



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

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

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**METAGENÓMICA APLICADA PARA LA DETECCIÓN DE  
PATÓGENOS VIRALES EMERGENTES DE LOS CERDOS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**PRESENTA:**

**MONTSERRAT AMARANTA VELÁZQUEZ VÁZQUEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**CLAUDIA CECILIA MÁRQUEZ MOTA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM**

**SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., julio de 2021



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.

## DEDICATORIA

A Aurora Vázquez, quien me enseñó la importancia de la solidaridad, la lealtad, la empatía y la resiliencia, entre muchas otras cosas. Fuiste una mujer muy fuerte, cariñosa, dedicada y enérgica, superaste innumerables adversidades y aprendiste de cada una de ellas. Siempre vivirás en mi corazón, gracias por tantas experiencias maravillosas, por cuidarme, por tus consejos, por transmitirme tu sabiduría, por tu gran amor y por mostrarme día a día lo invaluable de cada pequeño momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Carmen Vázquez y Manuel Velázquez, quienes me han apoyado desde siempre y han velado por mi bienestar. Nuestra pequeña familia ha salido adelante de múltiples problemas, y sé que seguiremos siendo fuertes. Agradezco infinitamente la fe que ambos han depositado en mí, así como todas las herramientas que me han brindado para poder desarrollarme y llegar hasta el posgrado. Somos un increíble equipo, me siento privilegiada por contar con un papá y una mamá que han caminado conmigo, acompañándome en los momentos felices, tristes y aquellos llenos de ansiedad, especialmente durante esta pandemia.

A mi familia: Manuel Velázquez del Olmo, Alicia Martínez, Patricia Velázquez, Rocío Velázquez, Gloria Velázquez, Aurora Vázquez, Rosa María Vázquez, Lucía Vázquez, Dulce Vázquez, Miguel Gómez, Miguelito Gómez, Laura Gómez, Demetrio Gil, Karla Gil, José María Gil, Ingrid Altamirano y Luisa Vázquez, quienes han creído en mí desde hace muchísimo tiempo, me han dado lecciones de vida y nos han apoyado a mis padres y a mí en los momentos difíciles.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, mi segundo hogar, por darme el chance de seguir enriqueciéndome profesionalmente. Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos y la Unidad de Investigación, por permitirme desarrollar la tesis en sus instalaciones.

Al doctor José Ivan Sánchez Betancourt, por la asesoría que recibí de su parte, por sus palabras de aliento, por tomar en cuenta mis comentarios y por confiar en mí en cuanto a las decisiones que tomé durante el proceso experimental del proyecto. Gracias por darme la “libertad creativa”, doctor, sí se pudo. Espero que en un futuro pueda ser tan brillante y perspicaz como usted.

A Ali Carbajal, el pequeño koala. Nos conocimos hace cuatro años y sé que siempre puedo contar contigo, eres una persona maravillosa, gracias por darme empujoncitos cuando lo necesito para tomar riesgos y por siempre creer en mí. Me has impulsado en mis peores momentos, cuando yo he dudado de mis capacidades, y me has escuchado como nadie. De verdad agradezco muchísimo que estés en mi

vida, y espero que sigamos compartiendo vivencias bonitas, pues me cuesta mucho visualizar mi futuro sin alguien tan valiosa como tú.

A quienes me encaminaron a la Biología Molecular, Mariana Pérez Rivera y Saúl Revéles, ya que, sin su guía, la verdad no sé en dónde estaría en estos momentos. La vida da muchas vueltas, y me siento muy afortunada de que, a partir de la tesis de licenciatura, pudiera conocerlos y ahora llamarlos amigos.

A Mary Jo Contreras, por darme el chance de seguir desarrollándome profesionalmente, sin su apoyo no estaría en el lugar en donde estoy. Muchas gracias por la confianza que has depositado en mí, y espero que podamos seguir trabajando juntas por mucho tiempo mientras mantenemos una bonita amistad.

A Jess Martínez, Sof Cruz e Izamar Romero ¿Quién diría que luego de 11 años seguiríamos siendo tan buenas amigas? Gracias por siempre estar para mí, por enriquecerme con sus comentarios y consejos, tanto académicos como de la vida cotidiana. Me siento muy feliz de tener como confidentes y cómplices a mujeres tan asombrosas como ustedes. A Yordy Negrete Moreno, Selene Quintana, Dennise Lezama, Ale Sánchez Ferrera, Stef Rivas, Erika Salazar, Mariana Elizarrarás, Cynthia Vázquez, Laura Vázquez, Víctor Roldán y Mariana Girón, mis amigos de la facultad, gracias por preocuparse por mí, compartir risas y momentos tristes conmigo, por confiar en mí y apoyarme siempre. A Amaury Martínez, mi primer amigo en el ámbito laboral, tenemos poco de conocernos, pero agradezco la ayuda y las risas del día a día, somos una gran dupla en este videojuego llamado “Sobreviviendo en el trabajo”.

Finalmente, y no por eso menos importantes, agradezco infinitamente a Caro Leyva y Ale López Márquez, quienes han estado al pendiente de mí desde hace bastante tiempo, por aceptarme tal y como soy en todos los sentidos, por rescatarme de situaciones complicadas, por escucharme, por hacerme reír cuando me siento fatal y por quererme mucho. Son personas muy importantes para mí, mis estrellas guía en la oscuridad, y espero que sigamos siendo amigas por muchísimos años más.

## RESUMEN

En los últimos años, se ha observado la emergencia y diseminación de nuevos agentes virales que comprometen la salud de distintas especies a nivel mundial, entre ellas los cerdos. Su importancia radica en la falta de información para su control y erradicación, así como de sus altas tasas de morbilidad, mortalidad y letalidad. Una herramienta útil para la detección de los patógenos emergentes es la metagenómica, que es el estudio de las comunidades de microorganismos que se encuentran en una muestra determinada. El objetivo del presente trabajo fue identificar las familias virales de virus DNA relacionadas con patógenos emergentes de gran importancia para la porcicultura a nivel mundial. Se tomaron 30 muestras de cerdos una producción del Estado de México por medio de hisopado rectal, que fueron purificadas y después mezcladas, formando pools a partir de las etapas de producción a evaluar, los cuales se secuenciaron con el sistema de Illumina MiSeq (Micro). Los archivos obtenidos a partir del secuenciador fueron evaluados por medio del programa FASTQC, y, por medio de Trimmomatic, se eliminaron las lecturas de baja calidad. Posteriormente, se procesaron por medio de las plataformas Kaiju y Kraken2 para clasificar taxonómicamente las lecturas. Finalmente, por medio de Pavian se visualizaron los resultados. Los agentes patógenos que se detectaron fueron el virus de la diarrea viral bovina y el mastadenovirus porcino tipo C, los cuales no representan un riesgo para la porcicultura nacional e internacional al no ocasionar enfermedad emergente alguna, por lo tanto, la hipótesis fue rechazada, sin embargo, podría realizarse un estudio empleando muestras de distintos estados de la República Mexicana para obtener un panorama real del estatus zoonosario del país.

**Palabras clave:** Metagenómica, Enfermedades emergentes de los cerdos, Secuenciación masiva, Virus DNA, Diarrea viral bovina en cerdos, Mastadenovirus porcino tipo C.

## **ABSTRACT**

In recent years, there have been observed the emergence and dissemination of new viral agents that compromises the health of different species, including pigs. Its importance relies on the lack of information for its control and eradication, as well as its high morbidity, mortality, and lethality rates. An useful tool for the detection of emerging pathogens is Metagenomics, which is the study of the microbial communities found in a sample. The aim of the present study was to identify the viral families of DNA viruses related with emergent pathogens that are affecting the worldwide porciculture. Thirty rectal samples of pigs were taken from a farm located in the Estado de México, those samples were purified, mixed to form pools from the different production phases and then sequenced by the Illumina MiSeq (Micro) system. The files obtained from the sequencer were evaluated with FASTQC, and, using Trimmomatic, the low-quality reads were eliminated. Subsequently, the high-quality reads were processed with Kaiju and Kraken2 for its taxonomic classification. Finally, the results were visualized with Pavian. The pathogens detected were the bovine viral diarrhea virus and the porcine mastadenovirus type C, which don't represent a risk for the national and international porciculture because they don't cause any emergent disease, therefore, the hypothesis was rejected, however, a future study could be realized using samples from different places of the Mexican Republic to obtain a real picture of the animal health status of the country.

**Keywords:** Metagenomics, Emergent pigs diseases, Massive sequencing, DNA virus, Bovine viral diarrhea in pigs, Porcine mastadenovirus type C.

## CONTENIDO

Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Resumen	5
Abstract	6
Contenido	7
Lista de abreviaturas	9
Lista de figuras	11
Lista de cuadros	12
1. Introducción	13
2. Hipótesis	27
3. Justificación	28
4. Objetivo general	29
5. Objetivos específicos	29
6. Material y métodos	30
6.1. Toma de muestras	30
6.1.1. Elaboración del medio de transporte viral	30
6.2. Purificación de material genético	31
6.3. Metodología de la secuenciación	32
6.4. Análisis bioinformático	32
7. Resultados	35
7.1. Cuantificación del material genético de los pools de las muestras	35
7.2. Análisis bioinformático	35
7.2.1. Análisis de calidad y limpieza de las lecturas	35
7.2.2. Clasificación taxonómica	36
8. Discusión	44
9. Limitaciones del estudio	47
9. Conclusión	48

10. Referencias	49
11. Anexos	63
11.1. Gráficos obtenidos a partir de FASTQC antes de la limpieza de las secuencias	63
11.2. Gráficos obtenidos a partir de FASTQC después de la limpieza de las secuencias	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg: microgramo.

ABI: Applied Biosystems.

ASFV: African Swine Fever virus (virus de la Peste Porcina Africana).

CEIEPP: Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina.

CINVESTAV: Centro de Investigación y Estudios Avanzados.

DNA: Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico).

ELISA: Enzyme-linked immunoassay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

EMBL: European Molecular Biology Laboratory.

emPCR: Emulsion Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa de emulsión).

FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Gb: Gigabases.

GC: Guanina-Citosina.

GE: General Electric.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses.

IPN: Instituto Politécnico Nacional.

LABSERGEN: Laboratorio de Servicios Genómicos.

mg: miligramo.

mL: mililitro.

mRNA: Messenger Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico mensajero).

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

ng: nanogramo.

NSG: Next-Generation Sequencing.

PAdV: Porcine Adenovirus (Adenovirus porcino).

pb: pares de bases.

PBoV: Porcine Bocavirus (Bocavirus porcino).

PBS: Phosphate Buffered Saline (solución salina tamponada con fosfato).

PCR. Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PCV-2: Porcine Circovirus type 2 (Circovirus porcino tipo 2).

PDCoV: Porcine Deltacoronavirus (Deltacoronavirus porcino).

PGM: Personal Genome Machine.

PHV-1: Porcine Herpesvirus type 1 (Suid herpesvirus).

PPV: Porcine Parvovirus (Parvovirus porcino).

prom.: promedio.

RNA: Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico).

rpm: revoluciones por minuto.

rRNA: Ribosomal Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico ribosomal).

RvP: Rotavirus Porcino.

SBS: Secuenciación por Síntesis.

TTSuV: Torque Teno Suis virus.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

vDEP: virus de Diarrea Epidémica Porcina.

vGET: virus de la Gastroenteritis Transmisible del Cerdo.

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de crecimiento	36
Fig. 2. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de destete	37
Fig. 3. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de engorda	37
Fig. 4. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de hembras gestantes	38
Fig. 5. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de lactancia	38
Fig. 6. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de machos reproductores	39
Fig. 7. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de crecimiento	39
Fig. 8. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de destete	40
Fig. 9. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de engorda	41
Fig. 10. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de hembras gestantes	41
Fig. 11. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de lactancia	42
Fig. 12. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de machos reproductores	43

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1. Grupos que integran la clasificación de Baltimore	16
Cuadro 2. Virus que afectan la industria porcina a nivel mundial	17
Cuadro 3. Principales plataformas de secuenciación de nueva generación	22
Cuadro 4. Flujo de trabajo de la secuenciación a partir de Illumina	23
Cuadro 5. Concentración de los pools de las muestras purificadas	35
Cuadro 6. Datos de las secuencias en los pools de las muestras	35

# 1 INTRODUCCIÓN

Un microbiota es una comunidad de microorganismos que puede encontrarse en diversos sitios del organismo, como en piel, cavidad oral, tracto urogenital y tracto gastrointestinal, y ésta tiene una relación mutualista con su hospedero (Nowland *et. al.*, 2019; Icaza-Chávez, 2013).

En conjunto, los distintos microbiotas se encargan de fortalecer la respuesta inmune del hospedero, preparándolo para futuras infecciones causadas por distintos patógenos, y, asimismo, el sistema inmune de este último ha desarrollado mecanismos para conservar estas poblaciones de microorganismos, manteniendo una simbiosis entre ambos (Belkaid and Harrison, 2018; Khodamoradi *et. al.*, 2019). Un ejemplo este tipo de relación es que, gracias a la fermentación que llevan a cabo los microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal de los cerdos, se estimula la producción de la inmunoglobulina A, que limita el ingreso de patógenos a las células epiteliales intestinales (Fouhse *et. al.*, 2016); por el otro lado, por medio de la fermentación de los alimentos que los cerdos ingieren se generan distintos compuestos, como aminos y amonio, lo cual está asociado con el crecimiento de diferentes poblaciones de microorganismos correspondientes al microbiota (Heyer *et. al.*, 2015).

Debido a sus características, el tracto gastrointestinal puede albergar diversos patógenos, ya sean protozoarios, bacterias, hongos o virus, que comprometen la salud del hospedero (Aluthge *et. al.*, 2019; Nowland *et. al.*, 2019). En organismos sanos, el sistema inmune tolera la presencia del microbiota en el tracto gastrointestinal; al proceso del desarrollo y establecimiento de colonias de microorganismos en ausencia de inflamación se le conoce como inmunidad homeostática, y esta es una característica de las respuestas adaptativas al microbiota (Belkaid and Harrison, 2018).

Se han realizado estudios en los cuales se prueba el efecto que tiene el estrés en el microbiota de esta región, evidenciando que existe una disminución de la diversidad y del número de microorganismos comensales; los cambios en el microbiota gastrointestinal también pueden ocurrir en el periodo prenatal, pues en

distintos ensayos se señala el impacto que tiene el estrés durante la gestación en las poblaciones de proteobacterias y bacterias ácido lácticas tanto en humanos como en animales de laboratorio (Bailey *et. al.*, 2004; Zijlmans *et. al.*, 2015; Mackos *et. al.*, 2017).

El microbiota gastrointestinal de los cerdos está compuesto principalmente por bacterias de dos filos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*; dependiendo de las diferentes etapas de vida de los cerdos, su estado fisiológico y su dieta, las especies de microorganismos comensales pueden variar, pero aquellas que generalmente predominan son las siguientes: *Lactobacillus* spp., *Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Selenomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Shigella* spp., *Escherichia* spp., *Prevotella* spp., *Butyrivibrio* spp., *Oscillibacter* spp. y *Ruminococcus* spp. (Wang *et. al.*, 2018; Valeriano *et. al.*, 2016; Kim *et. al.*, 2015).

Por otro lado, al conjunto de microorganismos, sus genes y sus metabolitos se le conoce como microbioma (Icaza-Chávez, 2013). Los términos microbioma y microbiota se han utilizado de forma indistinta por varios autores, ya que, si bien no son lo mismo, a través de la información obtenida al estudiar las secuencias genéticas de los microorganismos (microbioma) se puede conocer la variedad de éstos (microbiota) (Marchesi and Ravel, 2015; Isaacson and Kim, 2012).

El estudio del microbioma puede llevarse a cabo por diversas técnicas, sin embargo, antes del desarrollo de herramientas moleculares, se empleaban cultivos para el crecimiento *in vitro* de las bacterias comensales de las diferentes regiones del organismo, pero muchas de éstas no podían aislarse y el análisis por este método excluía a protozoarios y virus (Barko *et. al.*, 2018). Con la implementación de nuevas tecnologías, fue posible estudiar el microbioma a través de procedimientos más específicos y con la capacidad de analizar el genoma de otros microorganismos, además de las bacterias, como la amplificación de secuencias específicas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) o por secuenciación masiva (Barko *et. al.*, 2018; Maltecca *et. al.*, 2020).

Parte importante del microbioma es el viroma, que se define como el conjunto de virus que se encuentran en un ambiente o un sistema en particular, incluyendo a aquellos que afectan a las células eucariotas y a los que afectan a las células procariotas (bacteriófagos); el viroma porcino está conformado por los virus que se encuentran en su organismo, tanto patógenos como aquellos que no ocasionan enfermedades, bacteriófagos, y por el material genético de antiguos retrovirus insertado en los cromosomas de los cerdos (Zárate *et. al.*, 2017; Denner, 2017).

Los virus pueden clasificarse bajo diferentes criterios; en 1976, David Baltimore estableció que los virus se clasifican en grupos distintos con base en su material genético, es decir, si éstos poseen DNA o RNA para la producción de las proteínas que lo conforman; de igual forma, por medio de la introducción microscópica de la taxonomía de los virus, éstos se han clasificado por las estructuras morfológicas que se observan a través del microscopio electrónico; sin embargo, desde 1996, The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ha identificado los virus con base en el orden, la familia, la subfamilia, el género y la especie a la que pertenecen, es decir, los clasifica taxonómicamente (Webber, 2016; Baltimore, 1971; Kuhn, 2020).

Entre los virus DNA y RNA existen diferencias significativas, principalmente en cuanto a su ciclo de replicación, pues usualmente los virus DNA ingresan a la célula por fusión de membranas, utilizan la maquinaria celular para la replicación del DNA y su posterior transcripción a RNA, mientras que los virus RNA infectan las células al inyectar su RNA en el citoplasma para la síntesis de las proteínas virales; algunos virus RNA pueden saltarse el paso de la transcripción debido a que algunas moléculas pueden actuar como mRNA y traducirse directamente a proteínas, y, adicionalmente, otros virus RNA requieren de un proceso para su replicación, conocido como transcripción reversa, para la utilización de la maquinaria bioquímica de la célula hospedera (Gelderblom 1996; Helmenstine, 2020; Libal, 2018). Otro punto importante a considerar es que los virus RNA tienen una tasa de mutación más grande que la de los virus DNA debido a la tasa de error de las enzimas involucradas en la replicación, ya que las DNA polimerasas tienen la capacidad de

corregir errores durante la replicación; estas mutaciones suelen ser aleatorias y en su mayoría se consideran como deletéreas, impidiendo la posterior replicación de los viriones portadores de ese genoma, pero a su vez, pueden ocurrir mutaciones que propicien la supervivencia del virus en ambientes hostiles, obteniendo como resultado la rápida evolución de este tipo de virus (Duffy, 2018; Domingo *et. al.*, 1997).

De acuerdo con el material genético que poseen los virus, éstos se dividen en los siguientes grupos:

**Cuadro 1. Grupos que integran la clasificación de Baltimore**

GRUPO	TIPO DE MATERIAL GENÉTICO	REFERENCIAS
I	<b>DNA bicatenario:</b> Como las células, estos virus realizan una transcripción asimétrica del DNA para dar lugar al mRNA. Ej. familia <i>Adenoviridae</i> .	Baltimore, 1971; Kuhn, 2020.
II	<b>DNA monocatenario:</b> se sintetiza la segunda cadena de DNA antes de que se transcriba el RNA, dependen de la actividad de endonucleasa de sus proteínas de iniciación de la replicación. Ej. familia <i>Circoviridae</i> .	Baltimore, 1971; Krupovic and Forterre, 2015.
III	<b>RNA bicatenario:</b> su material genético se encuentra segmentado, y cada segmento codifica para la síntesis de una proteína. Ej. familia <i>Reoviridae</i> .	Baltimore, 1971; Wickner, 1993.
IV	<b>RNA monocatenario sentido positivo:</b> su sitio de replicación primario es el citoplasma. Para la síntesis de mRNA, requiere de la producción de una cadena negativa molde de RNA. Ej. familia <i>Picornaviridae</i> .	Baltimore, 1971; Hiscox, 2007.
V	<b>RNA monocatenario sentido negativo:</b> necesitan su propia RNA polimerasa dependiente de RNA en la célula infectada para iniciar la síntesis de mRNA específico del virus. Ej. familia <i>Paramyxoviridae</i> .	Baltimore, 1971; Palese <i>et. al.</i> , 1996.
VI	<b>RNA monocatenario sentido positivo que tienen un DNA intermedio en su replicación producido por la transcripción inversa y virus RNA tumorales:</b> Ej. familia <i>Retroviridae</i> .	Baltimore, 1971; Kuhn, 2020.
VII	<b>DNA bicatenario con transcriptasa reversa:</b> el DNA se replica a través de RNA intermediario que puede utilizarse como mRNA o como templado para mRNA. Ej. familia <i>Hepadnaviridae</i> .	Rye <i>et. al.</i> , 2017.

Diversos virus pueden colonizar las células del epitelio intestinal de los cerdos, y éstos pueden excretarse por medio de las heces, como el virus de Diarrea Epidémica Porcina (vDEP), el virus de Gastroenteritis Transmisible del Cerdo (vGET), el Rotavirus Porcino (RvP) y el Deltacoronavirus Porcino (PDCoV), cuyo material genético es RNA (Crouch, 1985; Piñeros y Mogollón, 2015; Vlasova *et al.*, 2017; Jung *et. al.*, 2016).

Otros virus de importancia en la industria porcina a nivel mundial, de material genético DNA, no necesariamente causan problemas a nivel gastrointestinal, pero pueden transmitirse vía fecal – oral y, por lo tanto, se pueden detectar en muestras de hisopos rectales o heces; éstos se enlistan en el siguiente cuadro:

**Cuadro 2. Virus que afectan la industria porcina a nivel mundial**

VIRUS	REGIÓN QUE AFECTA Y TRANSMISIÓN	SITIOS DE REPLICACIÓN	SIGNOLOGÍA Y LESIONES	IMPACTO EN LA PRODUCCIÓN PORCINA	REFERENCIAS
<b>Adenovirus porcino (PAdV) – Adenoviridae</b>	Tracto digestivo.  Se transmite por vía fecal – oral.	Tonsilas e intestino delgado; también se replica en el sistema nervioso central, pulmones, corazón, hígado, riñones y bazo.	Anorexia, enteritis, espasmos musculares, diarrea y falta de coordinación; también puede causar lesiones en cerebro, pulmones y riñones.	Se considera un agente de baja patogenicidad, aunque puede exacerbar desórdenes reproductivos.	Derbyshire, 2012; Said, Woldemariam and Tikoo, 2019; The Center for Food Security & Public Health, 2015.
<b>Virus de la Peste Porcina Africana (ASFV) – Asfarviridae</b>	Multisistémico; cursa con diferentes cuadros clínicos, dependiendo de la virulencia de la cepa y la carga viral.  Su transmisión es por orina, heces, jabalíes y garrapatas del género <i>Ornithodoros</i> .	En monocitos y macrófagos; de igual forma se replica en células endoteliales, hepatocitos, células del epitelio tubular renal y neutrófilos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Cuadro hiperagudo: hemorragias internas, hemorragias en piel y muerte súbita.</li> <li>● Cuadro agudo: lesiones hemorrágicas.</li> <li>● Cuadro crónico: abortos, alteraciones respiratorias y baja mortalidad.</li> </ul>	Al causar una enfermedad que alcanza un porcentaje de mortalidad de hasta el 100%, se estima que, en Estados Unidos, podría causar una pérdida económica de más de 15 billones de dólares en 2 años, así como la pérdida de 140,000 empleos.	Sánchez-Vizcaíno, 2012; Sánchez-Vizcaíno, 2015; Golnar <i>et. al.</i> , 2019; Carriquiry <i>et. al.</i> , 2020.
<b>Bocavirus porcino (PBoV) – Parvoviridae</b>	Multisistémico.  Se transmite por medio de fluidos orales y heces; se puede detectar en linfonodos, pulmón y suero.	Linfonodos, intestino delgado, pulmones y bazo.	Se ha detectado en cerdos con signos respiratorios, diarrea y positivos a Circovirus porcino tipo 2; puede causar complicaciones reproductivas, sin embargo, se desconoce cuál es su signología específica.	Se considera un agente inmunosupresor; se desconoce su patogénesis. En 2018 se reportó el primer caso en humanos al causar una infección respiratoria en un niño de 3 años.	Swine Health Information Center, 2016; Zhang <i>et. al.</i> , 2016; Zhou <i>et. al.</i> , 2014; Safamanesh <i>et. al.</i> , 2018.

<p><b>Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) – <i>Circoviridae</i></b></p>	<p>Multisistémico.</p> <p>Su transmisión es a través de secreciones nasales, saliva, moco traqueal, orina, heces, semen y secreciones oculares.</p>	<p>Linfonodos bronquiales e inguinales, tonsilas, pulmones, hígado, riñones, bazo y timo.</p>	<p><b>Síndrome multisistémico de adelgazamiento post-destete:</b> pérdida de peso, agrandamiento de linfonodos, ictericia, neumonía, diarrea, enteritis, momias, mortinatos y abortos.</p> <p><b>Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina:</b> lesiones en piel, nefritis glomerular e intersticial, y vasculitis.</p>	<p>Es uno de los patógenos de mayor importancia económica a nivel mundial en la porcicultura, particularmente por los fallos reproductivos que ocasiona, así como por su fácil diseminación dentro de las producciones.</p>	<p>Lukert and Allan, 2012; Meng, 2013; Segalés, 2012; Madson and Opriessnig, 2011.</p>
<p><b>Parvovirus porcino (PPV) – <i>Parvoviridae</i></b></p>	<p>Tracto reproductor.</p> <p>Se transmite por medio de heces y orina; también se transmite vía transplacentaria.</p>	<p>Linfocitos activados; por PCR se ha detectado el virus en corazón, pulmón, riñón, bazo, endometrio e intestino delgado.</p>	<p>Falla reproductiva, muerte fetal, muerte embrionaria, momificaciones, reabsorción embrionaria y mortinatos.</p>	<p>Reduce el número de lechones obtenidos por ciclo productivo.</p>	<p>Mengeling, 2012; Meszaros <i>et. al.</i>, 2017; Mengeling <i>et. al.</i>, 2000.</p>
<p><b>Suid herpesvirus (PHV-1) – <i>Herpesviridae</i></b></p>	<p>Multisistémica; ocasiona la enfermedad de Aujeszky o Pseudorrabia.</p> <p>Se transmite a través de leche, orina, heces y secreciones vaginales y prepuciales.</p>	<p>Cavidad nasal, tonsilas, faringe y pulmones.</p>	<p>Lechones: fiebre, anorexia, temores, posición de perro sentado, caminan en círculos, y convulsiones (afecta sistema nervioso central). Cerdos destetados: tos, estornudos, conjuntivitis, disnea y signos nerviosos. Adultos: neumonía. Cerdas gestantes: reabsorción de embriones, abortos, mortinatos, o paren lechones débiles.</p>	<p>Su impacto radica en la diversidad de órganos y tejidos que afecta, en que su curso clínico es agudo y que afecta todas las etapas de producción, por lo que la forma más efectiva de eliminar este virus es despoblar la producción afectada.</p>	<p>Kluge <i>et. al.</i>, 2012; Nauwynck, 1997; The Center for Food Security &amp; Public Health; 2017; Liu <i>et. al.</i>, 2019.</p>

<b>Torque teno suis virus (TTSuV) – Anelloviridae</b>	Multisistémico. Puede transmitirse por medio de heces, saliva, suero, secreciones nasales, semen y calostro; también se puede transmitir de forma vertical.	No se sabe con exactitud su ciclo de replicación, pero se sugiere que puede replicarse en hígado y médula ósea, así como en pulmón, bazo, páncreas, riñón, tiroides, linfonodos y células mononucleares.	Ambos tipos (TTSuV-1 y TTSuV-2) no producen signos clínicos ni lesiones por sí solos en los cerdos, pero potencia a otros patógenos.	De acuerdo con reportes recientes, el TTSuV contribuye a la inducción de enfermedades ocasionadas por otros virus de gran importancia en la porcicultura (PCV-2 y PRRSv). De igual manera, se sugiere que este agente deteriora el sistema inmunológico del organismo al que infecta.	International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020; Gallei <i>et. al.</i> , 2010; Manzin <i>et. al.</i> , 2015; Kekarainen and Sergalés, 2009; Ghosh <i>et. al.</i> , 2020; Manzin <i>et. al.</i> , 2015,
---	---	--	--	---	---

Todos los virus pasan por distintas fases: la unión del virión a las células huésped gracias a los receptores de éstas, la fusión de membranas, el desnudamiento del material genético, la replicación, el ensamblaje de los nuevos viriones y su salida al espacio extracelular; sin embargo, en el proceso de replicación existen diferencias muy marcadas entre los virus DNA y los virus RNA (DiMaio and Coen, 2007; Cann, 2016). De manera general, los virus DNA necesitan construir mRNA que pueda ser traducido en proteínas por medio de la maquinaria celular, el virus necesita replicar su genoma y requiere de las enzimas nucleares de las células huésped para la síntesis de mRNA y la replicación, por lo que todo el proceso se lleva a cabo en el núcleo celular (Hunt and McIlroy, 2016).

Para realizar el diagnóstico de enfermedades virales de los cerdos se pueden llevar a cabo pruebas de laboratorio, las cuales se clasifican en dos grupos, las pruebas directas, que detectan el virus, y las pruebas indirectas, que son las técnicas serológicas que detectan anticuerpos específicos contra determinado patógeno viral, considerando que la exposición al agente produce una respuesta por parte del sistema inmune (Crespo, 2000; Tapia, 2015). En las pruebas directas se encuentran la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés), la hibridación *in situ*, la microscopía electrónica, la técnica de ELISA directa (el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas por sus siglas en inglés) y el aislamiento viral, entre otras, y como ejemplos de pruebas indirectas se mencionan

la fijación de complemento, la hemaglutinación indirecta, la neutralización, la inhibición de la hemaglutinación, el Western Blot y la técnica de ELISA indirecta (Crespo, 2000; Tapia, 2015; Reller and Weinstein, 2000; MacLachlan and Dubovi, 2011).

En la actualidad se sabe que existen diversas técnicas diagnósticas para detectar varios microorganismos en un solo ensayo, sin embargo, éstos suelen ser costosos, se requiere de equipo especializado para poder llevarse a cabo y no permiten conocer la diversidad de microorganismos que habitan en determinados sistemas dentro de un individuo (Abcam, 2019; Claas *et. al.*, 2013; Brunstein *et. al.*, 2008). Para poder analizar el microbioma de los sistemas de un organismo en cuestión, se ha implementado la secuenciación de material genético, que se refiere a los métodos empleados para determinar el orden de los nucleótidos en una molécula de DNA de algún organismo (Kumar, 2012).

En 1977, Frederick Sanger, un bioquímico británico, publicó un artículo en donde se describió por primera vez una técnica de secuenciación, conocida como secuenciación del DNA de terminador dideoxi, implementada inicialmente en gel en placa y luego en sistemas basados en gel capilar (McGinn and Gut, 2013; Shendure *et. al.*, 2017); en ese mismo año, Walter Gilbert desarrolló otra forma de secuenciación, la cual se basaba en la modificación química del DNA, degradándolo y dividiéndolo en bases específicas, separadas en un gel de electroforesis (Liu *et. al.*, 2012; Pareek *et. al.*, 2011). Debido a que el método de Sanger tiene una alta eficiencia y una baja radioactividad en comparación con el de Gilbert, este es considerado como el procedimiento base de la secuenciación de primera generación (Liu *et. al.*, 2012).

A partir del trabajo de Sanger, se introdujeron los primeros secuenciadores automatizados de DNA al mercado, comercializados por Applied Biosystems (ABI), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y General Electric (GE), logrando que la comunidad científica tuviera acceso a este tipo de equipos y permitiendo que, en 2001 y con secuenciadores más tecnológicos, se secuenciara por primera vez el genoma humano (Pareek *et. al.*, 2011; Lander *et. al.*, 2001)

El método de Sanger se basa en el uso del DNA como molde y de la DNA polimerasa para la síntesis de cadenas de DNA con terminación específica; la reacción ocurría en 4 tubos, cada tubo contiene a la molécula molde, los 4 desoxirribonucleótidos trifosfato (correspondientes a cada nucleótido), la DNA polimerasa y los 4 didesoxirribonucleótidos trifosfato, los tamaños de los fragmentos de cada reacción específica de la base eran medidos por electroforesis en geles de poliacrilamida, en los que se separaban los fragmentos de DNA por tamaño, cada uno variando solo por una base, produciendo una imagen de escalera en la que se podía observar el orden de las bases y así, obtener el orden correcto de los nucleótidos que conforman la secuencia (Sanger *et. al.*, 1977; McGinn and Gut, 2013; Shendure *et. al.*, 2017).

La secuenciación Sanger evolucionó durante los siguientes 30 años luego de su desarrollo para poder realizarse de forma automatizada; en 1986 se demostró que los datos proporcionados por este método se podían procesar directamente en una computadora, se reemplazó la DNA polimerasa por la Taq polimerasa, la electroforesis en gel cambió fue sustituida por electroforesis capilar y se agregó un marcaje fluorescente a los didesoxirribonucleótidos trifostato; gracias a estas modificaciones el proceso de la secuenciación se lleva a cabo en varios ciclos, por lo que también se le conoce como secuenciación cíclica (Shendure and Ji, 2008; Shendure *et. al.*, 2011; Shendure *et. al.*, 2017; Tipu and Shabbir, 2015).

Aunque la secuenciación por el método de Sanger guio a la comunidad científica a diferentes descubrimientos, tiene limitaciones, como lo es el que se necesite una gran cantidad de material genético, o bien, que la técnica no es tan sensible, en consecuencia, fue necesario implementar nuevos protocolos y equipos para ampliar el campo de conocimiento en las Ciencias Genómicas, dando origen a los métodos de secuenciación de nueva generación (Next-Generation Sequencing: NGS, por sus siglas en inglés) (Tipu and Shabbir, 2015; Liu *et. al.*, 2012). En el siguiente cuadro se muestran algunas de las plataformas que utilizan la NGS:

**Cuadro 3. Principales plataformas de secuenciación de nueva generación**

PLATAFORMA	TAMAÑO DE LECTURA	DESCRIPCIÓN	APLICACIONES
<b>ROCHE 454 SYSTEM</b>	400 pb*	Emplea la pirosecuenciación, que detecta productos de la incorporación de nucleótidos (pirofosfatos) para reportar cuál es la base que se incorpora en la cadena de DNA. Los fragmentos se ligan a adaptadores y se amplifican por PCR de emulsión (emPCR).	Secuenciación de genomas bacterianos y virales, productos de PCR multiplex, detección de mutaciones somáticas.
<b>Illumina GA/HiSeq System</b>	150 – 300 pb*	Utiliza la amplificación en puente: las moléculas de DNA, con unos adaptadores ligados a sus extremos, se usan para la amplificación de reacciones de síntesis en un soporte con secuencias complementarias de primers al adaptador; los nucleótidos incorporados (marcados con fluorescencia) son detectados.	Secuenciación de genomas complejos, de RNA, de productos de PCR multiplex y captura híbrida, detección de mutaciones somáticas; en medicina forense y test prenatales.
<b>ABI SOLiD System</b>	75 pb*	Adopta la tecnología de secuenciación de dos bases en la ligación de secuencias. Las bibliotecas se pueden secuenciar mediante una ligadura de sonda de 8 bases. La señal fluorescente se registrará durante el sondeo complementario a la hebra molde; la secuenciación del fragmento puede deducirse después de 5 rondas de secuenciación.	Secuenciación de genomas complejos, de RNA, de productos de PCR multiplex y captura híbrida, detección de mutaciones somáticas.
<b>Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine)</b>	200 – 400 pb*	Convierte directamente las secuencias de nucleótidos en información digital, a través de un chip, detectando cambios de voltaje conforme los nucleótidos se agregan a la cadena de DNA en crecimiento.	Secuenciación de productos de PCR multiplex, microbiología y enfermedades infecciosas, detección de mutaciones somáticas.

Información obtenida de: Liu *et. al.*, 2012; Mardis, 2017; Slatko *et. al.*, 2018.

\*pb: pares de bases

En 1998, la compañía británica Solexa comenzó a utilizar una técnica de secuenciación que consistía en la síntesis de cadenas de material genético con ayuda de terminadores fluorescentes, para que, de esta forma, se generaran bibliotecas a partir de amplificaciones de PCR en puente, que a su vez formaban clusters, es decir, colonias del mismo fragmento de DNA (Jauk, 2019; Rubio *et. al.*, 2020). En 2006, la empresa Illumina compró Solexa, refinando su tecnología para desarrollar secuenciadores capaces de leer secuencias más grandes en menor tiempo, y en 2007 comenzó a comercializarlos (Slatko *et. al.*, 2018, Jauk, 2019; Kulski, 2016).

La secuenciación de Illumina se divide en cuatro etapas:

**Cuadro 4. Flujo de trabajo de la secuenciación a partir de Illumina**

ETAPAS	FUNDAMENTO
<b>Preparación de bibliotecas</b>	Se preparan a partir de la fragmentación aleatoria de material genético de la muestra a analizar, y, al mismo tiempo, se ligan adaptadores a los fragmentos.
<b>Generación de clusters</b>	Los fragmentos del material genético a analizar se anclan a una celda, que está separada por carriles cubiertos con oligonucleótidos complementarios a los adaptadores previamente ligados. Después, cada fragmento se amplifica en diferentes clusters por medio de la amplificación en puente, en donde, utilizando la cadena original, se genera una cadena reversa complementaria. La cadena original se retira, conservando la cadena reversa, se ancla a su secuencia complementaria de oligonucleótido, formando un puente. Luego, se genera una cadena complementaria que es idéntica a la original, resultando en dos cadenas clonadas del segmento inicial. Por medio de este proceso se forman millones de copias de cada fragmento.
<b>Secuenciación</b>	Se retiran las cadenas reversas, conservando solo las que son idénticas a la original. Se introducen nucleótidos modificados en la placa marcados con fluoróforos, que permiten la identificación de cada una de las bases de las secuencias. El secuenciador utiliza un método en el que se detectan las bases individuales mientras se incorporan a las hebras del templado de material genético. La secuenciación se realiza base por base con una precisión alta, eliminando casi en su totalidad los errores específicos.
<b>Análisis de datos</b>	Una vez obtenidas las lecturas, se procede a utilizar herramientas de análisis bioinformático para el ensamble de las secuencias

Información obtenida de: Rubio *et. al.*, 2020; Illumina Inc., 2017; Illumina Inc., 2010.

De forma general, los secuenciadores de esta plataforma proveen lecturas de 100 pb en promedio, teniendo una longitud máxima de 500 pb, de igual forma, los costos son menores en comparación con otros sistemas como Roche454 (Slatko *et. al.*, 2018; Kulski, 2016). Illumina tiene equipos de nivel industrial, con una salida de datos por ejecución de 120 a 1500 Gb, así como otros de menor tamaño pero que emplean la misma tecnología de secuenciación, entre ellos se encuentra MiSeq, utilizado principalmente en laboratorios pequeños, pues tiene una salida de datos inferior (0.3 a 15 Gb), pero brinda resultados en uno o dos días a un menor costo (Kulski, 2016; Illumina Inc., 2019).

Para poder interpretar la información recabada a partir de la secuenciación, es necesario emplear herramientas bioinformáticas que permitan su análisis por medio del ensamble o la clasificación de genomas; los datos generados por el

secuenciador normalmente se convierten en documentos FASTA o FASTQ, que pueden ser procesados por una gran variedad de softwares disponibles (Arboleda and Xian, 2019; Bayat, 2002).

Una vez obtenida la información del secuenciador, es necesario revisar la disposición de los archivos y descartar las secuencias de baja calidad; a los datos obtenidos por medio de la secuenciación se les conoce como lecturas o *reads*, que son fragmentos de DNA que fueron amplificados por el secuenciador y juntos, conforman secuencias genéticas (Hodkinson and Grice, 2015; Johnson and Raza, 2018).

Algunos softwares para el procesamiento y estudio de los datos obtenidos a partir de la secuenciación genética son aquellos que se encargan del ensamble de genomas, como Velvet, Meraculous, SOAPdenovo, Supernova, Canu, FALCON, Flye, SPAdes y HGAP, sin embargo, para poder ejecutarlos es necesaria la elaboración de scripts de programación por medio de lenguajes como Python, BASH y/o Perl (Hodkinson and Grice, 2015; Verma *et. al.*, 2005). Por otro lado, existen programas que se encargan de la clasificación taxonómica del material genético que se encuentra en los archivos, como MG-Rast, DIAMOND, MegaBLAST, Kraken2, KrakenUniq, metaOthello y Kaiju; estas plataformas se encuentran disponibles gratuitamente y en línea, pero requieren de otros softwares, entre ellos Pavian, para la visualización de los resultados y su correspondiente análisis (Ye *et. al.*, 2019; Menzel *et. al.*, 2016; Breitwieser and Salzberg, 2019)

La secuenciación de material genético tiene una gran variedad de aplicaciones, por ejemplo, se emplea en la detección de enfermedades congénitas, la identificación de las funciones de los genes en una secuencia de DNA determinada, la comparación de genomas, el estudio de patrones evolutivos, el análisis de los genomas para su posterior edición por medio de ingeniería genética, el diagnóstico de enfermedades como cáncer, estudio de variación de secuencias, la detección e identificación de genomas en medicina forense, el estudio y detección de enfermedades infecciosas y el estudio del microbioma presente en diferentes

muestras (Verma *et. al.*, 2005; Rice and Green, 2019; Ahn, 2011; Metzker, 2005; Houldcroft *et. al.*, 2017).

Debido a que el aislamiento de diferentes organismos es complejo y no siempre se puede llevar a cabo, la secuenciación de material genético es una opción para su estudio; esta técnica ha dado origen a un nuevo campo en la ciencia, conocido como metagenómica (Tringe and Rubin, 2005).

La metagenómica se define como el estudio y análisis del genoma de una determinada población de microorganismos que se encuentran en el ambiente, o bien, en muestras clínicas de organismos pluricelulares (Wooley *et. al.*, 2010; Delwart, 2007). Es un conjunto de técnicas, que comprenden diversos enfoques y métodos relacionados entre sí en el campo de la investigación, para poder llevar a cabo un análisis funcional de los microorganismos presentes en una muestra a través de las secuencias de sus genomas (National Center for Biotechnology Information, 2006; National Research Council, 2007).

Previo al desarrollo de la secuenciación genética, el conocimiento de la microbiología se enfocaba en organismos que pudieran desarrollarse en cultivos; sin embargo, con la implementación de métodos de secuenciación de genomas de Gilbert y Sanger y el desarrollo del análisis de secuencias de los genes 5S y 16S del rRNA por Carl Woese en 1977, la idea de conocer el genoma de los organismos se volvió una realidad, pues estos protocolos permiten conocer del genoma de cualquier organismo (Handelsman, 2004; Schechter, 2020). En 1986 nació la idea de clonar DNA directamente del medio ambiente, basándose en secuencias del gen 16S del rRNA (Alves *et. al.*, 2018), y, en 1991, se creó el primer vector de clonación a partir de un bacteriófago, que dio pie para la creación de bibliotecas de secuencias de DNA de varios organismos (Handelsman, 2004).

El término “metagenómica” fue acuñado en 1998 por Jo Handelsman, pero dos años antes, en 1996, JL Stein y colaboradores realizaron el primer estudio metagenómico al analizar los microorganismos presentes en una muestra de agua del océano de Hawaii por medio de secuenciación del gen 16S del rRNA (Schechter, 2020; Alves *et. al.*, 2018). En 2000, Rondon y colaboradores realizaron un análisis

metagenómico de una muestra de suelo, e introdujeron el término “biblioteca metagenómica”, que es una herramienta que almacena el material genético obtenido a partir de una secuenciación y permite el análisis de los datos para su interpretación (Gilbert and Dupont, 2011; Dias *et. al.*, 2014).

Conforme las ciencias genómicas avanzaban y se realizaban más análisis metagenómicos de diversas muestras, las tecnologías avanzaron a la par, creando nuevos sistemas de secuenciación basados en el método de Sanger con la capacidad de procesar muestras de manera rápida, eficaz y a un bajo costo, permitiendo que más investigadores a nivel mundial pudiesen ampliar el conocimiento de la microbiología (Escobar-Zepeda *et. al.*, 2015).

Cualquier tipo de muestra de la que se pueda extraer material genético puede ser analizada por medio de la metagenómica, por lo que la obtención de DNA o RNA de los virus de muestras clínicas son la pieza clave para la detección e identificación de familias de éstos para su estudio (Hugenholtz and Tyson, 2008). Existen diferentes métodos mediante los cuales se puede realizar un análisis metagenómico, sin embargo, por medio de los sistemas de secuenciación de nueva generación, es posible la secuenciación masiva del material genético de los microorganismos de una muestra clínica o del ambiente y posteriormente se realiza un análisis bioinformático con los resultados obtenidos (Hugenholtz and Tyson, 2008; Cadena-Zamudio *et. al.*, 2016).

Se han realizado análisis metagenómicos para determinar las familias de virus que se pueden encontrar en muestras de heces de cerdos sanos y con cuadro clínico gastrointestinal (Denner, 2017; Shan *et. al.*, 2011; Chen *et. al.*, 2018). En China, el viroma de los cerdos está integrado por las familias *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* y *Reoviridae* (Denner, 2017), mientras que en los cerdos de Estados Unidos se pueden encontrar las familias *Picornaviridae*, *Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae* y *Parvoviridae* (Shan *et. al.*, 2011). En México, el conocimiento del viroma de los cerdos es limitado, por lo que el enfoque de este proyecto es conocer parte de dicha información a través del análisis metagenómico.

## **2 HIPÓTESIS**

Por medio de la secuenciación masiva y el análisis bioinformático, se encontrarán familias de virus DNA de importancia zoonositaria a nivel mundial que se consideran exóticos o emergentes en México.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

Debido a que la mayoría de las pruebas diagnósticas empleadas para la identificación de patógenos se enfocan en un microorganismo en particular, una herramienta que permita conocer el microbioma viral de los cerdos presente en heces, como lo es la secuenciación masiva, proveerá de la información necesaria para establecer una posible relación de alguna familia viral encontrada en las muestras analizadas y las familias de los agentes considerados como exóticos o emergentes en México que, en la actualidad, afectan a la porcicultura mundial.

#### **4 OBJETIVO GENERAL**

Identificar las familias virales DNA relacionadas con patógenos emergentes de importancia para la porcicultura a nivel mundial en muestras de hisopos rectales de cerdos por medio de análisis metagenómicos.

#### **5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las familias de virus DNA que se encuentran en el tracto gastrointestinal, mediante muestras de hisopos rectales de cerdos a través de la secuenciación masiva.
- Clasificar taxonómicamente todos los organismos que se encuentran en las muestras de hisopos rectales de cerdos empleando la bioinformática.
- Detectar la presencia de familias de virus DNA causantes de enfermedades exóticas o emergentes del cerdo.

## **6 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. TOMA DE MUESTRAS**

Se emplearon cinco muestras aleatorias de hisopos rectales de cerdos, tanto clínicamente sanos como con diarrea, de cada una de las siguientes etapas: lactancia, destete, crecimiento, engorda, reproducción y maternidad en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), localizado en Jilotepec, Estado de México, obteniendo un total de 30 muestras. A pesar de que el muestreo pudiera parecer limitado, se decidió que solo se consideraran 5 individuos de cada etapa debido a que los animales comparten las mismas condiciones ambientales dentro de las casetas de la producción, por lo que incorporar más cerdos al estudio no mostrarían resultados diferentes a los obtenidos.

Las muestras se tomaron con un hisopo directamente del recto de los cerdos, se colocaron en tubos con medio de transporte viral y se refrigeraron a una temperatura de 4°C para su traslado hacia el laboratorio.

#### **6.1.1. ELABORACIÓN DEL MEDIO DE TRANSPORTE VIRAL**

Para la preparación de este medio, se utilizó el protocolo SOP#DSR-052-05, Preparation of Viral Transport Medium de The Centers for Disease Control and Prevention como base, empleando el siguiente material:

- Campana de flujo laminar
- Pipetas estériles de 10 y 25 mL
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS), 10X (500 mL)
- Sulfato de gentamicina (50 mg/mL)
- Etanol al 70%
- Vaso de precipitados

Se procedió a realizar la siguiente metodología:

- 1 Se limpió la superficie de trabajo y las botellas de los reactivos a emplear con etanol al 70%.
- 2 Se colocaron 500 mL de PBS en un vaso de precipitados.
- 3 Con una pipeta estéril, se añadió 1 mL de sulfato de gentamicina, para obtener una concentración final de 100 µg/mL de antibiótico.
- 4 Se hicieron 30 alícuotas de 1 mL de medio de transporte en tubos cónicos de 1.5 mL.

Posterior a la toma de muestras, en el laboratorio, se extrajo el hisopo cuidadosamente y los tubos se centrifugaron a 8000 rpm (7156 g) por 5 minutos, con la finalidad de separar los residuos y así obtener aproximadamente 0.7 mL de sobrenadante, este último se tomó con una pipeta, se colocó en un microtubo de 1.5 mL y se utilizó para realizar la purificación del material genético.

## **6.2. PURIFICACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO**

Se llevó a cabo por medio del kit Viral DNA extraction and purification de la empresa BioVision, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 1 Se agregaron 200 µL de la muestra, así como 200 µL de la solución viral de lisis y 20 µL de la solución de Proteinasa K en un microtubo limpio. Se vortexeó el contenido por 30 segundos, y se incubó por 10 minutos a 58°C.
- 2 Se añadieron 100 µL de perlas magnéticas al microtubo.
- 3 Se agregaron 300 µL de isopropanol al microtubo.
- 4 Se mezcló el contenido del microtubo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5 Se colocó el microtubo en un estante magnético por 20 segundos. Fue necesario asegurarse de que las perlas se colectaron en el fondo del tubo.
- 6 Se removió el sobrenadante con ayuda de una pipeta.
- 7 Se lavaron las perlas magnéticas con 600 µL de solución de lavado y se vortexeó la muestra.

- 8 Se lavaron las perlas con 500  $\mu$ L de etanol al 80% dos veces y se repitió el paso 5.
- 9 Se secaron las perlas magnéticas a 55°C por 4 minutos, dejando el tubo abierto.
- 10 Se eluyó el DNA de las perlas con 30  $\mu$ L de buffer de elución, se incubó el microtubo a 60°C por 2 minutos y luego se vortexeó a máxima velocidad por 1 minuto. Luego de 5 minutos se vortexeó de nuevo.
- 11 Se removieron las perlas con el rack magnético, y se pipeteó el DNA para transferirlo a un microtubo limpio.
- 12 Se almacenó el DNA purificado a -20°C.

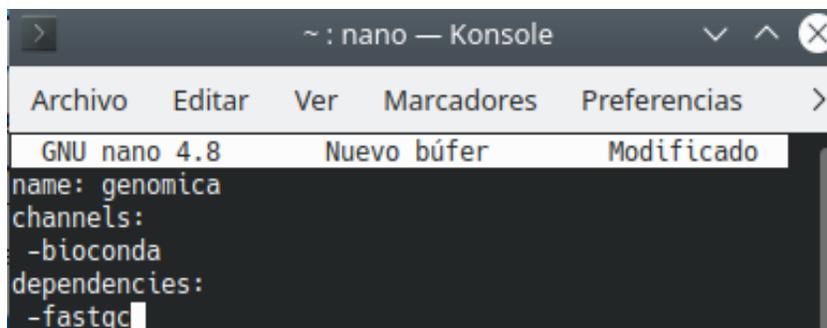
Después, se mezclaron los productos obtenidos de las muestras de cada etapa de producción, dando como resultado seis pools diferentes, que fueron cuantificados por medio del espectrofotómetro Nanodrop One, de Thermo Fisher Scientific.

### **6.3. METODOLOGÍA DE LA SECUENCIACIÓN**

Las muestras se enviaron al Laboratorio de Servicios Genómicos (LABSERGEN), del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (IPN), para la realización de la secuenciación masiva de los pools, en donde se empleó la plataforma de SBS (Secuenciación por Síntesis), con el sistema de Illumina MiSeq (micro), utilizando los kits TruSeq DNA PCR-Free, para construcción de las bibliotecas, y MiSeq Reagent Kit v2 de 300 ciclos, para la obtención de las lecturas, de la empresa Illumina Inc.

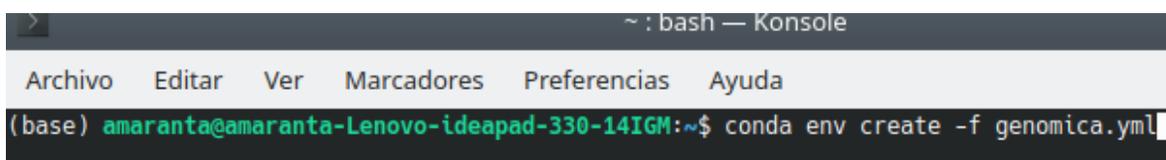
### **6.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

Debido a que uno de los programas necesarios para el proyecto no se pudo ejecutar utilizando únicamente la consola, que fue el analizador de calidad de lecturas FASTQC, se procedió a la elaboración de un ambiente informático, creando un archivo en el procesador de texto Nano, en donde se indicó el nombre del ambiente, el canal o gestor de paquetes y el nombre del software a descargar:



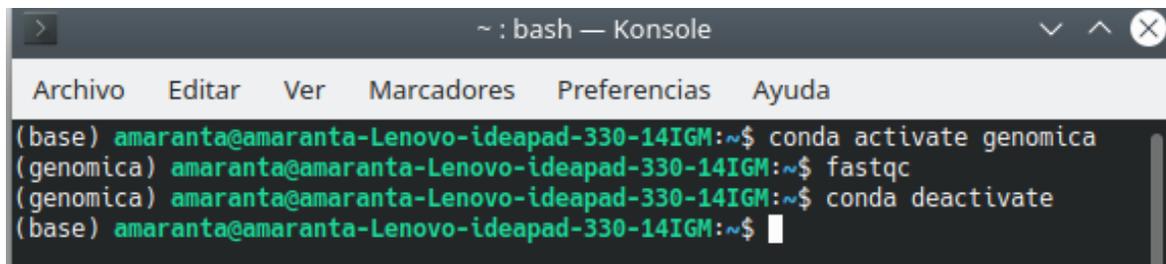
```
> ~ : nano — Konsole
Archivo  Editar  Ver  Marcadores  Preferencias  >
GNU nano 4.8  Nuevo búfer  Modificado
name: genomica
channels:
- bioconda
dependencies:
- fastqc
```

El documento se guardó con la terminación `.yml`, y se ejecutó el comando **conda env create -f [nombre del ambiente].yml**



```
> ~ : bash — Konsole
Archivo  Editar  Ver  Marcadores  Preferencias  Ayuda
(base) amaranta@amaranta-Lenovo-ideapad-330-14IGM:~$ conda env create -f genomica.yml
```

Una vez creado el ambiente, se activó con el comando **conda activate [nombre del ambiente]** y se ejecutó el software necesario. Para desactivar el ambiente se empleó el comando **conda deactivate**.



```
> ~ : bash — Konsole
Archivo  Editar  Ver  Marcadores  Preferencias  Ayuda
(base) amaranta@amaranta-Lenovo-ideapad-330-14IGM:~$ conda activate genomica
(genomica) amaranta@amaranta-Lenovo-ideapad-330-14IGM:~$ fastqc
(genomica) amaranta@amaranta-Lenovo-ideapad-330-14IGM:~$ conda deactivate
(base) amaranta@amaranta-Lenovo-ideapad-330-14IGM:~$
```

Se analizaron los archivos obtenidos a partir del secuenciador por medio del software FASTQC, que mostró de manera general la calidad y el tamaño de las lecturas. Con base en el reporte de FASTQC, se procedió a limpiar las secuencias utilizando el software Trimmomatic, con el comando **trimmomatic PE - phred[calidad deseada] [Archivo de entrada 1] [Archivo de entrada 2] [Archivo de salida pareado 1] [Archivo de salida no pareado 1] [Archivo de salida pareado 2] [Archivo de salida no pareado 2] LEADING:[número de nucleótidos a cortar al inicio de cada lectura] TRAILING:[número de nucleótidos a cortar al final de cada lectura] SLIDINGWINDOW:[número de nucleótidos cuya calidad se va a evaluar y a promediar]:[calidad que debe superar el promedio]**

de los nucleótidos mencionados anteriormente] MINLEN:[tamaño mínimo de las lecturas] AVGQUAL:[calidad que todas las lecturas deben superar de forma general]

```
(trimmomatic) amaranta@amaranta-Lenovo-ideapad-330-14IGM:~/Ensamblados/SecuenciasTesis$ trimmomatic PE -phred33 Crecimiento.1.fastq Crecimiento.2.fastq Crec_1_pf.fastq Crec_1_uf.fastq Crec_2_pf.fastq Crec_2_uf.fastq LEADING:7 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:16 MINLEN:40 AVGQUAL:30
```

En seguida, se revisó la calidad de las lecturas procesadas con Trimmomatic, por medio de FASTQC.

Luego, con ayuda del servidor en línea del programa Kaiju (<https://kaiju.binf.ku.dk/>), se clasificaron taxonómicamente los organismos cuyo material genético se encontraba en los pools. Este software se encarga de asignar las lecturas, en este caso de 151 pares de bases, directamente a sus taxones correspondientes utilizando la base de datos del NCBI, así como una base de datos de referencia de secuencias de proteínas de genomas microbianos y virales. Se decidió emplear Kaiju por su facilidad de uso y porque no solo se encarga de clasificar bacterias, sino que abarca tanto organismos eucariotas como procariotas, así como el objeto de estudio del presente trabajo: los virus.

Los archivos con terminación .out obtenidos se procesaron en Kraken2. Esta plataforma designó etiquetas taxonómicas a todas las secuencias de DNA y se emitió un reporte, que refinó la clasificación de los genomas de los pools, determinando el dominio, filo, clase, orden, familia, género y especie de cada uno de los organismos presentes en las muestras. Este software se encuentra disponible en la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>).

Finalmente se empleó Pavian, que es un paquete del programa R que analiza los resultados de la clasificación metagenómica y permite su visualización.

## 7 RESULTADOS

### 7.1. CUANTIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO DE LOS POOLS DE LAS MUESTRAS

Posterior a la purificación del material genético de las muestras, se realizaron los pools y se cuantificaron, obteniendo las siguientes concentraciones:

**Cuadro 5. Cuantificación del material genético presente en los pools de las muestras purificadas**

Etapa de producción	Concentración de los pools (ng/ $\mu$ L)
Crecimiento	35.5
Destete	12.12
Engorda	75.4
Hembras gestantes	20.7
Lactancia	25.8
Machos reproductores	14.2

### 7.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

#### 7.2.1. Análisis de calidad y limpieza de las lecturas

Los archivos recibidos luego de la secuenciación masiva fueron evaluados por medio del software FASTQC. La calidad de los pools de las muestras de las diferentes etapas de producción se resume en la siguiente tabla:

**Cuadro 6. Datos de las secuencias en los pools de las muestras**

Etapa de producción	Secuencias totales	Secuencias totales después de limpieza	Long. de lecturas	% de GC	Calidad prom. de lecturas
Crecimiento	494,690	155,655	35 - 151	43	38
Destete	603,958	189,038	35 - 151	44	38
Engorda	545,805	174,092	35 - 151	40	38
H. Gestantes	627,153	188,362	35 - 151	43	38
Lactancia	589,689	174,464	35 - 151	43	38
M. Reproductores	618,628	188,700	35 - 151	43	38

Dado que la calidad de las lecturas ya era buena, es decir, que la calidad promedio fue mayor a 30 y que, por lo tanto, la probabilidad de que cada una de las bases realmente fuese la que indica el secuenciador es del 99.9%, se realizó la limpieza de las secuencias con Trimmomatic, estableciendo una calidad de lecturas mayor a 33 y una longitud mínima de 151 bases por lectura, eliminando así las secuencias pequeñas y de baja calidad que pudieran interferir y alentar el funcionamiento de los softwares para la clasificación taxonómica.

Las gráficas de cada uno de los archivos antes y después de la limpieza de las lecturas se encuentran en los anexos 1 y 2.

### 7.2.2. Clasificación taxonómica

Por medio de Kaiju se obtuvieron los siguientes gráficos, que ilustran de manera general el material genético de los microorganismos que se encuentran en los pools de las muestras:

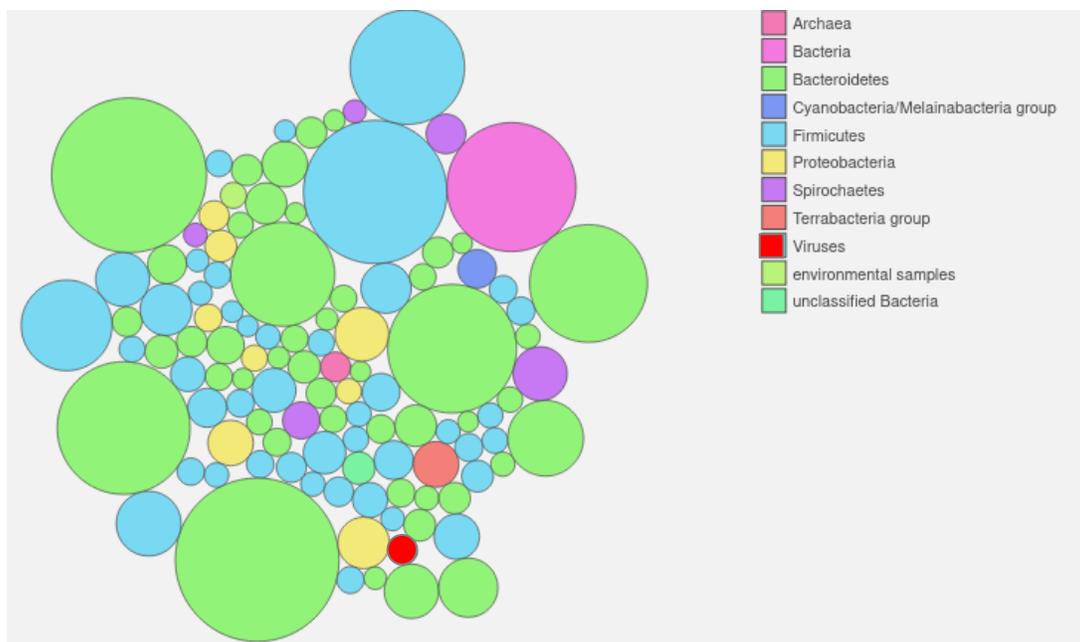


Fig. 1. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de crecimiento; las burbujas de color rosa indican la proporción de las arqueobacterias, las burbujas magenta corresponden a los microorganismos clasificados como bacterias, las olivas a los microorganismos pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, las azul rey a los grupos *Cyanobacteria* y *Melainabacteria*, las azul cielo al filo *Firmicutes*, las amarillas a las proteobacterias, las moradas al filo *Spirochaete*, las coral al grupo *Terrabacteria*, la roja a los virus, las verde lima a microorganismos que se encuentran en el ambiente, y las verde trébol a las bacterias sin clasificación.

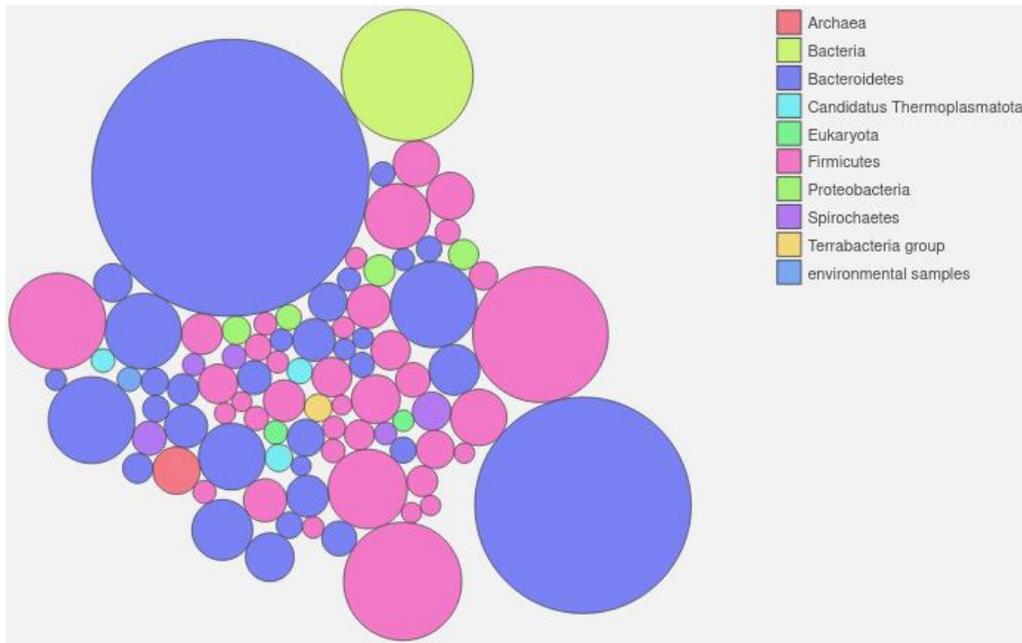


Fig. 2. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de destete; las burbujas de color coral corresponden a las arqueobacterias, las verde pera a los microorganismos clasificados como bacterias, las azul rey a los microorganismos pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, las azul cielo a los filos *Candidatus* y *Thermoplasmatota*, las verde periquito a las células eucariotas, las magenta al filo *Firmicutes*, las verde lima a las proteobacterias, las moradas al *Spirochaete*, las amarillas al grupo *Terrabacteria*, y las azules a microorganismos que se encuentran en el ambiente.

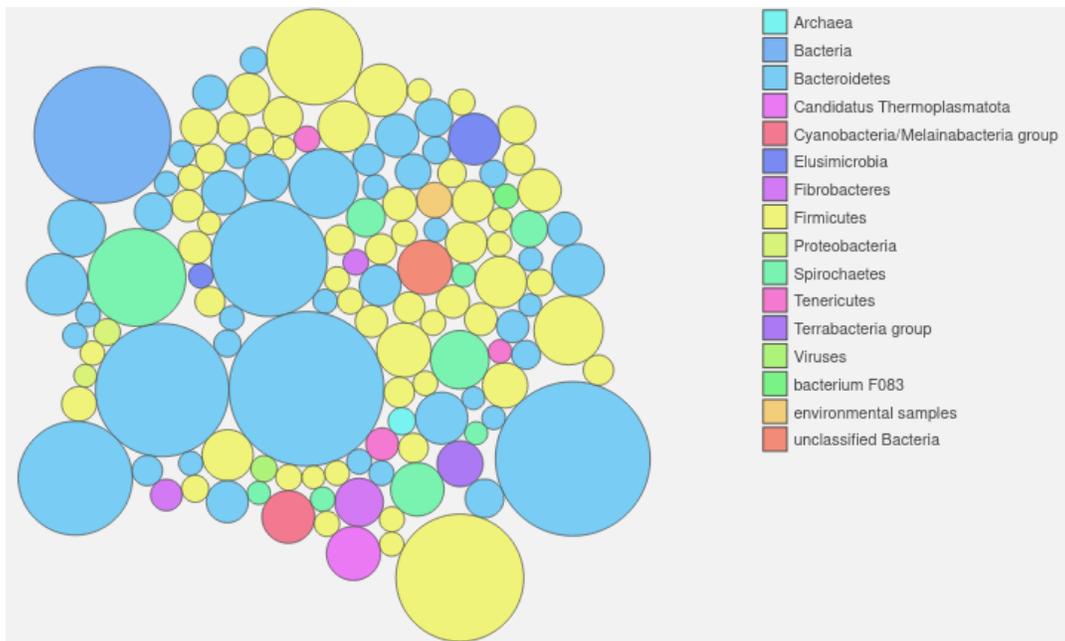


Fig. 3. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de engorda; las burbujas de color azul cielo indican la proporción de las arqueobacterias, las burbujas azul rey corresponden a los microorganismos clasificados como bacterias, las azul a los microorganismos pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, las magenta a los filos *Candidatus* y *Thermoplasmatota*, las coral a los grupos *Cyanobacteria* y *Melainabacteria*, las azul cobalto al filo *Elusimicrobia*, las moradas al filo *Fibrobacteres*, las amarillas al filo *Firmicutes*, las verde pera a las proteobacterias, las turquesa al filo *Spirochaete*, las rosa al filo *Tenericutes*, las moradas al grupo *Terrabacterium*, las verde lima a los virus, las verde periquito al grupo de bacterias sin clasificación F083, las anaranjadas a microorganismos que se encuentran en el ambiente, y las color salmón a las bacterias sin clasificación.

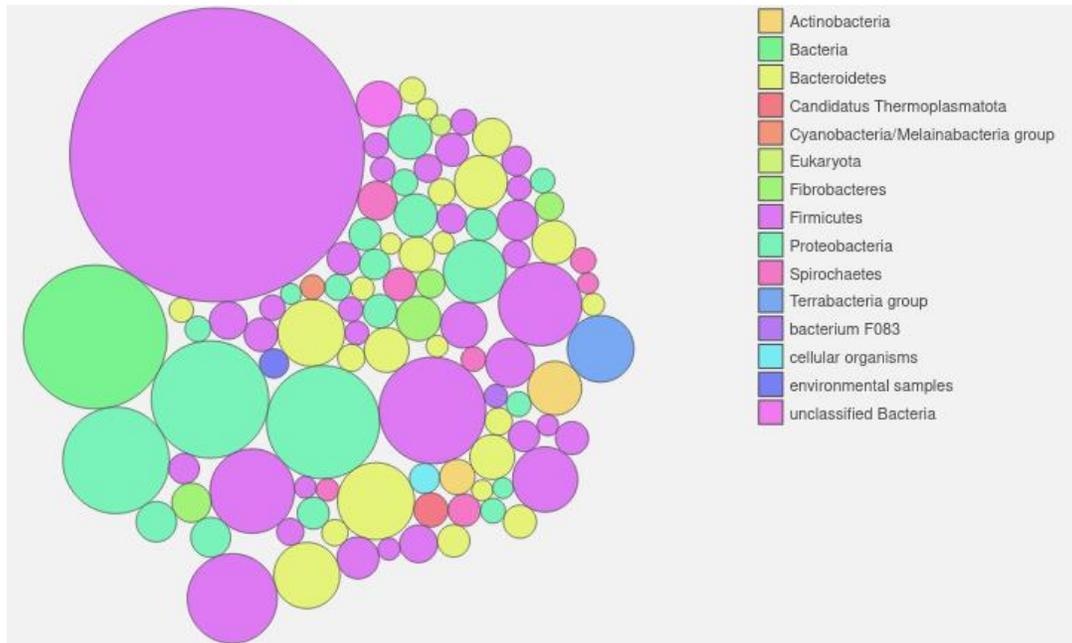


Fig. 4. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de hembras gestantes; las burbujas de color anaranjado indican la proporción de los microorganismos del filo *Actinobacteria*, las burbujas verde periquito corresponden a los microorganismos clasificados como bacterias, las amarillas a los microorganismos pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, las coral a los filos *Candidatus* y *Thermoplasmatota*, las color salmón a los grupos *Cyanobacteria* y *Melainabacteria*, las verde lima a las células eucariotas, las verde lima al filo *Fibrobacteres*, las violeta al filo *Firmicutes*, las turquesa a las proteobacterias, las magenta al filo *Spirochaetes*, las azul rey al grupo *Terrabacteria*, las moradas al grupo de bacterias sin clasificación F083, las azul cielo a organismos celulares variados, las azul cobalto a microorganismos que se encuentran en el ambiente, y las rosa a las bacterias sin clasificación.

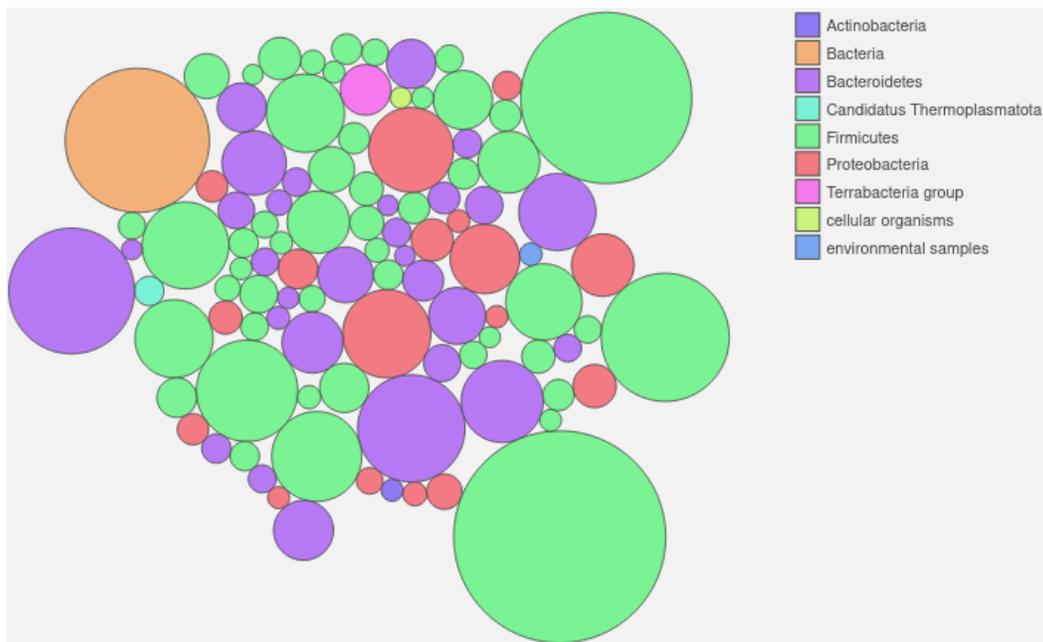


Fig. 5. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de lactancia; las burbujas de color azul indican la proporción de los microorganismos del filo *Actinobacteria*, las burbujas anaranjadas corresponden a los microorganismos clasificados como bacterias, las moradas a los microorganismos pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, las azul cielo a los filos *Candidatus* y *Thermoplasmatota*, las verde al filo *Firmicutes*, las coral a las proteobacterias, las magenta al grupo *Terrabacteria*, las verde lima a organismos celulares variados y las azul claro a microorganismos que se encuentran en el ambiente.

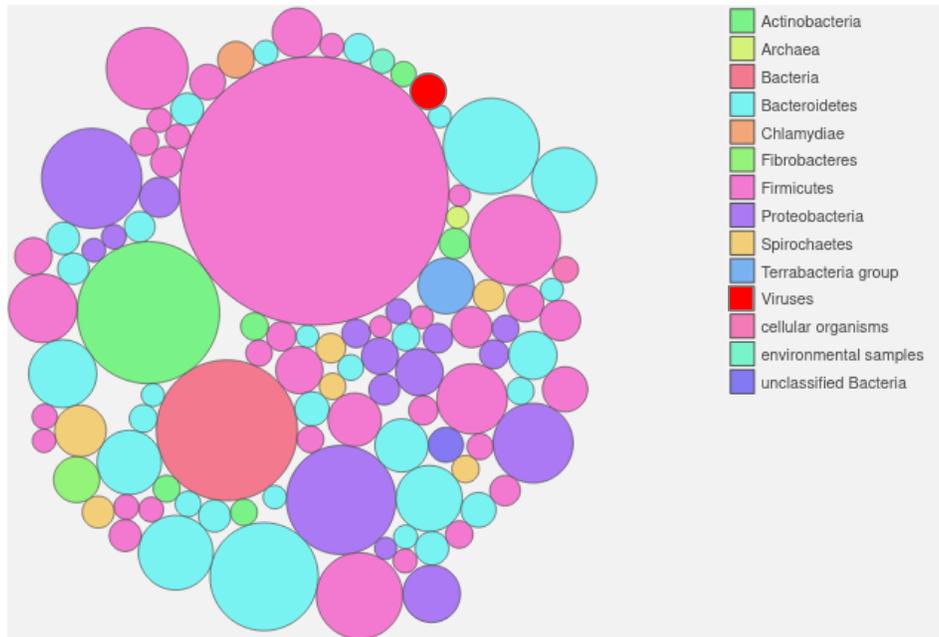


Fig. 6. Gráfico de burbujas del pool de muestras de la etapa de machos reproductores; las burbujas de color verde indican la proporción de los microorganismos del filo *Actinobacteria*, las burbujas verde lima corresponden a las arqueobacterias, las coral a los microorganismos clasificados como bacterias, las azul cielo a los microorganismos pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, las anaranjado al filo *Chlamydiae*, las verde periquito al filo *Fibrobacteres*, las magenta al filo *Firmicutes*, las moradas a las proteobacterias, las amarillas al filo *Spirochaetes*, las azul al grupo *Terrabacteria*, la roja a los virus, las magenta a organismos celulares variados, las azul agua a microorganismos que se encuentran en el ambiente, y las azul cobalto a las bacterias sin clasificación.

Luego de realizar la clasificación de los organismos de los pools de las muestras, se profundizaron los resultados. El análisis del pool de las muestras de la etapa de crecimiento mostró que se clasificó el 31.9% de las secuencias, de las cuales el 0.181% corresponden a virus. En la siguiente figura se puede apreciar con mayor exactitud qué microorganismos fueron detectados:

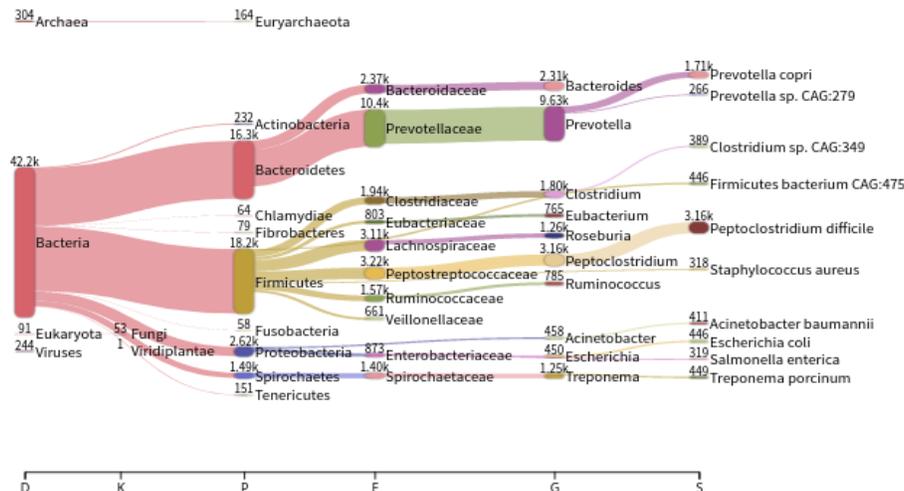


Fig. 7. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de crecimiento. En la parte superior de la imagen se encuentra el dominio de las arqueobacterias, del cual se desprende el filo *Euryarchaeota*, debajo de este, el dominio



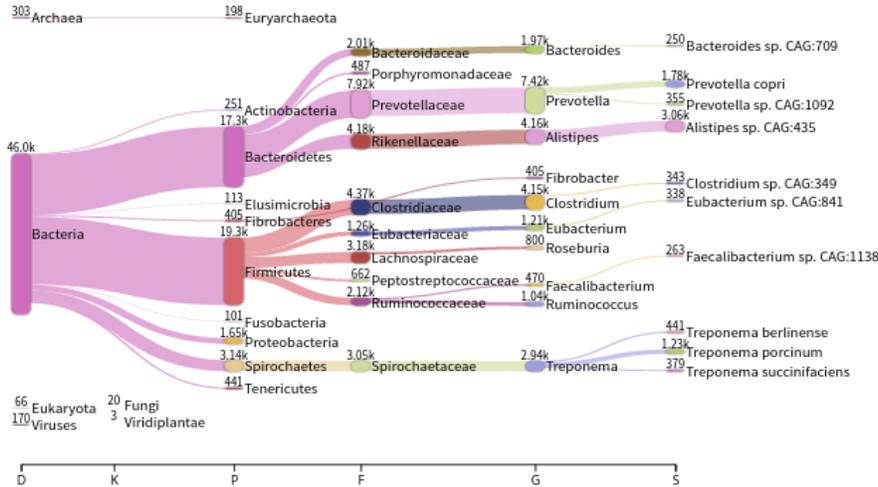


Fig. 9. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de engorda. Las arqueobacterias, junto con su filo *Euryarchaeota* están en la parte superior de la imagen. Después, el reino *Bacteria* se encuentra marcado con morado, ramificándose en los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Elusimicrobia*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* y *Tenericutes*, los cuales se ramifican a su vez en clases, géneros y especies. El dominio *Eukaryota* se divide en el reino *Fungi* y el clado *Viridiplantae*. Los virus no se encuentran ramificados debido a que, en comparación con la cantidad de bacterias encontradas, los géneros y especies detectados de estos son muy pocos.

En esta etapa de producción, las familias virales que se hallaron son *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Poxviridae*, *Phycodnaviridae* y *Microviridae*; no se encontraron especies virales patógenas.

De igual forma, en el pool de las muestras de las hembras gestantes se clasificaron el 14.7% de las secuencias, y de estas, el 0.038% correspondieron a virus.

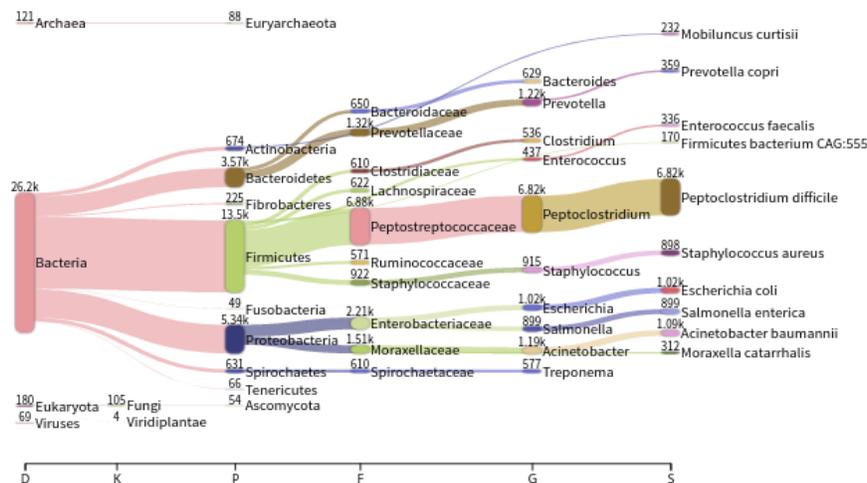


Fig. 10. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de hembras gestantes. El dominio *Archaea* se encuentra en la parte superior, junto con el filo *Euryarchaeota* derivado de este. El dominio *Bacteria* se encuentra marcado con rosa, que se ramifica en los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* y *Tenericutes*, que a su vez se ramifican en clases, géneros y especies. Del dominio *Eukaryota* se desprenden el clado *Viridiplantae* y el reino *Fungi*, del cual deriva el filo *Ascomycota*. Los virus no se encuentran ramificados debido a que, en comparación con la cantidad de bacterias encontradas, los géneros y especies detectados de estos son muy pocas.

Las familias virales que se identificaron en el pool de las muestras de hembras gestantes son *Poxviridae*, *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Retroviridae* y *Flaviviridae*; por lo que concierne a las especies virales que desarrollan patologías, solamente se identificó al virus de diarrea viral bovina tipo 1.

Con relación a los pools de las muestras de la etapa de lactancia, se clasificaron el 25.9% de las secuencias, de las cuales el 0.0604% se identificaron como virus.

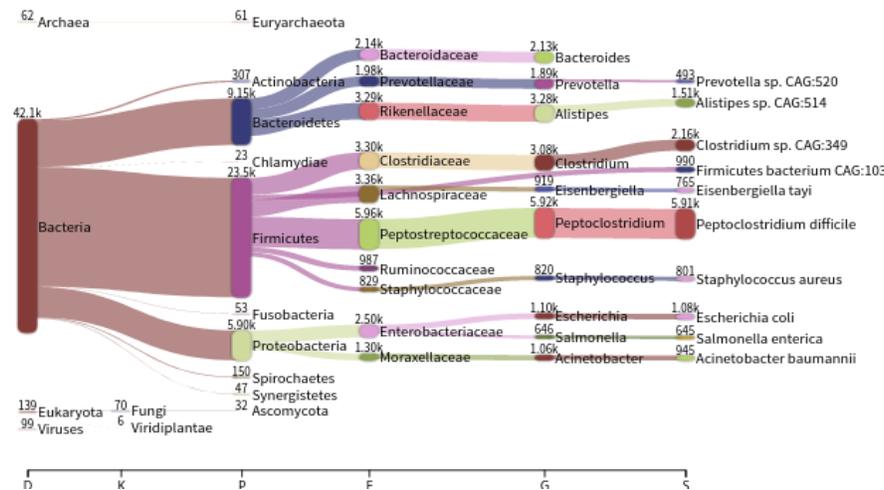


Fig. 11. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de lactancia. Las arqueobacterias y su filo *Euryarchaeota* están marcadas en la parte superior. El dominio *Bacteria* está sombreado con marrón y ramificado en los fillos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* y *Synergistetes*, que a su vez se ramifican en clases, géneros y especies. Del dominio *Eukaryota* se originan el clado *Viridiplantae* y el reino *Fungi*, del que se deriva el filo *Ascomycota*. Los virus no se encuentran ramificados debido a que, en comparación con la cantidad de bacterias encontradas, los géneros y especies detectados de estos son muy pocas.

Se encontraron las siguientes familias virales en las muestras de lactancia: *Poxviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Phycodnaviridae* y *Retroviridae*; sin embargo, no se hallaron especies virales de importancia médica en la porcicultura.

Finalmente, en el pool de las muestras de machos reproductores se clasificaron el 20.9% de las lecturas, de las cuales el 0.0964% fueron marcadas como secuencias virales.

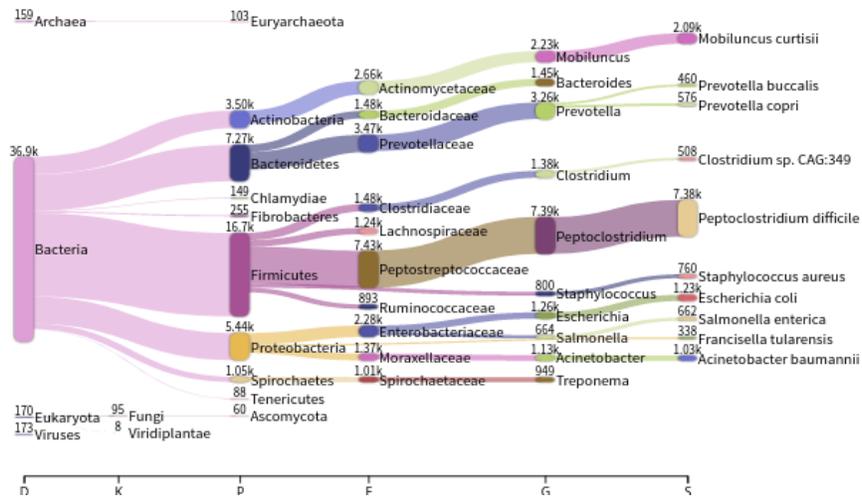


Fig. 12. Clasificación taxonómica de los microorganismos de la etapa de machos reproductores. El dominio de las arqueobacterias se encuentra en la parte superior de la imagen, junto con su filo *Euryarchaeota*. El dominio *Bacteria* está marcado de color violeta y se ramifica en los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* y *Synergistetes*, que se dividen en clases, géneros y especies. Del dominio *Eukaryota* proceden el clado *Viridiplantae* y el reino *Fungi*, del que se deriva el filo *Ascomycota*. Los virus no se encuentran ramificados debido a que, en comparación con la cantidad de bacterias encontradas, los géneros y especies detectados de estos son muy pocas.

Las familias de los virus que se identificaron en el pool son *Poxviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Retroviridae* y *Microviridae*. No se encontraron especies virales patógenas.

## 8 DISCUSIÓN

Las enfermedades emergentes son aquellas que aparecen por primera vez, o bien, que ya existían, pero que aumentan su incidencia, virulencia, resistencia o distribución geográfica, y han tomado importancia desde la década de 1970, no solo por el hecho de ser patologías de las que se tiene poca o nula información, sino porque suelen diseminarse rápidamente, tener tasas de morbilidad, mortalidad y letalidad altas y por la falta de vacunas o tratamientos eficaces ante ellas (Morens and Fauci, 2020; Cunningham *et. al.*, 2017; Losa, 2021).

En la industria porcícola, las enfermedades emergentes se han erradicado gracias a programas zoonitarios y medidas de bioseguridad, pero es importante considerar que pueden aparecer de forma esporádica en cualquier tipo de producción y que algunas de ellas son enfermedades zoonóticas, por lo que también comprometen la salud de los seres humanos (Segalez, 2015; Meng, 2012; VanderWaal and Deen, 2018).

En el presente trabajo, se realizó un análisis metagenómico para conocer las familias virales que se encontraban en 6 etapas de producción de cerdos, enfocado principalmente en los virus DNA, pues una de las mejores herramientas para el estudio de patógenos emergentes es la secuenciación masiva, ya que permite la visualización y el análisis completo de los microorganismos que se encuentran en muestras de cualquier tipo (Rubin, 2016; Mokili *et. al.*, 2012).

Se seleccionaron los virus DNA debido a los recientes brotes de peste porcina africana que han alarmado a la Medicina Veterinaria, ya que se ha detectado la enfermedad en Europa y Asia con consecuencias fatales para las producciones afectadas, y se teme que, eventualmente, se extienda por todo el mundo (Sánchez-Vizcaíno, 2012; Carriquiry *et. al.*, 2020). De igual forma, se debe monitorear la enfermedad de Aujeszky que, si bien México es una zona libre de esta patología desde 2015, puede ingresar al país y ocasionar pérdidas económicas importantes (The Center for Food Security & Public Health, 2017; Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020). La vigilancia epidemiológica es el pilar para la prevención, control y erradicación de las enfermedades, y los análisis de

datos obtenidos a partir de la secuenciación masiva dan un panorama completo de los microorganismos presentes en un territorio determinado.

Muchos estudios de metagenómica se enfocan en las poblaciones de bacterias que se encuentran en las distintas etapas de producción, sin embargo, en cuanto a virus concierne, la etapa más estudiada es la neonatal, pues es la más vulnerable a enfermedades infecciosas del tracto gastrointestinal, causando pérdidas económicas importantes a nivel mundial (Zhang *et. al.*, 2014; Carranza *et. al.*, 2006; Larson and Schwartz, 1987), por lo que la información del viroma de los cerdos por etapa de producción aún sigue siendo limitada.

En este estudio, el porcentaje de secuencias virales detectadas fue menor al 0.02% en comparación con otros tipos de genomas, sin embargo, esto puede deberse al tipo de muestra que se tomó, pues probablemente algunas partículas virales se degradaron por la presencia de enzimas y por las condiciones en el interior del tracto gastrointestinal (Roux *et. al.*, 2021).

De acuerdo con los artículos de Sachsenröder y colaboradores (2014) y de He y colaboradores (2021), las familias de bacteriófagos encontradas en estudios metagenómicos fueron *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*, lo cual coincide con lo que se encontró en la clasificación taxonómica de las muestras empleadas en este proyecto, sin embargo, también se encontró la familia *Phycodnaviridae*, que si bien tiene similitudes con el virus de la peste porcina africana en cuanto a estructura del genoma y estrategia de replicación, no representa un riesgo para la salud de los cerdos (Markosyan *et. al.*, 2020; Larsen *et. al.*, 2008).

De igual manera, otros estudios metagenómicos reportaron a las familias *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Coronaviridae*, *Hepeviridae*, *Picobirnaviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae* y *Reoviridae* tanto en cerdos con diarrea como en clínicamente sanos (Amimo *et. al.*, 2016; Rickli, 2020), a diferencia del presente estudio, en el que se detectaron las familias *Adenoviridae*, *Retroviridae*, *Poxviridae*, *Parvoviridae* y *Flaviviridae*. Es importante resaltar la presencia de esta última, pues al profundizar el análisis, se identificó al virus de la diarrea viral bovina tipo 1, causante de una enfermedad

relacionada filogenéticamente con la fiebre porcina clásica, que, siendo el CEIEPP una producción exclusivamente de cerdos, pudo haber ingresado a las instalaciones debido a la cercanía con ganado bovino, por la compra-venta de animales infectados o por medio de fómites, por ejemplo (Deng *et. al.*, 2012; Bielefeldt-Ohmann, 2020). De acuerdo con la SADER, se considera a la diarrea viral bovina como una enfermedad endémica en el territorio nacional que representa un bajo riesgo desde los puntos de vista económico, epidemiológico, de salud pública y para el comercio nacional e internacional, la notificación mensual de esta patología es obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica para su monitoreo, sin embargo, la importancia de esta enfermedad en los cerdos radica en el impacto que tiene en la reproducción, pues de forma general, puede causar abortos, muerte fetal y una baja tasa de fertilidad (Tao *et. al.*, 2013).

Finalmente, en el estudio metagenómico realizado por Hause y colaboradores se detectó al mastadenovirus tipo C en cerdos clínicamente sanos de más de 10 semanas de edad, lo cual concuerda con el presente trabajo, pues se identificó al mismo virus en las muestras de la etapa de crecimiento. Las infecciones suelen ser leves o subclínicas, por lo que no representan un riesgo aparente para la porcicultura, además, se consideran patógenos comunes en las producciones a nivel mundial (Horak and Leedom-Larson, 2016; The Center for Food Security & Public Health, 2015; Derbyshire, 2012). Hasta el momento, no existen estudios en México que reporten o analicen casos de mastadenovirus tipo C, sin embargo, se sabe que los cerdos infectados de 1 a 4 semanas de edad desarrollan un cuadro clínico gastrointestinal, impactando directamente la etapa de lactancia dentro de las producciones al disminuir la ganancia diaria de peso, retrasando el crecimiento de los lechones (The Center for Food Security & Public Health, 2015; Larson and Schwartz, 1987).

## **9 LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Debido a la pandemia, la toma de muestras no pudo realizarse en distintos estados de la República Mexicana, por lo que se recurrió a emplear los cerdos del del CEIEPP como población animal a analizar.

Asimismo, se decidió que se hicieran pools con las muestras de cada una de las etapas de producción a analizar por los costos de la secuenciación.

## 10 CONCLUSIÓN

- ♣ En el presente estudio, se tomaron y purificaron las muestras de los cerdos de las etapas de crecimiento, destete, engorda, hembras gestantes, lactancia y machos reproductores del CEIEPP, de la FMVZ, UNAM, para, posteriormente, llevar a cabo la secuenciación masiva y determinar si había algún patógeno emergente que pusiera en riesgo a la industria porcícola en dicha producción.
- ♣ Se compararon los resultados obtenidos con los previamente reportados en otros trabajos, coincidiendo entre ellos.
- ♣ No se aceptó la hipótesis, pues no se detectaron virus DNA de importancia zoonositaria considerados como exóticos o emergentes en México. A pesar de que se empleó una técnica que permite el estudio de todo el microbioma presente en una muestra determinada, no se obtuvo la información necesaria para el establecimiento de una posible relación entre los resultados obtenidos y alguna familia de patógenos virales emergentes debido a que el estudio se llevó a cabo en una producción que llevaba aislada más de un año por la contingencia sanitaria, por lo que se sugiere que este estudio podría realizarse con muestras de distintos estados de la República Mexicana para obtener un panorama real y amplio de la situación zoonositaria del país, y, de ser necesario, tomar las medidas pertinentes para prevenir, controlar y/o erradicar enfermedades emergentes.

## 11 REFERENCIAS

- Abcam. *Multiplex immunoassay techniques: a review of current methods* [Internet]. *FirePlex*. 2019. Disponible en: <https://www.abcam.com/kits/multiplex-immunoassay-techniques-review-of-methods-western-blot-elisa-microarray-and-luminex>
- Ahn S. *Introduction to bioinformatics: sequencing technology*. *Asia Pac. Allergy*. 2011; 1: 93 – 97.
- Aluthge ND, Sambeek DM, Carney-Hinkle EE, Li YS, Fernando SC, Burkey TE. *The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health*. *J. Anim. Sci.* 2019; 97 (9): 3741 – 3757.
- Alves LDF, Westmann CA, Lovate GL, De Siqueira GMV, Borelli TC, Guazzaroni ME. *Metagenomic Approaches for Understanding New Concepts in Microbial Science*. *Int. J. Genomics*. 2018; 2018.
- Amimo JO, El Zowalaty ME, Githae D, Wamalwa M, Djikeng A, Nasrallah GK. *Metagenomic analysis demonstrates the diversity of the fecal virome in asymptomatic pigs in East Africa*. *Arch. Virol.* 2016; 887 – 897.
- Arboleda VA, Xian RR. *An overview of DNA analytical methods*. *Methods Mol. Biol.* 2019; 1897: 385 – 402.
- Bailey MT, Lubach GR, Coe CL. *Prenatal Stress Alters Bacterial Colonization of the Gut in Infant Monkeys*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2004; 38 (4): 414 – 421.
- Baltimore D. *Expression of Animal Virus Genomes*. *Bacteriol. Rev.* 1971; 35 (3): 235 – 241.
- Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. *The Gastrointestinal Microbiome: A Review*. *J. Vet. Intern. Med.* 2018; 32 (1): 9 – 25.
- Bayat A. *Bioinformatics*. *BMJ*. 2002; 325: 1018 – 1022.
- Belkaid Y, Harrison OJ. *Homeostatic Immunity and the Microbiota*. *Immunity*. 2017; 46 (4): 562 – 576. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761317301413?via%3Dihub>

- Bielefeldt-Ohmann H. *Special issue: Bovine viral diarrhea virus and related pestiviruses. Viruses.* 2020; 12 (10): 12 – 14.
- Breitwieser FP, Salzberg SL. *Pavian: Interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. Bioinformatics.* 2020; 36 (4): 1303 – 1304.
- Brunstein JD, Cline CL, Mckinney S, Thomas E. *Evidence from Multiplex Molecular Assays for Complex Multipathogen Interactions in Acute Respiratory Infections. J Clin Microbiol.* 2008; 46 (1): 97 – 102.
- Cadena-Zamudio JD, Martínez-Peña MD, Guzmán-Rodríguez LF, Arteaga-Garibay RI. *Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. Agro Product.* 2016; 9 (2): 70 – 83.
- Cann AJ. *Particles.* En: Cann AJ. *Principles of Molecular Virology. Elsevier,* 6th edition. 2016. Chapter 2, Particles; 27 – 57.
- Carranza AI, Corrales JP, Ambrogi A. *Enfermedades que producen diarrea en cerdos en las etapas de desarrollo y terminación. Univ. Nac. Río Cuarto.* 2006; 1 – 6.
- Carriquiry M, Elobeid A, Swenson D, Hayes D. *Impacts of African Swine Fever in Iowa and the United States. Center for Agricultural Rural Development.* 2020; March: 1 – 25.
- The Center for Food Security & Public Health. *Aujeszky's Disease. The Center for Food Security & Public Health.* 2017. p. 1 – 4.
- The Center for Food Security & Public Health. *Porcine Adenovirus [Internet]. Swine Health Information Center.* 2015. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-porcine-adenovirus>
- Chen Q, Wang L, Zheng Y, Zhang J, Guo B, Yoon K, Gauger PC, Harmon KM, Main RG, Li G. *Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. Virol J.* 2018; 15 (95): 1 – 9.
- Claas EC, Burnham C-AD, Mazzulli T, Templeton K, Topin F. *Performance of the xTAGR Gastrointestinal Pathogen Panel, a Multiplex Molecular Assay for*

*Simultaneous Detection of Bacterial, Viral, and Parasitic Causes of Infectious Gastroenteritis. J Microbiol Biotechnol.* 2013; 23 (7): 1041 – 5.

- Crespo MP. *El diagnóstico viral por el laboratorio. Colomb. Med.* 2000; 31 (3): 135 – 150.
- Crouch CF. *Vaccination against enteric rota and coronaviruses in cattle and pigs: Enhancement of lactogenic immunity. Vaccine.* 1985; 3 (4): 284 – 291.
- Cunningham AA, Daszak P, Wood JLN. *One health, emerging infectious diseases and wildlife: Two decades of progress? Philos. Trans. R Soc. B.* 2017; 372.
- Delwart, EL. *Viral metagenomics. Rev. Med. Virol.* 2007; 17: 115 – 31.
- Deng Y, Sun CQ, Cao SJ, Lin T, Yuan SS, Zhang HB, Zhai SL, Huang L, Shan TL, Zheng H, Wen XT, Tong GZ. *High prevalence of bovine viral diarrhea virus 1 in Chinese swine herds. Vet. Microbiol.* [Internet]. 2012; 159: 490 – 493. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.023>
- Denner J. *The porcine virome and xenotransplantation. Virol. J.* 2017; 14 (171): 1– 7.
- Derbyshire JB. *Adenovirus.* En: Zimmerman J, Karriker L, Ramírez A and Schwartz K. *Diseases of Swine. Wiley– Blackwell*, 10th edition. 2012. Chapter 4, Adenovirus; section 2, Viral Diseases; 89 – 92.
- Dias RS, Silva LCF, Eller MR, Oliveira VM, De Paula SO, Silva CC. *Metagenomics: Library construction and screening methods. Metagenomics Methods, Appl. Perspect.* 2014; (January): 45 – 65.
- DiMaio D, Coen DM. *Replication Strategies of DNA Viruses.* En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B and Straus SE. *Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins*, 5th edition. 2007. Chapter 6, Replication Strategies of DNA Viruses; 107 – 117.
- Domingo E, Menéndez-Arias L, Holland JJ. *RNA virus fitness. Rev. Med. Virol.* 1997; 7 (2): 87 – 96.
- Duffy S. *Why are RNA virus mutation rates so damn high? PLoS Biol.* 2018; 16 (8): 1 – 6.

- Escobar-Zepeda A, De León AVP, Sanchez-Flores A. *The Road to Metagenomics: From microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics*. *Front. Genet.* 2015; 6 (December): 1 – 15.
- Fouchse JM, Zijlstra RT, Willing BP. *The role of gut microbiota in the health and disease of pigs*. *Anim Front.* 2016; 6 (3): 30 – 36.
- Gallei A, Pesch S, Esking WS, Keller C, Ohlinger VF. *Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences*. *Vet Microbiol.* 2010; 143 (2 –4): 202 – 212. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.005>
- Gelderblom HR. *Structure and Classification of Viruses*. En: Baron. S. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, 4th edition. 1996. Chapter 41: Structure and Classification of Viruses.
- Ghosh S, Kleymann A, Singh-Malik Y, Kobayashi N. *Torque Teno Virus*. En: Sing-Malik Y, Kumar-Singh R, Pal-Yadav M. *Livestock Diseases and Management*. Springer, 1st edition. 2020. Chapter 5, Torque Teno Virus; 111 – 122.
- Gilbert JA, Dupont CL. *Microbial metagenomics: Beyond the genome*. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2011; 3: 347 – 371.
- Golnar AJ, Martin E, Wormington JD, Kading RC, Teel PD, Hamer SA, Hamer GL. *Reviewing the Potential Vectors and Hosts of African Swine Fever Virus Transmission in the United States*. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2019; 19 (7): 512 – 524.
- Handelsman J. *Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68 (4): 1477 – 1481.
- Hause BM, Duff JW, Scheidt A, Anderson G. *Virus detection using metagenomic sequencing of swine nasal and rectal swabs*. *J. Swine Heal. Prod.* 2016; 24 (6): 304 – 308.
- He B, Gong W, Yan X, Zhao Z, Yang L, Tan Z, Xu L, Zhu A, Zhang J, Rao J, Yu X, Jiang J, Lu Z, Zhang Y, Wy J, Li Y, Shi Y, Jiang Q, Chen X, Tu C. *Viral Metagenome-Based Precision Surveillance of Pig Population at Large Scale*

*Reveals Viromic Signatures of Sample Types and Influence of Farming Management on Pig Virome. Am. Soc. Microbiol.* 2021; 6 (3).

- Helmenstine AM. *The Differences Between DNA and RNA. ThoughtCo* [Internet]. 2020. Disponible en: <https://thoughtco.com/dna-versus-rna-608191>
- Heyer CME, Weiss E, Schmucker S, Rodehutschord M, Hoelzle LE, Mosenthin R, Stefanski V. *The impact of phosphorus on the immune system and the intestinal microbiota with special focus on the pig. Nutr Res Rev.* 2015; 28 (1): 67 – 82.
- Hiscox JA. *RNA viruses: Hijacking the dynamic nucleolus. Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5 (2): 119 – 127.
- Hodkinson BP, Grice EA. *Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. Adv. Wound Care.* 2015; 4 (1): 50 – 58.
- Horak S, Leedom-Larson K. *Porcine Adenovirus. Swine Health Information Center and Center for Food Security Public and Health* [Internet]. 2016; Disponible en:  
<http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-porcine-adenovirus>
- Houldcroft CJ, Beale MA, Breuer J. *Clinical and biological insights from viral genome sequencing. Nat. Rev. Microbiol.* 2017;15 (3): 183 – 192.
- Hugenholtz P, Tyson GW. *Q & A Metagenomics. Nature.* 2008; 455: 2006 – 2008.
- Hunt M, McIlroy D. *Virology - Chapter 3: DNA virus replication strategies. University of South Carolina* [Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.microbiologybook.org/mhunt/dna1.htm>
- Icaza-Chávez ME. *Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. Rev Gastroenterol México.* 2013; 78 (4): 240 – 248.
- Illumina Inc. *Illumina sequencing introduction. Illumina* [Internet]. 2017. Disponible en:  
[https://www.illumina.com/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf)

- Illumina Inc. *Illumina Sequencing Systems*. Illumina [Internet]. 2019. Disponible en: [https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/brochures/brochure\\_sequencing\\_systems\\_portfolio.pdf](https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/brochures/brochure_sequencing_systems_portfolio.pdf)
- Illumina Inc. *Illumina Sequencing Technology*. Illumina [Internet]. 2010. Disponible en: [https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight\\_sequencing.pdf%0Ahttps://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM](https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf%0Ahttps://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM)
- International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy*. ICTV. 2020. Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Isaacson R, Kim HB. *The intestinal microbiome of the pig*. *Anim. Health. Res. Rev.* 2012; 13 (1): 100 – 109.
- Jauk F. *Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones*. *Hematología*. 2019; 23: 21 – 23.
- Johnson E, Raza S. *What is long read sequencing?*. PHG Foundation. 2018.
- Jung K, Hu H, Saif LJ. *Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis*. *Virus Res.* 2016; 226: 50 – 59.
- Kekarainen T, Segalés J. *Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection*. *Vet. J.* 2009; 180 (2): 163 – 168.
- Khodamoradi Y, Kessel J, Vehreschild JJ, Vehreschild MJGT. *The Role of Microbiota in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections*. *Dtsch Arztebl Int.* 2019; 116 (40): 670 – 676.
- Kim J, Nguyen SG, Guevarra RB, Lee I, Unno T. *Analysis of swine fecal microbiota at various growth stages*. *Arch. Microbiol.* 2015; 197 (6): 753 – 759.
- Kluge JP, Beran GW, Hill HT, Platt KB. *Pseudorabies (Aujeszky's Disease)*. En: Zimmerman J, Karriker L, Ramírez A and Schwartz K. *Diseases of Swine*. Wiley – Blackwell, 10th edition. 2012. Chapter 19, Pseudorabies; section 2, Viral Diseases; 233 – 244.

- Krupovic M, Forterre P. *Single – stranded DNA viruses employ a variety of mechanisms for integration into host genomes. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015; 1341 (1): 41 – 53.
- Kuhn JH. *Virus Taxonomy. Reference Module in Life Sciences.* 2020. p. 1 – 10.
- Kulski JK. *Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. InTech.* 2016; (January).
- Kumar BR. *DNA Representation.* En: Munshi, A. *DNA Sequencing – Methods and Applications. InTech.* 2012.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, *et. al.* *Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature.* 2001; 409 (6822): 860 – 921.
- Larsen JB, Larsen A, Bratbak G, Sandaa RA. *Phylogenetic analysis of members of the Phycodnaviridae virus family, using amplified fragments of the Major Capsid Protein gene. Appl Environ Microbiol.* 2008; 74 (10): 3048 – 3057.
- Larson LA, Schwartz KJ. *Differential diagnosis of baby pig diarrhea. Iowa State Univ. Digit. Repos.* 1987; 49 (2): 84 – 90.
- Libal A. *Does a Virus Have DNA?. Sciencing [Internet].* 2018. Disponible en: <https://sciencing.com/virus-dna-4058.html>
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. *Comparison of next-generation sequencing systems. J. Biomed. Biotechnol.* 2012; 2012.
- Liu Y, Chen Q, Rao X, Diao X, Yang L, Fang X, Hogeveen H. *An economic assessment of pseudorabies (Aujeszky’ disease) elimination on hog farms in China. Preventive Veterinary Medicine.* 2019; 163 (December): 24 – 30. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.005>
- Losa, JE. *Emerging infectious diseases: a medical reality. Anales del Sistema Sanitario de Navarra [Internet].* 2021; 44 (2): 147– 151. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34427282/>
- Lukert PD and Allan GM. *Porcine Circovirus.* En: Zimmerman J, Karriker L, Ramírez A and Schwartz K. *Diseases of Swine. Wiley – Blackwell,* 10th

edition. 2012. Chapter 8, Porcine Circovirus; section 2, Viral Diseases; 119 – 123.

- Mackos AR, Maltz R, Bailey MT. *The role of the commensal microbiota in adaptive and maladaptive stressor-induced immunomodulation. Horm. Behav.* 2017; 88: 70 – 78.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. En: *Fenner's Veterinary Virology*. Elsevier, 4th edition. 2011. Chapter 5, Laboratory Diagnosis of Viral Infections; p. 125 – 139.
- Madson DM, Opriessnig T. *Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. Animal Health Research Review.* 2011; 12 (1): 47 – 65.
- Maltecca C, Bergamaschi M, Tiezzi F. *The interaction between microbiome and pig efficiency: A review. J. Anim. Breed. Genet.* 2020; 137 (1): 4 – 13.
- Manzin A, Mallus F, Macera L, Maggi F, Blois S. *Global impact of torque teno virus infection in wild and domesticated animals. J. Infect. Dev. Ctries.* 2015; 9 (6): 562 – 570.
- Marchesi JR, Ravel J. *The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome.* 2015; 3 (1): 1 – 3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Mardis ER. *DNA sequencing technologies: 2006 – 2016. Nat. Protoc.* 2017; 12 (2): 213 – 218.
- Markosyan T, Sargsyan K, Kharatyan S, Elbakyan H, Hakobyan V, Simonyan L, Voskanyan H, Shirvanyan A, Stepanyan T, Khachatryan M, Karapetyan M, Avagyan A, McVey WR, Weller R, Keen J, Risatti GR. *The epidemiological status of African swine fever in domestic swine herds in the Tavush Province region, Armenia. Rev Sci Tech.* 2019; 38 (3): 751 – 760.
- McGinn S, Gut IG. *DNA sequencing - spanning the generations. N. Biotechnol.* 2013; 30 (4): 366 – 372. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.012>
- Meng XJ. *Emerging and Re-emerging Swine Viruses. Transbound Emerg. Dis.* 2012; 59 (Suppl. 1): 85 – 102.

- Meng XJ. *Porcine circovirus type 2 (PCV2): Pathogenesis and interaction with the immune system. Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013; 1: 43 – 64.
- Mengeling WL. *Porcine Parvovirus*. En: Zimmerman J, Karriker L, Ramírez A and Schwartz K. *Diseases of Swine. Wiley– Blackwell*, 10th edition. 2012. Chapter 17, Porcine Parvovirus; section 2, Viral Diseases; 187 – 197.
- Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. *The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60 – 61: 199 – 210.
- Menzel P, Ng KL, Krogh A. *Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. Nat. Commun.* [Internet]. 2016; 7 (April): 1 – 9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Mészáros I, Olasz F, Cságola A, Tijssen P, Zádori Z. *Biology of porcine parvovirus (Ungulate parvovirus 1). Viruses.* 2017; 9 (12): 1 – 14.
- Metzker ML. *Emerging technologies in DNA sequencing. Genome Res.* 2005; 15 (12): 1767 – 1776.
- Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. *Metagenomics and future perspectives in virus discovery. Elsevier.* 2012; 2: 63 – 77.
- Morens DM, Fauci AS. *Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. Cell.* 2020; 182: 1077 – 1092.
- National Center for Biotechnology Information. *Metagenomics. Bethesda (MD).* 2006. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6858/>
- National Research Council. *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet. The National Academies Press.* 2007.
- Nauwynck HJ. *Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. Vet. Microbiol.* 1997; 55 (1 – 4): 3 – 11.
- Nowland TL, Plush KJ, Barton M, Kirkwood RN. *Development and function of the intestinal microbiome and potential implications for pig production. Animals.* 2019; 9 (3): 1 – 15.

- Palese P, Zheng H, Engelhardt OG, Pleschka S, García-Sastre A. *Negative – strand RNA viruses: Genetic engineering and applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93 (21): 11354 – 11358.
- Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. *Sequencing technologies and genome sequencing. J. Appl. Genet.* 2012; 52 (4): 413 – 435.
- Piñeros R, Mogollón D. *Coronavirus en porcinos: importancia y presentación del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en Colombia. Rev. Med. Vet.* 2015; 29: 73 – 89.
- Reller LB, Weinstein MP. *Special section: Medical microbiology. Clin. Infect. Dis.* 2000; 30 (5): 739 – 751.
- Rice ES, Green RE. *New Approaches for Genome Assembly and Scaffolding. Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2019; 7: 17 – 40.
- Rickli CI. *Detection of potentially commensal viruses and associated bacteria in pigs by metagenomic analysis.* 2020.
- Roux S, Matthijnssens J, Dutilh BE. *Metagenomics in Virology. Encycl. Virol.* 2021; (January): 133 – 140.
- Rubio S., Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. *Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. Universitas Médica.* 2020; 61 (2). Disponible en: <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
- Rubin E. *Metagenomics and molecular diagnostics for emerging infectious diseases. Int. J. Infect. Dis.* [Internet]. 2016; 53: 25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.069>
- Rye C, Wise R, Jurukovski V, Jean D, Choi J, Avissar Y. *Viruses.* En: Rye C, Wise R, Jurukovski V, Jean D, Choi J, Avissar Y. *Biology. Openstax*, 1st edition. 2017. Chapter 21: Viruses; 535 – 531.
- Sachsenröder J, Twardziok SO, Scheuch M, Johne R. *The general composition of the faecal virome of pigs depends on age, but not on feeding with a probiotic bacterium. PLoS One.* 2014; 9 (2): 15 – 22.
- Safamanesh S, Azimian A, Shakeri A, Ghazvini K, Jamehdar SA, Khosrojerdi M, Youssefi M. *Detection of Porcine Bocavirus from a Child with Acute*

*Respiratory Tract Infection. Pediatric Infectious Disease Journal.* 2018; 37 (12): E338 – E339.

- Said A, Woldemariam TA, Tikoo SK. *Porcine Adenovirus Type 3 E3 Encodes a Structural Protein Essential for Capsid Stability and Production of Infectious Progeny Virions.* *J Virol.* 2018; 92 (20): 1 – 16.
- Sánchez-Vizcaíno JM. *African Swine Fever.* En: Zimmerman J, Karriker L, Ramírez A and Schwartz K. *Diseases of Swine.* Wiley – Blackwell, 10th edition. 2012. Chapter 5, African Swine Fever; section 2, Viral Diseases; 93 – 99.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Gomez-Villamandos JC, Carrasco L. *An update on the epidemiology and pathology of African swine fever.* *J. Comp. Pathol.* 2015; 152 (1): 9 – 21.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* *Proc Natl Acad Sci.* 1977; 74 (12): 5463 – 5467.
- Schechter M. *The history of metagenomics: An incomplete summary* [Internet]. *Meren Lab.* 2020. Disponible en: <http://merenlab.org/2020/07/27/history-of-metagenomics/>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. *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.* *Diario Oficial de la Federación:* 04/05/2016.
- Segalés J. *Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis.* *Virus Res.* 2012; 164 (1 – 2): 10 – 19. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.007>
- Segalez J. *Epidemiology of infection/control and mitigation option of foodborne pathogens and zoonotic diseases in the pork production chain.* 2015. p. 97 – 100.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. *Enfermedad de Aujeszky.* *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria* [Internet]. 2020. Disponible en:

<https://www.gob.mx/senasica/documentos/enfermedad-de-aujeszky?state=published>

- Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E. *The Fecal Virome of Pigs on a High - Density Farm The Fecal Virome of Pigs on a High-Density Farm. J Virol.* 2011; 85.
- Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, Waterston RH. *DNA sequencing at 40: Past, present and future. Nature.* 2017; 550 (7676): 345 – 353. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature24286>
- Shendure J, Ji H. *Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol.* 2008; 26 (10): 1135 – 1145.
- Shendure J, Porreca GJ, Church GM, Andrew F, Hendrickson CL, Kieleczawa J, Slatko BE. *Overview of DNA Sequencing Strategies. Wiley Online Library;* 2011. p. 1 – 23.
- Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. *Overview of Next Generation Sequencing technologies (and bioinformatics) in cancer. Mol. Biol.* 2018; 122 (1): 1 – 15.
- Swine Health Information Center, Center for Food Security and Public Health. *Porcine Bocavirus [Report].* 2016.
- Tao J, Liao J, Wang Y, Zhang X, Wang J, Zhu G. *Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in pigs. Vet. Microbiol.* [Internet]. 2013; 165: 185 – 189. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.010>
- Tapia LI. *Laboratorio de Virología en la Práctica Clínica. Rev. Méd. Clínica Las Condes.* 2015; 26 (6): 744 – 752. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864015001509>
- Tipu HN, Shabbir A. *Evolution of DNA sequencing. J. Coll. Physicians Surg. Pakistan.* 2015; 25 (3): 210 – 215.
- Tringe SG, Rubin EM. *Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. California Digital Library.* 2005.

- Valeriano VDV, Balolong MP, Kang DK. *Probiotic roles of Lactobacillus sp. in swine: insights from gut microbiota. J. Appl. Microbiol.* 2017; 122 (3): 554 – 567.
- VanderWaal K, Deen J. *Global trends in infectious diseases of swine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018; 115 (45): 11495 – 11500.
- Verma M, Kulshrestha S, Puri A. *Genome Sequencing.* En: Keith JM. *Bioinformatics. Methods in Mol. Biol.* 2017. Chapter 1: Genome Sequencing; 35 – 45.
- Vlasova AN, Amimo JO and Saif LJ. *Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. Viruses.* 2017; 9 (3): 1 – 27.
- Wang C, Shi C, Zhang Y, Song D, Lu Z, Wang Y. *Microbiota in fermented feed and swine gut. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102 (7): 2941 – 2948.
- Webber LM. *The Practice of Clinical Virology: Virus Taxonomy. Bacteriol. Virol. Res.* 2016; 2.1: 43 – 48.
- Wickner RB. *Double-stranded RNA virus replication and packaging. J. Biol. Chem.* 1993; 268 (6): 3797 – 3800.
- Wooley JC, Godzik A, Friedberg I. *A Primer on Metagenomics. Plos. Comput. Biol.* 2010; 6 (2).
- Ye SH, Siddle KJ, Park DJ, Sabeti PC. *Benchmarking Metagenomics Tools for Taxonomic Classification. Cel.* 2019; 178 (4): 779 – 794. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.010>
- Zárate S, Taboada B, Yocupicio-Monroy M, Arias CF. *Human Virome. Arch. Med. Res.* 2017; 48 (8): 701 – 716.
- Zhang R, Fang L, Cai K, Zeng S, Wu W, An K, Chen H, Xiao S. *Differential contributions of porcine bocavirus NP1 protein N- and C-terminal regions to its nuclear localization and immune regulation. J. Gen. Virol.* 2016; 97 (5): 1178 – 1188.
- Zhang B, Tang C, Yue H, Ren Y, Song Z. *Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China. J. Gen. Virol.* 2014; 95: 1603 – 1611.

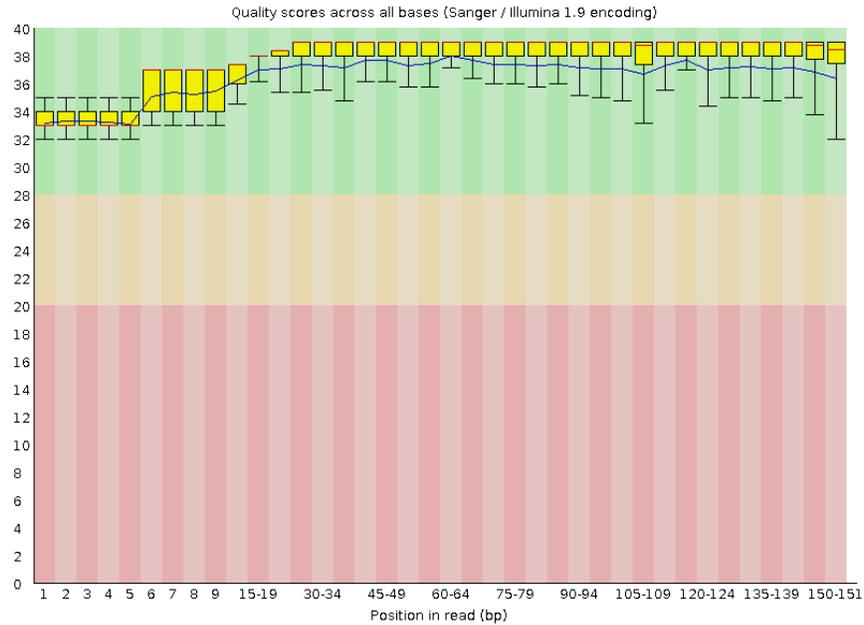
- Zhou F, Sun H, Wang Y. *Porcine bocavirus: Achievements in the past five years. Viruses.* 2014; 6 (12): 4946 – 4960.
- Zijlmans MAC, Korpela K, Riksen-Walraven JM, de Vos WM, de Weerth C. *Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. Psychoneuroendocrinology.* 2015; 53: 233 – 245.

## 12 ANEXOS

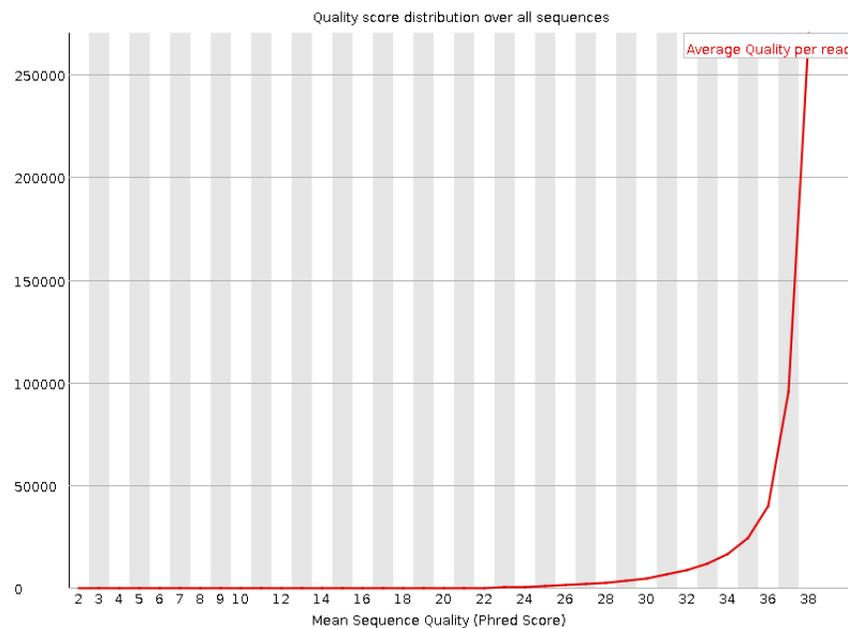
### 11.1. Gráficos obtenidos a partir de FASTQC antes de la limpieza de las secuencias

#### Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de crecimiento

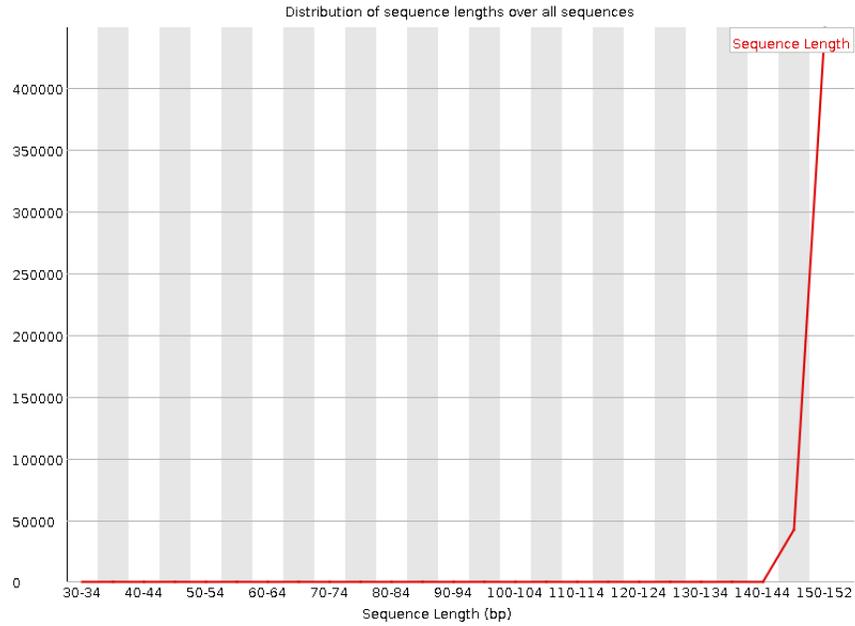
##### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



##### 2. Calidad promedio de las lecturas

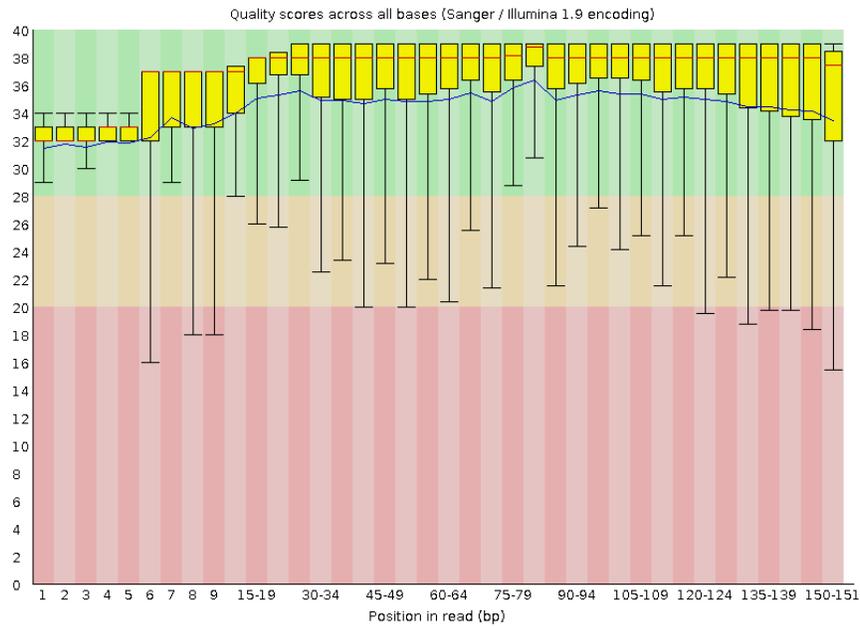


### 3. Tamaño de las lecturas

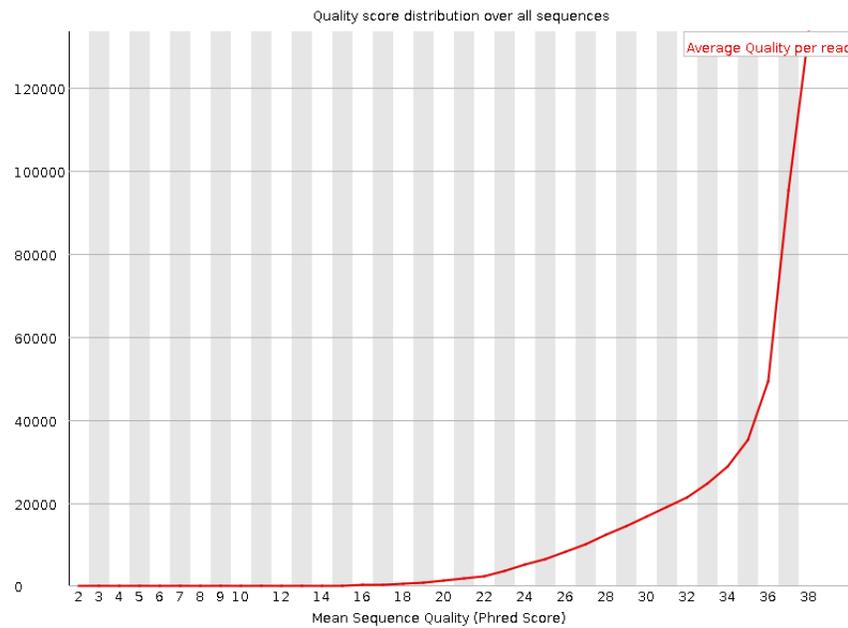


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de crecimiento

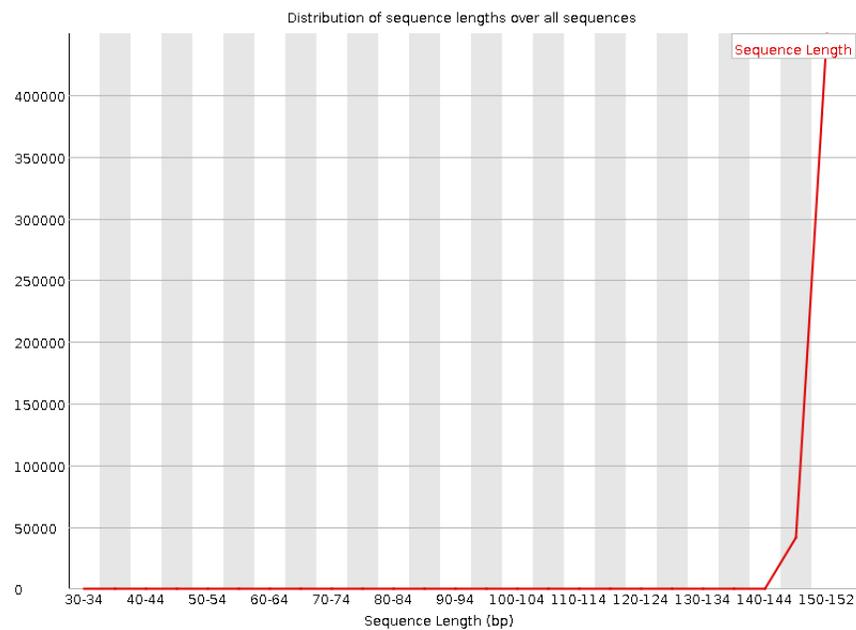
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

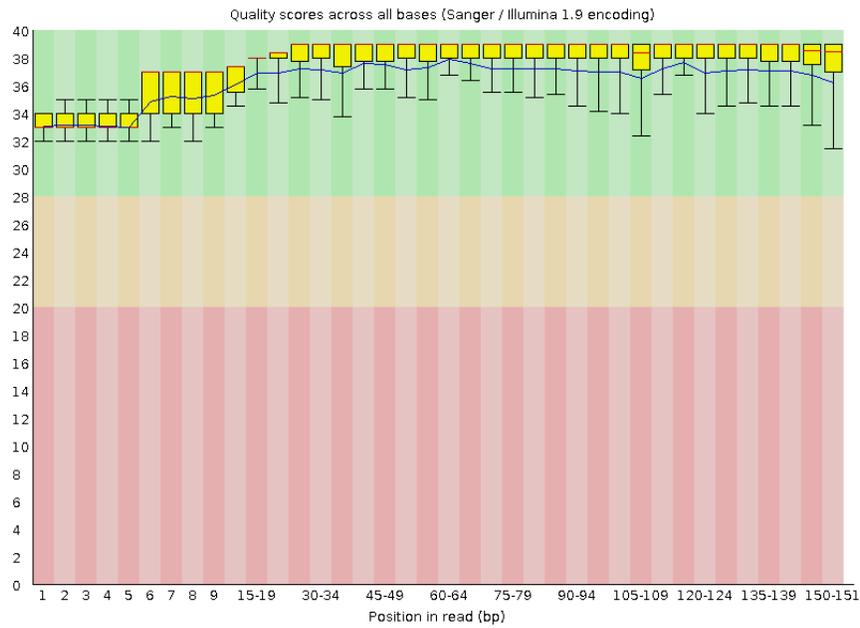


## 3. Tamaño de las lecturas

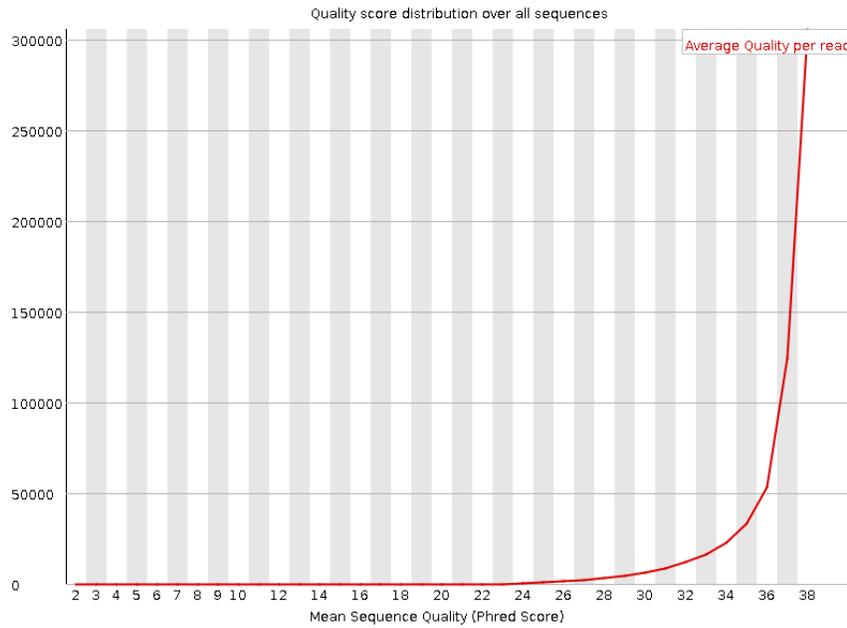


# Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de destete

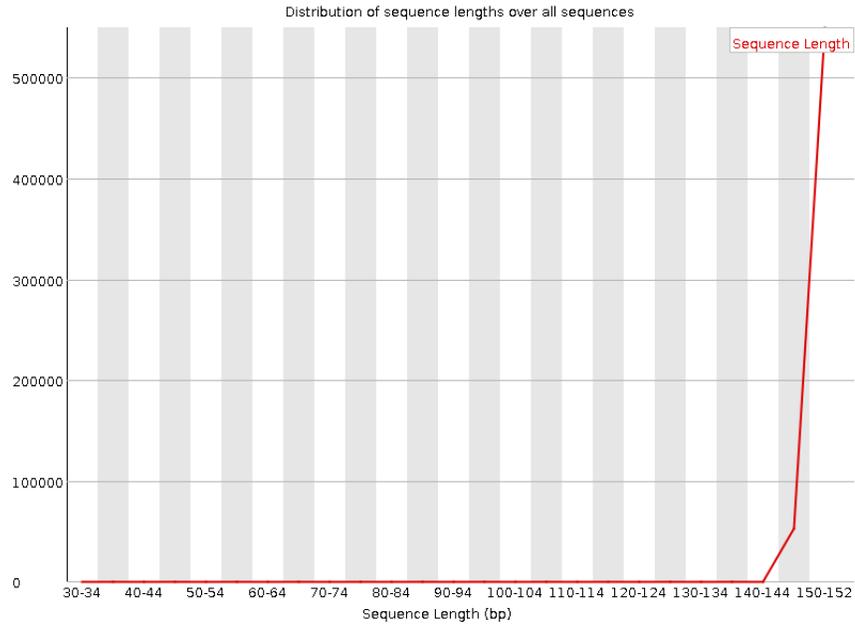
## 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

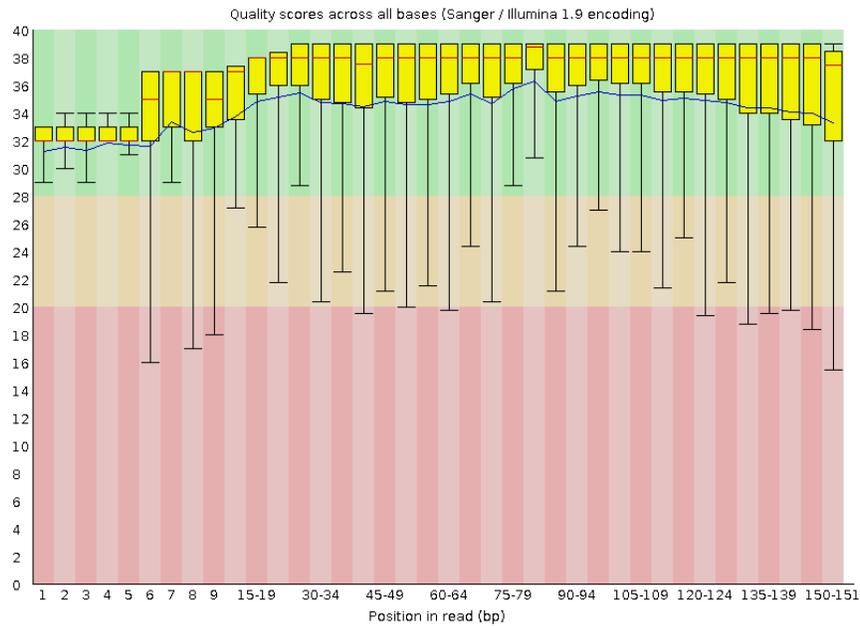


### 3. Tamaño de las lecturas

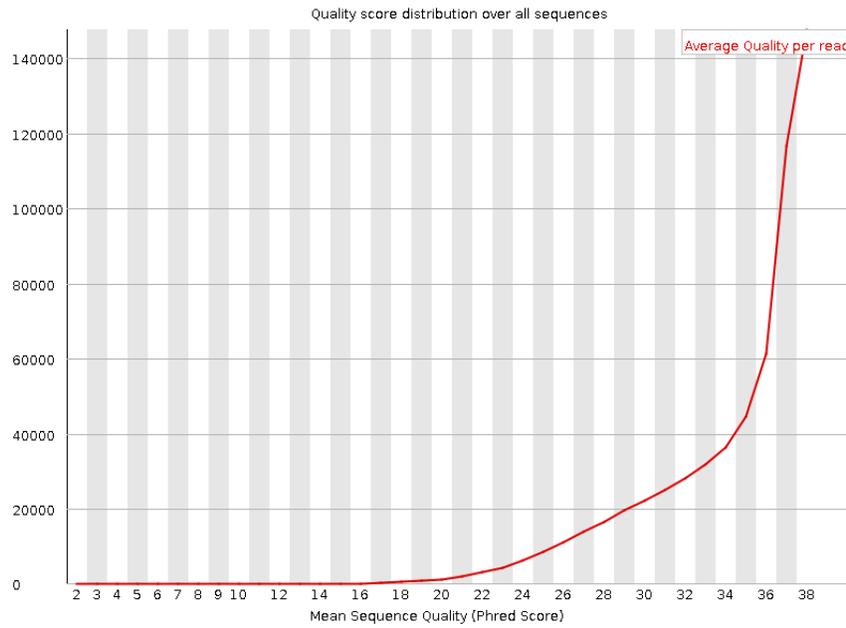


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de destete

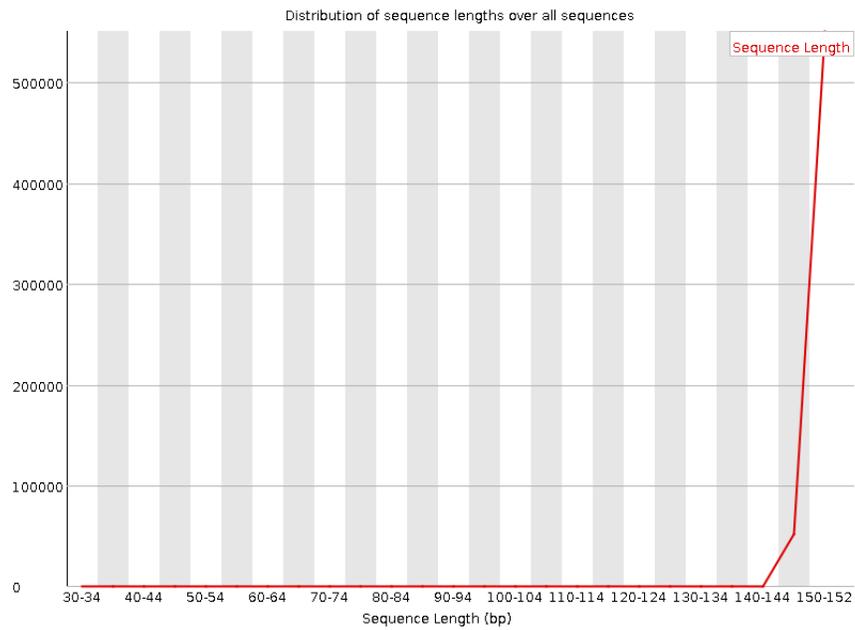
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

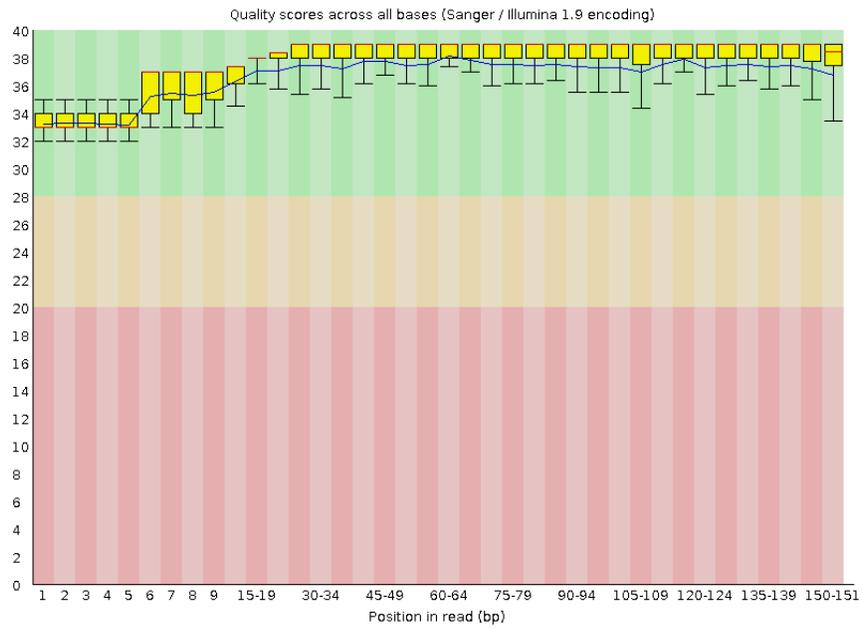


## 3. Tamaño de las lecturas

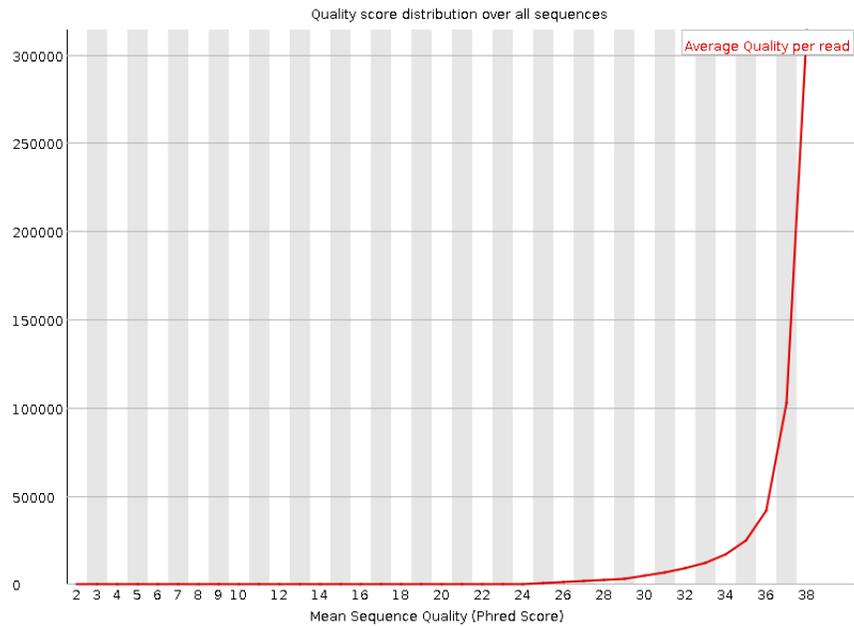


# Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de engorda

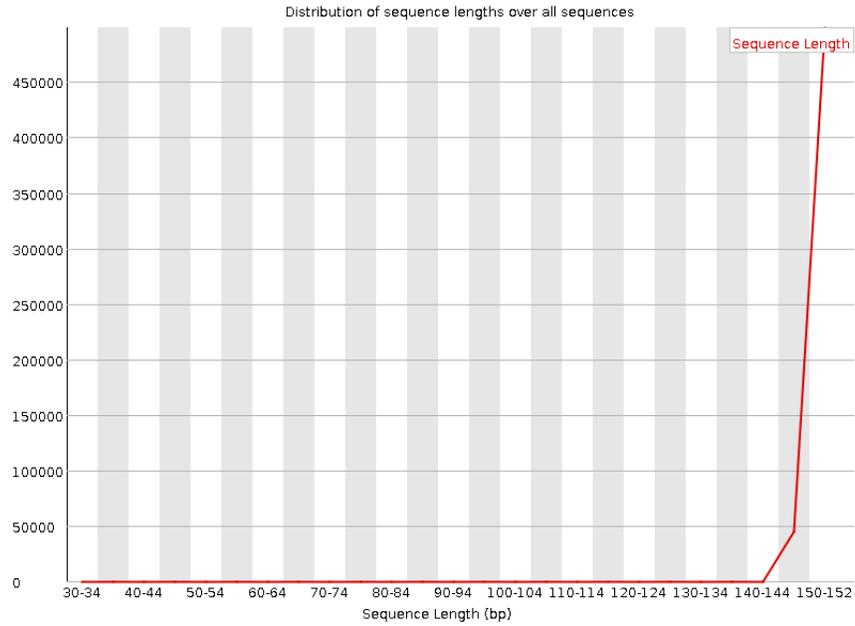
## 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

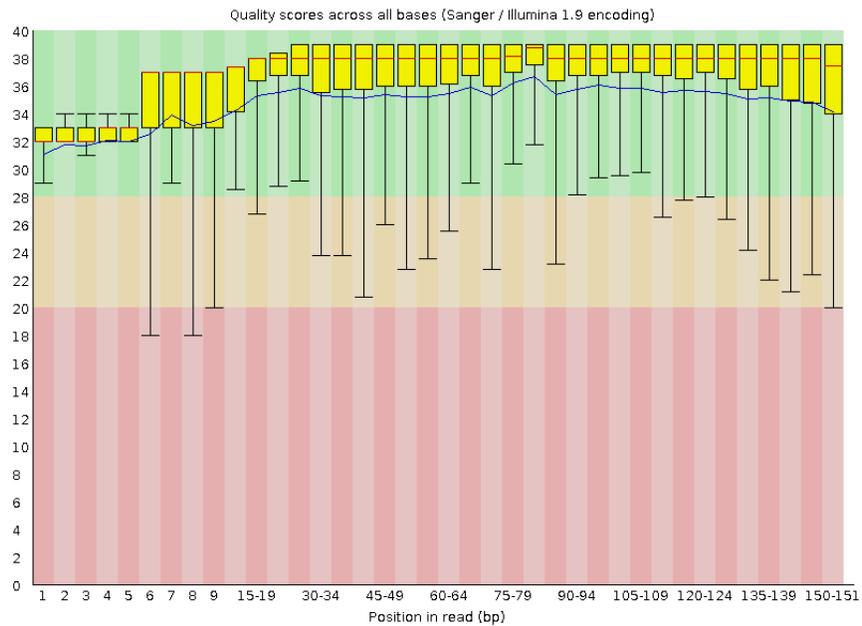


### 3. Tamaño de las lecturas

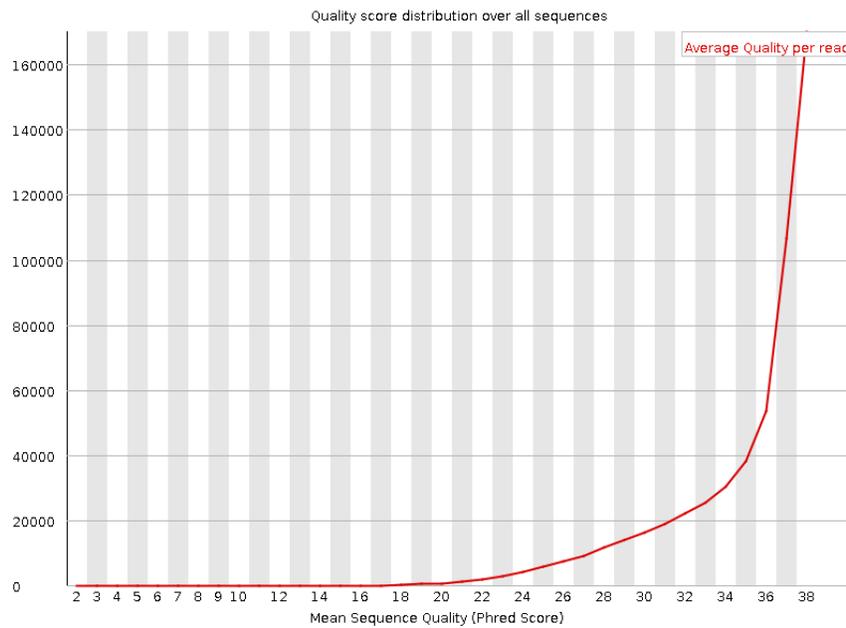


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de engorda

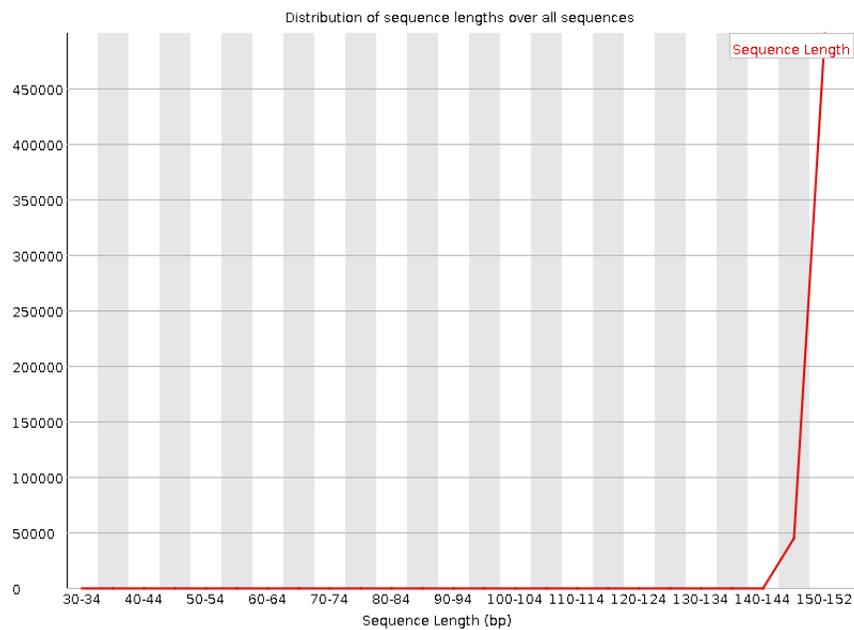
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

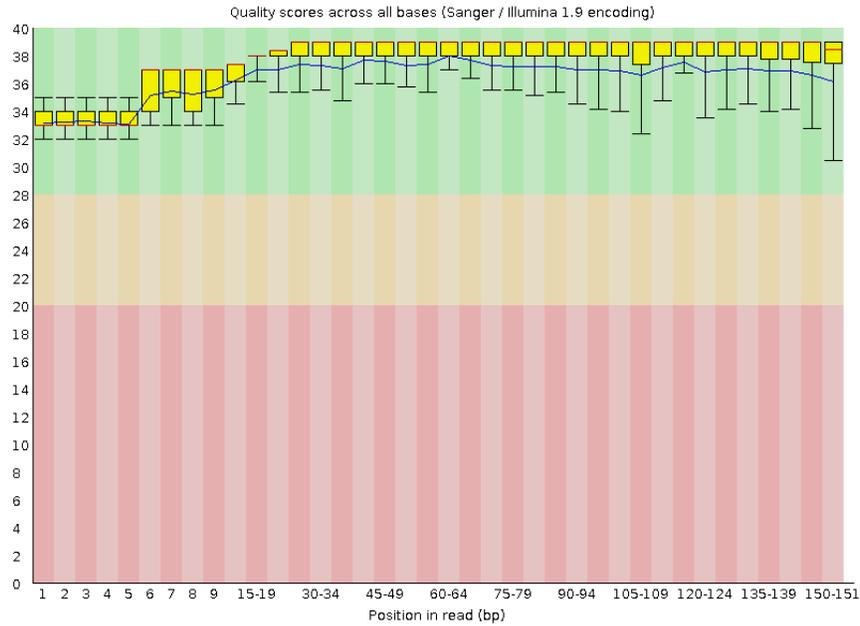


## 3. Tamaño de las lecturas

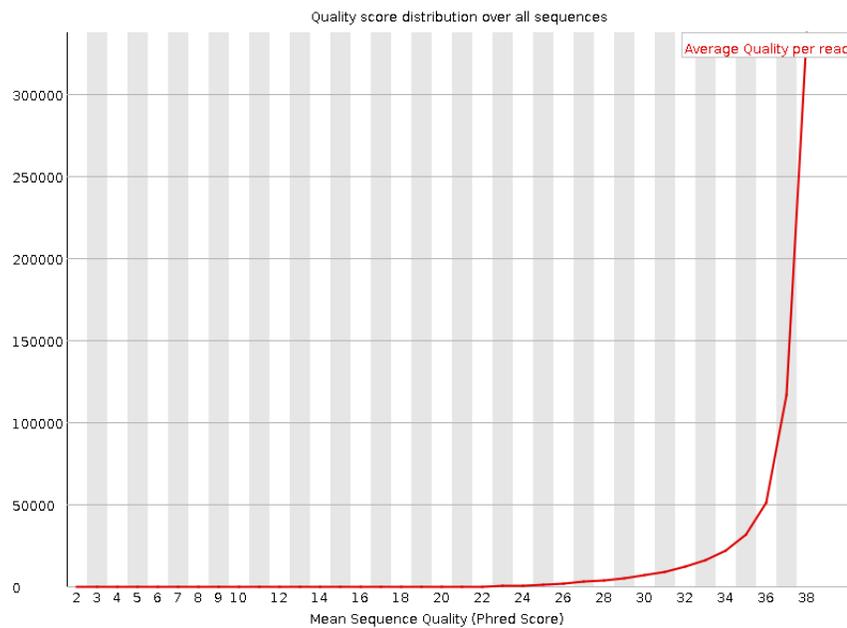


# Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de hembras gestantes

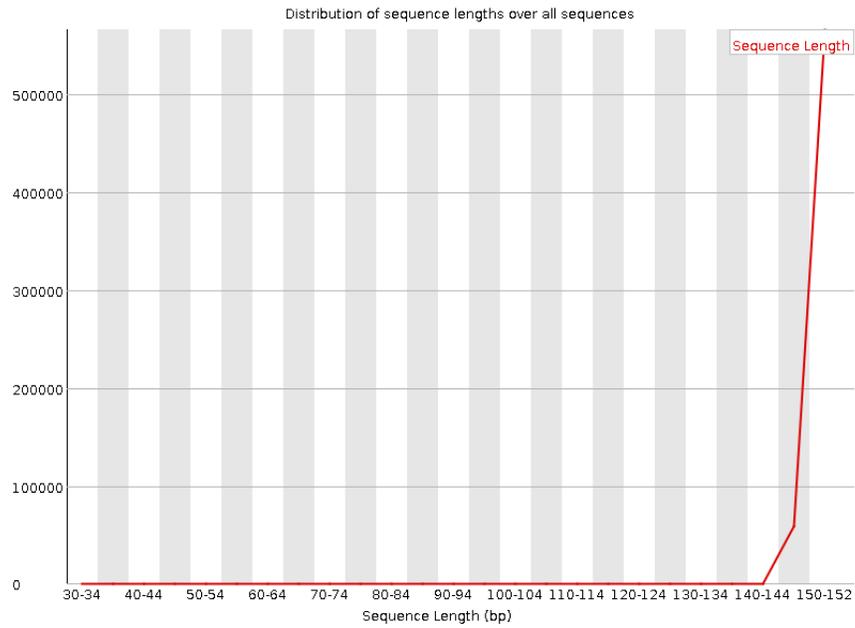
## 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

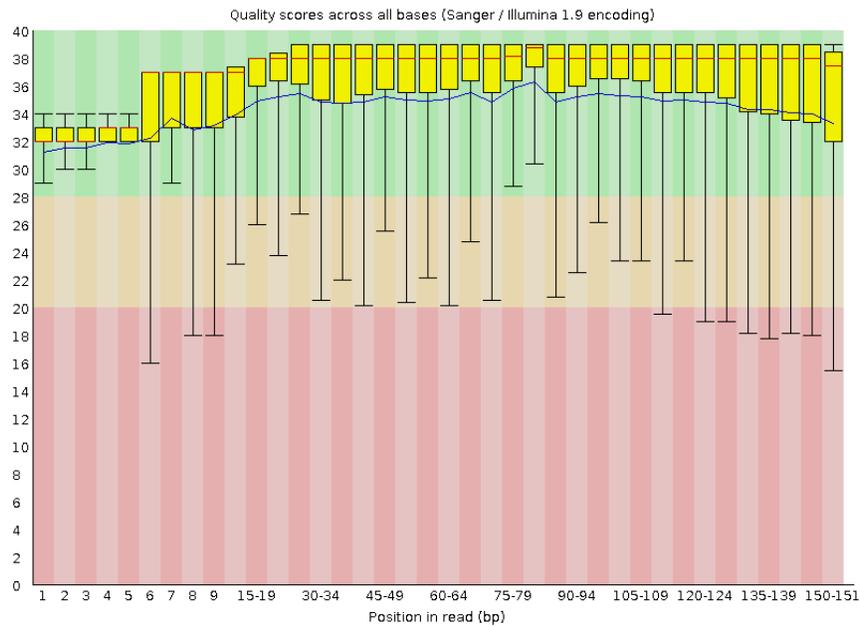


### 3. Tamaño de las lecturas

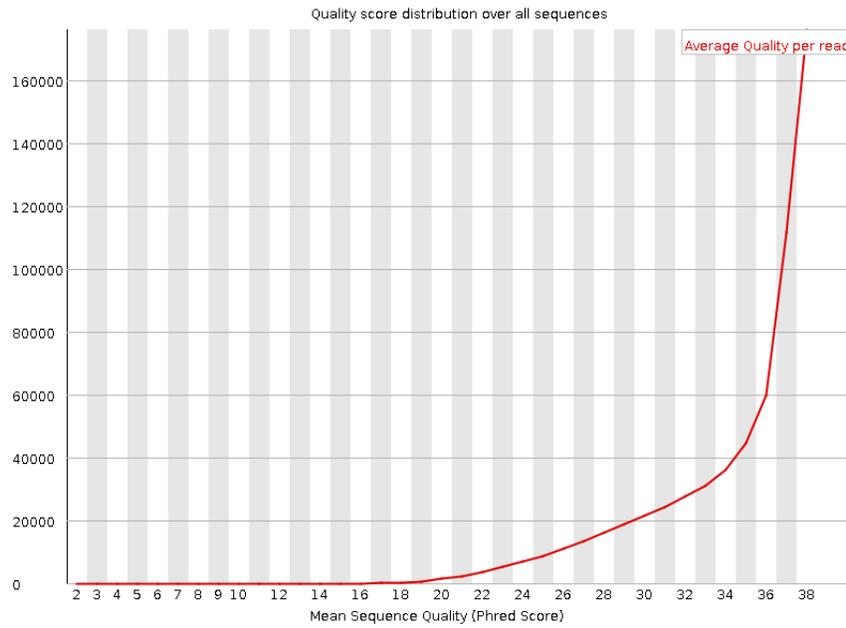


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de hembras gestantes

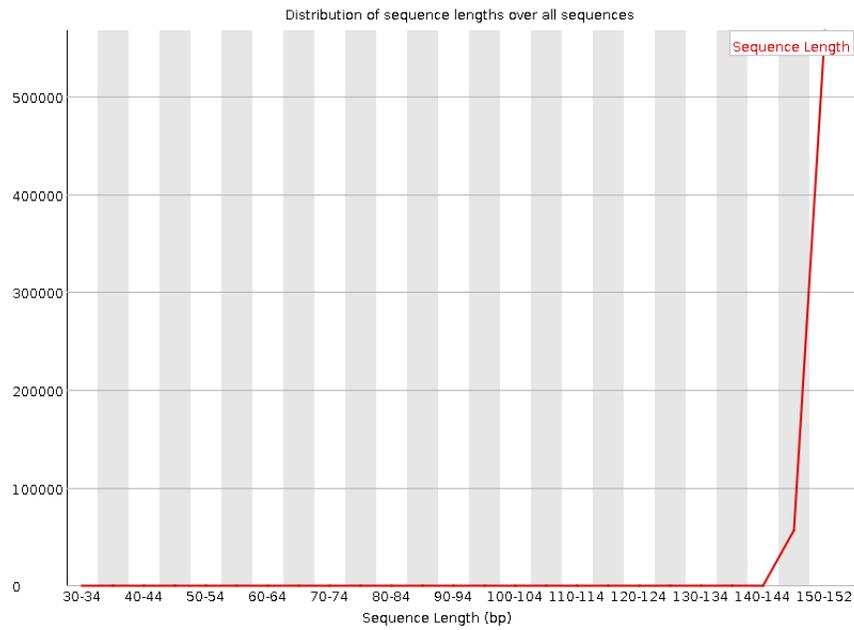
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

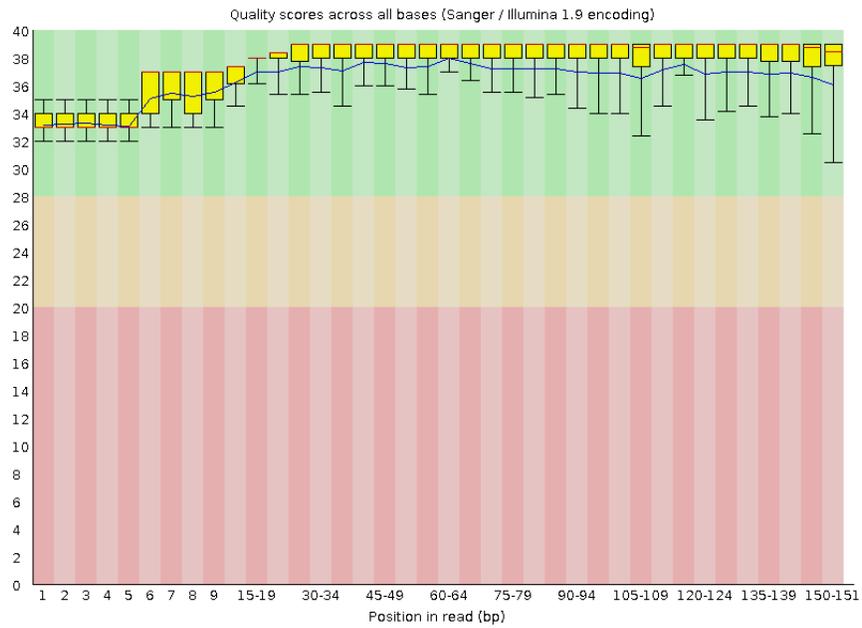


## 3. Tamaño de las lecturas

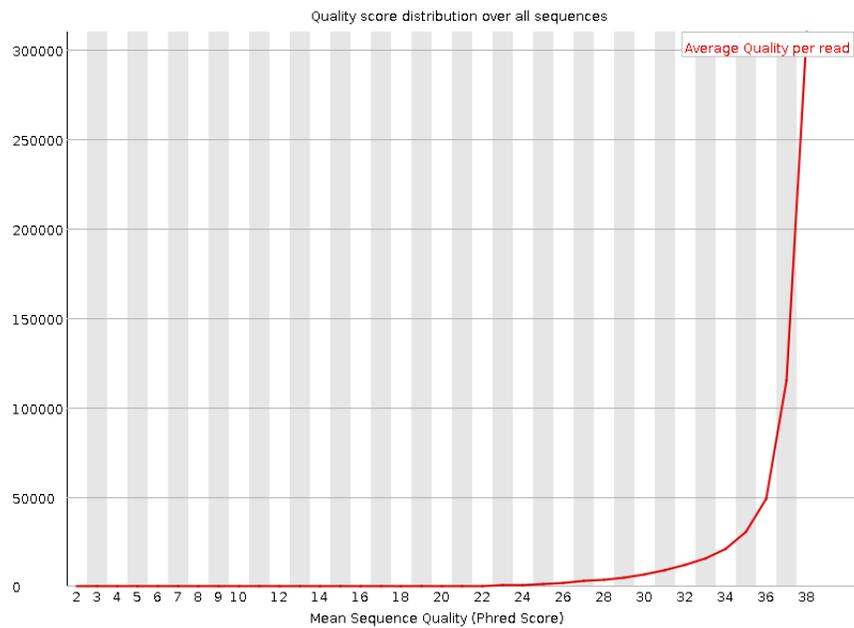


# Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de lactancia

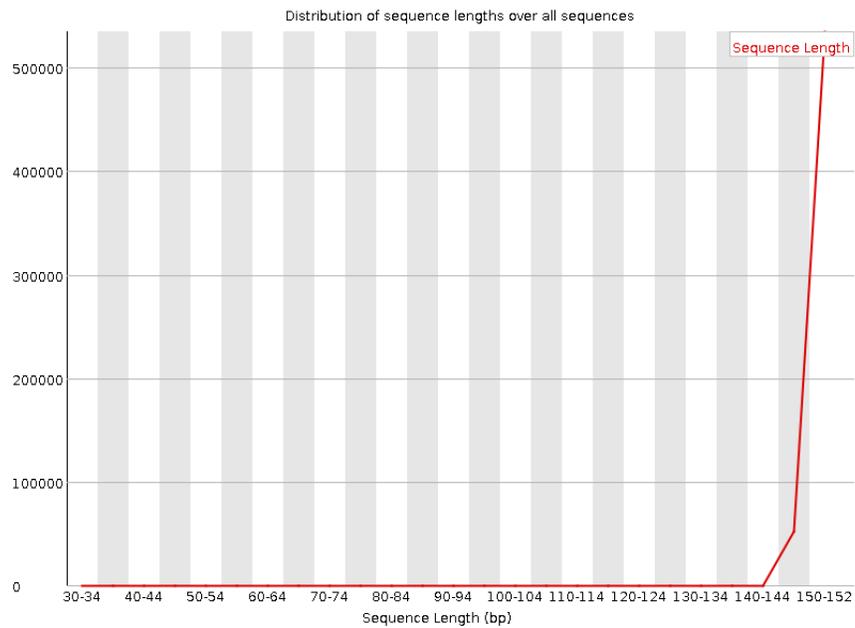
## 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

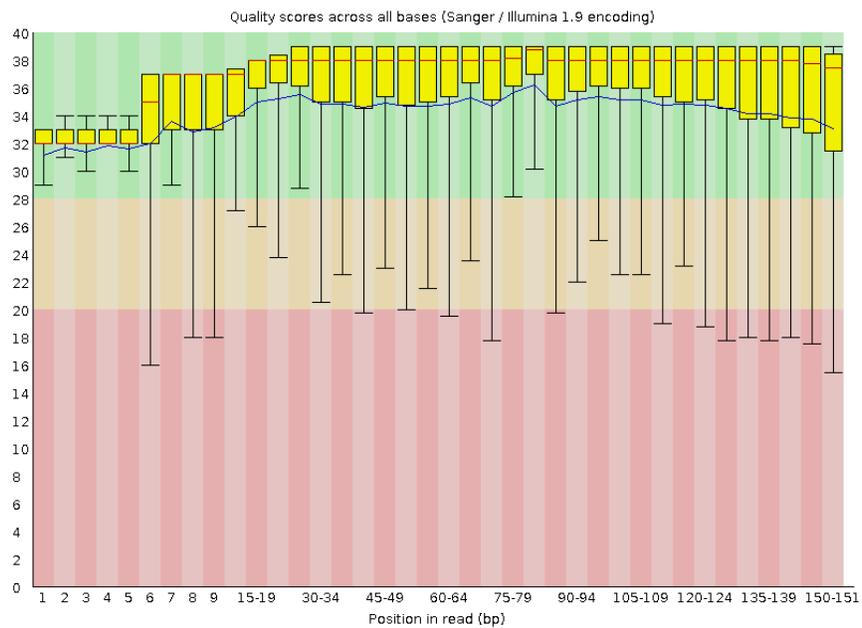


### 3. Tamaño de las lecturas

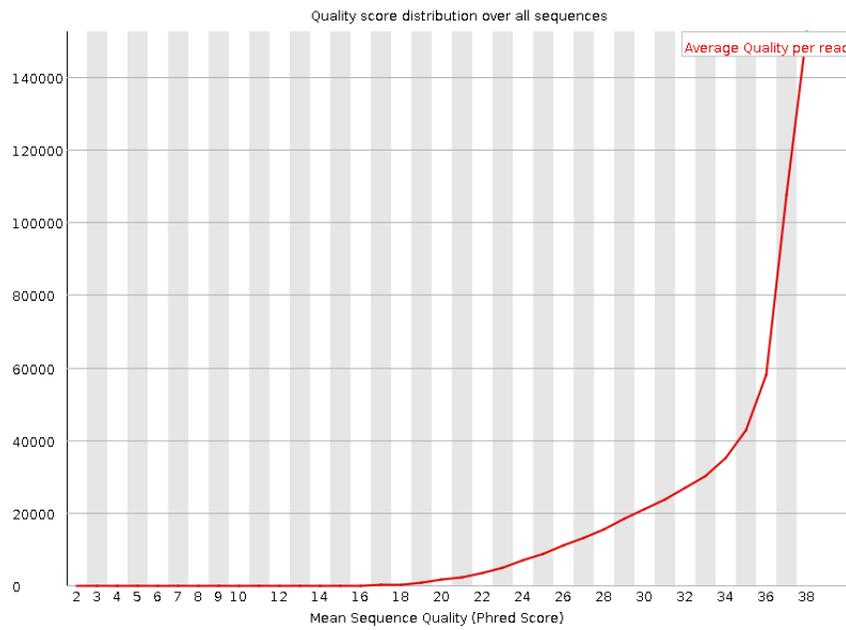


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de lactancia

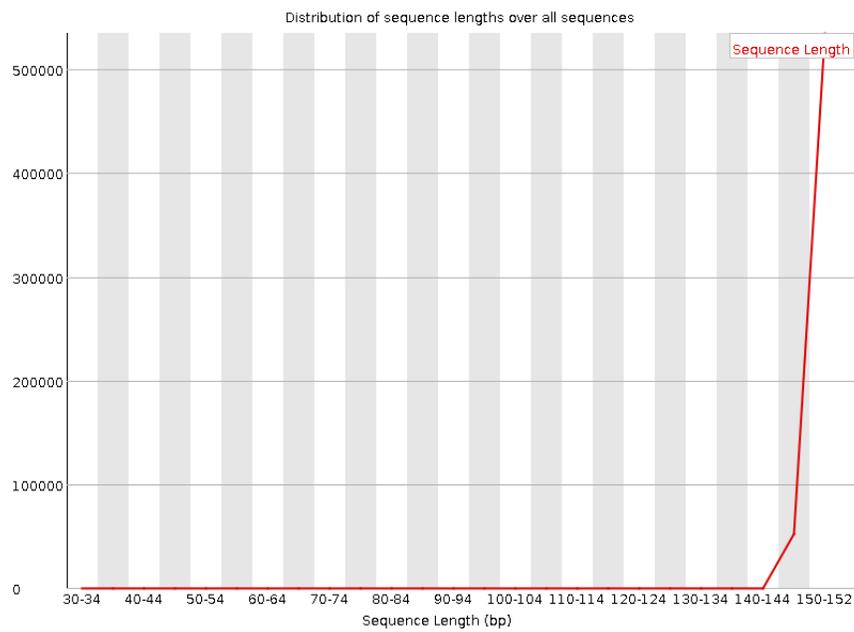
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

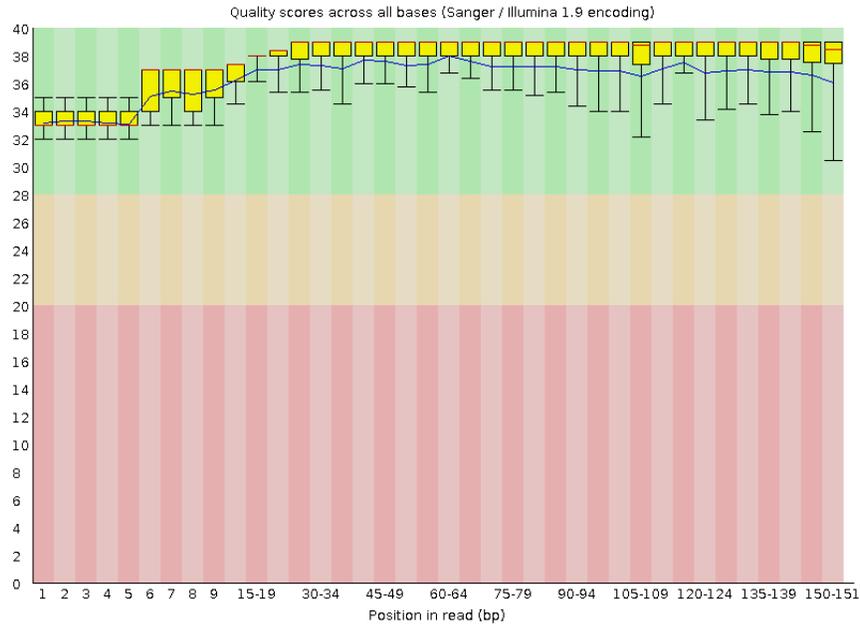


## 3. Tamaño de las lecturas

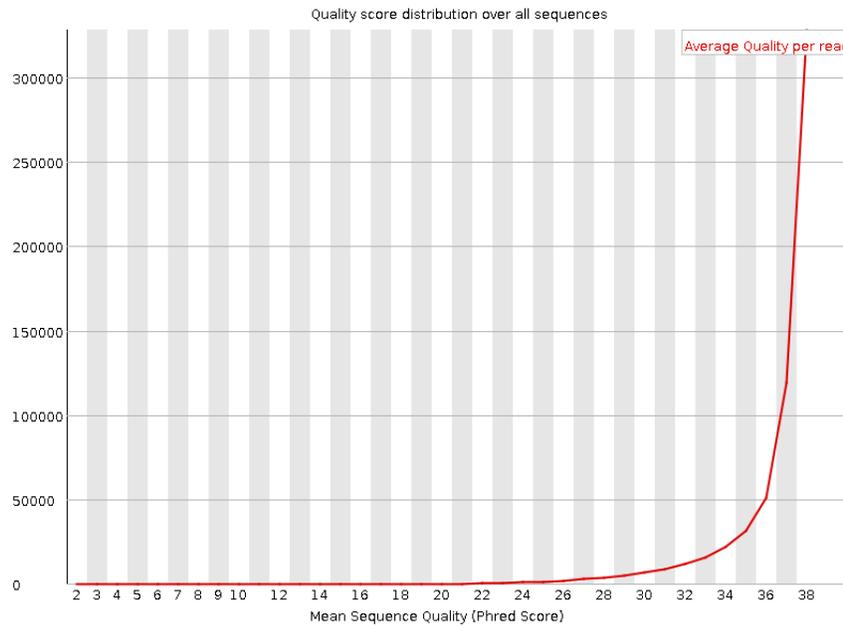


# Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de machos reproductores

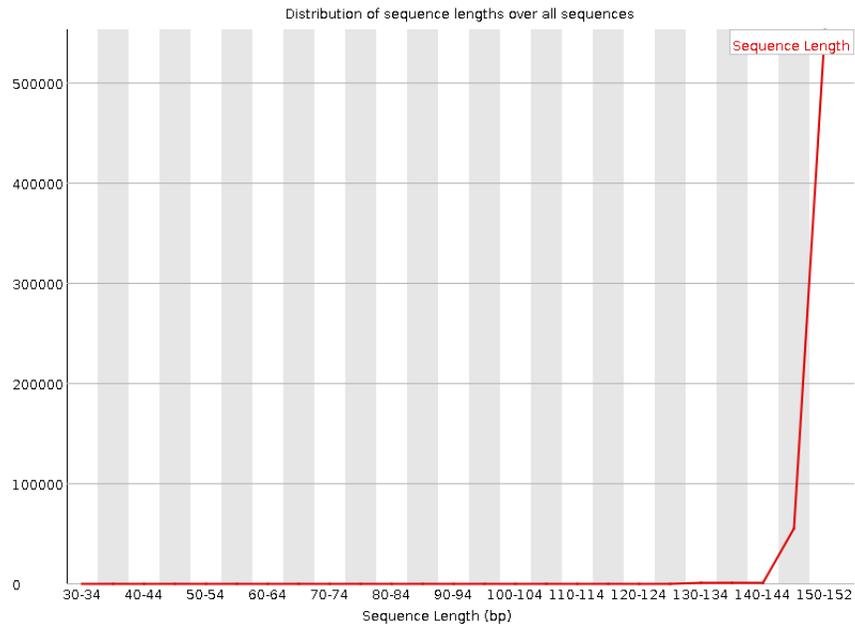
## 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

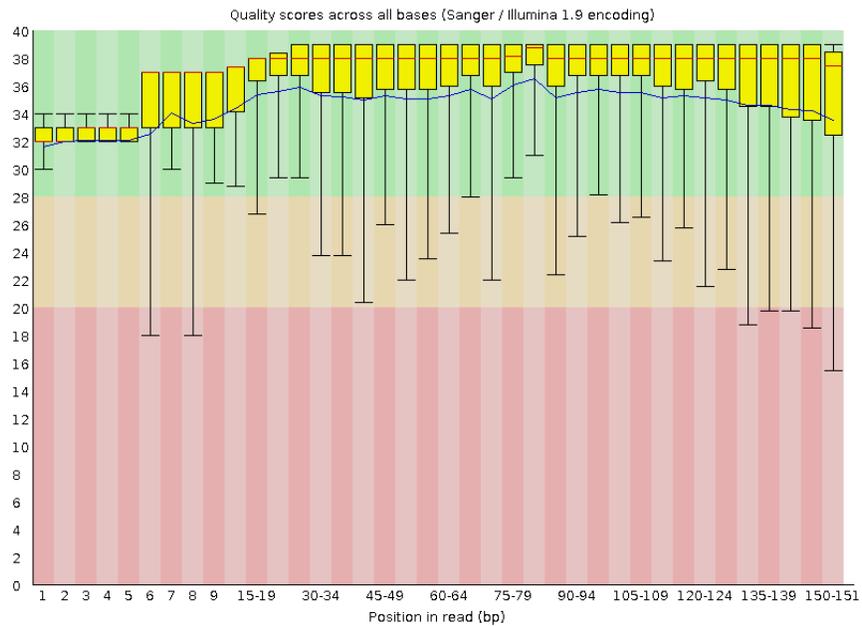


### 3. Tamaño de las lecturas

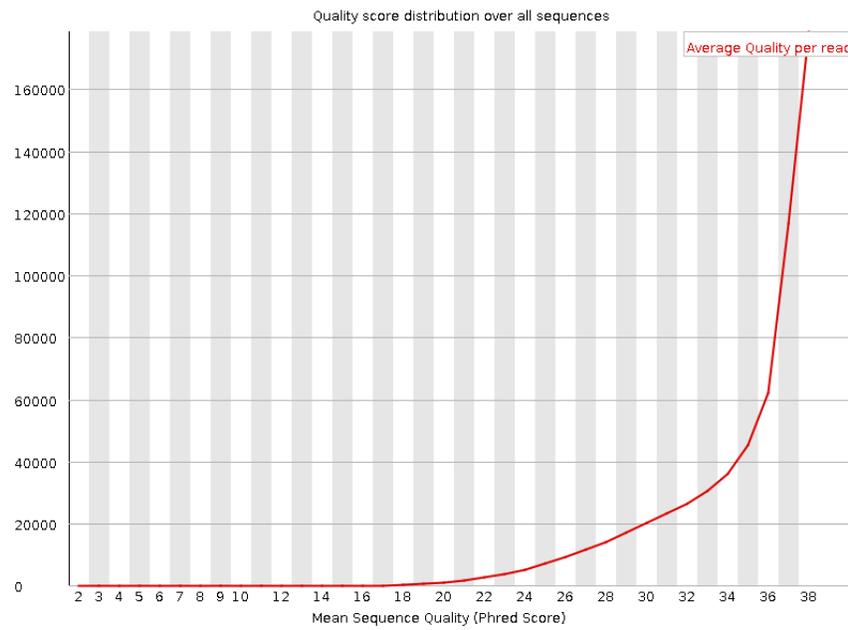


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de machos reproductores

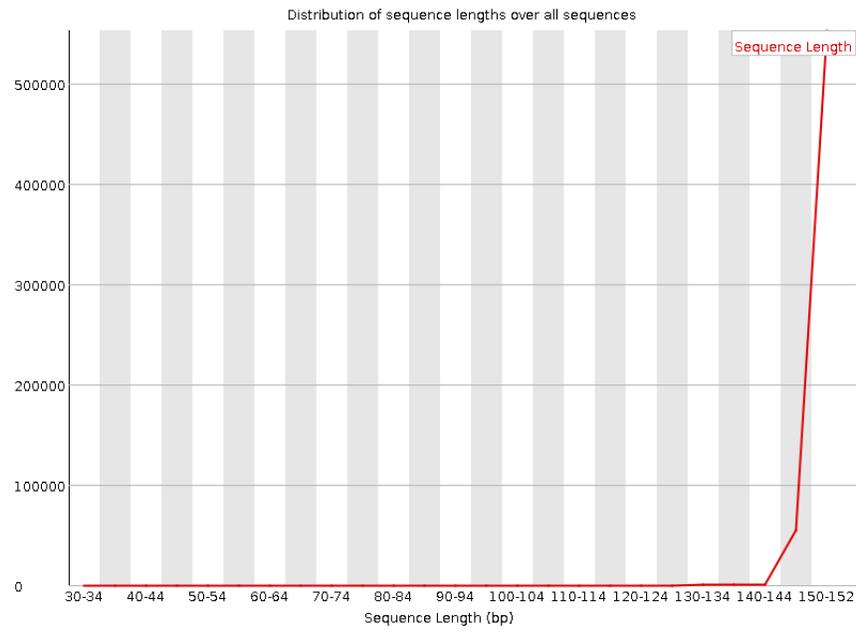
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas



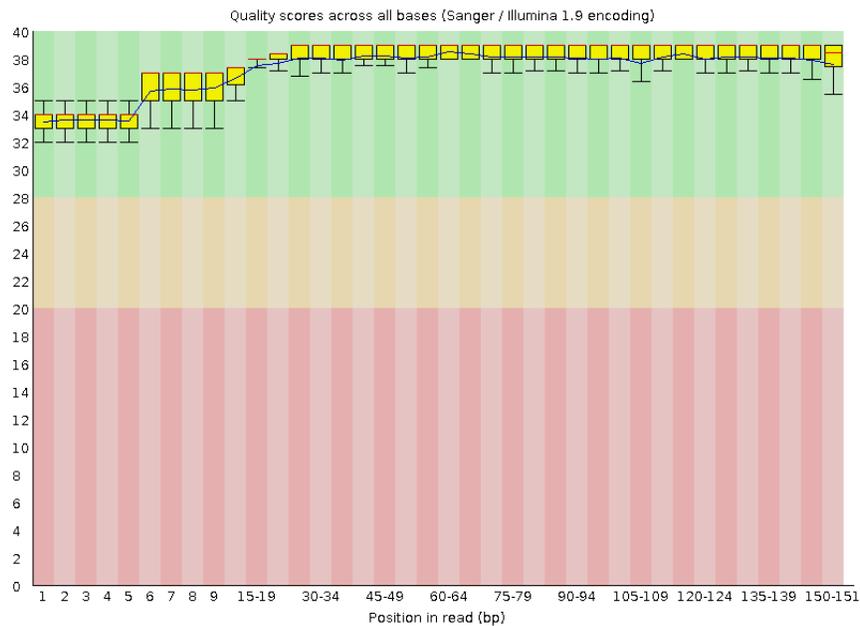
## 3. Tamaño de las lecturas



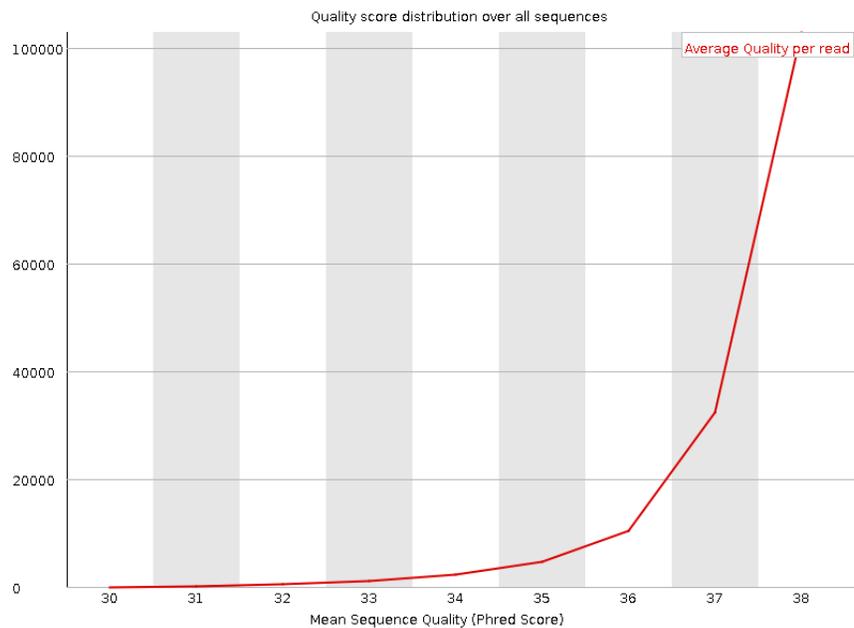
## 11.2. Gráficos obtenidos a partir de FASTQC después de la limpieza de las secuencias

### Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de crecimiento

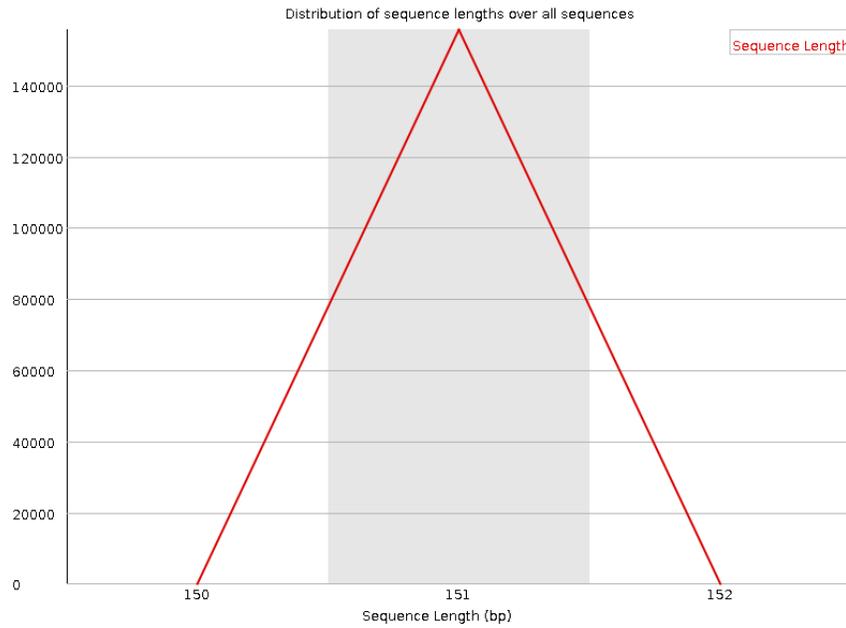
#### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



#### 2. Calidad promedio de las lecturas

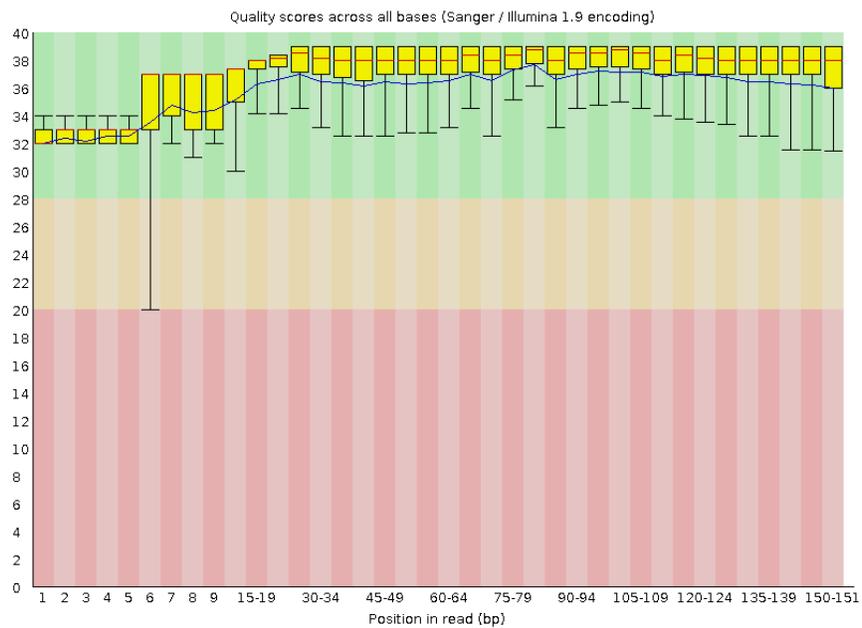


### 3. Tamaño de las lecturas

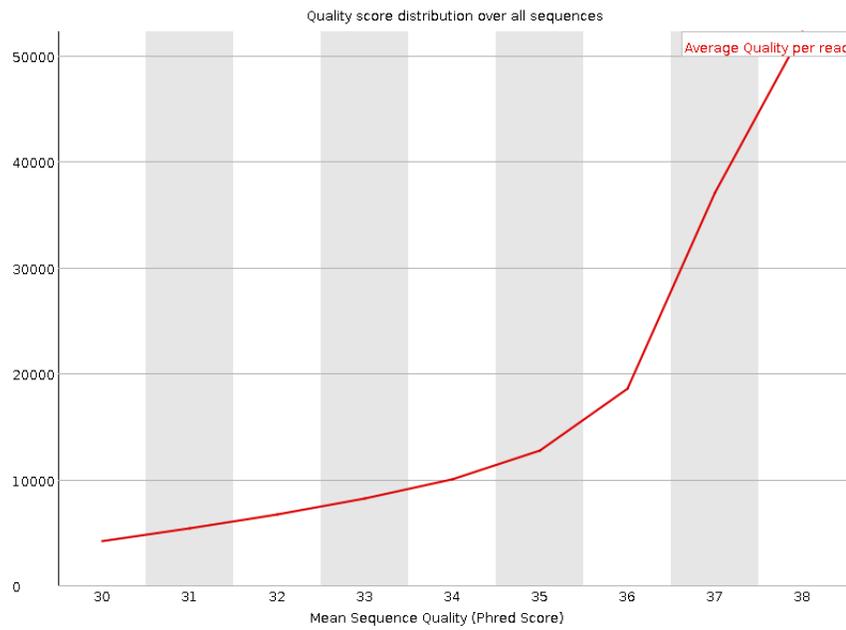


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de crecimiento

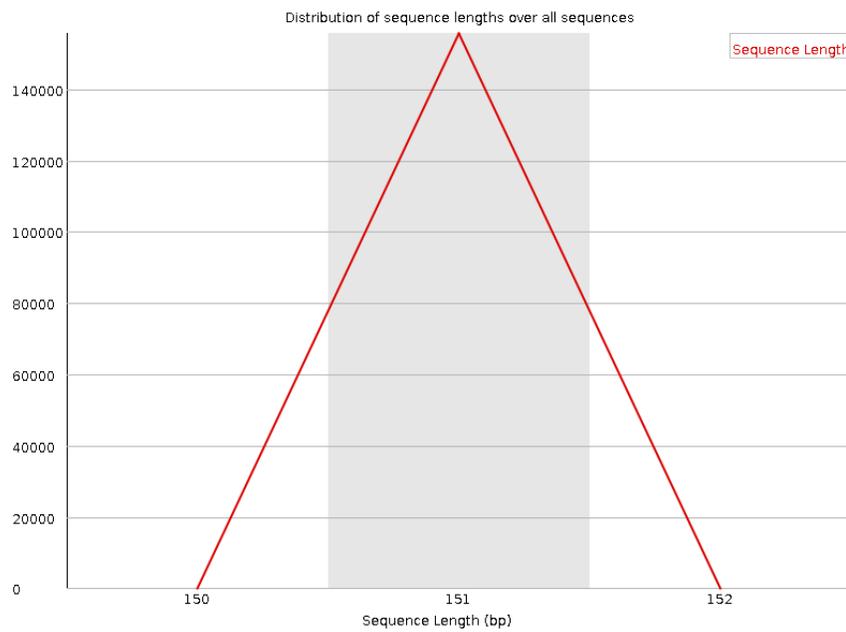
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

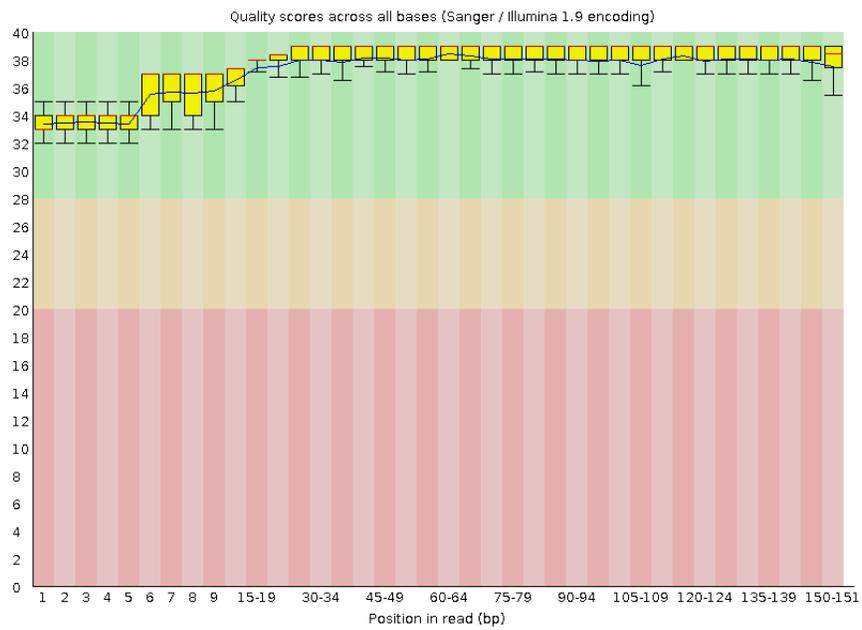


## 3. Tamaño de las lecturas

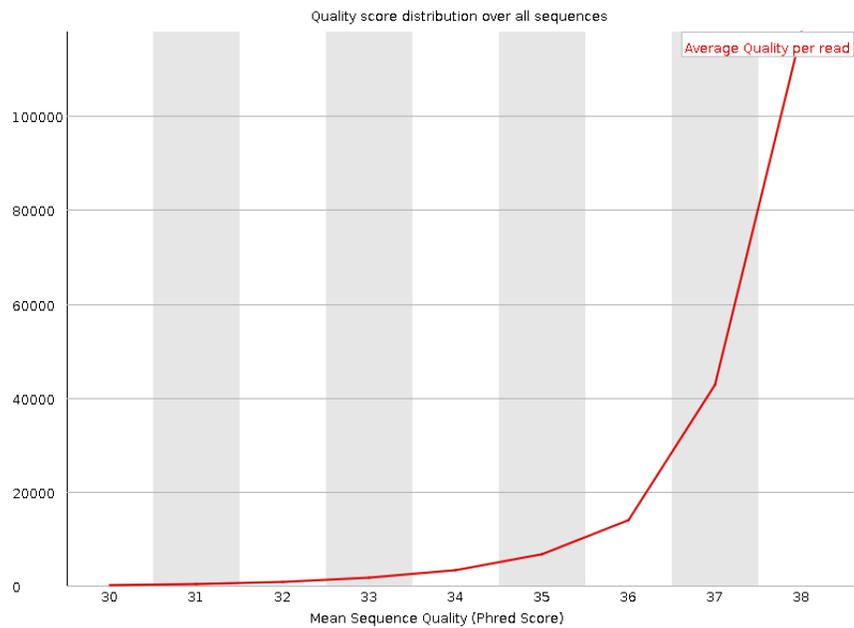


## Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de destete

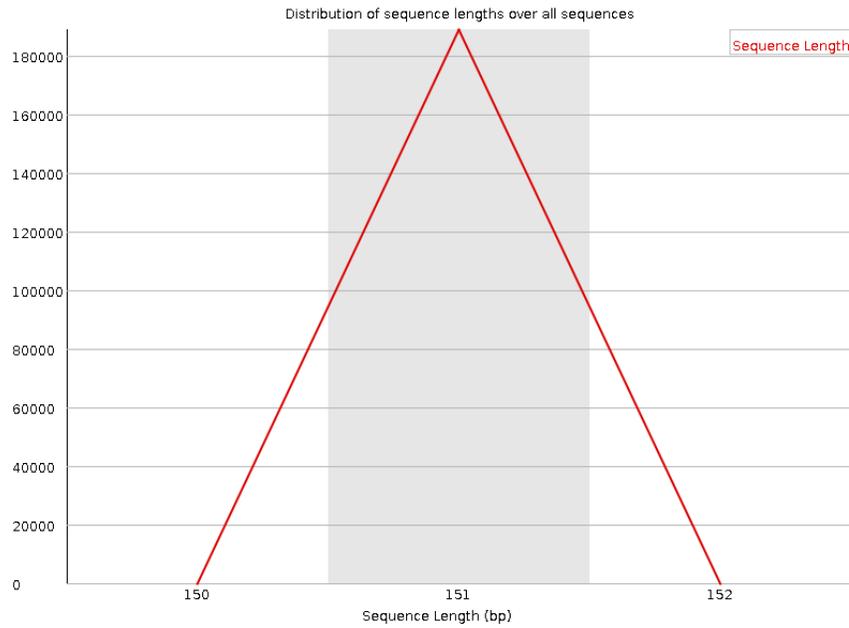
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



### 2. Calidad promedio de las lecturas

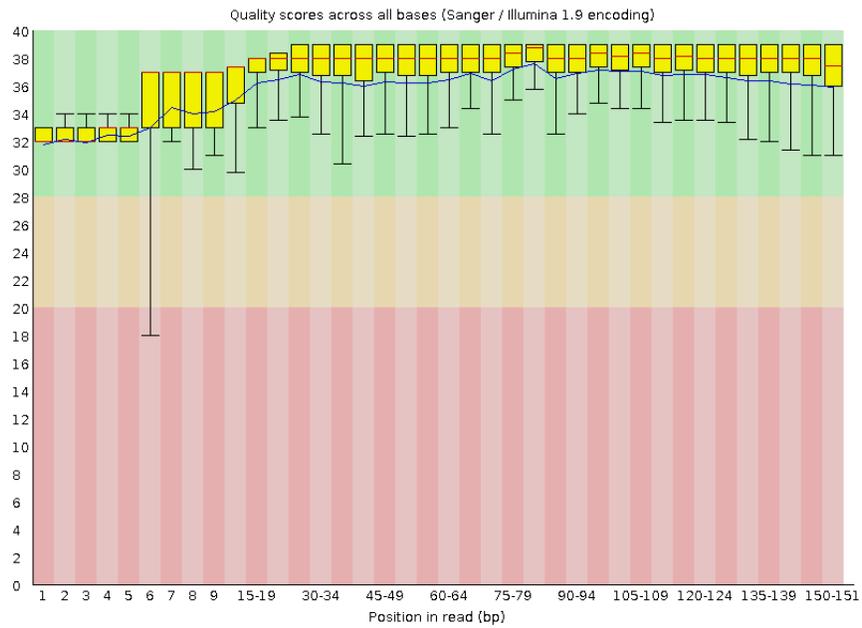


### 3. Tamaño de las lecturas

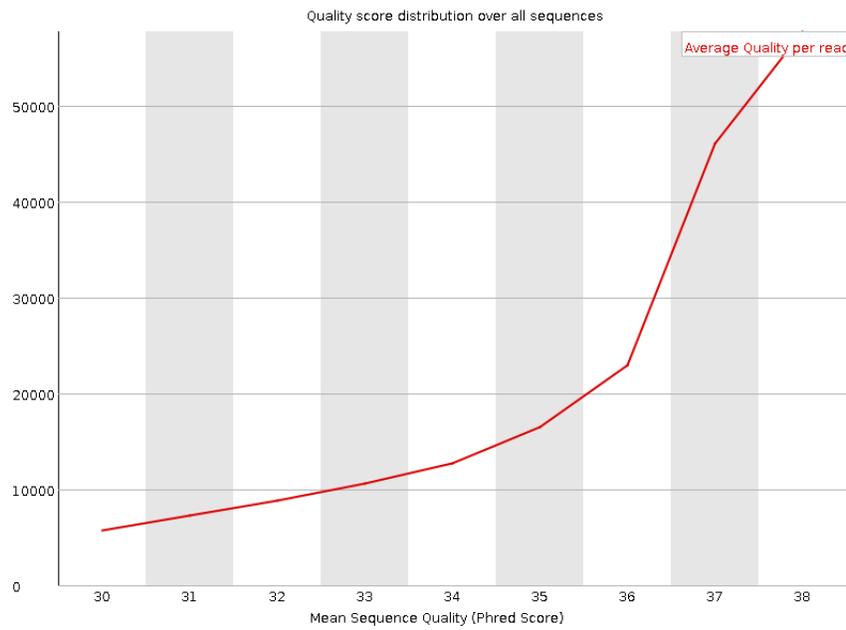


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de destete

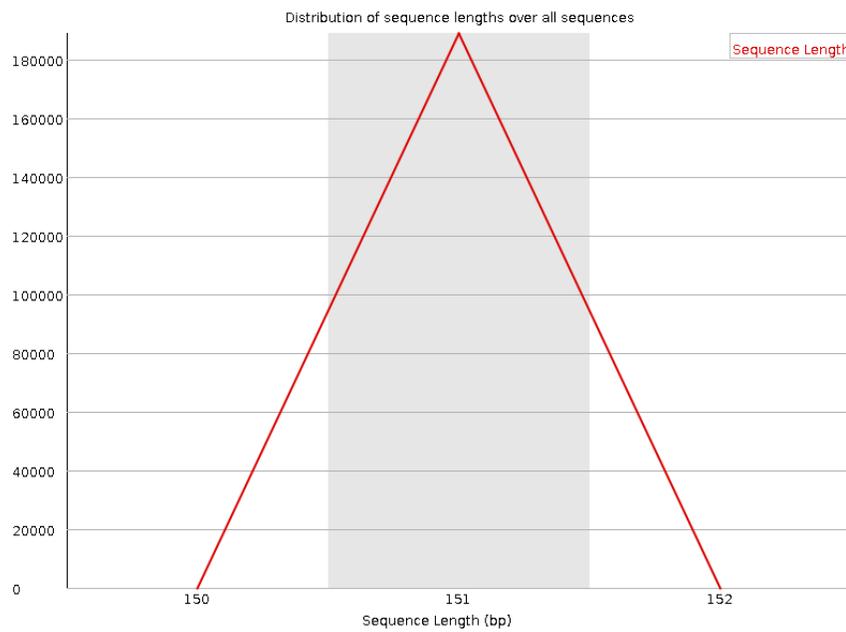
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

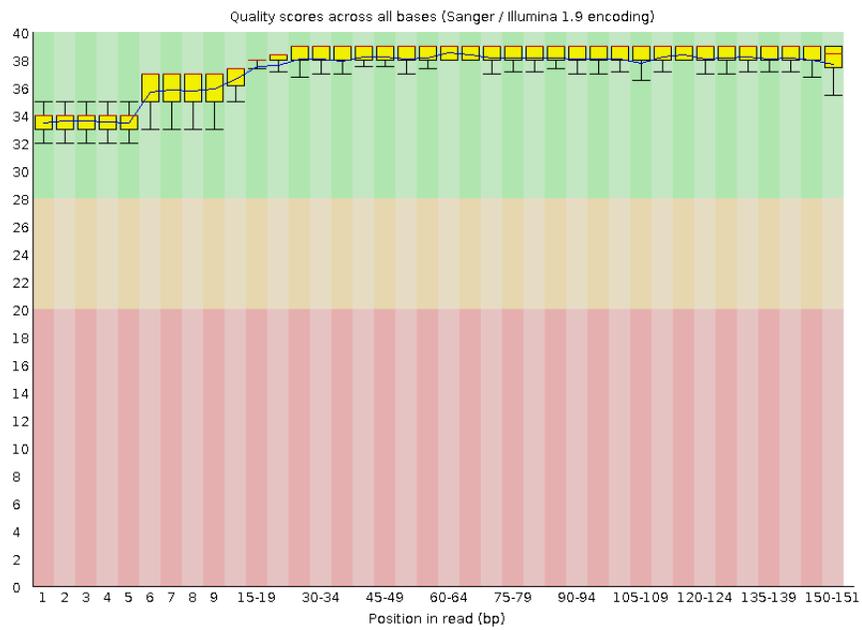


## 3. Tamaño de las lecturas

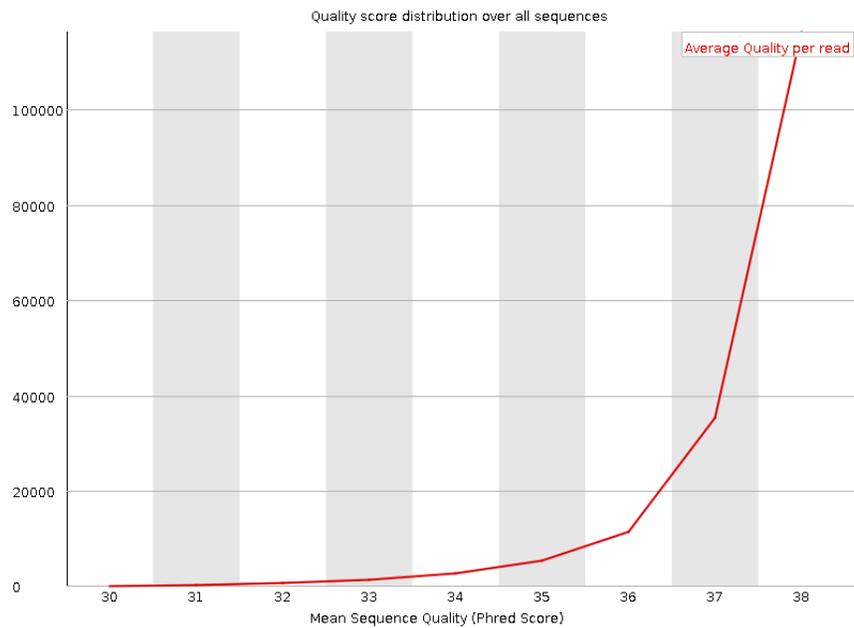


# Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de engorda

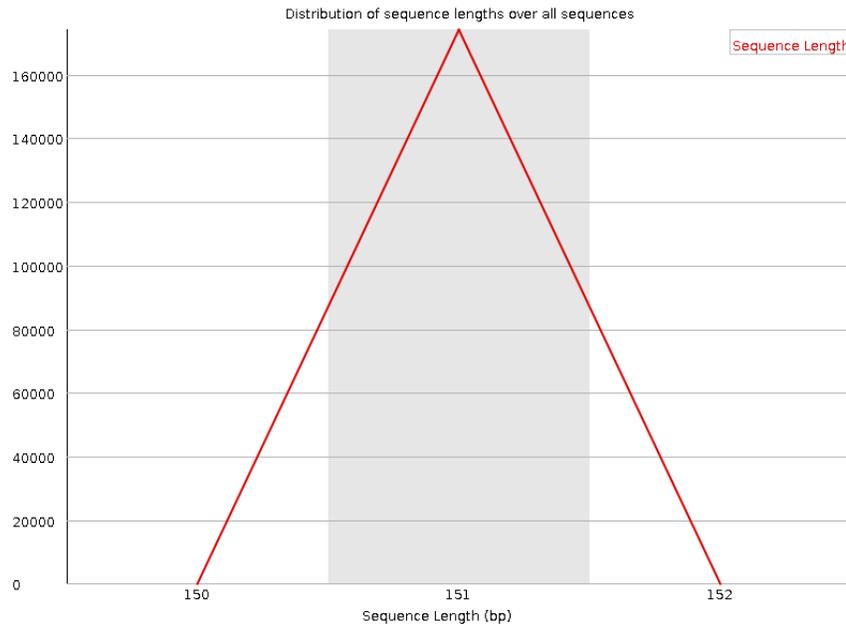
## 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

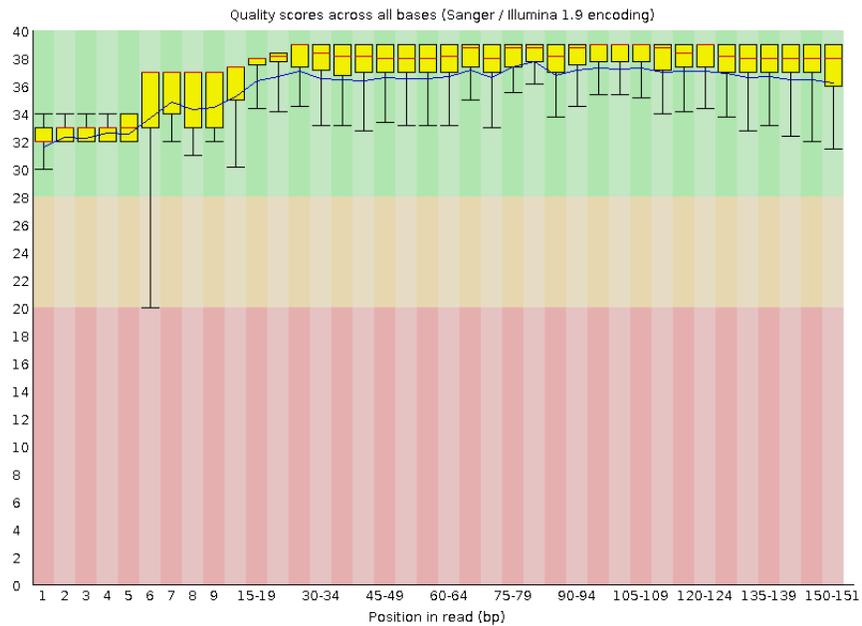


### 3. Tamaño de las lecturas

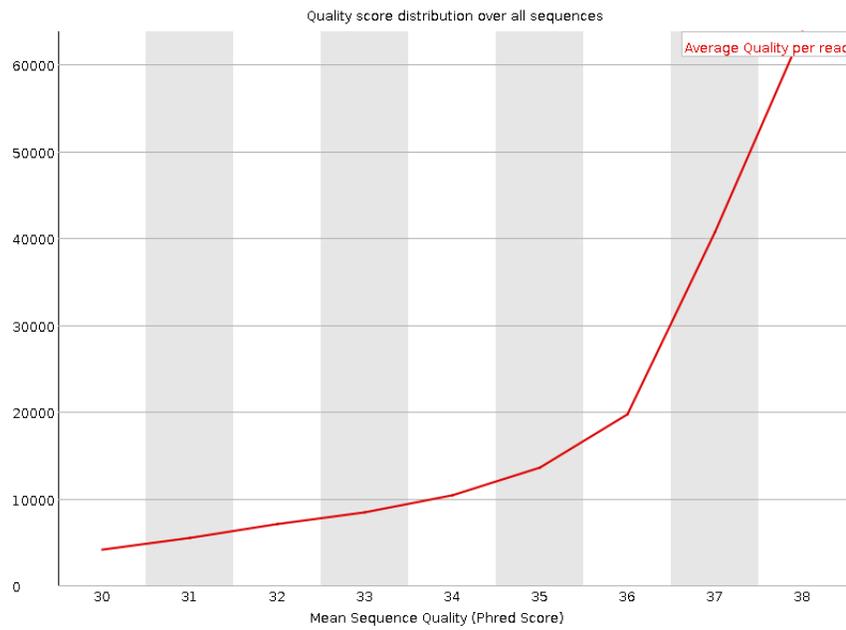


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de engorda

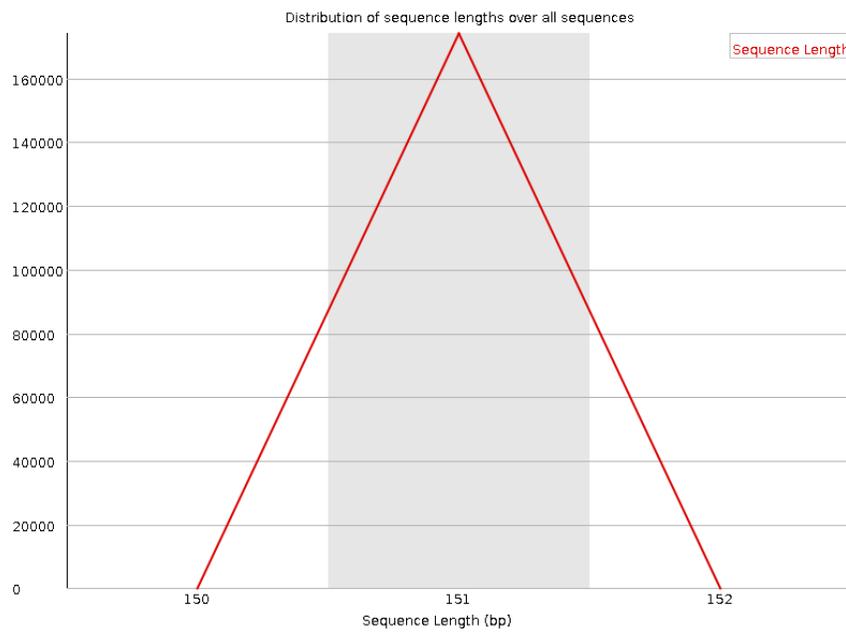
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

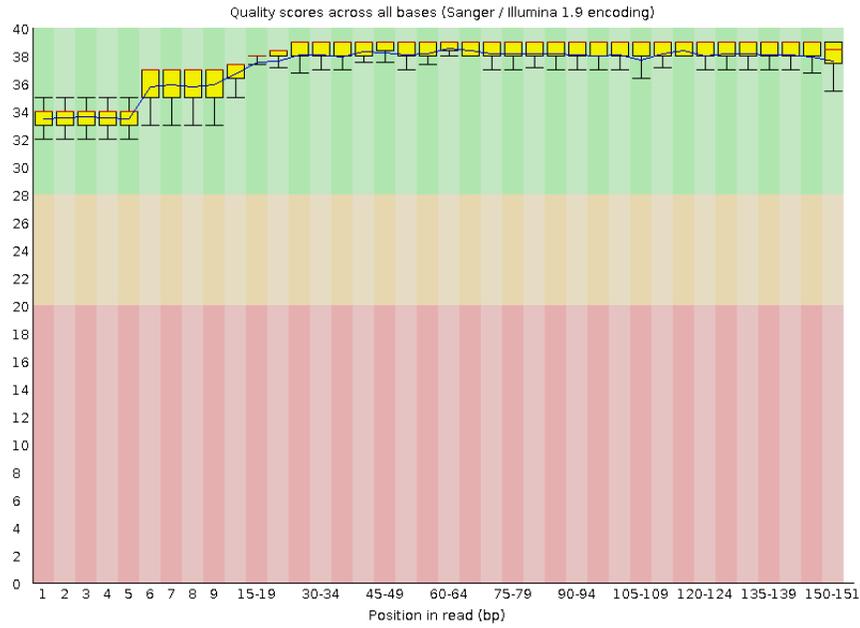


## 3. Tamaño de las lecturas

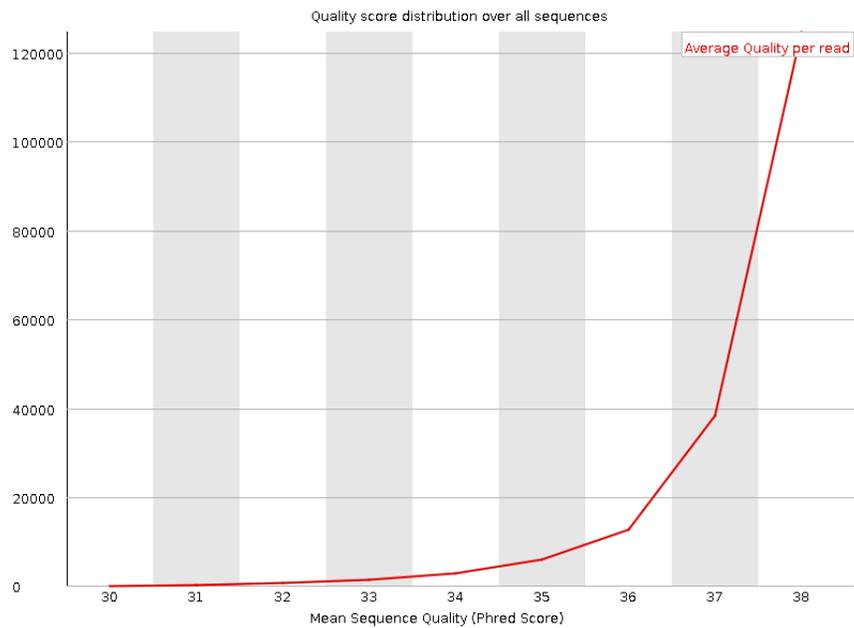


# Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de hembras gestantes

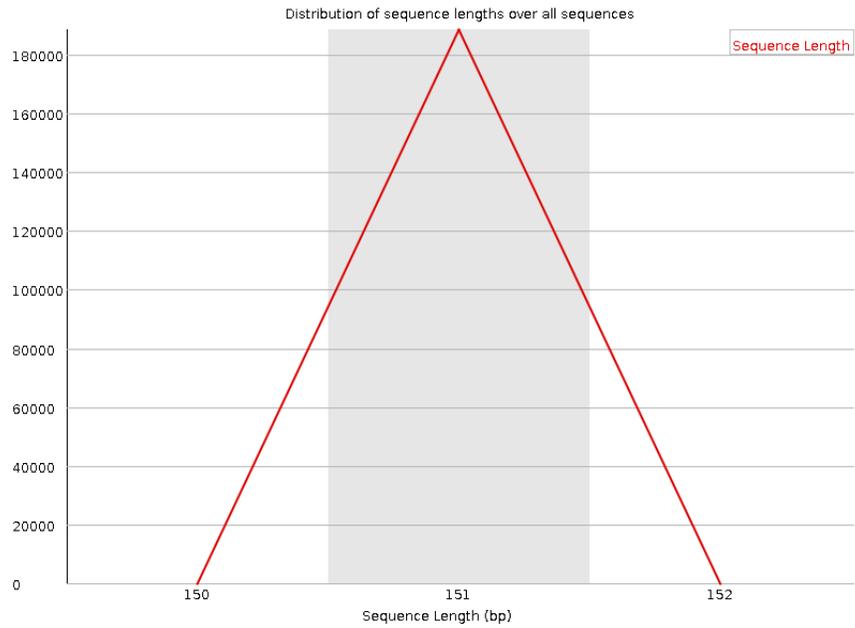
## 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

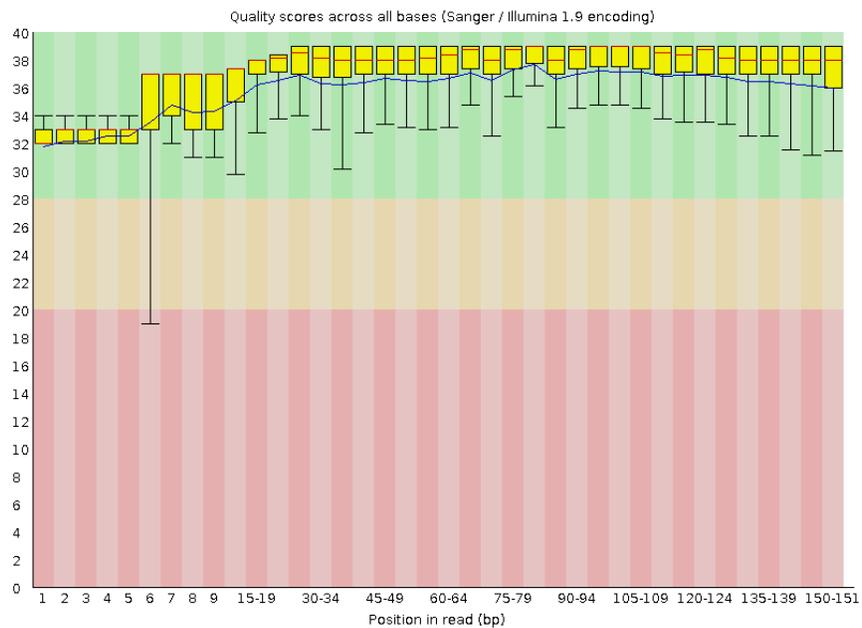


### 3. Tamaño de las lecturas

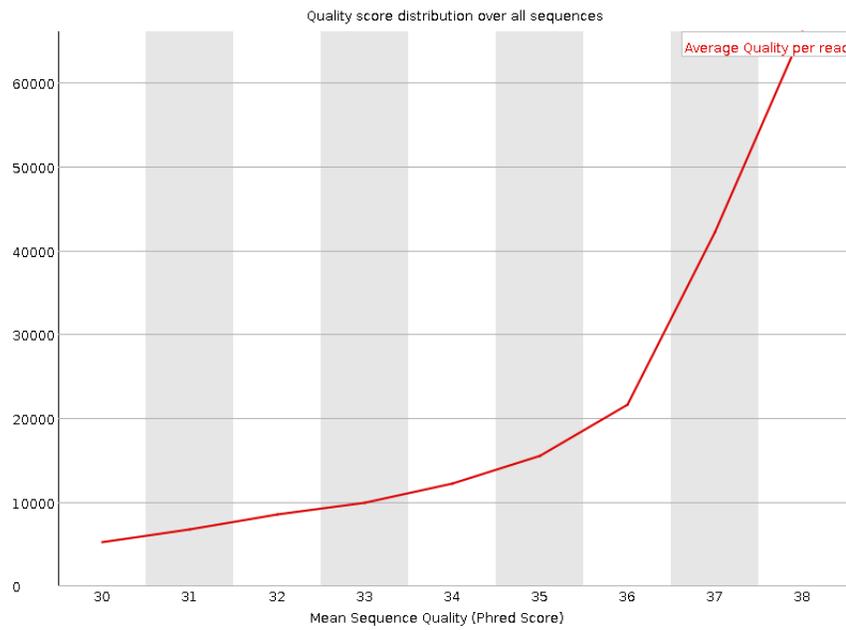


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de hembras gestantes

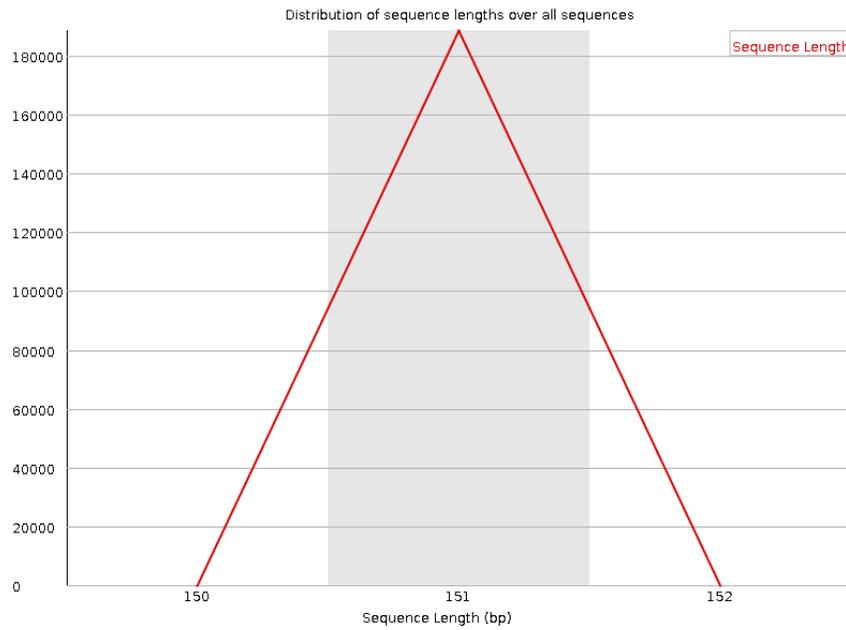
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

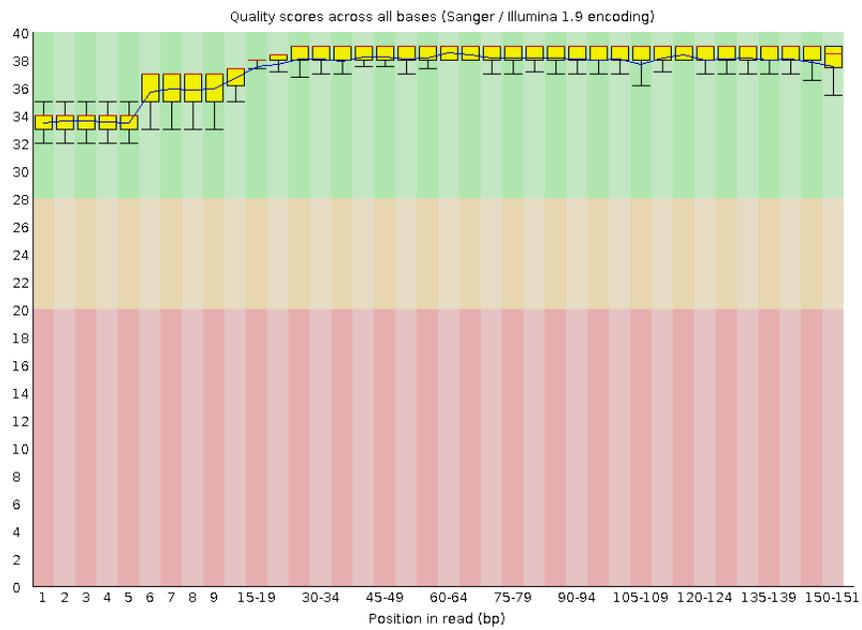


## 3. Tamaño de las lecturas

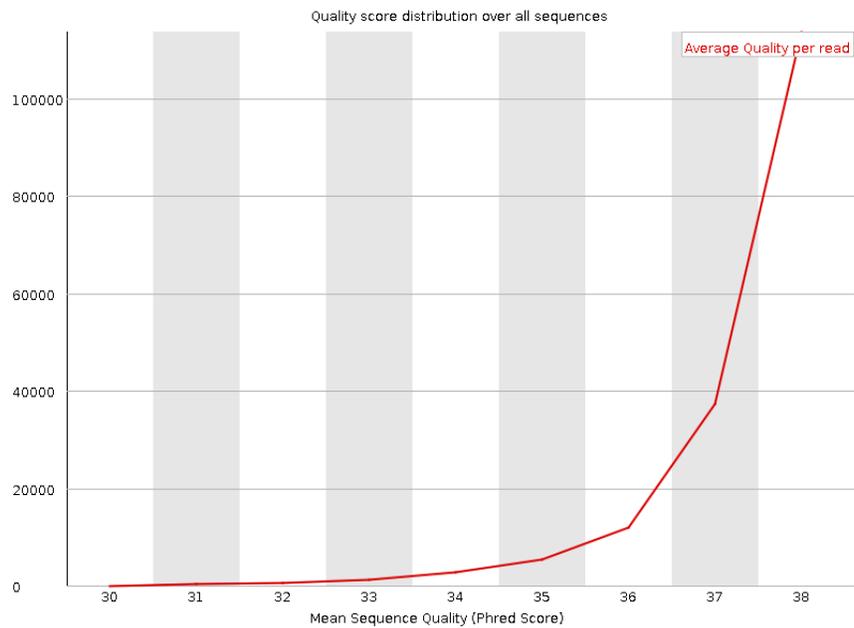


## Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de lactancia

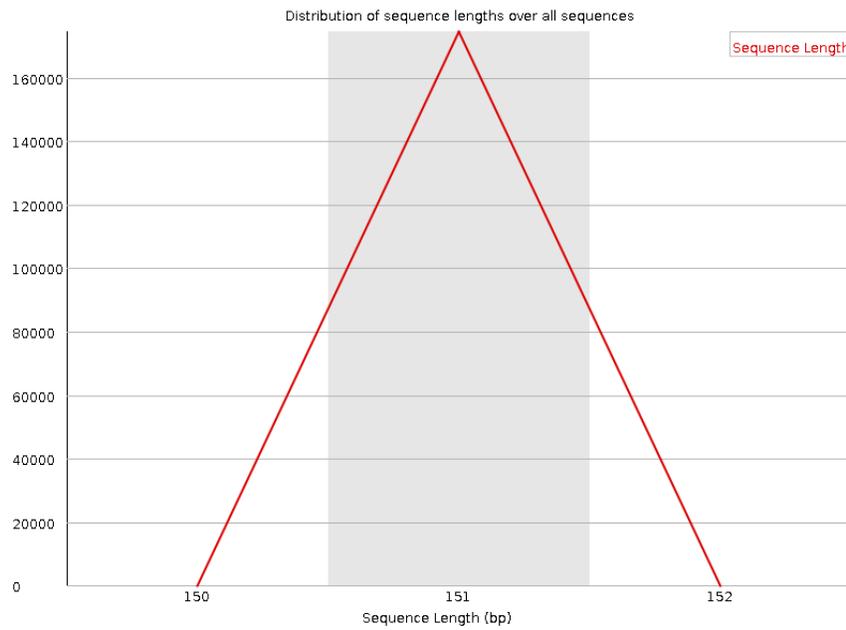
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



### 2. Calidad promedio de las lecturas

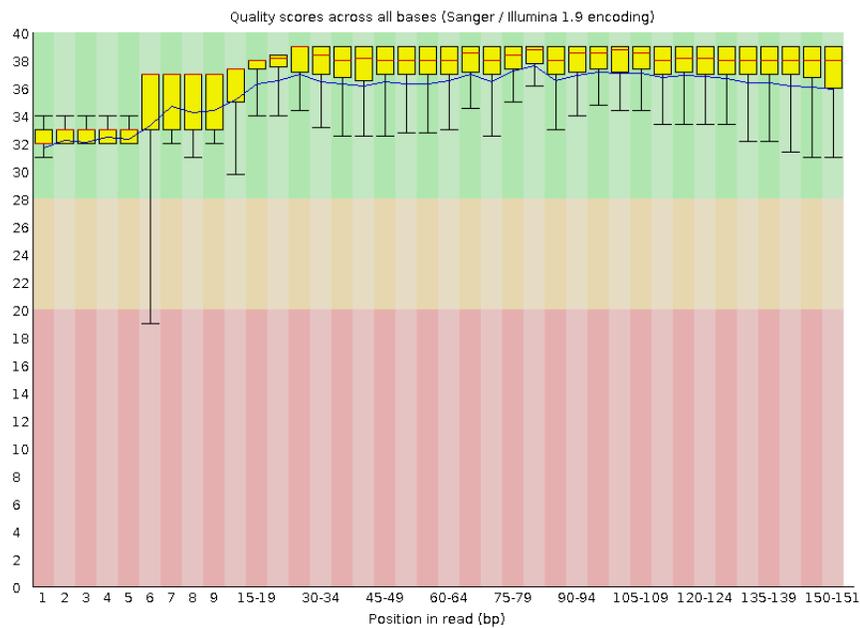


### 3. Tamaño de las lecturas

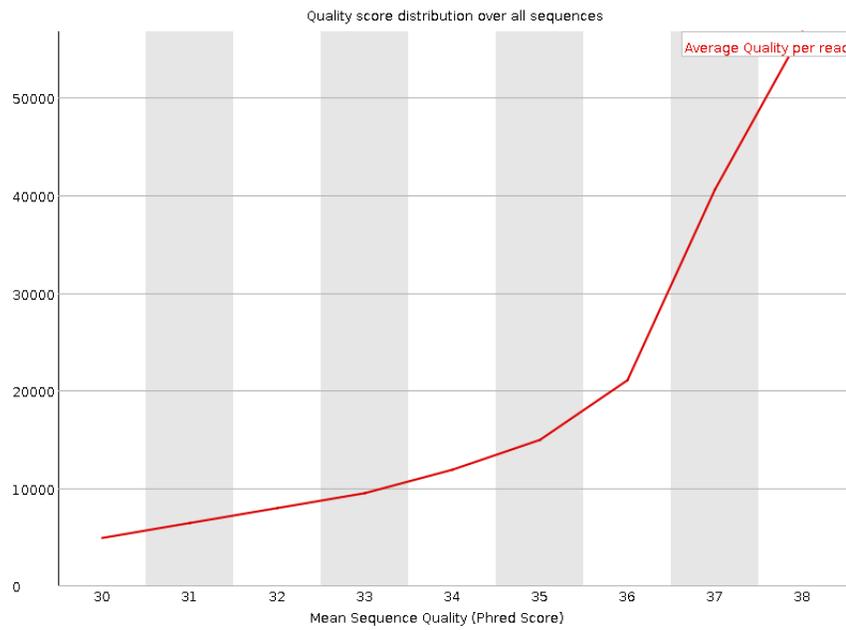


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de lactancia

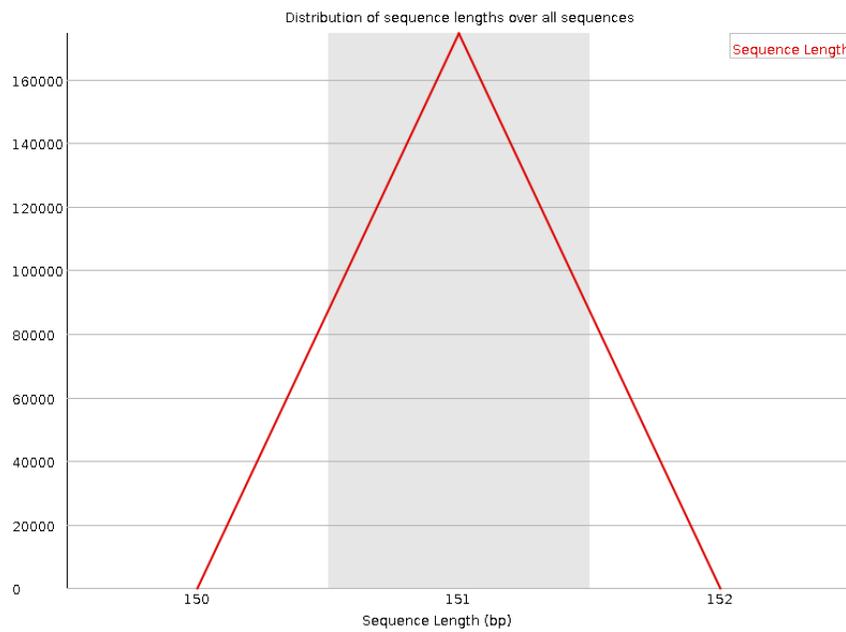
### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

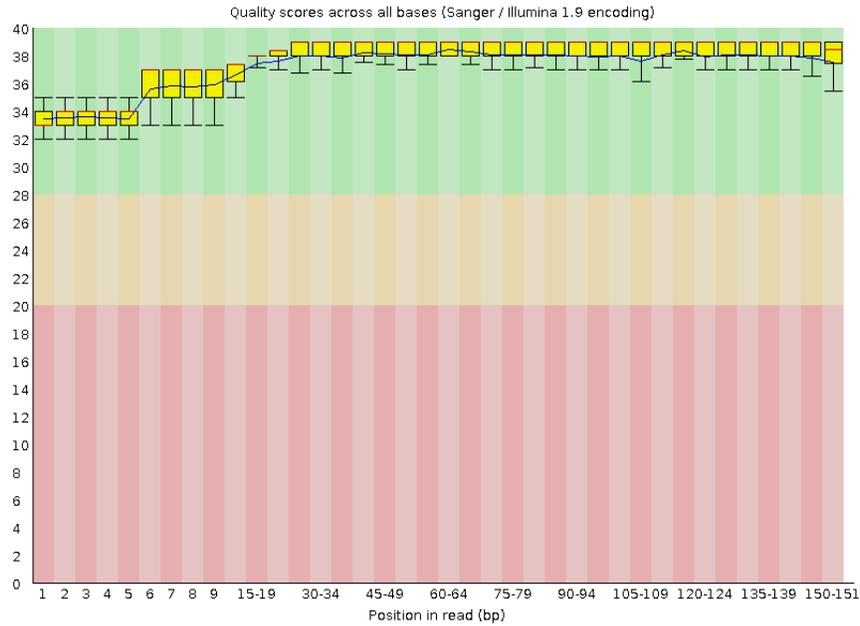


## 3. Tamaño de las lecturas

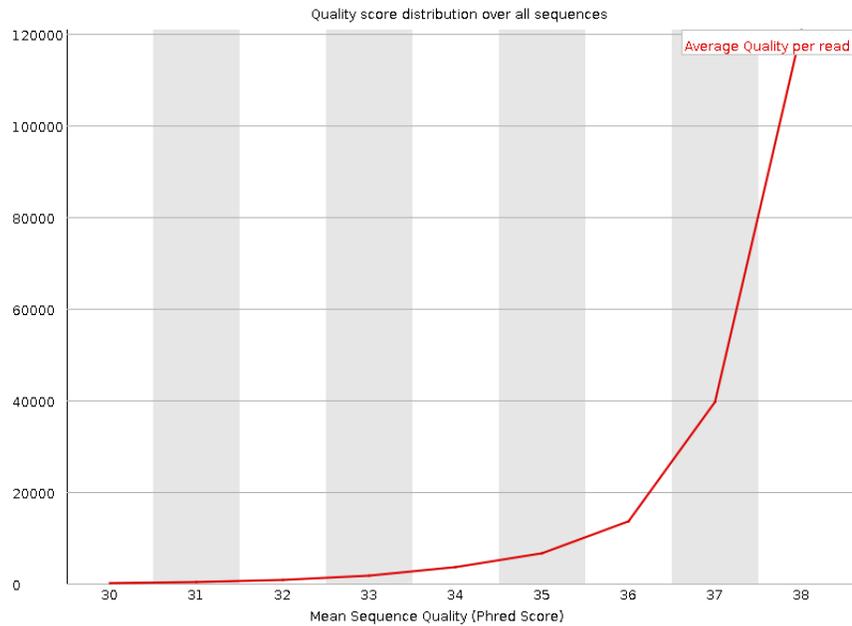


# Gráficos del archivo de las lecturas Forward de la etapa de machos reproductores

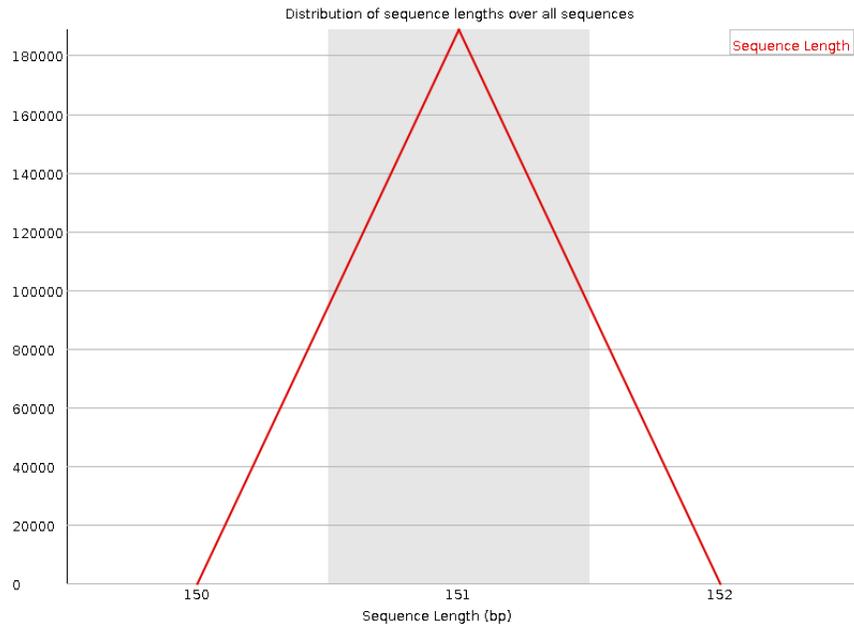
## 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas

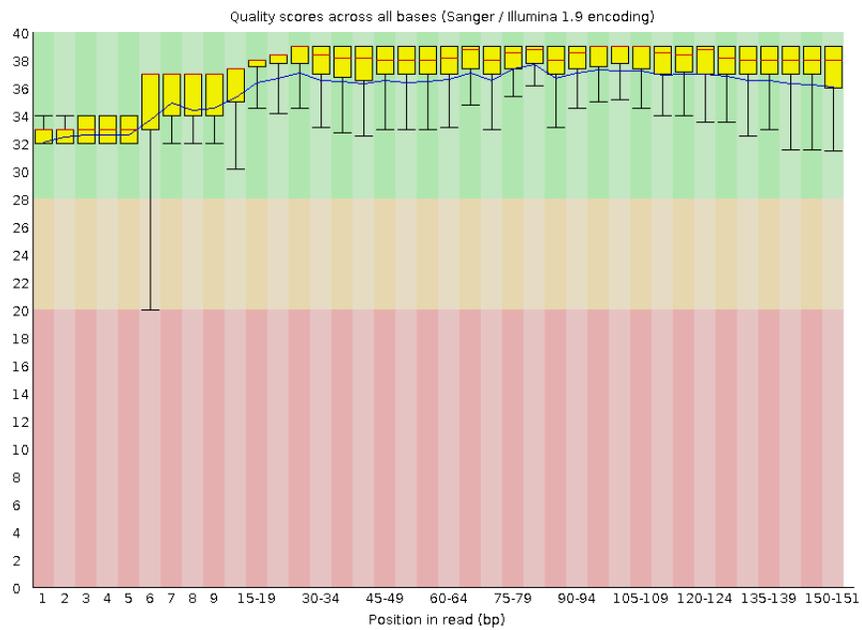


### 3. Tamaño de las lecturas

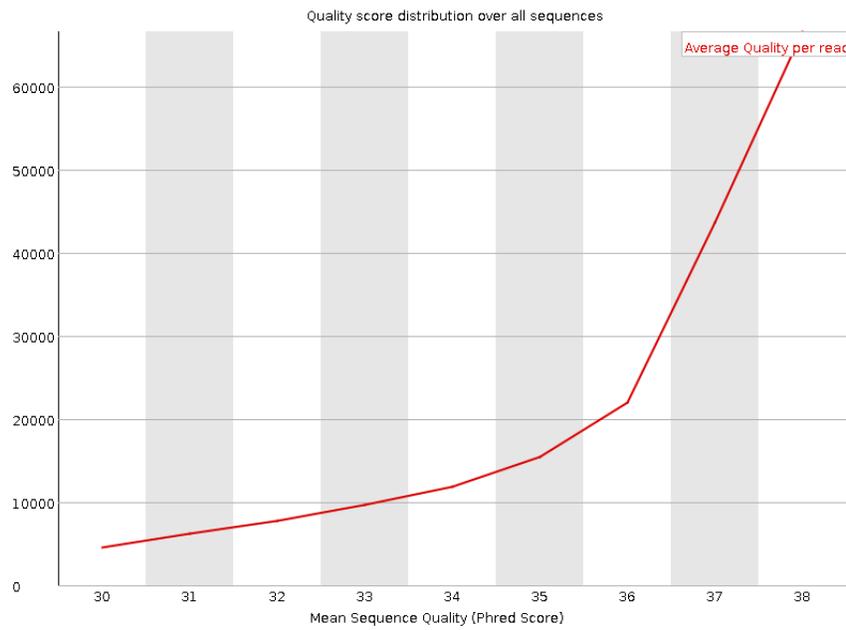


## Gráficos del archivo de las lecturas Reverse de la etapa de machos reproductores

### 1. Calidad de las lecturas a través de cada base



## 2. Calidad promedio de las lecturas



## 3. Tamaño de las lecturas

