

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA
DIARREA EPIDÉMICA PORCINA (vDEP) EN DIFERENTES
ÓRGANOS DE UN GRUPO DE NEONATOS PORCINOS
INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

RAFAEL AGUILAR GUZMÁN

Asesores:

Dra. María Elena Trujillo Ortega

Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la fortaleza otorgada, a mis padres por su apoyo incondicional, a mi hermano por siempre expresarme su sentir, a mis profesores por su guía y amistad y a todos aquellos que de forma directa o indirecta me acompañaron para llevar a buen término este proyecto. Sin su ayuda esto no habría sido posible.

A ti querida Universidad, por darme la oportunidad y los caminos para desarrollarme como persona y como profesional.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

La presente tesis es parte del proyecto PAPIIT #.IN-221218 con título “Análisis diferencial de proteínas expresadas en cultivo celular con diferentes aislados del virus de la Diarrea Epidémica Porcina obtenidos en México y su relación con cambios de antigenicidad”, del cual es responsable la Dra. María Elena Trujillo Ortega.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
POSTULADOS DE KOCH Y POSTULADOS DE EVANS	2
AGENTE ETIOLÓGICO	5
CLASIFICACIÓN	5
GENOMA.....	5
TRANSMISIÓN.....	8
PATOGENIA.....	9
REPLICACIÓN VIRAL EN OTROS TEJIDOS	10
SIGNOLOGÍA Y LESIONES	11
DIAGNÓSTICO.....	12
DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y TIEMPO DE DETECCIÓN	15
PREVENCIÓN Y CONTROL	17
IMPACTO A LARGO PLAZO DE LA DEP	20
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	24
GRUPOS EXPERIMENTALES.....	24
ACLIMATACIÓN DE LOS ANIMALES.....	24
ALIMENTACIÓN.....	25
BIOENSAYO.....	25
EUTANASIA	25
NECROPSIA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	28
MANEJO DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS (RPBI).....	30
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN	30
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TRANSCRIPTASA REVERSA	30
ELECTROFORESIS	33
RT-q-PCR TIEMPO REAL DE MUESTRAS POSITIVAS	34
RESULTADOS.....	35
SIGNOLOGÍA CLÍNICA	35
NECROPSIA.....	37
HISTOPATOLOGÍA	39
DIAGNÓSTICO INTEGRAL.....	44
RT-PCR	44

RT-q-PCR	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS.....	53

RESUMEN

AGUILAR GUZMÁN RAFAEL. Detección y cuantificación del virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP) en diferentes órganos de un grupo de neonatos porcinos inoculados experimentalmente. (Bajo la dirección de: Dra. María Elena Trujillo Ortega y Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva).

Se infectaron por VO 20 lechones (10 Lechones calostrados - Grupo A y 10 Lechones sin calstrar - Grupo B) con 1.5 ml de un inóculo obtenido del aislamiento viral de muestras positivas de pulmón provenientes del brote mexicano de DEP del año 2014 en células VERO (KM044335.1) y positivo por RT-PCR a la región del gen M del vDEP con títulos infecciosos virales de 1×10^8 DICC₅₀%/ml. En el periodo de 24 horas post infección el 20% de ambos grupos presentaron diarrea. Se les aplicó la eutanasia y se les realizó la necropsia. Los hallazgos macroscópicos incluyeron las asas intestinales del yeyuno adelgazadas, dilatadas, con gas y contenido líquido amarillento en su interior, mientras que los hallazgos microscópicos observados fueron atrofia de las vellosidades intestinales del íleon con degeneración vacuolar moderada a severa de los enterocitos, linfangiectasia, escaso infiltrado inflamatorio en la lámina propia y edema en el mesocolon. Usando RT-q-PCR se logró la detección y cuantificación relativa de RNA viral específico del vDEP en el órgano bazo.

En conclusión, el inóculo fue capaz de producir la enfermedad de la DEP, sugiriendo su posible utilidad como método de control para rebrotes futuros evitando el riesgo que el feed back implica.

INTRODUCCIÓN

La Diarrea Epidémica Porcina (DEP) es una enfermedad de etiología viral que afecta a los cerdos en todas las etapas productivas (Ouyang, *et al.*, 2015; Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018), sin embargo, es particularmente importante en lechones menores de una semana de vida debido a que en éstos la mortalidad usualmente alcanza el 100%, mientras que en cerdos destetados es de 1-3% y en cerdos de engorda escasa o nula (Li, *et al.*, 2016).

POSTULADOS DE KOCH Y POSTULADOS DE EVANS

La validación de proyectos que involucran agentes biológicos, ocurre cuando se es capaz de cumplir con las pruebas de causalidad primaria expuestas en los Postulados de Koch y en los Postulados de Evans descritos a continuación:

Postulados de Koch

1. Debe demostrarse que el agente está presente en cada caso de enfermedad en animales de experimentación.
2. El agente no debe encontrarse en casos de otras enfermedades.
3. Una vez aislado el agente, éste debe ser capaz de reproducir la enfermedad en animales de experimentación.
4. El agente debe ser recuperado a partir de la enfermedad experimental inducida.

(Koch, 1882)

Postulados de Evans

1. La prevalencia de la enfermedad debe ser significativamente mayor en los individuos expuestos a la causa putativa que en aquellos no expuestos.
2. La exposición a la causa putativa debe estar presente de manera más común en aquellos individuos enfermos que en los individuos control sin la enfermedad cuando todos los factores de riesgo se mantienen controlados de manera constante.
3. La incidencia de la enfermedad debe ser significativamente mayor en aquellos individuos expuestos a la causa putativa que en aquellos no expuestos como demuestran estudios prospectivos.
4. Temporalmente, la enfermedad debe seguir a la exposición del agente putativo con una distribución normal de los periodos de incubación.
5. Un espectro de respuestas del hospedero debe seguir a la exposición del agente putativo conforme a un gradiente lógico biológico de moderado a severo.
6. Una respuesta medible del hospedero seguida de la exposición al agente putativo debe ocurrir o debe incrementarse en magnitud si está presente antes de la exposición.
7. La reproducción experimental de la enfermedad debe ocurrir con una mayor incidencia en aquellos individuos expuestos apropiadamente al agente putativo que en aquellos que no lo fueron. Esta exposición puede ser deliberada, experimental inducida en laboratorio o demostrada en una exposición natural controlada.

8. La eliminación o la modificación de la causa putativa o del vector que lo porta, debe disminuir la incidencia de la enfermedad.
9. La prevención o la modificación de la respuesta del hospedero tras la exposición con el agente causal, debe disminuir o eliminar la respuesta.
10. Todo debe ser lógico desde el punto de vista biológico y epidemiológico.

(Evans, 1976)

Para el desarrollo de cualquier experimento es necesario el conocimiento de las partes involucradas en el mismo, siendo en este caso, el agente, sus particularidades y los manejos que el Médico Veterinario Zootecnista ejerce para su control.

AGENTE ETIOLÓGICO

CLASIFICACIÓN

El virus de la DEP (vDEP) se cataloga en el Orden de los *Nidovirales*, Familia *Coronaviridae*, Subfamilia *Orthocoronavirinae*, Género *Alphacoronavirus*, Subgénero *Pedacovirus* (International Comitee on Taxonomy of Viruses, 2019).

Este virus envuelto con diámetro de entre 60 y 160 nm (Zimmerman, *et al.*, 2012), está catalogado como coronavirus debido a su morfología semejante a la de una corona, la cual es conferida por las glicoproteínas que presenta en la superficie con forma de pico llamadas “S” (por su traducción del inglés referente a Spike).

Estas glicoproteínas con longitud de entre 12 y 25 nm de largo están involucradas en el reconocimiento y entrada del virus (Ouyang, *et al.*, 2015).

GENOMA

El vDEP presenta un genoma RNA monocatenario y segmentado de cadena positiva con una longitud de 25-30 Kb y la siguiente conformación:

5'-(1a / 1b)-S-ORF3-E-M-N-3'

(Zúñiga, *et al.*, 2016)

- Un gen de la polimerasa, el cual ocupa 2/3 partes del genoma y a su vez se constituye por:
 - ORF1a que codifica para la poliproteína 1a
 - ORF1b que codifica para la poliproteína 1ab
- Cinco regiones no traducidas (UTR's) (por sus siglas y traducción del inglés referentes a UnTranslated Region) en sus extremos 5' y 3'
- Siete marcos abiertos de lectura (ORF's) (por sus siglas y traducción del inglés referentes a Open Reading Frame), de los cuales el ORF3 codifica para una proteína "accesoria" que se especula tiene funciones como factor de virulencia debido a que en virus altamente adaptados a cultivos celulares, se han encontrado alteraciones en su estructura genética (Song & Park, 2012) y del ORF 2 al ORF 6 se codifica para tres proteínas no estructurales y cuatro proteínas estructurales.

Las proteínas estructurales son:

- **"S"** - Espícula:

Es un peplómero tipo 1 de 150-220 kDa constituido por 1,383 aminoácidos (a.a), un péptido de señal de 1-18 a.a., epítomos neutralizantes, un dominio transmembranal de 1334-1356 a.a. y un dominio citoplasmático corto que a su vez se subdivide en S1 de 1-789 a.a. y S2 (también conocido como péptido de fusión) de 790-1383 a.a. según su homología con otros coronavirus (Song & Park, 2012; Ujike & Fumihiko, 2015).

Dado que S permite la infección y es el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes, S se asocia con la atenuación de la virulencia del vDEP *in vivo* y es la principal proteína en que se basa el desarrollo de vacunas (Dong-Kyu, *et al.*, 2010; Song & Park, 2012; Ujike & Fumihito, 2015).

- **“E”** - Envoltura

Es una proteína de 7 kDa que en coexpresión con “M” permite la formación de pseudopartículas exhibidas para la actividad interferogénica similar a la de los viriones completos (Song & Park, 2012; Ujike & Fumihito, 2015).

- **“M”** - Membrana

Es una proteína transmembranal de 20-30 kDa compuesta por un dominio corto amino-terminal en el exterior y un dominio largo carboxi-terminal en el interior.

Esta proteína juega un papel importante en el proceso de ensamblaje del virus al interactuar con “S” y con “N” y con la inmunidad al inducir la producción de IFN- α y anticuerpos neutralizantes que actúan en presencia del complemento (Xiaofeng & Pengchong, 2011; Song & Park, 2012; Ujike & Fumihito, 2015).

- **“N”** - Nucleocápside

Es una fosfoproteína de 58 kDa asociada con la formación de la nucleocápside, con la transcripción del genoma viral al unirse a su RNA y formar una ribonucleoproteína y con la inducción de inmunidad celular.

Además, al ser una proteína conservada, puede usarse como blanco para el diagnóstico temprano de la infección por el vDEP (Xiaofeng & Pengchong, 2011; Song & Park, 2012; Ujike & Fumihiko, 2015).

TRANSMISIÓN

El virus es capaz de infectar de manera directa e indirecta, siendo la manera directa por medio de la ingesta de heces contaminadas y la manera indirecta por medio de fómites contaminados con heces como vehículos (especialmente aquellos empleados en el transporte de los animales), equipo, ropa de trabajo e incluso alimento.

Algunos estudios demostraron una capacidad moderada de detección de RNA del VDEP (23 - 41%) en leche, sugiriendo esta vía como probable ruta de transmisión vertical (Li, *et al.*, 2012; Sun, *et al.*, 2012).

También se sospecha que los productos de sangre de cerdo, como el plasma secado por aspersión, y que se incorporan a las raciones alimentarias de los lechones, constituyen posibles medios de propagación del virus (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018).

Otro posible reservorio, incluye animales adultos portadores del virus que presentan una infección de tipo asintomática y que esparcen el virus de manera subclínica (Jung & Saif, 2015).

PATOGENIA

Una vez que el virus ha ingresado al organismo por vía fecal-oral, la proteína viral “S” mediante su sección S1, interactúa con las proteínas transmembranales glicosiladas de 150 kDa llamada Aminopeptidasa N (APN) (Li, *et al.*, 2007) presentes de manera abundante en las microvellosidades de los enterocitos (Gillespie, *et al.*, 2017) del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) (Li, *et al.*, 2016).

Cuando esta interacción ha sido consolidada, la proteína viral S expone su sección S2, la cual permite la fusión del virión con la membrana celular y la posterior entrada del material genético (M. Knipe & M. Howley, 2007; UniProt Consortium, 2018).

La replicación del vDEP ocurre en el citoplasma celular, donde el ensamblaje de los viriones ocurre rápidamente mediante gemación a través de membranas intracitoplasmáticas (retículo endoplásmico y aparato de Golgi) (Ducatelle, *et al.*, 1981), por lo que es posible encontrarlo desde las 12 a 18 horas post infección alcanzando su máxima replicación entre las 24 y 36 horas (Zimmerman, *et al.*, 2012).

Dada sus propiedades citolíticas, el virus provoca una rápida degeneración de la mitocondria (Ducatelle, *et al.*, 1981), la vacuolización, exfoliación y necrosis de las microvellosidades (Zúñiga, *et al.*, 2016; Li, *et al.*, 2016), disminución de la cantidad de células caliciformes, interrupción de las uniones intercelulares de los

enterocitos e incremento de la permeabilidad gastrointestinal (Kim & Lee, 2014; Jung, et al., 2015; Schweer, *et al.*, 2016; Jung & Saif, 2017).

Debido a que en los neonatos porcinos la tasa de reemplazo de las células intestinales es reducida, se produce una reducción en la relación vellosidad - cripta normal. Pasando de una relación normal de 7:1 a una de hasta 3:1 (Zimmerman, *et al.*, 2012; Niederwerder & Hesse, 2018).

Esto provoca la signología típica de la DEP que suele observarse entre 1 y 4 días post infección (periodo de incubación) (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018), llegando a excretarse por entre 7 y 9 días

REPLICACIÓN VIRAL EN OTROS TEJIDOS

La replicación del virus fuera del intestino permanece como incógnita, pues hasta ahora no se han encontrado antígenos en otras regiones como el píloro, las tonsilas, el bazo, el hígado y los riñones. (Jung & Saif, 2015).

De igual forma, los tejidos pulmonares han comprobado ser negativos a los antígenos del vDEP, lo cual aporta evidencia de la ausencia de replicación viral en el tracto respiratorio bajo (Debouck, *et al.*, 1981; Sueyoshi, *et al.*, 1995; Stevenson, *et al.*, 2013; Jung, *et al.*, 2014), aunque recientemente se reportó la replicación del vDEP en macrófagos pulmonares porcinos *in vitro* e *in vivo*. (Park & Shin, 2014)

SIGNOLOGÍA Y LESIONES

La signología clínica con la que cursan los lechones menores de una semana, incluye diarrea acuosa, que se debe a la disminución de las enzimas digestivas presentes en las microvellosidades de los enterocitos. Entre ellas las disacaridasas (lactasa, sucrasa y maltasa), la leucina APN y la fosfatasa alcalina. También presentan vómito, aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual se produce (Jung & Saif, 2015), anorexia, fiebre y deshidratación. Como consecuencia se produce hipernatremia, hiperkalemia, hipercloremia, hipocalcemia y bajos niveles de bicarbonato en sangre (Coussement , *et al.*, 1982; Jung, *et al.*, 2006), conduciéndolos casi de manera invariable a la muerte. Así se explican las mortalidades del 100% en lechones y del 1 al 3% en cerdos destetados (Li, *et al.*, 2016).

La necropsia suele revelar adelgazamiento de las paredes intestinales y la presencia de leche y gases en su interior.

En animales de las etapas de crecimiento-finalización, la infección es menos severa, por lo que la signología se reduce a vómito, letargia y diarrea moderada con una morbilidad mesurada y una mortalidad cercana al 0% (Li, *et al.*, 2016; Niederwerder & Hesse, 2018).

Finalmente, en cerdos adultos la infección puede incluso no ser aparente debido a una mínima o nula signología gastrointestinal. Sin embargo, en hatos sin contacto previo con el agente se puede llegar a observar letargia e inapetencia (Niederwerder & Hesse, 2018).

DIAGNÓSTICO

La Diarrea Epidémica Porcina debe distinguirse de otras enfermedades gastroentéricas virales como la Gastroenteritis Transmisible (GET) la cual produce lesiones muy similares, el Delta Coronavirus Porcino (PDCov) y el Rotavirus; así como de enfermedades bacterianas provocadas por agentes como *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp., *Lawsonia intracellularis*, entre otras; y enfermedades parasitarias provocadas por agentes como *Isospora suis*, *Cryptosporidium* spp., nematodos, entre otras.

Para dar un diagnóstico definitivo al confirmar la presencia del vDEP en muestras clínicas como heces, intestino, pulmón o contenido gástrico intestinal, las pruebas de laboratorio son necesarias.

La prueba de “oro” para lograr la detección del antígeno, es el aislamiento viral a partir de muestras clínicas en cultivo de células de riñón de mono verde africano (VERO). Sin embargo, debido a que esta técnica exige la suplementación con tripsina, que permite la escisión de la proteína S en sus fracciones S1 y S2 lo que permite la entrada a la célula y la liberación de los viriones (Shirato, *et al.*, 2011; Wicht, *et al.*, 2014), y a la pérdida de virulencia del vDEP conforme se realizan pases ciegos (Kweon, *et al.*, 1997), otras alternativas de diagnóstico son necesarias.

Es por esta razón que para confirmar que una muestra contiene **vDEP con capacidad infectiva, actualmente el bioensayo es el único método determinante**, es decir, inocular animales susceptibles con una muestra

presuntamente positiva esperando que éstos desarrollen la enfermedad (Miller, *et al.*, 2016).

Otras alternativas para la detección del antígeno son: la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (por sus siglas en inglés referentes a Polimerase Chain Reaction) para detectar una sección del templado genómico del vDEP, los Ensayos por Inmunoabsorción Ligada a Enzimas ELISA (por sus siglas en inglés referentes a Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a partir de heces y la Inmunohistoquímica.

De las anteriores, la detección de ácidos nucleicos por medio de la PCR en sangre, fluidos orales y heces, siendo esta última la muestra de elección en fases agudas debido a que usualmente contienen los mayores títulos virales, es la alternativa más usada debido a su alta sensibilidad, alta especificidad y a la rapidez con la que se realiza.

Esta herramienta tiene dos modalidades, la PCR Transcriptasa Reversa RT-PCR (por sus siglas en inglés referentes a Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction) y la PCR Transcriptasa Reversa Tiempo Real RT- q- PCR (por sus siglas en inglés referentes a Reverse Transcription – Quantitive - Polimerase Chain Reaction). Esta última es la más recomendable porque es altamente sensible, presenta un bajo riesgo de contaminación cruzada, tiene un amplio rango dinámico y el potencial para la cuantificación precisa del virus. Mientras que la RT-PCR requiere una ejecución más larga y laboriosa, aunado a que presenta una sensibilidad de 10 a 100 veces menor que la RT-q-PCR y no es capaz de cuantificar la carga viral (Miller, *et al.*, 2016).

Se debe recalcar que con esta herramienta, un resultado positivo no confirma que una muestra contenga virus infectivo o viable (Miller, *et al.*, 2016).

La detección del virus por PCR en el suero entrega resultados variables, pues los lechones y los cerdos recién destetados desarrollan una viremia de baja intensidad durante la infección aguda (Niederwerder & Hesse, 2018), mientras que las cerdas pueden incluso no generar viremia.

Por otro lado, su uso en fluidos orales es de gran utilidad, pues se ha logrado la detección del virus en animales positivos hasta la 4a semana post-infección (Vitosh-Sillman, *et al.*, 2016; Niederwerder, *et al.*, 2016).

Para la detección de anticuerpos se cuenta con pruebas como la ELISA a partir de suero, Inmunofluorescencia, Inmunohistoquímica y neutralización en suero (Zimmerman, *et al.*, 2012; Miller, *et al.*, 2016; Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018).

Estas herramientas son poco útiles en fases agudas de la enfermedad debido a que la producción de anticuerpos tarda al menos 2 semanas tras la infección (Pasick, *et al.*, 2014; Niederwerder, *et al.*, 2016), pero se presentan como una alternativa confiable para la vigilancia de infecciones crónicas, endémicas o recurrentes (Niederwerder & Hesse, 2018).

DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD Y TIEMPO DE DETECCIÓN

Existe gran discrepancia entre la duración clínica de la enfermedad y el intervalo de tiempo en que el virus puede ser detectado en muestras de heces e intestino, pero se sabe que el virus puede ser detectado previamente al desarrollo de la enfermedad clínica y bastante tiempo después del cese de la visualización de la signología clínica (Niederwerder & Hesse, 2018).

Un estudio demostró que en el periodo de incubación, entre el 30 y el 50 % de las células epiteliales absortivas del intestino delgado, son positivas a la detección del virus, lo cual es consistente con la presencia de animales portadores asintomáticos con excreción viral durante la fase aguda de la infección.

De la fase aguda a la intermedia (de 24 a 60 h después de la presentación de signología clínica), se observó que el número de células epiteliales positivas fue de medio a alto número, mientras que en las etapas tardías de la infección (>72 h después de la presentación de signología clínica) un alto número de células epiteliales permanecen positivas, lo que sugiere la reinfección de las células epiteliales en regeneración (Debouck, *et al.*, 1981).

En otro estudio en el que se inocularon cerdos de entre 3 y 4 semanas de edad con el vDEP, los animales sanaron a los 8 días post infección, la excreción viral se detectó hasta el día 28 post infección y el virus en el intestino delgado pudo detectarse hasta 42 días post infección (Niederwerder & Hesse, 2018).

En un esfuerzo por investigar el potencial del vDEP para producir una infección crónica y su transmisión Crawford *et al.*, 2015 diseñaron un estudio en el cual

cerdos centinelas fueron expuestos secuencialmente en intervalos semanales a cerdos infectados con el vDEP. Aunque los animales infectados presentaron excreción intermitente por hasta 42 DPI, los cerdos centinela se infectaron únicamente cuando fueron introducidos entre los días 7 y 14 post infección, lo que sugiere que después de varias semanas de la inoculación, el virus presente en heces e intestino parece no presentar un riesgo de transmisión (Crawford, *et al.*, 2015).

En contraparte, se sugiere considerar a cerdos clínicamente sanos como portadores potenciales tras una exposición, pues se ha reportado persistencia a largo plazo del vDEP en campo (Pijpers, *et al.*, 1993; Park & Lee, 2009). Por ejemplo, Hamblin, en 2017 reportó la detección de cerdos capaces de excretar el virus incluso después de 70 días de haberse infectado, lo que hace que el manejo en campo sea muy complicado (Hamblin, 2017).

PREVENCIÓN Y CONTROL

La similitud en la presentación clínica y en la epidemiología entre el vGET y el vDEP y el deltacoronavirus porcino (DCoVP), que también tiene una presentación enteropatogénica que infecta de manera aguda al intestino delgado provocando también enteritis atrófica, diarrea y vómito, dificulta el diagnóstico y por ende el control de las enfermedades (Saif, *et al.*, 2012; Jung, *et al.*, 2015; Jung & Saif, 2015).

Dado que no existe tratamiento específico para la enfermedad (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018), la prevención y el control se concentran en la aplicación de la bioseguridad estricta y en la detección temprana de la enfermedad.

Las medidas de bioseguridad se basan en prevenir la introducción y propagación del virus, por lo que sus procedimientos hacen especial énfasis en evitar la introducción de cerdos con un estatus sanitario desconocido; controlar el desplazamiento de cerdos, material y personal dentro de la explotación; desinfectar los vehículos y equipos, la adecuada eliminación de los cerdos muertos y del estiércol, así como, en la interrupción del ciclo de transmisión mediante la aplicación de programas “todo dentro-todo fuera” (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018) tomando siempre en cuenta el periodo de excreción, las capacidades de supervivencia y la susceptibilidad del agente.

El periodo de excreción del virus de un animal infectado puede extenderse de 6 hasta 35 días.

Sus capacidades de supervivencia involucran estabilidad a temperaturas entre 4-50°C (Hofmann & Wyler, 1989), supervivencia fuera del huésped por hasta 28 días a 4°C en heces, 7 días a 25°C en alimento seco contaminado con heces, hasta 14 días a 25°C en forrajes húmedos y al menos 28 días a 25°C en alimentos húmedos.

El virus es susceptible a la formalina al 1%, al carbonato de sodio al 4%, a los solventes lípidos como el cloroformo, a los iodóforos en ácido fosfórico 1% y al hidróxido de sodio 2% (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018), así como a los agentes oxidantes (Virkon S), al cloro, a los compuestos fenólicos (One-Stroke Environ, Tek-Trol), al formaldehído, al glutaraldehído, a los detergentes iónicos y no iónicos, a los iodóforos fuertes en ácido fosfórico y al éter (Hofmann & Wyler, 1989; Jung & Saif, 2015).

Otra alternativa para la prevención de un brote es la aplicación de alguno de los 4 tipos de vacunas disponibles: vacunas de subunidades, vacunas inactivadas, vacunas vectorizadas y vacunas atenuadas.

Las vacunas de subunidades y las vacunas inactivadas son efectivas en la producción de inmunidad de manera parcial, por lo que únicamente deben ocuparse como refuerzo en cerdas que ya posean cierta inmunidad. Mientras que las vacunas atenuadas o modificadas por ingeniería genética, son efectivas en la producción de inmunidad a largo plazo, sin embargo, éstas no previenen la

excreción del virus y además existe el riesgo de reversión a patógeno, por lo que como estrategia de prevención han mostrado no ser totalmente efectivas (Ouyang, *et al.*, 2015; Zúñiga, *et al.*, 2016).

Debido a la poca efectividad de las vacunas, el procedimiento estándar para el control de un hato que cursa con un brote de DEP, consiste en exponer a las cerdas reproductoras por VO con inóculos, también llamado “Feed back” o “Licuado”, constituidos por macerados de intestino (Srijangwad, *et al.*, 2017), diarrea y/o contenido gástrico de lechones con signología clínica de la DEP para que éstas desarrollen la enfermedad y, en aproximadamente tres semanas, produzcan anticuerpos (Geiger & Connor, 2013) y sean capaces de proteger a su camada por medio de la inmunidad pasiva presente en el calostro.

Es importante hacer mención, que los resultados obtenidos con este método son altamente variables porque es imposible estandarizar la carga viral proporcionada en cada bolo debido a que el inóculo se produce a partir de animales en diferentes estadios de la enfermedad, además de que su uso supone un alto riesgo sanitario al significar la posible inoculación de otros agentes patológicos (Gillespie, *et al.*, 2017).

Finalmente, se debe hacer notar que la enfermedad no es zoonótica y no supone un riesgo para la salud humana o la seguridad de los alimentos (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018).

IMPACTO A LARGO PLAZO DE LA DEP

La DEP se presenta con mayor frecuencia a finales de otoño y en los primeros meses de invierno cuando las temperaturas son bajas, declinando los casos positivos y las presentaciones clínicas a finales de la primavera, verano e inicios del otoño cuando las temperaturas son más elevadas, de esta manera, se ha encontrado que con bajas temperaturas se puede producir hasta el doble de pérdidas en los hatos infectados en comparación con las épocas más calurosas del año. (Niederwerder & Hesse, 2018).

El impacto en la producción generado por la DEP, se mantiene por varios meses después del brote y para algunos hatos puede prolongarse por más de un año tras la exposición inicial.

Se calcula que en promedio el tiempo para obtener lechones negativos al vDEP es de 29.5 semanas después de un brote y que el tiempo requerido para reestablecer al 100% la producción, medida en número de lechones destetados por semana, es de 21 semanas. También se ha calculado que aproximadamente el 6% de las cerdas no recuperan al 100% su producción, incluso un año después de la exposición. (Goede & Morrison, 2016).

El impacto en la Ganancia Diaria de Peso (GDP) es otra variable a considerar, pues según estudios conducidos por Madson *et al.*, 2014 y Curry *et al.*, 2017, en los que lechones de 3 semanas de vida y cerdos de 5 semanas de edad fueron infectados con el vDEP, la GDP es significativamente menor durante la primera semana post-infección. Después de 6 semanas de experimentación los animales

de 5 semanas de edad mostraron diferencia de 6.5 kg en promedio en comparación con el grupo control. Esto impacta directamente en el tiempo a mercado, pues aunque la GDP se reestablece después de este periodo, no se logra un crecimiento compensatorio aunque el consumo diario de alimento no se modifique (Madson, *et al.*, 2014; Alvarez, *et al.*, 2015; Curry, *et al.*, 2017).

En las cerdas, la GDP puede reducirse hasta la mitad en los primeros 7 días post infección (0.66 kg a 0.35 kg), lo cual se acentúa si existe una co-infección con el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), demostrando así la importancia de las co-infecciones en la patogénesis de ambos agentes (Schweer, *et al.*, 2016).

También los índices de mortalidad se modifican según lo demuestra un estudio conducido por Alvarez, *et al.*, 2015 en el cual los índices de mortalidad de un grupo de cerdos en crecimiento pasan de un promedio de 4.3 - 4.8% a uno de 12.5% posterior a su exposición al vDEP (Alvarez, *et al.*, 2015).

JUSTIFICACIÓN

La DEP es una enfermedad de alto impacto para la porcicultura, debido a que ocasiona mortalidad hasta del 100% de los neonatos porcinos menores a 3 semanas de vida, a que el único método de control y prevención es la inoculación de las cerdas con licuados constituidos por intestinos y contenido intestinal proveniente de lechones infectados (feed back) con la intención de estimular el desarrollo de inmunidad y por consiguiente la protección de los lechones mediante inmunidad pasiva y al riesgo sanitario que implica al desconocer la presencia de otros agentes patógenos en el feed back, es importante la búsqueda de un método capaz de realizar la misma acción sin los impactos sanitarios consecuentes.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue reproducir experimentalmente, mediante la infección por bioensayo, la enfermedad de la DEP a neonatos porcinos de menos de 24 horas de vida con un inóculo obtenido del aislamiento viral de muestras positivas de pulmón provenientes del brote mexicano de DEP del año 2014 en células VERO, así como determinar la carga del vDEP presente en los linfonodos, tonsilas, bazo, intestinos y pulmones por medio de RT-q-PCR.

HIPÓTESIS

La inoculación por bioensayo a un grupo de neonatos porcinos menores de 24 horas de vida con un inóculo de vDEP obtenido de muestras positivas colectadas del brote mexicano en el año 2014, producirá DEP con signología clínica y será posible detectar la presencia del agente y determinar la carga viral presente en linfonodos, tonsilas, bazos, intestinos y pulmones mediante la RT-q-PCR.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el inóculo de vDEP (aislado KM044335.1) es capaz de producir la enfermedad de la DEP con signología clínica a un grupo de neonatos porcinos de menos de 24 horas de vida, así como su detección y cuantificación en diferentes órganos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir el cuadro clínico post infección
- Confirmar la presencia del vDEP en linfonodos, tonsilas, bazos, intestinos y pulmones
- Cuantificar el vDEP en órganos linfonodos, tonsilas, bazos, intestinos y pulmones

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se recibieron 20 neonatos porcinos de menos de 24 horas de vida, sin signología aparente de diarrea, provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) transportados conforme a la NOM-024-ZOO-1995 y a la NOM-051-ZOO-1995 y se alojaron en el aislamiento número 3 del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ).

GRUPOS EXPERIMENTALES

Los 20 neonatos porcinos se dividieron aleatoriamente en dos grupos, aquellos a los cuales se les permitió beber calostro, identificado como Grupo A (Lechones calostrados) y aquellos a los cuales no se les permitió beber calostro, identificado como Grupo B (Lechones No calostrados).

ACLIMATACIÓN DE LOS ANIMALES

Los animales se dejaron descansar por 30 minutos para después ser identificados con crayón de cera del 1 al 10 y colocarlos en cajas plásticas con cama de paja y viruta y un foco incandescente como fuente de calor.

ALIMENTACIÓN

El protocolo de alimentación involucró la administración del suplemento nutricional Vigorol® por vía oral (VO) con una dosis de 2ml y una frecuencia de 2 horas hasta el punto final.

BIOENSAYO

Una vez transcurridas 12 horas de la recepción de los animales, a los dos grupos se les administró por VO 1.5 ml de inóculo obtenido del aislamiento viral de muestras positivas de pulmón provenientes del brote mexicano de DEP del año 2014 en células VERO identificado en el Gen Bank con el número de acceso KM044335.1, en las cuales la propagación fue eficiente mostrando efecto citopático (ECP) caracterizado por la fusión de células infectadas desde el pase 3 y positivo por RT-PCR a la región del gen M y de los cuales se obtuvieron títulos infecciosos virales de 1×10^8 DICC₅₀%/ml después de 10 pases (Becerra Hernández, 2016; Hernández Villegas, 2016).

EUTANASIA

Los animales se monitorearon continuamente en busca de signología característica de DEP, siendo la presentación de signología clínica característica de la DEP (diarrea acuosa), el parámetro para decidir el punto final del experimento y aplicar la eutanasia a los animales bajo el registro número 572 y

aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la FMVZ.

Así, con estricto apego a la NOM-062-ZOO-1999 y la NOM-033-ZOO-1995, se les aplicó la eutanasia a todos los animales 24 horas después de la inoculación, hayan presentado signología o no, en la sala de Necropsias del Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM bajo el siguiente procedimiento:

1. **Tranquilizado:** Se aplicó Sural® (Sedante neuroléptico cuyo principio activo es la Azaperona) con una dosis de 2 mg / Kg de peso por vía intramuscular (IM) (Pisa Agropecuaria, 2017) y se monitoreó la reacción de los animales al reflejo podal y movimiento ocular a los 5, 10 y 15 minutos, considerándolos tranquilizados con la ausencia del reflejo antes descrito, ausencia de movimiento ocular y postura en recumbencia lateral (Das, *et al.*, 2016).
2. **Insensibilización:** Se humedeció completamente la cabeza de los animales, se colocó un insensibilizador eléctrico en “Y” justo detrás de las orejas ajustado a una Intensidad de 1.02 Amperes (A), Frecuencia de 150 Hertz (Hz) y 3,796 Joules (J) y se accionó por 3-5 segundos (Végh, *et al.*, 2017).
3. **Exsanguinación:** Se exsanguinó a los animales por degüello, por medio de corte en el tronco braquiocefálico.

4. **Corroboración de la muerte del animal:** Se comprobó que los animales presentaran los siguientes 5 puntos:

1. Apnea
2. Colapso inmediato
3. Convulsiones tónico-clónicas
4. Ausencia de vocalización
5. Ausencia de movimiento ocular u ojos con rotación superior

(Végh, *et al.*, 2017)

NECROPSIA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se realizó la necropsia con el objetivo de evaluar las lesiones macroscópicas presentes en los animales y obtener muestras para RT-qPCR de los siguientes órganos: linfonodos submandibulares, tonsilas, bazos, pulmones e intestinos. La tonsila, los linfonodos y el bazo se conservaron en medio de transporte Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM por sus siglas en inglés), los pulmones y los intestinos se colocaron por separado en bolsas estériles, se congelaron a $-75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ para después realizar las pruebas moleculares. (Cuadro 1 y Cuadro 2)

Se colectaron muestras de intestino (duodeno, yeyuno, íleon y colon) para su evaluación histológica, las cuales fueron conservadas en formalina al 10% amortiguada a pH de 7.2 y posteriormente procesadas por las técnicas de rutina de inclusión en parafina y tinción de rutina con hematoxilina y eosina. Los tejidos fueron evaluados por microscopia óptica y se tomaron fotomicrografías representativas de lesiones como: atrofia de vellosidades, degeneración vacuolar, infiltrado linfocitario y linfangiectasia.

Cuadro 1. Muestras obtenidas del Grupo A (Lechones calostrados).

Id / Órgano	Linfonodo	Tonsila	Bazo	Pulmón	Intestino	Total
Lechón 1	-	1	1	1	1	4
Lechón 2	-	1	1	1	1	4
Lechón 3	-	1	1	1	1	4
Lechón 4	-	1	1	1	1	4
Lechón 5	1	1	1	1	1	5
Lechón 6	1	1	1	1	1	5
Lechón 7	1	1	1	1	1	5
Lechón 8	1	1	1	1	1	5
Lechón 9	1	1	1	1	1	5
Lechón 10	1	1	1	1	1	5
Total	6	10	10	10	10	46

Cuadro 2. Muestras obtenidas del Grupo B (Lechones No calostrados).

Id / Órgano	Linfonodo	Tonsila	Bazo	Pulmón	Intestino	Total
Lechón 1	1	1	1	1	-	4
Lechón 2	1	1	1	1	1	5
Lechón 3	1	1	1	1	1	5
Lechón 4	1	1	1	1	1	5
Lechón 5	1	1	1	1	1	5
Lechón 6	1	1	1	1	1	5
Lechón 7	1	1	1	1	1	5
Lechón 8	1	1	1	1	1	5
Lechón 9	1	1	1	1	1	5
Lechón 10	-	-	-	-	-	0
Total	9	9	9	9	8	44

MANEJO DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS (RPBI)

Los cadáveres y órganos restantes fueron depositados en bolsas de color amarillo para recolección de RPBI según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 para incinerarse o tratarse.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN

Para la extracción del ARN viral se usó el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN cat No. 74104 y 74106) conforme al protocolo descrito por el fabricante. Posteriormente se cuantificó la cantidad de ARN presente en las muestras (linfonodos submandibulares, tonsilas, bazos, pulmones e intestinos) por medio del Espectrofotómetro NanoDrop™ Lite.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TRANSCRIPTASA REVERSA

Se realizó la RT-PCR punto final con el kit comercial OneStep® (QIAGEN cat. N°. 210212) ajustando a un volumen final de reacción de 10µl (Cuadro 3) con oligonucleótidos dirigidos a la amplificación del gen M reportados por (Li, *et al.*, 2012) (Cuadro 4) en el Termociclador Eppendorf Mastercycler con las condiciones de amplificación presentes en el (Cuadro 5).

Cuadro 3. Protocolo de RT-PCR con el kit comercial OneStep

Reactivo	Proporción (µl)
Inhibidor	0.2
5X	2
dNTP's	0.4
Primers Forward	0.25
Primers Reverse	0.25
H ₂ O DPEC	4.5
Enzima	0.4
RNA	2
Total	10

Fuente: (QIAGEN® cat. N°. 210212).

Cuadro 4. Oligonucleótidos orientados al gen M usados para la RT-PCR punto final.

Oligonucleótidos M	Secuencia 5'-3'	Posición en gen	Tamaño pb
Forward	GGACACATTCTTGGTGGTCT	25,545 – 25,565	370
Reverse	GTTTAGACTAAATGAAGCACTTTC	26,289 – 26,309	

Cuadro 5. Condiciones de temperaturas para la RT-PCR punto final.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (')	No. de ciclos
Pre calentamiento	50	1	1
Retrotranscripción (RT)	50	30	
Inactivación de RT y activación de la Taq polimerasa	95	15	
Desnaturalización	94	2	40
Alineación	55	2	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	10	1

ELECTROFORESIS

Se realizó un gel de agarosa al 2%(Top VisionAgarose, Thermo scientific, cat. N° R0491) con Tris Borato EDTA (TBE) durante 30 minutos a 85-100 V. Para identificar el tamaño de los amplicones se ocupó el marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, cat. N° SM0241) con el buffer de carga 6X (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo scientific, cat. N° R0611).

Para teñirse con bromuro de etidio (Ethidium Bromide UltraPure™, Invitrogen cat. N° 15585011) y visualizarlo en el transiluminador (3UV™ Benchtop Transiluminator UVP).

RT-q-PCR TIEMPO REAL DE MUESTRAS POSITIVAS

Las muestras de órganos que resultaron positivas en la RT-PCR, fueron sujetas a una RT-q-PCR tiempo real para conocer la cantidad de cDNA presente con el kit comercial Vetmax™ PEDV/TGEV/SDCoV kit (applied biosystems cat. N° A33402) ajustando a un volumen final de reacción de 20µl (Cuadro 6) en el Termociclador QuantStudio™ 7 Real-Time PCR System, 96 well 0.1-ml con las condiciones de amplificación presentes en el (Cuadro 7).

Cuadro 6. Protocolo de RT-q-PCR con el kit comercial Vetmax™ PEDV/TGEV/SDCoV kit.

Reactivo	Proporción (µl)
TaqMan ^R Fast Virus 1-Step Master Mix	5.0
Vetmax™ PEDV/TGEV/SDCoV Primer Probe Mix	1.0
Nuclease-Free Water	6.0
Muestra	8.0
Total	20

Fuente: Vetmax™ PEDV/TGEV/SDCoV kit (applied biosystems cat. N° A33402)

Cuadro 7. Condiciones de temperaturas para la RT-q-PCR tiempo real.

Etapa		Temperatura (°C)	Tiempo	No. de ciclos
Retrotranscripción (RT)		48	10 min.	1
Inactivación RT / Desnaturalización inicial		95	10 min.	1
Amplificación	Desnaturalización	95	15 seg.	40
	Alineación / Extensión	60	45 seg.	

RESULTADOS

SIGNOLOGÍA CLÍNICA

La signología clínica detectable por observación se presentó de la siguiente manera:

Grupo A (Lechones Calostrados)

Los neonatos porcinos calostrados número 3 y 5 presentaron diarrea amarillenta 8 y 11 horas post inoculación respectivamente. En ningún caso se registró deshidratación, vómito, inapetencia o muerte (Cuadro 8).

Grupo B (Lechones No calostrados)

Los neonatos porcinos no calostrados número 2 y 3 presentaron diarrea amarillenta 12 y 20 horas posteriores a la inoculación. De manera general se registró meteorismo leve y en ningún caso se registró deshidratación, vómito, inapetencia o muerte (Cuadro 9).

Cuadro 8. Signología observada en el Grupo A (Lechones calostrados).

Id / Signo	Deshidratación	Vómito	Inapetencia	Meteorismo	Diarrea	Total
Lechón 1	-	-	-	-	-	0
Lechón 2	-	-	-	-	-	0
Lechón 3	-	-	-	-	1	1
Lechón 4	-	-	-	-	-	0
Lechón 5	-	-	-	-	1	1
Lechón 6	-	-	-	-	-	0
Lechón 7	-	-	-	-	-	0
Lechón 8	-	-	-	-	-	0
Lechón 9	-	-	-	-	-	0
Lechón 10	-	-	-	-	-	0
Total	0	0	0	0	2	2

Cuadro 9. Signología observada en el Grupo B (Lechones No calostrados).

Id / Signo	Deshidratación	Vómito	Inapetencia	Meteorismo	Diarrea	Total
Lechón 1	-	-	-	-	-	0
Lechón 2	-	-	-	-	1	1
Lechón 3	-	-	-	-	1	1
Lechón 4	-	-	-	-	-	0
Lechón 5	-	-	-	-	-	0
Lechón 6	-	-	-	-	-	0
Lechón 7	-	-	-	-	-	0
Lechón 8	-	-	-	-	-	0
Lechón 9	-	-	-	-	-	0
Lechón 10	-	-	-	-	-	0
Total	0	0	0	0	2	2

NECROPSIA

En los animales del Grupo A (Lechones Calostrados) las asas intestinales a nivel del yeyuno estaban ligeramente dilatadas, adelgazadas y contenían abundante líquido amarillo claro (Figura 1).



Figura 1. Grupo A (Lechones calostrados). El estómago está ligeramente dilatado y las asas intestinales a nivel del yeyuno están dilatadas, adelgazadas y contienen abundante líquido amarillo claro.

En los animales del Grupo B (Lechones No calostrados) las asas intestinales a nivel del yeyuno estaban ligeramente dilatadas, adelgazadas y contenían abundante líquido amarillo. (Figura 2).



Figura 2. Grupo B (Lechones No calostrados). Las asas intestinales a nivel del yeyuno están dilatadas, adelgazadas y contienen abundante líquido amarillo y gas.

HISTOPATOLOGÍA

En el Grupo A (Lechones Calostrados) las vellosidades intestinales del íleon presentaron atrofia leve (Figura 3). Los enterocitos del yeyuno e íleon exhibieron degeneración vacuolar moderada (Figura 4). En la lámina propia había escaso infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas (Figura 5) y los vasos linfáticos estaban ligeramente dilatados (linfangiectasia) (Figura 6). En el colon, el mesocolon estaba expandido debido a edema (Figura 7).

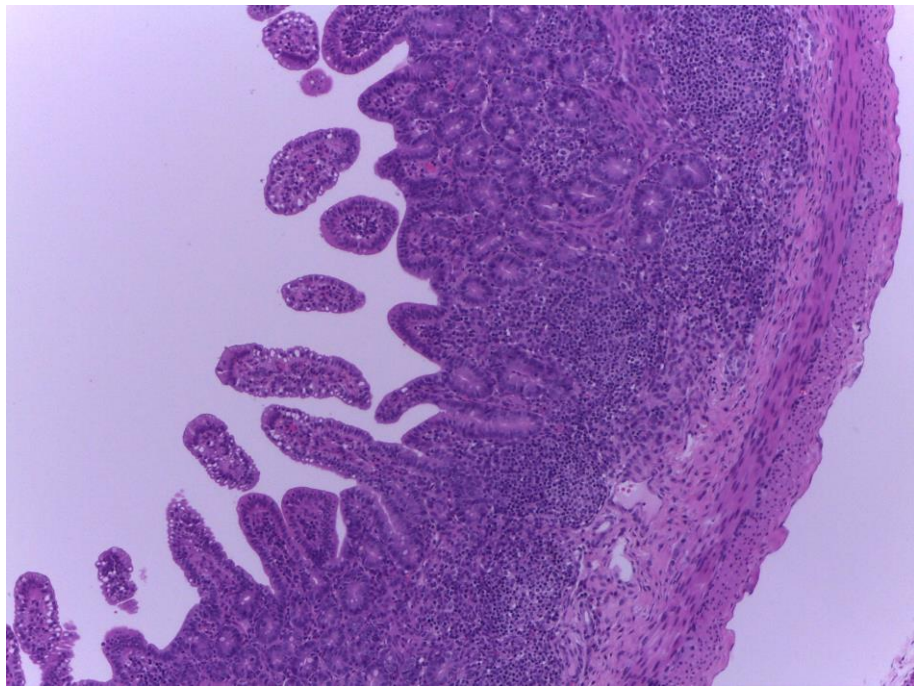


Figura 3. Íleon. Grupo A (Lechones Calostrados). Atrofia de las vellosidades intestinales. Hematoxilina y Eosina (H&E). 10X.

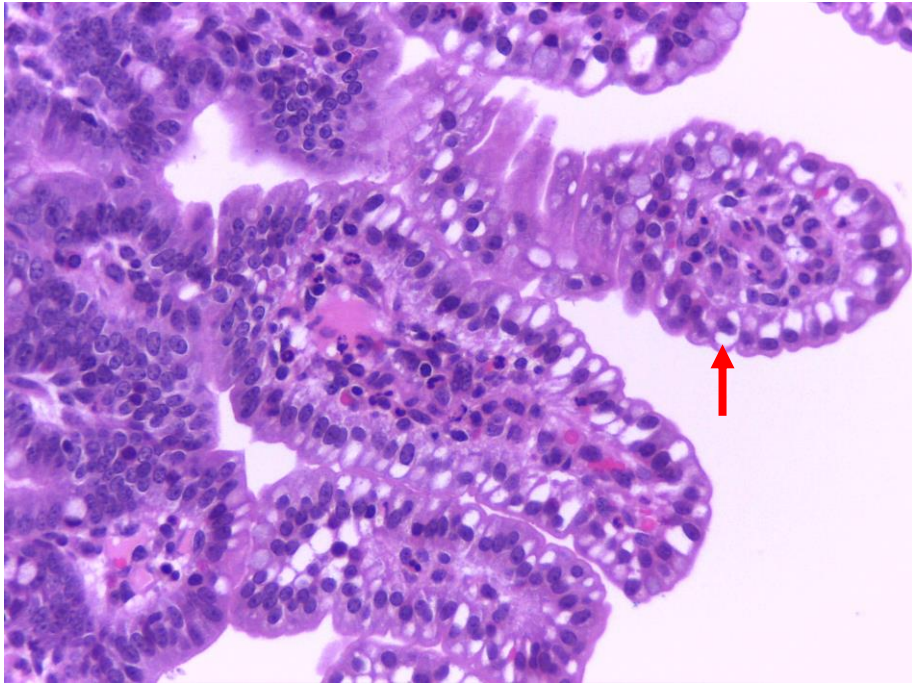


Figura 4. Íleon. Grupo A (Lechones Calostrados). Enterocitos con presencia de vacuolas claras intracitoplasmáticas (degeneración vacuolar) (flecha roja). Presencia de infiltrado inflamatorio en la lámina propia (flecha amarilla). H&E. 10X.

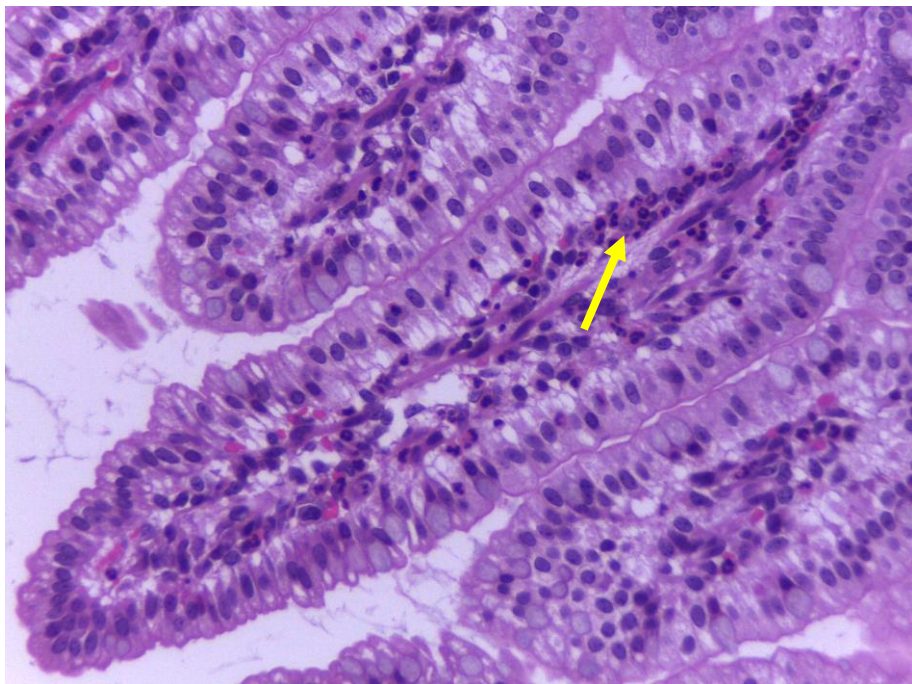


Figura 5. Íleon. Grupo A (Lechones Calostrados). Presencia de infiltrado inflamatorio en la lámina propia (flecha amarilla). H&E. 40X.

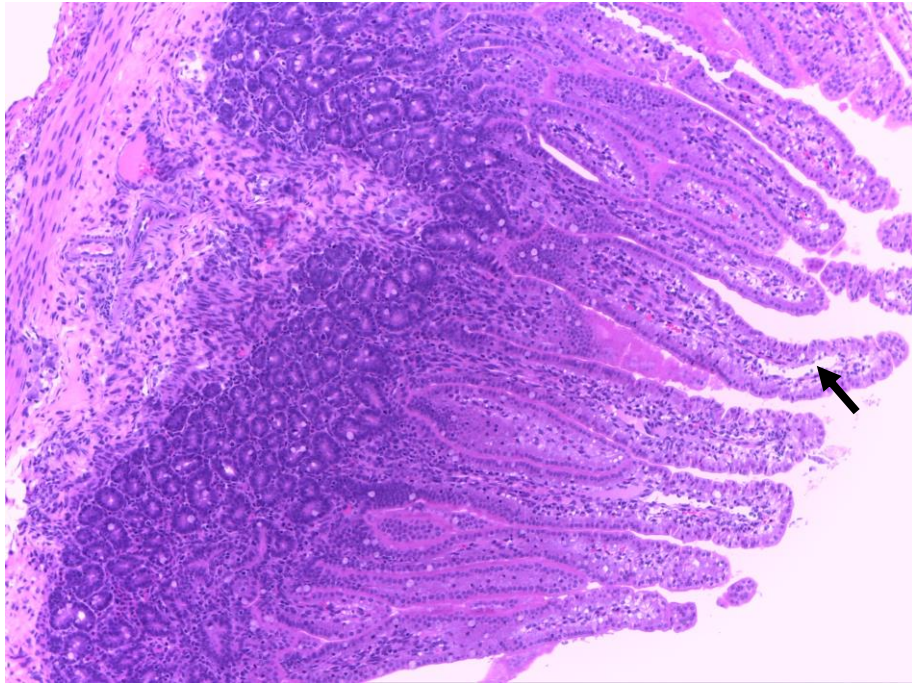


Figura 6. Íleon. Grupo A (Lechones Calostrados). Lámina propia. Vasos linfáticos dilatados (linfangiectasia) (flecha). H&E. 10X.

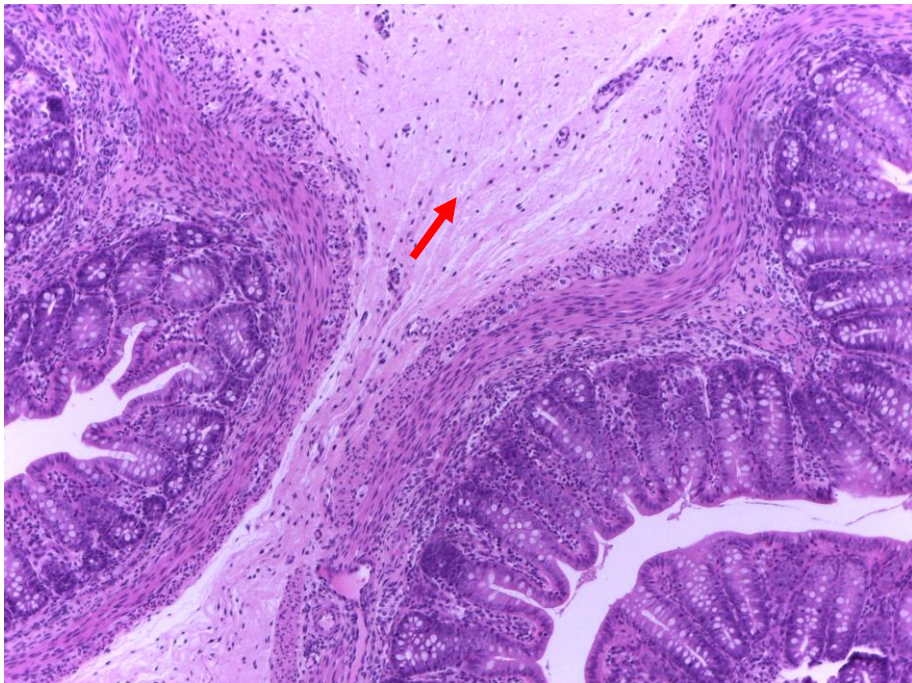


Figura 7. Colon. Grupo A (Lechones Calostrados). El mesocolon está expandido debido a la presencia de edema (flecha amarilla). H&E. 10X.

En el Grupo B (Lechones No calostrados) los enterocitos al nivel del yeyuno presentaron degeneración vacuolar severa (Figura 8). En el colon el mesocolon estaba expandido debido a edema (Figura 9).

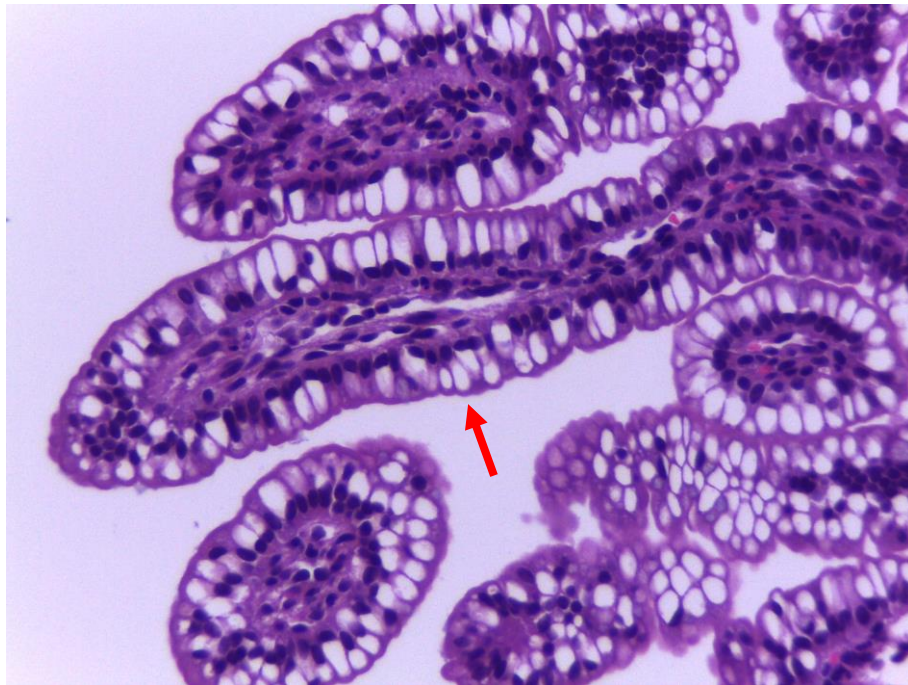


Figura 8. Yeyuno. Grupo B (Lechones No calostrados). Enterocitos con presencia de vacuolas claras intracitoplasmáticas (degeneración vacuolar). H&E. 10X.



Figura 9. Colon. Grupo B (Lechones no calostrados). El mesocolon está expandido debido a la presencia de edema (flecha roja). Los vasos linfáticos están moderadamente dilatados (linfangiectasia) (flecha amarilla). H&E. 10X.

DIAGNÓSTICO INTEGRAL

RT-PCR

Mediante esta técnica se identificaron siete muestras positivas de bazo de los animales 4, 6, 7 y 10 del Grupo A (Lechones Calostrados) (Cuadro 10) y de los animales 5, 6 y 7 del Grupo B (Lechones No calostrados) (Cuadro 11).

Cuadro 10. Órganos positivos a la presencia del vDEP por RT-PCR punto final del Grupo A de (Lechones calostrados).

Grupo A (Lechones calostrados)											
Órgano	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total (+)
Linfonodos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Tonsila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Bazo	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	4
Pulmón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Intestino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total (+)	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	4

Cuadro 11. Órganos positivos a la presencia del vDEP por RT-PCR punto final del Grupo B (Lechones No calostrados).

Grupo B Animales No calostrados											
Órgano	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total (+)
Linfonodos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Tonsila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Bazo	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	3
Pulmón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Intestino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total (+)	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	3

En la fila superior del gel de agarosa se observó la amplificación del gen M a 370 pb en los carriles 4, 5, 6 y 9 correspondientes a los bazos de los animales 4, 6, 7 y 10 del Grupo A (Lechones Calostrados).

Mientras que en la fila inferior del gel de agarosa se observó la amplificación en los carriles 5, 6 y 7 correspondiente a los bazos de los animales 5, 6 y 7 del Grupo B (Lechones No calostrados) (Figura 17).

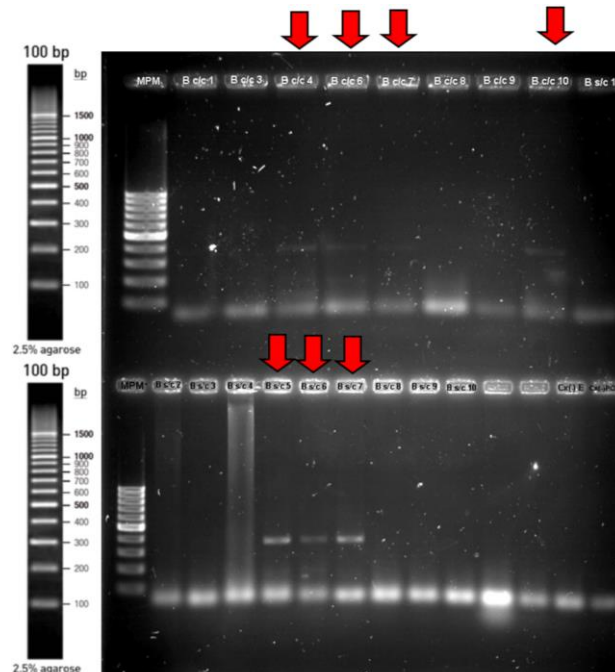
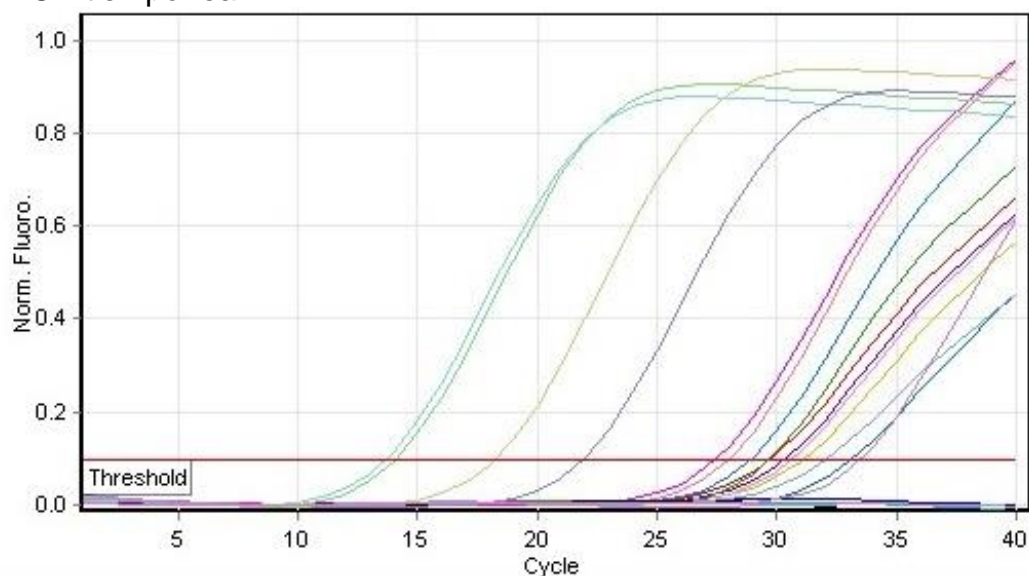


Figura 17. Resultados de la RT-PCR punto final de bazos individuales por grupo correspondientes a la amplificación de un fragmento de 370 pb del gen M. Las muestras positivas corresponden al tamaño esperado. Fila superior (Carril 1: Marcador de Peso Molecular (MPM) de 100 pb, Carril 2: Bazo de Lechón con calostro (B c/c) #1, Carril 3: B c/c #3, Carril 4: B c/c #4, Carril 5: B c/c #6, Carril 6: B c/c #7, Carril 7: B c/c #8, Carril 8: B c/c #9, Carril 9: B c/c #10, Carril 10: Bazo de Lechón sin calostro (B s/c) #1). Fila inferior (Carril 1: MPM de 100 pb, Carril 2: B s/c 2, Carril 3: B s/c 3, Carril 4: B s/c 4, Carril 5: B s/c 5, Carril 6: B s/c 6, Carril 7: B s/c 7, Carril 8: B s/c 8, Carril 9: B s/c 9, Carril 10: B s/c 10, Carril 13: Control negativo de la electroforesis (Cx(-)E), Carril 14: Control negativo de la PCR (Cx(-)PCR)).

RT-q-PCR

Los resultados obtenidos mediante la RT-q-PCR semicuantitativa del cDNA viral específico para GET, DEP y DCoV el vDEP en los bazos según los Ciclos Umbrales (CT por sus siglas en inglés que hacen referencia a Cycle Threshold) obtenidos (Figura 18 y Cuadro 12).

Figura 18. Gráfica de curvas de amplificación de las muestras de bazos por RT-q-PCR tiempo real de datos de la presencia de ARN del vDEP por ciclo mediante RT-q-PCR tiempo real.



Cuadro 12. Ct's de los Bazos positivos a la presencia de ARN del vDEP por RT-q-PCR.

Animal	Ct
Bazo del lechón c/c 4	(5) 29.71
Bazo del lechón c/c 6	(7) 31.09
Bazo del lechón c/c 7	(6) 30.33
Bazo del lechón c/c 10	(3) 28.92
Bazo del lechón s/c 5	(2) 28.01
Bazo del lechón s/c 6	(4) 29.69
Bazo del lechón s/c 7	(1) 27.45

DISCUSIÓN

Los 1.5 ml de un inóculo obtenido del aislamiento viral de muestras positivas de pulmón provenientes del brote mexicano de DEP del año 2014 en células VERO (KM044335.1) y positivo por RT-PCR a la región del gen M del vDEP con títulos infecciosos virales de 1×10^8 DICC₅₀%/ml (Becerra Hernández, 2016; Hernández Villegas, 2016) administrado en este estudio por VO, fue capaz de producir signología clínica (diarrea amarillenta) en los neonatos porcinos número 3 y 5 correspondientes al Grupo A (Lechones Calostrados) 8 y 11 horas post inoculación respectivamente y en los neonatos porcinos número 2 y 3 del Grupo B (Lechones No calostrados) 12 y 20 horas PI respectivamente y lesiones macróscopicas (asas intestinales adelgazadas y dilatadas debido a la presencia de gas y contenido líquido amarillento en el interior) propias del vDEP.

Esto concuerda con lo reportado por los grupos de investigación de E. Pillatzki, *et al.*, 2015, Niederwerder, *et al.*, 2016, quienes lograron reproducir la enfermedad de la DEP, pero con algunas diferencias metodológicas en las edades de los animales inoculados, títulos virales de los inóculos, vías de infección y periodos de contacto con el virus (E. Pillatzki, *et al.*, 2015; Niederwerder, *et al.*, 2016).

E. Pillatzki, *et al.*, 2015 reportaron el desarrollo de signología propia de la DEP hasta el 3er DPI en el 100% de neonatos porcinos con 5 días de vida tras inocularlos por VO por 7 días consecutivos con alimento contaminado experimentalmente con un aislado de cultivo celular de vDEP (USA/NC/2013/35140 P3) con títulos infecciosos virales de 4×10^5 DICC₅₀%/ml. Por su parte Niederwerder, *et al.*, 2016 reportaron que el 100% de los animales de

4 semanas de vida inoculados experimentalmente por VO y por vía intranasal con 5 ml de un inóculo (USA/KS/2013, Gen Bank KJ184549.1) con títulos infecciosos virales de 1.42×10^5 DICC₅₀%/ml presentaron signología en un periodo de entre 3 y 8 DPI, en comparación con este estudio donde la presencia de signología con mayor prontitud puede deberse a la administración de un inóculo con título superior, a la posible susceptibilidad de los sujetos experimentales de ambos grupos (Lechones calostrados y Lechones No calostrados) y a la diferencia de entre 4 y 27 días de vida (E. Pillatzki, *et al.*, 2015; Niederwerder, *et al.*, 2016).

La susceptibilidad de los lechones puede deberse a que (aunque los lechones provinieron de una granja que fue positiva a DEP en el año 2014) la protección inmunológica que las cerdas desarrollaron para el agente había disminuido o desaparecido para el momento que se realizó este estudio, por lo que fueron incapaces de proteger a sus lechones por inmunidad pasiva vía calostro.

Por otro lado, la razón por la que los lechones no murieron dentro de las 24 horas posteriores a la infección y previo a la eutanasia, aun cuando desarrollaron signología correspondiente a coronavirus, puede deberse a que el suplemento alimenticio (Vigorol) administrado cada dos horas, contiene una alta cantidad de vehículo líquido, lo cual pudo haber aliviado la severa deshidratación con la cual cursan los animales en el desarrollo de la enfermedad.

Las lesiones observadas durante la necropsia (asas intestinales adelgazadas y dilatadas debido a la presencia de gas y contenido líquido amarillento en el interior) concuerdan con lo reportado por E. Pillatzki, *et al.*, 2015 en los animales eutanizados al 7° DPI, a diferencia de lo observado por Niederwerder, *et al.*, 2016

quien reportó no haber encontrado lesión alguna en los animales eutanizados entre 4, 7 y 28 DPI (E. Pillatzki, *et al.*, 2015; Niederwerder, *et al.*, 2016).

Los estudios histológicos revelaron que los animales del Grupo A (Lechones calostrados) exhibieron degeneración vacuolar moderada en los enterocitos del yeyuno e íleon y atrofia leve de las vellosidades intestinales del íleon. En la lámina presentaron escaso infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas y los vasos linfáticos estaban ligeramente dilatados (linfangiectasia) En el colon, el mesocolon estaba expandido debido a edema.

En el Grupo B (Lechones No calostrados) los enterocitos al nivel del yeyuno presentaron degeneración vacuolar severa y el mesocolon expandido debido a edema.

Esto coincide una vez más con lo obtenido por E. Pillatzki, *et al.*, 2015 quien logró identificar atrofia de las vellosidades intestinales de leve a moderada, en el íleon y diverge con Niederwerder, *et al.*, 2016 quién reportó fusión y atrofia difusa de moderada a severa de las vellosidades en el yeyuno e íleon de dos animales eutanizados cuatro y siete DPI respectivamente, así como atrofia de leve a moderada de las vellosidades en el yeyuno e íleon de un animal eutanizado 28 DPI (E. Pillatzki, *et al.*, 2015; Niederwerder, *et al.*, 2016).

Los resultados de las pruebas moleculares por la PCR a los linfonodos, tonsilas, bazos, pulmones e intestinos de ambos grupos experimentales, únicamente 7 muestras de 46 posibles resultaron positivas a la presencia de ácidos nucleicos RNA del vDEP, siendo estas las correspondientes a los bazos de los animales 4,

6, 7 y 10 del Grupo A (Lechones Calostrados) y 5, 6 y 7 del Grupo B (Lechones No calostrados) con Ct's entre 28 y 31. Estos resultados divergen con lo observado por Niederwerder, *et al.*, 2016, quienes reportaron haber encontrado ARN viral correspondiente al vDEP en cornetes nasales, tonsilas, timo, linfonodos e intestinos además del bazo en algunos animales de sus grupos experimentales (Niederwerder, *et al.*, 2016).

Las causas de las inconsistencias pueden deberse a algunos elementos como que la sección de las muestras usadas para realizar la prueba molecular no presentaran células infectadas, al almacenamiento por un periodo largo de tiempo de las muestras, lo cual pudo haber reducido o eliminado la infectividad del vDEP detectable por PCR o a la interacción de todas.

CONCLUSIONES

La inoculación de lechones susceptibles menores de 24 horas de vida por VO con 1.5 ml de un inóculo obtenido del aislamiento viral de muestras positivas de pulmón provenientes del brote mexicano de DEP del año 2014 en células VERO (KM044335.1) y positivo por RT-PCR a la región del gen M del vDEP con títulos infecciosos virales de 1×10^8 DICC₅₀%/ml fue capaz de producir la enfermedad de la DEP con la signología y lesiones propias del agente 24 horas PI y fue detectable en los órganos bazo por medio de RT-q-PCR.

La presentación de signología dentro de las 24 horas post infección fue similar en ambos grupos, incluyendo diarrea y deshidratación, por lo que se puede inferir que la inmunidad de la granja había desaparecido, aunque no se comprobó.

El inóculo fue capaz de producir la enfermedad de la DEP, sugiriendo su posible utilidad como método de control para rebrotes futuros evitando el riesgo que el feed back produce.

Estudios posteriores son requeridos para responder cómo se modifican los resultados con variaciones en los volúmenes administrados, dosis infectantes, tiempo de infección y la presencia de anticuerpos específicos contra el vDEP en las cerdas reproductoras y en el calostro.

REFERENCIAS

1. Alvarez, J., Sarradell, J., Morrison, R. & Pérez, A., 2015. Impact of porcine epidemic diarrhea on performance of growing pigs. *PLoS ONE*, Issue 10.
2. Becerra Hernández, J. F., 2016. *Aislamiento del virus de la diarrea epidémica porcina en cultivo celular*, Ciudad de México: Tesis que para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista.
3. Chen, Q. y otros, 2015. Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. *Virology*, Issue 482, pp. 51-59.
4. Coussement , W., Ducatelle, R., Debouck, P. & Hoorens, J., 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and Histochemical study.. *Veterinary Pathology*, Issue 19, pp. 46-56.
5. Crawford, K. y otros, 2015. Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. *Veterinary Research*, Issue 46, p. 19.
6. Crawford, K. y otros, 2016. Status of vaccines for porcine epidemic diarrhea virus in the United States and Canada. *Virus Research*, Issue 226, pp. 108-116.

7. Curry, S. M. y otros, 2017. Nursery pig growth performance and tissue accretion modulation due to porcine epidemic diarrhea virus or porcine delta coronavirus challenge. *Journal of animal science*, Issue 95, pp. 173-181.
8. Das, G. y otros, 2016. Effects of general anesthesia with ketamine in combination with the neuroleptic sedatives xylazine or azaperone on plasma metabolites and hormones in pigs. *Journal of Animal Science*, Issue 94, pp. 3229-3239.
9. Debouck, P., Pensaert, M. & Coussement, W., 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs experimentally induced by the coronavirus-like agent Cv 777. *Veterinary Microbiology*, Issue 6, pp. 157-165.
10. Dong-Kyu, L., Choi-Kyu, P., Seong-Hee, K. & Changhee, L., 2010. Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Research*, Volumen 149, pp. 175-182.
11. Ducatelle, R., Coussement, W., Debouck, P. & Hoorens, J., 1981. In vivo morphogenesis of a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Archives of Virology*, Issue 68, pp. 35-44.
12. E. Pillatzki, A. y otros, 2015. Experimental inoculation of neonatal piglets with feed naturally inoculated with porcine epidemic diarrhea virus. *Journal of Swine Health and Production*, 23(6), pp. 317-320.
13. Evans, A. S., 1976. Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisted. *THE YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*, Issue 49, pp. 175-195.

14. Geiger, J. O. & Connor, J. M., 2013. *Porcine Epidemic Diarrhea, Diagnosis, and Elimination.* [En línea] Available at: <https://www.aasv.org/aasv%20website/Resources/Diseases/PorcineEpidemicDiarrhea.php>
15. Gillespie, T. y otros, 2017. Effect of Booster Vaccination with Inactivated Porcine Epidemic Diarrhea Virus on Neutralizing Antibody Response in Mammary Secretions. *Viral Immunology*, 00(00), pp. 1-7.
16. Goede, D. & Morrison, R. B., 2016. Production impact & time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Preventive Veterinary Medicine*, Issue 123, pp. 202-207.
17. Hamblin, J., 2017. *Previously Infected Pigs Spread PED Longer Than Previously Thought.* [En línea] Available at: <https://www.aasv.org/news/story.php?id=10384>
18. Hernández Villegas, E. N., 2016. *Estandarización de la técnica de RT-PCR para el diagnóstico de la diarrea epidémica porcina y su evaluación en muestras clínicas obtenidas en un brote de diarrea en una granja porcina de ciclo completo*, Ciudad de México: Tesis que para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista.
19. Hofmann, M. & Wyler, R., 1989. Quantation, Biological and Pysycochemical Properties of Cell Culture-adapted Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus (PEDV). *Veterinary Microbiology*, Issue 20, pp. 131-142.

20. International Comitee on Taxonomy of Viruses, 2019. *International Comitee on Taxonomy of Viruses ICTV*. [En línea] Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [Último acceso: 19 marzo 2019].
21. Jaramillo Arango, C. J. & Martínez Maya, J. J., 2010. *Epidemiología veterinaria*. 1a ed. México: El Manual Moderno.
22. Jung, K., Ahn, K. & Chae, C., 2006. Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Research in Veterinary Science*, Issue 81, pp. 310-315.
23. Jung, K. y otros, 2014. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerging infectious diseases*, Issue 20, pp. 662-665.
24. Jung, K. y otros, 2015. Structural alteration of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary microbiology*, Issue 177, pp. 373-378.
25. Jung, K. y otros, 2015. Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs. *Emerging Infectious Diseases*, Issue 21.
26. Jung, K. & Saif, L. J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal*, Issue 204, pp. 134-143.

27. Jung, K. & Saif, L. J., 2017. Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Research in veterinary science*, Issue 110, pp. 12-15.
28. Kim, Y. & Lee, C., 2014. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology*, Issue 460-461, pp. 180-193.
29. Koch, R., 1882. Die Ätiology der Tuberkulose. *Berliner Klinischen Wochenschrift*, 10 abril, Issue 15, pp. 221-230.
30. Kweon, C. -. H., Lee, J. -. G., Han, M. -. G. & Kang, Y. -. B., 1997. Rapid Diagnosis of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. Sci*, 59(3), pp. 231-232.
31. Li, B. X., Ge, J. W. & Li, J. Y., 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for de PEDV coronavirus. *Virology*, Issue 365, pp. 166-172.
32. Li, W. y otros, 2012. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, Issue 18, pp. 1350-1353.
33. Li, W. y otros, 2016. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Research*, Volumen 226, pp. 117-127.
34. M. Knipe, D. & M. Howley, P., 2007. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: LIPPINCOT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER BUSINESS.

35. Madson, D. M. y otros, 2014. Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. *Veterinary microbiology*, Issue 174, pp. 60-68.
36. Miller, L. C. y otros, 2016. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction assays for Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) to assess PEDV transmission in growing pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(1), pp. 20-29.
37. Niederwerder, M. C. & Hesse, A. R., 2018. Swine enteric coronavirus disease: A review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada. *Transboundary and Emerging Diseases*, Issue 65, pp. 660-675.
38. Niederwerder, M. C. y otros, 2016. Tissue localization, shedding, virus carriage, antibody response, and aerosol transmission of Porcine epidemic diarrhea virus following inoculation of 4-week-old feeder pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, Issue 28, pp. 671-678.
39. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018. OIE. [En línea] Available at: <https://www.oie.int/doc/ged/D13925.PDF> [Último acceso: octubre 2018].
40. Ouyang, K. y otros, 2015. Evaluation of humoral immune status in porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infected sows under field conditions. *Veterinary Research*, 46(140).

41. Park, C. & Lee, C., 2009. Clinical examination and control measures in a commercial pig farm persistently infected with porcine epidemic diarrhea (PED) virus. *Journal of Veterinary Clinics*, Issue 26, pp. 463-466.
42. Park, J. E. & Shin, H. J., 2014. Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages. *Virus Research*, Issue 191, pp. 143-152.
43. Pasick, J. y otros, 2014. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreak of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Transboundary and Emerging Diseases*, Issue 61, pp. 397-410.
44. Pijpers, A., van Nieuwstadt, A. P., Terpstra, C. & Verheijden, J. H., 1993. Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *The Veterinary record*, Issue 132, pp. 129-131.
45. Pisa Agropecuaria, 2017. [En línea] Available at: <http://pisaagropecuaria.com.mx/producto/procina/> [Último acceso: 31 octubre 2017].
46. Saif, L. J. y otros, 2012. Coronaviruses. En: I. S. University, ed. *Diseases of Swine*. 10 ed. IA, USA: Wiley-Blackwell, pp. 501-524.
47. Schweer, W. P. y otros, 2016. The effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine epidemic diarrhea virus challenge

- on growing pigs I: Growth performance and digestibility. *Journal of animal science*, Issue 94, pp. 514-522.
48. Schweer, W. P. y otros, 2016. The effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine epidemic diarrhea virus challenge on growing pigs II: Intestinal integrity and function. *Journal of animal science*, Issue 94, pp. 523-532.
49. Shirato, K., Matsuyama, S., Ujike, M. & Taguchi, F., 2011. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *Journal of Virology*, Issue 85, pp. 7872-7880.
50. Song, D. & Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, Volumen 44, pp. 167-175.
51. Srijangwad, A. y otros, 2017. Immune response of gilts to single and double infection with porcine epidemic diarrhea virus. *Arch Virol*, Issue 162, pp. 2029-2034.
52. Stevenson, G. W. y otros, 2013. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: Clinical signs, lesiones, and viral genomic sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Issue 25, pp. 649-654.
53. Sueyoshi, M. y otros, 1995. A immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea. *Journal of Comparative Pathology*, Issue 113, pp. 59-67.

54. Sun, R. Q. y otros, 2012. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerging Infectious Diseases*, Issue 18, pp. 161-163.
55. Ujike, M. & Fumihito, T., 2015. Incorporation of Spike and Membrane Glycoproteins into Coronavirus Virions. *Viruses*, 7(4), pp. 1700-1725.
56. UniProt Consortium, 2018. *UniProt*. [En línea] Available at: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q91AV1> [Último acceso: 25 septiembre 2018].
57. Végh, Á., Abonyi-Tóth, Z. & Rafai, P., 2017. Effect of current intensity and duration on the effectiveness of head-only electrical stunning in pigs under commercial conditions. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1(65), pp. 13-28.
58. Vitosh-Sillman, S. y otros, 2016. Experimental infection of conventional nursing pigs and their dams with Porcine deltacoronavirus. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, Issue 28, pp. 486-497.
59. Wicht, O. y otros, 2014. Proteolytic Activation of the Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Spike Fusion Protein by Trypsin in Cell Culture. *Journal of Virology*, Issue 88 (14), pp. 7952-7961.
60. Xiaofeng, R. & Pengchong, L., 2011. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal. *Virus Genes*, Volumen 42, pp. 229-235.
61. Zimmerman, J. J. y otros, 2012. *Disease of Swine*. 10 ed. Iowa: Wiley-Blackwell.

62. Zúñiga, S. y otros, 2016. Virulence factors in porcine coronaviruses and vaccine design. *Virus Research*, Issue 226, pp. 142-151.