



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Detección y caracterización de teschovirus porcino
en casos clínicos con signos nerviosos

Detection and characterization of porcine
teschovirus in clinical cases with nervous signs

Autora:

Isabel Lafuente Menjón

Director:

José Luis Arnal Bernal

Departamento de Biología Molecular
EXOPOL

Junio de 2024

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1 MUESTREO	6
4.2 PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	6
4.3 EXTRACCIÓN DEL RNA.....	7
4.4 DETECCIÓN DE TESCHOVIRUS PORCINO MEDIANTE RT-qPCR.....	8
4.5 SECUENCIACIÓN	9
5. RESULTADOS	14
5.1 DETECCIÓN DE TESCHOVIRUS PORCINO MEDIANTE RT-qPCR.....	14
5.2 SECUENCIACIÓN	16
6. DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIONES	22
CONCLUSIONS.....	22
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. RESUMEN

El teschovirus porcino (PTV) es un virus de RNA de cadena sencilla que presenta un mecanismo de transmisión feco-oral. Este virus es capaz de acceder al sistema nervioso y causar signos neurológicos severos como la polioencefalomielitis, aunque la mayoría de los animales infectados permanecen asintomáticos.

En el presente trabajo se buscó evidenciar la presencia de teschovirus porcino en diferentes muestras clínicas de cerdos que sufrían un brote agudo de enfermedad neurológica, así como su caracterización a través de la secuenciación del gen VP1 al ser la región que concentra la mayor variabilidad genética y permite diferenciar los serotipos. De esta manera se pretendía establecer una relación entre el serotipo de PTV identificado y la gravedad de los signos neurológicos.

Para ello, se analizaron 127 muestras de 9 animales diferentes que presentaban signos clínicos nerviosos. En primer lugar, se llevó a cabo la extracción del RNA de las muestras tras un pretratamiento variable en función del tipo de matriz biológica. Para poder detectar la presencia del virus se realizó una amplificación mediante RT-qPCR utilizando el kit comercial de Exopol "EXOone Porcine Teschovirus oneMIX qPCR kit", basado en la química de la sonda de hidrólisis fluorogénica. Por último, para intentar caracterizar el teschovirus porcino encontrado en las muestras se seleccionaron aquellas que habían resultado positivas a PTV y se utilizaron diferentes cuartetos de primers con los que se llevó a cabo una PCR anidada para maximizar la sensibilidad, seguida de una electroforesis. Los productos de amplificación seleccionados se secuenciaron mediante la técnica de secuenciación Sanger.

Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de PTV en muestras relacionadas con el sistema digestivo de los animales bajo estudio, no así en aquellas tomadas de localizaciones sistémicas o del sistema nervioso. Además, no fue posible el genotipado del PTV por la ausencia de resultados en la secuencia del virus.

En conclusión, aunque se exploró en profundidad la conexión entre el agente etiológico y la enfermedad, no se puede concluir con los resultados obtenidos y la información disponible que el brote de enfermedad se deba a teschovirus porcino, a pesar de que los animales tuvieran signos compatibles.

ABSTRACT

Porcine teschovirus (PTV) is a single stranded RNA virus which has a fecal-oral transmission mechanism. This virus is able to access the nervous system and to cause severe neurological signs such as polyencephalomyelitis, although most of infected animals remain asymptomatic.

In this present study, the aim was to evidence the presence of porcine teschovirus in different clinical samples from pigs suffering from an acute outbreak of neurological disease, as well as its characterization through VP1 gene sequencing as it is the region that concentrates most of the genetic variability and allows the differentiation of serotypes. In this way, it was intended to establish a relationship between the PTV serotype identified and the severity of the neurological signs.

In order to achieve this, 127 samples from 9 different animals that showed nervous clinical signs were analyzed. Firstly, RNA was extracted from the samples after a variable pretreatment depending on the type of biological matrix. To detect the presence of the virus, RT-qPCR amplification was performed using Exopol's commercial kit "EXOone Porcine Teschovirus oneMIX qPCR kit", based on the fluorogenic hydrolysis probe chemistry. Finally, in an attempt to characterize the porcine teschovirus found in the samples, those that had tested positive to PTV were selected, and different quartets of primers were used to perform a nested PCR so as to maximize sensitivity, followed by an electrophoresis. The selected amplification products were sequenced using the Sanger sequencing technique.

The results obtained showed the presence of PTV in samples related to the digestive system of the animals under study, but not in those taken from systemic or nervous system locations. In addition, PTV genotyping was not possible due to the absence of virus sequence results.

To conclude, although the connection between the etiologic agent and the disease was thoroughly explored, it cannot be concluded with the results obtained and the available information that the disease outbreak is due to porcine teschovirus, despite the fact that the animals had compatible signs.

2. INTRODUCCIÓN

El teschovirus porcino (PTV) pertenece al género *Teschovirus* de la familia *Picornaviridae* del orden *Picornavirales* (Deng et al., 2012). Sus viriones son esféricos, sin envuelta, y contienen un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo de aproximadamente 7,2 kb de longitud, rodeado por una cápside icosaédrica (Chiu et al., 2012; C. Zhang et al., 2013). El genoma completo del PTV tiene un único marco abierto de lectura que codifica una poliproteína, flanqueado por regiones no codificantes de RNA. Las regiones sin traducir (UTRs) en 3' y en 5' están altamente conservadas debido a su importancia en la transcripción y traducción (C. Zhang et al., 2013).

El PTV presenta un mecanismo de transmisión feco-oral, y es excretado en las heces y en la orina de los cerdos durante varias semanas (Deng et al., 2012). Tras su ingestión se replica en las amígdalas y en el tracto digestivo hasta dar lugar a una viremia, aunque esta última etapa puede no tener lugar si el hospedador cuenta con anticuerpos que eliminen rápidamente el agente infeccioso (Chiu et al., 2012; Yamada et al., 2009). Este virus puede acceder al sistema nervioso central bien siguiendo una ruta vascular atravesando la barrera hematoencefálica o mediante transporte axonal retrógrado a través de los nervios craneales (Chiu et al., 2012).

Una gran variedad de signos clínicos y lesiones han sido asociados a la infección por diferentes serotipos del teschovirus porcino, incluyendo fallos reproductivos, diarrea, neumonía o miocarditis (Carnero et al., 2018). Sin embargo, cuando el PTV invade el sistema nervioso central puede causar signos neurológicos severos como la poliencefalomielitis (Chiu et al., 2012; Vreman et al., 2020), siendo este el caso más característico de infección por teschovirus porcino. Los signos nerviosos pueden ser leves, denominado enfermedad de Talfan, o severos, denominado enfermedad de Teschen, descrita por primera vez en 1929 en un brote con signos neurológicos severos, y que generalmente se asocia al serotipo 1 (PTV1) (Cano-Gómez et al., 2013; Donin et al., 2014; Liang et al., 2023).

La mayoría de los animales infectados por PTV permanecen asintomáticos, de manera que las infecciones suelen pasar inadvertidas (Cano-Gómez et al., 2013; Ray et al., 2020; Rosa et al., 2006). Se trata de un virus globalmente endémico que circula en la mayoría de piaras, y que ha sido detectado con frecuencia en las heces de cerdos sanos, lo que sugiere que este virus podría colonizar el tracto intestinal sin causar trastornos de relevancia (Carnero et al., 2018; Liang et al., 2023). La presencia del teschovirus porcino no siempre se ha asociado a la aparición de signos clínicos, ya que por el momento no se ha conseguido establecer la relación entre varios genotipos víricos del PTV y procesos clínicos severos (Donin et al., 2014).

En un estudio realizado por Buitrago et al. en España en 2010 el 16% de los cerdos sanos examinados estaban excretando PTV en las heces, lo que llevó a la conclusión de que, aunque históricamente este virus ha causado serios trastornos en los cerdos, las cepas de PTV que circulan actualmente en España aparentemente no causan signos perceptibles. Esto puede deberse a la falta de patogenicidad intrínseca de los virus circulantes o a la inmunidad adquirida de las poblaciones porcinas (Buitrago et al., 2010).

Los picornavirus entéricos porcinos fueron inicialmente clasificados dentro del género *Enterovirus*, sin embargo, posteriores ajustes taxonómicos los clasificaron en tres subgrupos, donde el primero de ellos incluía 10 genotipos de PTV (Cano-Gómez et al., 2013; Donin et al., 2014). Actualmente hay 13 serotipos (PTV1 - PTV13) incluidos en PTV tipo A (Boros et al., 2012), mientras que los serotipos PTV14 a PTV22 pertenecen a PTV tipo B (Yang et al., 2018). El PTV12 fue por primera vez identificado en España en 2011 (Cano-Gómez et al., 2011), mientras que el PTV13 también fue descrito en primera instancia en España en 2018 (Carnero et al., 2018).

Los epítomos responsables de las diferencias entre serotipos de PTV se localizan en gran parte en las proteínas más externas de la cápside, como es VP1 (Usherwood & Nash, 1995). Es por ello que el sistema actual para genotipar PTV se basa en la secuenciación del gen que codifica dicha proteína (Boros et al., 2012; Cano-Gómez et al., 2011; Chiu et al., 2012; Ray et al., 2020; Rosa et al., 2006; Vreman et al., 2020; Yang et al., 2018, 2020) pues es la región que concentra la mayor variabilidad genética y por tanto la estrategia óptima para la clasificación molecular de estos virus (Cano-Gómez et al., 2011).

Las infecciones por PTV se diagnosticaban tradicionalmente mediante métodos laboriosos y costosos como el aislamiento del virus en células en cultivo, ensayos de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos, fijación del complemento, microscopía electrónica o histopatología (Deng et al., 2012; Qiu et al., 2013; Rosa et al., 2006; Zhang et al., 2013). Sin embargo, con los avances en biología molecular, los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) son los más utilizados, ya que es un método sensible y rápido (Rosa et al., 2006; Zhang et al., 2013). Variaciones basadas en esta técnica, como la RT-qPCR (RT-PCR cuantitativa) con sondas de hidrólisis permiten mejorar la sensibilidad y especificidad, así como el análisis simultáneo de diferentes virus relacionados (i.e. PRRSV, CSFV) mediante la conformación de ensayos multiplexados. (Cano-Gómez et al., 2013; Carnero et al., 2018; Chiu et al., 2012; Deng et al., 2012; Donin et al., 2014; Liu et al., 2011; Qiu et al., 2013; Ray et al., 2020; Vreman et al., 2020; C. Zhang et al., 2013).

Desde su primera aparición en 1929, el PTV y su enfermedad asociada se propagaron a través de Europa y otros continentes durante los años 40 y 50, causando graves pérdidas económicas (Rosa et al., 2006; B. Zhang et al., 2023). Actualmente, este virus es considerado un patógeno de categoría B en cerdos, lo que implica que se disemina fácilmente dando lugar a morbilidades moderadas y mortalidades reducidas (NIAID, 2018). Debido a su persistencia, puede sobrevivir en las granjas durante largos periodos de tiempo, pudiendo, potencialmente, agravar los efectos que producirían las infecciones por otros virus como el PRRSV (Qiu et al., 2013). Esto, además de provocar un detrimento de la salud de los animales provoca un impacto económico debido a la disminución en la tasa de crecimiento o al incremento en el coste de fármacos, por lo que el estudio del PTV ha suscitado el interés de diferentes grupos de investigación en diferentes partes del mundo. A pesar de ello, todavía restan por definir con detalle multitud de aspectos en relación con la epidemiología y patogenia de este virus. Las modernas técnicas moleculares han puesto de manifiesto multitud de serotipos para los cuales no ha sido posible establecer una relación clara entre su infección y el desarrollo de la respectiva enfermedad (Stäubli et al., 2021).

3. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo experimental son los siguientes:

- Evidenciar la presencia del PTV en diferentes muestras clínicas obtenidas mediante muestreo completo y sistemático de animales que sufren un brote agudo de enfermedad neurológica con sospecha de implicación viral.
- Caracterizar el PTV encontrado mediante secuenciación del gen VP1 y posterior análisis filogenético con el fin de poder conocer su serotipo y establecer su relación con la gravedad de los signos neurológicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MUESTREO

En este estudio se analizaron un total de 127 muestras provenientes de 9 animales diferentes que procedían de 4 granjas diversas. Los animales analizados presentaban signos clínicos y habían sido sacrificados en granja debido a una enfermedad de afectación neurológica. Los cerdos en estudio se encontraban en etapa de transición donde la manifestación clínica comenzaba a las 6-7 semanas de vida. Los signos descritos por el veterinario responsable de la explotación eran recurrentes en el tiempo sin estacionalidad aparente, y se trataban de afectación sistémica evidenciada con fiebre, disnea, complicaciones cardiaco-congestivas, edema, conjuntivitis, inflamación palpebral y afectación nerviosa. La hipertermia era uno de los primeros signos detectables, y podía llegar a 41,9 °C, aunque descendía cuando se instauraban los signos nerviosos. Además, la enfermedad no respondía a terapia antibiótica y se descarta mediante diagnósticos anteriores la implicación del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRSV) y de *Streptococcus suis*.

Tras la necropsia se obtuvieron muestras correspondientes a distintos órganos, así como hisopos y exudados como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1

Muestras analizadas en este estudio

Muestra	Nº de muestras	Muestra	Nº de muestras
Pulmón	9	Hisopo rectal	7
Líquido pericárdico	7	Riñón	7
Corazón	7	Exudado ocular	7
Hígado	7	Exudado nasal	7
Tonsila	9	Exudado oral	7
Bazo	7	Exudado bronquial	7
Linfonodo mediastínico	7	Testículo	5
Linfonodo mesentérico	9	Encéfalo	9
Intestino	7	Heces	2

4.2 PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La extracción y purificación de RNA viene precedido de un pretratamiento de la muestra que varía en función del tipo de matriz biológica:

- **Hisopos:** se introduce el hisopo en un tubo con PBS (tampón fosfato salino) y se realiza un movimiento rotatorio para retirar las células del hisopo. A continuación, dicho líquido se transfiere a un tubo con perlas de zirconio 0.1 mm sin PBS para la extracción.

- Pulmones y órganos digestivos: se corta un pequeño fragmento del órgano (aproximadamente 25 mg) utilizando pinzas y tijeras estériles, se añade a un tubo con perlas de zirconio 0.1 mm con buffer de lisis proveniente del kit comercial de extracción MagMAX CORE (Thermofisher), y se homogeneiza en el interior del tubo.
- Órganos diferentes a tejido digestivo o pulmones: se corta un pequeño fragmento del órgano (aproximadamente 25 mg) utilizando pinzas y tijeras estériles, se añade a un tubo con perlas de zirconio 0.1 mm con PBS, y se homogeneiza en el interior del tubo.
- Líquidos: se depositan 250 µl en un tubo eppendorf vacío.
- Exudados: se transfiere todo su contenido a un tubo seco con perlas de zirconio 0.1 mm.
- Heces: se toman aproximadamente 25 mg y se añaden a un tubo con perlas de zirconio 0.1 mm con buffer de lisis del kit comercial de extracción MagMAX CORE (Thermofisher).

Todo este procedimiento se llevó a cabo en una estación de trabajo de biocontención y con un equipo de protección adicional al uniforme de laboratorio, que consta de una bata de plástico, doble guante, manguitos de plástico, gafas y mascarilla FFP2, de forma que se evitan las contaminaciones cruzadas entre muestras y operario.

Una vez dispuestas las muestras, las muestras líquidas se llevan a un agitador vórtex y aquellas muestras que contienen tejidos primero se procesan en un homogeneizador de tejidos Roche MagNA Lyser automático (2 ciclos de 30 segundos a 6000 rpm), y posteriormente se centrifugan 2 minutos a 1 g.

4.3 EXTRACCIÓN DEL RNA

Para llevar a cabo la extracción del RNA de las muestras tras su pretratamiento se utiliza el kit comercial MagMAX CORE (Thermofisher) en el robot de extracción automática KingFisherFlex (Thermofisher), por lo que el primer paso para poder realizar la extracción es preparar las placas que se introducirán en dicho robot. Este kit extrae ácidos nucleicos totales, tanto DNA como RNA.

La primera placa es la llamada “lisis y binding”, que será la placa donde posteriormente se añadirán las muestras pretratadas. En esta placa se añaden 350 µl de solución de lisis, que contiene tiocianato de guanidina, y 350 µl de solución de binding, que contiene isopropanol, en cada pocillo. A continuación, se añaden 20 µl de perlas magnéticas y 10 µl de proteinasa K por pocillo. Seguidamente, se preparan las placas “wash1” y “wash2”, en las que se añaden 500 µl por pocillo, bien del wash1 que contiene isopropanol y tiocianato de guanidina, o del wash2 que contiene etanol. Por último, se prepara la placa de elución, donde al final del proceso tendremos el RNA extraído. Aquí se añaden 200 µl por pocillo de la solución de elución.

Una vez preparadas estas placas, se cargan las muestras pretratadas en la placa “lisis y binding”, en concreto 200 µl de muestra en cada pocillo. Este proceso se realizará de nuevo en campana y con mascarilla FFP2 para evitar contaminaciones.

Una vez cargadas todas las muestras en sus correspondientes pocillos se lleva esta placa y las otras tres placas preparadas con anterioridad al KingFisher, donde se introducen las placas según se va indicando en la pantalla. Se selecciona el programa de extracción correspondiente a RNA y en unos 30 minutos se obtiene el RNA extraído, el cual se trasvasa a tubos eppendorf tratados de manera que se encuentran libres de RNasas, para evitar la degradación de los ácidos nucleicos extraídos.

4.4 DETECCIÓN DE TESCHOVIRUS PORCINO MEDIANTE RT-qPCR

Para poder detectar la presencia del virus se realizó una amplificación mediante RT-qPCR utilizando el kit comercial de Exopol denominado “EXOone Porcine Teschovirus oneMIX qPCR kit”, basado en la química de la sonda de hidrólisis fluorogénica (Exopol, s. f.).

Este kit contiene:

- PTSV oneMIX tube: contiene todos los componentes para la reacción de PCR en tiempo real (tampón, retrotranscriptasa, polimerasa, dNTPs, sondas y primers específicos para el virus y por último el control endógeno).
- Control positivo NERV1: DNA sintético específico liofilizado, que hay que reconstituir en 250 µl de agua de calidad para biología molecular (molecular grade water).
- Agua: agua de calidad para biología molecular.

Para llevar a cabo la amplificación primero se prepara la placa donde se realizará dicho procedimiento, y se añaden 15 µl del PTSV oneMIX en cada pocillo que se vaya a utilizar. Previamente, la placa se deja 15 minutos con luz UV en la campana para evitar contaminaciones. Tras ello se dispensan en cada pocillo 5 µl de cada uno de los tubos con el RNA extraído de cada muestra, así como 5 µl de agua en el pocillo correspondiente al control negativo, y 5 µl del control positivo NERV1 en el pocillo correspondiente al control positivo.

A continuación, se sellan las placas con una tapa óptica, y se lleva a la centrífuga durante un minuto a bajas revoluciones para evitar que queden gotas en las paredes del pocillo y asegurar que todo su contenido se mezcla adecuadamente.

Una vez centrifugada, la placa se lleva a un termociclador QuantStudio (Applied Biosystems), que ofrece aplicaciones y funciones estándar de qPCR con monitorización remota y análisis en la nube (Thermo Fisher Scientific Inc., s. f.-a). En el termociclador se selecciona el perfil térmico descrito por el fabricante del kit para amplificar RNA (tabla 2).

Tabla 2*Protocolo térmico para RT-qPCR de RNA*

Ciclos	Tiempo	Acción	Temperatura
1 ciclo	15 min	Transcripción reversa	45 °C
1 ciclo	5 min	Activación enzimática	95 °C
	15 s	Desnaturalización	95 °C
42 ciclos	60 s	Hibridación	60 °C
		Adquisición de datos	

Los datos de fluorescencia deben recopilarse durante el paso de “Adquisición de datos” a través del canal FAM a 530 nm para el PTV, y a través de los canales HEX o VIC a 560 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., s.f.-b) para el control endógeno. Los resultados se guardan automáticamente. El control endógeno se detecta de forma simultánea al virus que estamos estudiando. Dicho control endógeno se trata de un gen housekeeping presente en todos los tejidos del cerdo, y cuya función es validar los resultados negativos al patógeno. De esta forma, si se obtiene un resultado negativo para el virus en estudio, pero un resultado positivo para el control endógeno, podemos validar el muestreo, la extracción y la amplificación.

Tras 98 minutos, tiempo que dura el protocolo térmico del termociclador para amplificar RNA, se podrán obtener los resultados en el programa informático del termociclador. De esta manera, se visualizan los resultados a través de un gráfico de amplificación, donde se representa la fluorescencia de cada canal frente al número de ciclos. Los valores Cq respectivos de cada muestra en cada fluoróforo se obtienen en el ciclo donde la curva de amplificación cruza el valor de fluorescencia establecido como threshold (umbral).

El valor Cq es una medida relativa de la concentración de PTV en la reacción de PCR, y corresponde con el ciclo en el que el número de moléculas son suficientes para que la fluorescencia pueda ser detectada. Cuanto mayor es el valor Cq, menor es el número de moléculas iniciales, ya que se necesitan más ciclos para alcanzar la fluorescencia detectable. Para poder calcular dicho valor se ajusta el threshold entre un 5 y un 10% de la fluorescencia máxima obtenida por el control positivo de reacción.

4.5 SECUENCIACIÓN

Para intentar caracterizar el PTV encontrado se seleccionaron las muestras que habían resultado positivas a PTV con un valor Cq igual o inferior a 33, ya que garantizan una mínima cantidad viral que posibilite la secuenciación.

Tabla 3*Muestras seleccionadas para la secuenciación*

Nº muestra	ID muestra	Tipo de muestra	Cq RT-qPCR
1	198757.10	Hisopo rectal	32,4
2	198757.30	Exudado nasal	30,7
3	198757.31	Exudado oral	33
4	198703.9	Intestino	25,9
5	198703.10	Hisopo rectal	30,6
6	198703.14	Exudado oral	31,4
7	198655.26	Hisopo rectal	32,9
8	198655.42	Hisopo rectal	33
9	203659.3	Heces	32
10	203659.4	Heces	26,5

La técnica de secuenciación utilizada fue el método Sanger, en el que se llevan a cabo cuatro reacciones separadas de extensión de DNA. Cada reacción se enriquece con un didesoxinucleótido trifosfato (ddATP, ddCTP, ddTTP o ddGTP) determinado, cada uno marcado con un fluoróforo diferente. La hebra de DNA recién sintetizada se extiende hasta que se incorpora el ddNTP disponible, y los productos de extensión son separados en función de su masa mediante electroforesis capilar (Janitz, 2008).

El protocolo de secuenciación comienza con la producción de los productos de amplificación a través de una PCR anidada. De esta forma, se hizo una primera PCR (Round 1) en la que se utilizaron dos primers que amplifican un segmento de aproximadamente 1 kb relativo a la secuencia parcial del gen VP1, que se utiliza generalmente para determinar el serotipo del virus (Cano-Gómez et al., 2011). A continuación, se hizo una segunda PCR (Round 2), en la que se utilizó otra pareja de primers que hibridan en una zona interior del producto generado anteriormente, amplificando un fragmento de 0,25 kb. Este procedimiento busca maximizar la sensibilidad y aumentar el éxito de la secuenciación en aquellas muestras con bajo título viral.

Los primers utilizados son los descritos en los artículos de 2011 y 2013 de Cano-Gómez et al. (Cano-Gómez et al., 2011, 2013).

Tabla 4*Primers de oligonucleótidos utilizados para la secuenciación*

Primer ID	Secuencia de oligonucleótidos (5'→3')	Localización en el gen	Tm (°C)
I2	CCYGGCTCACCATCACARGCAG	2379–2400	58
V2	GCYGGRTCTTTYAAAATTTGGTAC	3343–3367	
II2	GTTGCTGTGMGGGCDATGCCTGC	2748–2770	58
VI2	TATGCTGTTGGYAGCACTGTYG	2979–3001	
I1	CCYAAITCACCATCYTTGGCTG	2379–2400	54
V1	TCRCAMAGRGCATCAACTGCTGG	3363–3385	
II1	GTTGCYGTGAGAGTRATGCCRCG	2748–2770	54
VI1	GAMACATATGGYACTGARCATG	2953–2972	
5I	GGCAGTACTCAAACCTTAGCATCAC	2353–2376	60
5IV	GCTTCCAGGTAAATGATGGGAGCG	2098–2931	
5II	GTGAGAGCAATGCCAATGAGCCC	2754–2776	60
5V	GGCATCAACTGCTGGGTCTTTC	3356–3376	

Estos primers vienen liofilizados, por lo que es necesario reconstituirlos utilizando TE, un tampón que contiene Tris-HCl 10 mM y EDTA 0,1 mM, de manera que finalmente se obtenga un tubo con el primer a una concentración de 10 µM.

Se utilizaron diferentes cuartetos de primers debido a que no se conocía cuál iba a ser el que diera mejores resultados, ya que como los virus mutan con facilidad, solo hibridarán los cebadores que tengan suficiente homología con la secuencia del virus que se quiere amplificar. Además, debido a la variabilidad genética intrínseca en el gen VP1, que determina el genotipo, es necesario el uso de diferentes parejas de primers, ya que cada una detecta con mayor facilidad diferentes serotipos y solo hibridarán los cebadores que tengan suficiente homología con la secuencia del serotipo de PTV en las muestras, a priori desconocido.

En un primer screening se utilizaron los primers I2 y V2 para el Round 1, y II2 y VI2 para el Round 2.

Para el Round 1 se siguió el siguiente protocolo:

Tabla 5*Set-up de la PCR para el Round 1*

2x Sensifast OneStep (Mastermix)	25 µl
Agua	7,5 µl
Retrotranscriptasa	0,5 µl
Inhibidor	1 µl
Oligo forward I2 (10 µM)	3 µl
Oligo reverse V2 (10 µM)	3 µl
RNA	10 µl

La solución Sensifast contiene los componentes necesarios para que la PCR tenga lugar (tampón, polimerasa, dNTPs...).

Tras depositar todos estos componentes en los pocillos de una placa, de manera que en cada pocillo hay un volumen final de 50 μ l, ésta se sella con una tapa, se centrifuga y se lleva al termociclador, que en este caso se trata de un termociclador BioRad MiniOpticon. En el termociclador se introdujo el siguiente protocolo térmico:

Tabla 6

Protocolo térmico para el Round 1

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	45 °C	15 min
1	95 °C	5 min
30x	94 °C	15 s
	58 °C	60 s
	72 °C	1 min
1x	72 °C	7 min

Se trata de una PCR “hot start” en la que el centro catalítico de la DNA polimerasa está bloqueado por un anticuerpo que se degradará a 95 °C permitiendo la actividad enzimática, asegurando así que se preserve la actividad de la enzima hasta el momento de la utilización.

Una vez terminada esta primera amplificación, se prepara la segunda PCR (Round 2), en la que se utiliza el segundo par de primers siguiendo el siguiente protocolo:

Tabla 7

Set-up de la PCR para el Round 2

2x Sensifast (Mastermix)	25 μ l
Agua	9 μ l
Oligo forward II2 (10 μ M)	3 μ l
Oligo reverse VI2 (10 μ M)	3 μ l
cDNA	10 μ l

El cDNA que se añade a cada pocillo se toma de la placa del Round 1. Tras añadir todos los componentes obteniendo un volumen final de 50 μ l por pocillo, se sella la placa con una tapa, se centrifuga y se lleva al termociclador, en el que se introduce el siguiente protocolo térmico:

Tabla 8*Protocolo térmico para el Round 2*

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	5 min
30x	94 °C	15 s
	58 °C	30 s
	72 °C	1 min
1x	72 °C	7 min

Una vez terminada esta segunda PCR se lleva este producto amplificado a una electroforesis. Se emplea un gel de agarosa al 2% preparado a partir de buffer TAE (Tris-Acetato 0,4 M, EDTA 0,01 M) en el que se añade MIDORI GREEN al 0,005% como agente revelador, y se carga cada pocillo con una muestra, así como el marcador de pesos moleculares de 100 bp (IBIANLAB, referencia: I03-B05). Se cargan las muestras mezclando 8 µl de cada uno de los pocillos de la placa de PCR con 2 µl de buffer de carga (IBIANLAB, referencia: I05-LB05, composición: 0,25% Bromphenol blue sodium Salt, 0,25% Xylene cyanol FF, 15% Ficoll 400), y se pone la electroforesis a correr a 100 V durante unos 25 minutos. Una vez terminado se lleva al transiluminador para documentar el gel.

A medida que no se iban obteniendo los resultados esperados, se fueron haciendo diferentes screenings. Por tanto, a continuación, se llevó a cabo el mismo proceso que el relatado anteriormente utilizando las siguientes dos parejas de primers: I1 (forward) y V1 (reverse) para el Round 1 y II1 (forward) y VI1 (reverse) para el Round 2, con la única diferencia de que, en este caso, se baja la temperatura del periodo de hibridación de los primers en el protocolo térmico del termociclador para que sea más parecida a la temperatura de melting indicada en el artículo. De esta manera, las partes del protocolo que se han llevado a cabo a 58 °C en el caso anterior, ahora se realizan a 54 °C.

De aquellas muestras que no se obtuvo un amplicón compatible se realizó una última amplificación con el objetivo de enviar todas las muestras posibles a secuenciar. Se utilizaron los primers 5I (forward) y 5IV (reverse), y 5II (forward) y 5V (reverse).

En este caso, no se trata de una PCR anidada como ocurría con las otras dos parejas de primers, sino que los primers generan unos productos de amplificación que se solapan, de manera que en los dos fragmentos amplificados con cada pareja de primers va a haber una zona de la secuencia común. Por tanto, solo se realiza una única ronda de PCR, pero con un mayor número de ciclos para conseguir más producto amplificado.

Para el set-up de esta PCR se sigue el mismo protocolo que para el Round 1 de las reacciones anteriores (Tabla 5), así como el mismo protocolo térmico cambiando los 30 ciclos por 40 (Tabla 6).

Los productos de amplificación seleccionados tras las electroforesis fueron enviados a un laboratorio externo, STAB VIDA, que llevó a cabo la secuenciación Sanger. Los electroferogramas obtenidos de los sentidos directos e inversos se alinearon en UGENE ver.37 software en comparación a la secuencia de referencia de la proteína VP1 obtenida de GenBank NCBI.

5. RESULTADOS

5.1 DETECCIÓN DE TESCHOVIRUS PORCINO MEDIANTE RT-qPCR

De las 127 muestras analizadas por RT-qPCR para la detección de PTV, 20 de ellas (15,7%) resultaron positivas. En la siguiente tabla se muestra el número de muestras analizadas de cada tipo y cuantas de ellas resultaron positivas, así como el rango de valores Cq.

Tabla 9

Resultados RT-qPCR

Muestra	Nº muestras analizadas	Nº positivos	Rango Cq
Pulmón	9	0	
Líquido pericárdico	7	1	35,4
Corazón	7	0	
Hígado	7	1	37,55
Tonsila	9	0	
Bazo	7	1	35,28
Linfonodo mediastínico	7	0	
Linfonodo mesentérico	9	2	36,36 – 37
Intestino	7	1	25,95
Hisopo rectal	7	6	30,51 – 36,7
Riñón	7	0	
Exudado ocular	7	1	34,99
Exudado nasal	7	1	30,68
Exudado oral	7	3	31,39 – 35,13
Exudado bronquial	7	1	36,34
Testículo	5	0	
Encéfalo	9	0	
Heces	2	2	26,55 – 31,97

El valor Cq correspondiente para cada muestra positiva se calcula a partir de las curvas obtenidas tras la amplificación, en las que aparece representada la fluorescencia frente al número de ciclos.

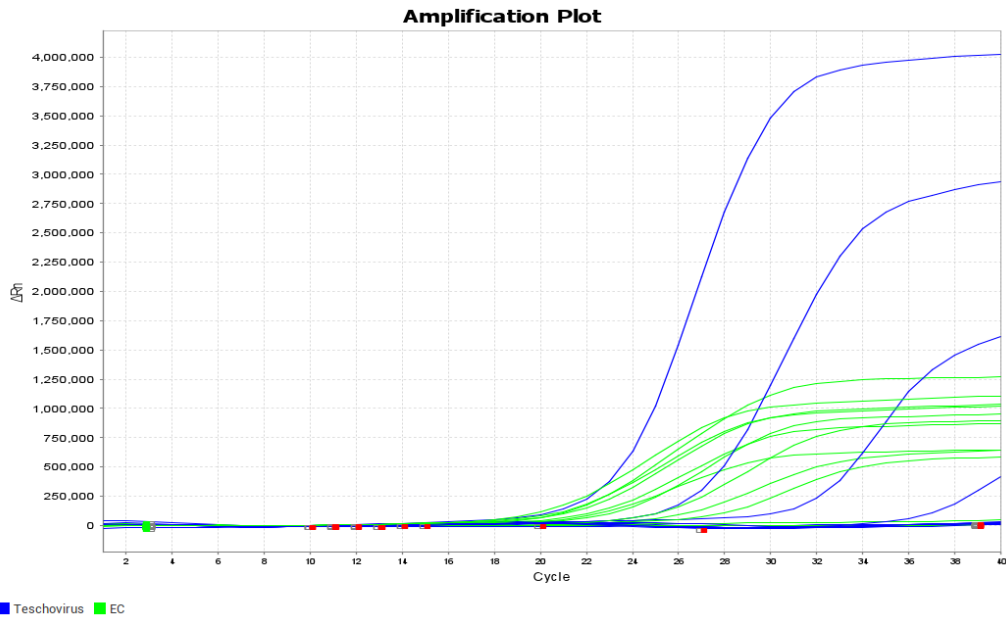


Figura 1. Curvas de amplificación de un lote de 12 muestras. En azul aparecen las curvas correspondientes al PTV y en verde al control endógeno. El control positivo corresponde a la curva azul con valor C_q 23, por lo que en este caso resultaron positivas 2 muestras.

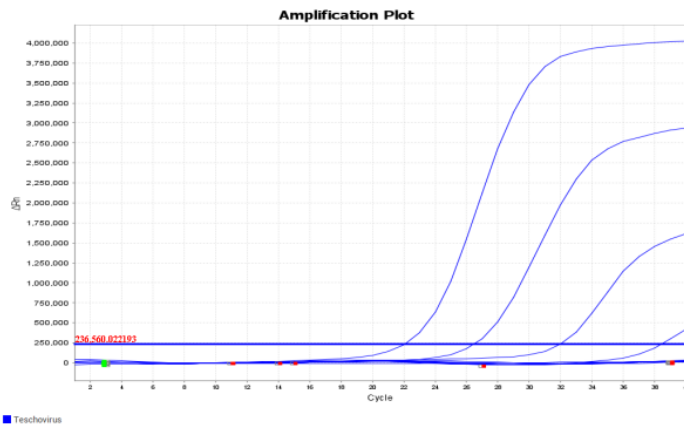


Figura 2. Curvas de amplificación del PTV de un lote de 12 muestras con su correspondiente threshold.

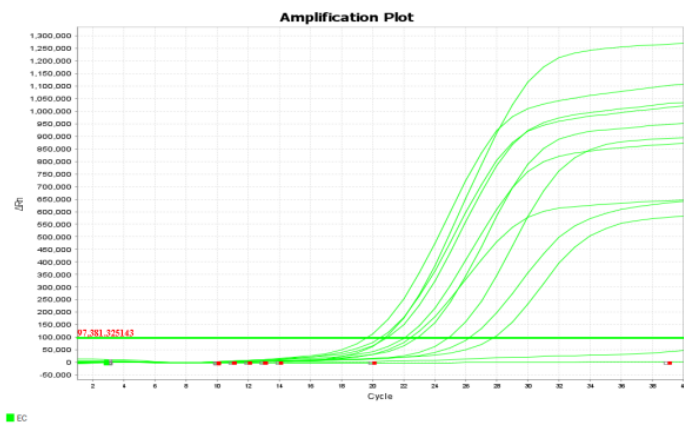


Figura 3. Curvas de amplificación del control endógeno de un lote de 12 muestras con su correspondiente threshold.

5.2 SECUENCIACIÓN

De las 20 muestras positivas finalmente se seleccionaron 10 para su secuenciación, especificadas en el apartado de “materiales y métodos”, lo que supone un 7,9% de las muestras iniciales.

Tras las correspondientes ampliaciones y electroforesis de estas diez muestras descritas en “materiales y métodos” se documentaron los geles para poder analizarlos.

1.1 Primers I2 y V2 para el Round 1, y II2 y VI2 para el Round 2

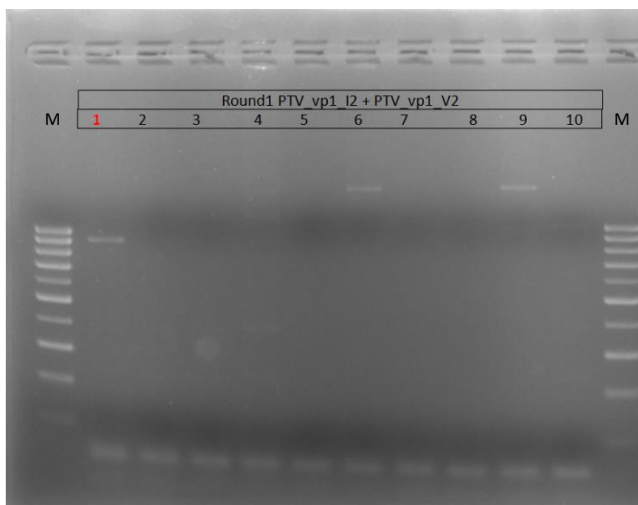


Figura 4. Gel cargado con el Round 1 (primers I2, V2).
Temperatura de hibridación de los cebadores: 60 °C.

M: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 bp con banda cada 100 bp.

Se observa una banda de 0,95 kb en la muestra número 1 (hisopo rectal). El tamaño esperado para las bandas de este Round es de 1 kb.

En rojo aparece indicada la muestra finalmente seleccionada para la secuenciación.

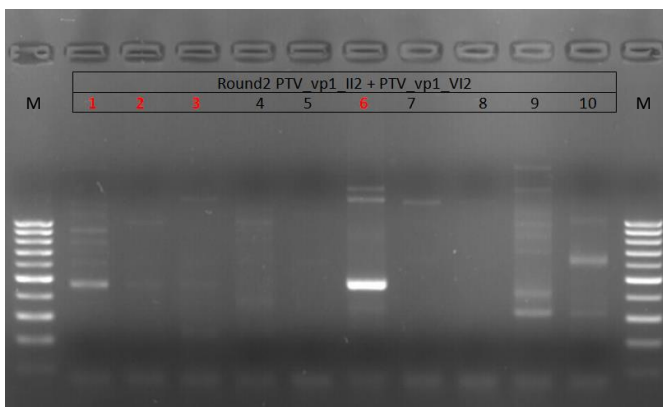
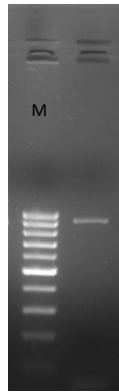


Figura 5. Gel cargado con el Round 2 (primers II2, VI2).
Temperatura de hibridación de los cebadores: 60 °C.

M: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 bp con banda cada 100 bp.

Se observan bandas de 0,45 kb en las muestras número 1 (hisopo rectal), 2 (exudado nasal), 3 (exudado oral) y 6 (exudado oral). Las bandas de las muestras 2 y 3 son muy tenues, mientras que en la muestra 6 la banda es especialmente visible. Sin embargo, el tamaño esperado para las bandas de este Round sería 0,25 kb. En rojo aparecen indicadas las muestras finalmente seleccionadas para la secuenciación.

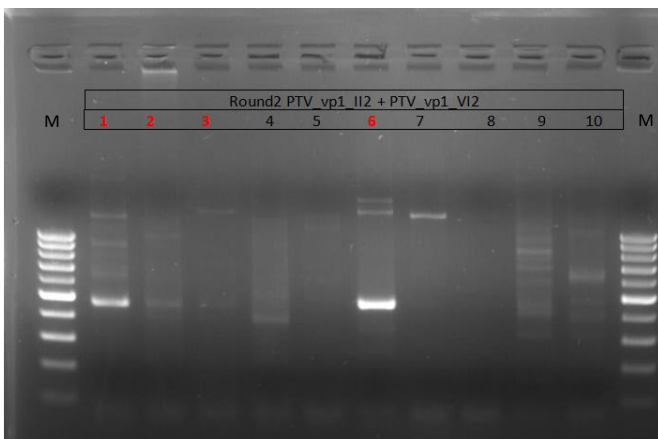
Se repitió la amplificación y electroforesis de la muestra 1 del Round 1 y del Round 2 a una temperatura de hibridación de 58 °C.



M: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 bp con banda cada 100 bp.

Se observa una banda clara y limpia de un tamaño aproximadamente similar al esperado, 1 kb.

Figura 6. Gel cargado con la muestra 1 del Round 1 (primers I2, V2). Temperatura de hibridación de los cebadores: 58 °C.

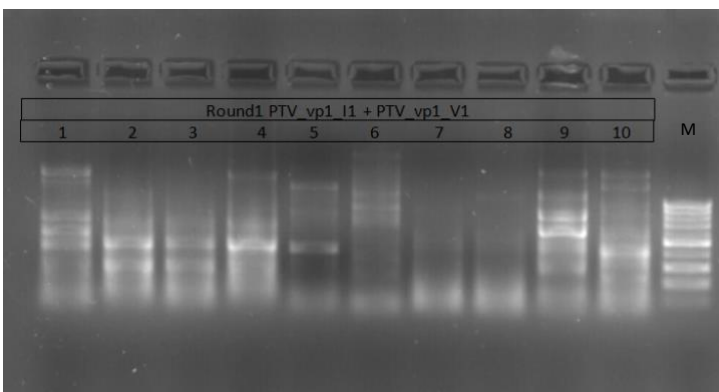


M: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 bp con banda cada 100 bp.

Se observan unos resultados similares a los que se obtuvieron la primera vez que se utilizaron estos primers a 60 °C, pues se obtienen bandas de 0,45 kb en las muestras 1,2,3 y 6. También se puede observar una banda de aproximadamente 0,35 kb en la muestra 4 (intestino). En rojo aparecen indicadas las muestras finalmente seleccionadas para la secuenciación.

Figura 7. Gel cargado con el Round 2 (primers II2, VI2). Temperatura de hibridación de los cebadores: 58 °C.

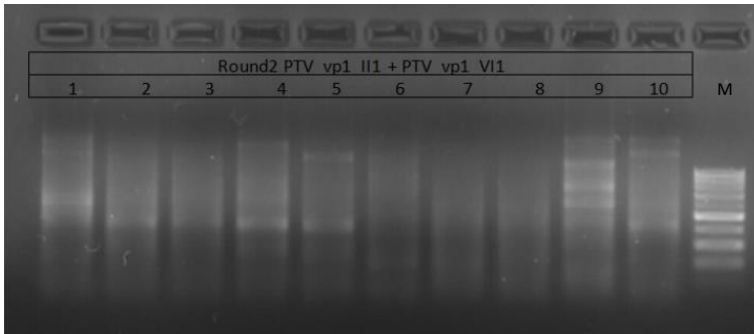
1.2 Primers I1 y V1 para el Round 1, y II1 y VI1 para el Round 2



M: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 bp con banda cada 100 bp.

No se observa ninguna banda clara del tamaño esperado (aproximadamente 1 kb).

Figura 8. Gel cargado con el Round 1 (primers I1 y V1).



M: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 bp con banda cada 100 bp.

Se observan algunas bandas tenues en torno a las 350 bp. El tamaño esperado de las bandas para este Round es de 0,25 kb.

Figura 9. Gel cargado con el Round 2 (primers II1 y VI1).

1.3 Primers 5I y 5IV, y 5II y 5V

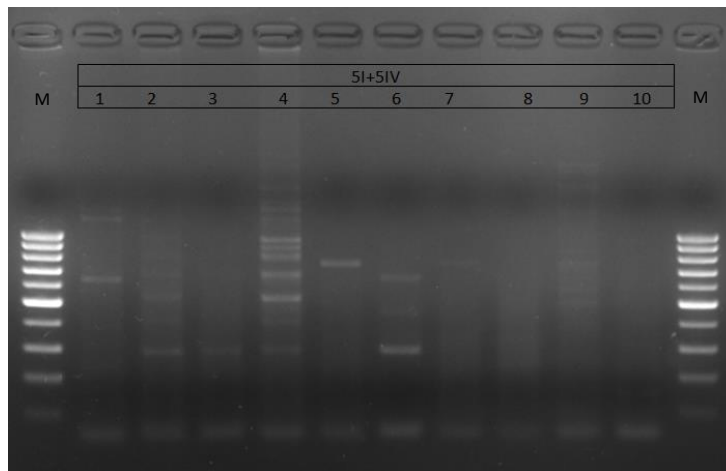


Figura 10. Gel cargado con los fragmentos amplificados con los primers 5I y 5IV.

M: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 bp con banda cada 100 bp.

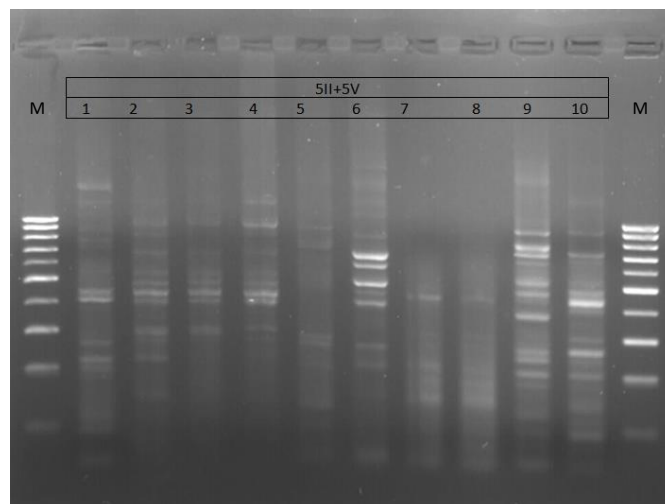


Figura 11. Gel cargado con los fragmentos amplificados con los primers 5II y 5V.

M: marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 bp con banda cada 100 bp.

En ninguno de los dos geles aparecen bandas del tamaño esperado, que en este caso serían de 0,6 kb.

Tabla 10

Resumen de los resultados de las electroforesis

Nº muestra	Primers I2+V2, II2+VI2		Primers I1+V1, II1+VI1		Primers 5I+5IV, 5II+5V	
	I2+V2	II2+VI2	I1+V1	II1+VI1	5I+5IV	5II+5V
1	Banda 0,95 kb	Banda 0,45 kb	No banda	No banda	No banda	No banda
2	No banda	Banda tenue 0,45 kb	No banda	Banda tenue 0,35 kb	No banda	No banda
3	No banda	Banda tenue 0,45 kb	No banda	Banda tenue 0,35 kb	No banda	No banda
4	No banda	Banda 0,35 kb	No banda	Banda tenue 0,35 kb	No banda	No banda
5	No banda	No banda	No banda	Banda tenue 0,35 kb	No banda	No banda
6	No banda	Banda 0,45 kb	No banda	No banda	No banda	No banda
7	No banda	No banda	No banda	No banda	No banda	No banda
8	No banda	No banda	No banda	No banda	No banda	No banda
9	No banda	No banda	No banda	No banda	No banda	No banda
10	No banda	No banda	No banda	Banda tenue 0,35 kb	No banda	No banda
Tamaño de banda esperado	1 kb	0,25 kb	1 kb	0,25 kb	0,6 kb	0,6 kb

Teniendo en cuenta estos resultados, se enviaron finalmente a un servicio externo de secuenciación (STAB VIDA) la primera muestra amplificada con los primers I2 y V2 del Round 1 (Fig. 6), y las muestras 1,2,3,4 y 6 amplificadas con los primers II2 y VI2 del Round 2 (Fig. 7).

A partir del análisis de los electroferogramas obtenidos tras la secuenciación, se obtuvo que las bandas de 0,45 kb observadas en el Round 2 no corresponden a PTV sino a *Moraxella spp*, una bacteria que forma parte de la microbiota del tracto respiratorio en vertebrados y que puede llegar a causar infecciones oportunistas (López-Serrano et al., 2020). Para el resto de los productos no se obtuvo ninguna secuencia concluyente ya que los picos de los electroferogramas no estaban bien definidos.

6. DISCUSIÓN

El estudio realizado demostró la presencia de teschovirus porcino en los animales bajo estudio. Estos resultados evidencian la utilidad de las nuevas técnicas moleculares para identificar patógenos en la sanidad animal. En este caso, se puede confirmar la eficacia de las técnicas de PCR basadas en sondas de hidrólisis para la detección de PTV asociado a una clínica.

Sin embargo, este trabajo también pone en valor la complejidad que presenta el diagnóstico de los procesos clínicos, pues el diagnóstico debe basarse en la combinación de, por un lado, la detección del agente etiológico, en este caso mediante PCR en tiempo real, y por otro lado en la descripción rigurosa de los signos clínicos. Aquí es donde recae una de las principales dificultades de este estudio, ya que la afectación neurológica causada por PTV puede provocar afectaciones heterogéneas, con severidad variable y en ocasiones signos atípicos, lo que provoca que los signos que se presentan en las granjas no siempre se observen de la misma manera que en casos descritos en la bibliografía. Estas limitaciones dificultaron la consecución de un diagnóstico mediante el establecimiento de una relación entre los signos clínicos y las evidencias moleculares.

Las muestras con resultado positivo evidenciaron principalmente la presencia del virus en muestras relacionadas con el sistema digestivo, especialmente aquellas con un valor Cq más bajo y por tanto aquellas donde el virus se encontraba en mayor cantidad. Como ya se comentó en el inicio de este trabajo, el teschovirus porcino es un agente endémico presente en los cerdos a nivel intestinal, por lo que es habitual encontrar animales portadores con ninguna o muy limitada implicación clínica a nivel entérico. Además, según el modelo feco-oral de transmisión de este virus, la presencia del PTV en muestras como los exudados nasales y orales podría ser indicativa de una contaminación (Chiu et al., 2014). Ambos hechos anteriores hacen que los hallazgos en este tipo de muestras no sean significativos.

Por el contrario, sí que hubiera sido relevante evidenciar el virus en localizaciones sistémicas, pero los resultados positivos obtenidos en este tipo de muestras, como líquido pericárdico, hígado o bazo, presentan valores Cq muy altos, motivo por el que no somos capaces de darles un valor diagnóstico. Una posible hipótesis que podría explicar los elevados valores Cq en estas muestras es la rápida eliminación del virus por los mecanismos de defensa inmune del hospedador, pues podría presentar anticuerpos previos debido a la presencia generalizada del teschovirus porcino en las granjas abordadas en el estudio (Yamada et al., 2009). Hubiera sido especialmente valioso detectar PTV en encéfalo, ya que la enfermedad asociada a su infección provoca encefalitis (Vreman et al., 2020), pero las 9 muestras analizadas de este órgano han resultado negativas.

Una de las limitaciones encontradas a lo largo de este análisis ha sido no poder acceder a estudios complementarios. Los animales presentaban signos de enfermedad nerviosa en los que el PTV podría ser uno de los agentes infecciosos, aunque no el único. Por tanto, otras técnicas diagnósticas como la histopatología habrían aportado información valiosa sobre el tipo de infección, describiendo posibles alteraciones en tejido nervioso del encéfalo, pudiendo confirmar hallazgos compatibles con una encefalitis de etiología vírica.

Respecto a la secuenciación, los resultados no han sido fructíferos, pues no se ha podido obtener ninguna secuencia de PTV. El trabajo de secuenciación iba enfocado a una caracterización por genotipado, para ello, como se indica en la bibliografía, se intentaron obtener las secuencias parciales del gen VP1. Sin embargo, la región asociada a VP1 es muy variable, por lo que a pesar de utilizar los cebadores basados en el gen codificante de esta proteína y los protocolos térmicos publicados por Cano-Gómez en 2011 y 2013 (Cano-Gómez et al., 2011, 2013), de forma literal o incluyendo algunas modificaciones, no hubo éxito.

Uno de los factores que ha dificultado en mayor medida la secuenciación es los bajos títulos virales encontrados por qPCR. Estas cantidades de patógeno son escasas para la técnica de secuenciación Sanger (Valencia et al., 2013).

Siguiendo con las limitaciones, no se conocía el serotipo de PTV con el que se estaba trabajando, por lo que es posible que la secuencia del gen VP1 de ese serotipo presentara baja similitud con los primers utilizados. La variabilidad del gen VP1 es la que permite caracterizar los serotipos, pero también podría hacer que los primers no tengan suficiente homología con el material genético que se quiere secuenciar. Además, dado que se trata de un virus endémico, quizá sea más sencillo que ocurran eventos de coinfección de diferentes cepas en un rebaño, aumentando potencialmente el riesgo de recombinación del genoma, añadiendo variabilidad genética tal vez no detectada hasta la fecha, dificultando así el diseño de primers suficientemente homólogos a la secuencia de partida.

Una posible solución futura para minimizar las limitaciones mencionadas podría ser, en vez de limitarse únicamente a la secuenciación de Sanger, en la que dependemos de cantidad de material genético de partida y de homología de los primers, utilizar otros métodos de secuenciación como Next Generation Sequencing (NGS). Esta técnica proporciona una cobertura más profunda de las regiones genómicas de interés, así como permite detectar y cuantificar variantes de baja frecuencia (Grada & Weinbrecht, 2013), por lo que podría ser una alternativa que generaría nuevas oportunidades al no depender tanto de la falta de homología entre cebadores y muestras.

Además de estas posibles futuras aproximaciones, también se podrían intentar mejorar los resultados analizando una mayor cantidad de muestras con el objetivo de obtener valores Cq más bajos o utilizando otros primers diferentes con suficiente homología para intentar favorecer el éxito en la secuenciación.

Teniendo todo esto en cuenta, se puede ultimar que, aunque se ha explorado en profundidad la conexión entre la detección del agente etiológico y la enfermedad, no se puede concluir con los resultados obtenidos y la información disponible que el brote de enfermedad se deba a teschovirus porcino, a pesar de que los animales tuvieran signos compatibles con una enfermedad de tipo nervioso. Esta conclusión se debe a la falta de evidencia de la presencia del PTV en el sistema nervioso central o en localizaciones sistémicas, lo que descartaría a este agente como causa de este brote. Sin embargo, implementando las posibles soluciones mencionadas, como el acceso a estudios histopatológicos, el uso de diferentes primers o la secuenciación mediante métodos menos limitados, en un futuro estudio se podría obtener información relevante para la resolución diagnóstica de este proceso clínico.

7. CONCLUSIONES

- 1) Las técnicas de PCR basadas en sondas de hidrólisis son eficaces para la detección de teschovirus porcino asociado a una clínica, ya que permitieron demostrar la presencia de PTV en los animales bajo estudio.
- 2) La mera detección molecular del agente etiológico (PTV) no es suficiente para definir un diagnóstico. Un análisis completo deberá evidenciar la presencia de PTV en localizaciones compatibles, fuera del sistema digestivo, y relacionarla con la descripción de signos clínicos.
- 3) Bajos títulos virales dificultan la secuenciación Sanger.
- 4) El uso de otras técnicas diagnósticas como la histopatología o la secuenciación masiva podrían aportar información que permitiera confirmar hallazgos compatibles con una encefalitis de etiología vírica.

CONCLUSIONS

- 1) PCR techniques based on hydrolysis probes are effective for the detection of clinic-associated porcine teschovirus, since they allowed demonstrating the presence of PTV in the animals under study.
- 2) The mere molecular detection of the etiologic agent (PTV) is not sufficient to define a diagnosis. A complete analysis should demonstrate the presence of PTV in compatible locations, outside the digestive system, and relate it to the description of clinical signs.
- 3) Low viral titers hinder Sanger sequencing.
- 4) The use of other diagnostic techniques such as histopathology or massive sequencing could provide information that could confirm findings compatible with encephalitis of viral etiology.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boros, Á., Nemes, C., Pankovics, P., Bíró, H., Kapusinszky, B., Delwart, E., & Reuter, G. (2012). Characterization of a novel porcine enterovirus in wild boars in Hungary. *Archives of Virology*, *157*(5), 981-986. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1255-5>
- Buitrago, D., Cano-Gómez, C., Agüero, M., Fernandez-Pacheco, P., Gómez-Tejedor, C., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2010). A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *22*(5), 763-766. <https://doi.org/10.1177/104063871002200519>
- Cano-Gómez, C., García-Casado, M. A., Soriguer, R., Palero, F., & Jiménez-Clavero, M. A. (2013). Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain. *Veterinary Microbiology*, *165*(1-2), 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.022>
- Cano-Gómez, C., Palero, F., Buitrago, M. D., García-Casado, M. A., Fernández-Pinero, J., Fernández-Pacheco, P., Agüero, M., Gómez-Tejedor, C., & Jiménez-Clavero, M. ángel. (2011). Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, *11*(8), 2144-2150. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.014>
- Carnero, J., Prieto, C., Polledo, L., & Martínez-Lobo, F. J. (2018). Detection of Teschovirus type 13 from two swine herds exhibiting nervous clinical signs in growing pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(2), e489-e493. <https://doi.org/10.1111/tbed.12762>
- Chiu, S. C., Hu, S. C., Chang, C. C., Chang, C. Y., Huang, C. C., Pang, V. F., & Wang, F. I. (2012). The role of porcine teschovirus in causing diseases in endemically infected pigs. *Veterinary Microbiology*, *161*(1-2), 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.031>
- Chiu, S. C., Yang, C. L., Chen, Y. M., Hu, S. C., Chiu, K. C., Lin, Y. C., Chang, C. Y., & Wang, F. I. (2014). Multiple models of porcine teschovirus pathogenesis in endemically infected pigs. *Veterinary Microbiology*, *168*(1), 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.019>
- Deng, M. Y., Millien, M., Jacques-Simon, R., Flanagan, J. K., Bracht, A. J., Carrillo, C., Barrette, R. W., Fabian, A., Mohamed, F., Moran, K., Rowland, J., Swenson, S. L., Jenkins-Moore, M., Koster, L., Thomsen, B. V., Mayr, G., Pyburn, D., Morales, P., Shaw, J., ... Metwally, S. (2012). Diagnosis of Porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *24*(4), 671-678. <https://doi.org/10.1177/1040638712445769>
- Donin, D. G., de Arruda Leme, R., Alfieri, A. F., Alberton, G. C., & Alfieri, A. A. (2014). First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, *46*(3), 523-528. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0523-z>
- Exopol. (s. f.). *EXOone Porcine Teschovirus oneMIX qPCR kit*. Recuperado 28 de noviembre de 2023, de <https://www.exopol.com/es/>

- Grada, A., & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: Methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(8). <https://doi.org/10.1038/jid.2013.248>
- Janitz, Michal. (2008). *Next-generation genome sequencing: towards personalized medicine*. Wiley-VCH.
- Liang, W., Wu, X., Ding, Z., Zhong, S., Qian, X., Ye, P., Liu, H., Chen, Z., Zhang, J., Cao, H., Hu, G., Luo, J., Li, Z., Ding, N., & Hu, R. (2023). Identification of a novel porcine Teschovirus 2 strain as causative agent of encephalomyelitis in suckling piglets with high mortality in China. *BMC Veterinary Research*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03549-1>
- Liu, S., Zhao, Y., Hu, Q., Lv, C., Zhang, C., Zhao, R., Hu, F., Lin, W., & Cui, S. (2011). A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of porcine teschovirus, classical swine fever virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Journal of Virological Methods*, 172(1-2), 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.12.023>
- López-Serrano, S., Galofré-Milà, N., Costa-Hurtado, M., Pérez-De-Rozas, A. M., Aragon, V., & Aragon, V. (2020). Heterogeneity of Moraxella isolates found in the nasal cavities of piglets. *BMC Veterinary Research*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2250-9>
- NIAID. (2018). *NIAID Emerging Infectious Diseases/Pathogens*. Recuperado 10 de febrero de 2024, de <https://www.niaid.nih.gov/research/emerging-infectious-diseases-pathogens#>
- Qiu, Z., Wang, Z., Zhang, B., Zhang, J., & Cui, S. (2013). The prevalence of porcine teschovirus in the pig population in northeast of China. *Journal of Virological Methods*, 193(1), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.005>
- Ray, P. K., Desingu, P. A., Anoopraj, R., Singh, R. K., & Saikumar, G. (2020). Identification and genotypic characterization of porcine teschovirus from selected pig populations in India. *Tropical Animal Health and Production*, 52(3), 1161-1166. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02114-7>
- Rosa, G. La, Muscillo, M., Grazia, A. Di, Fontana, S., Iaconelli, M., & Tollis, M. (2006). *Validation of RT-PCR Assays for Molecular Characterization of Porcine Teschoviruses and Enteroviruses*. <http://www.postgresql.org>
- Stäubli, T., Rickli, C. I., Torgerson, P. R., Fraefel, C., & Lechmann, J. (2021). Porcine teschovirus, sapelovirus, and enterovirus in Swiss pigs: multiplex RT-PCR investigation of viral frequencies and disease association. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(5), 864-874. <https://doi.org/10.1177/10406387211025827>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (s. f.-a). *Modelos del sistema de PCR en tiempo real QuantStudio*. Recuperado 29 de diciembre de 2023, de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/quantstudio-systems/models.html>

- Thermo Fisher Scientific Inc. (s. f.-b). *Sistema de PCR digital QuantStudio Absolute Q*. Recuperado 29 de diciembre de 2023, de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/digital-pcr/quantstudio-absolute-q-system.html>
- Usherwood, E. J., & Nash, A. A. (1995). Lymphocyte recognition of picornaviruses. En *Journal of General Virology*.
- Valencia, C. A., Pervaiz, M. A., Husami, A., Qian, Y., & Zhang, K. (2013). *Sanger Sequencing Principles, History, and Landmarks* (pp. 3-11). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9032-6_1
- Vreman, S., Caliskan, N., Harders, F., Boonstra, J., Peperkamp, K., Ho, C. K. Y., Kuller, W., & Kortekaas, J. (2020). Two novel porcine teschovirus strains as the causative agents of encephalomyelitis in the Netherlands. *BMC Veterinary Research*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2275-0>
- Yamada, M., Kozakura, R., Nakamura, K., Yamamoto, Y., Yoshii, M., Kaku, Y., Miyazaki, A., Tsunemitsu, H., & Narita, M. (2009). Pathological Changes in Pigs Experimentally Infected with Porcine Teschovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 141(4), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.05.002>
- Yang, T., Li, R., Yao, Q., Zhou, X., Liao, H., Ge, M., & Yu, X. (2018). Prevalence of porcine teschovirus genotypes in hunan, china: Identification of novel viral species and genotypes. *Journal of General Virology*, 99(9), 1261-1267. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001129>
- Yang, T., Lu, Y., Zhang, L., & Li, X. (2020). Identification of novel genotypes belonging to the species Teschovirus A from indigenous pigs in western Jiangxi, China. *Archives of Virology*, 165(4), 993-1001. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04525-6>
- Zhang, B., Guo, R., Xiao, L., Zhong, C., Yuan, X., Huang, J., Zhu, X., Zhou, J., Fan, B., Xue, T., Liu, C., Zhu, X., Li, J., & Li, B. (2023). Analysis on the genome of a teschovirus type 1 isolates with swine diarrhea. *Heliyon*, 9(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14710>
- Zhang, C., Wang, Z., Hu, F., Liu, Y., Qiu, Z., Zhou, S., Cui, S., & Wang, M. (2013). The survey of porcine teschoviruses in field samples in China with a universal rapid probe real-time RT-PCR assay. *Tropical Animal Health and Production*, 45(4), 1057-1061. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0312-0>