Revisión e investigación de la detección y análisis filogenético del síndrome de diarrea aguda porcina por coronavirus en China

Fuente

LING ZHOU[1,2], YUAN SUN[1,2], TIAN LAN[1], RUITING WU[1,2], JUNWEI CHEN[3], ZIXIAN WU[3], QINGMEI XIE[1,2], XIANGBIN ZHANG[1,2,3], JINGYUN MA[1,2].

[1]. *College of Animal Science, South China. Agricultural University, Guangzhou, China. Key Laboratory of Animal Health. Aquaculture and Environmental Control,*
[2]. *Guangzhou, Guangdong, China.*

RESUMEN

El coronavirus que produce el síndrome de diarrea aguda porcina (SADS-CoV), se descubrió por primera vez en el sur de China en enero de 2017 y causó un brote a gran escala de enfermedad diarreica mortal en lechones. En estas páginas, llevamos a cabo una investigación retrospectiva de 236 muestras de 45 granjas porcinas diferentes con antecedentes clínicos de enfermedad diarreica con el fin de evaluar la aparición y la distribución de SADS-CoV en cerdos de China. Nuestros resultados sugieren que SADS-CoV se ha desarrollado en China al menos desde agosto de 2016. Mientras tanto, se detecta una prevalencia de SADS-CoV (43,53%), delta coronavirus porcino (8,83%), virus de diarrea epidémica porcina (PEDV) (78,25%) , rotavirus (21,77%) y virus de gastroenteritis transmisible (0,2%), y también encontramos que la coinfección de SADS-CoV y PEDV ocurrió con una mayor frecuencia con una tasa de 17,65%. Examinamos y obtuvimos dos nuevos genomas completos, cinco N y cinco genes S de SADS-CoV.

El análisis filogenético basado en estas secuencias reveló que todas las secuencias de SADS-CoV en este estudio se agruparon con las cepas de SADS-CoV informadas previamente para formar una rama bien definida que se agrupaba con las cepas de coronavirus HKU 2 de murciélago. Este estudio es la primera investigación retrospectiva para SADS-CoV y proporciona la información epidemiológica en porcino de este virus en China, lo que destaca la urgencia de desarrollar medidas efectivas para controlar SADS-CoV.

1.INTRODUCCIÓN

El coronavirus del síndrome de diarrea aguda porcina (SADS-CoV) es un coronavirus descubierto en 2017. Se trata de un virus de ARN monocatenario con un tamaño de genoma de aproximadamente 27 kb (*Gong et al., 2017; Pan et al., 2017 ; Zhou et al., 2018*). SADS-CoV pertenece a la familia *Coronaviridae* que contiene cuatro géneros, *Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (*Woo, Huang, Lau y Yuen, 2010; Woo et al., 2012*). Hasta ahora, se han identificado seis coronavirus de cerdos, que incluyen el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), el coronavirus respiratorio porcino (PRCV), SADS-CoV y el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) que pertenecen al género *Alphacoronavirus*, así como un betacoronavirus, virus de la encefalomielitis hemaglutinante porcina (PHEV) y un deltacoronavirus: el deltacoronavirus porcino (PDCoV) (*Lin, Saif, Marthaler y Wang, 2016; Wesley, Woods y Cheung, 1991; Woo et al., 2010*). Entre estos virus, SADS-CoV es el coronavirus más recientemente descubierto, que se informó por primera vez en 2017 en China y se considera un coronavirus relacionado con HKU2 con un origen de murciélago (*Gong et al., 2017; Zhou et al. , 2018*). En enero de 2017, se detectó SADS-CoV en una granja porcina y posteriormente se propagó rápidamente a otras tres granjas en la provincia de Guangdong, causóando el síndrome de diarrea aguda porcina fatal (SADS), caracterizado por los signos clínicos con diarrea aguda grave y pérdida rápida de peso de lechones. Los síntomas de SADS-CoV son similares a los causados por otros coronavirus entéricos porcinos como PDCoV y PEDV, pero SADS-CoV resulta más dañino que estos virus porque provocó la muerte de casi 25.000 lechones en poco tiempo con pérdidas económicas muy significativas (*Dong et al., 2015; Sun, Wang, Wei, Chen y Feng, 2016; Zhou et al., 2018*). Por lo tanto, es urgente investigar la epidemiología molecular y los patrones de transmisión de SADS-CoV para establecer controles efectivos para este coronavirus.

Para ampliar el presente estudio, realizamos una prueba de PCR retrospectiva en muestras de diarrea de 45 granjas porcinas en la provincia de Guangdong con el objetivo de evaluar la aparición y la distribución de SADS-CoV en cerdos de China. Se proporcionó la información de prevalencia y coinfección de SADS-CoV de once granjas positivas para SADS-CoV. Las secuencias de SADS-CoV, que incluyen dos genomas completos, cinco genes de la proteína nucleocápsida (N) y cinco genes de la proteína espiga (S), también se identificaron y caracterizaron con el fin de investigar las relaciones filogenéticas de SADS-CoV.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recogida de muestras

Se recogieron un total de 236 muestras clínicas de diarrea, incluidas heces y contenido intestinal, de lechones y cerdas de 45 granjas porcinas en las ciudades de Qingyuan y Shaoguan de la provincia de Guangdong del Norte, entre los meses de agosto de 2016 y mayo de 2017, de acuerdo con las recomendaciones de las normas nacionales para animales de laboratorio de la República Popular de China (GB149258-2010). Las muestras se conservaron a -80 ° C desde el momento de la recepción original hasta su uso.

2.2 Extracción de ácido nucleico y diagnóstico molecular.

Las muestras se homogeneizaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (20% p/v), se congelaron y descongelaron tres veces; después se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 g. El ácido nucleico viral se extrajo siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit *Miniprep* de ADN/ARN viral de fluido corporal *AxyPrep*™ (Axygen Scientific, Inc). El ácido nucleico del virus se almacenó a -80°C hasta que se realizó la PCR. Se diseñó un par de cebadores para detectar SADS-CoV basado en el gen N conservado de este virus. Se llevó a cabo igualmente un RT-PCR de un paso con el kit *PrimeScript*™ *One-RT RT-PCR* con *Dye Plus* (Takara, Biotechnology, Dalian, China) para amplificar los fragmentos objetivo mediante el siguiente perfil térmico de 50 °C durante 30 minutos; 94 °C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, recocido a 55° C durante 30 s, una extensión a 72° C durante 30 s, y un paso final de 72° C durante 5 min. Otros cuatro agentes patógenos diarreicos, incluidos PEDV, PDCoV, rotavirus (RV) y TGEV de granjas positivas para SADS-CoV-también fueron probados por RT-PCR de acuerdo con los métodos descritos anteriormente (*Liu, Zhu, Liao, Xu y Zhou, 2015; Mai et al., 2017; Stevenson et al., 2013*).

FIGURA 1
Localizaciones de granjas positivas para el estudio de SADS-CoV en la provincia de Guangdong (China).

2.3 Amplificación del gen N, el gen S y el genoma completo de SADS-CoV

Los pares de cebadores específicos basados en las cepas de SADS-CoV informadas (números de acceso de GenBank: *MF094681-MF094684*) se diseñaron para genes S, genes N y amplificaciones genómicas completas, respectivamente. Los ensayos de PCR se realizaron con el siguiente perfil térmico: 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s, y 72° C durante 1 min 15 s, seguido de 10 minutos finales extensión a 72 °C. Los productos se purificaron siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de purificación de banda de gel (Omega Bio-tek, Estados Unidos) y luego se clonaron en el vector PMD19-T (Takara, Biotechnology, Dalian, China) y se transformaron células competentes E. coli DH5α. Los clones positivos fueron seleccionados y enviados al Instituto de Genómica de Beijing (Shenzhen, Guangdong, China) para una secuenciación adicional.

2.4 Alineación de secuencias y análisis filogenético.

Las secuencias de nucleótidos se ensamblaron y alinearon utilizando el programa *DNASTAR* (*DNAStar V7.1*, Madison, WI, Estados Unidos). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de unión de vecinos en el *software MEGA 7.0* con análisis de arranque de 1.000 réplicas. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxones asociados se agrupan se muestran como ramas cercanas (*Chenna et al., 2003; Kumar, Stecher y Tamura, 2016; Tamura, Nei y Kumar, 2004*).

3. RESULTADOS

3.1 Detección de SADS-CoV

De 236 muestras clínicas de diarrea de 45 granjas porcinas, 53 muestras recogidas de once granjas porcinas entre agosto de 2016 y mayo de 2017 fueron positivas para SADS-CoV y las ubicaciones de estas once granjas se indican en la *Figura 1*. Las granjas SM, GL, DL , DE, TP, WT, DCD y SC estaban en Qingyuan, y las granjas LS, ZW e YX estaban en Shaoguan. De estas once granjas positivas para SADS-CoV, se recogieron un total de 170 muestras de diarrea archivadas que incluyen 55 heces y 115 contenidos intestinales para investigar más a fondo los agentes patógenos diarreicos, incluidos SADS-CoV, PEDV, RV, PDCoV y TGEV. Las tasas de infección de estos cinco patógenos en orden fueron 43,5% (74/170), 78,2% (133/170), 21,8% (37/170), 8,8% (15/170) y 0% (0/170). El SADS-CoV se probó positivamente tanto en las muestras intestinales como en las fecales y las tasas de detección fueron del 49,6% (57/115) y del 30,9% (17/55), respectivamente, que fueron el segundo más alto entre los cinco patógenos evaluados. PEDV tuvo la tasa positiva más alta en 84,3% (97/115) para muestras intestinales y 65,5% (36/55) para muestras fecales. TGEV se probó negativamente en las 170 muestras de diarrea.
También se detectaron los casos de infección individual o coinfección por SADS-CoV, PDCoV, PEDV y RV. Más de la mitad de las muestras solo fueron infectadas por uno de los cuatro virus a una tasa de 58,82% (100/170), y la infección individual de PEDV tuvo la tasa más alta de 37,06% (63/170). En las 74 muestras positivas para SADS-CoV, 28 muestras fueron infectadas solo por SADS-CoV, y el resto 46 muestras fueron infectadas por SADS-CoV combinado con uno a tres patógenos más. La coinfección de SADS-CoV y PEDV se produjo con mayor frecuencia con una tasa del 17,65% (30/170).
Los primeros casos con infección por SADS-CoV-positivo se encontraron en las granjas LS, TP y ZW en agosto de 2016. El contenido intestinal de estas once granjas resultó positivo para SADS-CoV y las tasas positivas oscilaron entre 25% y 77.78%. Mientras que las muestras fecales de dos granjas ZW e YX resultaron negativas para SADS-CoV, pero positivas para infecciones PDCoV, PEDV y RV. Las tasas positivas de SADS-CoV en las muestras fecales de otras nueve granjas variaron de 13,33% a 100%. La granja LS tuvo la tasa positiva más alta de 77,8% (7/9) para muestras intestinales y las granjas DCD y SC tuvieron tasas positivas de 100% para muestras fecales.

3.2 Identidades de secuencia y análisis filogenéticos.

Los dos genomas completos, cinco genes N y cinco genes S fueron secuenciados y disponibles en *GenBank*.

Las longitudes del genoma completo, el gen N y el gen S fueron 27,163 pb, 1,128 pb y 3,390 pb, respectivamente. Las dos nuevas secuencias completas, cinco genes N y cinco secuencias de genes S compartieron identidades de secuencia altas de 99,8%–100%, 99,8%–100% y 99,6%–100%, con genomas completos, genes N y genes S reportados previamente.

Las dos secuencias completas de SADS-CoV mostraron identidades de nucleótidos del 95% al 95,1% con cuatro cepas de coronavirus de murciélago HKU2, y las identidades de nucleótidos entre los genes N de SADS-CoV estudiados aquí y las de las cepas de coronavirus de murciélago HKU2 oscilaron entre 94,2% al 94,3%. Los genes S de SADS-CoV en este trabajo compartieron identidades bajas de nucleótidos de 79,9%–80% con los genes S de las cepas HKU2 de coronavirus de murciélago. Los análisis filogenéticos basados en los genomas completos, los genes N y los genes S indicaron que todas las secuencias SADS-CoV se agruparon para formar una rama y un grupo bien definidos con cuatro cepas HKU2 de coronavirus de murciélago en los árboles filogenéticos de los genomas de longitud completa y los genes N, todas las cepas de SADS-CoV estaban ubicadas filogenéticamente dentro de *AlphaCoV*, mientras que el árbol filogenético de los genes S exhibía que todas las secuencias de SADS-CoV, cuatro cepas de HKU2 de murciélago y dos cepas de *BtRf-AlphaCoV* se separaron de otras secuencias de *AlpaCoV* y se agruparon con las secuencias de *BetaCoV*.

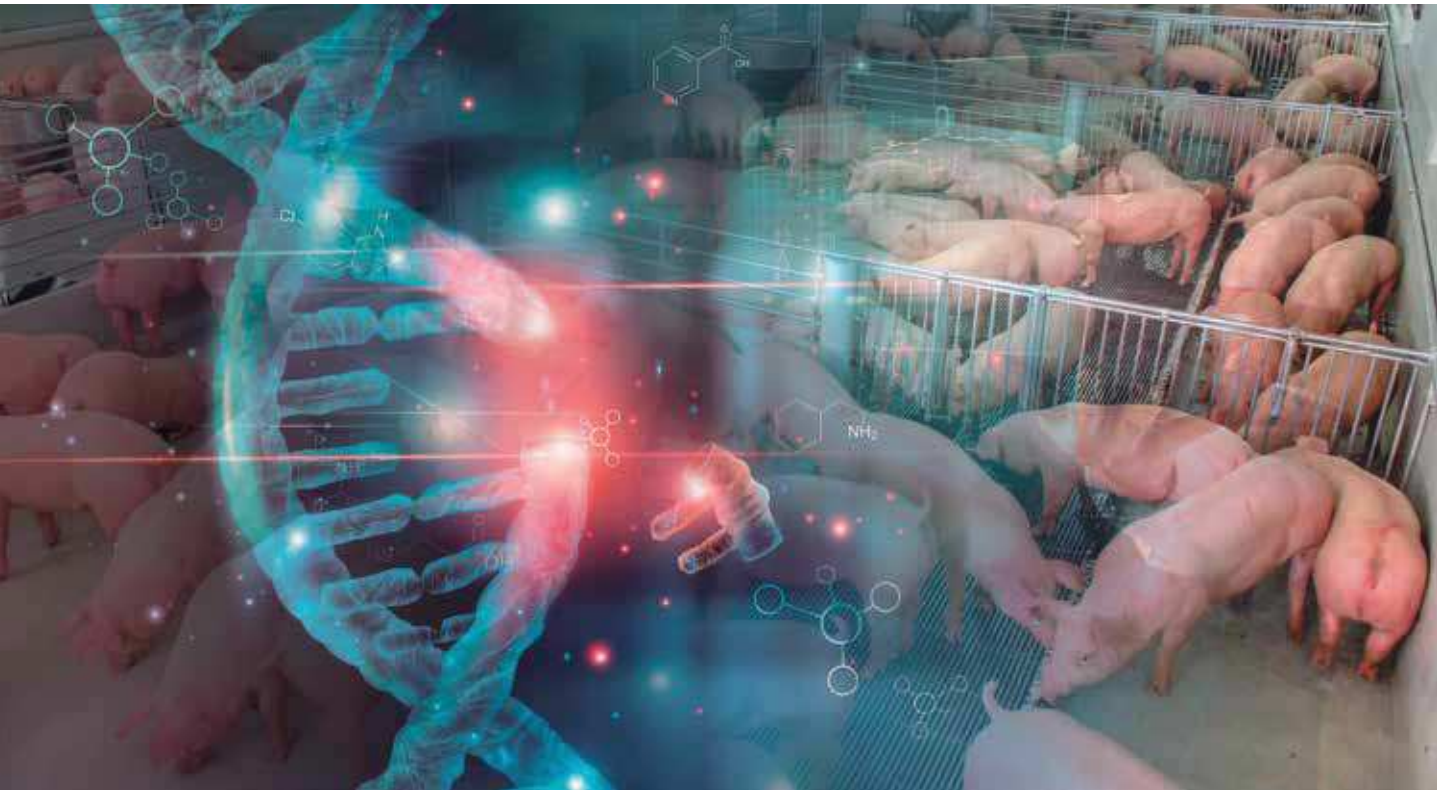
4. DISCUSIÓN

En este estudio retrospectivo y en la investigación realizada en 2017, analizamos 45 granjas porcinas de la provincia de Guangdong con base en 236 muestras de diarrea. Nuestros resultados mostraron que la primera muestra positiva de SADS-CoV se recolectó en agosto de 2016 de la granja LS con antecedentes de diarrea, así como de otras dos granjas TP y ZW, lo que indica que SADS-CoV ha surgido en cerdos en China al menos desde agosto de 2016 (*Zhou et al., 2018*).

Al mismo tiempo, los signos clínicos de SADS-CoV durante la investigación retrospectiva incluyeron vómitos severos y agudos y diarrea, lo que provocó la muerte en lechones de menos de 5 días de edad con una tasa de mortalidad de alrededor del 50%. Estas presentaciones clínicas fueron similares a esos signos en el brote a gran escala de SADS-CoV reportado por Zhou et al. (2018), excepto que la tasa de mortalidad en lechones posteriormente aumentó al 90%.

Con base en las tasas de infección documentadas en nuestro trabajo, se reveló que PEDV (78,25%) seguía siendo la causa principal de la diarrea porcina, lo que es consistente con estudios previos de que se ha considerado que PEDV es el principal patógeno responsable de la diarrea porcina y de la epidemia en China desde 2010 (*Ge et al., 2013; Sun et al., 2012; Zhao et al., 2016*).

Excepto PEDV, SADS-CoV tuvo la segunda tasa de infección alta (43,53%), que exhibe una tendencia

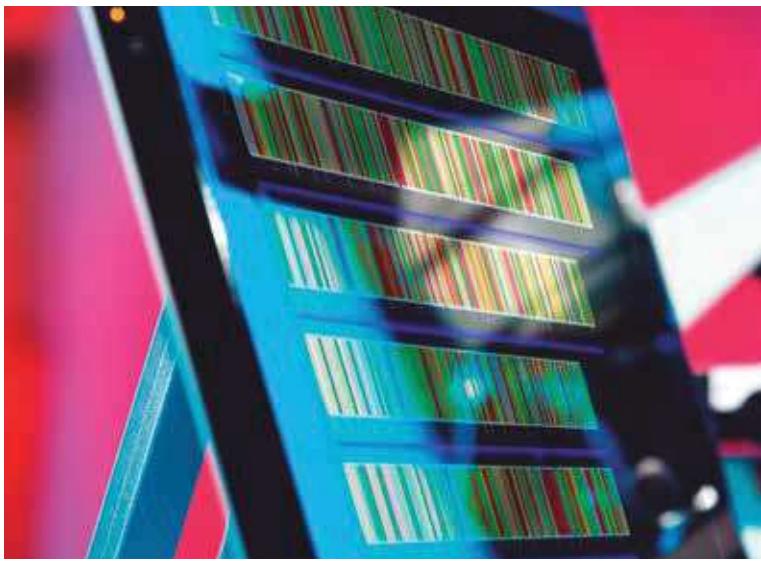


predominantemente evidente en los cerdos. Mientras tanto, de las muestras positivas de SADS-CoV, el 62,2% eran coinfecciones de uno a cuatro virus diferentes, lo que revela una alta prevalencia de coinfección en las granjas analizadas. En particular, nuestros resultados también mostraron que SADS-CoV y PEDV estaban presentes simultáneamente en todas las muestras de coinfección de SADA-CoV.

Considerando el hecho de que PEDV ha causado brotes previos de diarrea porcina en la granja de cerdos donde Zhou et al. (2018) informaron más tarde la aparición de SADS-CoV, PEDV parece ser capaz de contribuir a la infección de SADS-CoV en cerdos. Por lo tanto, SADS-CoV puede ser patógeno como infección secundaria después de la infección por PEDV, pero se necesitan más estudios para comprender mejor la patogénesis de este nuevo coronavirus.

Las relaciones filogenéticas de las secuencias SADS-CoV también se identificaron en este estudio. Los resultados mostraron que todas las secuencias de SADS-CoV se agruparon para formar una rama independiente y se separaron de otras secuencias virales en el género *Alphacoronavirus*. Nuestros resultados también indicaron que tanto los genomas completos, los genes N y los genes S de todas las cepas SADS-CoV compartían los nucleótidos más altos identificados con esas secuencias correspondientes de cuatro cepas HKU2 de coronavirus de murciélago. En este trabajo, los árboles filogenéticos de los genomas de longitud completa y los genes S de las secuencias SADS-CoV mostraron que la rama SADS-CoV se agrupaba con estas cuatro cepas HKU2, lo que es igual a los resultados anteriores (*Gong et al., 2017; Pan et al. ., 2017; Zhou et al., 2018*).

Además de los genomas y los genes S, el árbol de los genes N en nuestro estudio también reveló el mismo resultado. Hasta ahora, se ha informado de un total de ocho genomas de SADS-CoV de longitud completa en



la provincia china de Guangdong (*Gong et al., 2017; Pan et al., 2017; Zhou et al., 2018; este estudio*). Los dos nuevos genomas de secuencias SADS-CoV en este trabajo compartieron identidades de nucleótidos al 100% con la secuencia MF167434 publicada por Gong et al. (2017) y nuestras cuatro secuencias previamente reportadas (*Zhou et al., 2018*), y compartieron el 99,8% de identidades de nucleótidos con la secuencia MF370205 estudiada por Pan et al. (2017). Los resultados sugieren que estas ocho secuencias de SADS-CoV pueden provenir del mismo origen. Solo el árbol filogenético de los genes S en nuestro trabajo mostró que las secuencias de *AlphaCoV* se dividieron en dos sublíneas, *AlphaCoV1* que contenía todas las secuencias *SADS-CoV* y *AlphaCoV2*, agrupadas junto con secuencias de *BetaCoV* y *DelatCov*, respectivamente. Y este resultado fue consistente con el estudio de Pan et al. (2017).

Como un coronavirus recién descubierto, la disponibilidad de datos de secuencias SADS-CoV es limitada, lo que impide una mejor comprensión de la epidemiología molecular de este virus. Mientras tanto, al ser un virus de ARN, SADS-CoV puede mutar rápidamente y exhibir altas diferencias genéticas (*Drummond, Pybus, Rambaut, Forsberg y Rodrigo, 2003; Kühnert, Wu y Drummond, 2011*). Por lo tanto, los nuevos datos de secuencias más disponibles están garantizados para dar una visión profunda del origen genético viral, la evolución y los patrones de transmisión de SADS-CoV.

En resumen, nuestro estudio retrospectivo sugiere que SADS-CoV ha surgido en cerdos en China al menos desde agosto de 2016. Los síntomas clínicos graves y la fuerte transmisión a corto plazo resaltan la urgencia de desarrollar medidas efectivas para controlar este nuevo virus descubierto. Se deben realizar más estudios, como epidemiología, virología y patobiología para comprender mejor el SADS-CoV en China. ■