

# PRIMER REPORTE DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE DIARREA EPIDÉMICA PORCINA EN ECUADOR

Garrido, Ana<sup>a\*</sup>; Barrera, Maritza<sup>a\*</sup>; Vaca, María<sup>a</sup>; Acosta, Alfredo<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Biología Molecular. Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro – Agrocalidad, Av. Interoceánica Km. 14<sup>1/2</sup>, La Granja MAGAP, Tumbaco, Ecuador.

<sup>b</sup>Dirección de Sanidad Animal. Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro – Agrocalidad, Av. Interoceánica Km. 14<sup>1/2</sup>, La Granja MAGAP, Tumbaco, Ecuador.

<sup>c</sup>SENESCYT, Secretaría Nacional de Educación Ciencia y Tecnología / Proyecto Prometeo, ECUADOR.

Ingresado: 30/04/2015

Aceptado: 06/08/2015

## Resumen

El virus de la diarrea epidémica porcina (DEP) es coronavirus que produce diarreas y vómitos con alta mortalidad, en Ecuador nunca antes había sido informado el diagnóstico de esta enfermedad. En el año 2014 se produjo un brote de diarrea en cerdos de la provincia Cotopaxi con las características clínico-epidemiológicas de DEP. Se presentan los resultados de la confirmación por RT-PCR de la presencia de ARN del virus DEP en las muestras de intestino y heces de cerdos enfermos y la obtención de la secuencia nucleotídica de un fragmento de 627 nucleótidos del gen S del aislado, que fue llamado DEP Cotopaxi 2014, esta secuencia tuvo una identidad de 100% con más de 72 cepas o aislados del virus de la DEP de los brotes del 2013 y 2014 de Estados Unidos y de aislados de Corea del Sur relacionados filogenéticamente también con cepas americanas.

**Palabras claves:** Diarrea epidémica porcina, diagnóstico, PCR, caracterización molecular, Ecuador.

## FIRST REPORT OF MOLECULAR DIAGNOSIS OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA IN ECUADOR

### Abstract

The virus of porcine epidemic diarrhea (PED) is a coronavirus that causes diarrhea and vomiting with high mortality. This disease had never been informed in Ecuador. In 2014, an outbreak of diarrhea in pigs of Cotopaxi province with clinical and epidemiological

characteristics of that disease. Here in are presented the RT-PCR diagnostic results of the presence of PED virus RNA in intestine and stool samples from diseased pigs and sequencing of S gene fragment of 627 nucleotides, the isolated virus was named Cotopaxi 2014 and the nucleotide sequence shared a 100% identity over 72 strains or isolates of PED virus from USA outbreaks during 2013 and 2014, and with South Korean isolates, phylogenetically related to American strains.

**Keywords:** Porcine Epidemic Diarrhoea, diagnostic, PCR, molecular characterization, Ecuador

## I. INTRODUCCIÓN

La diarrea epidémica porcina (DEP) se reportó por primera vez en el Reino Unido en 1971 [1]. La enfermedad se caracteriza por grave enteritis, vómitos, diarrea acuosa, deshidratación, y alta tasa de mortalidad entre los cerdos. Posteriormente, se identificó el agente causal de la PED como el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), clasificado dentro del género *Alphacoronavirus*, familia *Coronaviridae*, orden *Nidovirales* [2] y se ubica dentro del grupo 1 de este género separado del virus de la gastroenteritis transmisible (TGE) que produce los mismos signos clínicos en cerdos, pero no está antigénicamente relacionado.[3] El genoma de los coronavirus está constituido por ARN de 26-30Kb de cadena simple y polaridad positiva, el cual está asociado con la nucleoproteína N formando la nucleocápsida helicoidal rodeada de una envoltura lipoproteica con espículas de la glicoproteína S y las proteínas M y sM (también conocida como E).[4] Recientemente se ha establecido

\* Correspondencia a: Ana Garrido,  
e-mail: [ana.garrido@agrocalidad.gob.ec](mailto:ana.garrido@agrocalidad.gob.ec)

la existencia de genogrupos y sub-genogrupos dentro de esta especie viral realizando el análisis filogenéticos a través de la comparación de la secuencia nucleotídica de los genes S y M y el genoma completo de cepas de diferentes brotes de China, Estados Unidos y Corea. [3, 5, 6, 7, 8].

PEDV ha sido informado en muchos países de Europa y Asia incluyendo Alemania, Francia, Suiza, Hungría, Italia, China, Corea del Sur, Tailandia, y Vietnam [3] pero nunca en América. En mayo de 2013 fue identificado por primera vez en los Estados Unidos y a finales de enero de 2014, habían ocurrido brotes en 23 estados, con 2692 casos confirmados causando graves pérdidas económicas.[9]

El 31 de julio de 2014 se produjo un brote de diarrea porcina con las características clínico-epidemiológicas de DEP en Latacunga, provincia Cotopaxi. Se presentan los resultados del diagnóstico por medios moleculares para confirmar la presencia del virus de la diarrea epidémica por primera vez en Ecuador.

## II. METODOLOGÍA

**Preparación de las Muestras:** Para el diagnóstico por PCR se tomaron muestras de intestino delgado y diarrea de 11 cerdos enfermos que procedían de una granja porcina del cantón Latacunga, provincia Cotopaxi. Los cerdos tenían signos clínicos compatibles con diarrea epidémica porcina como diarrea y vómitos con una morbilidad de 4.86%.

Las muestras de intestino estaban constituidas por 10cm de yeyuno e ileon por separado con su contenido, ligado por ambos extremos y las heces diarreicas habían sido colectadas por estimulación rectal. Se trasladaron refrigeradas el mismo día que fueron tomadas.

Se prepararon 5 homogenados de intestino mediante el raspado de la mucosa intestinal de 2-3 fragmentos intestinales arrastrándolas vellosidades junto con el contenido intestinal y mezclándolas al 50% con solución salina tamponada con fosfato (PBS; 0,1 M, pH 7,2), tres procedían de ileon y dos de yeyuno. Además se preparó un extracto de cada muestra de diarrea diluida 1:10 en PBS, se homogenizaron por agitación, y se clarificaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 4800 X g a 4°C.

**Extracción de ARN:** Se realizó la extracción del ARN de cada extracto de diarrea y homogenado de intestino con Trizol (Invitrogen) siguiendo la metodología del fabricante con las siguientes variaciones: Se utilizaron 500 µL del reactivo el cual se mezcló suavemente durante 5 min con 200 µL del homogenado de intestino delgado o 500 µL del sobrenadante

clarificado de heces. En la precipitación con isopropanol se incubó a -70°C durante 2 horas. El ARN se almacenó a -70°C.

**Reverso-transcripción (RT):** Para la obtención del ADN complementario (c-DNA) se realizó la reacción de RT con la enzima MLV (Invitrogen). Previamente 10 µL de cada ARN se incubaron a 95°C por 3 min junto a 250 ng de "randomhexamers" y 0.3mM de dntps (Invitrogen), luego se colocaron los tubos en hielo rápidamente durante 1 min. El volumen de reacción final fue de 50 µL de una mezcla que contenía el Buffer RT, DTT (0.3mM), Inhibidor de ARNasa (2U/ µl) en concentración final y 200u de la enzima MLV. El perfil térmico de incubación de la reacción fue: 25°C ,15min; 37°C, 1hora; 95°C, 3min.

**Diagnóstico del virus DEP por PCR:** Se utilizaron primers (Tabla I) que amplifican una región conservada del gen N [10]. La concentración final de los componentes de la reacción de PCR de diagnóstico fueron Buffer PCR Green Flexi 1X; MgCL2, 1.5mM; dntps, 0.2mM; primers, 0.5 µM y 1.25u de la Enzima GoTaq Hot Start, (Promega). El perfil de temperatura fue 5min, 94°C; 30 ciclos de -30 s a 94°C, 1min a 56°C y 1min a 72°C- con una extensión final de 5min a 72°C.

**Tabla I.** Primers utilizados para la amplificación por PCR de un fragmento del gen N para el diagnóstico y del gen S para secuenciar.

| Nombre | Secuencia 5'-3'        | Gen | Talla (pb) |
|--------|------------------------|-----|------------|
| N219   | GCATTTCTACTACCTCGGAACA | N   | 338        |
| N557   | CTCCACGACCCTGGTTATTT   |     |            |
| S1F    | TTCTGAGTCACGAACAGCCA   | S   | 651        |
| S2R    | CATATGCAGCCTGCTCTGAA   |     |            |

**Obtención de productos de PCR para secuenciar:** Se seleccionaron cuatro muestras para la obtención del producto del gen S para secuenciar (I1, Y2, I3 y D6) y se utilizó una pareja de primers (Tabla I) cuya diana es el gen S.[11] Los componentes y su concentración final en la reacción de 50µL fueron: buffer PCR1X; MgCl2, 3mM; dntps,0.2mM; primers S1 y S2, 0.5µM y 1ude PLATINUM TAQ polimerasa (Invitrogen). El perfil térmico: 94°C, 5min; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1min a 53°C y 1min a 72°C; 5min a 72°C. La pureza y la estimación de la concentración de los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa teñida con SyberSafe.

**Secuenciación:** Se utilizó el servicio de MacroGen,SA (Seul, República de Corea del Sur) para la purificación de los productos de PCR y la obtención de la secuencia nucleotídica mediante el método de secuenciación estándar en capilar.

**Programas para el análisis de las secuencias:** Los programas empleados para el análisis de las secuencias fueron: BioEditSequenceAlignment Editor [11], MEGA 6.1 [13]. Las secuencias fueron comparadas con las depositadas en el banco de datos de secuencias nucleotídicas (GenBank, NCBI, USA) mediante el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del análisis por RT-PCR del ARN extraído de todas las muestras, se amplificó una banda de la talla esperada de 338pb con los primers que tienen como diana una región conservada del gen N de VDEP. En la Figura 1 se muestra la amplificación obtenida del ARN extraído de cinco muestras de íleon y yeyuno y de nueve de las once muestras de heces diarreas.

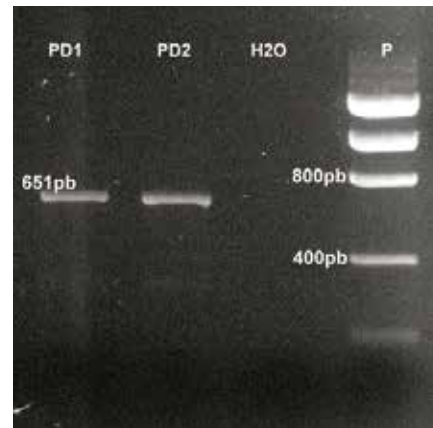


**Figura 1.** Análisis por RT-PCR del gen N del virus diarrea epidémica porcina de las muestras de intestino y heces diarreas de cerdos enfermos. P = patrón de Peso Molecular Trackit 100pb; I= Muestras de íleon; Y= Muestras de Yeyuno; D= Muestras de Diarrea.

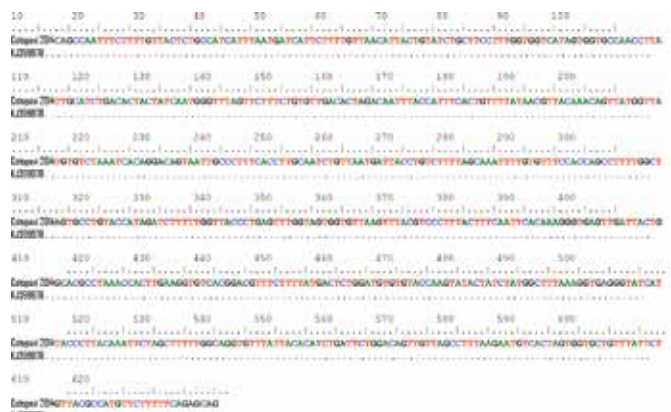
Para la obtención de la secuencia nucleotídica de cuatro muestras seleccionadas de íleon, yeyuno y diarrea, se obtuvo un producto de PCR de 651pb con los primers del gen S, mostrándose los productos obtenidos de dos de estas muestras en la Figura 2. Después de editadas las secuencias y comparadas mediante el alineamiento, se obtuvo la secuencia nucleotídica de los cuatro productos secuenciados y sus réplicas observándose que eran idénticas entre sí, a esta secuencia se le nombró virus de la diarrea epidémica porcina Cotopaxi, 2014. Al comparar esta secuencia nucleotídica, mediante el programa BLAST se determinó que existía un 100% de identidad con más de 71 aislados o cepas de DEP de brotes del 2013 y 2014 en diferentes estados de los Estados Unidos de América [8, 14] y de Corea del Sur (Tabla II).[5] En el alineamiento de la secuencia del DEP de Ecuador con la secuencia del gen S de la cepa americana OH851 [9] se puede observar un 100% de identidad alineando en la posición 1489 hasta la 2115 del gen S de dicha cepa (Figura 3).

El gen S del VDEP tiene más de 4000 nucleótidos y codifica para la proteína S que constituye las espículas de la envoltura, lo que determina su alta variabilidad. La

caracterización genética de este gen ha servido para dilucidar las relaciones genéticas entre los diferentes cepas y el estatus epidemiológico en el campo.[7] Por otra parte se han observado 97-100% de identidad entre regiones del gen S dentro del mismo sub genogrupo.[3]



**Figura 2.** Productos de PCR del gen S del virus de la diarrea epidémica porcina de muestras de cerdos enfermos I1=íleon 1; Y2= Yeyuno 2; P= Patrón Low Mass Ladder, Invitrogen.



**Figura 3.** Secuencia nucleotídica de 627 nucleótidos del gen S del virus de la diarrea epidémica de Ecuador (Cotopaxi, 2000) y su alineamiento con la secuencia de la cepa OH851 aislada en Estados Unidos durante el 2014.

En el estudio filogenético conducido por Huang et al [6] se demostró que todas las cepas de DEP de los Estados Unidos están agrupadas en un clado dentro del sub-genogrupo 2a y están estrechamente relacionadas con una cepa de China llamada AH2012, posteriormente se determinó que las cepas de Norteamérica del 2013 y 2014 se agrupan en 2 clados claramente conformados.[8] Sin embargo, recientemente se demostró la presencia de un virus PED variante, la cepa OH851.[9] Hay que señalar que las cepas de Corea del Sur que tienen un 100% de identidad nucleotídica con la región del gen S de Cotopaxi 2014 (Tabla II) están relacionadas

filogenéticamente con cepas de Estados Unidos.[5] La completa identidad genética del aislado ecuatoriano en la región de 627 nucleótidos del gen S sugiere que pertenecen al mismo genogrupo, pero para realizar el análisis filogenético y establecer el origen del brote de Ecuador es necesario completar la caracterización genética del aislado Cotopaxi 2014 mediante la obtención de la secuencia nucleotídica del S gen completo.

**Tabla II:** Cepas y aislados representativos con los que el virus de la diarrea epidémica porcina Cotopaxi 2014 tiene una identidad del 100% en una región de 626 nucleótidos del gen S.

| Cepa o aislado (País)     | N°GenBank   | Autor               |
|---------------------------|-------------|---------------------|
| USA/TC PC170-P2           | KM392227.1  | Oka et al, 2014     |
| USA/TC PC168-P2           | KM392226.1  | Oka et al, 2014     |
| USA/C PC22A-P10           | KM392224.1  | Oka et al, 2014     |
| USA/Minnesota84/2013      | KJ645707.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Minnesota127/2014     | KJ645703.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Ohio126/2014          | KJ645702.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Missouri101/2013      | KJ645692.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Illinois98/2013,      | KJ645690.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Iowa96/2013           | KJ645688.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Ohio75/2013           | KJ645670.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Wisconsin74/2013      | KJ645669.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/NorthCarolina40/2013  | KJ645646.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Texas39/2013          | KJ645645.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/Colorado30/2013       | KJ645638.1  | Vlasova et al, 2014 |
| USA/ OH851(variante)      | KJ399978    | Wang et al,2014     |
| aislado KNU-1310 ( Corea) | KJ451045.1* | Lee y Lee 2013      |
| aislado KNU-1305( Corea)  | KJ662670.1  | Lee y Lee 2013      |
| aislado IA2 (USA)         | KF468754.1  | Huang et al, 2013   |
| aislado MN (USA)          | KF468752.1  | Huang e al,2013     |

#### IV. CONCLUSIÓN

Es la primera vez que se confirma por medios moleculares el diagnóstico clínico-epidemiológico de la presencia del virus de la diarrea epidémica porcina en cerdos de la provincia Cotopaxi de Ecuador y es presumible que el virus proceda de Estados Unidos, dada la alta identidad genética del aislado Cotopaxi, 2014 con secuencias del gen S de cepas y aislados del mencionado país de los años 2013 y 2014.

#### Agradecimientos

Agradecemos al proyecto Prometeo de la SENESCYT y AGROCALIDAD del MAGAP por el financiamiento de esta investigación. Por la gestión realizada al Dr. Luis Ramos, Dr. Javier Vargas, Dr. Nelson Cabrera y a la Dra. Johanna Salas por sus aportes en el seguimiento epidemiológico desde planta central y los Dres. Diego Burgasí y Fabio Chanatasig por su apoyo en la atención y seguimiento al evento sanitario en la Coordinación provincial de Cotopaxi.

#### Referencias

[1]E.N. Wood (1977) "An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea", *Vet Rec.*100, 243–4.

[2]R.J. De Groot, S.C. Baker, R. Baric, L. Enjuanes, A.E. Gorbalenya, K.V. Holmes, S. Perlman, L. Poon, P.J.M. Rottier, P.J. Talbot, P.C.Y. Woo, J. Ziebuhr (2011), "Family Coronaviridae", En: "Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", (Ed.:A.M.Q. King, E.Lefkowitz, M.J. Adams, E.B. Carstens), Elsevier, Oxford, pp. 806-828.

[3]D.S. Song, J.B.K. Park (2012) "Porcine epidemic diarrhea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines". *Virus Genes*, 44, 167–75.

[4]L.Enjuanes, D.Cavanagh. (2002) "Coronaviridae", En:"The Springer Index of Viruses", (Eds.:C. A Tidona, G.Darai), University of Heidelberg, Alemania, pp, 272-280.

[5]S. Lee, C. Lee (2014) "Outbreak-Related Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains Similar to US Strains, South Korea, 2013", *Emerging Infect. Dis.*20 (7), 1223-1226.

[6]Y.W.Huang, A.W.Dickerman, P. Pineyro, L.Li, .Fang, R .Kiehne (2013) "Origin, evolution and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States". *mBio.*4, e00737–13.

[7]Y.Tian, Z. Yu, K.Cheng, Y. Liu, J. Huang, Y. Xin, Y. Li, S. Fan, T. Wang, G.Huang, N. Feng, Z. Yang, S. Yang, Y Gao, X.Xia (2013) "Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of New Variants of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Gansu, China in 2012", *Viruses*, 5, 1991-2004; doi:10.3390/v5081991.

[8]A.N.Vlasova, D.Marthaler, Q. Wang, M.R Culhane., K.D.Rossow, A.Rovira, J. Collins, L.J.Saif (2014) "Distinct Characteristics and Complex Evolution of PEDV Strains, North America, May 2013-February 2014", *Emerging Infect. Dis.* 20 (10), 1620-1628.

[9]L Wang, B Byrum, Y Zhang (2014) "New Variant of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, United States 2014. *Emerging Infectious Diseases*; 20 (5), 918-919.

[10]K. Jung, Q. Wang, K.A. S. Zhongyan Lu, Y. Zhang, L.J. Saif (2014). "Pathology of US Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain PC21A in Gnotobiotic Pigs". *Emerging Infect. Dis.* 20(4), 662-665.

[11]D.S.Song, K.B.Kang, J.S.Oh, W.Gun, J.S.Yang, H.J. Moon, K.Yong-Suk, J.B.K.Park (2006) "Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus", *J.Vet.Diagn. Invest.*18, 278–281.

[12]T.A.Hall (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.

[13]K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013) "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0". *Molecular Biology and Evolution.* 30, 2725-2729.

[14]T. Oka,L.J. Saif,D. Marthaler,M.A. Esseilia,T. Meuliad,.C.M. Lin,A.NVlasova,K. Jung,Y. Zhang,Q.Wang ( 2014)“Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene”,Vet. Microbiol.173(3-4),258–269.