

Ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBR Green para la detección del virus de la diarrea epidémica porcina



<https://cu-id.com/2248/v45e05>

SYBR Green-based real-time PCR assay for the detection of porcine epidemic diarrhea virus

Danilo Granda Moncayo¹, Freddy Proaño Pérez¹, Ana D. Garrido Haro², Maritza Barrera Valle^{3*}

¹Departamento Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica del Ejército, Ecuador.

²Laboratorio de Biología Molecular, Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario (AGROCALIDAD). Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas. Código Postal 170518. Quito, Ecuador.

³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí. Av. Urbina y Che Guevara. Portoviejo, Ecuador.

RESUMEN: La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad contagiosa producida por el virus del mismo nombre que es clasificado dentro del género *Alphacoronavirus*, familia *Coronaviridae*. Este virus produce diarrea, vómitos y pérdida de peso en cerdos de todas las edades, pero en los cerditos neonatos alcanza una morbilidad y mortalidad de hasta el 100%. En Ecuador, fue diagnosticada por primera vez en el 2014 mediante PCR convencional o en punto final. Actualmente existe la necesidad de contar con un ensayo ultrasensible, específico, que permita trabajar un gran número de muestras para facilitar la vigilancia epidemiológica de nuevos brotes y detectar animales portadores. Se desarrolló y evaluó un ensayo de PCR en tiempo real con un colorante intercalador de ADN como el SYBR Green para detectar el virus de la DEP (VDEP) en heces de cerdos, con cebadores que tienen como diana el gen N del virus. En la evaluación de la sensibilidad analítica se utilizó un patrón de ARN del VDEP sintetizado en el laboratorio, determinándose que el límite de detección del ensayo desarrollado fue de 4 copias de ARN del VDEP, comparando con la PCR en punto final que fue 100 veces más sensible, la especificidad del ensayo se basó en la posibilidad de detectar falsos positivos mediante la curva de disociación. Los valores de Ct (valor umbral) en el análisis intra e inter-ensayo mostraron coeficientes de variación válidos. En la evaluación del desempeño diagnóstico, el ensayo detectó 18 muestras positivas de un total de 52 para un 100% de concordancia con el PCR en punto final. Se concluye que el ensayo de PCR en tiempo real con SYBR Green desarrollado es altamente sensible, específico, reproducible y rápido para el diagnóstico del VDEP en homogenados de mucosa intestinal de cerdos.

Palabras clave: PCR en tiempo real, SYBR Green, diarrea epidémica porcina, gen N.

ABSTRACT: Porcine epidemic diarrhea (PED) is a contagious disease caused by its virus, classified within the genus *Alphacoronavirus*, family *Coronaviridae*. This virus causes diarrhea, vomiting and weight loss in pigs of all ages, especially in neonatal piglets, with morbidity and mortality of up to 100%. In Ecuador, the disease was diagnosed for the first time in 2014 by conventional or endpoint PCR. Currently, there is a need for an ultrasensitive and specific assay, which allows working a large number of samples to facilitate epidemiological surveillance of new outbreaks and detect carrier animals. A real-time PCR assay intercalating DNA dyes such as SYBR Green was developed and assessed to detect PED virus (PEDv) in swine feces with primers targeting the N-gene of the virus. A PEDv RNA standard synthesized in the laboratory was used in the assessment of the analytical sensitivity. The detection limit of the developed assay was determined to be 4 copies of PEDv RNA, compared to endpoint PCR which was 100 times more sensitive. Assay specificity was based on the possibility of detecting false positives using the melting curve. Cycle threshold (Ct) values in intra- and inter-assay analysis showed valid coefficients of variation. When assessing diagnostic performance, the assay detected 18 positive samples out of a total of 52 for 100 % agreement with the endpoint PCR. It is concluded that the developed SYBR Green-based real-time PCR assay is highly sensitive, specific, reproducible and rapid for the detection of PEDv in swine intestinal mucosa homogenates.

Key words: real-time PCR, SYBR Green, porcine epidemic diarrhea, N gene.

INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) está clasificado dentro del subgénero *Pedacovirus* del género *Alphacoronavirus*, familia *Coronaviridae*, Orden Nidovirales, es un virus envuelto, de genoma ARN de cadena simple y polaridad positiva (1). Este virus produce diarrea, vómitos y pérdida de peso en cerdos de todas las edades, pero en los cerditos neonatos alcanza una morbilidad y mortalidad de hasta el

100% (2). Hasta el año 2012 no se tenían registros de brotes de VDEP en el hemisferio occidental, ni en Australia. Hasta que en el 2013 se confirmaron numerosos brotes de cepas de este virus en Estados Unidos (EE.UU), las cuales tenían una similitud mayor al 99,5% con aislados de China (2, 3). Entre 2013 y 2014 fue diseminada por casi todos los estados y hacia Canadá y México, causando pérdidas millonarias en estos países (4).

*Autor para la correspondencia: maritza.barrera@utm.edu.ec

Recibido: 21/04/2023

Aceptado: 12/06/2023

El primer brote del VPED en Ecuador se diagnosticó mediante PCR en punto final (5) en el 2014 y fue notificado a la OMSA. Se determinó la alta identidad genética del aislado ecuatoriano con los aislados de EE. UU. y China (6). La enfermedad está controlada, pero se realiza el seguimiento epidemiológico de los brotes de diarrea porcina.

Existen otros virus que producen diarrea en el cerdo y dentro de la familia *Coronaviridae* se encuentran los virus del género *Deltacoronavirus* y otro del género *Alphacoronavirus*, como el virus de la gastroenteritis transmisible (GET), y es imposible realizar el diagnóstico etiológico de un brote de diarrea en cerdos mediante métodos clínico-epidemiológicos. Estos coronavirus porcinos comparten algunos epítopes antigénicos, por lo que los inmunoensayos deben diseñarse utilizando anticuerpos monoclonales específicos, de forma que eliminen las reacciones cruzadas. Los ensayos basados en la PCR detectan el ARN viral en las muestras clínicas rápidamente y con alta sensibilidad y especificidad, pues se pueden diseñar cebadores que tengan como diana zonas específicas del gen N dado que es conservado dentro de cada especie (7).

Como está documentado, el tipo salvaje cepas del VDEP aisladas de diferentes regiones/países alrededor del mundo han mostrado una considerable variación genética y en virulencia, lo que ha dificultado el diagnóstico correcto y retrasado la intervención para el control el brote (7, 8).

Por lo tanto, es de gran importancia desarrollar nuevos ensayos de diagnóstico con un amplio espectro de detección de las variantes genéticas del VDEP responsables de los brotes de diarrea.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un ensayo ultrasensible, específico, rápido y que permita el procesamiento de un mayor número de muestras que el PCR en punto final, para detectar el ARN del VDEP en muestras de heces de cerdos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cebadores para PCR en tiempo real y PCR en gel del VDEP

Se diseñaron parejas de cebadores mediante el programa Primer 3Plus (9) a partir de la secuencia del gen N de la cepa OH851 del VDEP (No. de acceso a GenBank: KJ399978.1). Se diseñaron dos parejas de cebadores para el diagnóstico por PCR en tiempo real con SYBR Green y una pareja para la generación del estándar de ARN utilizado en la determinación del límite de detección. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por MACROGEN en Seúl, Corea. La lista de cebadores utilizados en este estudio se describe en la **Tabla 1** y el esquema de la posición en el gen N de los amplicones generados en la **Figura 1**.

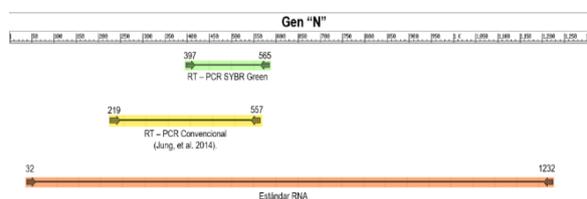


Figura 1. Esquema del gen N de la cepa OH851 del virus de DEP y la posición de los amplicones generados por las parejas de cebadores utilizadas en esta investigación. / *Diagram of the N gene of PED virus OH851 strain and the position of the amplicons generated by the primer pairs used in the research.*

Generación del estándar de ARN

Para la generación del estándar de ARN se utilizó como molde, el aislado ecuatoriano Cotopaxi, 2014 (5). En la **figura 1**, se observa la posición nucleotídica del estándar en el gen N de la cepa OH851. La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el Kit MegaScript (Ambion), en un volumen de reacción de

Tabla 1. Cebadores utilizados en este estudio. / *Primers used in the study.*

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)
PCR en tiempo real con SYBR Green		
DEPNF397	AGATTGTTGAACCTAACACA	169
DEPNR565	ATTATTATTGCCCTCTCTGT	
RT-PCR en punto final (Jung et al., 2014)		
DEPNF219	GCATTCTACTACCTCGGAACA	338
DEPNR557	CTCCACGACCCTGGTTATTT	
Obtención del ADN molde para la generación del estándar de ARN		
DEPNF32	GCAAACGGGTGCCATTATCC	1201
DEPN1-1232R	TCAGATGGCACACCCACATC	
DEPNF32	GCAAACGGGTGCCATTATCC	1230
DEPNR1232 T7	*AATACGACTCACTATAGGGTCAGATGGCACACCCACATC	

* Marcado en negrita la secuencia mínima del promotor de transcripción del fago T7

20 µL a partir de 210 ng de DNA molde, incubando a 37°C durante 6 horas. El ARN obtenido fue purificado con el Kit RNeasy Mini (Qiagen) y almacenado a -70°C. La concentración del estándar de ARN fue determinada mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

PCR en tiempo real basado en SYBR Green (qPCR-SYBR) y PCR en punto final

Tanto en el protocolo de la qPCR-SYBR Green en evaluación como en la PCR en punto final (10) se realizó la reacción de reverso transcripción separada de la de PCR, con la enzima M-MLV (Invitrogen) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Se estandarizó el protocolo de la PCR en tiempo real utilizando el SYBR Green PCR Master Mix (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Se determinó la concentración de los cebadores y el perfil térmico óptimos, seleccionando las condiciones en que no se formaban dímeros de cebadores y no aumentaba el valor del Ct. Se utilizó el equipo LightCycler 480 II Software 1.2 (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Para la PCR en punto final, se utilizó el Kit GoTaq Hot Start Polymerase (Promega) y los cebadores DEPNF219 y DEP NR557 (10) en concentración de 0,4 M. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con SYBR Safe (Invitrogen) al 0,01 %.

Validación del ensayo PCR en tiempo real basado en SYBR Green

Para la evaluación de la sensibilidad analítica y la repetibilidad intra e inter ensayos se utilizaron diluciones del ARN estándar obtenido en diluciones seriadas 1: 10 que van desde 4×10^8 copias hasta 4×10^1 copias de ARN. Las mismas diluciones del estándar se utilizaron para determinar el límite de detección de la RT-qPCR-SYBR y del PCR en punto final.

La especificidad del ensayo de RT-qPCR-SYBR establecido se evaluó utilizando el ARN de tres virus porcinos como el virus de la GET, peste porcina clásica (PPC) y del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRS), los cuales se sometieron al análisis mediante el ensayo desarrollado. La evaluación de la especificidad se determinó a través de la temperatura de disociación determinando el pico de la curva de disociación.

La repetibilidad intra y entre ensayos se evaluó realizando el ensayo de RT-qPCR-SYBR a cuatro diluciones del estándar, seleccionadas por sus valores de Cp bajos (19-22) y altos (28-33). Cada dilución se sometió a tres pruebas paralelas bajo las condiciones de amplificación optimizadas, y se calculó el coeficiente de variación de tres réplicas de la misma corrida y entre corridas efectuadas en tres días diferentes. por el mismo operador. La Desviación Estándar y el Coefi-

ciente de Variación fueron calculados con el programa Microsoft Excel 2013.

Eficiencia diagnóstica

Se prepararon muestras de homogenado de raspado de la mucosa intestinal y el contenido intestinal de 49 porcinos enfermos con diarrea, preparados al 10% en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El ARN de cada muestra fue extraído a partir de 200 µL de cada muestra, utilizando 500 µL del TRIzol (LIFE Technologies) y siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN precipitado se disolvió en 50 µL de H₂O libre de nucleasa (Promega). El ARN de cada muestra fue evaluado por el ensayo de RT-qPCR-SYBR estandarizado. De estas muestras intestinales 18 eran positivas por PCR en punto final, considerándolas verdaderas positivas y el resto habían sido negativas.

RESULTADOS

Protocolo de PCR en tiempo real -SYBR Green optimizado

Las condiciones del protocolo del ensayo RT-qPCR-SYBR estandarizado fueron las siguientes:

La mezcla del PCR final contenía 0,4 µM de cada cebador, 2 µL de FastStart DNA Master SYBR Green I (3,2 µL de MgCl₂, 25 mM) (concentración final de 5 mM), 5 µL del c-ADN molde; la temperatura óptima de alineamiento seleccionada fue de 58° C. El volumen de reacción fue de 20µL.

El perfil de temperatura optimizado fue: 95°C, 10:00; 45 ciclos (95°C, 0:15; 60°C, 1:00) y la generación de la curva de disociación 60°C a 95°C.

Sensibilidad analítica del ensayo de RT-PCR en tiempo real basado en SYBR Green

Se generó el estándar de ARN a partir de la cepa Cotopaxi 2014, con una concentración de 526 ng / µL (8.52×10^{11} copias de ARN / µL), con el cual se prepararon las diluciones de estándar para determinar la cantidad mínima de ARN que detecta el ensayo en evaluación.

Se obtuvieron las curvas de fluorescencia típica hasta la dilución 9 que corresponde a 4 copias de ARN (Figura 2 A). Por lo que el límite de detección del ensayo es de 4 copias de RNA por cada 5 µL de ARN añadidos en el paso de la reverso transcripción. Se obtuvo una línea recta en la curva estándar de Cp contra concentración (Figura 2 B), por lo que hay un aumento de la fluorescencia inversamente proporcional al número de copias de ARN en la muestra. El ensayo muestra que en todas las diluciones del estándar, el pico de la curva de disociación del producto de PCR se encuentra a una temperatura de 83°C (Figura 2 C).

Comparando con el límite de detección de la PCR en punto final se obtuvo que el producto de la PCR se podía visualizar (Figura 3) hasta el carril 4, que

corresponde con el producto obtenido con la dilución de 4000 copias de ARN.

Especificidad analítica

La temperatura de disociación (T_m) de los productos generados en la PCR en tiempo real basado en SYBR Green, con los ARN de los virus PPC, PRRS y GET fue diferente a 83°C que es la T_m del producto de PCR de los primers DEP NF397 y DEP NR565 (Figura 4), por lo que el ensayo resultó ser específico para la detección del VDEP.

Repetibilidad intra e interensayo

En el experimento de repetibilidad intra ensayo el coeficiente de variación (CV) osciló entre 0,64% y 1,06% (Tabla 2) y en la evaluación inter ensayo estuvo entre 0,79% y 1,07% (Tabla 3). Se observó una variación un poco mayor cuando las muestras tenían poco ARN. Estos datos indicaron que el ensayo fue repetible con baja variabilidad.

Los valores del coeficiente de varianza (CV) mostrados en el análisis intra ensayo son aceptables y dentro de un rango estimado. Se estima valores de CV menores a 1% cuando la cantidad de DNA inicial está entre 100 y 100 000 copias, y valores mayores a 1% para menos de 100 copias. Además, se conoce que los CV aumentan en pruebas inter ensayo (11).

Eficiencia Diagnóstica

Los resultados del ensayo de RT-PCR en tiempo real-SYBR Green coincidieron al 100%, con la RT-PCR en punto final. Se detectó el ARN de DEP mediante el ensayo estandarizado en las 18 muestras verdaderas positivas de animales enfermos de diarrea epidémica porcina del total de 52 muestras analizadas. El resto (34 muestras) fueron negativas por ambas técnicas.

DISCUSIÓN

La variabilidad genética del gen S entre cepas de virus DEP de diferentes países, origen y año de aislamiento (12, 13), hacen que no sea una diana recomendable para el diseño de cebadores para el diagnóstico directo del VDEP en muestras clínicas. Se seleccionó como diana de la PCR en tiempo real al gen N, pues esta región genómica es relativamente más conservada dentro de la misma especie viral que los genes de las otras proteínas estructurales del virus a pesar de que se conoce que los virus ARN de cadena simple tienen una alta tasa de mutación (14). Además, el ARNm que codifica para la proteína N del virus es más abundante en las células infectadas (15). Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia del gen N de la cepa OH851 del VDEP de EE.UU. (16), debido a la similitud genética del gen S de esta cepa con el aislado ecuatoriano Cotopaxi 2014 (6).

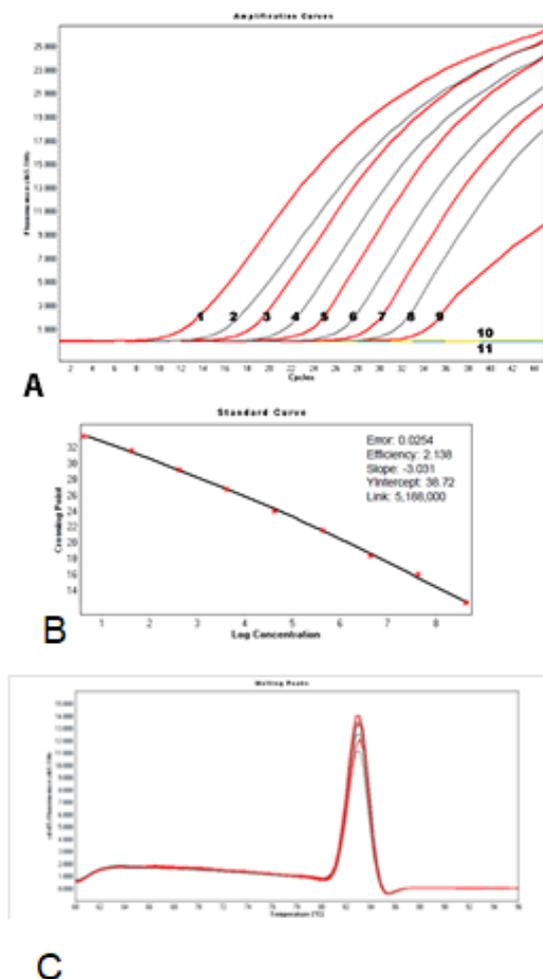


Figura 2. Resultados de la prueba de la sensibilidad analítica del ensayo PCR en tiempo real-SYBR Green. A: Curvas de amplificación de las muestras generadas con diluciones base 10 del ARN estándar generado. B: Curva estándar. C: Curva de disociación del ensayo. Número de copias de ARN probadas: 1.- ($4 \cdot 10^{08}$); 2.- ($4 \cdot 10^{07}$); 3.- ($4 \cdot 10^{06}$); 4.- ($4 \cdot 10^{05}$); 5.- ($4 \cdot 10^{04}$); 6.- ($4 \cdot 10^{03}$); 7.- ($4 \cdot 10^{02}$); 8.- ($4 \cdot 10^{01}$); 9.- ($4 \cdot 10^{00}$); 10.- ($4 \cdot 10^{-01}$); 11: agua libre de nucleasas. / Analytical sensitivity test results of the SYBR Green- based real-time PCR assay. A: Amplification curves of samples generated with base 10 dilutions of the standard RNA generated. B: Standard curve. C: Assay dissociation curve. Number of RNA copies tested: 1.-($4 \cdot 10^{08}$); 2.-($4 \cdot 10^{07}$); 3.-($4 \cdot 10^{06}$); 4.-($4 \cdot 10^{05}$); 5.-($4 \cdot 10^{04}$); 6.-($4 \cdot 10^{03}$); 7.-($4 \cdot 10^{02}$); 8.-($4 \cdot 10^{01}$); 9.-($4 \cdot 10^{00}$); 10.-($4 \cdot 10^{-01}$); 11.-nuclease-free water.

Se conoce que la principal ventaja de la PCR en tiempo real, en cualquiera de sus formatos, es su mayor sensibilidad frente al PCR en punto final, el ensayo de PCR en tiempo real estandarizado detecta hasta 4 copias del ARN del VDEP, 1000 veces menor que la PCR convencional. Esto se traduce en una mayor posibilidad de hacer un diagnóstico temprano de la enfermedad. Otra ventaja es que posibilita la cuantificación de la carga viral a través del número de copias de ARN del virus que se encuentran presentes en la muestra (7). Otros ensayos de PCR en tiempo real basados en SYBR Green precedentes, tuvieron un límite de detección más alto: 10^3 copias (17), $3,46 \times 10^1$ (18)

y 10 copias (19) de ADN plasmídico utilizado como estándar. Estos resultados no son comparables con los del presente estudio, donde en la determinación de la sensibilidad de la prueba, está incluida la reacción de reverso-transcripción, lo que es un requisito para determinar la sensibilidad de la PCR de diagnóstico de un virus de genoma ARN, pues la reacción de transcripción reversa influye en la sensibilidad (20). El estándar de ARN obtenido, permitió determinar la mínima cantidad de ARN del VDEP en la muestra que el ensayo es capaz de detectar.

Los ensayos de PCR en tiempo real que se han documentado para el diagnóstico del VDEP están basados en sondas TaqMan principalmente (7), pero también se ha usado SYBR Green (17-19). La ventaja principal de estos ensayos de PCR en tiempo real, es que puede detectar el ARN del VDEP con alta sensibilidad y especificidad en cualquier muestra de origen fecal. Las células diana de la infección del VDEP son los enterocitos del intestino delgado y del colon del cerdo, por lo que el ARN viral está presente en los tejidos intestinales y las heces durante 2 a 15 días, aunque puede extenderse por 49 días (8). Aunque cada método tiene claras ventajas en la presentación de resultados, las sondas TaqMan tienen una alta especificidad, pero esto a pesar de ser una ventaja, también resulta una desventaja pues, en el caso que haya una variación genética en la zona diana de la sonda, da lugar a falsos negativos.

Se eligió un ensayo de PCR en tiempo real con SYBR Green debido a su sencillez y que no conlleva la utilización de una sonda, por lo que tiene la capacidad de detectar diferentes variantes genéticas, además porque brinda la posibilidad de utilizar el análisis de las curvas de disociación, lo que le proporciona un mayor nivel de especificidad, al poder determinar que

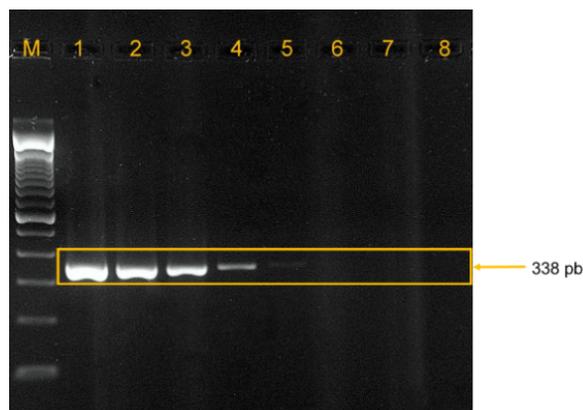


Figura 3. Electroforesis de los productos de amplificación de las diluciones del estándar de ARN por PCR en punto final. M: Marcador de peso molecular de 100 pb. Número de copias de ARN probadas: 1.- ($4 \cdot 10^{07}$); 2.- ($4 \cdot 10^{06}$); 3.- ($4 \cdot 10^{05}$); 4.- ($4 \cdot 10^{04}$); 5.- ($4 \cdot 10^{03}$); 6.- ($4 \cdot 10^{02}$); 7.- ($4 \cdot 10^{01}$); 8.- agua libre de nucleasas. / *Electrophoresis of the amplification products of PCR endpoint RNA standard dilutions. M: 100 bp molecular weight marker. Number of RNA copies tested: 1.- ($4 \cdot 10^{07}$); 2.- ($4 \cdot 10^{06}$); 3.- ($4 \cdot 10^{05}$); 4.- ($4 \cdot 10^{04}$); 5.- ($4 \cdot 10^{03}$); 6.- ($4 \cdot 10^{02}$); 7.- ($4 \cdot 10^{01}$); 8.- nuclease-free water.*

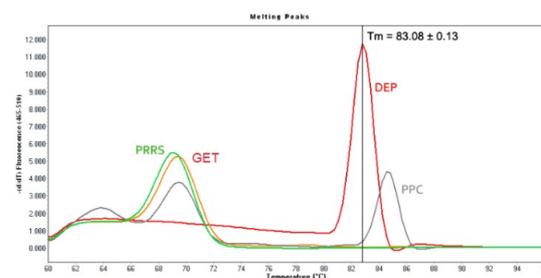


Figura 4. Curva de disociación en el análisis de los virus PPC, PRRS y GET mediante la RT-qPCR-SYBR. / *Dissociation curve in the analysis of CSF, PRRS and TGE viruses by RT-qPCR-SYBR.*

Tabla 2. Variación intra-ensayo del valor de Cp de tres réplicas de diferentes concentraciones de ARN. / *Cp value intra-assay variation of three replicates of different RNA concentrations.*

Copias ARN	Cp*			CV (%)
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
($4 \cdot 10^{02}$)	31.89	32.32	32.48	0.93
($4 \cdot 10^{03}$)	28.97	29.58	29.20	1.06
($4 \cdot 10^{05}$)	21.76	21.97	22.03	0.64
($4 \cdot 10^{06}$)	20.01	19.68	19.99	0.96

Cp= Ciclo umbral (Crossing point)

Tabla 3. Variación inter ensayo del valor de Cp de diferentes concentraciones de ARN en tres días diferentes. / *Cp value inter-assay variation of different RNA concentrations on three different days.*

Copias ARN	Cp* promedio			CV (%)
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
($4 \cdot 10^{02}$)	32.23	32.78	32.54	1.07
($4 \cdot 10^{03}$)	29.25	30.99	30.18	0.94
($4 \cdot 10^{05}$)	21.92	24.91	25.08	1.00
($4 \cdot 10^{06}$)	19.89	22.74	22.59	0.79

Cp= Ciclo umbral (Crossing point)

la fluorescencia es emitida por el amplicón específico (21), como se comprobó durante la validación del ensayo desarrollado.

Se estandarizó el ensayo realizando la reacción de transcripción reversa y la PCR en tiempo real en dos reacciones separadas, aunque se alarga en 1 hora el tiempo de obtener los resultados, tiene la ventaja de que si el resultado de la prueba es negativo, el ADN complementario obtenido usando random hexámeros, puede ser utilizado para el diagnóstico de otros coronavirus que producen diarrea en el cerdo como el virus de la GET (1), Delta coronavirus (22) y del virus del síndrome de la diarrea aguda porcina (SADCoV) que pertenece al subgénero *Sarbecovirus* (23). Este ADN complementario se podría utilizar incluso para el diagnóstico de estos virus por PCR en punto final.

Hay que señalar que en general se busca aumentar la rapidez en la emisión de los resultados y la tendencia a nivel internacional es desarrollar sistemas de diagnóstico por PCR en tiempo real y en formato multiplex, pero también son más costosos y en el diagnóstico veterinario en los países en vías de desarrollo, solo se justifica su uso en una enfermedad de alto impacto económico y bajo programa de vigilancia (24, 25).

En la determinación de la eficacia diagnóstica la prueba desarrollada detectó el VDEP en todas las muestras verdaderas positivas.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo de PCR en tiempo real basado en SYBR Green para la detección del VDEP, que además permite la cuantificación del número de copias genómicas. Este ensayo puede detectar de forma sensible la presencia del VDEP en muestras intestinales de cerdos, lo que apoya su uso como un método de vigilancia rápido y fiable para diagnosticar la diarrea epidémica porcina.

REFERENCIAS

1. Liu Q, Gerds V. Transmissible gastroenteritis virus of pigs and porcine epidemic diarrhea virus (coronaviridae). Encyclopedia of Virology. Elsevier; 2021. p. 850-3.
2. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. Vet J. 2015;204(2):134-43.
3. Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. Emerging Infect Dis. 2014;20(5):917-9.
4. Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. Clin Exp Vaccine Res. 2015;4(2):166-76.
5. Garrido A, Barrera M, Vaca M, Acosta A. Primer reporte de diagnóstico molecular de diarrea epidémica porcina en Ecuador. Ecuador es Calidad. 2015;2(2): 15-19.
6. Barrera M, Garrido-Haro A, Vaca MS, Granda D, Acosta-Batallas A, Pérez LJ. Tracking the origin and deciphering the phylogenetic relationship of porcine epidemic diarrhea virus in Ecuador. Biomed Res Int. 2017 ;2017:2978718. <https://doi.org/10.1155/2017/2978718>
7. Olech M. Current state of molecular and serological methods for detection of porcine epidemic diarrhea virus. Pathogens. 2022;11(10): 1074 <https://doi.org/10.3390/pathogens11101074>.
8. Jung K, Saif LJ, Wang Q. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. Virus Res. 2020;286:198045):1-13
9. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 2012;40(15):e115. doi: [10.1093/nar/gks596](https://doi.org/10.1093/nar/gks596). Epub 2012 Jun 22. PMID: 22730293; PMCID: PMC3424584.)
10. Jung K, Wang Q, Scheuer KA, Lu Z, Zhang Y, Saif LJ. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. Emerging Infect Dis. 2014;20(4):662-5.
11. Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. J Biol Regul Homeost Agents. 2004;18(2):212-4.
12. Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira A, et al. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. Emerging Infect Dis. 2014;20(10):1620-8.
13. Li F, Zeng Y, Zhang R, Peng K, Jiang C, Xu Z, et al. Genetic variations in S gene of porcine epidemic diarrhoea virus from 2018 in Sichuan Province, China. Vet Med Sci. 2020;6(4):910-8.
14. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. Annu Rev Microbiol. 1997;51:151-78.
15. Siddell S, Wege H, ter Meulen V. The structure and replication of coronaviruses. Curr Top Microbiol Immunol. 1982;99:131-63.
16. Huang Y-W, Dickerman AW, Piñeyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. MBio. 2013;4(5):e00737-13. doi: [10.1128/mBio.00737-13](https://doi.org/10.1128/mBio.00737-13).
17. Zhou X, Zhang T, Song D, Huang T, Peng Q, Chen Y, et al. Comparison and evaluation of conventional RT-PCR, SYBR green I and TaqMan real-time RT-PCR assays for the

- detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cell Probes*. 2017;33:36-41.
18. Han H-Y, Zheng H-H, Zhao Y, Tian R-B, Xu P-L, Hou H-L, et al. Development of a SYBR green I-based duplex real-time fluorescence quantitative PCR assay for the simultaneous detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine circovirus 3. *Mol Cell Probes*. 2019;44:44-50.
 19. Zheng L-L, Cui J-T, Han H-Y, Hou H-L, Wang L, Liu F, et al. Development of a duplex SYBR Green? based real-time PCR assay for detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine bocavirus3/4/5. *Mol Cell Probes*. 2020;51:101544.
 20. Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AFM. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depend on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem*. 2002;307(1):63-9.
 21. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997;245(2):154-60.
 22. Duan C. An updated review of porcine deltacoronavirus in terms of prevalence, pathogenicity, pathogenesis and antiviral strategy. *Front Vet Sci*. 2021;8:811187.
 23. Zhou P, Fan H, Lan T, Yang X-L, Shi W-F, Zhang W, et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*. 2018 ;556(7700):255-8.
 24. Bolivar AM, Rojas A, Lugo PG. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*. 20143(1): 25-33
 25. World Organisation for Animal Health. Chapter 2.1.2. Biotechnology Advances in the Diagnosis of Infectious Diseases. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 9]. p. 20. Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.02_B_IOTECH_DIAG_INF_DIS.pdf.

Conflicto de intereses. Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

Contribución de los autores. **Danilo Granda:** Investigación, Escritura-borrador original. **Freddy Proaño:** Conceptualización; Validación. **Ana Garrido:** Investigación; Administración de Proyecto. **Maritza Barrera:** Conceptualización; Supervisión; Redacción: revisión y edición.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)