

# IDENTIFICACIÓN DE CEPAS VARIANTES Y VIRULENTAS DEL VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL

Lara-Romero R<sup>1\*</sup>, Gómez-Núñez L<sup>2</sup>, Martínez-Lara AC<sup>2</sup>, Diosdado-Vargas F<sup>2</sup>, Sanabria-Valle L<sup>3</sup>, Rivera-Benítez JF<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM; <sup>2</sup> CENID-MA, INIFAP, <sup>3</sup>UPIBI-IPN.

e-mail: [rivera.francisco@inifap.gob.mx](mailto:rivera.francisco@inifap.gob.mx).

**Palabras clave:** virus de la diarrea epidémica porcina, RT-PCR en tiempo real, diferenciación.

## Introducción

El virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP) pertenece al género *Alfacoronavirus*, provoca problemas entéricos severos y su importancia radica en las grandes pérdidas económicas relacionadas a la mortalidad en lechones. Los signos clínicos que caracterizan la enfermedad son vómito, diarrea acuosa y pérdida de peso en todas las etapas productivas, sin embargo, en lechones la mortalidad alcanza hasta un 100%. En México, a principios de julio del 2013, varios veterinarios dedicados a la clínica porcina identificaron brotes sugerentes de la infección entérica causada por el vDEP, confirmando su presencia de forma oficial en mayo de 2014.<sup>1,2</sup> El objetivo de este estudio fue adaptar un ensayo molecular que permita identificar las cepas variantes y virulentas del vDEP.

## Materiales y métodos

Se seleccionaron 46 muestras de campo, de las cuales 11 correspondían a diarrea y 35 a intestino delgado (ID) de lechones afectados por un cuadro sugerente de vDEP en cinco estados de Michoacán (n=8), Sonora (n=7), Jalisco (n=10), Veracruz (n=8), Guanajuato (n=1) y Puebla (n=12). Conjuntamente se analizaron seis muestras de ID e hisopados rectales (HR), obtenidas en dos infecciones experimentales realizadas con una cepa variante y una virulenta del vDEP. El ARN de las muestras fue obtenido mediante el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN), de acuerdo al protocolo del fabricante. Se sintetizaron un par oligonucleótidos específicos de la región S1 del gen *s* del vDEP y dos sondas de hidrólisis específicas para diferenciar cepas virulentas y cepas variantes, de acuerdo a lo descrito por Wang y Colaboradores en el 2014.<sup>3</sup> Se realizó una RT-PCR en tiempo real, utilizando el kit 2X QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix (QIAGEN) con las condiciones de amplificación de 50°C 20min; 95°C 15min; y 45 ciclos de 95°C 45s y 55°C 45s.

## Resultados

De los cinco estados evaluados en el presente trabajo se detectó la circulación de la cepa virulenta del vDEP en los estados de Sonora, Jalisco y Puebla; mientras que en los estados de Michoacán y Veracruz los cuadros clínicos fueron asociados a la cepa variante. De las muestras de ID, el 83% resultaron positivas para la detección de un fragmento del gen *s* del vDEP, mientras que para las muestras de diarrea el 82% fueron positivas. Se logró la identificación de coinfecciones por cepas virulentas y variantes del vDEP, en muestras de diarrea como de ID. En cuanto a las infecciones experimentales, se logró replicar el cuadro clínico en lechones de dos días de edad para ambas cepas, logrando la detección del ARN viral en el 100% de las muestras.

## Discusión y conclusiones

Esta prueba de RT-PCR en tiempo real nos permitió identificar de manera rápida, específica y sensible la presencia de ARN del vDEP. La prueba mostró gran versatilidad independientemente del origen de las muestras, hisopados rectales, heces y órganos de procedencia experimental o de casos clínicos. Esta prueba puede ser usada para el diagnóstico del virus de la diarrea epidémica porcina en la República Mexicana, aunado a esto, brinda la oportunidad de clasificar cepas virulentas y variantes, que pudiera conducir al estudio de mutaciones o deleciones asociadas a la disminución de la patogenicidad, con la intención de obtener cepas candidatas para la elaboración de biológicos para la prevención y el control de la enfermedad en el territorio nacional.

## Referencias

1. Li, W., *et al.* 2012. *Emerg Infect Dis*, 18: 1350.
2. Wang, L., *et al.* 2014. *Emerg Infect Dis*, 20(5), 917.
3. Wang, L., *et al.* 2014. *J Virol Meth*, 207, 154-157.

Estudio financiado por CONACYT PDCPN2014-01. No. 249177 (SIGI: 15481533550)