

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE DELTACORONAVIRUS PORCINO
EN MUESTRAS DE HECES MEDIANTE RT-PCR PUNTO
FINAL.

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

PRESENTA
MIGUEL GUILLERMO SEGURA PATIÑO

Asesores:
DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA
M.C. ROLANDO BELTRÁN FIGUEROA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A Miguel Segura, mi amado padre que apoyó mis decisiones hasta el último día de su vida. Siempre te recordaré como la persona que me dio su amor incondicional, que se levantaba de madrugada para trabajar y regresaba de noche con una enorme sonrisa en su rostro y todo para que su familia tuviera un techo sobre su cabeza, comida en la mesa, educación y ropa que vestir; siempre te recordare “Cochecito”.

A Leticia Patiño, mi amada madre que desde el día que nací me da aceptación, apoyo y mucho amor todos los días. Gracias por enseñarme a que nunca debo darme por vencido, por impulsarme para alcanzar mis sueños y sobre todo por el apoyo para terminar mi licenciatura. Te agradezco porque tú también has trabajado para que nunca nos faltara nada en la vida, incluyendo tu amor en los momentos más difíciles y un abrazo cuando parece que todo el mundo de viene sobre tus hijos.

A Brenda Segura, mi amada hermana que a pesar que no le tocó el mejor hermano menor y que muchas veces hemos discutido al punto de dejarnos de hablar y que tenemos formas de pensar y ver la vida muy diferente, le agradezco por siempre estar ahí para mí como una segunda madre cuando más lo necesito.

A Nubia e Isaac Vega, saben perfectamente que los amo como si fueran 2 hermanos más en mi vida que me regañan, me cuidan e incluso me protegen. Gracias por enseñarme cosas de la vida para hacerme más fuerte, más listo y más grande.

Al Master Alfonso, muchas gracias por entrenarme, escucharme y motivarme a superarme y tener el valor para cerrar ciclos. Sabe que usted es considerado como mi 2do padre ya que cuando perdí al mío me apoyo, me ha compartido su sabiduría y sus regaños solo han sido para que sea un mejor ser humano que supere sus límites.

A Shayra, mi amada gemela malvada que a pesar de todos los errores que puedo cometer está ahí para apoyarme en mis momentos de dolor y tristeza, así como los de amor y felicidad.

A esas personas que he conocido a lo largo de mi vida y han permanecido a mi lado apoyándome cuando sentía que ya no iba a poder seguir adelante y se han dado el tiempo para conocerme en mis buenos y malos momentos sacándome una sonrisa, un momento memorable, escuchándome, aconsejándome o simplemente caminando a mi lado: Sarahi, Mariana Peralta, Yutzine, Mirel, Mariana Velazquez, Jhoana, Araceli, Gemma, Elizabeth, Valentina, Minerva, Itzel, Erika, Luisa, Karina Sánchez, Karina Malagón, Mafer, Andrea, Rosa, Rubí, Noemí, Anto, Isra, José Carlos, Amadeus, Elias, Octavio, Víctor Francisco, Francisco, Víctor Landa, Berny, Uriel, Fernando, Cuauhtémoc, Ulises, Iván, Daniel, Everardo, Gerardo, Ed, Freddy, Rody, Israel y Gustavo; en verdad espero contar con ustedes por el resto de mi vida porque ya son parte de mi familia que llevo en el corazón y gracias por regalarme un día, una hora, un minuto e incluso un segundo de su tiempo.

Al Doc Rolando, no tengo palabras para agradecerle el apoyo, las enseñanzas y la paciencia durante todo mi proceso de titulación y servicio social. En verdad

espero que durante muchos años continúe ayudando a más y más estudiantes ansiosos de entrar al gremio.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento al Proyecto PAPIIT 221218 por darme la oportunidad de realizar este proyecto y alcanzar mi titulación; así como al equipo de investigación a cargo de la Dr. María Elena Trujillo.

Contenido

ABREVIATURAS.....	- 1 -
RESUMEN.....	- 3 -
INTRODUCCIÓN.....	- 5 -
1) Descripción, clasificación y genoma del Deltacoronavirus porcino (DCoVP)....	- 7 -
2) Factores que predisponen a la enfermedad.....	- 11 -
3) Patogenia.....	- 13 -
4) Epidemiología del DCoVP.....	- 15 -
5) Pruebas diagnósticas y muestras utilizadas.....	- 19 -
6) Prevención y tratamiento.....	- 23 -
Justificación.....	- 24 -
Hipótesis.....	- 24 -
Objetivos.....	- 24 -
a) Objetivo General:.....	- 24 -
b) Objetivos específicos:.....	- 24 -
Material y Métodos.....	- 25 -
1. Obtención del control positivo.....	- 25 -
2. Selección y análisis de oligonucleótidos.....	- 25 -
3. Precipitación con polietilenglicol (PEG).....	- 27 -
4. Extracción del material genético.....	- 28 -
5. Estandarización de la RT-PCR punto final.....	- 30 -
6. Determinación de la temperatura de fusión.....	- 31 -
7. Electroforesis.....	- 33 -
8. Prueba con muestras de campo.....	- 34 -
Resultados.....	- 35 -
1. Estandarización de las RT-PCR punto final del DCoVP.....	- 35 -
2. Desafío de la técnica.....	- 36 -

Discusión	- 37 -
Conclusiones.....	- 40 -
Referencias	- 41 -
Anexos	- 50 -

Lista de ilustraciones

Imagen 1. Principales enfermedades virales en cerdos provocadas por la subfamilia <i>Coronavirinae</i> divididas por el género al que pertenecen.	- 6 -
Imagen 2. Adaptación de la relación filogenética y organización del genoma de los coronavirus humanos y animales	- 8 -
Imagen 3. Representación gráfica de los componentes estructurales del virión de los coronavirus	- 9 -
Imagen 4. Representación gráfica del genoma del DCoV - 9 -	- 9 -
Imagen 5. Resultados positivos a DCoV por RT-qPCR a 3 años	- 11 -
Imagen 6. Gráfica que muestra los porcentajes de resultados positivos del DCoV esperados para 2019	- 16 -
Imagen 7. Gráfica de muestras sometidas a rRT-PCR para el diagnóstico de DCoV	- 20 -
Imagen 8. Diagrama de la dinámica del DCoV en cerdos destetados de 3 semanas de edad.....	- 21 -
Imagen 9. Incremento en la concentración de material genético detectado en el control positivo del DCoV	- 27 -
Imagen 10. Termociclador utilizado durante el estudio.	- 31 -
Imagen 11. Cámara de electroforesis trabajando a 84 volts.	- 34 -
Imagen 12. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.....	- 35 -

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Resumen de la información de los coronavirus entéricos en cerdos. Muestra sus principales similitudes y diferencias.....	- 18 -
Cuadro 2. Análisis de oligonucleótidos dirigidos al gen que codifica a la proteína M.....	- 26 -
Cuadro 3. Condiciones para el kit SuperScript™ VILO™ de Thermo Fisher Scientific.....	- 31 -
Cuadro 4. Programación de gradientes en Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf.....	- 32 -
Cuadro 5. Condiciones del Termociclador para PCR en gradientes.....	- 33 -
Cuadro 6. Cuadro de resultados de muestras de campo.....	- 36 -

ABREVIATURAS.

µl. microlitros

APN. Aminopeptidasa N

cDNA. Ácido desoxirribonucleico complementario

CoV. Coronavirus

CRP. Coronavirus respiratorio porcino.

DCoVP. Deltacoronavirus porcino

DEPC. Dietilpirocarbonato

DNA. Ácido desoxirribonucleico

DOF. Diario Oficial de la Federación

kb. Kilobases

ml. mililitros

NCBI. *National Center for Biotechnology Information*

nm. Nanómetros

NT. Nucleótido

pb. Pares de bases

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa

PEG. Polietilenglicol

pp. Poliproteínas

RNA. Ácido Ribonucleico

rpm. Revoluciones por minuto

RT. Retrotranscriptasa

SADER. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural

SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, desarrollo rural, pesca y Alimentación

SeCoV. Coronavirus entérico del cerdo.

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

SHIC. *Swine Health Information Center*

Tm. Temperatura de fusión

UPP. Unidad de Producción Pecuaria

VDEP. Virus de la diarrea epidémica porcina

VGET. Virus de la gastroenteritis transmisible

RESUMEN.

Segura Patiño Miguel Guillermo. IDENTIFICACIÓN DE DELTACORONAVIRUS PORCINO EN MUESTRAS DE HECES MEDIANTE RT-PCR PUNTO FINAL. (Bajo la dirección de: Dra. María Elena Trujillo Ortega y el M.C. Rolando Beltrán Figueroa).

En la actualidad los coronavirus no solo tienen un impacto económico y sanitario en humanos, las producciones porcinas enfrentan problemas relacionados a este grupo de virus siendo el Deltacoronavirus porcino (DCoVP) uno de los identificados recientemente dentro del territorio mexicano. Al igual que los virus de Diarrea Epidémica Porcina (VDEP) y el virus de la Gastroenteritis transmisible (VGET) provoca diarrea acuosa, vómito, deshidratación y finalmente la muerte en lechones menores de 3 semanas de edad.

En el presente estudio se estandarizó una prueba de RT-PCR utilizando como control positivo una muestra de heces de un lechón menor a 3 semanas de edad positivo a DCoVP. Los oligonucleótidos dirigidos al gen M fueron analizados mediante la plataforma Primer-BLAST y la plataforma OligoAnalyzer para conocer valores de temperatura de fusión, porcentaje de G-C y estructuras secundarias (horquillas y dímeros). Para mejorar la calidad de la muestra se precipitó con polietilenglicol previa a la extracción con el protocolo de Tioisocianato de guanidina; posteriormente se utilizó el kit SuperScript™ VILO™ de Thermo Fisher Scientific para la síntesis de cDNA. Seguido a esto, se utilizaron 4 diferentes gradientes de temperatura utilizando la función “*Gradient PCR*” del Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf para realizar la PCR, con los oligonucleótidos diseñados se logró un amplicón en cuatro diferentes

gradientes. Para verificar la técnica se procesaron 25 muestras de campo provenientes de una granja del estado de Sonora con problemas de diarrea.

INTRODUCCIÓN.

Desde el establecimiento de la porcicultura mexicana en el siglo XVI, pasando por su auge en la década de los 70's y hasta la actualidad una de las principales preocupaciones ha sido el disminuir los problemas sanitarios, así como incrementar los parámetros productivos y reproductivos. Dentro de los problemas sanitarios de mayor importancia en los últimos años se encuentran los causados por los agentes virales, los cuales pueden provocar enfermedad como agentes primarios o incluso facilitar que otros agentes desarrollen síndromes o complejos con un impacto económico considerable estimado en \$18,280,000.00 mxn en el caso de los coronavirus (Godina & Pacheco, 2016; Beltran, *et al.*, 2017; Mayora, 2018).

Dentro de los virus de importancia en los sistemas de producción porcina se encuentran los Coronavirus (CoV) (orden *Nidovirales*, familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae*), los cuales no sólo afectan a esta especie, sino que también afectan a un gran número de mamíferos y aves provocando afecciones respiratorias, neurológicas y entéricas (Woo, *et al.*, 2012; Homwong, *et al.*, 2016).

Anteriormente se les clasificaba con los grupos 1, 2 y 3 basándose en función de sus relaciones filogenéticas (King, *et al.*, 2011), pero el comité internacional para taxonomía de virus cambió los nombres por los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y desde 2007 con los aislamientos de los virus Bulbul coronavirus HKU11 (BuCoV HKU11), Thrush coronavirus HKU12 y el Munia coronavirus HKU13 (MunCoV HKU13) se incorporó el género *Deltacoronavirus* (DCoV) a esta clasificación (Woo, *et al.*, 2012; Zhang, *et al.*, 2016; Jung, *et al.*, 2016; Diez Izquierdo, *et al.*, 2020; Sino Biological, 2020).

En la actualidad se han identificado seis CoV que afectan a los cerdos, los cuales son: coronavirus respiratorio porcino (CRP), virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, virus de diarrea epidémica porcina (VDEP), Virus de la Gastroenteritis Transmisible (VGET), el Deltacoronavirus porcino (DCoVP) y en 2016 se describió una recombinación entre el VDEP y el VGET que fue nombrado como Coronavirus entérico del cerdo (SeCoV) aunque de este último no existe mucha información; en la **Imagen 1** muestran estas enfermedades divididas por el género al que pertenecen (Piñedos & Mogollón Galvis, 2015; Zhang, et al., 2016; Homwong, et al., 2016; Woo, et al., 2012; Dong, et al., 2016; Jung, et al., 2016; Zuñiga, et al., 2016).

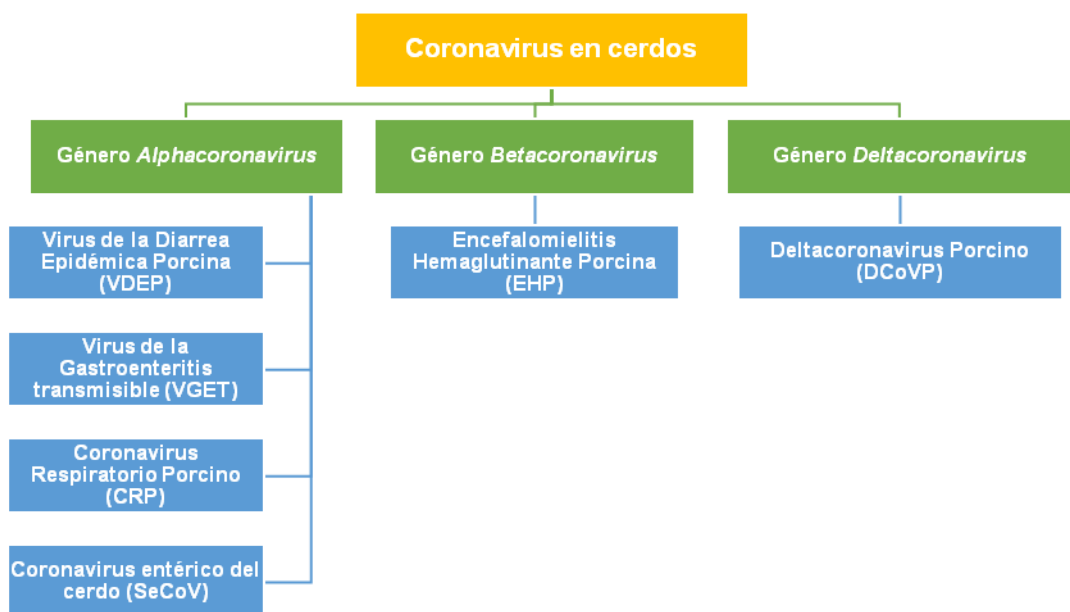


Imagen 1. Principales enfermedades virales en cerdos provocadas por la subfamilia *Coronavirinae* divididas por el género al que pertenecen.

1) Descripción, clasificación y genoma del Deltacoronavirus porcino (DCoVP).

Múltiples estudios se han elaborado sobre de los CoV para conocer los fenómenos virales que encierran debido a su potencial zoonótico. El primer aislamiento del DCoVP se realizó en Hong Kong, China en 2012 durante un estudio de vigilancia epidemiológica para identificar nuevos CoV entre febrero de 2007 y junio de 2011 (Jung, et al., 2016). El análisis genético del DCoVP sugiere que su origen evolutivo tiene mayor relación con los CoV de las aves a diferencia de los *Alphacoronavirus* entéricos previamente identificados en los cerdos que tienen su origen evolutivo de los murciélagos; como se puede observar en la **Imagen 2** los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* comparten un mismo origen evolutivo, pero se muestra el distanciamiento y especificidad entre los coronavirus del cerdo y de otras especies descartando un posible peligro zoonótico (Dong, et al., 2016; Formi, et al., 2016).

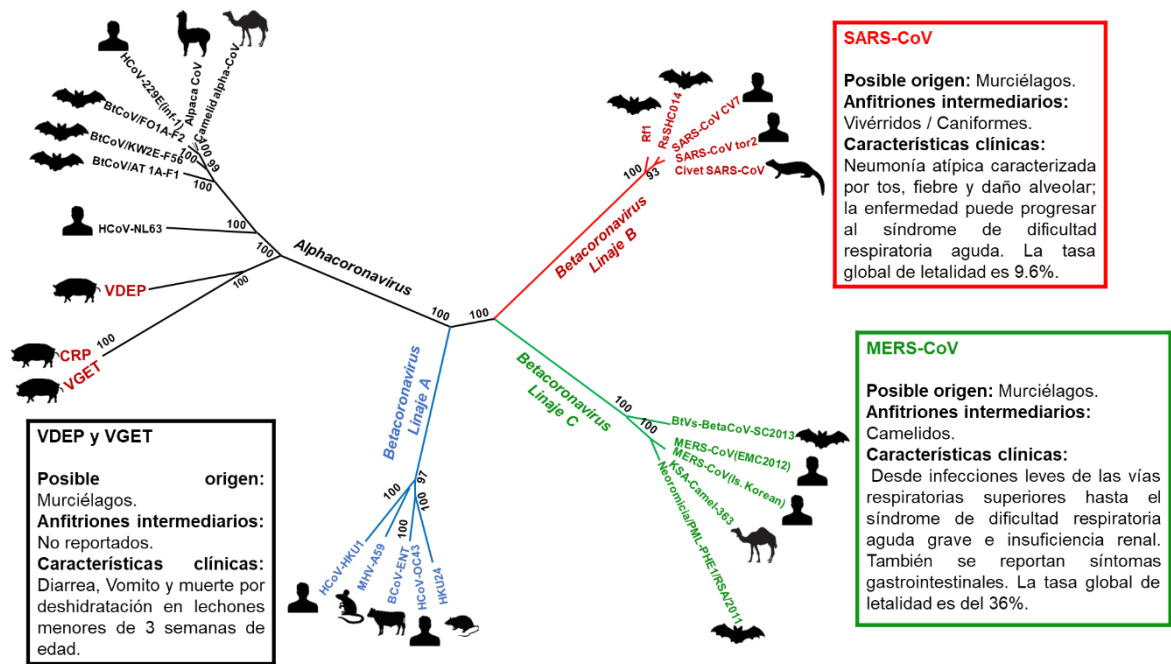


Imagen 2. Adaptación de la relación filogenética y organización del genoma de los coronavirus humanos y animales extraída de Formi, *et al.*, 2016.

En general el DCoV es un virus entérico con estructura similar al de todos los coronavirus siendo catalogado dentro del grupo IV en la clasificación de Baltimore, por ser un virus RNA de cadena sencilla en sentido positivo (Molina López & Manjarrez Zavala, 2015).

En general los CoV son un virus envuelto con aspecto externo similar al de una corona, un diámetro de 10 a 60 nm y de 24.4 a 31.7 kb aproximadamente. Su genoma está conformado por una región no traducida o UTR (del inglés *untranslated region*) 5-UTR, el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) 1a/1b que sintetiza las poliproteínas (pp) 1a y 1ab que procesan 16 proteínas no estructurales como NS6 y NS7; las secuencias para la síntesis de proteínas estructurales: espícula o “spike” (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) (**Imagen 3**) y finalmente la región 3-UTR, en la **Imagen 4** donde se puede observar la representación gráfica del material genético del

DCoVP extraída del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI por sus siglas en inglés) (Jung, et al., 2016; Lee & Lee, 2015; Zhang, et al., 2016; Dong, et al., 2016).

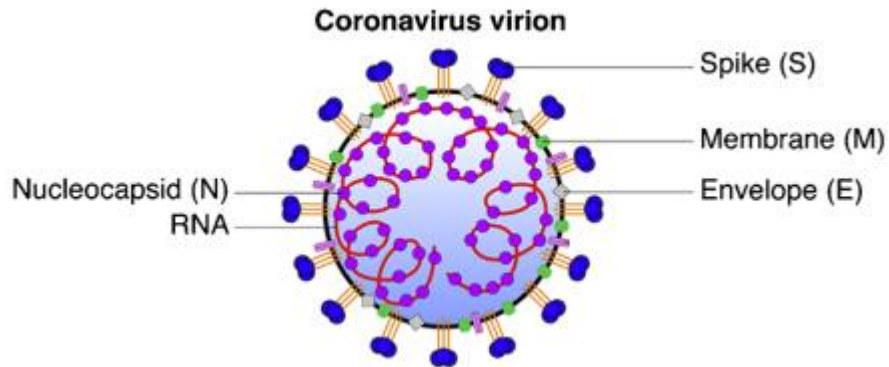


Imagen 3. Representación gráfica de los componentes estructurales del virión de los coronavirus extraída de Millet & Whittaker, 2015. Algunos coronavirus del linaje A de los *Betacoronavirus* presenta Hemaglutinina esteresara en su virión.

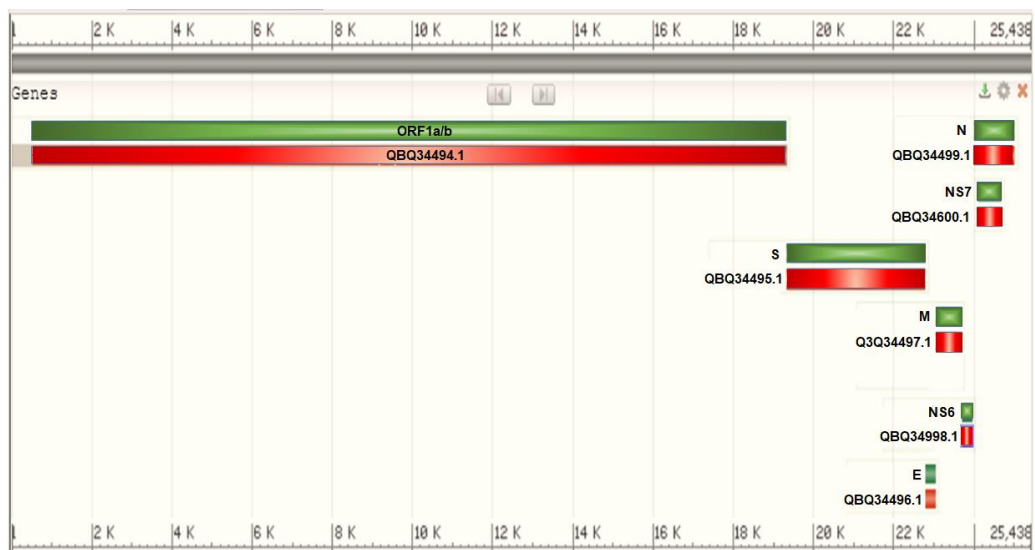


Imagen 4. Representación gráfica del genoma del DCoV. La región ORF1a/b engloba dos tercios del genoma que codifica dos proteínas de replicación viral (1a y 1ab). Contiene las secuencias para proteínas estructurales S, E, M y N. Entre el gen M y el gen N se encuentra la secuencia para la NS6 y dentro del gen N se encuentra la secuencia para la NS7 (Lee & Lee, 2015).

Por otra parte, la diversidad de los genomas que existen dentro de los coronavirus fue dada por recombinaciones y mutaciones que sufrieron a lo largo de aproximadamente 10 mil años y debido a esta rápida evolución han dificultado su estudio; se ha hablado de un ancestro en común del cual descienden los todos los géneros coronavirus identificados hasta el momento (Formi, et al., 2016). Algunos estudios en 2016 indicaron que la helicasa de los genes S y N del DCoV están estrechamente relacionadas con los CoV de leopardos asiáticos y hurones chinos (similitud NT \geq 99.8%) esto además indica una potencial transmisión interespecie entre pequeños mamíferos y cerdos por lo que es necesario realizar estudios de vigilancia epidemiológica para definir el papel de los pequeños mamíferos como hospedero del DCoV y tomar las medidas de bioseguridad correspondientes (Jung, et al., 2016).

2) Factores que predisponen a la enfermedad.

Existen diferentes factores que predisponen a la manifestación de enfermedades en los cerdos como en otras especies, pero una de las principales que ha favorecido la diseminación y propagación de virus en cerdos es la concentración de grandes poblaciones llegando a 5,000 cerdos por km² en México (Morilla, 2003).

Sumado a lo anterior, algunos reportes y trabajos describen una estacionalidad de la enfermedad. Por ejemplo, el Centro de Información de Salud en Cerdos (por sus siglas en inglés SHIC) reportó que los primeros 4 meses del año 2017 y 2018 los casos positivos a DCoVVP fueron mayores en comparación a los reportados en el resto del año (**Imagen 5**). Por otra parte, un estudio realizado en la Universidad de Minnesota en 2014 reportó un incremento en sus casos positivos en los meses de marzo, abril y mayo con porcentajes de 12.11%, 11.46% y 11.17% respectivamente (Swine Health Information Center, 2018; Homwong, et al., 2016)

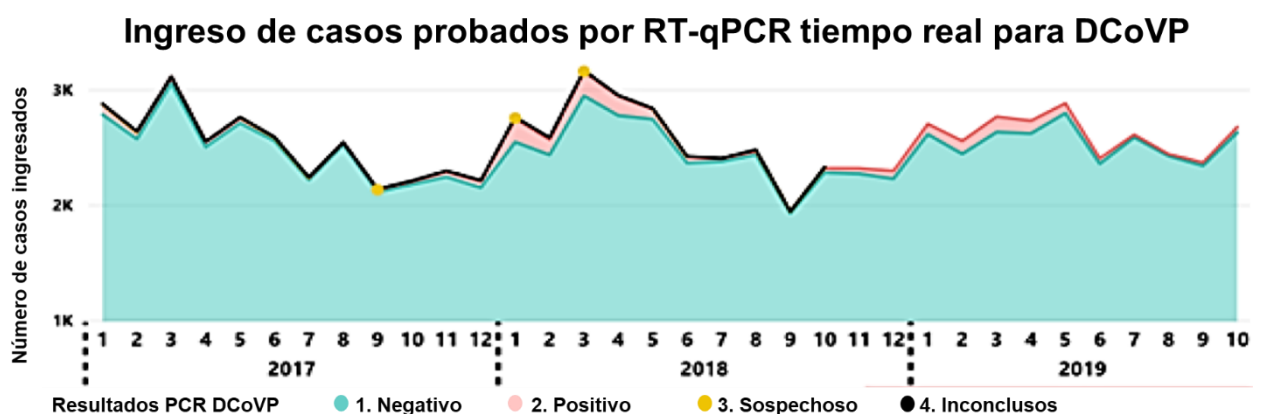


Imagen 5. Resultados positivos a DCoVVP por RT-qPCR a 3 años, donde se observa un incremento de casos positivos en los 4 meses primeros meses de los años 2018 y 2019 (Swine Health Information Center, 2019).

Otro de los factores que se tiene identificado es la edad de los animales, debido a que la alta mortalidad se observa en cerdos menores de 21 días de edad, esto debido a la baja reposición de enterocitos en lechones en comparación con la de cerdos adultos (Dong, et al., 2016; Zuñiga, et al., 2016).

3) Patogenia.

Al igual que otros CoV entéricos de los cerdos, la transmisión del DCoV es por vía fecal – oral, debido a que la liberación de partículas virales se da principalmente por las heces de animales enfermos, pero también la infección se puede iniciar por contacto con vómito o fómites (Jung, et al., 2016).

Posterior a su entrada, el DCoV infecta los enterocitos de las vellosidades intestinales, siendo los sitios de replicación primaria en yeyuno e íleon. En esta etapa existen 2 pasos críticos para la infección de las células del huésped, los cuales son unión y fusión con la membrana celular del hospedero por medio de la unión a un receptor específico por medio de la proteína S que se encuentra en la superficie del virión. Está constituida por la región S1 encargada de la unión a la célula blanco que a su vez está conformado por los dominios N-Terminal (NTD) y C-Terminal (CTD), y la proteína S2 encargada de la fusión de la envoltura viral con la membrana celular del hospedero para el ingreso del material genético al citoplasma. Cabe señalar que la proteína S se ha adaptado para utilizar diversos receptores celulares y no existe relación en la filogenia debido a que virus estrechamente relacionados pueden utilizar diferentes receptores (Millet & Whittaker, 2015; Dong, et al., 2016).

El receptor aminopeptidasa N (APN) o CD13 era el receptor reconocido que daba el tropismo a los CoV entéricos de los cerdos, debido a que se encuentra en grandes cantidades en el borde de cepillo de los enterocitos, pero estudios realizados en 2017 demostraron que la APN no es un receptor funcional para la entrada del VDEP, por lo cual no se puede afirmar que este es el receptor involucrado en la patogenia de los tres coronavirus entericos porcinos (Li, et al.,

2017). Sumado a lo anterior, se ha identificado el papel de las enzimas digestivas del huésped, como la tripsina en el caso del VDEP, ya que se ven involucradas en la patogénesis del virus debido a que rompen las subunidades permitiendo que S2 inicie el proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana celular de las células del huésped (Formi, et al., 2016; Zuñiga, et al., 2016).

Posterior a esto, trabajos indican que el DCoV tiene una replicación similar al del resto de los coronavirus (Millet & Whittaker, 2015) e incluso que debido a la viremia es posible detectar RNA de este virus en estómago, pulmón, corazón, bazo, hígado y riñón mediante la prueba de RT- qPCR (Jung, et al., 2016; Arguello, et al., 2016)

Una vez establecida la infección, se ha demostrado experimentalmente la manifestación de signos clínicos de 24 a 72 horas post-inoculación en cerdos de 3 semanas de edad (Zhang, 2016). En la necropsia se puede observar zonas transparentes en el intestino delgado traslúcido como enteritis atrófica aguda debido al acortamiento de las velocidades intestinales que conlleva a una disminución en la capacidad de absorción. Lo anterior provoca una diarrea acuosa que aunado al vómito en los cerdos infectados genera deshidratación e inapetencia que culmina con la muerte del animal. (Arguello, et al., 2016; Homwong, et al., 2016; Zhang, et al., 2016; Formi, et al., 2016; Zuñiga, et al., 2016).

Finalmente, se ha hablado de coinfecciones debido a que estudios realizados por Lee & Lee en 2014, donde el 80% de las muestras analizadas para DCoV, correspondieron a casos de co-infecciones con otros agentes como el VDEP y Rotavirus, pero en la revisión de Velázquez en 2019 realizada en México no se

encontró evidencia alguna de co-infecciones entre Coronavirus con otros agentes (Velázquez, 2019).

4) Epidemiología del DCoVp.

El DCoVp se ha diseminado en diferentes países como Canadá, Corea del sur, China, Estados Unidos y Tailandia. Las cepas reportadas globalmente comparten una alta similitud de nucleótidos (NT) $\geq 98.9\%$ entre sí, lo que sugiere una posible circulación global de un solo genotipo (Jung, et al., 2016).

En América el primer país en anunciar oficialmente la presencia del DCoVp fue Estados Unidos en febrero de 2014 por el Departamento de agricultura de Ohio. Los laboratorios de diagnóstico veterinario realizaron pruebas de RT-PCR para detectar este nuevo coronavirus entérico, el cual ya estaba presente en 9 estados en ese momento (Homwong, et al., 2016). Actualmente en el Informe de seguimiento de enfermedades domésticas del SHIC, reportó un incremento en los casos positivos de 2017 y 2019 superando los casos que se había pronosticados como se puede observar en la **Imagen 6** (Swine Health Information Center, 2019).

Valores previstos de porcentajes positivos a DCoV en 2019

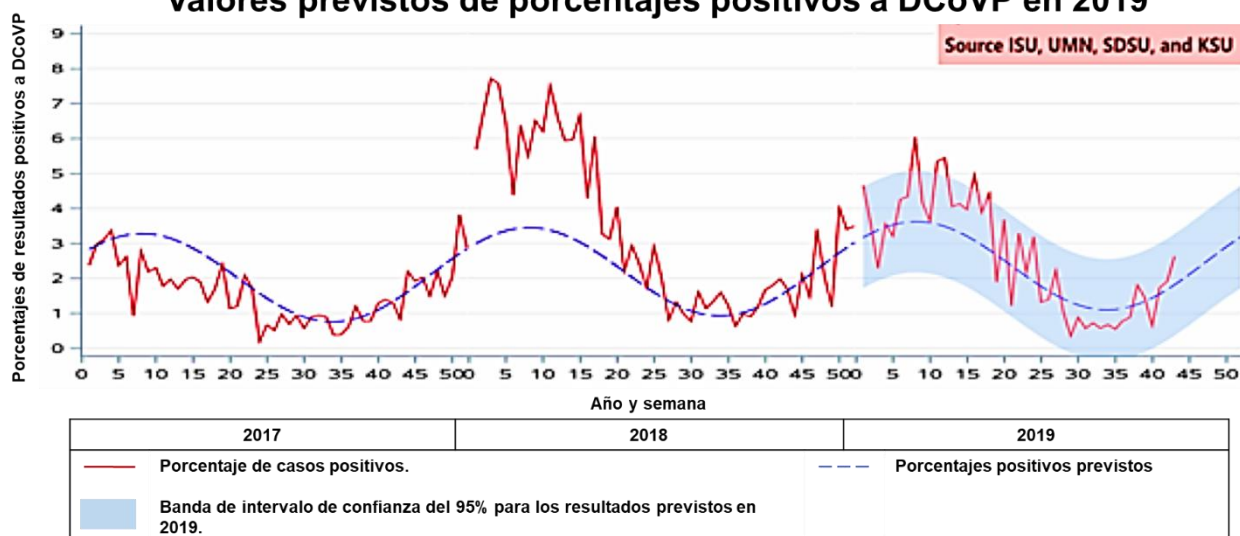


Imagen 6. Gráfica que muestra los porcentajes de resultados positivos del DCoV esperados para 2019 de resultados positivos del DCoV. La línea punteada de color azul muestra los porcentajes esperados, la línea de color rojo muestra los porcentajes de casos positivos y la banda azul el intervalo de confianza del 95% (Swine Health Information Center, 2019).

En 2016 se publicó la primera evidencia del DCoV en México, durante un estudio realizado en 2014 por la universidad de Minnesota en donde se procesaron 68 muestras individuales provenientes de cerdos de México, de las cuales se obtuvieron tres muestras positivas a DCoV (correspondiente al 4.4%) (Homwong, *et al.*, 2016).

La SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo rural, pesca y Alimentación) ahora SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural), por medio del Diario Oficial de la Federación (DOF), en su acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos, clasificó al DCoV dentro de las enfermedades de los cerdos del grupo 3 como el “Síndrome diarreico asociado a la presencia de coronavirus”,

incluyendo al *Alphacoronavirus* y al *Deltacoronavirus* (Secretaría de Gobernación, 2016); el 29 de noviembre de 2018 finalmente se le nombro como “Infección asociada a Deltacoronavirus” dentro del mismo grupo (Secretaría de Gobernación , 2018).

Posteriormente en 2019 se publicó el primer reporte y análisis filogenético del DCoV en México, donde se analizaron 885 muestras de diferentes regiones de país donde el 9.6% fueron positivas al DCoV (Pérez Rivera, *et al.*, 2019).

La información reportada y las similitudes que existen entre los CoV que afectan el tracto gastrointestinal de los cerdos se describen en el cuadro 1 con las principales similitudes y diferencias que existen entre ellos. A pesar que la Organización Mundial de Sanidad Animal considera como ausente a VGET en México desde mayo 2018 (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2019) se le consideró debido a la gran similitud que tiene con el DCoV y el VDEP.

Cuadro 1. Resumen de la información de los coronavirus entéricos en cerdos. Muestra sus características en común con VGET, VDEP y DCoV (Morilla González & Estrada Correa, 1981; Jung, et al., 2016; Arguello, *et al*, 2016; Velázquez. 2019; Wentao, et al., 2016).

		VDEP	VGET	DCoVP
Identificación		Inglaterra, 1971	Estados Unidos, 1946	Hong Kong, 2012
Confirmación	América	Estados Unidos, 2013	Estados Unidos 1965	Estados Unidos, 2014
	México	Julio, 2013	1965	Desconocida (2014 aproximadamente)
Género		<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Deltacoronavirus</i>
Origen evolutivo		Murciélagos	Murciélagos	Aves silvestres
Material genético		RNA	RNA	RNA
Número de hebras		Una hebra	Una hebra	Una hebra
Sentido		Positivo	Positivo	Positivo
Tamaño del genoma		27.4 a 28.1 kb	28.5 a 27.9 kb	24,4 a 31.7 kb
Diámetro		10 a 60 nm	10 a 70 nm	10 a 60 nm
Morbilidad		80 – 100 %	100%	100%
Mortalidad		50 – 90 %	50 - 100%	50 – 100%
Signos		Diarrea, vómito y deshidratación	Diarrea, vómito y deshidratación	Diarrea, vómito y deshidratación
Lesiones	Microscópicas	Atrofia de vellosidades intestinales	Atrofia de vellosidades intestinales	Atrofia de vellosidades intestinales
	Macroscópicas	Enteritis Atrófica Severa	Enteritis Atrófica Severa	Enteritis Atrófica Severa
Edad de mayor severidad		Primeras dos semanas de vida	Primeras 3 semanas de vida	Primeras dos semanas de vida

5) Pruebas diagnósticas y muestras utilizadas.

Debido a la similitud en el cuadro clínico y lesiones que provocan los coronavirus entéricos, la identificación del agente etiológico es fundamental para diseñar estrategias de control eficientes y adecuadas antes y durante los brotes de DCoV, VDEP y VGET (Zhang, et al., 2016).

Los métodos de diagnóstico del DCoV se han dividido en métodos virológicos y métodos serológicos. Dentro de los métodos virológicos se encuentran: la detección de partículas virales por medio de microscopía electrónica, la detección de ácidos nucleicos a través reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), la detección de antígenos virales por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica y finalmente la detección de virus viables con el aislamiento viral; dentro de los métodos serológicos se han mencionado pruebas de ELISA (Zhang, 2016).

Dentro de las muestras empleadas para el diagnóstico del DCoV se han utilizado muestras de heces, feedback, intestino y fluidos orales. En su estudio, Homwong y colaboradores mencionan que al utilizar fluidos orales se tiene de 1.89 a 2.05 % mayor probabilidad de detectar DCoV por medio de RT-PCR en comparación a las muestras de heces, además de ser la mejor muestra para el monitoreo debido a la impregnación de partículas fecales y su facilidad de obtención (Homwong, et al., 2016). Sumado a esto, un análisis realizado por el SHIC evidencio que la muestra más utilizada para el diagnóstico del DCoV durante el periodo 2015 al 2018 fueron los fluidos orales con hasta el 56.4% en 2017; en la **Imagen 7** se observa las principales

muestras que se han utilizado para el diagnóstico del DCoV y el porcentaje que representan cada uno de ellas (Swine Health Information Center, 2019).

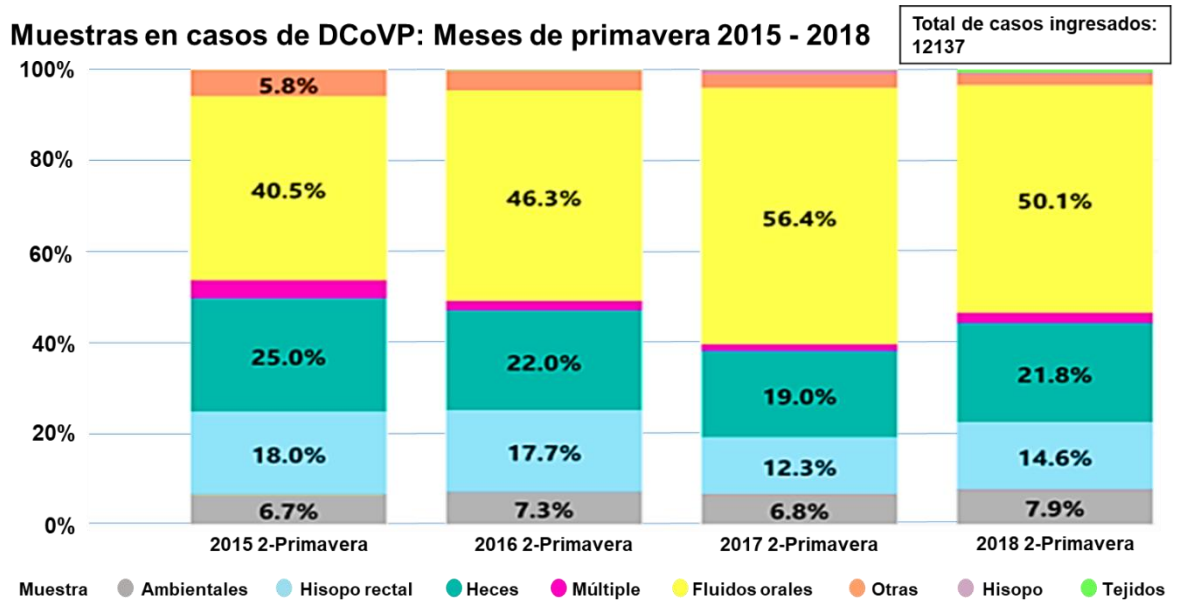


Imagen 7. Gráfica de muestras sometidas a rRT-PCR para el diagnóstico de DCoV (Swine Health Information Center, 2019).

Sumado a lo anterior, en su revisión de 2016, Zhang presenta una gráfica que indica los tiempos ideales para obtener muestras dependiendo si el diagnóstico se quiere dirigirse a la detección del virus o de anticuerpos, con base a lo observado en los días post-inoculación en cerdos de 3 semanas de edad (**Imagen 8**), donde se indican los niveles de anticuerpos neutralizantes y los niveles de RNA viral determinado por RT-PCR tiempo real basados en la detección del gen M del DCoV; para esto se compararon muestras de heces individuales, hisopos rectales e hisopos de fluidos orales (Zhang, 2016).

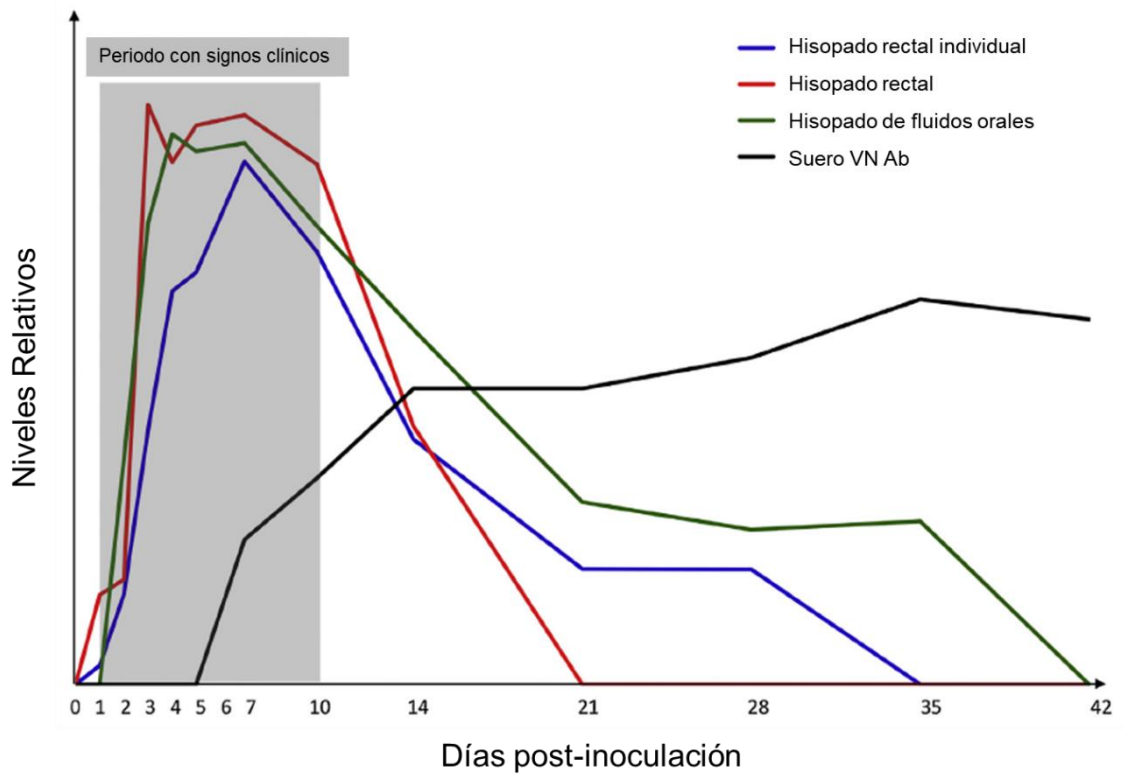


Imagen 8. Diagrama de la dinámica del DCoV en cerdos destetados de 3 semanas de edad (Zhang, 2016).

Para el procesamiento de las muestras, principalmente de heces y fluidos orales, se optado por la técnica de RT-PCR, la cual es una herramienta en el diagnóstico mediante biología molecular que permite obtener *in vitro* millones de copias a partir de un fragmento de DNA simulando la replicación celular en un tubo (Serrato Díaz, et al., 2014). Este es el método de elección para la detección de múltiples microorganismos debido a que es una herramienta rápida, sensible y específica. Se han desarrollado múltiples pruebas de RT-PCR que detectan y diferencian estos Coronavirus, las cuales han sido utilizadas en algunos laboratorios de diagnóstico veterinario. Por lo general diseñadas para la identificación de regiones altamente conservadas de la proteína “M” o “N” (Zhang, et al., 2016).

Con relación a lo anterior, desde su descripción en 1988 y hasta la actualidad la PCR múltiple ha apoyado en diversos campos de la ciencia para el análisis simultáneo de múltiples genes en una sola reacción. Por ejemplo, en el campo de la epidemiología, su importancia crece por la factibilidad de aumentar en una sola reacción la detección simultánea de varios agentes patógenos en una sola reacción (Bolívar, et al., 2014).

6) Prevención y tratamiento.

En su revisión de 2018, García Cano demuestra que el método conocido como “Feedback” utilizado como método preventivo para inmunizar a las cerdas contra el VDEP a través de la ingesta de intestino delgado, contenido gástrico y diarrea de animales que murieron a causa de este virus ha favorecido la recirculación de enfermedades como parvovirus porcino (García, 2018). De igual manera este método ha sido la elección para el tratamiento contra el DCoV (Jung, et al., 2016), por lo que no se puede descartar la probabilidad de problemas similares en granja.

Actualmente, no existen vacunas en el mercado mexicano para la prevención del DCoV, aunque ya existen vacunas para la prevención del VDEP por parte de los laboratorios Zoetis (Zoetis, 2017) y de MSD.

Dentro de las herramientas que se cuentan para la prevención del DCoV y otros agentes patógenos están las medidas de bioseguridad (Velasco Villalvazo, 2015). Actualmente, existen diferentes manuales publicados por diferentes instituciones académicas y gubernamentales como SADER, donde detallan la importancia de la bioseguridad y medidas para evitar el ingreso de una enfermedad a una Unidad de Producción Pecuaria (UPP). Además, existen empresas de equipamiento ganadero donde se estipula que el programa de bioseguridad debe estar personalizado a las necesidades de cada UPP (COVENCO, 2019) debido a que los patógenos pueden ingresar por diferentes vías como son: camiones, equipo, personal e incluso animales nuevos en la granja (Jung, et al., 2016).

Justificación.

Debido al impacto económico a causa de coronavirus entericos en cerdos calculados en 1.8 millones de dolares en 2016 por Zhang y \$18,280,000.00mxn por Amador en 2015 y la informacion revelada en los ultimos años de la presencia del Deltacoronavirus Porcino en México, resalta la importancia de la implementación de una técnica molecular sensible y específica como la RT-PCR para su diagnóstico oportuno y este basado en un control positivo obtenido dentro del territorio nacional.

Hipótesis.

Si el Deltacoronavirus porcino está provocando problemas de diarrea en lechones menores de 3 semanas de edad, este podrá ser identificado por medio de la prueba de RT-PCR punto final a partir de heces.

Objetivos.

a) Objetivo General:

Estandarización de una prueba de RT-PCR dirigida a identificar Deltacoronavirus porcino.

b) Objetivos específicos:

- Mejorar la calidad de la muestra por medio de la precipitación con polietilenglicol.
- Estandarizar la técnica de RT-PCR que amplifica un segmento del gen M del DCoV

Material y Métodos.

1. Obtención del control positivo.

El control positivo del DCoVP fue proporcionado por el equipo de investigación a cargo de la Dra. María Elena Trujillo Ortega; se recibieron 30 ml de heces de un cerdo positivo a DCoVP proveniente de una granja del estado de Guanajuato; el diagnóstico fue realizado mediante un kit comercial con oligonucleótidos dirigidos al gen que codifica a la proteína S. Esta muestra se dividió en alícuotas de 1 ml en tubos de 1 ml de capacidad para almacenarse en el ultra-congelador a una temperatura de – 70 °C en laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

2. Selección y análisis de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos dirigidos al gen “M” del DCoVP empleados en este trabajo fueron los utilizados en el estudio de Jung y colaboradores en 2015 (Jung, et al., 2015), para conocer su especificidad se realizó un ensayo *in silico* donde se introdujeron en la plataforma Primer-BLAST, la cual se encuentra disponible entre las herramientas del NCBI, para conocer las secuencias que identifica y la región en la que se alinean dentro del GenBank, las cuales en su mayoría eran secuencias del DCoVP o el segmento que codifica a la proteína M.

Posteriormente, para la evaluación de la calidad de cada uno de los oligonucleótidos se utilizó la plataforma OligoAnalyzer que forma parte de los servicios del IDT (Integrated DNA Technologies), donde se evaluó la temperatura de fusión, porcentaje de G-C y estructuras secundarias (horquillas y dímeros) (Pinzon, 2007; Caudal Medrano & Lugo Melchor , 2018)

Los resultados de la evaluación de oligonucleótidos se presentan en el siguiente cuadro, donde las uniones fueron representadas con la posición seguida del nucleótido participante y la posición está basada en la secuencia completa del GenBank registrada como *Porcine deltacoronavirus strain CH/JXJGS01/P50, complete genome* con el acceso MH025764.1.

a) Oligonucleótidos para identificar al DCoVp.

Cuadro 2. Análisis de oligonucleótidos dirigidos al gen que codifica a la proteína M.

						N° de nucleótidos	Tm (°C)				
Secuencia Forward				CGC-GTA-ATC-GTG-TGA-TCT-ATG-T		22	54.8				
Secuencia Reverse				CCG-GCC-TTT-GAA-GTG-GTT-AT		20	55.3				
	Posición	%G-C	Tm (°C)	Horquillas			Dímeros			Amplificado	
				Uniones	ΔG (kcal.mole)	Tm (°C)	N° de Posibilidades Homodímeros	Rango Delta G (kcal/mol)	N° de Posibilidades Heterodímeros		Rango Delta G (kcal/mol)
Forward	23126 a 23147	45.5	58.8	3C---G9	- 0.97	36.5	14	-10.26 a -0.96	13	-3.61 a -0.96	540 Pb
				4G---C10							
				1C---9G	- 0.94	34.8					
				2G---10C							
3C-/-11T	0.25	21.8	9	-9.75 a -0.96							
4G---12C											
5C---16G	0.35	20.3									
6C---15G											
Reverse	23666 a 23647	50	55.3	6C---13 G	1	7.1	9	-9.75 a -0.96	13	-3.61 a -0.96	540 Pb
				7T---12 A							
				4G-/-17T	1.02	2.6					
				5C---16G							
				6C---15G	1.16	4					
				2C---9G							
3G-/-8T											
1C---16G											
2C---15G											

3. Precipitación con polietilenglicol (PEG).

Antes de la extracción del material genético se utilizó PEG para concentrar las muestras de heces y mejorar la concentración de material genético (Sobsey, 1987; Shieh, et al., 1995; Sarmiento Pérez, et al., 1999; González, et al., 2006); en la imagen se muestran el incremento de los que se obtuvo en el control positivo.

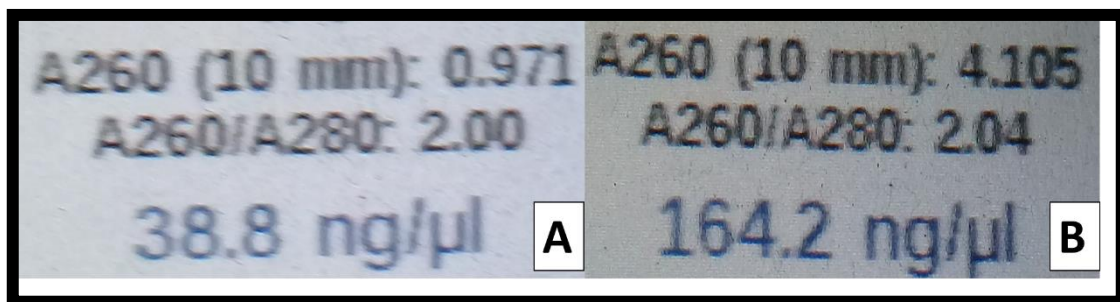


Imagen 9. Incremento en la concentración de material genético detectado en el control positivo del DCoVP. En la imagen A no se utilizó la precipitación con PEG, mientras que en la imagen B si se utilizó.

El procedimiento se describe a continuación, durante ésta metodología se mantuvieron condiciones de cadena fría.

Se utilizó una alícuota de 1 ml del control positivo al DCoVP y se transfirió a un tubo de micro-centrifuga de 2 ml junto a 0.08 g de polietilenglicol.

Se utilizó el agitador vortex de Labnet modelo S0200 para agitar el tubo de micro-centrifuga en 4 periodos de 5 segundos hasta tener una mezcla homogénea de la muestra de heces con el PEG.

Se mantuvo en agitación durante 24 horas en agitación dentro del refrigerador a una temperatura de 4° C.

Después de las 24 horas, se colocó el tubo en una micro-centrifuga EPPENDORF® 5415R, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 hora con 30 minutos a 4 °C para obtener una pastilla.

4. Extracción del material genético.

La extracción del material genético fue realizada utilizando modificaciones al protocolo de tioisocianato de guanidina (Trizol®, Invitrogen) (Chomczynski, 1993). El protocolo fue el siguiente:

En el mismo tubo de 2 ml donde se realizó la precipitación con polietilenglicol, se le adicionaron 500 µl de Trizol® (TRIZOL™ Reagent, cat. 15596018) y se mantuvo a 4°C.

Se agitó la muestra en 12 periodos de 6 segundos cronometrados utilizando un Agitador vortex de Labnet modelo S0200, entre cada periodo se colocaba nuevamente en el hielo para evitar la degradación de la muestra; se dejó incubar por 10 minutos a 4°C.

Se agregaron 200 µl de cloroformo al 100% (conservado en la hielera) y se dejó incubar durante 8 minutos en baño de hielo.

Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4° C utilizando la centrifuga refrigerada sorvall legend RT, para obtener la fase acuosa, fase intermedia y la fase fenólica.

Una vez obtenidas las 3 fases, se procedió a tomar la totalidad de la fase acuosa con una micropipeta de 100 µl sin tocar la fase intermedia para transferirla a otro tubo de micro - centrifuga de 1.5 ml previamente

identificada. Las otras fases fueron colocadas junto a los tubos y puntas en el contenedor para residuos contaminados con Trizol®.

Se le adicionaron 500 µl de Isopropanol al 100% a 4°C aproximadamente y se dejó incubando a -20°C durante 24 horas.

Posterior a las 24 horas la muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C en la centrifuga sorvall legend RT para concentrar el RNA presente en el fondo del tubo de micro-centrifuga y formar una pastilla tipo pellet.

De una sola intención se decantó el isopropanol en el contenedor de residuos líquidos correspondiente asegurándose de no perder el pellet.

Se agregó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugo a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, seguido a esto nuevamente se decantó el Etanol en el contenedor de residuos líquidos y se repitió la misma metodología una vez más para lavar el pellet de residuos de Trizol® e isopropanol.

Se dejó secar el pellet de 20 minutos a una temperatura de 25°C dentro de una campana de flujo laminar.

Se reconstituyó el pellet con 20 µl de agua con Dietilpirocarbonato (DEPC) y la cuantificación del RNA en Nanogramos por microlitros, por medio de espectrofotometría utilizando el NanoDrop™ Lite de Thermo Scientific™.

5. Estandarización de la RT-PCR punto final.

Para la síntesis de cDNA (DNA complementario) se utilizó el kit SuperScript™ VILO™ de Thermo Fisher Scientific (número de catálogo 11754050) siguiendo las especificaciones del fabricante. El volumen final se unificó a 13 µl por cada reacción, de los cuales 2.6 µl corresponden al reactivo 5x VILO que contiene una mezcla de reacción de primers aleatorios, dNTPs y MgCl₂; 1.3 µl del reactivo 10x SuperScript III Enzyme Blend que contiene SuperScript III RT, inhibidores recombinantes de Ribonucleasas y proteína auxiliar patentada; el volumen de del RNA se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Volumen RNA} = 2500 \mu\text{l} * / \text{Concentración de RNA}$$

**Concentración mínima detectable por el kit de acuerdo a lo especificado por el fabricante.*

Si era necesario, se adicionaba agua DEPC para alcanzar el volumen total de 13 µl; seguido a este paso se utilizó el Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf que tenía programadas con el nombre de “VILO” las condiciones de tiempos y temperaturas que requería el Kit, las condiciones se describen a continuación:

Cuadro 3. Condiciones para el kit SuperScript™ VILO™ de Thermo Fisher Scientific.

CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	25° C	10 minutos
2	42 °C	60 minutos
3	85° C	5 minutos

6. Determinación de la temperatura de fusión.

Utilizando la función “Gradient PCR” del Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf (**Imagen 10**) se programaron 4 diferentes gradientes (**ANEXO 1**) para conocer el comportamiento de los primers del DCoVP con base en la temperatura reportada en los análisis realizados en la plataforma OligoAnalyzer. La programación seleccionada fue la siguiente:



Imagen 10. Termociclador utilizado durante el estudio.

Cuadro 4. Programación de gradientes en Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf.

Tubos: 200 µl		Temperatura: 55°C		Gradiente: 6°C	
Carril	Temperatura	Carril	Temperatura		
1	49 °C	7	55.5°C		
2	49.2°C	8	57.1°C		
3	49.8°C	9	58.7°C		
4	50.9°C	10	60°C		
5	52.3°C	11	60.9°		
6	53.8°C	12	61°C		

Seguido a esto se tomaron las temperaturas de los carriles 4, 5, 7 y 8 para realizar la PCR con los primers del DCoVP. Las condiciones del Termociclador fueron las siguientes:

Cuadro 5. Condiciones del Termociclador para PCR en gradientes.

Temperatura	Tiempo	Acción
95°C	2 minutos 30 segundos	Activación Taq
94°C	1 minuto	Desnaturalización
55°C	1 minuto	Alineación
	G = 6.0°C	
72°C	1 minuto	Extensión
	40 ciclos	
72°C	72°C	Extensión Final

Para la mezcla de reacción de la PCR se utilizó el kit “Taq DNA PolymeraseRecombinant” de invitrogen (Número de referencia 1615-010) y se tomó como volumen final 10 µl, de los cuales 5 µl corresponden a la Master Mix que contiene todos los componentes para la PCR, 2.5 µl de cDNA del DCoVP, 0.4 µl primer forward del DCoVP, 0.4 µl de primer reverse del DCoVP y cuanto baste para 10 µl de agua libre de nucleasas.

7. Electroforesis.

Los productos de la RT-PCR fueron visualizados en su totalidad en gel de agarosa al 2% (TopVision Agarose Tablets, caja con 200 tabletas de 0.5g,

Thermo scientific, número de catálogo R2801), utilizando buffer de carga (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo scientific, número de catálogo R0611, vial con 5 x 1.0 mL) y un marcador de peso de 1000 pares de bases (pb) (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, número de catálogo SM0241, Thermo scientific vial con 50 µg.), en una cámara de electroforesis horizontal a 84 volts durante 35 minutos. Finalmente, el gel de agarosa fue teñido con bromuro de etidio (Ethidium Bromide UltraPure TM, Invitrogen, 10 mg/ml número de catálogo 15585011.) y fue visualizado en el “Transiluminador 3UV™ Benchtop Transilluminator UVP”.



Imagen 11. Cámara de electroforesis trabajando a 84 volts.

8. Prueba con muestras de campo.

Para probar la prueba, se utilizaron 25 muestras provenientes de una granja ubicada en el estado de Sonora con problemas de diarrea.

Resultados.

1. Estandarización de las RT-PCR punto final del DCoVP.

Realizando 4 extracciones del control positivo del DCoVP se obtuvieron concentraciones de material genético de 28.5, 38.8, 30.19 y 20.45 ng/μl, posteriormente se realizó la RT-PCR y posteriormete la electroforesis a la par de otro estudio para detección de VSG porcino con un control positivo de β-actina obteniendo los resultados mostrados en la imagen 11.

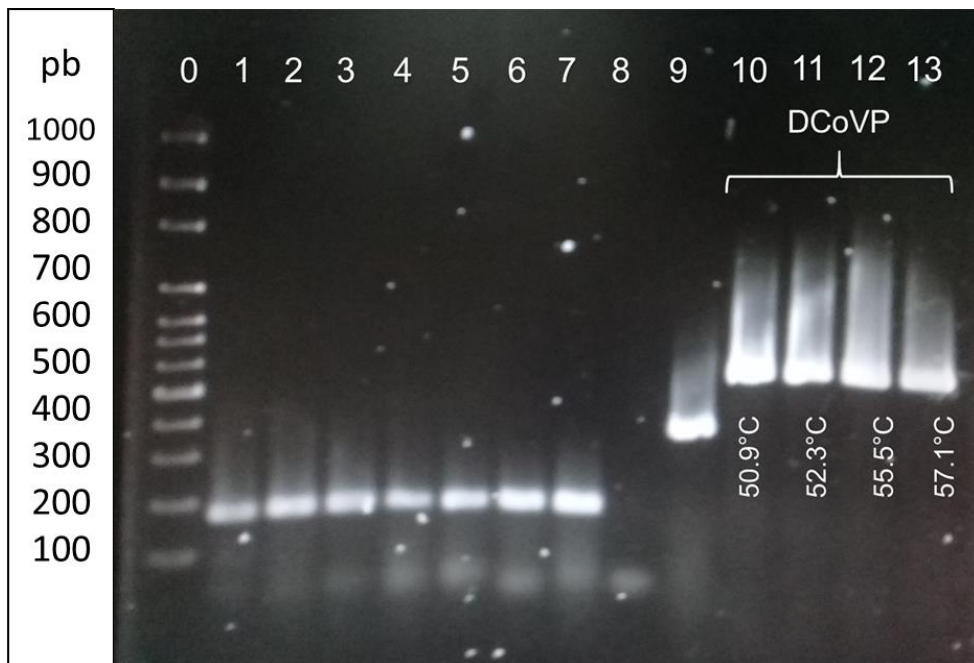


Imagen 12. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Amplificación del control positivo con los primers dirigidos al gen M del DCoVP (lado derecho). **Carril 0:** Marcador de peso molecular 100 pb. **Carriles 1 – 7:** Amplificación del gen que codifica VSG. **Carril 8:** Control negativo. **Carril 9:** Beta-actina. **Carril 10:** Reacción con concentración 28.5 ng/μl a 50.9°C. **Carril 11:** Reacción con concentración 38.8 ng/μl a 52.3°C. **Carril 12:** Reacción con concentración 30.15 ng/μl a 55.5°C. **Carril 13:** Reacción con concentración 20.45 ng/μl a 57.1°C.

2. Desafío de la técnica.

Utilizando el protocolo para la estandarización de la RT-PCR se procesaron las 25 muestras provenientes del estado de Sonora, resultando todas negativas como se muestran en la siguiente Cuadro.

Cuadro 6. Cuadro de resultados de muestras de campo

IDENTIFICACIÓN	RESULTADO	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
C-1	NEGATIVO	C-14	NEGATIVO
C-2	NEGATIVO	C-15	NEGATIVO
C-3	NEGATIVO	C-16	NEGATIVO
C-4	NEGATIVO	C-17	NEGATIVO
C-5	NEGATIVO	C-18	NEGATIVO
C-6	NEGATIVO	C-19	NEGATIVO
C-7	NEGATIVO	C-20	NEGATIVO
C-8	NEGATIVO	C-21	NEGATIVO
C-9	NEGATIVO	C-22	NEGATIVO
C-10	NEGATIVO	C-23	NEGATIVO
C-11	NEGATIVO	C-24	NEGATIVO
C-12	NEGATIVO	C-25	NEGATIVO
C-13	NEGATIVO		

Discusión

El diagnóstico oportuno es crucial para controlar una enfermedad en cualquier producción pecuaria para elegir las medidas de control y posible erradicación; en el caso del Deltacoronavirus porcino a pesar de haber sido identificado hace 9 años en China, se ha diseminado e identificado en otros países como Corea y Estados Unidos provocando pérdidas económicas en producciones porcinas (Zhang, 2016). Debido a las similitudes que tiene con el virus de la DEP y de la GET en cuanto al cuadro clínico, las lesiones macroscópicas y microscópicas, la morbilidad del 100% y la mortalidad elevada hace difícil el diagnóstico diferencial sin recurrir a pruebas de laboratorio (Arguello, et al., 2016; Homwong, et al., 2016; Zhang, et al., 2016; Formi, et al., 2016; Zuñiga, et al., 2016).

Sumado a lo anterior, Dong y colaboradores en el 2016 mencionan que no existe evidencia de inmunidad cruzada entre los coronavirus, por lo que el diagnóstico del DCoVp por medio de pruebas de laboratorio como el ensayo de PCR es importante para la planificación de estrategias de control y monitoreo de la enfermedad.

En la actualidad, no se tiene un panorama claro de su situación epidemiológica del Deltacoronavirus porcino dentro del territorio mexicano, sin embargo en Estados Unidos el SHIC elabora reportes mensuales de casos positivos DCoVp, DEP y otras enfermedades de alto impacto económico en la industria porcina, que incluyen muestras utilizadas, casos positivos totales, predicciones y casos sospechosos; los cuales serían datos útiles para conocer la situación epidemiológica del país y apoyar al médico veterinario zootecnista al control y diagnóstico de la enfermedad.

En México, el diagnóstico del DCoV se ha hecho con kits comerciales, como Velázquez en 2019, y Santiago y Carreón en 2018 mencionan que la mayoría de los kits comerciales utilizados para el diagnóstico en México no suelen contemplar las cepas que circulan en el país debido a la nula o escasa información, así como el monitoreo de la enfermedad en brotes en granjas o regiones porcícolas (Santiago, N. y Carreón, N.R., 2018; Velázquez M., 2019). Debido a la poca factibilidad de elaborar un kit comercial por país tomando en cuenta las cepas circulantes, el médico encargado debe conocer la metodología presente en el kit para tener un resultado certero; en el caso del control positivo fue detectado con un kit que identifica el gen M que según lo descrito por Masters en 2006 es el gen más conservado dentro de los coronavirus.

Por otra parte, el análisis bioinformático de los oligonucleótidos permite obtener una búsqueda más acertada de los primers que cumplan con los parámetros requeridos para un ensayo de PCR y de esta manera posean un equilibrio entre especificidad y sensibilidad para un mejor rendimiento durante la prueba (Hernández & Valdez, 2007; De la Fuente, et al., 2018), los primers seleccionados que cumplieron con las especificaciones necesarias para un ensayo de PCR fueron analizados mediante las plataformas de Primer-BLAST disponible en el NCBI y la plataforma OligoAnalyzer que forma parte de los servicios del IDT las cuales han demostrado ser herramientas sumamente útiles para este tipo de análisis (Pinzon, 2007; Caudal Medrano & Lugo Melchor , 2018).

Es importante recordar que la técnica de PCR tiene sus limitaciones como cualquier técnica de diagnóstico porque dependa de los resultados que necesite el MVZ . Cortazar y Silva, Serrato así como Zhang coinciden en que

existen puntos importantes para la realización de un ensayo de PCR como son el control positivo, conservación de la cadena fría de los reactivos y muestras, utilización de material estéril y optimización del procesamiento de acuerdo a la muestra y preservación de la misma desde el momento de la colecta hasta su envío al laboratorio (Cortazar Martínez & Silva Rincón, 2004; Serrato Díaz, et al., 2014; Zhang, 2016). En nuestro estudio el control positivo así como las muestras de campo fueron sometidas a la precipitación con polietilenglicol previo a la extracción del genético para mejorar la concentración de ARN total, esta metodología ya ha sido utilizada en otros estudios para aislar enterovirus en aguas residuales (Shieh, et al., 1995; Sarmiento Pérez, et al., 1999; González, et al., 2006) dando como resultado una mejor concentración de RNA total en la muestra.

Tomando los datos obtenidos en el presente estudio se puede aceptar la hipótesis planteada al inicio del trabajo debido a que se logró un amplificado con el peso molecular esperado de 540 pares de bases que confirma la presencia del Deltacoronavirus porcino en la muestra de heces proveniente del estado de Guanajuato y aunque las muestras de campo provenientes de Sonora resultaron todas negativas se puede tomar una de las siguientes posturas: la primera que el virus no estuvo presente en las muestras procesadas siendo otro agente etiológico el que está provocando los problemas de diarrea y la segunda como mencionan Lowe en 2012 y Zhang en 2016 se debe de tener en cuenta los tiempos en los que se recolectan las muestras y la prueba diagnóstica a la que se piensan someter, ya que puede haber dejado de secretarse el virus en ese momento por lo que para el diagnóstico del agente etiológico se debe someter a otra prueba diferente por métodos serológicos como es el ensayo por

inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) (Lowe, 2012; Zhang, 2016), pero actualmente no existe registro de su utilización en México.

Por otra parte, Pérez y colaboradores obtuvieron 9.6% de casos positivos a DCoV de sus 885 muestras totales de hisopados rectales de diferentes estados de la república mexicana utilizando primers dirigidos al gen S y en 2016 la Universidad de Minnesota recibió 68 muestras individuales provenientes de México de las cuales resultaron positivas tres de éstas a DCoV (correspondiente al 4.4%) (Homwong, *et al.*, 2016). Con esta información sería recomendable incrementar el número de muestras en un futuro estudio utilizando la metodología expuesta en este trabajo con los primers dirigidos al gen M que ha demostrado ser el más conservado entre los Coronavirus (Masters, P.S., 2006) y que al ser analizados por las plataformas de Primer-BLAST y OligoAnalyzer demostraron cumplir con todas las características necesarias para una prueba de PCR y además de funcionar a 4 diferentes temperaturas, por lo que pueden ser utilizados en una RT-PCR multiplex dirigida a identificar otros agentes como son DEP y GET.

Finalmente, ya con la PCR estandarizada se puede continuar incrementando el número de muestras para hacerlo estadísticamente significativo y de esta manera comenzar a conocer la situación epidemiológica del país con relación al DCoV.

Conclusiones.

Se logró identificar el Deltacoronavirus porcino por medio de la prueba de RT-PCR a partir de una muestra de heces aumentando la concentración de ARN utilizando la precipitación con polietilenglicol.

Es importante probar toda prueba de diagnóstico molecular con muestras de campo de animales con la signología clínica sugerente a la enfermedad.

Referencias

1. Amador, J. N., 2015. *Efectos económicos de la Diarrea Epidémica (PED) en México. Porcicultura*. [En línea] Disponible en:
<https://www.porcicultura.com/destacado/Efectos-economicos-de-la->

Diarrea-Epidemica-%28PED%29-en-Mexico [Último acceso: 28 03 2020].

2. Arguello, H., De Nova, P. J., Rubio, P. & Carvajal, A., 2016. Diarrea epidémica porcina: nuevos desafíos de una vieja conocida. *Suis*, Issue 130, pp. 12 - 19.
3. Beltran, R. y otros, 2017. Virus y el sector pecuario. En: C. F. Arias, ed. *La Virología en México: Situación actual, retos y oportunidades*. Ciudad de México: Academia Mexicana de Ciencias, pp. 91 - 95.
4. Bolívar, A. M., Rojas, A. & García-Lugo, P., 2014. PCR y PCR-Múltiplex: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina* , 3(1), pp. 25-33.
5. Caudal Medrano, M. D. & Lugo Melchor , O., 2018. *Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos*. [En línea] Disponible en: <http://www.e-gnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad/article/view/307> [Último acceso: 2020 03 26].
6. Chomczynski, . P., 1993. A reagent for the singlestep simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, Issue 15, p. 532–537.
7. Cortazar Martínez, A. & Silva Rincón , E. P., 2004. *Instituto de Biotecnología*. [En línea] Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf> [Último acceso: 2020 03 28].

8. COVENCO, 2019. *Bioseguridad en granjas porcinas*. [En línea]
Disponible en: <https://cavenco.com/bioseguridad-granjas-porcinas/>
[Último acceso: 28 Marzo 2020].
9. De la Fuente, A., Romero, D. X., Cárdenas , O. & Álvarez, M. T., 2018.
Diseño y evaluación de primers in silico del gen E1 del virus de
chikungunya. *CON-CIENCIA*, 6(1), pp. 107-124.
10. Diez Izquierdo, L. y otros, 2020. *informe Tecnico CCAES Nuevo
coronavirus 2019-nCoV*. [En línea] Disponible en:
[https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/covid-19/informacion-
profesionales/informe-tecnico-nuevo-coronavirus-2019-ncov](https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/covid-19/informacion-profesionales/informe-tecnico-nuevo-coronavirus-2019-ncov) [Último
acceso: 2020 03 28].
11. Dong, N. y otros, 2016. Isolation, genomic characterization, and
pathogenicity of a Chinese porcine deltacoronavirus strain CHN-HN-
2014. *Veterinary Microbiology*, Issue 196, pp. 98 - 106.
12. Formi, D., Cagliani, R., Clerici, M. & Sironi, M., 2016. Molecular evolution
of human coronavirus genomes. *Trends in Microbiology*, Volumen 20,
pp. 1 - 14.
13. García Cano Rubí, N. (2018). *IDENTIFICACIÓN DE PARVOVIRUS
PORCINO (PVP), ANÁLISIS PRODUCTIVO, REPRODUCTIVO Y
ECONOMÍA EN UNA GRANJA PORCINA DE CICLO COMPLETO,
DESPUÉS DE UN BROTE DE DIARREA EPIDÉMICA PORCINA (DEP)*.
Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

14. Godina González, A. & Pacheco Facio, F. D. J., 2016. El Economista.
[En línea] Available at:
<https://www.economista.com.mx/opinion/Situacion-de-la-porcicultura-mexicana-l-20160530-0007.html> [Último acceso: 5 Febrero 2020].
15. González, M. M. y otros, 2006. Detección de Poliovirus en aguas residuales de Armenia, Colombia. *Salud Pública*, 8(1), pp. 13 -23.
16. Hernández, C. & Valdez, R., 2007. *Temas de ciencia y tecnología*, 22(64), pp. 5-19.
17. Hernández Villegas, E. (2016). *Estandarización de la técnica de RT-PCR para el diagnóstico del virus de la diarrea epidémica porcina y su evaluación en muestras clínicas obtenidas en un brote de diarrea en una granja porcina de ciclo completo*. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
18. Homwong, N. y otros, 2016. Characterization and evolution of porcine deltacoronavirus in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, Issue 123, pp. 168 - 174.
19. Jung, K. y otros, 2015. Pathogenicity of 2 Porcine Deltacoronavirus Strains in Gnotobiotic Pigs. *Emerging Infectious Diseases*, 21(4), pp. 650 - 654.
20. Jung, K., Hu, H. & Saif, L. J., 2016. Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. *Virus Research*, Issue 226, pp. 50 - 59.

21. King, A., Lefkowitz, E., Adams, M. J. & Carstens, E. B., 2011. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Primera ed. Reino Unido: Elsevier.
22. Lee, S. & Lee, C., 2015. Functional characterization and proteomic analysis of the nucleocapsid protein of porcine deltacoronavirus. *Virus Research*, Issue 208, pp. 136 -145.
23. Li, W. y otros, 2017. Aminopeptidase N is not required for porcine epidemic diarrhea virus cell entry. *Virus Research*, Issue 235, pp. 6 - 13.
24. Lowe, J. F., 2012. *Una estrategia de manejo sistematizada para granjas de reproductoras en base a su estatus de PRRS*. [En línea] Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/manejo-sistematizado-para-granjas-de-reproductoras-con-prrs_31347/ [Último acceso: 09 02 2021].
25. Masters P.S. The Molecular Biology of Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 65 (6): 193–292.
26. Mayora García, G., 2018. *Veterinaria Digital*. [En línea] Disponible en: <https://www.veterinariadigital.com/articulos/porcicultura-en-mexico-a-traves-del-tiempo/> [Último acceso: 04 08 2020].
27. Millet, J. K. & Whittaker, G. R., 2015. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Research*, Volumen 202, pp. 120 - 134.

28. Molina López, J. & Manjarrez Zavala , M. E., 2015. *Microbiología Bacteriología y Virología*. Segunda ed. Ciudad de México: Méndez Editores.
29. Morilla González, A., 2003. Las enfermedades virales emergentes de los cerdos. *Ciencia Veterinaria*, pp. 197 - 227.
30. Morilla González, A. & Estrada Correa, A., 1981. GASTROENTERITIS TRANSMISIBLE DE LOS CERDOS. *Ciencia Veterinaria*, Issue 3, pp. 1 - 62.
31. National Center for Biotechnology Information, s.f. *GenBank*. [En línea] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [Último acceso: 14 Noviembre 2019].
32. Organización Mundial de Sanidad Animal, 2019. *WAHIS Interfase*. [En línea] Disponible en: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation [Último acceso: 28 Marzo 2020].
33. Pérez Rivera, C. y otros, 2019. First report and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus in Mexico. *Transboundary and emerging diseases*, Volumen 00, pp. 1 - 6.
34. Pinzon, A. M., 2007. *Introducción al diseño "in silico" de primers*. [En línea] Disponible en: <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/cbib/estudiantes/1-07/primerDesign.pdf> [Último acceso: 2020 03 26].

35. Piñedos, R. & Mogollón Galvis, J. D., 2015. Coronavirus en porcinos: importancia y presentación del virus de la diarea epidémica porcina (PEDV) en Colombia. *Rev Med Vet*, Volumen 29, pp. 73 - 89.
36. Santiago, N y Carreón, N.R. Técnicas diagnósticas para los virus de Gastroenteritis Transmisible y Diarrea Epidémica Porcina. Los Porcicultores y su entorno. BM Editores. 2018. Disponible en: <https://bmeditores.mx/porcicultura/articulos/salud-y-prevencion-del-cerdo/enfermedades-y-tratamientos-en-porcicultura/tecnicas-diagnosticas-para-los-virus-de-gastroenteritis-transmisible-y-diarrea-epidemica-porcina-1688>
37. Sarmiento Pérez, L. y otros, 1999. Valoración de una novedosa tecnología para la detección de enterovirus en aguas negras. *Cubana Med Trop*, 51(3), pp. 166 - 177.
38. Secretaria de Gobernación , 2018. *Diario Oficial de la Federación*. [En línea] Disponible en: <https://www.dof.gob.mx/> [Último acceso: 4 Febrero 2020].
39. Secretaria de Gobernación, 2016. *Diario Oficial de la Federación*. [En línea] Disponible en: <https://www.dof.gob.mx/> [Último acceso: 4 Febrero 2020].
40. Serrato Díaz, A., Flores Rentería , L., Aportela Cortez, J. & Sierra Palacios, E., 2014. *Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático*. [En línea] Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf> [Último acceso: 2020 03 28].

41. Shieh, Y., Wait, D., Tai, L. & Sobsey, M., 1995. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 54(1), pp. 51 - 66.
42. Sino Biological, 2020. *Spike Protein / S Protein*. [En línea] Disponible en: <https://www.sinobiological.com/research/virus/hcov-spike-protein-overview> [Último acceso: 06 08 2020].
43. Sobsey, M. D., 1987. Capítulo 5. En: *Methods For Recovering Viruses From The Environment*. Boca Ratón: CRC Press, pp. 77 - 108.
44. Swine Health Information Center, 2019. *Domestic Disease Monitoring Reports*. [En línea] Disponible en: <https://www.swinehealth.org/domestic-disease-surveillance-reports/> [Último acceso: 14 Noviembre 2019].
45. Trujillo Ortega, M; Figueroa, R.; García, M.; Juárez, M.; Sotomayor, A.; Hernández, E.; Becerra, J.; Sarmiento, R., 2016. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico case report. *BMC Veterinary Research*, 12(132), pp. 1 - 8.
46. Velasco Villalvazo, J. L., 2015. *Bioseguridad en granjas porcinas. Porcicultura*. [En línea] Disponible en: <https://www.porcicultura.com/destacado/Bioseguridad-en-granjas-porcinas> [Último acceso: 28 Marzo 2020].
47. Velázquez Vázquez, M. (2019). *Estandarización, evaluación y validación de la técnica rt-pcr múltiple para el diagnóstico molecular de diarrea*

epidémica porcina (dep), gastroenteritis transmisible del cerdo (get) y rotavirus porcina (rvp). Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

48. Wentao, L. y otros, 2016. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Research*, Issue 226, p. 117–127.
49. Woo, P. C. Y. y otros, 2012. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *Journal of Virology*, pp. 3995 - 4008.
50. Zhang, J., 2016. Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution. *Virus Research*, Volumen 226, pp. 71 - 84.
51. Zhang, J; Tsai, Y; Lee, P; Chen, Q; Zhang, Y; Chiang, C; Shen, Y; Li, F; Chang, H; Gauger, Phillip C; Harmon, Karen M; Wang, H., 2016. Evaluation of two singleplex reverse transcription-Insulated isothermal PCR tests and a duplex real-time RT-PCR test for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus. *Journal of Virological Methods*, Issue 234, pp. 34 - 42.
52. Zoetis, 2017. *Catalogo de productos Zoetis*. [En línea] Disponible en: <https://www.zoetis.mx/products/porcino/pedv.aspx> [Último acceso: 2020 03 28].

53. Zuñiga, S. y otros, 2016. Virulence factors in porcine coronaviruses and vaccine design. *Virus Research*, Volumen 226, pp. 142-151.

Anexos

Anexo 1. Gradientes descartados en el Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf.

Tubos: 200 µl		Temperatura: 55°C		Gradiente: 3°C	
Carril	Temperatura	Carril	Temperatura		
1	52.1°C	7	55.3°C		

2	52.1°C	8	56.1°C
3	52.4°C	9	56.9°C
4	53°C	10	57.5°C
5	53.6°C	11	58,0°C
6	54.4°C	12	58.3°C

Tubos: 200 µl Temperatura: 55°C Gradiente: 4°C			
Carril	Temperatura	Carril	Temperatura
1	51.1°C	7	55.3°C
2	51.2°C	8	54.2°C
3	51.6°C	9	57.5°C
4	52.3°C	10	58.4°C
5	53.2°C	11	59°C
6	54.2°C	12	59.4°C

Tubos: 200 µl Temperatura: 55°C Gradiente: 5°C			
Carril	Temperatura	Carril	Temperatura
1	50°C	7	55.5°C
2	50.2°C	8	57.1°C
3	50.7°C	9	58.1°C
4	51.6°C	10	59.2°C
5	52.3°C	11	60°C
6	53.8°C	12	60.4°C

