30 min), inactivación de la retrotranscripción y desnaturalización inicial (94°C/15 min), seguido por 45 ciclos, compuestos por temperatura de desnaturalización (90°C/ 30 seg), alineamiento (S800: 59°C, S1000: 60°C; N: 58°C/ 60 seg), posteriormente la extensión (72°C/1

min), por último un ciclo de 72°C por 10 minutos para extensión final. Una vez finalizada la reacción se realizó la electroforesis de los productos en gel de agarosa al 1.5% teñido con *Midori Green* a un volumen de 100ml, para posteriormente ser visualizado en fotodocumentador.

5.6 RT-PCR tiempo real

Para los ensayos de RT-PCR en tiempo real se utilizaron los iniciadores descritos por Wang *et al.* (2014) (55), los cuales se encuentran dirigidos al gen S (región conservada), se emplean dos diferentes sondas, las cuales están diseñadas para hibridar con cepas de virus variantes (S-VAR) y virulentos (S-VIR). Además, se estandarizó una prueba de diseño propio denominada S1-INI, la cual está dirigida para amplificar un fragmento conservado del gen S1 del vDEP. Las pruebas se realizaron empleando una mezcla de reacción del paquete comercial *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (QIAGEN), utilizando 10µl de master mix 2X, 0.2 µl de RT Mix, 0.75 µl de iniciadores (c/u), 0.5 µl de las sondas específicas, 5.8 µl de agua libre de RNAasas para ajustar un volumen de 18 µl. Finalmente, para completar la reacción, se añadió 2 µl de cada una de las muestras a evaluar. Para el desarrollo de la prueba se utilizó el termociclador *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (BioRad), con el siguiente programa: retrotranscripción (50 °C/20 min), desnaturalización (95°C/30 seg) y 40 ciclos de desnaturalización (94°C/45 seg), hibridación y lectura (60°C/45 seg).

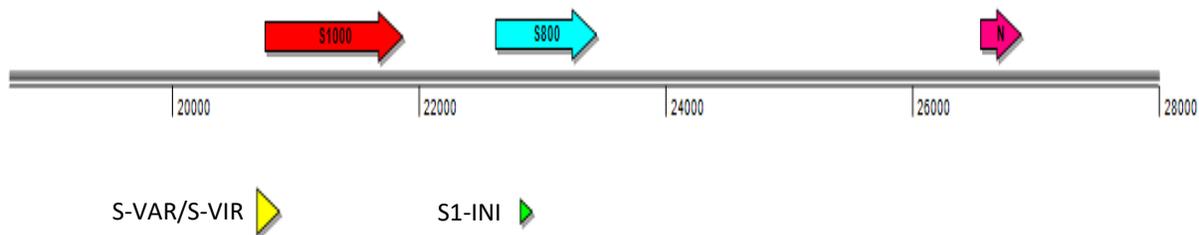


Figura 5. Genoma del virus de la diarrea epidémica porcina y sitios de amplificación para las distintas pruebas de RT PCR en punto final y tiempo real.

Para la estandarización de la prueba de diseño interno (S1-INI), se realizaron experimentos con gradientes de temperaturas para el alineamiento de los iniciadores, con muestras previamente reportadas como positivas. El gradiente se realizó con temperaturas oscilantes entre 50 y 60 °C, para las cuales se observaron las curvas reportadas, así como su punto de corte (Cq) y la presencia de amplificaciones no específicas.

5.7 Cuantificación absoluta de la carga viral

Para realizar la cuantificación absoluta en las pruebas de RT-PCR en tiempo real se requirió clonar el fragmento amplificado. La clonación se llevó a cabo empleando el vector plasmídico pJET1.2/blunt (*CloneJET PCR Cloning Kit*, Thermo Fisher Scientific). Para la cuantificación en la prueba S-VAR/S-VIR se emplearon los vectores previamente transformados por Lara-Romero et al., (2017) (44). Para la cuantificación en la prueba INI se construyeron dos vectores con el inserto de una cepa variante y una cepa virulenta del vDEP. Previamente, se obtuvo cDNA, bajo las constantes referidas por el fabricante (*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*, Thermo Fisher Scientific), dicha reacción se realizó para la obtención de un volumen total de 20µl, posteriormente se realizó una

prueba de PCR, utilizando los iniciadores INI y la mezcla de reacción *GoTaq Green PCR Master Mix* (Promega) en un volumen de 100 μ l, posterior a la amplificación se observó en un gel de agarosa al 2%. Los productos fueron purificados con el paquete comercial *QIAquick Gel Extracción Kit* (QIAGEN) bajo las condiciones establecidas por el fabricante. Los productos purificados fueron ligados al vector pJET empleando la mezcla: 10 μ l de Buffer de reacción, 1 μ l de Bluting enzima, 1 μ l de vector pJET, 1 μ l de ligasa y 7 μ l del producto purificado. El vector con el inserto fue empleado para transformar células *E. coli One Shot Top10* (Thermo Fisher Scientific), las cuales fueron sembradas en medio líquido LB, dejando crecer toda la noche a 250 rpm a una temperatura de 37°C. Una vez alcanzado el periodo de crecimiento, se centrifugó y se obtuvo una suspensión de células para la transformación, la cual se llevó a cabo por medio de choque térmico. Se sembró en placa usando agar LB con ampicilina, las colonias que crecieron a las 18 horas fueron seleccionadas para una nueva siembra en medio líquido LB, se dejó incubar por 12 horas y se centrifugó para posteriormente realizar la purificación de los plásmidos empleando el paquete comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Los plásmidos purificados fueron sometidos a una digestión enzimática para liberación del plásmido, utilizando la enzima de restricción *Bgl II*. El DNA extraído fue resuspendido en buffer TE (pH 8.0), se realizaron alícuotas de 50 μ l y fueron almacenadas a -80° C. La concentración final fue determinada por espectrofotometría. La cantidad exacta de moléculas de DNA fue calculada con el programa libre disponible en scienceprimer.com. Se realizaron diluciones decuples del DNA plasmídico (10^{-1} a 10^{-10}), mismas que fueron empleadas en la elaboración de la curva estándar.

5.8 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para determinar la especificidad y sensibilidad analítica de las pruebas utilizando las siguientes formulas(47).

$$sesibilidad = \frac{\textit{verdaderos positivos}}{\textit{total de casos positivos}} \times 100$$

La especificidad se calculó a partir de las muestras negativas, así como los testigos utilizados en cada una de las pruebas.

$$especificidad = \frac{\textit{verdaderos negativos}}{\textit{total de casos negativos}} \times 100$$

6. Resultados.

6.1. Análisis *in silico*

Al realizar el alineamiento con las distintas cepas de referencia se observó que los iniciadores empleados en la prueba S1-800, tienen concordancia, con el 83.3% de las cepas. Así mismo, para los iniciadores empleados en las pruebas de RT-PCR en tiempo real, los dirigidos para las cepas variantes obtuvieron el mejor resultado general, de la misma forma, la concordancia, entre los iniciadores de las pruebas S-Vir y S1-INI, obtuvieron valores parecidos (89.3 y 86.4%). Cabe mencionar, que los iniciadores empleados en las pruebas de RT-PCR en tiempo real, obtuvieron valores más altos en comparación con las pruebas en punto final. En el Cuadro 2 se observan las cepas mexicanas reportadas por Lara-Romero et al. (2017) (44) y el porcentaje similitud de cada uno de los iniciadores de las pruebas.

Cuadro 2. Porcentaje de similitud obtenido del análisis *in silico*.

Iniciadores	Cepas de referencia	Cepas de México
S1-800	83.33	100
S1-2-1000	74.07	70
N	75.92	---
S-Vir	89.39	86.66
S-Var	100	100
S1-INI	86.41	90

6.2 RT-PCR punto final

Para obtener los resultados a partir de las reacciones de RT-PCR se realizaron electroforesis utilizando geles de agarosa al 1.5% para ser visualizados por medio del fotodocumentador; de los tres grupos experimentales se recolectaron 83 muestras en total, dichas muestras obtuvieron un porcentaje de positividad grupal promedio para la prueba S800, de 0 (G1), 2.8 (G2) y 33.9% (G3), mientras que para la prueba S1000, el porcentaje de positividad fue del 13.3, 2.8 y 60.2%; para la prueba N, fue de 75, 95.1 y 81.4%. Por hora de colecta, los valores de positividad se presentan en la Figura 6, la representación numérica se encuentra acompañada de un mapa de calor, entre mayor sea la intensidad de color, mayor será el promedio de muestras positivas.

		RT-PCR punto final								
		S1			S1-2			N		
	hpi	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
0										
10										
20										
30										
40	24	ND	20	14	ND	0	29	ND	100	100
50	48	0	0	14	0	20	57	60	100	57
60	72	0	0	28	40	0	86	100	100	100
70	96	0	0	ND	0	0	ND	80	100	ND
80	120	0	0	85	0	0	100	80	100	100
90	144	0	0	ND	20	0	ND	80	100	ND
100	168	0	0	28	20	0	29	50	66	50

Figura 6. Porcentaje de positividad en las pruebas de RT-PCR punto final utilizando los distintos iniciadores.

6.3. RT-PCR en tiempo real

6.3.1. Porcentaje de positividad

Para la observación de los resultados obtenidos en la prueba de RT-PCR tiempo real, se prescinde de la utilización del gel de agarosa, ya que estos se observaron por medio del programa Bio-Rad CFX Manager, mediante el cual se observaron las curvas de amplificación, con las que se identificaron las muestras positivas, cuyo porcentaje grupal del mismo fue de 100 (G1), 85.4 (G2) y 81.4% (G3) para las pruebas S-Vir, 10.8, 100 y 24.2% para la prueba S-Var y de 100, 86.4 y 90% en la prueba S1-INI, respectivamente; desglosándose por hora de muestreo se pueden observar los porcentajes de positividad en la Figura 7.

		RT-PCR tiempo real								
		S-Vir			S-Var			S1-INI		
	hpi	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
0										
10										
20										
30	24	ND	100	100	ND	100	14	ND	100	100
40	48	100	100	100	20	100	0	100	100	100
50	72	100	100	71	20	100	57	100	100	100
60	96	100	100	ND	0	100	ND	100	100	ND
70	120	100	66	86	0	100	0	100	66	100
80	144	100	66	ND	25	100	ND	100	66	ND
90	168	100	66	50	0	100	50	100	66	50
100										

Figura 7. Porcentaje de positividad en las pruebas de RT-PCR tiempo real utilizando los distintos iniciadores.

6.3.2. Valores de cuantificación (Cq)

Una de las posibilidades de realizar las pruebas de RT-PCR en tiempo real, es que el resultado puede ser expresado con valores cualitativos o cuantitativos. En relación al análisis cualitativo puede expresarse de dos formas, con el valor de cuantificación (Cq) y con el valor ajustado a la Cq. Se decidió presentar los dos análisis ya que es común que los clínicos y médicos veterinarios que hacen uso del laboratorio de diagnóstico reciban los resultados, en muchos casos, de esta forma. A continuación, se presentan los resultados con relación al valor de cuantificación en donde se promedió el valor de las muestras analizadas por hora de colecta (Figura 8). Empleando con un mapa colorimétrico, iniciando desde las tonalidades rojizas correspondiente a los valores más bajos (mayor concentración relativa de RNA viral), hasta llegar a las tonalidades verdes con los valores más altos (menor concentración relativa de RNA viral), por lo que se observó que el

promedio de Cq por prueba realizada fue de 28.5 para S-Vir, 33 para S-Var y 30.6 para la prueba S1-INI.

		RT-PCR tiempo real								
		S-Vir			S-Var			S1-INI		
	hpi	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
40	24	ND	31	30		30	32	ND	32	33
35	48	31	32	31	37	33	-	32	33	32
30	72	28	31	25	32	33	32	30	32	31
25	96	29	31	ND	-	32	ND	31	33	ND
20	120	30	30	20	-	33	32	33	32	21
15	144	30	28	ND	37	32	ND	31	32	ND
10	168	31	30	21	-	32	-	34	32	22

Figura 8. Valores de cuantificación (Cq) promedio obtenidos durante la fase experimental. El color rojo representado en un mapa de calor indica un valor de Cq más bajo y el verde, un valor más alto.

Es importante señalar que, en esta forma de representar los resultados, el valor expresado es inversamente proporcional a la cantidad de material genético contenido en las muestras colectadas, lo que significa que a menor Cq, mayor concentración relativa del material genético del vDEP.

6.3.3 Valores ajustados a Cq

Para expresar los resultados como valor ajustado a Cq, el valor obtenido debe restarse al ciclo considerado como punto de corte en donde la prueba es positiva, en este caso, el ciclo 40. Esta forma de representar los resultados indica incrementos en números relativos, que corresponden a una mayor concentración del material genético del vDEP. Los valores por día fueron promediados y se emplearon para graficar en relación al tiempo de experimentación (Figura 9 a 11).

En el G1 se observó que los valores ajustados más altos se obtuvieron con las pruebas S-Vir, seguido de la prueba S1-INI, al mismo tiempo se observó un comportamiento similar a lo largo de las horas post inoculación, se observa que para la prueba S-Var, el comportamiento de los resultados fue errático, así como los valores ajustados por debajo de lo esperado.

Valores ajustados G1

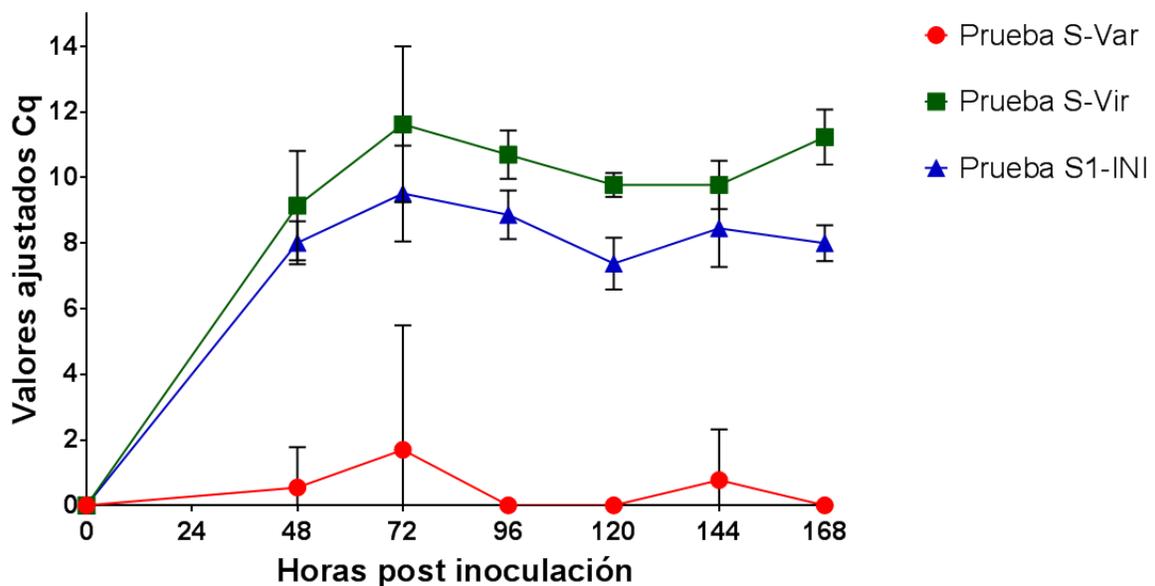


Figura 9. Promedio de los valores ajustados a Cq del G1 a lo largo del tiempo de experimentación. Se observan los valores promedio más altos empleando la prueba S-VIR.

En el G2 se observó que los valores ajustados más altos se obtuvieron con la prueba S-Vir, sin embargo, se identificó un comportamiento, similar entre las tres pruebas realizadas a lo largo del tiempo post inoculación, de la misma forma, se observa una tendencia uniforme en los valores obtenidos a lo largo del tiempo.

Valores ajustados G2

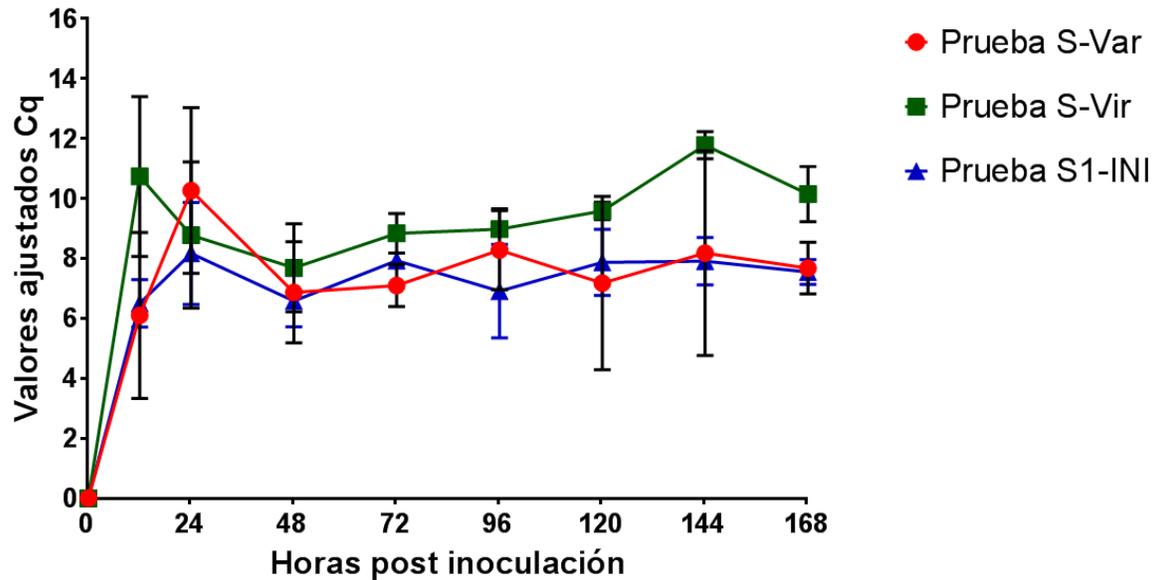


Figura 10. Promedio de los valores ajustados a Cq del G2 a lo largo del tiempo de experimentación. Se observan los valores promedio más altos empleando la prueba S-VIR.

En el G3, se pudo observar que la prueba S-Vir, obtuvo una mayor positividad en comparación con las demás pruebas realizadas, en la prueba S1-INI se observa un comportamiento similar a la anterior; en contraste la prueba S-Var, refleja una identificación más baja y errática en relación a las otras pruebas.

Valores ajustados G3

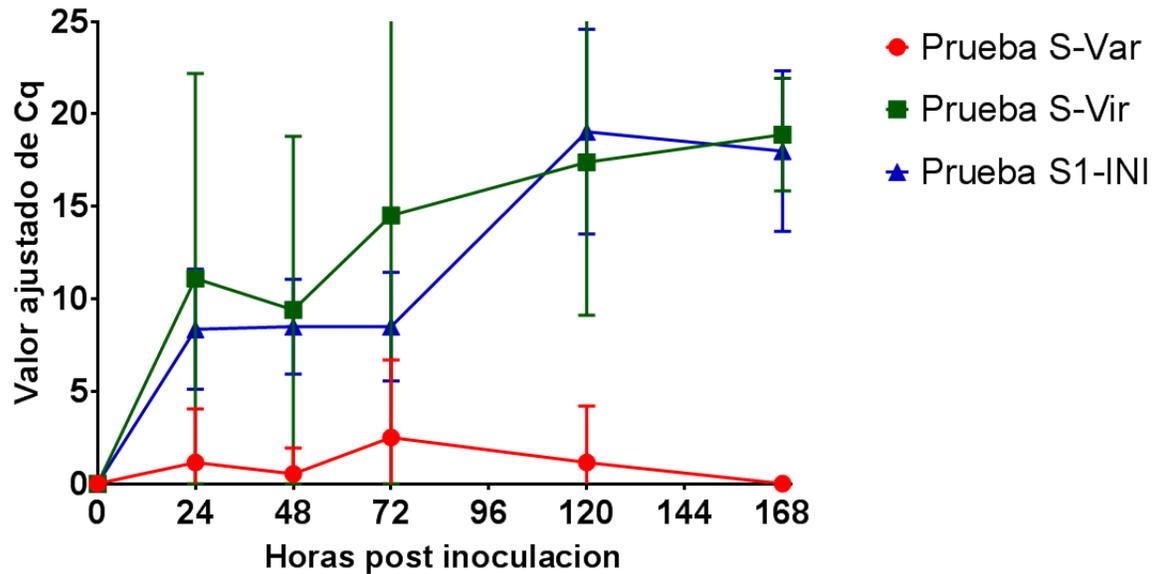


Figura 11. Promedio de los valores ajustados a Cq del G3 a lo largo del tiempo de experimentación. Se observan los valores promedio más altos empleando la prueba S-VIR.

En el caso del G3 se analizaron de manera conjunta, dos tipos de muestras más, la muestra colectada con hisopo corto (HC), vía rectal y una muestra de fluido colectada por medio de hisopo oral (HO). El comportamiento registrado para las muestras de HC, a través de las diferentes horas post inoculación, fue similar entre las tres pruebas evaluadas (Figura 12).

Valores ajustados G3 HC

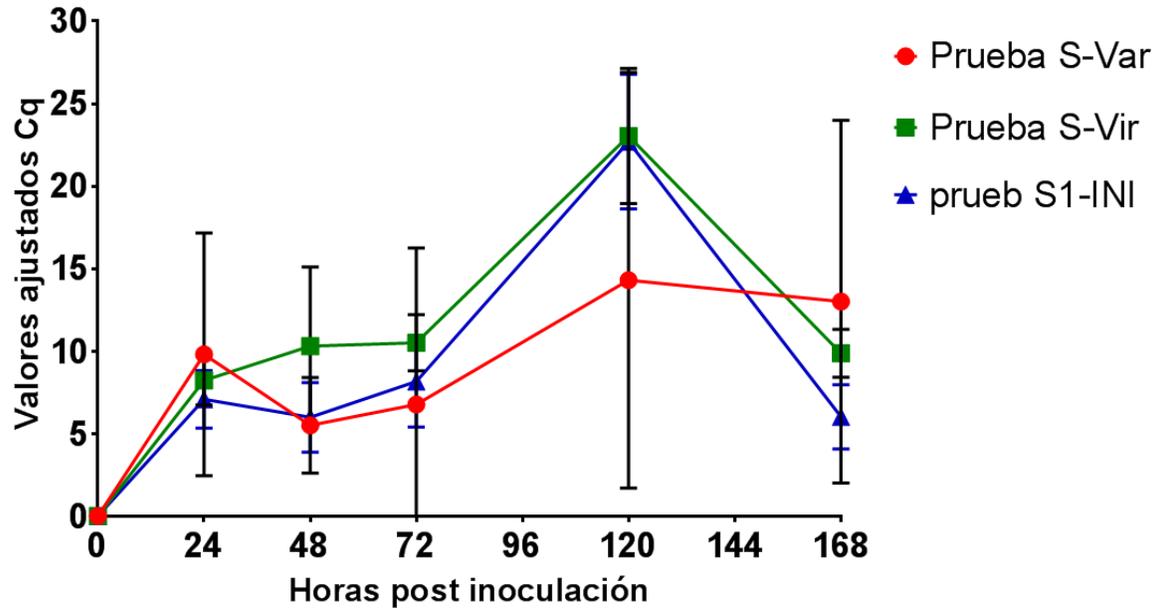


Figura 12. Promedio de los valores ajustados del G3, con muestras obtenidas por medio de hisopo rectal corto (HC).

En los valores correspondientes de las muestras obtenidas por medio de HO, se observa un comportamiento similar entre las pruebas S-Vir y la prueba S1-INI, en cuanto la prueba S-Var, se observó un comportamiento errático.

Valores ajustados G3 HO

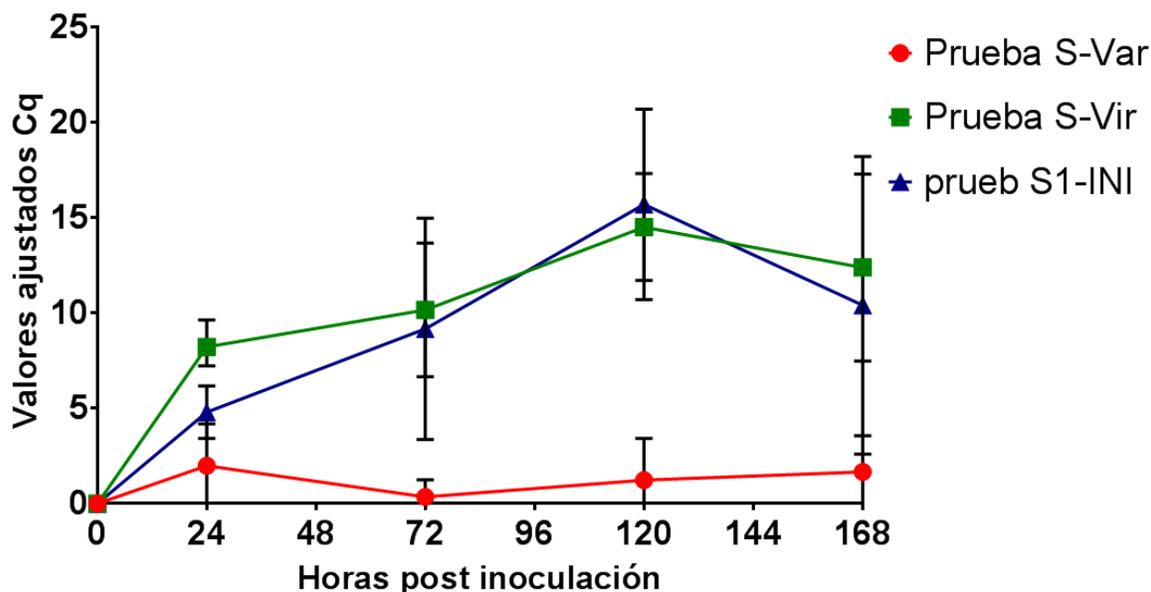


Figura 13. Promedio de los valores ajustados obtenidos del grupo 3 con muestras de fluido oral colectadas por medio de hisopo (HO).

6.3.4 Cuantificación absoluta por RT-PCR en tiempo real

6.3.4.1 Construcción de curvas de calibración

Para las pruebas de S-VAR y S-VIR, se utilizaron curvas de calibración previamente estandarizadas en el laboratorio. Los valores de cuantificación obtenidos indican límites de detección de 1 a 10^7 copias de equivalentes genómicos por ml. Las curvas de cuantificación obtenidas por medio de la metodología de diseño interno (S1-INI) se presentan en la Figura 14. Se observó un patrón de dilución en las diferentes concentraciones evaluadas por ciclo de amplificación, de la misma forma se comprobó que existió concordancia entre cada prueba inter-ensayo, ya que, en todos los casos, la amplificación de cada una de las diluciones es correspondiente entre ellas. En la curva de calibración de la prueba virulenta, las Cq resultantes abarcaron a partir del ciclo 7.8, hasta un

máximo de 34.9, mientras que, para la prueba variante, fueron entre los ciclos 7.3 y 35.18. Los valores de cuantificación obtenidos indican límites de detección de 1 a 10^9 copias de equivalentes genómicos por ml, para ambas pruebas. Todos los valores obtenidos durante la cuantificación de la carga viral, fueron transformados a Log10.

Una vez construidas las curvas de calibración se logró cuantificar la carga viral por muestra. Los valores promedio y la desviación estándar de cada grupo, por día de experimentación se muestran en las Figuras 15 a 17 .

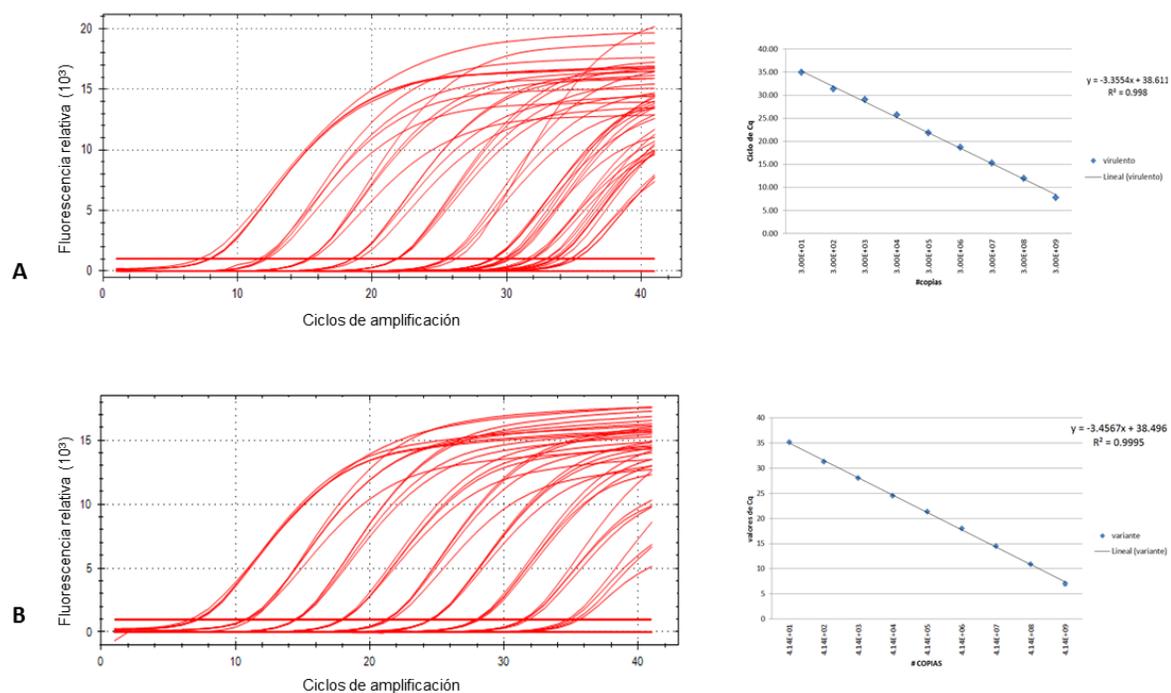


Figura 14. Curva de calibración de la prueba S1-INI. A) Diluciones seriadas y amplificación empleando un vector con el inserto de una cepa virulenta. B) Diluciones seriadas y amplificación empleando un vector con el inserto de una cepa variante.

En el G1 el comportamiento de las pruebas S-Vir y S1-INI, presentaron una tendencia similar, durante todo el tiempo de experimentación, con una cuantificación máxima a las 72 horas con valores de $1.29E+06$ y $1.75E+05$, para estas, comparativamente, a las 15049 copias cuantificadas por la prueba S-Var (Figura 15).

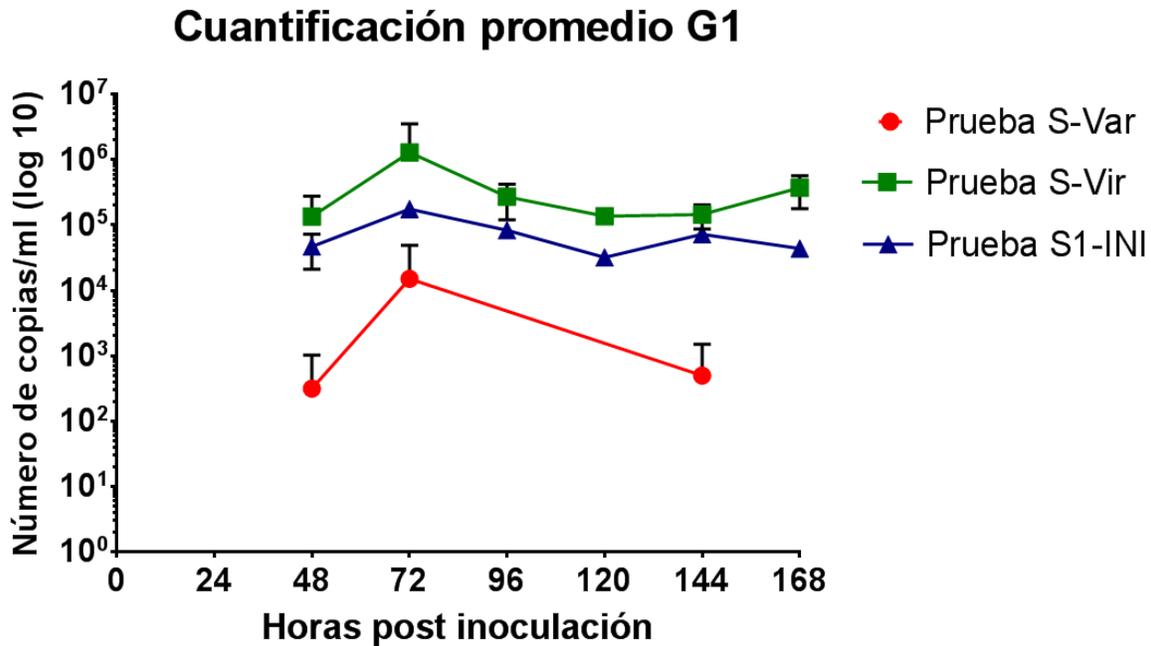


Figura 15. Promedio de los valores de cuantificación del G1 con muestras rectales obtenidas por medio de hisopo largo.

En el G2, se observa en todas las pruebas una tendencia similar entre ellas, identificando una menor cuantificación general con la prueba S1-INI, en comparación con las otras pruebas. La cuantificación máxima se presentó a las 12 horas para la prueba S-Vir, con una cuantificación de $8.69E+05$. Los valores máximos para las pruebas S-Var y S1-INI, se registraron a las 24 horas ($1.27E+06$ y $8.38E+04$ número de copias, respectivamente), posteriormente se presentó una baja generalizada en la cuantificación a las 48 horas y un repunte a las 144 horas post infección. Se observó menor desviación estándar en la prueba S1-INI,

comparativamente con las otras pruebas, lo que indica una menor variación entre los valores reportados (Figura 16).

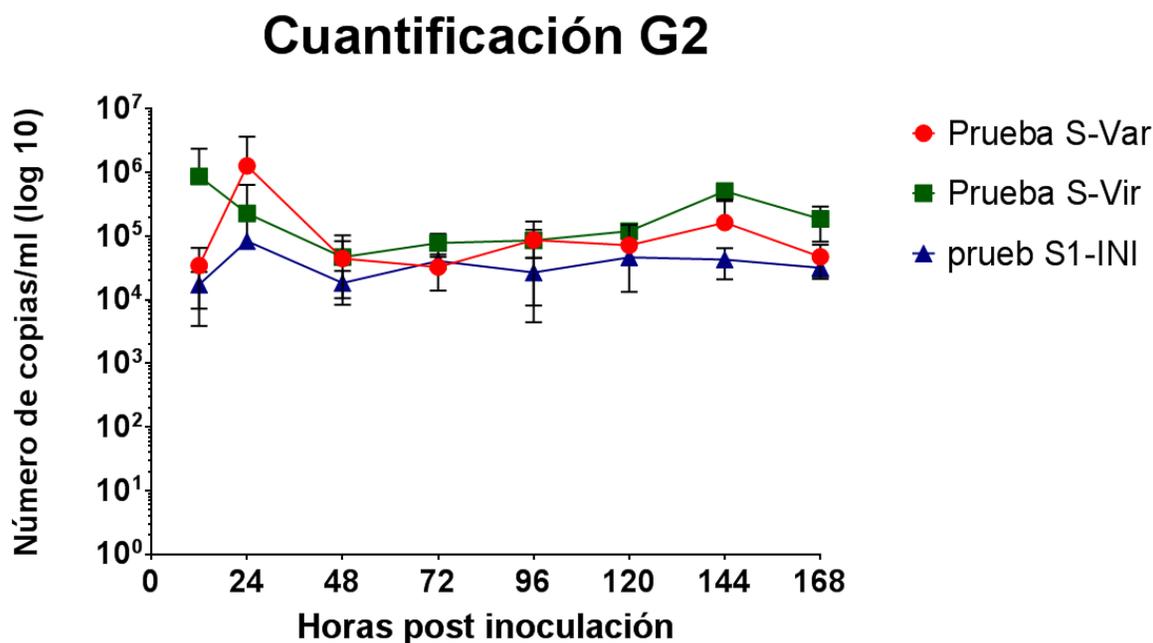


Figura 16. Promedio de los valores de cuantificación del G2 con muestras rectales obtenidas por medio de hisopo largo.

En el G3, se observó una tendencia a incrementar la carga viral de forma positiva a lo largo del tiempo, identificando un pico máximo en la cuantificación con valores de $4.74E+08$ para la prueba S-Vir y $6.79E+08$, para la prueba S1-INI, a las 120 horas post inoculación (Figura 17).

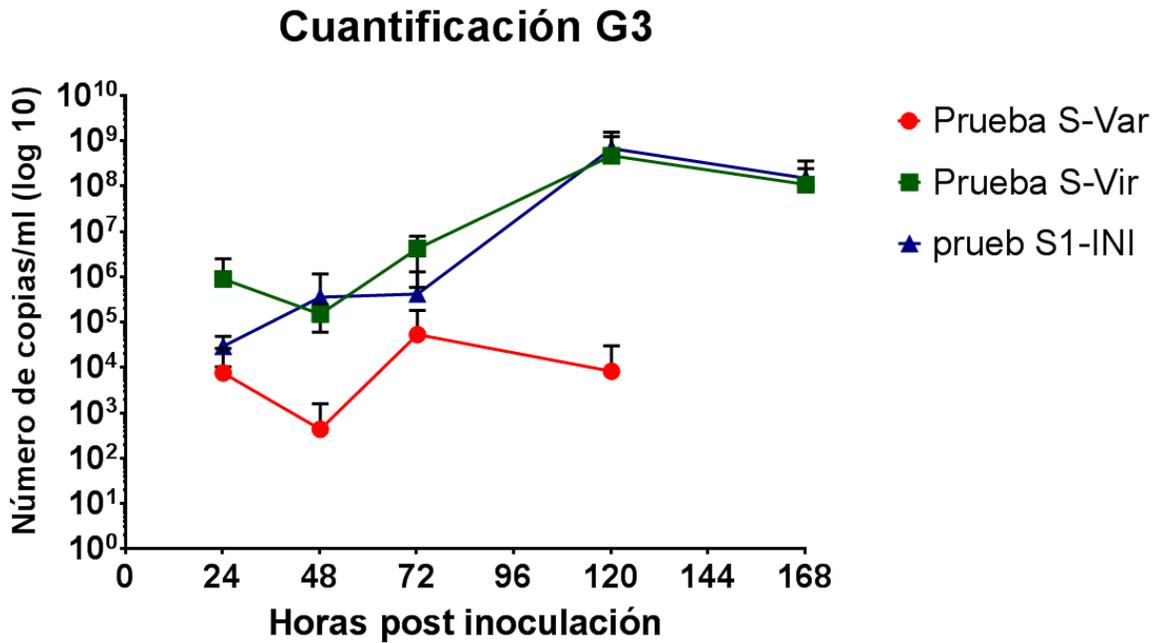


Figura 17. Promedio de los valores de cuantificación del G3 con muestras rectales obtenidas por medio de hisopo largo.

Los resultados obtenidos de las muestras colectadas por medio de hisopo corto y de hisopo oral del G3 se presentan en las Figuras 18 y 19. En el caso de las pruebas realizadas para el muestreo con hisopos cortos, se detectó la mayor cuantificación a las 168 horas post infección con un valor de $2-3.24E+09$ para la prueba S-Vir y de $3-92E+09$ para la prueba S1-INI a las 120 horas post infección (Figura 18).

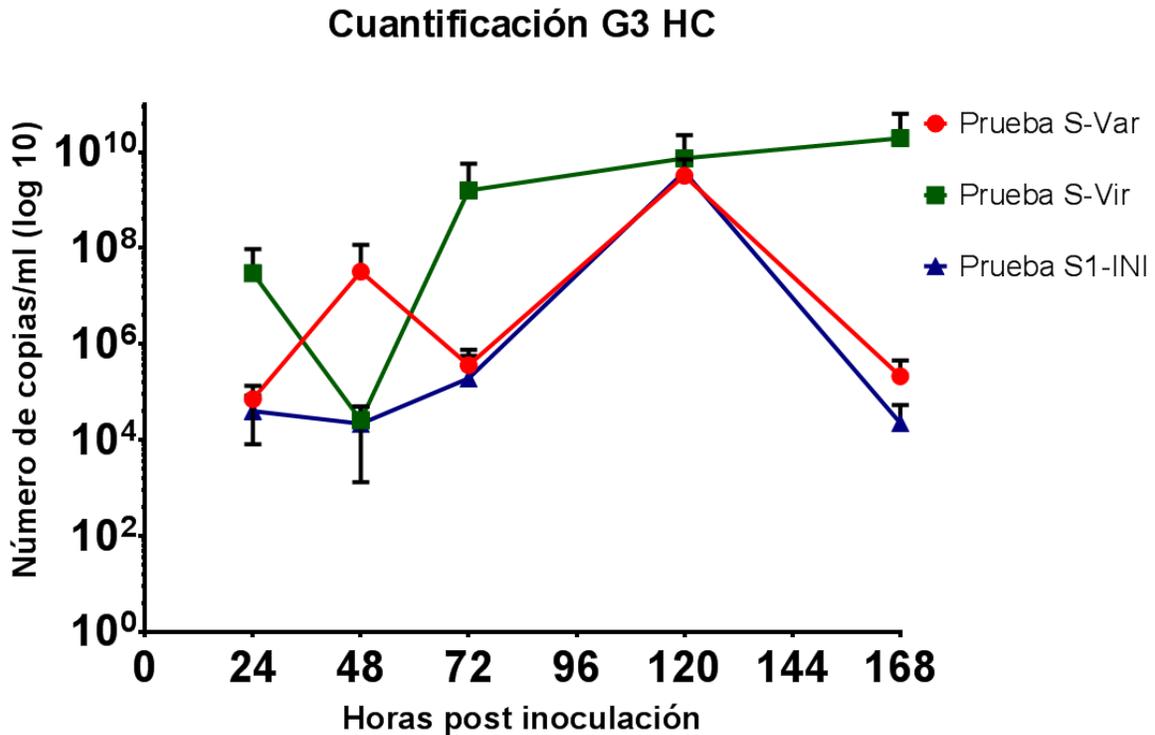


Figura 18. Promedio de los valores de cuantificación del G3 con muestras rectales obtenidas por medio de hisopo corto.

En las muestras de fluidos orales colectados con hisopo, se pudo observar que las pruebas correspondientes a S-Vir y S1-INI, presentan valores similares a lo largo del experimento, teniendo un pico de amplificación máximo a las 168 horas post infección ($2.16E+07$ y de $1.58E+08$ número de copias, respectivamente). Para la prueba S-Var, se presentó una baja cuantificación, con un máximo de $1.9E+03$ número de copias (Figura 19).

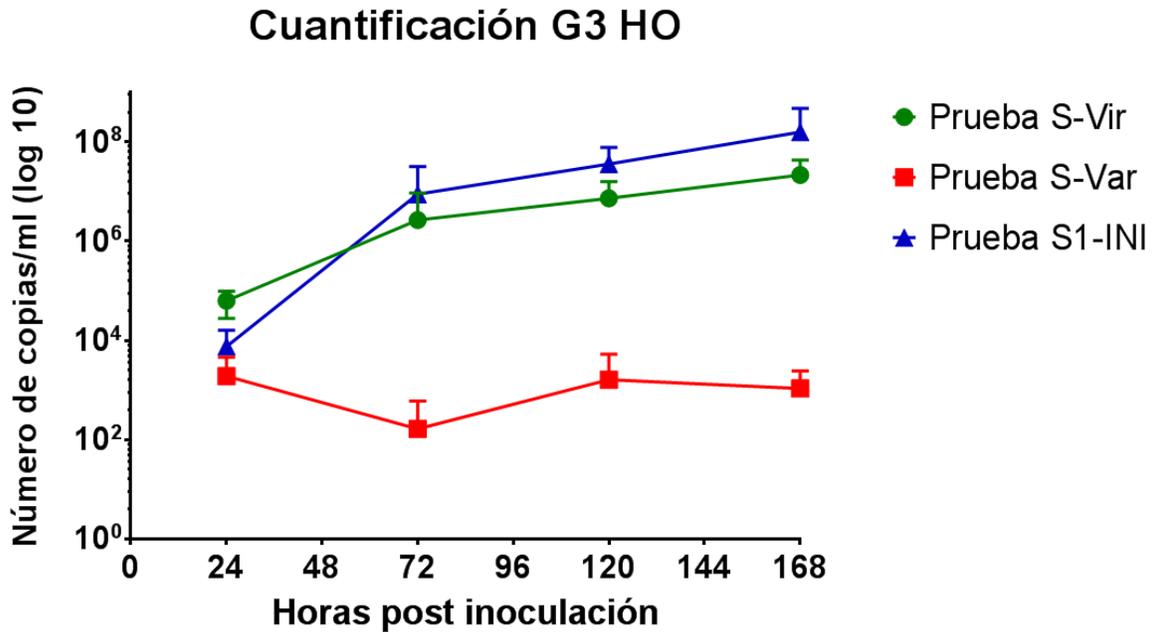


Figura 19. Promedio de los valores de cuantificación del G3 con muestras de fluido oral obtenidas por medio de hisopo oral.

6.4 Análisis estadístico

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas se obtuvieron los valores de sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos por cada grupo en cada una de las pruebas (Cuadros 3 y 4) (47,48). En el Cuadro 5 se observa una baja sensibilidad para las pruebas dirigidas al gen S, en los dos primeros grupos (3.7, 7.69 y 18.5, 7.69%), mejorando considerablemente en el G3, esto indica la alta probabilidad de tener resultados falsos negativos. En contraste, las pruebas realizadas para el gen N, el promedio registrado entre los tres grupos, fue de 87.49%. En cuanto los valores predictivos, los valores negativos, resultaron con bajos valores.

Cuadro 3. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para las pruebas de RT-PCR punto final.

Valores de especificidad, sensibilidad y valores predictivos en pruebas de RT-PCR en punto final.												
Grupo	Muestras totales	Controles		Positivos	Negativos	Total	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)	Exactitud (%)	
		Positivos	Negativos									
S800												
G1	26	1	1	1	27	28	3.70	100.00	100.00	3.70	7.14	
G2	25	1	1	2	25	27	7.69	100.00	100.00	4.00	11.11	
G3	32	1	1	13	21	34	39.39	100.00	100.00	4.76	41.18	
S1000												
G1	26	1	1	5	23	28	18.52	100.00	100.00	4.35	21.43	
G2	25	1	1	2	25	27	7.69	100.00	100.00	4.00	11.11	
G3	32	1	1	22	12	34	66.67	100.00	100.00	8.33	67.65	
PEDN												
G1	26	1	1	22	6	28	81.48	100.00	100.00	16.67	82.14	
G2	25	1	1	25	2	27	96.15	100.00	100.00	50.00	96.30	
G3	32	1	1	28	6	34	84.85	100.00	100.00	16.67	85.29	

En el Cuadro 4 se presenta la sensibilidad promedio para cada uno de los grupos y protocolos de RT-PCR en tiempo real evaluados. La prueba S1-INI presentó mayor porcentaje de sensibilidad y exactitud. La prueba S-Var registró los valores más bajos. En comparación con los protocolos evaluados de RT-PCR en punto final estas pruebas tuvieron un mejor desempeño.

Cuadro 4. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos para las pruebas de RT-PCR en tiempo real.

Valores de especificidad, sensibilidad y valores predictivos en pruebas de RT-PCR en tiempo real.												
Grupo	Muestras totales	Controles		Positivos	Negativos	Total	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)	Exactitud (%)	
		Positivos	Negativos									
S-Var												
G1	26	1	2	3	27	29	14.8	100.00	100.00	8.00	20.69	
G2	25	1	2	22	25	28	88.5	100.00	100.00	40.00	89.29	
G3	32	1	2	6	21	35	21.2	100.00	100.00	7.14	25.71	
S-Vir												
G1	26	1	2	5	26	29	100.0	100.0	100.0	100.0	100.00	
G2	25	1	2	2	22	28	88.5	100.0	100.0	40.0	89.29	
G3	32	1	2	22	27	35	84.8	100.0	100.0	28.6	85.71	
S1-INI												
G1	26	1	2	22	26	29	100.0	100.0	100.0	100.0	100.00	
G2	25	1	2	25	22	28	88.5	100.0	100.0	40.0	89.29	
G3	32	1	2	28	30	35	93.9	100.0	100.0	50.0	94.29	

7. Discusión.

A partir de la aparición de nuevas cepas del virus de la diarrea epidémica porcina en el continente asiático y su posterior llegada al continente americano, con los primeros casos en Estados Unidos y su posterior diseminación por los países de la región a partir del 2013, el desarrollo de técnicas diagnósticas eficientes ha sido una prioridad para la contención de esta enfermedad. En el caso de la técnica de RT-PCR factores como la practicidad y el potencial cuantitativo, ha contribuido en un aumento en el uso de esta herramienta diagnóstica (13,14).

El desarrollo de protocolos de diagnóstico molecular para el vDEP, considerando con la situación actual, es de suma importancia. Esto debido a la alta capacidad de variación genética del virus, se ha registrado una elevada aparición de cepas nuevas a partir de la aparición de la enfermedad, un ejemplo de esto es el reporte de más de 90 cepas diferentes en Estados Unidos a partir del año 2014 (49). En México, los reportes de la aparición de nuevas cepas se basan principalmente en la caracterización de la proteína S del virus, como lo menciona Trujillo y Lara Romero. (17,44).

En los análisis *in silico* realizados a partir de cepas circulantes en el mundo, así como en cepas reportadas para México, se encontró una alta similitud con los iniciadores utilizados (86.64 y 86.33%) respectivamente. Debido a la falta de información en México para el análisis de los indicadores para el gen N, reportados por Chiou *et al.* (46), su similitud con las cepas analizadas fue de 75.92%.

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas de RT-PCR en punto final indican

resultados contrastantes, con respecto a los resultados del análisis *in silico*, ya que los porcentajes de positividad fueron muy bajos en los grupos G1 y G2.

En el G2, se observó una positividad mayor con la prueba dirigida al gen N, las cuales, en general, presentaron una mejor detección en todos los grupos, una de las razones puede ser que, debido a que el producto de amplificación es de un menor tamaño, su extensión es más eficiente en la prueba de RT-PCR, que con productos de mayor tamaño, como en las pruebas realizadas para el gen S (50).

Una de las ventajas en la utilización de las técnicas de RT-PCR en tiempo real, como lo mencionan Miller *et al.* (2015) (39), es la mayor capacidad de detección de la prueba comparándola con la RT-PCR en punto final. Se menciona una mejora de esta prueba en términos de sensibilidad, aumentando hasta 10 a 100 veces más este valor. Esta situación se logró observar en el presente estudio, ya que el porcentaje de positividad promedio obtenido fue mayor, comparándolo con las pruebas de RT-PCR punto final.

Para una evaluación integral, en el caso de los datos obtenidos por RT-PCR en tiempo real, una buena alternativa es realizar la comparación correspondiente entre cada grupo con valores ajustados y la cuantificación promedio, ya que no son excluyentes entre ellas; así se logra observar una tendencia en las gráficas del G1, donde se mantiene una evolución similar a lo largo de las horas post inoculación, para las pruebas S-VIR y S1-INI.

En el caso del G2, se registró una evolución similar, observando valores altos a las 12 y 24 hpi, para la prueba S-Vir, seguido de un repunte a las 144 hrs. Esto es equivalente a la evaluación del Cq ajustado. Así mismo, las gráficas correspondientes al HL del G3, muestran valores más altos y se observa una

mayor positividad, relacionado con una menor Cq promedio. En el caso de la comparación con las pruebas de RT-PCR punto final, se observa positividad promedio menor, situación similar a lo reportado por Miller *et al.* y Schmittgen *et al.* (39,51), que mencionan que las pruebas de RT-PCR en tiempo real presentan una mayor sensibilidad, así como una menor variación inter ensayo.

En los datos obtenidos sobre la especificidad, sensibilidad y los valores predictivos de cada grupo de muestras, se observó una amplia diferencia entre las pruebas de RT-PCR punto final y en tiempo real. De acuerdo a lo mencionado por Miller *et al.* y Wang *et al.*, (39,52), durante el diseño de los iniciadores denominados S-Var y S-Vir se reportó un porcentaje de alineación alto, con respecto a las sondas diseñadas. Sin embargo, el número de cepas analizadas en ese estudio fue muy reducido. Una vez que se amplía el número de cepas, el porcentaje de alineamiento disminuye hasta un 86%, esto se refleja claramente con los datos obtenidos de sensibilidad, ya que se pierde la capacidad de detectar animales enfermos (excretando el virus), en las pruebas realizadas. Los valores obtenidos indican un 14.8 y 84.8% de sensibilidad, respectivamente, en contraste con las pruebas S1-INI, en donde la capacidad para detectar animales enfermos aumentó de manera importante.

Los valores predictivos que resultaron a partir de las pruebas diagnósticas realizadas, muestran un 100% de probabilidad de identificar a un individuo enfermo, esto como lo menciona Lumbreras (53), está relacionado a la prevalencia de la enfermedad, la cual era alta. Así mismo, los valores predictivos negativos, los cuales resultaron menos efectivos, ya que las pruebas, principalmente en la prueba S-Var, ya que es la prueba que generó mayor cantidad de resultados

falsos negativos.

La exactitud de la prueba como menciona Ruiz Morales (54), es el valor que reporta a los individuos que teniendo o no la enfermedad fueron diagnosticados eficientemente, en las pruebas diagnósticas realizadas, se pueden observar valores de exactitud muy similares y que concuerdan con los valores de sensibilidad, teniendo mejores resultados en las pruebas de RT-PCR en tiempo real.

8. Conclusiones.

- Se logró estandarizar una prueba de diagnóstico molecular adaptada a cepas nacionales, así como su evaluación con protocolos de referencia estandarizados.
- El protocolo de diagnóstico molecular desarrollado a partir de cepas circulantes en el país, obtuvo valores de sensibilidad y especificidad más eficientes entre los protocolos utilizados.
- La herramienta de diagnóstico molecular (S1-INI) permite la cuantificación de la carga viral y puede ser empleada con muestras colectadas bajo diferentes protocolos.

9. Referencias.

1. Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon J-T, Andersson L. The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genet Soc Am.* 2000;1791(April):1785–91.
2. SAGARPA. Sistema de producción porcina [Internet]. Vol. 11, Sistema De Agronegocios Pecuarios. 2014. Available from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BAC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=024382>
3. FAOSTAT 2018 [Internet]. Faostat 2018. 2018. Available from: <http://www.fao.org/faostat/es/#compare>
4. SIAP. Población ganadera [Internet]. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2015. p. 2015. Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166003/porcino.pdf>
5. FIRA. Panorama agroalimentario, Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial [Internet]. 2016. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200634/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_Cerdo_2016.pdf%5Cnhttp://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61948/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_Bovino_2015.pdf%5Cnhttp://www.porcimex.org/Compendio Estadistic
6. Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Diseases of swine 10th Edition. 10th ed. Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. 2012. 1012 p.
7. Harleman JH, Meyer RC. Life cycle of *Isospora suis* in gnotobiotic and conventionalized piglets. *Vet Parasitol.* 1984;17(1):27–39.
8. Roepstorff A, Nansen P. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. *FAO Animal Health Manual: Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine.* 1998. 35-69 p.
9. Roger SM, Craven JA, Williams I. Demonstration of reovirus-like particles in intestinal contents of piglets with diarrhoea. Vol. 51, *Australian Veterinary Journal.* 1975. p. 536–536.
10. Papp H, László B, Jakab F, Ganesh B, De Grazia S, Matthijnssens J, et al. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol.* 2013;165(3–4):190–9.
11. Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses.* 2017;9(3):1–27.
12. Morilla González A, Estrada Correa A. Gastroenteritis transmisible de los cerdos. In: *Ciencia Veterinaria* [Internet]. 1981. p. 11. Available from: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c01.pdf>
13. Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhoea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1350–3.
14. Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, et al. Emergence of Porcine epidemic diarrhoea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagnostic Investig.* 2013;25:649–54.
15. Puranaveja S, Poolperm P, Lertwatcharasarakul P, Kesdaengsakonwut S, Boonsoongnern A, Urairong K, et al. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhoea virus, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(7):1112–5.
16. Lee C. Porcine epidemic diarrhoea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J* [Internet]. 2015;12:1–16. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0421-2>
17. Trujillo-ortega ME, Beltrán-figueroa R, Juárez-ramírez M, Sotomayor-gonzález A, Hernández-villegas EN, Becerra-hernández JF, et al. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Vet Res* [Internet]. 2016;8–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0763-z>
 18. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses; 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. 2005.
 19. Baker SC. *Coronaviruses: Molecular Biology*. Elsevier. 2008;554–62.
 20. Sjöström H, Noren O, Olsen J. Structure and Function of aminopeptidase N. *Heal (San Fr)*. 2002;31(6):291–306.
 21. Kamau AN, Park JE, Park ES, Yu JE, Rho J, Shin HJ. Porcine amino peptidase N domain VII has critical role in binding and entry of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* [Internet]. 2017;227:150–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.004>
 22. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* [Internet]. 2015;204(2):134–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.017>
 23. Olanratmanee E on, Kunavongkrit A, Tummaruk P. Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2010;122(1–2):42–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.07.004>
 24. Shibata I, Tsuda T, Mori M. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. 2000;72.
 25. Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*. 2012;44(2):167–75.
 26. OIE. Virus de la diarrea epidemica porcina en México. [Internet]. 2016. Available from: www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=19584
 27. OIE. Porcine epidemic diarrhea virus México, notificación inmediata. 2014;1–2. Available from: www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=15288
 28. Pensaert MB, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol*. 1978;58(3):243–7.
 29. Diel DG, Lawson S, Okda F, Singrey A, Clement T, Fernandes MH, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: An overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Res* [Internet]. 2016;226:60–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189041>
 30. Oka T, Saif LJ, Marthaler D, Esseili MA, Meulia T, Lin CM, et al. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet Microbiol* [Internet]. 2014;173(3–4):258–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.012>
 31. Viviana S. de Lozano, María Julia Yáñez AM. *Principios y práctica de la Microscopía Electrónica*. 2014. 83 p.
 32. Woeste S, Demchick P. New version of the negative stain. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57(6):1858–9.
 33. Peña-Castro JM, Gregorio-Ramírez O, Barrera-Figueroa BE. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: Historia,

- fundamentos y perspectivas. *Educ Quim.* 2013;24(2):237–46.
34. Tamay De Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad.* 2013;70–8.
 35. Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2000;25(2):169–93. Available from: <http://jme.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/jme.0.0250169>
 36. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;6(4):279–84.
 37. Soo Hyun Eom, Wang J, Steitz TA. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. Vol. 382, *Nature.* 1996. p. 278–81.
 38. Martínez C, Adriana, Elsa SR, Patricia. BIOTECNOLOGÍA MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PCR ALUMNOS : CORTAZAR MARTÍNEZ. 2004;
 39. Miller LC, Crawford KK, Lager KM, Kellner SG, Brockmeier SL. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction assays for Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) to assess PEDV transmission in growing pigs. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2016;28(1):20–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1040638715621949>
 40. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. In: PUESTA AL DÍA EN MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. 2005. p. 299–305.
 41. Mackay IM. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2002;30(6):1292–305. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/30.6.1292>
 42. Hou X-L, Yu L-Y, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet Microbiol* [Internet]. 2007;123(1–3):86–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TD6-4N3GFHF-2/2/b615a00646cb0b61e63402b131af6599>
 43. Licea Vega JA, Mendoza Saavedra MA, Álvarez Rodríguez M del C, Cruz Sánchez TA, González Ruiz C, García Tinajero R, et al. *Inmunología veterinaria.* 2016. 152 p.
 44. Lara-Romero R, Gómez-Núñez L, Cerriteño-Sánchez JL, Márquez-Valdelamar L, Mendoza-Elvira S, Ramírez-Mendoza H, et al. Molecular characterization of the spike gene of the porcine epidemic diarrhea virus in Mexico, 2013–2016. *Virus Genes* [Internet]. 2017;1–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1528-x>
 45. Kim SY, Song DS, Park BK. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2001;13(6):516–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724144>
 46. Chiou HY, Huang YL, Deng MC, Chang CY, Jeng CR, Tsai PS, et al. Phylogenetic Analysis of the Spike (S) Gene of the New Variants of Porcine Epidemic Diarrhoea Virus in Taiwan. *Transbound Emerg Dis.* 2014;64(1):157–66.
 47. Cuevas Renaud C, Alejo Martínez A. Validez y fiabilidad de las medidas de exposición y medición. Universidad Nacional Autónoma de México. 2010.
 48. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *VETERINARY EPIDEMIOLOGIC RESEARCH. CANADA: AVC Inc.;* 2013.
 49. Jarvis MC, Lam HC, Zhang Y, Wang L, Hesse RA, Hause BM, et al. Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Prev Vet Med.* 2016;123:175–84.
 50. Eduard C i. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). In: *Principios básicos de*

la manipulación genética INGENIERÍA GENÉTICA [Internet]. 2000. p. 1–28.
Available from:
<https://mail.google.com/mail/u/0/%5Cnpapers3://publication/uuid/79652429-AB39-406D-8B38-98EAF95C646>

51. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: Comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 2000;285(2):194–204.
52. Wang L, Zhang Y, Byrum B. Development and evaluation of a duplex real-time RT-PCR for detection and differentiation of virulent and variant strains of porcine epidemic diarrhea viruses from the United States. *J Virol Methods.* 2014;207:154–7.
53. Hernández-Aguado I. Estudios sobre pruebas diagnósticas. In: Lumbreras Lacarra B, editor. *Manual de epidemiología y salud pública para grados en ciencia de la salud.* Madrid: Médica Panamericana; 2011. p. 369.
54. Ruiz Morales Á, Gómez Restrepo C. Evaluación de una prueba diagnóstica. In: *Epidemiología clínica : investigación clínica aplicada.* 2a edición. Bogotá: Médica Panamericana; 2015. p. 625.

