



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL
por compendio de publicaciones

**Diarreas de etiología vírica en el ganado porcino:
aportaciones al diagnóstico y control**

**Viral diarrhoea in swine:
contributions to diagnosis and control**

Héctor Puente Fernández

Programa de Doctorado: Ciencias Veterinarias y de los Alimentos

Tutora: Ana M. Carvajal Urueña

Directores: Ana M. Carvajal Urueña y Héctor Argüello Rodríguez

LEÓN, 2023

*A mi padre y a mi madre,
por darme el mejor regalo que se puede dar a una persona.*

Creer en mí.

“Un gran poder conlleva una gran responsabilidad”

BEN PARKER

Agradecimientos

Cinco años dan para mucho. Muchas extracciones, muchas PCRs, muchos diagnósticos del hospital, muchos clostridios, muchos virus, muchas meriendas, pero sobre todo, muchas personas. Personas que de una forma u otra me han ayudado en esta aventura y quiero dar las gracias. Por eso, voy a intentar no olvidarme de ninguna de estas personas, así que si tienes intención de leer la sección de agradecimientos de esta tesis, procura ponerte cómodo o cómoda y disponer de la cantidad suficiente de café, té o colacao. Para aquellas personas que dicen que hacer unos agradecimientos extensos es de pesados o pedantes, me habría gustado citar a Diego Armando Maradona tras lograr la clasificación de su selección para el Mundial 2010, pero como igual sonaba poco profesional para una tesis doctoral, voy a citar a José María Gutiérrez “Guti”: pueden ir a coger amapolas al campo.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a los arquitectos de esta tesis, a mis directores. **Ana**, muchísimas gracias por la oportunidad que me diste. Esta tesis ha llevado mucho trabajo y mucha mierda (en sentido literal) pero si ahora me diesen la oportunidad de elegir, no cambiaría absolutamente nada de este proceso, y en parte es gracias a ti, porque puedo decir con una $p < 0,05$, que he tenido una de las mejores jefas del mundo. **Héctor**, muchas gracias a ti también. No solo por el empujón que me diste para publicar cuando llegaste, sino también por todo ese buen ambiente que creaste y que espero que se conserve por mucho tiempo. Y por último, muchas gracias **Pedro**, por aportarme esa visión de lo que es el mundo profesional tras salir “del cascarón” al finalizar la carrera.

También me gustaría dar las gracias a las geniales técnicas de laboratorio que me apoyaron durante el doctorado. **Gloria**, gracias por ayudarme y formarme, me enorgullezco de poder decir que soy el último *Jedi* que formaste. **Diana**, muchas gracias por ser como una segunda madre en el laboratorio y por tener siempre una sonrisa al servicio de todos.

A mis hermanos de tesis. **Manu**, Laura sigue sin volver... Igual llega a tiempo para la lectura, no hay que perder la esperanza. Muchas gracias por todo, las bromas a Óscar, las noches sin dormir en Granada, las bombas en el moloko, el halo de inhibición, los conciertos en el despacho, las noches midiendo fluorescencia, las distancias de seguridad en los cafés, las palizas a los viejóvenes a padel, etc. **Óscar**, guardaré para toda

la vida tus frases célebres, créeme que intenté por todos los medios (mentira, tampoco todos) incluirlas en mi tesis como anexos. Muchas gracias por aguantarnos tantos años a Manu y a mí, por pasarme todos los informes de la FPU, por haber hecho 4.378 muestras de covid tú solo, por no callarte nada y por la formación que me diste en temáticas como las elecciones de EE.UU., la Monarquía en España o la prensa rosa. Como dije antes, no cambiaría nada de esta etapa (ni el diagnóstico de covid por “caridad”) y en gran parte es por vosotros, porque no me imagino compañeros mejores que vosotros dos.

A mis compañeros de santuario. **Ruben**, solo conozco una persona que haya conseguido que digas “no lo sé”, y, *plot twist*, me toca de tribunal de la tesis. Muchas gracias por ayudarme en todo momento, independientemente de lo que se tratase y de lo que estuvieras haciendo. **Sandra**, muchas gracias por todos esos momentos inolvidables, por ponerme desde primera hora de la mañana a funcionar y por hacerme perder en algunas ocasiones la poca vergüenza que ya me quedaba. Si sigues viva, que sepas que sigo teniendo la moneda de 12 € en el bolsillo. **Lorena**, contigo empezó todo. Muchísimas gracias por enseñarme a coger una pipeta, que los nucleótidos no eran letras flotando en un tubo y que las PCRs son un dolor de muelas. **Rebeca**, gracias por contagiarme los lunes tu buen humor y tus ganas de comerte el mundo (sigo esperando la entrada gratis para ir a verte al conservatorio). **Tania**, gracias por tener siempre unas palabras de ánimo y una pedazo sonrisa esperando en el despacho. **Lucía**, muchas gracias por ayudarme a orientar mi futuro laboral. No he conseguido que me crezcan los pimientos, pero gracias a ti he conocido el maravilloso y fantástico mundo de la albañilería. Aun así mi querida Pepa, creo que finalmente me decantaré por ser Telefonista. Ahora en serio, muchas gracias por ser mi porcicompañera y ser siempre un +1 en todos los planes que iban saliendo. Te nombro mi sucesora en el título de Alfa. **Clara**, en el fondo sé que te caíamos bien y que no quedabas con nosotros por miedo a liberar al *Mr. Hyde* que habita en tí. Gracias por la paciencia que has tenido conmigo y por reírte de mis chistes cortos (malos). **Elena**, estoy tramitando ya la patente del antibiograma de doble disco, creo que va a ser un pelotazo, te voy diciendo. Muchas gracias por ser una niña tan dulce y por tener siempre tiempo para escuchar mis monólogos de virus. **Eva**, sigo pensando que soy más guapo que majo, de aquí a *Asgard*. Muchas gracias por ser mi compitrueno y por compartir conmigo ese deseo de ver el mundo arder. **Javi**, no creo que fuese a mayores pero por si acaso, no me digas el día de la defensa que me queda muy bien el corte de pelo. Muchas gracias por tu predisposición total para cualquier plan, tus manualidades y

sobre todo, por tu tarta asturiana. **Samu**, en ti pongo toda mi fe de organizar y movilizar a los futuros integrantes de Enfermedades Infecciosas. Gracias por los debates de fútbol, por la música ambiental en el laboratorio, por sacar palabras hasta de una piedra y por la imagen del primer día de un tío tan, tan, tan grande con una mascarilla tan, tan, tan pequeña. **Aroa**, sobre la bocina pero conseguiste entrar en este club selecto (lo que no te sé decir si eso es bueno o malo). Muchas gracias por todos esos descansos en el laboratorio, los saludos de anormales, las comilonas, etc. Sí, llegaste casi al final pero me llevo este kiwi para toda la vida. Nos vemos en los cursos de desempleados.

Mi querido *Team África*, **Apeh**, **Moha**, **Hanan**, thank you very much for all the moments we spent together, I hope to see you soon and remember, put your mask on!

Los chicos TFG, **Javi** espero que sigas siendo un excelente imitador de ovejas, **Mer** ja deixi d'infectar les cèl·lules amb aigua beneïda, **Irene** ojalá hayas superado el disgusto del final de Juego de Tronos, **Julia** no dejes de bailar nunca, **Silvia** sigo esperando que me enseñes a placar, **Víctor** se echan de menos tus rajadas de profes, **Ruben** que no dejen nunca de olerte a dinero los cerdos, **Alex** no te borres el tatuaje del cerdo en la vida, **Bryan** seguimos esperando las pizzas (Doña Clara está que trina), **Laura** intenta apuntar a un órgano vital que así no se levantan y **Julian** espero que hayas podido ver a Argentina levantar un Mundial. Muchísimas gracias por cada momento que vivimos juntos.

Sin olvidar al resto de integrantes del Área de Enfermedades Infecciosas, **Juan** y **Chiru**, gracias a los dos por ser sencillamente únicos, **Marce**, siempre te agradeceré que me pusieras matrícula aunque fuese un Merengue.

Ni a los ángeles de *Aquilón*, **Estér**, **Marta** y **Nuria**, gracias por todos los momentos que pasamos juntos ya fueran en granja, congresos o pasillos.

Ni a **Tere**, porque empezar cada mañana con un, ¡buenos días guapetón!, le alegra la cara a cualquiera.

Ni tampoco a la gente del Área de Microbiología, **Sonia**, **César**, **Esther** y sus esbirros, **Maxi** y **Alba**. Gracias por estar como cabras y hacerme reír día sí, día también (os perdono lo del Charizard).

Tampoco me olvido de la gente de Alimentos, *José, Avelino, Marcia* y compañía. No hemos pasado mucho tiempo juntos, pero con toda la tranquilidad que le brindabais al individuo que tenía sentado detrás y por consecuente, a mí, os tengo que dar las gracias.

Al personal de la granja, *Antonio, Narciso, Raúl*, muchas gracias por cuidarme tanto y siempre estar dispuestos a echarme una mano. *Gelines, Víctor, Benjamín, Iván, Cintia, Gracia* y un montón de gente más de la universidad que me dejaré sin nombrar, sinceramente, gracias.

Me gustaría agradecer también a *Marga, Enric, Gerard, Anna, Hepzi, YanLi* y demás gente de la Facultat de Veterinària de la UAB y del IRTA-CReSA, que me acogiesen y tratasen tan bien durante mi estancia en Barcelona. En especial a *Ivan* y *Martí*, gracias por el apoyo y la ayuda que me distéis el tiempo que estuve allí y durante toda la tesis. No se me olvida que tenemos pendiente un tapeo por León.

También a la gente del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del CSIC. Gracias a *Gloria* y *Walter*, por vuestra excelente dirección en un tema sobre el que tenía muy poca idea, y a *Alba, Irene* y *Enric* por hacerme más amena mi breve estancia en Valencia. Siento mucho que desde mi visita os quedarais sin fallas dos años seguidos, prometo dejaros que disfrutéis unas cuantas más antes de que vuelva.

No me voy a olvidar de la *people* de Minnesota, que se encargaron, y con bastante éxito, de hacerme lo menos traumático esos tres meses al otro lado del charco. Muchas gracias *Montse*, por cuidarme tanto y ayudarme en todo lo que pudiste. Estaré eternamente agradecido por la oportunidad que me diste de aprender de los mejores expertos en patógenos respiratorios. Thank you very much *My* and *Lang*, for being patient to explain everything you were doing and for helping me with the experiments. *Albert* y *Berta*, vosotros fuisteis los que me rescatasteis del aeropuerto después de 27 horas de viaje y los que me encontrasteis en tiempo record dónde alojarme durante los tres meses. Vuestra historia me enseñó lo fácil que son las cosas cuando dos personas se quieren de verdad. Muchas gracias por todo y mucha suerte con la aventura de ser papás. Y cómo me voy a olvidar de mis webones, *Joaquín* y *Cipriano*, muchísimas gracias, me disteis la vida allí maricos. Además conseguisteis un hecho histórico hasta la fecha, que consiguiese aprender a bailar salsa, merengue y bachata (aunque se me dé mucho peor que el fútbol). Os espero en la madre patria, para que disfrutéis de lo que es el paraíso y si os apetece, que os *parkeen* un par de bicis. *Angie* y *Sam*, sois dos amores, mil gracias

por vuestra ayuda y por no enfadaros conmigo por todas las veces que os pisé bailando. **María**, muito obrigado bonita, estarei sempre grato pela vossa ajuda na viagem de regresso a Espanha. **Gustavo**, muchas gracias por tu ayuda en la fría Minnesota, que sepas que ya queda menos para que Vinicius Jr sea balón de oro. **Guilherme, Mariana, Igor, Chon, Gerardo, Bruna, Cesar, María** y los demás miembros del *Swine group* de la UMN, gracias por vuestra ayuda. **Rodrigo** y **Kristina**, gracias por acercarme a la comunidad del soccer en St. Paul, gracias a vosotros pude seguir practicando mi pasión durante esos tres meses. Mi querida resistencia española, **María** y **Pablo**, gracias por ese fantástico viaje por el corazón de los Estados Unidos. Gracias a él puedo fardar de que he estado en el *Hotel Bellagio* apostando (perdiendo) dinero a la ruleta, además de conocer dónde nació el elegido que traería el equilibrio a la fuerza, que luego resulto que no, pero luego que sí... Bah que más dá, que también estuve en *Tatooine*.

Tengo también que dar las gracias de corazón a todos y cada uno de mis amigos, **Guti, Coke, Nero, Rucho, Silva, Charly, Jorge, Sergio, Torch, Caba** y **David**, porque en mayor o menor medida, todos habéis tenido que estar esperándome los días que salía tarde de la universidad además de escuchar mis relatos de estimulación anal y/o sacrificio de cerdos. **Marta, Paula** y **Elena**, no me olvido de vosotras, muchas gracias mis niñas. Aunque no estuvimos tan cerca como durante la carrera, siempre habéis tenido tiempo para preguntarme qué tal me va el doctorado o para felicitarme por alguna publicación.

No puedo olvidarme tampoco de las dos personas sin las que hoy no estaría aquí, mis padres. **Papá**, no vivimos juntos esta etapa de mi vida, pero sí me enseñaste algo indispensable para la vida, me enseñaste a no rendirme nunca. **Mamá**, si papá me enseñó la teoría, tu me enseñaste a ponerla en práctica, a salir adelante en los peores momento, a luchar hasta el final, a no tener miedo a lo que piensen los demás, en resumen, a sobrevivir frente a cualquier adversidad. Por todo esto y por la vida que me disteis, Gracias.

Antes de cerrar estos agradecimientos me gustaría acordarme de una serie de personas que normalmente nadie se acuerda, y si se acuerdan no es precisamente para darles las gracias. Me refiero a las personas que alguna vez me dijeron que era un gato asustadizo que no sabía vivir lejos de la falda de su madre, que si me quedaba en León iba a ser un fracasado, que más me valía dedicarme a la hostelería ya que no me daba para ir a la universidad o sencillamente, que no sabía hacer nada bien. Gracias. Gracias por darme el impulso que he necesitado cuando he dudado, cuando he encontrado

dificultades, cuando no he tenido la suerte de cara. Gracias, porque aunque al resto de personas les debo todo, no hubiese podido llegar hasta aquí sin vosotros.

Y para finalizar estos agradecimientos, me gustaría nombrar a dos personas que, sin ser parte del grupo de investigación, han sido muros de carga de esta Tesis Doctoral. **Carmen**, eres la principal responsable de que hiciera el doctorado en León y eternamente te estaré agradecido por ello. Gracias por haber sido la mejor amiga del mundo y haber tenido siempre tiempo para escucharme y ayudarme. Te mereces todo y más. **Sara**, muchas gracias por haberme aguantado enfados y frustraciones, e incluso haberme ayudado tardes, noches y fines. Ójala todo te vaya genial en la vida, te lo mereces.

Bueno, pues parece que ya está. Espero que no haya sido muy tedioso llegar hasta aquí, porque lo que viene a partir de ahora no es que sea mucho más interesante, a no ser que seas un amante de los cerdos, un friki de los virus o, como yo, las dos. Creo que la mejor forma de introducir esta Tesis Doctoral es con la frase con la que comencé mi primer cuaderno de laboratorio:

En un lugar de la ULe....

Financiación y becas

Esta Tesis Doctoral se ha enmarcado en el proyecto coordinado "Nuevos virus porcinos causantes de diarrea en España", cuya referencia es E- RTA2015-00003-C02-02, financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), ejecutado entre el 26/06/2017 y el 30/04/2021, con Ana M. Carvajal Urueña como investigador principal en la Universidad de León.

Héctor Puente Fernández disfrutó de una beca del Gobierno de España (Ministerio de Educación y Formación Profesional) para desarrollar esta tesis doctoral, cuya referencia es FPU 17/00466 y abarcó desde el 15/09/2018 hasta la fecha de defensa de la presente tesis doctoral. El doctorando también ha recibido una beca del Gobierno español (Ministerio de Universidades), cuya referencia es EST 21/00289, para una estancia corta en el "College of Veterinary Medicine" de la Universidad de Minnesota en EE.UU., desde el 07/09/2021 hasta el 06/12/2021.

Lista de publicaciones

La presente Tesis Doctoral por compendio de publicaciones incluye los siguientes artículos científicos para su consideración:

- Héctor Puente, Walter Randazzo, Irene Falcó, Ana Carvajal y Gloria Sánchez. (2020). *Rapid Selective Detection of Potentially Infectious Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Exposed to Heat Treatments Using Viability RT-qPCR*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1911. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01911>
- Héctor Puente, Martí Cortey, Pedro José Gómez de Nova, Óscar Mencía-Ares, Manuel Gómez-García, Ivan Díaz, Héctor Argüello, Margarita Martín, Pedro Rubio y Ana Carvajal. (2021). *First identification and characterization of rotavirus H in swine in Spain*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68, 3055–3069. <https://doi.org/10.1111/tbed.13992>
- Héctor Puente, Héctor Argüello, Óscar Mencía-Ares, Manuel Gómez-García, Pedro Rubio y Ana Carvajal. (2021). *Detection and Genetic Diversity of Porcine Coronavirus Involved in Diarrhea Outbreaks in Spain*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 651999. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.651999>
- Héctor Puente, Ivan Díaz, Héctor Argüello, Óscar Mencía-Ares, Manuel Gómez-García, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Martí Cortey, Margarita Martín, Pedro Rubio y Ana Carvajal. (2022). *Characterization and cross-protection of experimental infections with SeCoV and two PEDV variants*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/tbed.14674>
- Héctor Puente, Héctor Argüello, Martí Cortey, Manuel Gómez-García, Óscar Mencía-Ares, Lucía Pérez-Pérez, Ivan Díaz y Ana Carvajal. *Detection and genetic characterization of enteric viruses in diarrhoea outbreaks from swine farms in Spain*. Manuscrito en preparación.

Además, parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes comunicaciones a congresos:

XXIII Simposio AVEDILA, Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio. Granada, España. Noviembre de 2018.

Póster. *Detección de agentes víricos implicados en el síndrome entérico porcino empleando múltiplex RT-PCR.* Héctor Puente, Pedro José Gómez-de Nova, Rubén Miranda, Oscar Mencía, Sandra González, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

XV Congreso Nacional de Virología. Barcelona, España. Junio de 2019.

1. Póster. *Molecular detection of several enteric viruses in porcine epidemic diarrhoea (PED) suspected outbreaks in swine farms in Spain.* Héctor Puente, Pedro José Gómez de Nova, Oscar Mencía, Manuel Gómez, Rubén Miranda, Pedro Rubio y Ana Carvajal.
2. Póster. *Full genome characterization by deep sequencing of fifteen Porcine Epidemic Diarrhea virus strains from Spain.* Martí Cortey, Ivan Díaz, Pedro José Gómez De Nova, Héctor Puente, Enric Mateu, Ana Carvajal y Marga Martín.

26th International Pig Veterinary Society Congress 2020. Río de Janeiro, Brasil. Noviembre de 2020.

1. Póster. *Diversity of RNA viruses in Spanish pig farms with diarrhoea using next-generation sequencing.* Héctor Puente, Martí Cortey, Manuel Gómez-García, Óscar Mencía-Ares, Héctor Argüello, Marga Martín, Ivan Díaz, Pedro Rubio y Ana Carvajal.
2. Póster. *Characterization of PEDV circulating strains in Spain between 2014 and 2019 reveals the introduction of a new recombinant PEDV clade.* Martí Cortey, Ivan Díaz, Pedro José Gómez de Nova, Héctor Puente, Enric Mateu, Ana Carvajal y Marga Martín.

Conferencia Porcina Allen D. Leman en Español. Minnesota, Estados Unidos. Diciembre de 2021.

Póster. *Valoración de la viremia asociada al coronavirus de la diarrea epidémica porcina utilizando diferentes técnicas moleculares.* Héctor Puente, Julia González de Juan, Héctor Argüello, Martí Cortey, Oscar Mencía, Manuel Gómez-García, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Ivan Díaz, Montserrat Torremorell y Ana Carvajal.

Conference of Research Workers in Animal Diseases 2021. Chicago, Estados Unidos. Diciembre de 2021.

Comunicación oral. *Assessment of viremia associated with porcine epidemic diarrhea coronavirus using different molecular techniques.* Héctor Puente, Julia González de Juan, Héctor Argüello, Martí Cortey, Oscar Mencía, Manuel Gómez-García, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Ivan Díaz, Montserrat Torremorell y Ana Carvajal.

XXIV Jornadas de porcino de la Universidad Autónoma de Barcelona y Associació de Veterinaris de Porcí de Catalunya. Barcelona, España. Junio de 2022.

Comunicación oral. *Infecciones recurrentes por el virus de la diarrea epidémica porcina.* Ivan Díaz, Margarita Martín, Héctor Puente, Ana Carvajal.

XXXIII Reunión de la Sociedad Española Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo, España. Junio de 2022.

Póster. *Inmunopatogenia de coronavirus entéricos porcinos durante la fase temprana de infección.* Karola Frištiková, Inés Ruedas-Torres, Héctor Puente, Héctor Argüello, Irene Rodríguez-Gómez, Ana Carvajal y Jaime Gómez-Laguna.

XVI Congreso Nacional de Virología. Málaga, España. Septiembre de 2022.

Póster. *Cross-protection among porcine enteric coronavirus.* Héctor Puente, Margarita Martín, Ana Carvajal, Ivan Díaz.

12th International Congress for Veterinary Virology. Gante, Bélgica. Septiembre de 2022.

Póster. *Cross-protection among porcine enteric coronavirus.* Héctor Puente, Margarita Martín, Ana Carvajal, Ivan Díaz.

Por último, durante el periodo de realización de la Tesis Doctoral se ha participado en las siguientes publicaciones que no componen los resultados incluidos en la presente memoria:

1. Martí Cortey, Ivan Díaz, Anna Vidal, Gerard Martín-Valls, Giovanni Franzo, Pedro José Gómez de Nova, Laila Darwich, Héctor Puente, Ana Carvajal, Marga Martín y Enric Mateu. (2019). *High levels of unreported intraspecific diversity among RNA viruses in faeces of neonatal piglets with diarrhoea*. *BMC Veterinary Research*, 15, 441. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2204-2>
2. Manuel Gómez-García, Cinta Sol, Pedro J. G. de Nova, Mónica Puyalto, Luis Mesas, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Rubén Miranda, Héctor Argüello, Pedro Rubio y Ana Carvajal. (2019). *Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria*. *Porcine Health Management*, 5, 32. <https://doi.org/10.1186/s40813-019-0139-4>
3. Jaime López de la Iglesia, Tania Fernández-Villa, Ana Rivero, Ana Carvajal, Estefanía Bay Simone, Miriam Martínez Martínez, Héctor Argüello, Héctor Puente y José Pedro Fernández Vázquez. (2020). *Predictive factors of COVID-19 in patients with negative RT-qPCR*. *Medicina de Familia SEMERGEN*, 46, 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2020.06.010>
4. Manuel Gómez-García, Héctor Argüello, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Sandra González, Rubén Miranda, Pedro Rubio y Ana Carvajal. (2020). *In-depth in vitro Evaluation of the Activity and Mechanisms of Action of Organic Acids and Essential Oils Against Swine Enteropathogenic Bacteria*. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 572947. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.572947>
5. Manuel Gómez-García, Héctor Puente, Héctor Argüello, Óscar Mencía-Ares, Pedro Rubio y Ana Carvajal. (2021). *In vitro Assessment of Antiviral Effect of Natural Compounds on Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 652000. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.652000>
6. Oscar Mencía-Ares, Héctor Argüello, Héctor Puente, Manuel Gómez-García, Avelino Álvarez-Ordóñez, Édgar G. Manzanilla, Ana Carvajal y Pedro Rubio. (2021). *Effect of antimicrobial use and production system on Campylobacter spp., Staphylococcus spp. and Salmonella spp. resistance in Spanish swine: A cross-sectional study*. *Zoonoses and Public Health*, 68, 54-66. <https://doi.org/10.1111/zph.12790>

7. Óscar Mencía-Ares, Raúl Cabrera-Rubio, José Francisco Cobo-Díaz, Avelino Álvarez-Ordóñez, Manuel Gómez-García, Héctor Puente, Paul D. Cotter, Fiona Crispie, Ana Carvajal, Pedro Rubio y Héctor Argüello. (2020). *Antimicrobial use and production system shape the fecal, environmental, and slurry resistomes of pig farms*. *Microbiome*, 8, 164. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00941-7>
8. Óscar Mencía-Ares, Héctor Argüello, Héctor Puente, Manuel Gómez-García, Édgar G. Manzanilla, Avelino Álvarez-Ordóñez, Ana Carvajal y Pedro Rubio. (2021). *Antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli and Enterococcus spp. is influenced by production system, antimicrobial use, and biosecurity measures on Spanish pig farms*. *Porcine Health Management*, 7, 27. <https://doi.org/10.1186/s40813-021-00206-1>
9. Pedro José Gómez de Nova, Martí Cortey, Ivan Díaz, Héctor Puente, Pedro Rubio, Marga Martín y Ana Carvajal. *A retrospective study of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) reveals the presence of swine enteric coronavirus (SeCoV) since 1993 and the recent introduction of a recombinant PEDV-SeCoV in Spain*. (2020). *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, 2911–2922. <https://doi.org/10.1111/tbed.13666>
10. Manuel Gómez-García, Irene Madrigal, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Héctor Argüello, Ana Carvajal y Juan Miguel Fregeneda-Grandes. (2022). *In vitro activity of essential oils against microbial isolates from otitis externa cases in dogs*. *Natural Product Research*, 36, 4552-4556. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1993217>
11. Manuel Gómez-García, Héctor Argüello, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Héctor Puente, Oscar Mencía-Ares, Pedro Rubio y Ana Carvajal. (2022). *Combined in vitro and on farm evaluation of commercial disinfectants used against Brachyspira hyodysenteriae*. *Porcine Health Management*, 8, 3. <https://doi.org/10.1186/s40813-021-00244-9>
12. Clara Vega, Lucía Pérez-Pérez, Héctor Argüello, Manuel Gómez-García, Héctor Puente, Ignacio Fernández-Usón, Pedro Rubio y Ana Carvajal. (2022). *In vitro evaluation of gentamicin activity against Spanish field isolates of Brachyspira hyodysenteriae*. *Porcine Health Management*, 8, 48. <https://doi.org/10.1186/s40813-022-00291-w>

Resumen

Las condiciones actuales de la producción porcina demandan un elevado estatus sanitario y de bienestar animal e implican un estricto control de las enfermedades de etiología infecciosa. Entre estas, las enfermedades entéricas siguen teniendo un papel muy relevante, especialmente en las primeras fases de la producción. Sin embargo, en los años más recientes, los procesos entéricos de etiología vírica han visto incrementada su relevancia en las explotaciones porcinas. Así, han emergido y/o reemergido algunos virus y han aparecido, en algunos casos, nuevas variantes con mayor virulencia y/o transmisibilidad. La participación de algunos de estos agentes víricos más nuevos en la etiología del complejo entérico está bien establecida, pero en muchos casos continúa siendo incierta.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue investigar la relevancia de las infecciones por diferentes virus que han sido implicados en la etiología del complejo entérico en las granjas de cerdos de España. Las investigaciones desarrolladas se han recogido en un total de cinco publicaciones que abordan la prevalencia de diferentes virus entéricos en brotes de diarrea (estudio 1: publicaciones 1, 2 y 3) así como su caracterización genética (estudio 2: publicaciones 1, 2 y 3), el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas de interés para el control de estas infecciones (estudio 3: publicación 4) y la caracterización de la infección y la inmunidad cruzada asociada a diferentes variantes del *Virus de la diarrea epidémica porcina* o VDEP detectadas en las explotaciones porcinas de España (estudio 4: publicación 5).

En el estudio 1 se investigó la prevalencia, en granjas españolas, de los cinco coronavirus entéricos descritos hasta el momento en el hospedador porcino, de rotavirus de los tipos A, B, C y H, así como de astrovirus, kobuvirus, torovirus, orthorevirus y mastadenovirus. Para ello, se monitorizaron 206 brotes de enfermedad entérica en granjas de cerdos, siendo muy común la detección de uno o más de los virus entéricos investigados. Entre los coronavirus entéricos el VDEP fue el único detectado, en casi el 20 % de los brotes investigados y particularmente en la etapa de engorde. Por su parte, se detectaron rotavirus en uno de cada cuatro brotes investigados, fundamentalmente *Rotavirus A* (RVA) y en menor medida *Rotavirus B* (RVB) tras el destete y *Rotavirus C* (RVC) en los brotes de diarrea neonatal. Se identificó por primera vez en Europa la infección por *Rotavirus H* (RVH) en un total de 8 granjas porcinas españolas. Finalmente,

se determinó la prevalencia de la infección por virus cuya relevancia en la etiología del complejo entérico no está bien establecida, confirmando la presencia de todos los virus investigados, con prevalencias que variaron entre el 48,5 % para los astrovirus y el 4,4 % para los orthoreovirus.

La caracterización molecular de los principales virus implicados en la etiología del complejo entérico fue el objetivo del estudio 2. Se obtuvo la secuencia completa del gen de la proteína S de todos los aislados del VDEP, determinando las variantes de este virus más extendidas en nuestro país, todas ellas del genogrupo INDEL o G1b, entre las que destacó una variante recombinante que se ha convertido en mayoritaria en los años más recientes (rVDEP-SeCoV). Además, se obtuvieron mediante técnicas de secuenciación masiva las secuencias completas del genoma de aislados de VDEP (4), RVH (4), astrovirus (16), kobuvirus (3) y torovirus (1), investigando sus relaciones con aislados recuperados en otras regiones o en otros hospedadores diferentes del cerdo.

En el estudio 3 se optimizó una herramienta de diagnóstico molecular rápida que permite discriminar entre virus viable o infeccioso y virus no viable, la PCR de viabilidad. Esta técnica permitió diferenciar el virus infeccioso del inactivado por calor en suspensiones virales del VDEP, así como en muestras de suero y tiene gran aplicabilidad en la monitorización de potenciales fuentes de infección implicadas en la transmisión de este coronavirus.

Por último, en el cuarto y último estudio, se caracterizó la infección en cerdos destetados por el *Coronavirus entérico porcino* (SeCoV) -un virus quimérico originado por un evento de recombinación entre el *Virus de la gastroenteritis transmisible* (VGET) o su mutante el *Coronavirus respiratorio porcino* (CVRP) y el VDEP, progenitor mayor y menor respectivamente- y dos variantes del genogrupo G1b del VDEP, entre ellas la variante recombinante rVDEP-SeCoV que identificamos como predominante en España en los años más recientes en el estudio 2. El cuadro clínico y lesional fue el característico de las infecciones por coronavirus entéricos, prolongándose la excreción en heces durante el periodo de convalecencia para los tres virus investigados. La protección frente a la reinfección fue completa tras el desafío homólogo a las 3 semanas, tanto en lo que respecta a la presentación clínica como a la presencia de lesiones o la eliminación viral en heces. Sin embargo, el desafío heterólogo se asoció a una protección parcial, existiendo excreción en heces o incluso clínica de diarrea o lesiones en el intestino delgado.

De forma global, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran la necesidad de una monitorización continua de los diferentes virus implicados en la etiología del complejo entérico porcino así como de nuevos estudios que permitan profundizar en el conocimiento de las enfermedades asociadas a la infección por algunos de estos agentes víricos.

Palabras clave:

Análisis filogenético, *Astrovirus porcino* (PAstV), cepa INDEL o G1, cepa no INDEL o G2, cerdo, *Coronavirus entérico porcino* (SeCoV), espícula o gen S, genoma completo, inactivación térmica, infectividad, inmunidad, *Kobuvirus porcino* (PKoV), *Mastadenovirus porcino* (PAdV), NGS, *Orthoreovirus de los mamíferos* (MRV), RT-PCR múltiplex, RT-qPCR de viabilidad, recombinante, *Rotavirus A* (RVA), *Rotavirus B* (RVB), *Rotavirus C* (RVC), *Rotavirus H* (RVH), *Torovirus porcino* (PToV), *Virus de la diarrea epidémica porcina* (VDEP).

Abstract

Strict control of infectious diseases is a major pillar in the sanitary and welfare standards that current and next future policies demand in swine production. Enteric diseases are among the main hazards challenging pig health, especially in the early stages of production and among them, the relative importance of viral pathogens is gaining relevance in recent years, both associated to the emergence of new aetiological agents and the re-emergence of well-known pathogens, some of which exhibit new variants with higher virulence and/or transmissibility.

The general objective of this Doctoral Thesis was to investigate the relevance of infections by different enteric viruses which have been suggested as aetiological agents of enteric disease on pig farms in Spain. The results of our research have been included in five peer-review articles answering questions about the prevalence of different enteric viruses in diarrhoea outbreaks (study 1: articles 1, 2 and 3), viral genetic characterization (study 2: articles 1, 2 and 3), the development of new diagnostic tools of interest for the control of these infections (study 3: article 4) and the characterization of the infection and cross-immunity associated with different variants of *Porcine epidemic diarrhoea virus* or PEDV (study 4: article 5).

Study 1 investigated the prevalence of the five enteric coronaviruses described to date in the porcine host, rotaviruses of types A, B, C and H, as well as astroviruses, kobuviruses, toroviruses, orthoreoviruses and mastadenoviruses in 206 outbreaks of enteric disease on Spanish swine farms. The detection of one or more of the investigated enteric viruses was very common with prevalence values ranging from 48.5% for astroviruses to 4.4% for orthoreoviruses. Particularly, PEDV was the only coronavirus detected, in almost 20 % of the outbreaks investigated, particularly in the fattening stage. Rotaviruses were detected in one out of four outbreaks investigated, mainly *Rotavirus A* (RVA) and to a lesser extent *Rotavirus B* (RVB) after weaning and *Rotavirus C* (RVC) in neonatal diarrhoea outbreaks. *Rotavirus H* (RVH) was identified for the first time in Europe, circulating on nine of the Spanish pig farms investigated.

The molecular characterization of the main viruses involved in the etiology of swine enteric disease was the objective of study 2. The complete sequence of the protein S gene of all PEDV isolates was obtained, identifying the most widespread variants of

this coronavirus in Spain, all of them included in the INDEL or G1b genogroup. Particularly, a recombinant variant (rPEDV-SeCoV) was identified as the predominant PEDV isolate in recent years in Spain. In addition, the complete genome sequences of PEDV (4), RVH (4), astrovirus (16), kobuvirus (3) and torovirus (1) isolates were obtained by high throughput sequencing techniques, allowing for the investigation of their relationships with isolates recovered in other geographical regions or in hosts other than swine.

A rapid molecular diagnostic tool to discriminate between viable or infectious virus and non-viable virus, viability PCR, was optimized in study 3. This technique differentiated infectious and heat-inactivated virus in PEDV viral suspensions as well as in serum samples and can be use in the monitoring of potential sources of infection involved in the transmission of this coronavirus.

Finally, in the fourth and last study, infection in weaned pigs by *Swine enteric coronavirus* (SeCoV) -a chimeric virus originating from a recombination event between *Transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) or its mutant *Porcine respiratory coronavirus* (PRVC) and PEDV- and two variants of PEDV G1b genogroup, including the recombinant variant between PEDV and SeCoV or rPEDV-SeCoV, were characterized. The clinical signs and lesions were similar to previous reports of enteric coronavirus infections regardless of the inoculum and faecal excretion during the convalescence period was observed for the three investigated isolates. Protection against reinfection was complete after homologous challenge at 3 weeks, both in terms of clinical disease and viral shedding. In contrast, heterologous challenge was associated with a partial protection, with viral excretion in faeces or even diarrhoea and lesions in the small intestine.

Overall, the results of this Doctoral Thesis allow us to conclude that there is a need for a continuous monitoring of the different viruses involved in the aetiology of enteric disease in swine as well as the convenience of new studies to investigate the clinical relevance of the infection by some of these viral agents.

Keywords:

Immunity, INDEL or G1 strain, infectivity, *Mammalian orthoreovirus* (MRV), multiplex RT-PCR, NGS, non-INDEL or G2 strain, Phylogenetic analysis, *Porcine astrovirus* (PAstV), *Porcine Epidemic Diarrhoea Virus* (PEDV), *Porcine kobuvirus* (PKoV), *Porcine mastadenovirus* (PAdV), *Porcine torovirus* (PToV), recombinant, *Rotavirus A* (RVA), *Rotavirus B* (RVB), *Rotavirus C* (RVC), *Rotavirus H* (RVH), spike or S gene, swine, *Swine enteric coronavirus* (SeCoV), thermal inactivation, viability RT-qPCR, whole genome.

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AdV: adenovirus

AlphaCoV: *Alphacoronavirus*

AN: anticuerpos neutralizantes

APN: aminopeptidasa N

ARN: ácido ribonucleico

AstV: astrovirus

BetaCoV: *Betacoronavirus*

BToV: *Torovirus bovino*

CDDP: cis-diamina-platino (II)

CoV: coronavirus

COVID-19: coronavirus disease-19

CVRP: *Coronavirus respiratorio porcino*

DeltaCoV: *Deltacoronavirus*

DEP: diarrea epidémica porcina

DICC₅₀: dosis infectantes cultivo celular 50 %

EE.UU.: Estados Unidos

ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógeno

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénico

EToV: *Torovirus equino*

GammaCoV: *Gammacoronavirus*

GET: gastroenteritis transmisible porcina

IBV: *Virus de la bronquitis infecciosa aviar*

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía Viral

IgA: inmunoglobulina A

IgG: inmunoglobulina G

Kb: kilobase

KoV: kobuvirus

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

MERS-CoV: *Virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio*

MRV: *Orthoreovirus de los mamíferos*

NGS: secuenciación de nueva generación

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal

ORF: marco de lectura abierto

PAdV: *Mastadenovirus porcino*

PAstV: *Astrovirus Porcino*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCV2: *Circovirus porcino* tipo 2

PDCoV: *Deltacoronavirus porcino*

PKoV: *Kobuvirus porcino*

PMA: propidio de monoazida

PToV: *Torovirus porcino*

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

RdRp: polimerasa dependiente de ARN

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa a tiempo real

RV: rotavirus

RVA: *Rotavirus A*

RVB: *Rotavirus B*

RVC: *Rotavirus C*

rVDEP-SeCoV: variante recombinante del VDEP-SeCoV

RVH: *Rotavirus H*

SADS-CoV: *Coronavirus del síndrome de diarrea aguda*

SARS-CoV: *Virus del síndrome respiratorio agudo grave*

SDPP: plasma porcino atomizado

SeCoV: *Coronavirus entérico porcino*

SPF: libres de patógenos específicos

TGI: tracto gastrointestinal

ToV: torovirus

UE: Unión Europea

UTR: región no traducida

VDEP: *Virus de la diarrea epidémica porcina*

VGET: *Virus de la gastroenteritis transmisible*

vPCR: reacción en cadena de la polimerasa de viabilidad

VTEC: *Escherichia coli* verotoxigénico

Índice

Capítulo 1: Introducción	1
1. Importancia del complejo entérico en la producción porcina.....	3
2. Mecanismos fisio-patológicos de la diarrea.....	6
3. Principales enfermedades entéricas en el ganado porcino.....	7
3.1 Enfermedades entéricas en lactación.....	7
3.2 Enfermedades entéricas en el destete.....	8
3.3 Enfermedades entéricas en cebo y reproductoras.....	9
4. Diarreas de etiología vírica.....	11
4.1 Coronavirus.....	12
4.2 <i>Virus de la diarrea epidémica porcina</i> (VDEP).....	16
4.2.1 Origen y distribución mundial.....	16
4.2.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión.....	20
4.2.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional.....	22
4.3 <i>Virus de la gastroenteritis transmisible porcina</i> (VGET).....	23
4.3.1 Origen y distribución mundial.....	23
4.3.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión.....	26
4.3.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional.....	27
4.4 <i>Coronavirus entérico porcino</i> (SeCoV).....	28
4.4.1 Origen y distribución mundial.....	28
4.4.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión.....	29
4.4.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional.....	29
4.5 <i>Deltacoronavirus porcino</i> (PDCoV).....	30
4.5.1 Origen y distribución mundial.....	30
4.5.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión.....	31
4.5.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional.....	32
4.6 <i>Coronavirus del síndrome de diarrea aguda</i> (SADS-CoV).....	33
4.6.1 Origen y distribución mundial.....	33
4.6.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión.....	33
4.6.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional.....	34

4.7 Rotavirus	35
4.7.1 Origen y distribución mundial	37
4.7.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión	40
4.7.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional	42
4.8 Astrovirus	44
4.8.1 Origen y distribución mundial	45
4.8.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión	46
4.8.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional	46
4.9 Kobuvirus	47
4.9.1 Origen y distribución mundial	48
4.9.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión	49
4.9.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional	49
4.10 Torovirus	50
4.10.1 Origen y distribución mundial	51
4.10.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión	52
4.10.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional	53
4.11 Orthoreovirus	53
4.11.1 Origen y distribución mundial	54
4.11.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión	55
4.11.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional	55
4.12 Adenovirus	57
4.12.1 Origen y distribución mundial	58
4.12.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión	59
4.12.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional	59
Capítulo 2: Justificación y Objetivos	61
Capítulo 3: Publicación I	65
Capítulo 4: Publicación II	79
Capítulo 5: Publicación III	89
Capítulo 6: Publicación IV	119
Capítulo 7: Publicación V	131

Capítulo 8: Discusión general	149
1. Prevalencia de diferentes agentes víricos en brotes de diarrea en las explotaciones porcinas de España.....	151
2. Diversidad genética del VDEP y de otros virus entéricos potencialmente implicados en la etiología de brotes de diarrea en las explotaciones porcinas de España	157
3. Nuevas herramientas diagnósticas para el control de las infecciones entéricas de etiología vírica en las explotaciones porcinas: PCR de viabilidad	161
4. Caracterización de la infección y la inmunidad cruzada asociada a las variantes del VDEP más frecuentemente detectadas en las explotaciones porcinas de España	164
Capítulo 9: Conclusiones/Conclusions	169
Capítulo 10: Bibliografía	175
Capítulo 11: Anexos	211
Anexo I: Información adicional de la Publicación I	213
Anexo II: Información adicional de la Publicación II	217
Anexo III: Información adicional de la Publicación III.....	239

Capítulo 1: Introducción

1. Importancia del complejo entérico en la producción porcina

El sector porcino español supone en torno al 16 % de la Producción Final Agraria y el 43 % de la Producción Final Ganadera, siendo clave en la economía del sector primario en nuestro país. Según los datos de 2021 (MAPA, 2021), España es el tercer productor a nivel mundial (después de China y EE.UU.) y teniendo en cuenta los datos de censo, ocupa la primera posición en el ámbito de la Unión Europea (UE), con cerca del 24 % del censo comunitario.

En los últimos años este sector ha vivido importantes cambios. Se ha producido una gran profesionalización y una mejora del modelo productivo. Las pequeñas explotaciones familiares de ciclo cerrado, propiedad de ganaderos independientes, se han transformado, en muchos casos, en sistemas integrados, con granjas de gran tamaño, de producción en múltiples fases y con tasas de renovación mucho más elevadas que las que se mantenían tradicionalmente. De forma paralela, la selección genética ha supuesto una clara mejoría en los índices técnicos, no solo en relación con el producto final sino también con la prolificidad de las reproductoras. Tanto los cambios en el modelo productivo como el aumento del tamaño de las camadas han conducido a un incremento continuado en el número de cerdos cebados, hecho que como hemos mencionado ha situado a España como principal productor de la UE y como país excedentario. La tasa de autoabastecimiento alcanzó el 212,5 % en 2021 (MAPA, 2021), convirtiendo la exportación en un elemento fundamental para el sector. Así, España se ha consolidado como segundo mayor exportador de porcino de la UE, solo superado por Alemania, incrementándose en los años más recientes de forma espectacular las exportaciones a terceros países, especialmente a China y a otros países del sudeste asiático (INTERPORC, 2021).

En este nuevo contexto, la sanidad, que siempre ha sido una preocupación fundamental para los veterinarios y productores, ha tomado aún mayor protagonismo. Esto se debe a varios motivos. Por un lado, la gestión de poblaciones de mayor tamaño y con altas tasas de renovación en el colectivo de reproductores conlleva un aumento en la incidencia de enfermedades si no se toman medidas específicas para evitarlo. Por otro lado, desde el punto de vista comercial, el mantenimiento de un estado sanitario elevado supone una ventaja competitiva por dos razones. En primer lugar, una adecuada sanidad contribuye a disminuir los costes de producción al asociarse a unos mejores índices

productivos (mayor fertilidad, menor mortalidad, mayor velocidad de crecimiento, menor índice de conversión, mayor ganancia media diaria...) y a un menor coste de medicaciones. En segundo lugar, la sanidad puede convertirse fácilmente en un importante elemento diferenciador en el mercado internacional, un auténtico arancel proteccionista frente al libre mercado. En este sentido, el poder certificar la ausencia de ciertas enfermedades en una empresa, una región o un país facilita el acceso a los mercados más exigentes, que suelen ser al mismo tiempo los que presentan una mayor rentabilidad.

Todo ello hace cada vez más necesario un conocimiento profundo de las enfermedades que afectan al sector, incluyendo las características más relevantes de sus agentes etiológicos, los mecanismos patogénicos, las claves para el reconocimiento clínico y el diagnóstico laboratorial, las principales características epidemiológicas y aspectos de relevancia para la prevención y el control.

Particularmente, las enfermedades que afectan al tracto intestinal (TGI) tienen un importante impacto en la producción porcina, tanto por su frecuencia de aparición como por su coste económico (Sitjar, 2000). A las pérdidas directas por las bajas de animales hay que sumar el empeoramiento del rendimiento productivo (aumento del índice de conversión, disminución de la ganancia media diaria o incremento del número de animales retrasados o “colas”, que necesitan más tiempo para alcanzar el peso de sacrificio) y las pérdidas indirectas relacionadas con los gastos de tratamiento, profilaxis y control.

Algunas enfermedades entéricas, como la diarrea epidémica porcina (DEP), pueden dar lugar a epidemias con alta mortalidad entre los lechones en la primera semana de vida que se asocian a un importante impacto económico para los productores. Este tipo de eventos epidémicos tienen una gran repercusión en los medios de comunicación especializados, causan alertas internacionales y estimulan medidas de prevención. Sin embargo, las enfermedades entéricas endémicas, presentes de forma habitual en las poblaciones, son las que en muchas ocasiones tienen un mayor impacto a largo plazo en la salud y la productividad.

Además de las pérdidas económicas directas e indirectas mencionadas, las enfermedades entéricas afectan al bienestar de los animales y al consumo de antimicrobianos. De hecho, la UE reconoce la diarrea postdestete y la infección por

Lawsonia intracellularis, agente etiológico de la enteropatía proliferativa, entre las principales causas de consumo de antibióticos en las granjas de cerdos (Parlamento Europeo, 2015). La emergencia de resistencias a los antibióticos constituye un importante problema de salud pública y ha llevado a restricciones legales al empleo de antimicrobianos en producción animal, particularmente en la producción porcina (Gómez-García *et al.*, 2021; Mencía-Ares *et al.*, 2021). En este sentido, cabe destacar los notables esfuerzos realizados en los años más recientes para la identificación y desarrollo de nuevas estrategias que permitan minimizar el impacto de las enfermedades del TGI en las granjas de cerdos, limitando la necesidad de uso de antimicrobianos.

El papel de la microbiota intestinal en el complejo entérico ha sido reconocido en los años más recientes (Isaacson y Kim, 2012). Las técnicas de metagenómica, cada vez más perfeccionadas, accesibles y asequibles, permiten a los investigadores explorar la influencia de esta microbiota intestinal en las enfermedades entéricas, reconociendo las oportunidades que la modulación de esta microbiota mediante la dieta o con métodos específicos como probióticos, prebióticos, postbióticos o simbióticos ofrece para optimizar la salud intestinal, la inmunidad y la productividad general del cerdo. En este sentido, hoy más que nunca somos conscientes de que el control de las enfermedades entéricas requiere una visión holística que integre factores como la nutrición, el manejo, la respuesta inmunitaria y la microbiota intestinal (Argüello-Rodríguez *et al.*, 2018).

Las enfermedades entéricas se producen en el cerdo a cualquier edad, asociándose con gran frecuencia a determinados manejos, particularmente el destete o los cambios en la alimentación. Además, son la principal causa de muerte de etiología infecciosa en las primeras semanas de vida de los lechones. Aunque su etiología es compleja y múltiple, las principales causas de enfermedad entérica en los cerdos son microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, virus o parásitos que actúan solos o, con gran frecuencia, combinados en infecciones mixtas que incluyen dos o más agentes.

Con independencia de la edad de los animales afectados, la diarrea es el signo clínico común en el complejo entérico porcino, pudiendo acompañarse de otros signos como dolor abdominal, fiebre, náuseas, vómitos o anorexia total o parcial. Aunque de forma estricta el concepto de diarrea abarca también cambios en la frecuencia de las deposiciones o en el volumen de las heces, en porcino este término define la disminución en la consistencia de las heces o, lo que es lo mismo, el incremento en el contenido de agua.

2. Mecanismos fisio-patológicos de la diarrea

Aunque las causas de diarrea son múltiples, desde el punto de vista de la patogenia son tres los mecanismos más frecuentemente implicados en el complejo entérico porcino (Tabla 1) (Zimmerman *et al.*, 2019).

La **diarrea osmótica** es consecuencia de la presencia en la luz del intestino de un exceso de solutos no absorbidos o no absorbibles que eleva la presión osmótica y favorece la retención de agua o incluso su salida activa hacia la luz intestinal. El déficit en la capacidad de digestión o absorción en el intestino, también denominado malabsorción, es una de las causas más comunes de este tipo de diarrea. Adicionalmente, la llegada al intestino grueso de este superávit de solutos no absorbidos o no absorbibles puede complicar el cuadro de diarrea a través de un exceso de fermentaciones microbianas. Habitualmente, las diarreas osmóticas tienen un pH ácido y suelen mejorar con el ayuno o cuando se suspende la ingestión del soluto o solutos no absorbibles. Un ejemplo de diarrea osmótica en porcino son las diarreas víricas causadas por coronavirus (CoV) o por rotavirus (RV); estas infecciones víricas producen la destrucción y acortamiento de las vellosidades en el epitelio del intestino delgado, evitando la normal digestión y absorción de los nutrientes ingeridos.

La **diarrea secretora** ocurre cuando la secreción de agua hacia la luz intestinal supera la capacidad de absorción de esta misma molécula en el intestino delgado. Se relaciona habitualmente con la presencia de toxinas, como las producidas por *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC), que actúan activando canales de intercambio de iones en la membrana del enterocito, permitiendo una secreción descontrolada de agua y electrolitos hacia la luz intestinal. Al contrario que las diarreas osmóticas, las diarreas secretoras suelen tener un pH alcalino y no mejoran con el ayuno.

La **diarrea exudativa o inflamatoria** es consecuencia de la disrupción del epitelio intestinal, frecuentemente por la multiplicación de un microorganismo patógeno. La destrucción del epitelio conduce a la exudación de plasma o incluso de sangre hacia la luz intestinal, unida a una ineficiente absorción de agua. La respuesta inflamatoria contribuye de forma importante al cuadro de diarrea, a través de mediadores de la inflamación y citocinas que estimulan la secreción. Además, la reparación del epitelio dañado con células inmaduras dificulta la digestión y absorción, añadiendo un

componente de diarrea osmótica al proceso. Son ejemplos de diarreas exudativas o inflamatorias la disentería porcina o las infecciones por *Clostridium perfringens* tipo C.

Tabla 1: Mecanismos de diarrea implicados en el complejo entérico porcino asociado a diferentes agentes infecciosos (adaptada de Zimmerman *et al.*, 2019).

Agente infeccioso	Mecanismo patológico primario de la diarrea		
	Hipersecreción	Malabsorción	Inflamación
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico	+++	+	-
<i>Clostridium perfringens</i> A	+	-	+
<i>Clostridium perfringens</i> C	-	+	+++
<i>Clostridioides difficile</i>	+	+	+++
Coronavirus	-	+++	-
Rotavirus	+	++	-
<i>Salmonella enterica</i>	+	-	+++
<i>Lawsonia intracellularis</i>	-	++	++
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> y otras espiroquetas fuertemente hemolíticas	-	+	++
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	-	+	++

3. Principales enfermedades entéricas en el ganado porcino

El impacto de las enfermedades entéricas en el ganado porcino varía según los países, los sistemas de cría y el estatus sanitario de las explotaciones. Además, dentro de las granjas, la situación de las enfermedades es dinámica, pudiendo producirse múltiples infecciones entéricas simultáneamente o de forma consecutiva, lo que genera complejos patrones clínicos de la enfermedad y dificultades para la instauración de medidas de control efectivas. En cualquier caso, la etiología y principales características clínicas del complejo entérico porcino varían en función de la etapa productiva.

3.1 Enfermedades entéricas en lactación

La diarrea es un proceso muy común en las salas de maternidad y todas las granjas, en mayor o menor medida, sufren consecuencias asociadas al complejo entérico en los lactantes. De hecho, la diarrea neonatal es la enfermedad más frecuente y con mayor impacto económico en esta etapa de la producción, pudiendo alcanzar un coste económico de hasta 20 € por camada afectada (Larsson, 2016; Carvajal *et al.*, 2018).

Entre los agentes etiológicos del complejo entérico relevantes en esta etapa se encuentran ETEC y *C. perfringens* tipo C, ambos patógenos controlables mediante la vacunación de las reproductoras. Adicionalmente, la disponibilidad de animales genéticamente resistentes a las cepas de *E. coli* que expresan la fimbria F4 (K88) puede ofrecer una opción de control mediante la selección genética, pero con una limitada aplicación en la cría comercial de cerdos. Otros agentes etiológicos relevantes en esta

etapa incluyen *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *Clostridium perfringens* tipo A, *Clostridioides difficile*, *Cystoisospora suis*, RV, CoV o incluso, ocasionalmente, criptosporidios en algunas unidades de producción (Tabla 2). Más recientemente, *Enterococcus hirae* se ha asociado a cuadros entéricos en lechones (Larsson *et al.*, 2014; Kongsted *et al.*, 2018). Otros microorganismos mencionados como causa ocasional de diarrea en lechones incluyen *Enterococcus durans* (Cheon y Chae, 1996), *Bacteroides fragilis* (Shah y Collins, 1989), *Chlamydia suis* (Rogers y Andersen, 2000) y virus como los kobuvirus, astrovirus o adenovirus, entre otros.

El diagnóstico etiológico de estos procesos entéricos se basa en la detección de estos agentes, incluyendo la demostración de factores de virulencia como fimbrias y/o toxinas (Larsson, 2016). En el caso de agentes que están presentes de forma habitual en las explotaciones porcinas como rotavirus, *C. perfringens* tipo A o *E. hirae* es necesario demostrar una multiplicación excesiva (empleando técnicas cuantitativas) y/o la presencia de lesiones con el fin de poder obtener conclusiones en lo que respecta a su participación en la etiología. En este sentido, se ha propuesto que la investigación del complejo entérico requiere de un esfuerzo considerable para caracterizar la condición y determinar la causa (Zimmerman *et al.*, 2019).

3.2 Enfermedades entéricas en el destete

El destete es uno de los periodos más críticos del ciclo de producción porcina. Los lechones, aún inmaduros, deben adaptarse al proceso de separación de la madre al tiempo que se mezclan con nuevos animales en un nuevo ambiente y con un nuevo tipo de alimentación (Fairbrother *et al.*, 2005; Rhouma *et al.*, 2017). El paso de una dieta líquida, basada en leche, a una dieta sólida y basada en cereales es un importante reto y causa en muchos lechones anorexia y pérdida de integridad del epitelio, disminución de la capacidad de digestión y absorción y disbiosis de la microbiota (Ortiz Sanjuán *et al.*, 2022). Todo ello contribuye para hacer que el destete sea una etapa crítica desde el punto de vista de las enfermedades entéricas.

Varios de los agentes infecciosos que afectan a los lactantes son también causa de enfermedad entérica en el destete. Así, los aislados de ETEC y EPEC son importante causa de diarrea en esta etapa, junto con aislados de *E. coli* verotoxigénicos (VTEC) causantes de la enfermedad de los edemas. De forma similar, los CoV y los RV siguen siendo causa de enfermedad entérica en el destete. El papel de otros virus como kobuvirus

o astrovirus no está bien definido (Saif, 1994). Además, se ha descrito que algunos brotes de enfermedad por *Circovirus porcino* tipo 2 (PCV2) se asocian a cuadros de diarrea que pueden ser consecuencia directa de la enteritis viral asociada a la infección (Segalés *et al.*, 2004). Finalmente, también pueden participar en la etiología del complejo entérico en el destete agentes como *Salmonella enterica*, *Brachyspira* spp. o *Lawsonia intracellularis* (Zimmerman *et al.*, 2019), más característicos de las fases de crecimiento y engorde (Tabla 2).

3.3 Enfermedades entéricas en cebo y reproductoras

Las principales enfermedades entéricas en los periodos de crecimiento y engorde incluyen la disentería porcina, la enteropatía proliferativa porcina, la salmonelosis y la espiroquetosis colónica porcina (Wills, 2000; Carvajal *et al.*, 2021). Adicionalmente, en explotaciones en extensivo o en explotaciones orgánicas con sistemas de producción al aire libre y en los que no se emplean de forma rutinaria antihelmínticos pueden aparecer parásitos entéricos como *Ascaris suum*, *Oesophagostomum* spp., *Trichuris* spp. o *Hyostromylus* spp. que pueden ser causa de colitis. A todas estas etiologías se une, nuevamente, el impacto de CoV como el *Virus de la diarrea epidémica porcina*, VDEP, o el *Virus de la gastroenteritis transmisible*, VGET, que afectan a cerdos de todas las edades (Tabla 2). Finalmente, podemos mencionar que enfermedades sistémicas graves como la peste porcina clásica o la peste porcina africana tienen un importante componente entérico. En este último caso, toda sospecha debe ser comunicada de forma inmediata a las autoridades competentes.

Se dispone de vacunas para el control de la enteropatía proliferativa porcina y de vacunas contra la salmonelosis asociada a los serotipos Typhimurium y Cholerasuis, pero no hay herramientas comerciales de inmunoprofilaxis para el resto de procesos. Además, son muy comunes las infecciones mixtas en las que participan varios de estos agentes. La detección directa de los patógenos implicados empleando técnicas de cultivo microbiológico, técnicas moleculares como la PCR o combinaciones de ambas constituye la base del diagnóstico del complejo entérico en esta etapa, aunque nuevamente la histopatología es una herramienta de utilidad que permite identificar el papel que juegan distintos microorganismos detectados en las infecciones combinadas (Zimmerman *et al.*, 2019).

Tabla 2: Características clínicas y epidemiológicas asociadas a los principales agentes etiológicos implicados en el complejo entérico porcino (adaptada de Zimmerman et al., 2019).

Etiología	Edad	Signos clínicos
<i>Escherichia coli</i> (ETEC, EPEC, VTEC)	Neonatal: 1-4 días de edad	Diarrea acuosa y amarillenta y deshidratación
	Postdestete: 2-3 semanas tras el destete	Diarrea, malestar, muertes súbitas / Edema de párpados y signos neurológicos
Rotavirus	De 1 día hasta 7 semanas de edad (más frecuente a las 2-3 sem)	Diarrea de acuosa a pastosa y deshidratación. La infección puede ser subclínica
<i>Clostridium perfringens</i> tipo C	De 1 a 14 días de edad	Diarrea acuosa a hemorrágica y muerte súbita
<i>Clostridium perfringens</i> tipo A	De 3 a 28 días de edad	Diarrea cremosa: suele ser leve pero puede afectar al ritmo de crecimiento
<i>Clostridioides difficile</i>	De 5 a 21 días de edad (raramente más edad)	Diarrea cremosa, deshidratación y edemas
<i>Cryptosporidium</i> spp	De 3 días hasta el destete	Diarrea amarillenta de leve a moderada
<i>Cystoisospora suis</i>	De 5 a 21 días de edad (algunas veces con mayor edad)	Diarrea acuosa amarillenta y retraso en el crecimiento
Coronavirus	Todas las edades	Diarrea acuosa, rápida deshidratación, vómitos, rápida difusión, elevada morbilidad y mortalidad en lechones de menos de 1-2 semanas de edad
<i>Circovirus porcino</i> tipo 2	De 6 a 12 semanas de edad (algunas veces con mayor edad)	Malestar, depresión, diarrea o emaciación acompañados, generalmente, por signos sistémicos
<i>Lawsonia intracellularis</i>	De 5 semanas hasta edad adulta	Diarrea de leve a grave (formas hemorrágicas en animales de más edad). La infección puede ser subclínica
<i>Brachyspira</i> spp fuertemente hemolíticas	De 6 semanas hasta edad adulta	Diarrea mucoide grave, generalmente diarrea mucohemorrágica
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	De 5 semanas hasta 4 meses de edad	Diarrea pastosa y mucoide, generalmente sin sangre
<i>Salmonella enterica</i>	Todas las edades, habitualmente tras el destete	Diarrea variable; de acuosa a teñida de bilis o mucohemorrágica y con flecos de fibrina
<i>Oesophagostomum dentatum</i>	Desde el destete hasta edad adulta	Diarrea moderada
<i>Trichuris suis</i>	Desde el destete hasta edad adulta	Diarrea mucoide, ocasionalmente mucohemorrágica
<i>Yersinia</i> spp	De 6 semanas hasta 4 meses de edad	Diarrea pastosa

4. Diarreas de etiología vírica

En los últimos años el uso racional y responsable de los antibióticos junto con el empleo sistemático de vacunas y mejoras en el manejo han conseguido un mejor control de las diarreas de etiología bacteriana, disminuyendo su impacto sobre las explotaciones porcinas. Sin embargo, la situación en lo que respecta al control de las diarreas de etiología vírica parece haberse complicado en los últimos 10-20 años. Han emergido y/o reemergido algunos virus y han aparecido, en algunos casos, nuevas variantes con mayor virulencia y/o transmisibilidad. La participación de algunos de estos agentes más nuevos en la etiología del complejo entérico está bien establecida, pero en muchos casos continúa siendo incierta (Zimmerman *et al.*, 2019).

Entre los virus con un papel relevante en la enfermedad entérica en la producción porcina se encuentran los CoV, que en los últimos años han centrado la atención en este campo, tras la emergencia en 2013 de la DEP en EE.UU. y otros países del continente americano y su re-emergencia en diferentes países europeos, y también los RV. Por su parte, entre los virus cuya implicación en la etiología del complejo entérico porcino está por esclarecer encontramos los kobuvirus, astrovirus, torovirus, orthoreovirus y los adenovirus porcinos, entre otros.

Tabla 3: Distribución por edades de los agentes víricos que han sido implicados en la etiología del complejo entérico porcino (adaptada de Zimmerman *et al.*, 2019).

1-2 días	3-4 días	5-6 días	1 semana	2 semanas	3 semanas	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses	Adulto
Rotavirus A (RVA)												
								Rotavirus B (RVB)				
Rotavirus C (RVC)												
Rotavirus H (RVH)												
Virus de la gastroenteritis transmisible (VGET)												
Virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP)												
Coronavirus entérico porcino (SeCoV)												
Deltacoronavirus porcino (PDCoV)												
Coronavirus del síndrome de diarrea aguda (SADS-CoV)												
								Astrovirus porcino (PAstV)				
Kobuvirus porcino (PKoV)												
								Torovirus porcino (PToV)				
Orthoreovirus de lo mamíferos (MRV)												
								Mastadenovirus porcino (PAdV)				

4.1 Coronavirus

Los coronavirus (CoV) son virus de la subfamilia *Orthocoronavirinae*, familia *Coronaviridae* y orden *Nidovirales*. De acuerdo al Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), actualmente esta subfamilia se clasifica en cuatro géneros, identificados como *Alphacoronavirus* (AlphaCoV), *Betacoronavirus* (BetaCoV), *Gammacoronavirus* (GammaCoV) y *Deltacoronavirus* (DeltaCoV). Como se muestra en el árbol filogenético de la Figura 1, estos géneros se separan claramente en grupos distintos. Hay una gran cantidad de especies diferentes de CoV, más de 45 reconocidas actualmente, la mayor parte del género BetaCoV, y 26 subgéneros (15 AlphaCoV, 5 BetaCoV, 3 DeltaCoV y 3 GammaCoV). Un estudio reciente de EcoHealth Alliance (<https://www.ecohealthalliance.org/>) junto con el Instituto de Virología de Wuhan y otras instituciones ha descrito más de 630 nuevas secuencias de coronavirus en murciélagos y se espera que el Global Virome Project (<http://www.globalviromeproject.org/>) aporte nuevas secuencias de coronavirus (Rodríguez Ferri, 2020; Rubio y Carvajal, 2020). Dados los continuos cambios que se producen en la taxonomía viral, en esta Tesis Doctoral identificaremos como especies diferentes a los distintos CoV que afectan al cerdo, aunque no todos ellos hayan sido reconocidos como tales por el ICTV.

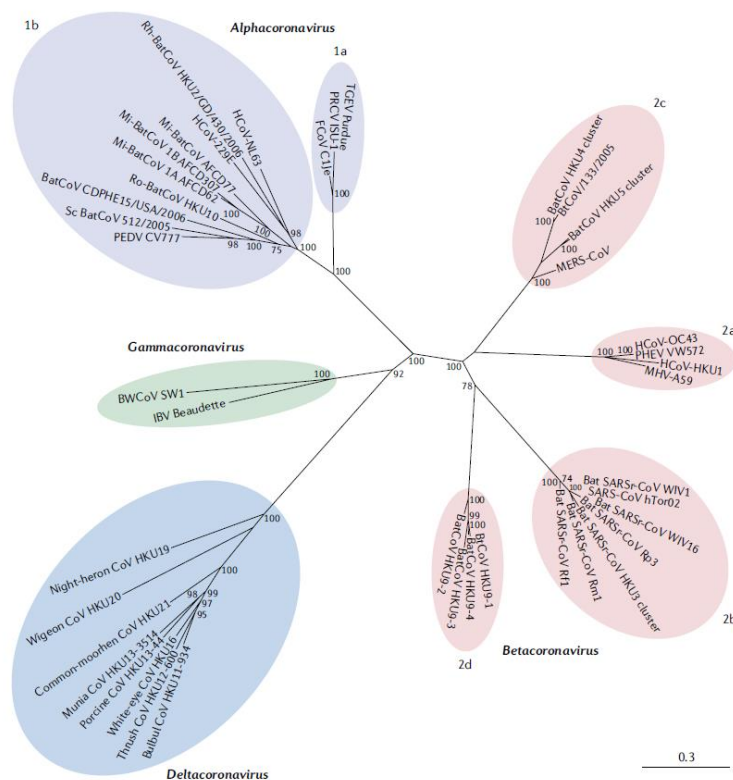


Figura 1: Árbol filogenético de los distintos géneros de coronavirus (tomada de Cui et al., 2019).

Los CoV son virus pleomórficos y con envoltura, con un diámetro total de 60-160 nm. La característica más prominente y definitoria de este grupo de virus son las estructuras en forma de espiga, denominadas espículas o peplómeros, en la superficie del virión y que les dan la apariencia de una corona solar (Zimmerman *et al.*, 2019; Rubio y Carvajal, 2020). El genoma de los CoV es un ARN monocatenario (25-30 kb) de polaridad positiva que contiene regiones no traducidas (UTR) en ambos extremos 3' y 5'. Dos tercios del genoma desde el extremo 5' codifican proteínas necesarias para la replicación del ARN que se escinden por proteasas, generando hasta 16 proteínas no estructurales, incluyendo una polimerasa dependiente de ARN (RdRp) imprescindible para la replicación. Por su parte, el tercio del extremo 3' del genoma comprende al menos cinco marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican cuatro proteínas estructurales comunes a todos los CoV: N (nucleocápside), S (espícula), E (envoltura) y M (membrana) y una o más proteínas no estructurales.

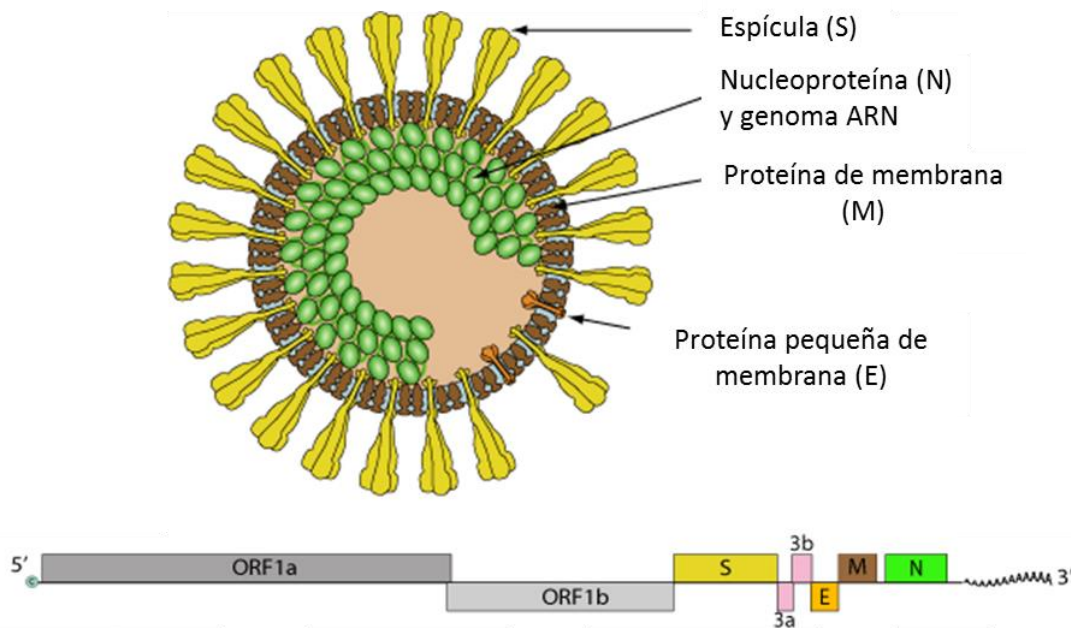


Figura 2: Estructura básica del virión y el genoma de un coronavirus (adaptada de Hulo *et al.*, 2011).

El genoma de los CoV se asocia con la proteína N, una fosfoproteína, para formar un complejo de ribonucleoproteína, largo y helicoidal. La glicoproteína M es la más abundante en el virión y está embebida en la envoltura lipoproteica, derivada de la célula hospedadora, junto con las proteínas S y E (Antas y Woźniakowski, 2019). La proteína E, denominada anteriormente sM o “proteína pequeña de membrana”, es de pequeño tamaño, pentamérica y necesaria para el autoensamblaje de nuevos viriones. Por su parte, la proteína S es una glicoproteína que constituye los peplómeros o espículas y es la

responsable de la unión específica a los receptores celulares, permitiendo la entrada del virus en la célula del hospedador y determinando el tropismo, y la principal responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes. El receptor que emplea esta proteína S para entrar en la célula hospedadora está muy poco conservado entre los diferentes CoV. Este hecho permite que el rango de hospedadores y también de tejidos en los que replican estos virus sean muy amplios. Además, las características de este receptor son determinantes en los fenómenos de salto de especie y de adaptación a nuevos hospedadores (Perlman y Netland, 2009).

El primer CoV descrito fue el *Virus de la bronquitis infecciosa aviar*, IBV en su abreviatura en lengua inglesa, un GammaCoV descrito en 1936 y que fue cultivado en embrión de pollo en 1937 (Rubio y Carvajal, 2020). En 1940 se demostró que los pasajes sucesivos de este virus en embrión de pollo producían una atenuación que permitía emplearlo para la protección de las gallinas, desarrollándose en los años 50 del pasado siglo la primera vacuna frente a una enfermedad causada por un CoV (Jordan, 2017). En años sucesivos se fueron describiendo diferentes enfermedades causadas por CoV en animales; así, en 1949 en ratones, en 1954 en cerdos, en 1962 en gatos o en 1974 en perros (Saif, 2004). Los CoV humanos fueron descubiertos más tarde, a partir de los años 60 del pasado siglo. Incluyen, actualmente, dos AlphaCoV responsables de resfriado común, virus 229E y NL63, y cinco BetaCoV (Figura 3). Entre estos BetaCoV se encuentran los CoV emergentes responsables de enfermedad respiratoria grave en el hombre y que han causado pandemias en el presente siglo: el *Virus del síndrome respiratorio agudo grave* o SARS-CoV, el *Virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio* o MERS-CoV y el SARS-CoV-2 causante de la enfermedad conocida como COVID-19 (coronavirus disease-19) (Petrosillo *et al.*, 2020; Rubio y Carvajal, 2020).

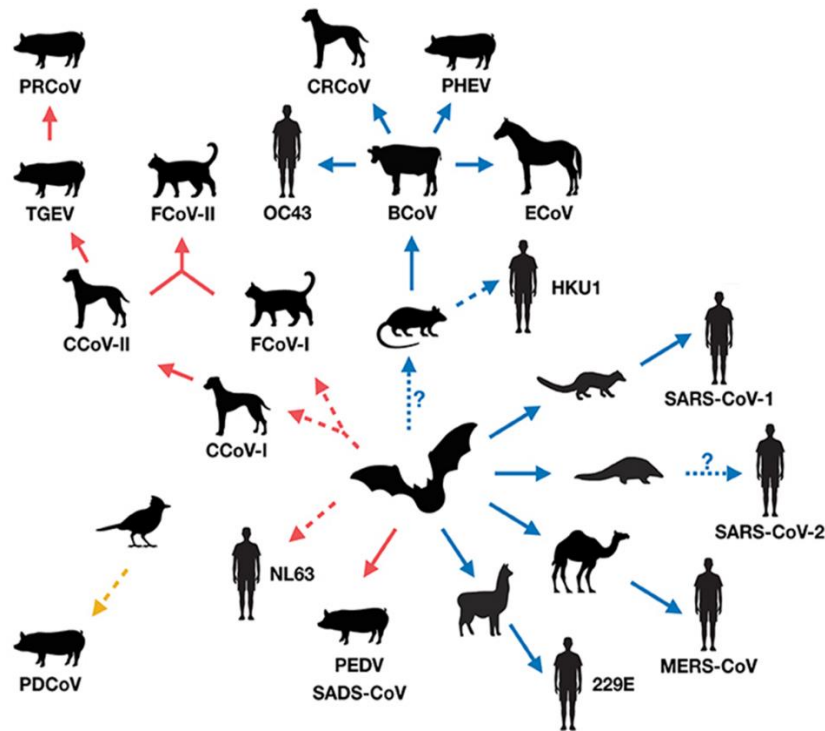


Figura 3: La evolución de los coronavirus en los seres humanos y los mamíferos domésticos a través de posibles especies hospedadoras intermediarias silvestres. Las flechas rojas, azules y amarillas indican la dirección de la aparición de coronavirus para los Alfacoronavirus, los Betacoronavirus y los Deltacoronavirus, respectivamente. Las flechas sólidas representan la transmisión directa (confirmada o sospechada) de coronavirus entre especies hospedadoras, y las flechas discontinuas representan la sospecha de transmisión indirecta a través de un hospedador intermediario no identificado. Las flechas discontinuas con un signo de interrogación indican eventos de propagación inciertos (tomada de Nova, 2021).

Entre los CoV que infectan al hospedador porcino nos encontramos con dos virus reconocidos como causa de diarrea en el cerdo desde hace tiempo, el VDEP y el VGET. Ambos se incluyen en el género AlphaCoV y se caracterizan por producir brotes agudos de diarrea en cerdos de todas las edades, con alta mortalidad entre los animales lactantes en poblaciones sin inmunidad previa. El *Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina* es un BetaCoV ampliamente difundido en las poblaciones de cerdos de América y Europa y que ocasionalmente causa vómito y desmedro en lechones de menos de 4 semanas. El *Coronavirus del síndrome de diarrea aguda* (SADS-CoV) es otro AlphaCoV que recientemente se ha asociado en Asia a cuadros graves de diarrea en lechones neonatos, mientras que el *Deltacoronavirus porcino* (PDCoV), miembro del género DeltaCoV, ha sido identificado en la segunda década del siglo XXI como agente etiológico de una enfermedad entérica similar a la DEP o la GET. Finalmente, se ha descrito la existencia de un virus quimérico producido por la recombinación del VGET con el VDEP, denominado *Coronavirus entérico porcino* (SeCoV).

Tabla 4: Comparativa del cuadro clínico y lesional asociados a la infección por diferentes coronavirus entéricos porcinos (adaptada de Vlasova et al., 2020).

	Síntomas	Periodo de incubación	Ubicación de lesiones	Morbilidad	Letalidad	Grupo de edad más afectado
VDEP	Diarrea, vómitos y deshidratación	24-36 h	Yeyuno e íleon	100 %	Hasta el 100 %	Lechones lactantes
VGET	Diarrea, vómitos y deshidratación	24 h	Yeyuno e íleon	100 %	Hasta el 100 %	Lechones lactantes
SeCoV	Diarrea, vómitos y deshidratación	24-36 h	Yeyuno e íleon	100 %	Hasta el 100 %	Lechones lactantes
PDCoV	Diarrea, vómitos y deshidratación	1-3 d	Yeyuno, íleon y colon	Hasta el 100 %	40-80 %	Lechones lactantes
SADS-CoV	Diarrea y deshidratación	3-4 d	Yeyuno e íleon	Hasta el 100 %	Hasta el 100 %	Lechones lactantes

4.2 Virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP)

4.2.1 Origen y distribución mundial

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad infecciosa y altamente contagiosa causada por un AlphaCoV del subgénero *Pedacovirus*, el VDEP. Cursa con diarrea acuosa en cerdos de cualquier edad, aunque los cuadros clínicos más graves se observan en los lechones neonatos, en la primera semana de vida, con una intensa deshidratación a consecuencia del cuadro de diarrea y los vómitos que pueden causar hasta un 100 % de letalidad en las camadas afectadas.

El cuadro clínico de DEP fue descrito por primera vez en Reino Unido y Bélgica en los años 70, sin que hasta el momento se haya podido determinar su origen. El VDEP muestra una estrecha relación filogenética con un CoV detectado en murciélagos de cola de ratón (*Tadarida brasiliensis*) en Brasil, por lo que se ha propuesto un origen asociado a un salto de especie directo, murciélago-cerdo (Figura 3), para este virus porcino (Simas et al., 2015). Difundió por todos aquellos países europeos con una producción porcina relevante durante los años 80, causando brotes de diarrea de presentación epidémica y generalmente estacional, coincidiendo con los meses más fríos, caracterizados por la afectación repentina de un elevado número de animales en la explotación, con morbilidades próximas al 80-100 % y letalidades en lechones variables (50 % como promedio), aunque generalmente inferiores a las observadas en brotes de gastroenteritis transmisible porcina (GET) (Zimmerman et al., 2019). En los años 90, estas presentaciones epidémicas o epizooticas fueron haciéndose cada vez menos frecuentes, observándose formas endémicas o enzoóticas de la DEP en las cuales el cuadro clínico de diarrea se presentaba exclusivamente en los lechones durante la transición, al

desaparecer la protección pasiva proporcionada por las reproductoras, o en las cerdas de reposición (Vlasova *et al.*, 2020). Además, la frecuencia de los brotes de DEP en las explotaciones porcinas europeas fue disminuyendo de forma progresiva, convirtiéndose en una enfermedad esporádica. Esta situación se mantuvo en los primeros años del siglo XXI, describiéndose un único brote epidémico de DEP en Italia, con más de 50 granjas afectadas en una región con elevada densidad porcina en el norte del país (Martelli *et al.*, 2008).

En Asia, el VDEP fue confirmado por primera vez en 1983 en China y en Japón, extendiéndose hacia otros países productores de la región como Corea del Sur, Filipinas o Tailandia en los años 90. Al contrario de lo que ocurrió en Europa y a pesar del uso de vacunas, tanto inactivadas como atenuadas para su control, la DEP se ha mantenido como una de las principales causas de diarrea en las explotaciones porcinas de la región desde su aparición y hasta el momento actual (Song y Park, 2012). Además, en 2010 y comenzando en el sur de China, se describen brotes particularmente graves de esta enfermedad, con letalidades elevadas en los lechones más jóvenes (50-90 %); estos brotes rápidamente se extienden por todo el país y posteriormente por toda la región, atribuyéndose a la aparición de nuevas variantes más virulentas del VDEP (Song y Park, 2012).

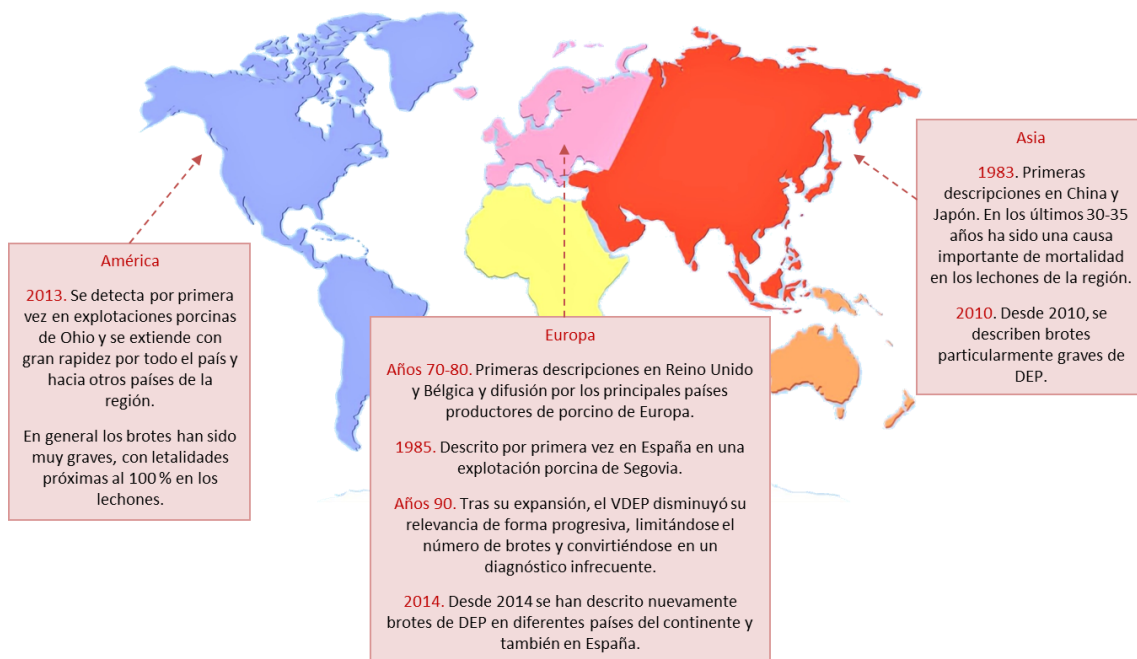


Figura 4: Evolución histórica en distintos ámbitos geográficos de la infección por el VDEP (adaptada de Prieto Suárez *et al.*, 2017).

La emergencia del VDEP en el continente americano fue más tardía, pero se caracterizó por un gran impacto clínico y una difusión explosiva. La primera explotación infectada se identificó en Iowa, en abril de 2013, confirmándose laboratorialmente la participación del VDEP en la primera semana del mes de mayo. El VDEP se extendió con gran velocidad por todo el país, afectando en el primer año de epidemia a más de 5.500 granjas en 25 estados y difundiéndose hacia otros países en el norte, centro y sur del continente (Canadá, México, Perú, República Dominicana, Colombia o Ecuador). Dos años después de su entrada, más del 50 % de las explotaciones de EE.UU. se habían infectado por el VDEP, habiéndose determinado que el movimiento de animales, así como el personal de las granjas, los camiones de transporte o el pienso contaminado fueron los principales factores implicados en esta vertiginosa difusión. En los años posteriores se ha observado una disminución gradual del número de brotes de DEP diagnosticados, así como de su gravedad, probablemente a consecuencia del desarrollo de inmunidad específica y de la circulación de cepas del VDEP menos virulentas. En lo que respecta al origen de este virus en los EE.UU., los estudios filogenéticos demostraron que los aislados circulantes en este país al inicio de la epidemia eran muy similares a los recuperados en Asia en los años inmediatamente anteriores, habiéndose propuesto que los contenedores flexibles de tela o rafia empleados en el transporte internacional de diferentes materias primas podrían estar implicados en esta transmisión (Lee, 2015).

La emergencia del VDEP en el continente americano también tuvo impacto a nivel mundial. El VDEP reemergió en países de Asia en los que se habían aplicado estrictas medidas para el control de la infección como Japón o Corea, habiéndose propuesto que esta reemergencia fue consecuencia de movimientos comerciales con EE.UU. (Prieto Suárez *et al.*, 2017). Además, en el invierno 2013-2014, el VDEP reemergió en diferentes países europeos, generando gran alarma entre los productores y las autoridades sanitarias. A pesar de que *a priori* la población porcina europea carecía, en su gran mayoría, de anticuerpos específicos frente al VDEP, dada la escasa o nula circulación de este virus antes de esta re-emergencia, tanto el impacto clínico como la difusión del VDEP en el continente europeo fueron limitados (Carvajal *et al.*, 2015).

El enorme interés suscitado por esta enfermedad emergente unido a la disponibilidad de nuevas técnicas de secuenciación y la disminución de su coste ha permitido un gran avance en los últimos años en los estudios de caracterización molecular de los aislados. Hoy en día están disponibles en la base de datos de GenBank las

secuencias completas de más de 400 aislados del VDEP. Aunque la homología de nucleótidos es superior al 90-95 % cuando se compara el genoma completo, existen regiones particularmente variables y el estudio en detalle de las mismas ha permitido identificar diferentes grupos o clústers de este virus (Zimmerman *et al.*, 2019).

De particular interés son las diferencias descritas en la región que codifica la proteína S o proteína de los peplómeros o espículas del virus, que como ya hemos mencionado es la principal responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes, del tropismo y de la entrada en la célula hospedadora de los CoV. Los denominados aislados INDEL o S-INDEL, actualmente identificados como G1, presentan inserciones y deleciones en la región S1 del gen que codifica la proteína S y se han asociado a brotes de enfermedad con menor mortalidad y duración. Por su parte, los aislados no-INDEL o G2 no muestran estas inserciones y deleciones y parecen ser aislados más virulentos, identificándose con frecuencia en explotaciones con letalidades próximas al 100 % en los lechones más jóvenes. Un estudio realizado en EE.UU. en 2016 evaluó experimentalmente la patogenicidad de estos dos grupos de aislados, confirmando las observaciones realizadas en campo; así, los lechones desafiados con aislados INDEL mostraban signos clínicos más leves, menor eliminación viral en las heces y menos lesiones que los desafiados con variantes no-INDEL (Chen *et al.*, 2016). Un resultado similar ha sido descrito recientemente cuando se comparó la patogenicidad de un aislado no-INDEL de origen norteamericano con un aislado INDEL de origen francés (Gallien *et al.*, 2018).

Tanto en el continente americano como en diferentes países de Asia se ha demostrado la circulación simultánea de aislados INDEL y no-INDEL en las explotaciones porcinas. Por el contrario, en Europa, las cepas que circulan desde el año 2014 son cepas INDEL, muy similares a las observadas en EE.UU. En Europa tan solo ha sido descrito un brote de DEP asociado a una cepa no-INDEL en una explotación porcina de Ucrania en el verano de 2014 (Dastjerdi *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que las cepas identificadas en los años 70 y 80 en Europa son también del tipo INDEL, aunque se agrupan en un clúster completamente separado de los aislados INDEL más recientes (clúster G1a para las cepas europeas y asiáticas de los años 80 y clúster G1b para las cepas más recientes tanto europeas como americanas o asiáticas).

4.2.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

El VDEP se transmite principalmente, sino exclusivamente, por la ruta fecal-oral, tanto de forma directa como indirecta. Los cerdos infectados excretan virus en las heces desde el día 1-2 postinfección y la entrada del virus en los cerdos receptivos se produce por vía oral.

Esta transmisión se ve favorecida por los siguientes factores:

- Intensa eliminación viral en las heces de los animales infectados (Madson *et al.*, 2014; Crawford *et al.*, 2015; Jung, Annamalai, *et al.*, 2015; Krishna *et al.*, 2020).
- Periodos de excreción de virus en las heces relativamente prolongados. Aunque clásicamente se consideraba que los animales solo eliminaban el VDEP en las heces durante 5-7 días, en la actualidad, empleando técnicas más sensibles, se han demostrado periodos de excreción viral de hasta 3-6 semanas en una cierta proporción de los infectados (Krishna *et al.*, 2020). Diversos estudios han demostrado que esta eliminación se prolonga más allá de los signos clínicos de diarrea (portador convaleciente), favoreciendo la transmisión de la infección (Crawford *et al.*, 2015; Gallien *et al.*, 2018; Díaz *et al.*, 2021).
- Baja dosis infectante (Thomas *et al.*, 2015).
- Una cierta resistencia ambiental que favorece la transmisión indirecta a través de diferentes vehículos, entre los que destacan los alimentos, el agua y todo tipo de fómites como camiones, calzado o ropas, particularmente cuando existen bajas temperaturas, elevada humedad y escasa exposición a la luz solar (Carvajal *et al.*, 2015; Dortmans *et al.*, 2018).

El VDEP se mantiene viable en heces o purines durante periodos de 2 semanas a temperaturas de 25 °C y hasta 28 días a 4 °C. También sobrevive en piensos contaminados; hasta 7 días en piensos secos a 25 °C y 14 días si el pienso es húmedo a la misma temperatura. Todo ello favorece la transmisión indirecta a través de diferentes vehículos, así como una típica presentación estacional, concentrándose los brotes de DEP en los meses más fríos del año (Kong *et al.*, 2020). Sin embargo, como corresponde a un virus con envoltura, el VDEP es sensible a los detergentes y a la gran mayoría de los desinfectantes de uso habitual.

La rápida diseminación del VDEP en el continente americano hizo surgir dudas acerca de otras posibles vías de transmisión:

- Teóricamente, el virus puede viajar distancias cortas en partículas de heces suspendidas en el aire y algunos trabajos han demostrado la presencia de material genómico del virus en el aire a una cierta distancia de explotaciones infectadas (Alonso *et al.*, 2014). Sin embargo, no se ha podido demostrar que esas muestras positivas contengan realmente virus con capacidad infectante y en dosis suficientes.
- Se ha demostrado la presencia de material genético del VDEP en leche y en semen de animales infectados, pero tampoco se ha probado que estas secreciones tengan capacidad infectante (Gallien *et al.*, 2018).
- Es posible demostrar la presencia de material genético del VDEP en la sangre de algunos animales infectados y se ha investigado el papel del plasma porcino atomizado (SDPP) empleado en la alimentación de lechones como posible fuente de infección por su contaminación intrínseca. Sin embargo, se ha comprobado que los procedimientos a los que se somete el plasma durante la producción junto con las condiciones de almacenamiento son suficientes para inactivar el VDEP, en caso de que este virus pudiera estar presente en el sustrato inicial (Opriessnig *et al.*, 2014; Pujols y Segalés, 2014).
- También se ha propuesto el posible papel de vectores y de otros hospedadores en la transmisión del VDEP. No se ha podido demostrar la multiplicación de este virus en ningún hospedador diferente al cerdo, aunque no se puede excluir la posibilidad de que diferentes vectores puedan participar en la transmisión mecánica del virus dentro de las explotaciones o incluso entre diferentes granjas (Gebhardt *et al.*, 2018).
- Un estudio realizado en Corea del Sur en 2021 demostró la transmisión vertical del VDEP a través de la placenta, detectándolo en los tejidos testiculares de los lechones y en los cordones umbilicales de las cerdas desafiadas experimentalmente mediante técnicas moleculares y técnicas inmunológicas. Además se consiguió aislar en cultivos celulares el VDEP del cordón umbilical, demostrando su viabilidad (Ryu *et al.*, 2022).

Como mencionamos anteriormente, se han descrito dos presentaciones epidemiológicas de la DEP en las granjas. Los brotes epidémicos se producen cuando se

introduce el virus en una granja sin exposición previa, es decir, donde la mayoría o la totalidad de los animales son seronegativos. En esta situación la enfermedad se extiende rápidamente, afectando a cerdos de todas las edades con una morbilidad cercana al 100 %. Además, el VDEP puede persistir y evolucionar hacia una presentación endémica en la granja, circulando en los lechones postdestete cuando pierden la inmunidad lactogénica, así como en las cerdas jóvenes de reposición seronegativas y recién introducidas en la explotación (Carvajal *et al.*, 2015).

4.2.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

Tras la entrada por vía oral, el VDEP alcanza el intestino delgado donde se localizan sus células diana, los enterocitos maduros de la vellosidad intestinal. Se multiplica en el citoplasma de estas células, fundamentalmente en el yeyuno e íleon y en menor grado en el colon, causando su destrucción y, consecuentemente, el acortamiento de las vellosidades intestinales. La diarrea se produce a consecuencia de un síndrome de malabsorción y mala digestión por la desaparición de las células maduras y el acortamiento de la vellosidad. La presencia de material no digerido en la luz intestinal complica el cuadro clínico de diarrea osmótica (Prieto Suárez *et al.*, 2017). Otros signos clínicos que se asocian con frecuencia a la infección por el VDEP son vómitos, anorexia y fiebre.

La letalidad en los brotes de DEP depende en gran medida de la edad de los animales afectados. Puede alcanzar hasta el 80-100 % en lechones de menos de una semana de edad, mientras que en cerdos destetados no suele superar el 1-3 % (Martelli *et al.*, 2008; Stevenson *et al.*, 2013). En los cerdos adultos no suelen observarse bajas asociadas a la infección. El recambio más lento de los enterocitos en los lechones neonatos (5-7 días) en comparación con los lechones de tres semanas (2-3 días) podría explicar, al menos parcialmente, la mayor susceptibilidad de estos lechones jóvenes al VDEP (Zimmerman *et al.*, 2019).

Se han descrito trastornos reproductivos en las cerdas, abortos y repeticiones de celo, durante algunos brotes de DEP (Olanratmanee *et al.*, 2010; Furutani *et al.*, 2017); no obstante, estos datos deben ser tomados con precaución ya que podrían ser consecuencia del empleo de la exposición deliberada de las reproductoras a las heces de lechones infectados o “feedback” con el fin de inmunizar a las cerdas gestantes. Este manejo, habitual en las granjas infectadas para favorecer la protección pasiva de los

lechones, implica la exposición al VDEP pero también a otros agentes que puedan estar en las heces o el contenido intestinal de los lechones afectados.

La replicación del VDEP ha estado clásicamente circunscrita al TGI. Sin embargo, una investigación reciente ha demostrado la capacidad de este virus para multiplicarse en macrófagos alveolares de lechones de 3 días de edad sin toma de calostro, tras su inoculación experimental con un aislado de campo de origen surcoreano (Park y Shin, 2014). Además, como hemos mencionado anteriormente, empleando técnicas moleculares se ha demostrado la presencia de material genético del VDEP, en concentraciones moderadas y durante corto tiempo, en la sangre de una proporción significativa de los animales afectados (Jung, Annamalai, *et al.*, 2015) y en testículos de lechones neonatos procedentes de madres con una infección activa (Ryu *et al.*, 2022). Sin embargo, a día de hoy, se desconoce la relevancia de estas potenciales replicaciones extraintestinales del VDEP desde un punto de vista clínico o epidemiológico.

4.3 Virus de la gastroenteritis transmisible porcina (VGET)

4.3.1 Origen y distribución mundial

La GET es, al igual que la DEP, una enfermedad entérica, altamente contagiosa y causada por un CoV del género AlphaCoV, subgénero *Tegacovirus*, el VGET. Clínicamente se caracteriza por vómitos, diarrea grave y una elevada letalidad, a menudo del 100 %, en lechones de menos de dos semanas de edad.

La GET fue descrita por primera vez en EE.UU. en 1946 (Doyle y Hutchings, 1946), distribuyéndose posteriormente por todos los países con una producción porcina relevante y siendo una de las principales enfermedades entéricas y causa de mortalidad en lechones a nivel mundial en las décadas de los 60 y 70 del pasado siglo (Zimmerman *et al.*, 2019). Sin embargo, la aparición del *Coronavirus respiratorio porcino* (CVRP) en Europa en 1984 modificó de forma definitiva la epidemiología de esta infección. El CVRP es un mutante del VGET caracterizado por una delección en el gen que codifica la proteína S, en su extremo N-terminal, que da lugar a una proteína S de menor tamaño, modificando el tropismo del virus, que pasa de entérico a respiratorio (Pensaert, 1989). Se ha demostrado que esta delección de unos 200 aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína S se asocia, además, a la pérdida de la capacidad de unión al ácido siálico, factor importante para la adhesión a la mucina, haciendo que el CVRP no pueda superar con facilidad la barrera de mucus en el TGI (Schwegmann-Wessels y Herrler, 2006).

La presencia de este virus respiratorio fue detectada en Europa en 1984, cuando se observó en Bélgica una elevada prevalencia de cerdos con anticuerpos neutralizantes frente al VGET y en ausencia de historia clínica compatible con GET (Prieto Suárez *et al.*, 2017). Este hallazgo fortuito hizo saltar todas las alarmas y, muy poco tiempo después, en 1986 se logró el aislamiento de este nuevo virus (Pensaert *et al.*, 1986). La difusión del CVRP por vía respiratoria en las explotaciones porcinas europeas en los 80 y 90 y, más recientemente, en los EE.UU. ha proporcionado protección cruzada frente al VGET y ha hecho disminuir la incidencia de los brotes asociados a este CoV, convirtiendo a la GET en una enfermedad esporádica en estas regiones (Zimmerman *et al.*, 2019).

En la actualidad, el VGET sigue siendo una causa importante de diarrea grave en los lechones de explotaciones CVRP seronegativas en América del Norte mientras que en Asia, VGET y VDEP frecuentemente cocirculan, generando importantes pérdidas económicas y haciendo necesario llevar a cabo un diagnóstico diferencial. Al contrario que la DEP, la GET es una enfermedad de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). En las figuras 5, 6 y 7 se muestran los datos de incidencia de los últimos años a nivel mundial, en Europa, América y Asia.

El VGET y el CVRP están muy relacionados y se incluyen en un mismo subgrupo o subgénero de AlphaCoV junto con los CoV caninos (I y II) y el CoV felino (Decaro y Lorusso, 2020). En base a las características del gen de la proteína accesoria ORF3 se ha propuesto que el VGET se originó por un salto de especie a partir del CoV canino tipo II (Figura 3). Recientemente se ha descrito la circulación en perros de un virus recombinante entre el VGET y el CoV canino tipo II, identificado como subtipo IIb del CoV canino (Decaro *et al.*, 2010).

Aunque no existe mucha información respecto a la variabilidad genética del VGET, tradicionalmente, los aislados se clasifican en dos subgrupos, identificados como Miller y Purdue. En el año 2017 se identificó un aislado del VGET particularmente virulento originado por la recombinación natural entre las cepas Miller M6 y Purdue 115, denominado JS2012 (Zhang *et al.*, 2017). Este VGET recombinante fue descrito en una granja de cerdos en la provincia de Jiangsu, en China, y se asoció a una letalidad del 100 % en los lechones en los primeros días de vida (Guo *et al.*, 2020).

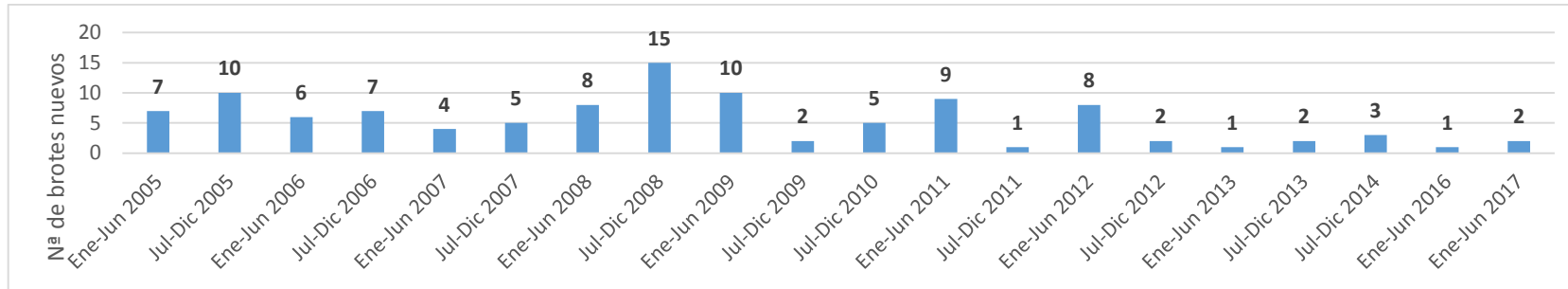


Figura 5: Brotes de GET declarados a la OMSA en Europa entre enero de 2005 y junio de 2017 (tomada de OMSA, 2022).

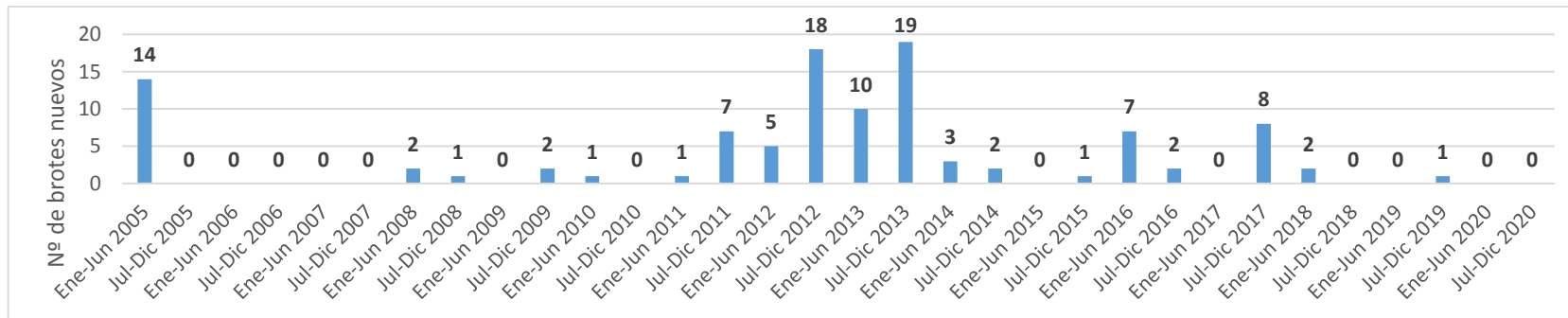


Figura 6: Brotes de GET declarados a la OMSA en América entre enero de 2005 y diciembre de 2020 (tomada de OMSA, 2022).

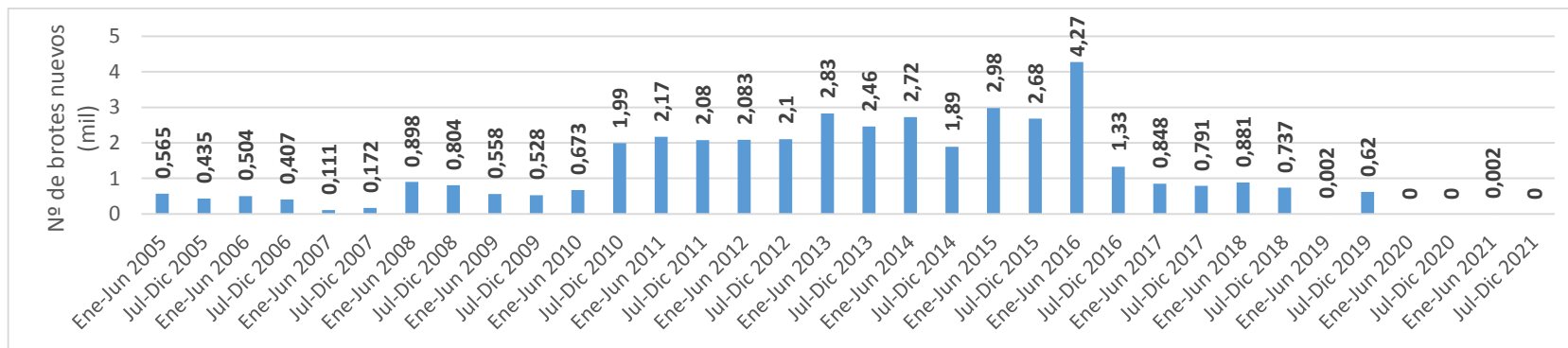


Figura 7: Brotes de GET declarados a la OMSA en Asia entre enero de 2005 y diciembre de 2021 (tomada de OMSA, 2022).

4.3.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

Los cerdos infectados excretan el VGET por las heces y, en menor medida, por vía respiratoria y mamaria. La duración de esta eliminación es variable, habiéndose descrito periodos superiores a los 100 días o incluso hasta 18 meses en un estudio, aunque no se ha podido demostrar la excreción de virus viable en estos individuos portadores crónicos (Woods y Wesley, 1998).

La transmisión directa se produce por el contacto estrecho con las heces y también por vía aerógena en distancias inferiores a 1 metro. Por su parte, la transmisión indirecta implica la exposición al virus presente en diferentes vehículos o vectores. Al igual que ocurría para el VDEP, los vehículos de transporte contaminados, el alimento, el agua y todo tipo de fómites pueden participar en esta transmisión indirecta, favorecidos por la resistencia ambiental del virus en condiciones de baja temperatura. Adicionalmente, se ha podido demostrar la transmisión a partir de otros hospedadores, habiéndose comprobado que los perros, gatos o zorros infectados excretan el VGET en sus heces durante periodos de 1 o 2 semanas y en ausencia de signos clínicos de diarrea (Prieto Suárez *et al.*, 2017). Por su parte, diferentes aves o insectos pueden participar en la transmisión mecánica del virus. La resistencia del VGET a las bajas temperaturas favorece que los brotes de la enfermedad tengan una marcada presentación estacional, siendo típicos de los meses más fríos del año.

Al igual que ocurría con los brotes de DEP, la GET puede presentarse de forma epidémica, cuando el virus entra en una explotación negativa, o en forma de brotes endémicos, cuando el virus persiste en una explotación afectando a los animales que pierden la inmunidad materna o a los animales que se incorporan. La forma epidémica se produce cuando la mayoría de los animales de la explotación son seronegativos al VGET y al CVRP y, por tanto, son receptivos a la infección por el VGET. Tras la entrada del virus, la enfermedad se extiende rápidamente a los cerdos de todas las edades, especialmente durante el invierno.

La GET endémica se refiere a la persistencia del virus y de la enfermedad en una explotación por la existencia de cerdos receptivos. La GET endémica es una secuela común de un brote epidémico y ocurre en granjas seropositivas que tienen partos frecuentes (Vlasova *et al.*, 2020), afectando a los lechones destetados cuando pierden la inmunidad maternal. También se produce en granjas en las que existen entradas frecuentes de animales receptivos entre los cuales puede circular el VGET. En esta

situación, la circulación viral es mucho más lenta y se producen cuadros clínicos más leves. El sistema de gestión de la granja y el grado de inmunidad pasiva transferida afectarán a esta presentación. La GET endémica en cerdos lactantes o recién destetados puede ser difícil de diagnosticar y debe diferenciarse de la enfermedad entérica causada por otros patógenos entéricos que afectan a lechones, como los RV, ETEC, EPEC o *C. perfringens*.

4.3.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

Al igual que ocurría en la DEP, los enterocitos maduros de las vellosidades intestinales del yeyuno e íleon son las principales células diana. La multiplicación del VGET en el citoplasma de estas células produce su lisis, el acortamiento notable de las vellosidades y un cuadro clínico de diarrea, causada principalmente por mala digestión y malabsorción (Moon, 1978). El cuadro clínico y las lesiones de la GET son indistinguibles de los de la DEP, con vómitos y una diarrea profusa que afecta a animales de todas las edades y que evoluciona hacia deshidratación en los lechones de menos de 2 semanas de edad. En las presentaciones epidémicas, la enfermedad progresa con gran rapidez dentro de la explotación, la morbilidad es muy elevada y la letalidad en los lechones de menos de 1 semana de edad puede alcanzar el 100 %. La mayoría de los animales presentan inapetencia, vómitos o diarrea. Los cerdos lactantes se deshidratan rápidamente y la letalidad es muy elevada en las dos primeras semanas de vida. Las cerdas en lactación suelen presentar anorexia y agalactia, con una reducción de la producción de leche, hecho que contribuye aún más a la mortalidad de los lechones (Zimmerman *et al.*, 2019). Por el contrario, en las presentaciones endémicas los signos clínicos son menos graves, la morbilidad es moderada y casi todos los afectados superan el proceso, con letalidades inferiores al 10-20 % en los cerdos desde los 6 días de edad y hasta aproximadamente las 2 semanas posteriores al destete. El acortamiento intenso de las vellosidades intestinales en el yeyuno e íleon es la principal lesión (Zimmerman *et al.*, 2019).

Los macrófagos alveolares en los pulmones y el tejido de la glándula mamaria son lugares de replicación extraintestinal reconocidos en la infección por el VGET (Kemeny *et al.*, 1975). Se ha descrito que la infección oronasal de los cerdos con el VGET puede causar un cuadro de neumonía (Underdahl *et al.*, 1975) mientras que la importancia clínica de la infección de la glándula mamaria no ha sido determinada. En este sentido, cabe mencionar que, como hemos indicado, la agalactia es un signo clínico que se observa

con frecuencia en las cerdas infectadas por el VGET y que se propaga rápidamente en la población.

Por su parte, el CVRP tiene tropismo por el tracto respiratorio y se multiplica en las células epiteliales de la nariz, tráquea, bronquios, bronquiolos, alvéolos y, en ocasiones, en los macrófagos alveolares. La multiplicación del virus induce necrosis en las células infectadas, pero las lesiones se resuelven con rapidez sin que, habitualmente, se manifiesten signos clínicos. En determinadas condiciones, el CVRP puede multiplicarse en los enterocitos, aunque la eliminación fecal de este virus es siempre de muy baja intensidad (Prieto Suárez *et al.*, 2017).

4.4 *Coronavirus entérico porcino (SeCoV)*

4.4.1 Origen y distribución mundial

El *Coronavirus entérico porcino (SeCoV)* es un virus quimérico producido por la recombinación del VGET o el CVRP y el VDEP. Su genoma está constituido por el del VGET estando substituido el gen de la proteína S de este virus por el gen de la proteína S del VDEP y supone un importante reto para el diagnóstico puesto que da lugar a identificación errónea cuando se emplean técnicas dirigidas a la detección de uno solo de estos dos virus o si las dianas empleadas para la identificación no son las adecuadas (Boniotto *et al.*, 2016; de Nova *et al.*, 2020). Así, si se emplean dos técnicas basadas en la detección de la proteína o el gen S del VDEP y el VGET, el diagnóstico será de DEP mientras que si se emplean dos técnicas basadas en la detección de la proteína o el gen M o N, el diagnóstico será de GET. Es necesario combinar técnicas específicas para ambos virus y dirigidas a diferentes dianas, proteína o gen S del VDEP y proteína N o M del VGET, para detectar la circulación del SeCoV (de Nova *et al.*, 2020).

Este virus recombinante ha sido descrito en diversos países europeos, aunque no fuera de Europa. La primera descripción se realizó en Italia en el año 2016, en muestras correspondientes a brotes de enfermedad entérica del periodo 2009-2012 (Boniotto *et al.*, 2016). A partir de esta primera identificación, este virus quimérico ha sido detectado en una granja porcina con un cuadro clínico compatible con DEP en Alemania en 2012 (Akimkin *et al.*, 2016) o en Eslovaquia en 2015 (Belsham *et al.*, 2016). Un trabajo retrospectivo realizado por nuestro grupo de investigación demostró que el SeCoV circuló en España entre 1993 y 2014, causando brotes de diarrea que fueron diagnosticados

erróneamente como DEP (de Nova *et al.*, 2020). El SeCoV se ha detectado nuevamente en 2019 en un brote de enfermedad entérica en Italia (Papetti *et al.*, 2022), aunque los estudios más recientes en Europa no han demostrado circulación de este virus (Antas *et al.*, 2021).

La infección simultánea en una misma célula del hospedador porcino por los dos virus progenitores, el VGET o el CVRP y el VDEP, está, evidentemente, en el origen de este virus. Respecto a la ubicación geográfica y temporal de este evento de recombinación, los limitados datos disponibles permiten sugerir que probablemente este virus apareció en Europa y coincidiendo una circulación importante de ambos virus.

4.4.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

Existen muy pocos datos en lo que respecta a las características epidemiológicas de la infección por el SeCoV. En un estudio realizado en Eslovaquia en 2015, en una granja de ciclo cerrado (Mandelik *et al.*, 2018), se demostró que la infección llegó a la explotación con dos machos reproductores procedentes de Noruega. Estos animales presentaron claros signos clínicos de enfermedad del TGI caracterizada por pérdida de apetito y diarrea. El proceso se extendió rápidamente por la granja, probablemente por la ruta fecal-oral y también con la participación del personal al cuidado de los animales (botas, ropas...). Estos dos animales no compartían espacio físico con otros animales de la granja, pero sí tenían contacto a través de los barrotes con las reproductoras gestantes. Así, los siguientes animales afectados fueron las cerdas antes del parto y, a continuación, todos los lechones en tres salas de parto. También existió una propagación rápida de la infección hacia y entre los cerdos de engorde, infectándose la granja por completo en dos semanas. En el plazo de 3-4 semanas, el brote se extendió a otra granja de cerdos con un propietario diferente, pero situada a sólo 100 m de la granja anterior, presentando una dinámica de infección similar.

4.4.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

Por el momento se desconoce el efecto de esta recombinación en la virulencia, el tropismo por diferentes órganos o la inmunidad, siendo necesarios estudios que permitan obtener esta información.

En las granjas afectadas no se describen bajas a partir del destete y la letalidad en los lechones lactantes oscila entre el 30 y el 35 % (Mandelik *et al.*, 2018). Además, se

han descrito abortos y repeticiones de celo en las cerdas en granjas infectadas, pero igual que señalámos anteriormente para el VDEP, este hecho podría estar relacionado con las estrategias de “feedback” empleadas para minimizar el impacto de la infección en los lechones.

4.5 *Deltacoronavirus porcino* (PDCoV)

4.5.1 Origen y distribución mundial

El *Deltacoronavirus porcino* (PDCoV) es un coronavirus enteropatógeno emergente del cerdo que causa diarrea aguda, vómitos, deshidratación y mortalidad en lechones neonatos.

En enero de 2014, coincidiendo con el brote epidémico de DEP en los EE.UU., la aplicación de técnicas de diagnóstico molecular en casos de diarrea permitió identificar la presencia de un nuevo CoV, en este caso un DeltaCoV, como causa de algunos de estos brotes (Wang *et al.*, 2014). Este nuevo virus, denominado *Deltacoronavirus porcino* (PDCoV), había sido descrito previamente, en 2012 (Woo *et al.*, 2012), en muestras de origen porcino en Hong Kong, sin vincularse inicialmente a enfermedad entérica. Los estudios de desafío experimental confirmaron la patogenicidad del PDCoV, asociándose con un cuadro clínico indistinguible del de la DEP o la GET en lechones durante las primeras semanas de vida (Chen *et al.*, 2015).

No existen hipótesis relativas a la introducción del PDCoV en los EE.UU., aunque las pruebas serológicas han demostrado que este virus circulaba en las granjas de cerdos del país desde 2010, habiendo pasado desapercibido durante 4 años (Sinha *et al.*, 2015). Los estudios retrospectivos realizados en China han demostrado, de forma similar, que el PDCoV circuló sin ser detectado en este país asiático desde 2004 (Dong *et al.*, 2015). Hasta el momento actual, el PDCoV se ha detectado en Hong Kong, EE.UU., Canadá, Corea del Sur, China, Tailandia, Vietnam, Laos, Taiwán, Japón, México, Haití y Perú (Marthaler, Raymond, *et al.*, 2014; He *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2022; More-Bayona *et al.*, 2022). Es importante destacar que, por el momento, el PDCoV nunca ha sido detectado en Europa.

Respecto al origen del PDCoV, los trabajos más recientes sugieren que este CoV se originó, probablemente, en el sudeste de Asia en los años 90 (Ye *et al.*, 2020). Se han descrito virus muy similares en otros mamíferos de vida libre, tanto mustélidos (tejón

turón chino o *Melogale moschata*) como felinos (gato de Bengala o *Prionailurus bengalensis*), en Asia, habiéndose propuesto que los DeltaCoV detectados en mamíferos derivan, directa o indirectamente, de CoV aviáres. Se desconoce exactamente el papel que estos pequeños mamíferos de vida silvestre han jugado en la aparición del PDCoV, siendo posible que se trate de hospedadores intermediarios a partir de los cuales el virus pudo alcanzar a los cerdos o, por el contrario, haber sido infectados a partir de la circulación del virus en la población porcina (Kong *et al.*, 2022). En cualquier caso, los estudios filogenéticos y el análisis de recombinación sugieren que el PDCoV puede ser fruto de uno o más eventos de recombinación entre DeltaCoV de diferentes aves, incluidos los virus HKU17 o ISU73347 aislados de loros y el virus HKU30 recuperado de codornices y perdices (Kong *et al.*, 2022).

4.5.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

El principal mecanismo de transmisión del PDCoV es la vía fecal-oral. Las heces, el vómito y todo tipo de fómites contaminados son las principales fuentes de infección. La eliminación del ARN viral en las heces tras el desafío experimental se prolonga entre 19 y 28 días (Hu *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2015), siendo destacable que esta eliminación supera ampliamente la duración del cuadro clínico. Este hecho permite proponer que los portadores convalecientes junto con los cerdos con infección subclínica pueden jugar un papel relevante en el mantenimiento y transmisión de esta infección, tal y como ocurre con el VDEP o el VGET.

Sin embargo, la excreción del PDCoV en las heces es claramente menor a la observada en las infecciones por el VDEP o el VGET, un hecho que puede ser indicativo de su adaptación incompleta o parcial al hospedador porcino. Este hecho contribuye a una propagación más lenta y a una menor letalidad de la infección en los lechones lactantes (Jung, Hu, *et al.*, 2015).

El PDCoV tiene capacidad para replicar en hospedadores diferentes del cerdo. Así, en 2019 se demostró su capacidad para infectar gallinas y pavos y también mamíferos como roedores y bovinos (Jung *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2019; Boley *et al.*, 2020). Además, un estudio reciente describe la detección del PDCoV en muestras de plasma de tres niños haitianos con una enfermedad febril aguda asociada a síntomas respiratorios y/o entéricos (Lednický *et al.*, 2021). Se ha propuesto que este amplio rango de hospedadores estaría relacionado con la aminopeptidasa N (APN), que ha sido

identificada como un receptor de entrada primario del PDCoV. Esta APN es muy similar entre diferentes hospedadores, así como en distintos tipos celulares. En este sentido, se ha demostrado que el PDCoV infecta *in vitro* células porcinas, humanas y de pollo a través de la APN (Li *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

4.5.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

El PDCoV replica en los enterocitos del epitelio del intestino delgado y grueso, causando unas lesiones y un cuadro clínico similares a los observados en las infecciones por el VGET o el VDEP, aunque por lo general más leves (Chen *et al.*, 2015; Jung, Hu, *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016).

El cuadro clínico se caracteriza por una diarrea aguda y acuosa debida a la malabsorción inducida por la pérdida masiva de enterocitos. Otros signos adicionales incluyen vómitos, deshidratación, pérdida de peso, letargia y muerte. Los cerdos seronegativos son receptivos a la infección por PDCoV a cualquier edad, alcanzándose morbilidades del 100 % en los lechones más jóvenes. La infección en las explotaciones de cría es autolimitada y se detiene cuando las cerdas gestantes desarrollan una inmunidad lactogénica que permite proteger adecuadamente a sus camadas (Zimmerman *et al.*, 2019).

Cabe destacar que en una proporción significativa de las granjas infectadas por PDCoV existe co-infección con el VDEP o el VGET. Por lo general, en aquellos casos en los que se identifica como único agente etiológico del cuadro de diarrea, tanto la morbilidad como la letalidad son notablemente inferiores a las observadas en los casos de GET o DEP, hecho que permite sugerir una menor virulencia del PDCoV (Chen *et al.*, 2015; Jung, Hu, *et al.*, 2015).

Las lesiones macroscópicas incluyen el adelgazamiento de la pared intestinal, desde el yeyuno y hasta el colon, y la acumulación de líquido amarillo con gas en la luz intestinal. A menudo el estómago se encuentra dilatado y contiene leche cuajada. Los hallazgos histológicos incluyen una enteritis atrófica de moderada a intensa, de multifocal a difusa, en el yeyuno y el íleon, a la que en ocasiones se une una vacuolización leve de las células del epitelio en el ciego y el colon (Jung, Hu, *et al.*, 2015). De forma similar a lo que ocurre en la DEP o la GET, la necrosis de los enterocitos infectados por el PDCoV (Jung *et al.*, 2016a) causa atrofia de las vellosidades localizada en el yeyuno y el íleon, pero no en el duodeno o el intestino grueso, lo que coincide con un menor número de

células epiteliales infectadas en estos tramos del TGI (Chen *et al.*, 2015; Jung, Hu, *et al.*, 2015).

De forma similar a lo descrito para el VDEP, se detectan concentraciones bajas de ARN del PDCoV en muestras de suero en la fase aguda de la infección (Chen *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2016). Tras la recuperación de los cerdos de la enfermedad clínica, se detectan concentraciones elevadas de antígenos del PDCoV en los tejidos linfáticos del intestino (Hu *et al.*, 2016), así como concentraciones moderadas o bajas de ARN viral, aunque no de antígenos, en múltiples órganos (Chen *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015).

4.6 *Coronavirus del síndrome de diarrea aguda (SADS-CoV)*

4.6.1 Origen y distribución mundial

El *Coronavirus del síndrome de diarrea aguda (SADS-CoV)* es un nuevo miembro del género AlphaCoV, detectado por primera vez en un devastador brote de enfermedad entérica ocurrido en 2017 en el sur de China, y que causó la muerte de aproximadamente 24.500 lechones y grandes pérdidas económicas (Gong *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018). Este mismo virus reapareció en enero de 2019 en granjas de cerdos en Guangdong, en China (Zhou *et al.*, 2019) y una investigación retrospectiva demostró que ha estado presente en granjas de cerdos en China desde, al menos, agosto de 2016 (Zhou *et al.*, 2019). Este nuevo CoV no se ha notificado, hasta el momento, fuera de China y dentro de este país, tan solo se ha detectado en granjas porcinas de las provincias de Guangdong y Fujian (Yang *et al.*, 2020).

La secuenciación y el análisis filogenético han demostrado que la secuencia del genoma de SADS-CoV es muy similar, homología superior al 95 %, a la de un CoV de murciélagos denominado HKU2, aislado del murciélago de herradura o *Rhinolophus ferrumequinum*, en Hong Kong y Guangdong en 2013-2016 (Gong *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020). Se ha propuesto que este nuevo CoV porcino corresponde a un salto de especie directo, del murciélago al hospedador porcino.

4.6.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

Todos los CoV entéricos porcinos (VDEP, VGET, SeCoV, PDCoV y SADS-CoV) tienen rutas y vías de transmisión similares. Las heces de los animales infectados son la principal fuente de infección y la ruta fecal-oral el principal mecanismo de

transmisión (Niederwerder y Hesse, 2018). Aunque no existen estudios específicos para el caso del SADS-CoV, estos serán, *a priori*, los principales mecanismos.

El receptor funcional de SADS-CoV también es motivo de preocupación. El gen de la proteína S presenta, en comparación con HKU2-CoV, numerosas inserciones y deleciones que generan cambios relevantes (75 aminoácidos sustituidos y 2 aminoácidos insertados). Este hecho podría estar relacionado con el proceso de transformación de su espectro de hospedadores (Pan *et al.*, 2017). Además, este virus es capaz de replicar con relativa facilidad *in vitro* sobre líneas celulares de diferentes especies, incluidas células humanas (Yang *et al.*, 2019; Edwards *et al.*, 2020).

4.6.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

Los signos clínicos de la enfermedad asociada a la infección por SADS-CoV son muy similares a los causados por otros CoV entéricos incluyendo anorexia, diarrea y vómitos, que pueden conducir a deshidratación, pérdida de peso, letargia y muerte. Estos signos clínicos no suelen durar más de 10 días. La enfermedad es más grave y a menudo letal en los lechones neonatos, especialmente en los nacidos de cerdas seronegativas. En los cerdos de más edad, como los destetados y las cerdas, la morbilidad es alta pero la letalidad baja (Liu y Wang, 2021).

Las lesiones son similares a las de otros CoV entéricos porcinos y se localizan, principalmente, en el intestino delgado, especialmente en el yeyuno y el íleon. Macroscópicamente existe adelgazamiento evidente de la pared intestinal y un contenido acuoso amarillo en el lumen intestinal (Pan *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018). A nivel microscópico la lesión característica es el acortamiento de las vellosidades y la destrucción de los capilares y del conducto central quiloso, que provocan la pérdida de la función intestinal

En un estudio reciente, Xu y colaboradores comprobaron que el SADS-CoV infectaba principalmente el intestino, causando una letalidad del 100 % y 50 % en lechones convencionales a los 5 y 7 días de edad, respectivamente (Xu *et al.*, 2018). Se ha detectado ARN de SADS-CoV en el corazón, el hígado, el bazo, los riñones, el estómago y los pulmones, pero no en la sangre de los lechones eutanasiados a los 7 días de vida, cuando los cerdos aún presentaban un cuadro clínico de diarrea grave.

4.7 Rotavirus

Los rotavirus (RV) son una de las principales causas de gastroenteritis aguda en niños pequeños y en animales, incluidos los lechones lactantes y destetados (Zimmerman *et al.*, 2019). Este género de virus está incluido en el orden *Reovirales* y familia *Sedoreoviridae*. Se trata de virus de ARN de doble cadena, sin envoltura, icosaédricos, con una cápside de aproximadamente 75 nm de diámetro compuesta por una triple capa de proteínas y con un genoma de 11 segmentos que codifican seis proteínas virales estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y cinco proteínas no estructurales (NSP1-NSP5) (Vlasova *et al.*, 2017). Las proteínas VP1, VP2 y VP3 forman la cápside interna del virión. La capa intermedia de la cápside está formada por la proteína VP6, mientras que la cápside externa está compuesta por las proteínas VP7 y VP4. Esta proteína VP4 se escinde proteolíticamente en las proteínas VP5 y VP8, permitiendo la adhesión y entrada en la célula del hospedador (Estes y Kapikian, 2007).

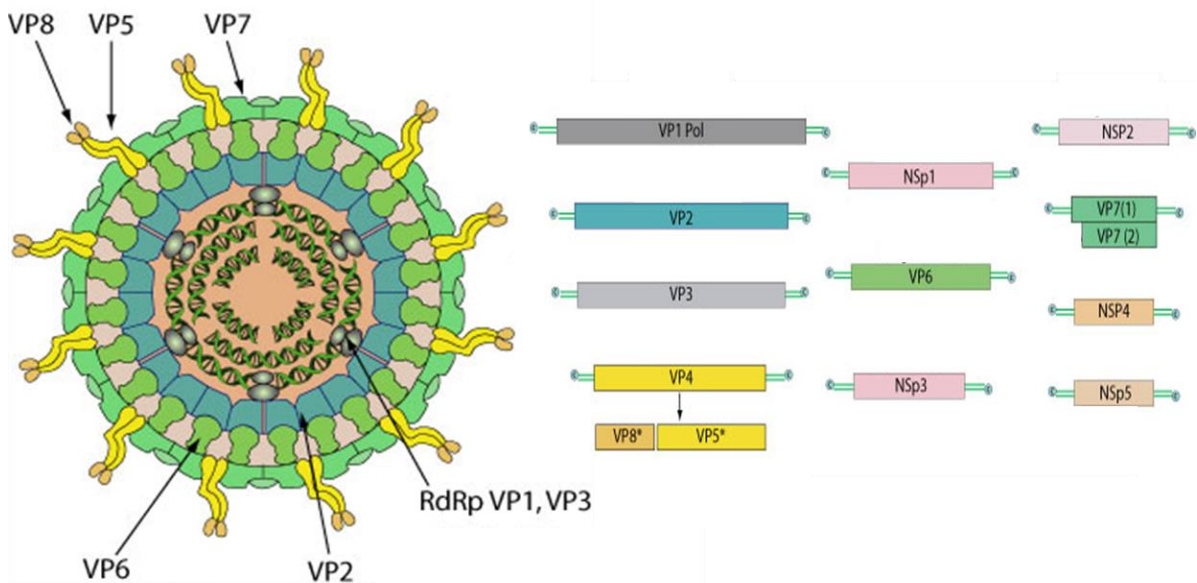


Figura 8: Estructura básica del virión y el genoma de un rotavirus (adaptada de Hulo *et al.*, 2011).

Los RV son virus altamente variables a consecuencia de la elevada frecuencia de los fenómenos de reordenamiento propios de los virus con genoma ARN segmentado. Gracias a este mecanismo se pueden mezclar segmentos génicos de diferentes RV que infectan simultáneamente una misma célula. Esta elevada variabilidad genética tiene importantes repercusiones en la frecuencia y en la distribución de las infecciones por estos virus ya que la inmunidad desarrollada tras la infección es específica de grupo y tipo y no protege de forma parcial frente a RV diferentes (Vlasova *et al.*, 2017).

Históricamente, los RV se agrupaban en base a los patrones de bandas del ARNd en un electroferograma y a su capacidad de neutralización cruzada en ensayos de reducción de placas en cultivos celulares (Estes y Kapikian, 2007). Hoy en día, las especies de RV se clasifican sobre la base de la secuenciación del gen de la proteína VP6, utilizando un valor de corte de identidad de nucleótidos del 53 % (Matthijnsens *et al.*, 2012). Actualmente hay 9 grupos o especies reconocidas, A-D y F-J. El grupo E de los RV fue identificado una única vez, en Inglaterra (Chasey *et al.*, 1986) en cerdos con diarrea, pero el ICTV decidió en 2019 abolir esta especie ante la falta de aparición de más cepas de la misma.

Los RVA, RVB, RVC, RVH, RVI y RVJ se han detectado en infecciones, tanto esporádicas como endémicas o epidémicas, en varias especies de mamíferos (Vlasova *et al.*, 2017), mientras que los RVD, RVF y RVG infectan aves de corral como pollos y pavos (Martella *et al.*, 2010). En el hospedador porcino se ha descrito la infección por RV de los grupos A, B, C y H (Zimmerman *et al.*, 2019). Aunque históricamente se consideraba que RVA era el más prevalente y patógeno en los cerdos, en la actualidad se ha identificado RVC como una causa importante de enteritis en lechones neonatos y se han asociado los RVB con infecciones en animales más adultos. Por el momento se desconoce si RVH es un patógeno significativo en este hospedador (Zimmerman *et al.*, 2019).

Las proteínas de la cápside externa, VP7 y VP4, inducen anticuerpos neutralizantes y son fundamentales desde el punto de la inmunidad frente a las infecciones por RV, constituyendo la base del sistema de tipificación dual G y P (Estes y Kapikian, 2007), con gran relevancia desde el punto de vista de la protección cruzada. Hasta la fecha, se han descrito 27 genotipos G y 37 genotipos P diferentes de RVA, tanto en humanos como en animales (Matthijnsens *et al.*, 2011). Para las cepas de RVA, este sistema de tipificación dual G/P se amplió en 2008 a un sistema de clasificación basado en la secuencia del genoma completo, con valores de corte de identidad porcentual de nucleótidos establecidos para los 11 segmentos de genes, con las notaciones G[x]-P[x]-I[x]-R[x]-C[x]-M[x]-A[x]-N[x]-T[x]-E[x]-H[x] para los genes que codifican VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5, respectivamente (Matthijnsens *et al.*, 2008). El Grupo de Trabajo de Clasificación de Rotavirus (GTCR) constituido en 2016 trata de establecer las directrices y desarrollar el sistema de clasificación de los RV

(Matthijnssens *et al.*, 2011), aunque, por el momento, solo ha abordado la clasificación de los RVA y no la de otras especies de este grupo de virus.

Como ya hemos indicado, los cerdos se infectan por una gran diversidad de serotipos o genotipos diferentes de RV, habiéndose demostrado que los tipos más prevalentes varían en función de la localización geográfica y también a lo largo del tiempo para una misma localización (Vlasova *et al.*, 2017). La distribución de los principales genotipos G y P de RVA detectados en los cerdos de diferentes regiones del mundo se muestran en la Figura 9. El conocimiento actualizado de esta distribución es fundamental para el diseño de estrategias de inmunoprofilaxis frente a los RV porcinos.

4.7.1 Origen y distribución mundial

Los RV son virus de distribución mundial, tanto en los cerdos como en otros hospedadores, y son endémicos en la gran mayoría de las granjas de cerdos. La gran variabilidad de estos virus y la limitada protección cruzada entre diferentes RV hace que en las explotaciones podamos ver el efecto de RV endémicos, que infectan a los animales que no han desarrollado inmunidad propia o animales que pierden la inmunidad materna, o de nuevos RV que entren en la granja dando lugar a brotes de características epidémicas al no existir inmunidad específica previa.

El RV bovino fue el primer RVA aislado en cultivo celular y confirmado como causa de diarrea en terneros en 1969 (Rodger *et al.*, 1982). El RV humano fue descubierto poco después, en 1973, por Bishop y colaboradores (1973). Los estudios posteriores demostraron la elevada prevalencia de las infecciones por RVA en animales jóvenes de diferentes especies de mamíferos, incluidos los cerdos, y su asociación con cuadros clínicos de diarrea en animales de menos de un mes de edad (Vlasova *et al.*, 2017).

Por su parte, los RVC se aislaron por primera vez en lechones en 1980 (Saif *et al.*, 1980) y posteriormente se identificaron en otros animales y en el hombre (Estes y Kapikian, 2007). El RVB también se describió por primera vez en un cerdo con diarrea en la década de los 80 (Theil *et al.*, 1985). Además de en la especie porcina, también se han detectado cepas de RVB en bovinos, corderos y ratas (Zimmerman *et al.*, 2019). En el caso del hombre, las infecciones por RVA y RVC se han identificado en todo el mundo, pero las infecciones por RVB tienen una distribución más limitada y sólo se han descrito en China, India y Bangladesh (Vlasova *et al.*, 2017).

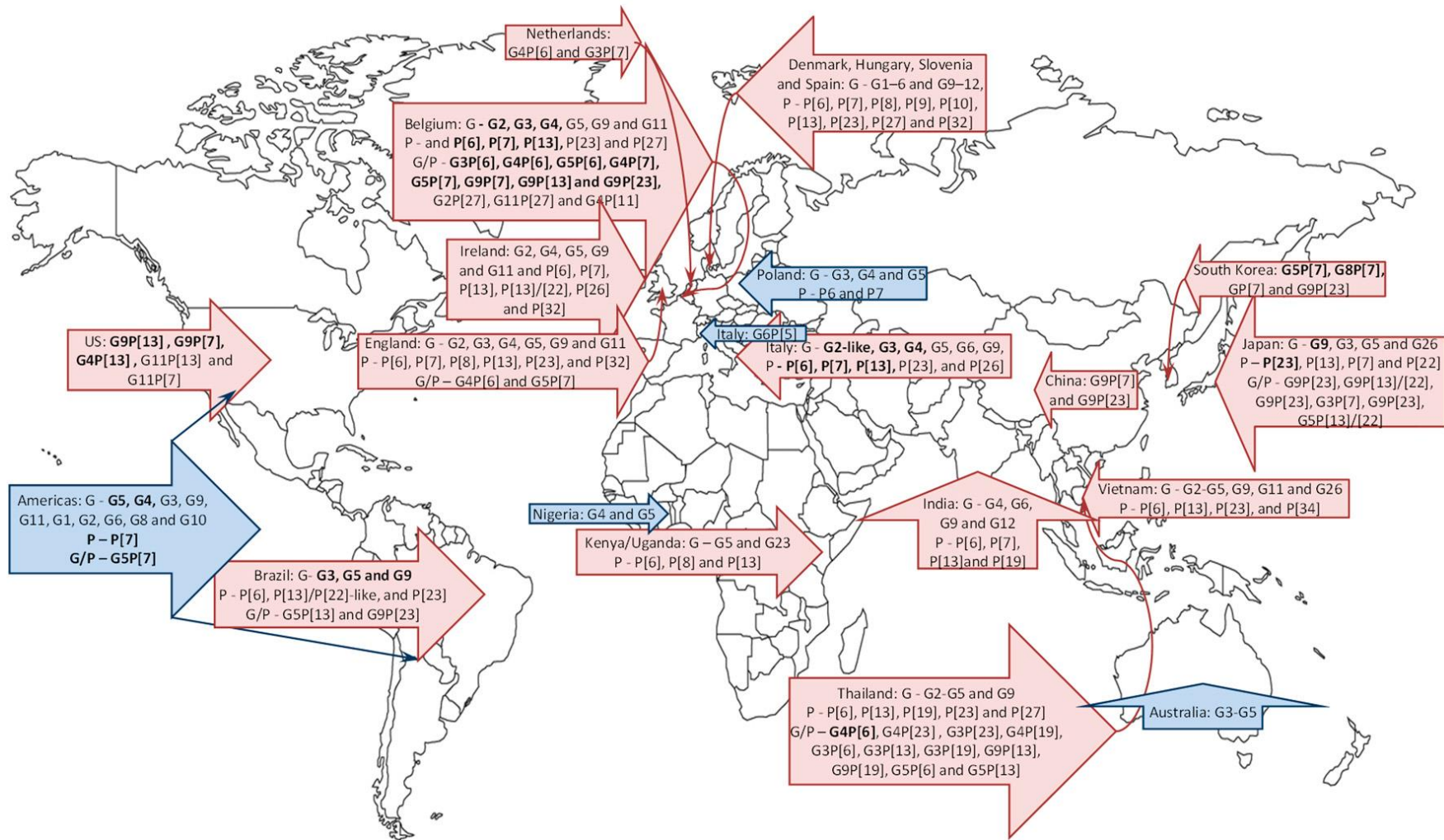


Figura 9: Distribución global de los principales genotipos de RVA identificados en estudios históricos (1976-2000, flechas azules) y actuales (posteriores al año 2000, flechas rosas) (tomada de Vlasova et al., 2017).

En lo que respecta a los RVH se han identificado en cerdos en Japón, Brasil, EE.UU., Sudáfrica y Vietnam (Vlasova *et al.*, 2017).

Las infecciones por RVA, RVB y RVC en los cerdos son causa de cuadros entéricos, de retraso del crecimiento y de pérdidas económicas (Vlasova *et al.*, 2017). Midgley y colaboradores (2012) analizaron un total de 1.101 muestras de heces recogidas en 134 explotaciones porcinas de cuatro países europeos (Dinamarca, Hungría, Eslovenia y España) entre 2003-2007. Los resultados demostraron que la prevalencia de RVA en los cerdos daneses con diarrea era sólo del 10 %, mientras que en Eslovenia y en España fue del 20 y 27 %, respectivamente. Otro estudio más reciente, describió una prevalencia del 51,2 % en cerdos con diarrea en Alemania (Otto *et al.*, 2015). Con respecto a RVC, se han descrito prevalencias del 4,4 % en Irlanda (Collins *et al.*, 2008), 4,6 % en República Checa (Smitalova *et al.*, 2009), 29 % en Bélgica (Theuns *et al.*, 2016) y 31% en Alemania (Otto *et al.*, 2015). Cabe destacar que los dos primeros estudios (Collins *et al.*, 2008; Smitalova *et al.*, 2009) se realizaron en cerdos de 4-5 semanas de vida, hecho que podría explicar las bajas prevalencias puesto que la detección de estos RV es más común en animales neonatos (1-5 días de vida). La información disponible en lo que respecta a la prevalencia y las características genéticas de los RVB porcinos en Europa es muy limitada. Las investigaciones realizadas en Alemania y República Checa detectaron menos del 1 % de muestras positivas a RVB en cerdos de hasta 3 semanas de edad con diarrea (Smitalova *et al.*, 2009; Otto *et al.*, 2015).

En Norteamérica, se ha descrito que la identificación de RV de los grupos A, B y C en muestras de lechones con diarrea es muy frecuente (82,1 %, 79,7 % y 73,3 %, respectivamente en EE.UU., Canadá y México) (Marthaler, Homwong, *et al.*, 2014; Homwong *et al.*, 2016). La prevalencia de RVA (59,5-62,0 %) fue ligeramente superior a la de RVC (51,1-53,0 %) y mayor que la de RVB (31,8-33,0 %). Otro estudio realizado en EE.UU. (Marthaler, Rossow, *et al.*, 2014) demostró una prevalencia de RVH del 15,0 % mientras que las investigaciones de Molinari y colaboradores (2016) identificaron al RVC como el grupo más prevalente en los cerdos (78 %), seguido por el RVA (46 %), el RVB (32 %) y el RVH (18 %) en Brasil.

Existen numerosos estudios de prevalencia de las infecciones por RV porcinos del grupo A en países asiáticos, habiéndose descrito valores entre el 19,8 y el 32,7 % (Vlasova *et al.*, 2017). Sin embargo, se dispone de muy poca información sobre la prevalencia de las infecciones por RVB y RVC porcinos en la mayoría de los países asiáticos. Los

resultados de un estudio realizado en China parecen indicar una circulación de RVC importante, con un 16,7 % de positivos entre los lechones con diarrea (Peng *et al.*, 2013). Un estudio realizado en Japón detectó más del 28 % de positivos a RVB porcino entre los cerdos con diarrea (Kuga *et al.*, 2009). Finalmente, aunque se han descrito casos de infección por RVH en algunos países asiáticos (Wakuda *et al.*, 2011; Suzuki y Inoue, 2018), no existen datos sobre la prevalencia de esta infección en las explotaciones porcinas de la región.

La presencia de RV porcinos de los grupos A, B, C y H también ha sido confirmada en varios países africanos (Vlasova *et al.*, 2017). La prevalencia de RV porcinos en Kenia y Uganda fue del 26,2 % para RVA y del 8,3 % para RVC (Amimo *et al.*, 2015). Existen además algunos datos limitados sobre la prevalencia de RVB en cerdos de África (Geyer *et al.*, 1996), pero, en general, la ausencia de programas de vigilancia y de instalaciones y/o herramientas de diagnóstico adecuadas hace que los datos sobre la prevalencia y la variabilidad genética de los RV en el ganado porcino africano sean limitados.

En Oceanía, aparte de varios informes sobre la circulación de RV de los años 90 (Huang *et al.*, 1993), Roczo y colaboradores (2021) identificaron la presencia de RV en el 57 % de las granjas con brotes de diarrea, con una prevalencia de RVA del 19 % y de RVC del 38 %.

4.7.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

Los RV son ubicuos y la práctica totalidad de los cerdos son infectados por estos virus a lo largo de su vida, muy frecuentemente varias veces (Estes y Kapikian, 2007). Además, se producen infecciones mixtas por diferentes RV, más frecuentemente en los animales adultos (Homwong *et al.*, 2016).

La edad de los animales es uno de los determinantes más relevantes en la prevalencia de la infección y la gravedad de la enfermedad asociada. Los lechones que no han recibido inmunidad pasiva específica de la cerda y los cerdos más jóvenes que han perdido esta inmunidad pasiva pero todavía no han desarrollado su propia respuesta inmunitaria son más receptivos a las infecciones por RV. La elevada receptividad de los neonatos combinada con el hecho de que las cerdas eliminan RV en los días próximos al parto, aumenta el riesgo de infección en los lechones jóvenes (Zimmerman *et al.*, 2019).

Los RV se eliminan en las heces de los animales infectados en elevadas concentraciones, habiéndose estimado que cada gramo de materia fecal contiene 1×10^{10} partículas infecciosas de RV. Además, los RV son altamente infecciosos y se ha demostrado la dosis infectante es baja, próxima a 10^2 viriones (Zimmerman *et al.*, 2019). La transmisión se produce por la ruta fecal-oral, bien directa o a través de todo tipo de material contaminado con RV, dando lugar a una rápida propagación dentro de las explotaciones porcinas. Los cerdos infectados excretan RV por las heces durante un periodo que oscila entre unos pocos días y dos semanas, contaminando el ambiente. La elevada supervivencia de los rotavirus en el medio externo unida a la baja dosis infectante favorece la transmisión en las explotaciones porcinas (Prieto Suárez *et al.*, 2017). Además, como hemos indicado, las propias reproductoras son una importante fuente de infección, habiéndose demostrado que una proporción considerable de estos animales excreta RV en los días inmediatamente anteriores y posteriores al parto y en ausencia de signos clínicos de diarrea.

En el caso de RVA, la infección se detecta con más frecuencia en cerdos jóvenes, con edades comprendidas entre los 7 y los 60 días, y particularmente entre las semanas de vida 3 y 5. En este sentido, un trabajo reciente en EE.UU. demostró que la detección de RVA es más común en cerdos entre los 21 y 55 días de edad, siendo menos frecuente la infección neonatal (Homwong *et al.*, 2016). Por su parte, los estudios más recientes señalan que los RVC son particularmente prevalentes en lechones durante la primera semana de vida.

En lo que respecta al rango de hospedadores, como hemos indicado, los RVA infectan a un amplio rango de hospedadores, incluyendo el hombre, mamíferos domésticos, mamíferos salvajes y multitud de aves (Zimmerman *et al.*, 2019). Además de en la especie porcina, los RVB se han detectado en el hombre, rumiantes y ratas (Zimmerman *et al.*, 2019) y los RVC en el hombre, en vacas (Soma *et al.* 2013) y en carnívoros domésticos (Zimmerman *et al.*, 2019). Por su parte, las infecciones por RVH han sido descritas en el hombre, en murciélagos y en cerdos (Suzuki y Inoue, 2018).

Se han descrito diferentes factores de riesgo para la infección por RV en las granjas porcinas, incluyendo la elevada densidad de animales, el destete precoz o los sistemas de producción "todo dentro/todo fuera" (Estes y Kapikian, 2007). En este sentido, se ha propuesto que las explotaciones de flujo continuo tienen una menor

incidencia de la infección por RVA debido a que las cerdas están más expuestas y, por tanto, transfieren mayores niveles de inmunidad pasiva a sus lechones.

4.7.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

La escisión de la proteína de la cápside externa VP4 en las subunidades VP5 y VP8 permite la entrada del virus en el citoplasma de las células mediante la interacción con el ácido siálico o ácido N-acetil-neuramínico (Zimmerman *et al.*, 2019). Los RV replican, principalmente, en los enterocitos del yeyuno e íleon y más concretamente en la mitad superior o zona apical de las vellosidades intestinales, dando lugar a un acortamiento y atrofia de las mismas. Adicionalmente, se detectan antígenos de RV transitoriamente en otros tejidos como el pulmón, el hígado, el bazo o el plexo coroideo (Zimmerman *et al.*, 2019), pero no hay evidencia de replicación extraintestinal.

El mecanismo ampliamente aceptado de la diarrea inducida por los RV es el acortamiento de las vellosidades, que conduce a una deficiencia en la absorción de líquidos y la subsiguiente diarrea por malabsorción (Prieto Suárez *et al.*, 2017). Adicionalmente, en la replicación de los rotavirus se produce una glucoproteína no estructural, la proteína NSP4. Se trata de una enterotoxina que experimentalmente induce un cuadro clínico de diarrea, alterando la permeabilidad de la membrana plasmática del enterocito. También se ha propuesto que la activación del sistema nervioso entérico o la isquemia en las vellosidades intestinales asociada a la destrucción celular pueden tener un cierto papel en la patogenia de estas infecciones.

Desde el punto de vista clínico, la infección por RV se caracteriza por una enfermedad entre subclínica y clínica, en función de la cepa de RV, de la edad del cerdo, del estado inmunitario, de la salud general y/o estatus sanitario de la granja y de la presencia de infecciones bacterianas o virales concomitantes o secundarias (Estes y Kapikian, 2007). El periodo de incubación es de 18-36 horas en lechones gnotobióticos y de 1-3 días en lechones convencionales. Los signos clínicos incluyen diarrea acuosa profusa, letargia, vómitos y anorexia, acompañados de una rápida pérdida de peso. Las heces adquieren un color más claro o amarillo y en la necropsia puede verse leche sin digerir en el estómago (Prieto Suárez *et al.*, 2017). Los estudios realizados con lechones de explotaciones convencionales describen morbilidades inferiores al 20 % y letalidades inferiores al 15 %, siendo capaces la mayoría de los animales de superar el proceso. La diarrea en los cerdos de menos de 5 días de edad dura entre 1 y 10 días y los cerdos que

se recuperan suelen volver rápidamente a su peso corporal normal. En los lechones de más de 5 días de edad se observan generalmente signos clínicos menos graves y una duración más corta de la enfermedad. La muerte también es mucho menos frecuente en estos lechones de más edad (Zimmerman *et al.*, 2019). También existen infecciones subclínicas por RV, especialmente en cerdos de más de 55 días (Amimo *et al.*, 2015).

La gravedad de los signos clínicos puede verse exacerbada por varios factores, como la dieta y la co-infección con otros patógenos entéricos. La desnutrición se correlaciona con periodos más largos de diarrea y con una restauración más lenta del epitelio intestinal (Zimmerman *et al.*, 2019). Además, la vitamina A se considera un determinante importante en la recuperación de la infección por RV; los cerdos con deficiencia de vitamina A experimentan episodios de diarrea más largos y más graves, con títulos virales más elevados en las heces y mayor daño intestinal en comparación con los cerdos con niveles adecuados de esta vitamina (Vlasova *et al.*, 2017). Por último, las co-infecciones con otros patógenos entéricos como ETEC o *C. perfringens* tipo A pueden agravar el cuadro clínico de diarrea en los lechones (Prieto Suárez *et al.*, 2017).

Las lesiones asociadas a las infecciones por RVA, RVB y RVC son similares. El intestino delgado y grueso de los cerdos afectados suele estar dilatado, con un contenido excesivo, acuoso y de coloración amarilla o gris. Las paredes del intestino delgado están adelgazadas en comparación con las de los individuos no afectados y el estómago puede contener leche no digerida (Carvajal *et al.*, 2018). El examen histológico muestra tumefacción de las células del epitelio del yeyuno e íleon al inicio del curso clínico que se hace más pronunciada a medida que progresa la infección. A partir de aproximadamente 24 horas tras la infección, estas células epiteliales se desprenden hacia la luz intestinal, lo que da lugar a vellosidades más finas y cortas. El acortamiento de las vellosidades va acompañado de criptas intestinales alargadas y con hiperplasia celular. A los 2-5 días de la infección, la morfología intestinal empieza a recuperarse y las vellosidades recuperan su longitud normal (Zimmerman *et al.*, 2019).

4.8 Astrovirus

Los astrovirus (AstV) están incluidos en el orden *Stellavirales* y familia *Astroviridae* y son virus de ARN monocatenario de sentido positivo, sin envoltura, con un diámetro próximo a los 30 nm y un genoma que varía entre 6,4 y 7,9 kb con tres marcos de lectura abiertos, ORF1a, ORF1b y ORF2 (Zimmerman *et al.*, 2019). Las regiones ORF1a y ORF1b codifican proteínas no estructurales, una proteasa de serina y una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), mientras que el ORF2 codifica la proteína de la cápside viral que finalmente se escinde en las proteínas estructurales VP34, VP27 y VP25 (Figura 10). La relación de especies animales receptoras a la infección por AstV se ha ampliado en la última década, detectándose en una gran variedad de mamíferos y de aves, relacionándose con enfermedades hepáticas, renales, gastroentéricas y/o neurológicas (De Benedictis *et al.*, 2011). Los estudios genómicos, basados principalmente en el ORF2 (proteína de la cápside), han demostrado que los AstV de diferentes especies animales se clasifican en diferentes grupos (Zimmerman *et al.*, 2019), aunque también han permitido identificar múltiples linajes de AstV dentro de una misma especie hospedadora. Hasta el momento, el ICTV ha reconocido en esta familia de virus dos géneros, *Avastrovirus* y *Mamastrovirus*, que incluyen, respectivamente, 3 especies de AstV de aves y 19 especies de AstV de mamíferos (*Mamastrovirus 1 a 19*). Algunos AstV aún no han sido reconocidos en esta clasificación.

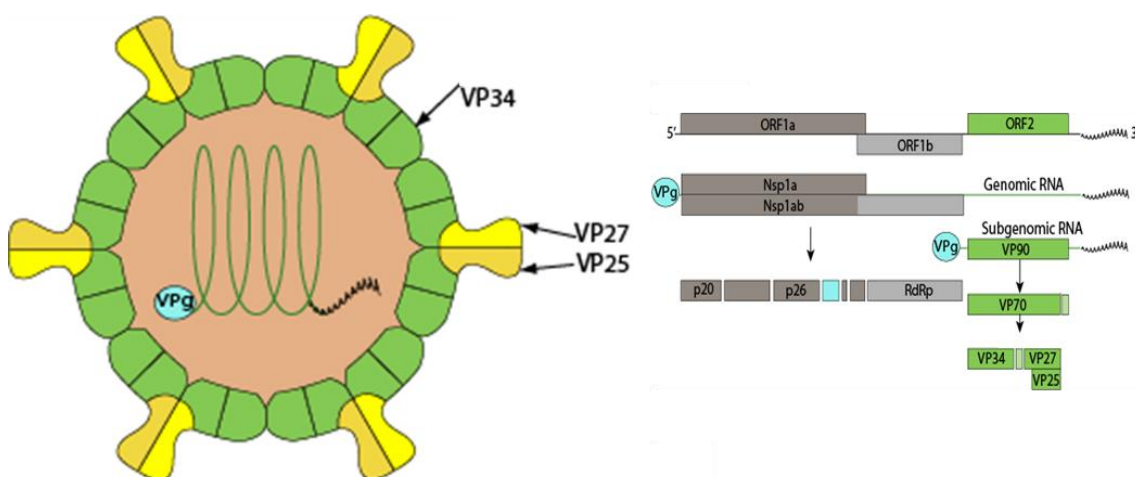


Figura 10: Estructura básica del virión y el genoma de un astrovirus (adaptada de Hulo *et al.*, 2011)

Las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los AstV no han sido completamente caracterizadas. El PAstV1 es un virus citopático que se aisló a partir de

muestras de heces de cerdos con diarrea en líneas celulares de riñón porcino incorporando tripsina al medio (Indik *et al.*, 2006). Es estable al tratamiento con disolventes lipídicos y resiste el calentamiento a 56 °C durante 30 minutos, pero es sensible al tratamiento con ácidos a pH 3,0 durante 3 horas.

4.8.1 Origen y distribución mundial

Los PAsV fueron identificados por primera vez hace 40 años en cerdos con diarrea (Bridger, 1980), caracterizándose a nivel molecular en 2001 (Jonassen *et al.*, 2001). Hasta el momento se han identificado cinco linajes distintos de PAsV, PAsV1 a PAsV5 (Luo *et al.*, 2011), aunque de todos ellos, tan solo el PAsV1 se ha clasificado dentro de la especie *Mamastrovirus 3*. No han sido clasificados oficialmente los PAsV2 a PAsV5.

Los PAsV han sido identificados en las heces de cerdos en diferentes países y regiones del mundo, en Reino Unido, Japón, Sudáfrica, República Checa y, recientemente, en 12 países más, indicando una distribución mundial (De Benedictis *et al.*, 2011; Zimmerman *et al.*, 2019). La prevalencia de la infección por PAsV es muy variable con valores que van desde el 95,4 % de cerdos infectados en Grecia (Stamelou *et al.*, 2022), el 93,2 % en Eslovaquia (Salamunova *et al.*, 2018), el 77 % en Canadá (Nantel-Fortier *et al.*, 2022), el 75 % en Dinamarca (Goecke *et al.*, 2017) o el 64 % en EE.UU. (Xiao *et al.*, 2013) hasta el 8,6 % en Francia (Capai *et al.*, 2022), el 8,4 % en Tailandia (Kumthip *et al.*, 2018) o el 7,5 % en Hungría (Valkó, Marosi, *et al.*, 2019). Se han descrito co-infecciones en un mismo animal con dos o más PAsV, más frecuentes en las fases de transición y engorde (Xiao *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016; Salamunova *et al.*, 2018; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019). Diferentes estudios han demostrado que los linajes PAsV4 y PAsV2 son los más prevalentes en el ganado porcino de Europa (Dufkova *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016; Salamunova *et al.*, 2018), América del Norte (Mor *et al.*, 2012) y Asia (Lee *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2016; Kumthip *et al.*, 2018).

En lo que respecta al origen de estos virus, los estudios genéticos y evolutivos apoyan la hipótesis de que la transmisión entre especies y la recombinación natural entre AstV de diferentes hospedadores, incluidos el hombre y los cerdos, así como el paso a través de hospedadores intermedios desconocidos, puede haber ocurrido en el pasado y ser el origen de la variabilidad mostrada por estos virus (Zimmerman *et al.*, 2019).

4.8.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

Aunque se presupone que la transmisión es principalmente fecal-oral, es importante mencionar que los PAsV también se detectan en hisopos nasales (Padmanabhan y Hause, 2016) y en muestras de sangre (Brnić *et al.*, 2013), sin que por el momento se conozca la relevancia de estas detecciones en su transmisión.

La elevada resistencia ambiental y su importante prevalencia en numerosas especies animales favorecen la propagación de los AstV. Se ha propuesto que, a diferencia de otros virus que también infectan a diversos hospedadores, los AstV no parecen tener un reservorio común (Wohlgemuth *et al.*, 2019).

4.8.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

En la mayoría de las especies de mamíferos, las infecciones por AstV están asociadas a gastroenteritis. En el hombre, los AstV son la tercera o cuarta causa más común de diarrea viral en niños pequeños en todo el mundo. En los cerdos, los AstV se han asociado a diarreas graves en infecciones naturales, pero siempre en presencia de otros patógenos entéricos conocidos (Zhou *et al.*, 2013; Kumthip *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2020; Nantel-Fortier *et al.*, 2022).

Experimentalmente se ha demostrado que la inoculación oral con un aislado adaptado a cultivo celular de PAsV1 causa diarrea leve en cerdos de 4 días de edad (Shimizu *et al.*, 1990). El cuadro clínico de diarrea comenzó al día siguiente de la inoculación y continuó durante 5-6 días. De forma similar, se observó una diarrea leve inducida por PAsV en lechones gnotobióticos de 7 días de edad en un estudio de inoculación experimental por vía oral (Indik *et al.*, 2006). Finalmente, un estudio experimental realizado por Ulloa y colaboradores (2019) sobre lechones convencionales de 28 días recién destetados y desafiados por vía oral con una cepa de PAsV1 demostró el desarrollo de diarrea leve en el tercer día postinoculación así como la eliminación de PAsV en las heces, sin que se observara pérdida de peso ni otros signos clínicos como letargia, depresión, fiebre o vómitos.

Este último estudio caracterizó las lesiones asociadas a la infección (Ulloa *et al.*, 2019). La inmunohistoquímica demostró la replicación viral en el citoplasma de los enterocitos del yeyuno, el íleon y el colon asociada a una yeyunitis necrotizante con desprendimiento de enterocitos. Otros hallazgos microscópicos en el intestino delgado de

los animales infectados por PAsV incluyeron lesiones moderadas de atrofia y fusión de las vellosidades, hiperplasia epitelial, hiperemia y edema intersticial grave. Además, se observaron lesiones en el intestino grueso, con una colitis de moderada a necrotizante con predominio linfoplasmocítico.

Algunas investigaciones recientes han propuesto otros signos clínicos potencialmente asociados a replications extraintestinales de algunos PAsV. Como hemos señalado anteriormente, se ha detectado ARN viral en sangre (Brnić *et al.*, 2013) así como en hisopos nasales recogidos de cerdos jóvenes con una enfermedad respiratoria aguda de etiología desconocida (Padmanabhan y Hause, 2016) y también en tejidos cerebrales de lechones con temblor congénito (Blomström *et al.*, 2014). Más recientemente, se ha notificado una enfermedad neurológica asociada a PAsV3 en granjas porcinas de Hungría y EE.UU., caracterizada por meningoencefalomielitis, debilidad y parálisis (Arruda *et al.*, 2017; Boros *et al.*, 2017). Todos estos hallazgos sugieren que los PAsV podrían tener una patogenicidad más compleja y que podrían implicarse en enfermedades graves afectando a diversos sistemas (Reuter *et al.*, 2018).

4.9 Kobuvirus

El género *Kobuvirus* (KoV), orden *Picornavirales*, familia *Picornaviridae* y subfamilia *Kodimesavirinae*, incluye virus pequeños, sin envoltura y con un ARN de sentido positivo y de cadena simple (Reuter *et al.*, 2009). El genoma de 8,2 kb de los KoV codifica una única poliproteína que consta de una proteína líder, tres proteínas estructurales de la cápside (VP0, VP3 y VP1) y siete proteínas no estructurales (2A a 2C y 3A a 3D) (Figura 11) (Reuter *et al.*, 2009). Este género de virus se divide en seis especies oficialmente reconocidas: *Aichivirus A* (antes *Aichivirus*), *Aichivirus B* (antes *Kobuvirus bovino*), *Aichivirus C* (*Kobuvirus porcino*), *Aichivirus D* (*Kagovirus 1*), *Aichivirus E* (*Picornavirus del conejo*) y *Aichivirus F* (*Kobuvirus del murciélago*) (Lu *et al.*, 2018). El *Aichivirus C* es la única especie de KoV que se ha descrito en cerdos, reconociéndose también como *Kobuvirus porcino* o PKoV (Khamrin *et al.*, 2014).

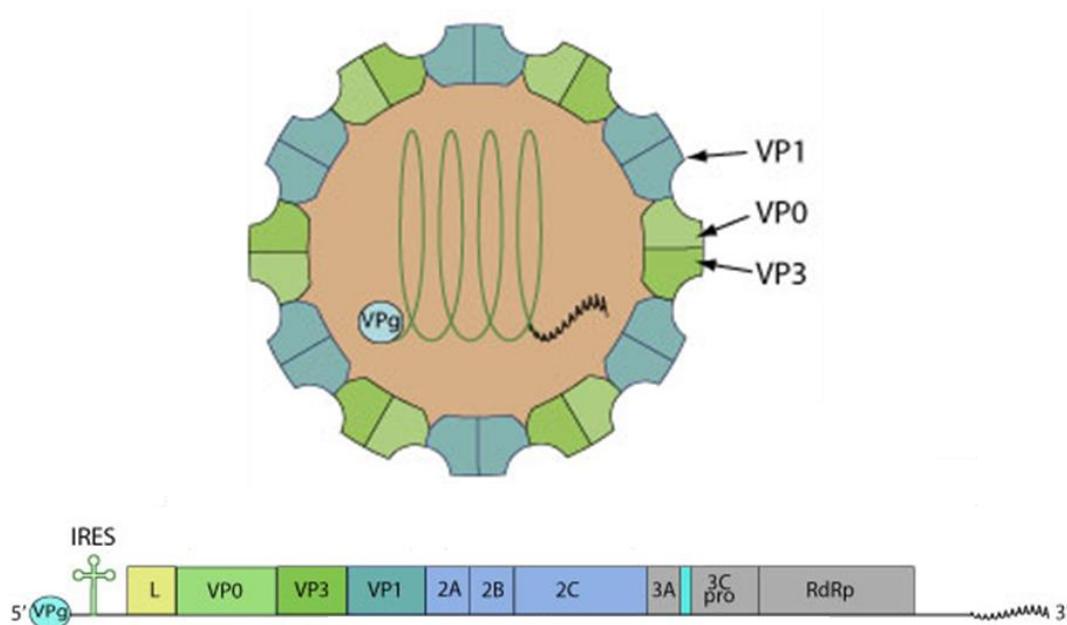


Figura 11: Estructura básica del virión y el genoma de un kobuvirus (adaptada de Hulo *et al.*, 2011).

Según el informe del ICTV, los miembros de cada especie del género *Aichivirus* deben compartir más del 70 % de identidad de aminoácidos en la poliproteína, 70 % en las proteínas estructurales de la cápside (VP0, VP3 y VP1) y 80 % en las regiones 2C, 3C y 3D que codifican proteínas no estructurales (Adams *et al.*, 2016). La cepa prototipo de *Aichivirus A* (A846/88) es citopática en líneas celulares epiteliales de riñón de mono verde africano, como BS-C-1 y Vero. Sin embargo, *Aichivirus B* y PKoV no han podido ser propagados en cultivos celulares.

4.9.1 Origen y distribución mundial

Los PKoV se identificaron por primera vez en 2008, en Hungría, a partir de muestras recogidas en una explotación porcina (Reuter *et al.*, 2009) y, desde entonces, se ha demostrado que están ampliamente distribuidos en todo el mundo, incluyendo países de Asia, Europa, África y América (Khamrin *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2013; Amimo *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016; Akagami *et al.*, 2017; Jackova *et al.*, 2017; Nantel-Fortier *et al.*, 2019; García-Hernández *et al.*, 2021). La frecuencia de detección de PKoV varía mucho en diferentes estudios, desde un 13,1 % de muestras positivas descrito en Kenia (Amimo *et al.*, 2014) hasta un 99 % en Tailandia (Khamrin *et al.*, 2009). Los pocos estudios que han incluido cerdos de diferentes edades describen que la prevalencia de esta infección disminuye con la edad (Zhou *et al.*, 2016; Jackova *et al.*, 2017; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019; Nantel-Fortier *et al.*, 2022; Werid *et al.*, 2022).

4.9.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

Se considera que la ruta fecal-oral, ya sea directamente a través del contacto con heces o indirectamente a través de los alimentos, agua o fómites contaminados, es el principal mecanismo implicado en la transmisión de estos virus, de forma similar a lo que ocurre con otros picornavirus y otros virus entéricos (Reuter *et al.*, 2011). Se ha comprobado que el PKoV se elimina, habitualmente, en las heces, pero recientemente se ha detectado material genómico de este virus en la sangre de los cerdos infectados. Se ha sugerido que este hallazgo podría indicar la capacidad del PKoV y, posiblemente, de los KoV en general para escapar del TGI hacia el sistema circulatorio en animales inmunocompetentes. Sin embargo, se desconoce si esta detección en sangre tiene alguna relevancia desde el punto de vista de la transmisión (Reuter *et al.*, 2010).

En lo que respecta al rango de hospedadores cabe destacar que se ha descrito una elevada prevalencia de la infección por PKoV en jabalíes en Hungría (Reuter *et al.*, 2013), habiéndose propuesto que estos suidos silvestres podrían ser un reservorio para estos virus.

Recientemente se han descrito evidencias que sugieren una transmisión interespecífica de KoV (Khamrin *et al.*, 2014); un estudio realizado en Japón demostró que un cerdo de 6 meses de edad y positivo a KoV por RT-PCR estaba infectado con una cepa del virus estrechamente relacionada con el *Kobuvirus bovino*, indicando que esta transmisión interespecífica de bovinos a cerdos o viceversa podría darse en la naturaleza (Khamrin *et al.*, 2009). Aunque no se conocen los factores que promueven esta transmisión interespecífica, es probable que un contacto estrecho entre estas especies animales aumente las posibilidades de que se produzca el salto de especie. Son necesarios más estudios para investigar estas transmisiones interespecíficas y el potencial zoonótico de estos virus.

4.9.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

La relevancia clínica de los KoV es desconocida. En cerdos, se detectan tanto en animales con diarrea como en sanos (Khamrin *et al.*, 2009; Akagami *et al.*, 2017; Jackova *et al.*, 2017; Nantel-Fortier *et al.*, 2019; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019). No obstante, existen estudios en los que el PKoV ha sido el único patógeno entérico detectado en algunos brotes de diarrea (Park *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2018), lo que subraya la necesidad de seguir investigando para poder dilucidar este aspecto.

La eliminación fecal implica que estos virus replican en el intestino, aunque no se conocen las células diana ni los receptores específicos. Sasaki y colaboradores (2003) demostraron que una estructura de bucle en el extremo 5' del genoma y la proteína líder desempeñan un papel esencial en la replicación y en la formación de nuevos viriones. Además, se ha descrito que la interacción de las regiones que codifican para las proteínas no estructurales 3A, 3B y 3C con la región terminal 5' del genoma está implicada en la síntesis del ARN genómico (Nagashima *et al.*, 2008).

No existen en la bibliografía ensayos experimentales en cerdos gnotobióticos ni en cerdos convencionales que describan el cuadro clínico o las lesiones macroscópicas y microscópicas asociadas a la infección por PKoV.

4.10 Torovirus

Los virus del género *Torovirus* (ToV), familia *Tobaniviridae* y orden *Nidovirales*, causan infecciones entéricas y cuadros clínicos de gastroenteritis en distintos animales y en el hombre (Zimmerman *et al.*, 2019). En la actualidad, hay tres especies reconocidas en el subgénero *Renitovirus*, *Torovirus porcino* (PToV), *Torovirus bovino* (BToV) y *Torovirus equino* (EToV) (Hu *et al.*, 2019).

Son virus con envoltura y su genoma consiste en ARN monocatenario y de sentido positivo, poliadenilado, con tamaño de 25-30 kb y una organización similar a la de los CoV (Zimmerman *et al.*, 2019). Este genoma contiene dos grandes ORFs superpuestos, identificados como ORF1a y ORF1b, conectados por un desplazamiento del marco de lectura, y que codifican dos poliproteínas replicasas. A continuación, hay cuatro ORFs más pequeños que codifican las proteínas estructurales S, M, HE y N (Figura 12). Los viriones tienen una morfología alargada en muestras frescas, con una longitud de unos 120 nm y una anchura de 55 nm, pero tras la congelación y descongelación repetidas, toman múltiples formas, incluyendo partículas redondas, en forma de riñón y de toro (Kroneman *et al.*, 1998). La nucleocápside está formada por la proteína N y el ARN viral y se rodea por la envoltura que contiene la proteína de membrana (M). En la superficie de las partículas se han identificado dos tipos de proyecciones: unas protuberancias más largas, de unos 19 nm, con forma de baqueta o pétalo, constituidas por la proteína S, y otras más cortas, con una longitud aproximada de 6 nm, constituidas por la hemaglutinina-esterasa (HE) (Hu *et al.*, 2019).

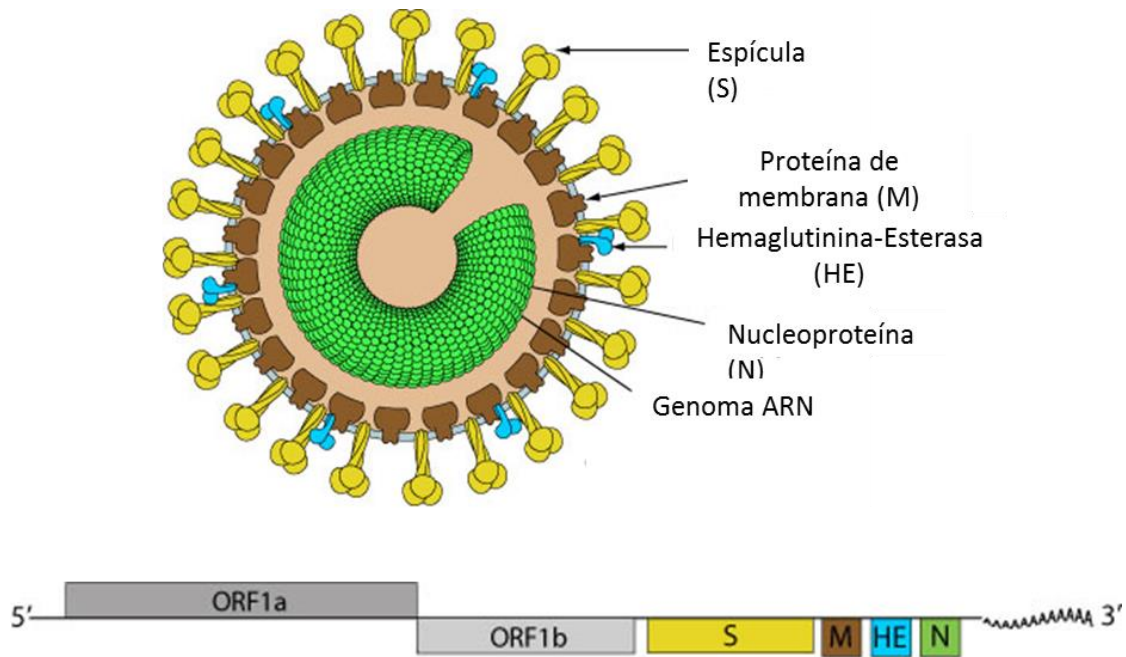


Figura 12: Estructura básica del virión y el genoma de un torovirus (adaptada de Hulo *et al.*, 2011).

El EToV, también llamado virus de Berna, fue el primer ToV descubierto y es la especie prototipo del género. Se aisló por primera vez en 1972 (aunque no se notificó hasta 1983) en Berna, Suiza, a partir de un hisopo rectal tomado de un caballo con enteritis pseudomembranosa y granulomas miliares y necrosis en el hígado (Weiss *et al.*, 1983). El BToV, también denominado virus de Breda, fue descubierto en 1982 en terneros con diarrea en Breda, Iowa, comprobándose que este aislado era capaz de infectar a terneros gnotobióticos y convencionales cuando se inoculaba por vía oral (Woode *et al.*, 1982). Finalmente, en 1998 se detectó y caracterizó por primera vez el PToV en muestras de heces de lechones en los Países Bajos (Kroneman *et al.*, 1998). La primera secuencia genómica del PToV corresponde con un aislado recuperado de cerdos en Shanghai, China (cepa SH1; número de acceso al GenBank JQ860350) y tenía una longitud de 28.301 pb y una identidad de secuencia del 79 % con BToV (Sun *et al.*, 2014).

4.10.1 Origen y distribución mundial

Se ha demostrado la distribución mundial del PToV y una elevada prevalencia de esta infección en los cerdos. Sin embargo, debido a las limitaciones de las técnicas de diagnóstico y a la existencia de infecciones asintomáticas (Matiz *et al.*, 2002), existe muy poca información sobre la distribución de estos virus. En 1998, Kroneman y colaboradores realizaron un ensayo de neutralización y demostraron que el 81,4 % de los cerdos presentaban anticuerpos neutralizantes del virus equino (EToV) en las granjas de

los Países Bajos. Empleando una técnica de detección molecular se comprobó que el 39,6 % de los lechones de una granja del noreste de España eliminaban PToV en las heces (Pignatelli *et al.*, 2009). También en España, un estudio longitudinal que detectaba anticuerpos específicos en suero mediante un ELISA basado en la proteína N y excreción fecal mediante RT-qPCR basada en el gen N determinó una seroprevalencia de la infección en lechones de 1, 3, 7, 11 y 15 semanas de edad del 92, 58, 91, 100 y 100 %, respectivamente. Todas las reproductoras presentaron anticuerpos específicos y se demostró que el 92 % de los lechones eliminaban PToV en algún momento del seguimiento longitudinal (Pignatelli *et al.*, 2010). Estos resultados fueron confirmados por un nuevo estudio epidemiológico en 100 granjas españolas que mostró una seroprevalencia global del 95,7 %, variando entre el 59,4 y el 99,6 % en función de la edad. La menor prevalencia de anticuerpos específicos se detectó en los lechones de 3 semanas de edad (Alonso *et al.*, 2014).

Existen, además, estudios de prevalencia de esta infección en animales con diarrea que muestran proporciones variables de cerdos positivos, entre el 6,4 y el 36 % en Corea (Hosmillo *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010) o 38 %-45 % en China (Zhou *et al.*, 2013, 2014). En muchos de estos casos, se describen infecciones mixtas con otros virus porcinos, incluyendo VDEP, PKoV, RVA, VGET, PAstV o MRV (Zhou *et al.*, 2013, 2014). Los lechones de 1 a 3 semanas de edad presentaron la frecuencia más alta de detección directa de PToV (Zhou *et al.*, 2014).

4.10.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

Como ocurre con otros virus entéricos, la infección por PToV se propaga, probablemente, a través del contacto fecal-oral directo e indirecto. Aunque no existen estudios específicos en cerdos, los estudios realizados en terneros desafiados experimentalmente con BToV demuestran títulos de hasta 10^6 dosis infectantes cultivo celular 50 % o DICC₅₀/mL en heces que permiten una rápida propagación de la infección en presencia de hospedadores receptivos (Koopmans y Horzinek, 1994). Además, no se puede ignorar la posibilidad de infecciones por la vía aerógena, habiéndose aislado BToV de tejidos del tracto respiratorio (Koopmans y Horzinek, 1994).

Aunque *a priori* los virus con envoltura son relativamente inestables en el medio, se ha descrito que los ToV son estables en un amplio rango de pH (2,5 a 10) y que resisten

la acción de la fosfolipasa C o del desoxicolato, mostrando una adaptación clara al tránsito por el TGI (Koopmans y Horzinek, 1994).

4.10.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

El potencial patógeno de los PToV como agentes etiológicos de diarrea en los cerdos no está claramente establecido, como tampoco lo está su potencial zoonótico. La falta de un sistema para el cultivo *in vitro* del PToV dificulta en gran medida los estudios experimentales que permitan investigar su biología y patogenicidad en el hospedador porcino.

4.11 Orthoreovirus

El género *Orthoreovirus* está incluido en el Orden *Reovirales*, familia *Spinareoviridae*. Se trata de virus sin envoltura, icosaédricos, con una cápside de aproximadamente 75 nm de diámetro, compuesta por una doble capa de proteínas, y con un genoma constituido por diez segmentos de ARN de doble cadena. Estos segmentos de ARN viral incluyen, según su movilidad electroforética, tres segmentos grandes (L1, L2 y L3), tres medianos (M1, M2 y M3) y cuatro pequeños (S1, S2, S3 y S4), que codifican ocho proteínas estructurales (λ_1 , λ_2 , λ_3 , μ_1 , μ_2 , σ_1 , σ_2 , σ_3) y cuatro proteínas no estructurales (μNS , μNSC , σNS , $\sigma_1\text{s}$) (Schiff *et al.*, 2007) (Figura 13). La cápside interna del virión está formada por las proteínas λ_1 y σ_2 , mientras que la cápside externa está compuesta por las proteínas λ_2 , μ_1 , σ_3 y σ_1 . La proteína σ_1 de la cápside externa del virión está codificada en el segmento génico S1 y facilita la hemaglutinación, la adhesión del virus a los receptores celulares del hospedador y la neutralización específica del serotipo (Singh *et al.*, 2022). Como ya indicamos en el caso de los RV, el genoma segmentado permite fenómenos de reordenación y favorece la variabilidad de este género de virus (Lelli *et al.*, 2015).

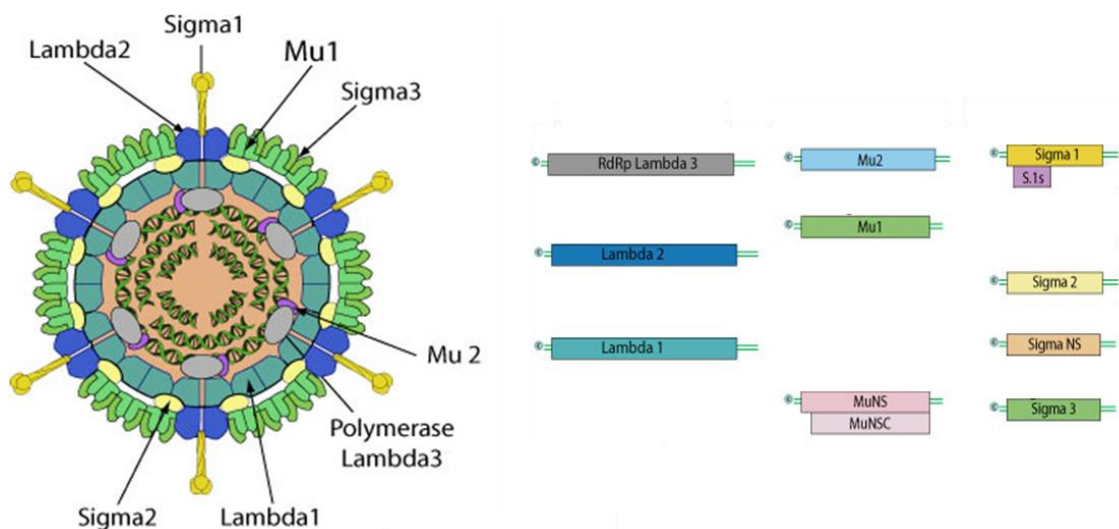


Figura 13: Estructura básica del virión y el genoma de un orthoreovirus (adaptada de Hulo et al., 2011).

En la actualidad se reconocen diez especies diferentes dentro del género *Orthoreovirus*, siendo el *Orthoreovirus de los mamíferos* (MRV) la especie que infecta a múltiples mamíferos, incluyendo cerdos, perros, vacas, ovejas, caballos, gatos, ratones, humanos y primates no humanos (Zimmerman *et al.*, 2019). Además, se conocen cuatro serotipos del MRV en función de su secuencia y de la antigenicidad de la proteína σ -1. Estos serotipos incluyen la cepa prototipo tipo 1 (Lang, T1L), el tipo 2 (Jones, T2J), el tipo 3 (Dearing, T3D) y el tipo 4 (Ndelle, T4N) (Day, 2009). Basándose en la filogenia del segmento S1, las cepas MRV tipo 3 pueden clasificarse en cuatro linajes.

Son virus estables en condiciones ácidas (pH 3,0) y resistentes a desinfectantes como el éter o el cloro, así como a la tripsina. Por el contrario, se inactivan con temperaturas de 50 °C durante 1 hora y por la exposición al desoxicolato de sodio al 0,1 %. También son resistentes a condiciones ambientales extremas, sobreviviendo en aguas residuales durante largos periodos de tiempo, aunque son inactivados por la exposición prolongada a luz ultravioleta (Zimmerman *et al.*, 2019).

4.11.1 Origen y distribución mundial

Se han aislado MRV de una amplia gama de especies de mamíferos, incluyendo murciélagos, vacas, visones, cerdos, perros y el hombre (Zimmerman *et al.*, 2019), existiendo controversia en lo que respecta a su potencial zoonótico (Steyer *et al.*, 2013).

En los cerdos, estos virus comenzaron a despertar atención tras identificarse en 2007 como causa de diarreas en lechones neonatos en China (Zhang *et al.*, 2011). Actualmente, estos virus se han identificado en cerdos de Asia (China y Corea del sur),

del continente americano (EE.UU.) o de Europa (Italia) y un estudio realizado en el año 2012 en Corea detectó un 19 % de eliminadores fecales de MRV en 78 granjas de cerdos (Kwon *et al.*, 2012). Además, en los cerdos se han detectado MRV de los serotipos 1, 2 y 3. Recientemente se han descrito aislados de MRV2 originados, probablemente, por el reordenamiento entre cepas de MRV de murciélagos, de cerdos y/o de humanos, que se han asociado con diarrea, gastroenteritis aguda y encefalopatía necrotizante en cerdos (Wang, Fu, *et al.*, 2015). Este hallazgo sugiere que la transmisión interespecífica de MRV puede ocurrir, al menos entre murciélagos y cerdos (Yang *et al.*, 2015).

4.11.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

La transmisión de los MRV en circunstancias naturales implica aerosoles y secreciones respiratorias que se unen a la transmisión fecal-oral. En ratones se ha demostrado una excelente correlación entre la capacidad de los MRV para replicarse en el intestino, la cantidad de virus que se elimina en las heces y la eficacia con la que un animal infectado transmite la enfermedad a sus compañeros no infectados. El segmento L2 que codifica la proteína λ -2 es el principal determinante de la eficiencia de la transmisión viral tras la inoculación por vía oral. Tanto este segmento L2 (λ -2) como el segmento S1 que codifica la proteína σ -1 influyen en la replicación y la supervivencia viral en el tejido intestinal (Clarke y Tyler, 2008).

La transmisión también se ve influida por la capacidad del virus para sobrevivir en el medio externo. La mayoría de los MRV son estables a temperaturas bajas, existiendo diferencias entre las cepas en cuanto a su termoestabilidad a temperaturas más altas. Por ejemplo, el MRV1 tiene una vida media de 19 horas a 37°C, en comparación con las 2,6 horas del MRV3. Los MRV también son estables en los aerosoles, especialmente en presencia de una elevada humedad relativa. Las proteínas de la cápside externa del virus parecen ser los principales determinantes de la estabilidad del virión (Clarke y Tyler, 2008).

4.11.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

Los MRV replican en los sistemas respiratorio e intestinal, aunque se desconocen muchos detalles sobre la patogenia de estas infecciones. En un principio, la adhesión y la entrada en las células del epitelio respiratorio se atribuían, únicamente, a la glicoproteína σ -1. Sin embargo, un estudio reciente ha sugerido que σ -1 puede no ser necesaria para esta entrada, desempeñando, en cambio, un papel relevante en la diseminación sistémica

del virus y la viremia. Una vez que el cerdo se infecta a través de la vía respiratoria, el virus puede alcanzar células de la serie blanca, el TGI o el sistema nervioso central (Boehme *et al.*, 2013). La eliminación viral en secreciones nasales y heces comienza a partir de las 24 horas de la inoculación y puede mantenerse durante 6 a 14 días mientras que los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación pueden detectarse a los 7 días de la inoculación y alcanzan su máximo a los 11-21 días (Zimmerman *et al.*, 2019).

Aunque estos virus se asociaban clásicamente a infecciones respiratorias y entéricas leves o asintomáticas (Schiff *et al.*, 2007), recientemente se ha descubierto que los MRV se asocian a enfermedades en el hombre y otras especies de mamíferos. Los casos clínicos de enteritis, infecciones respiratorias agudas o encefalitis en el hombre debidos a cepas de MRV han aumentado en todo el mundo y se ha propuesto que las cepas de MRV implicadas son consecuencia de reordenamientos entre distintos MRV y que se mantienen en reservorios animales (Steyer *et al.*, 2013).

La asociación de los MRV con enfermedad en los cerdos no está claramente establecida. El MRV3, solo o combinado con otros patógenos, se ha identificado en cerdos con enfermedad entérica en Asia, Norteamérica y Europa (Zhang *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2012; Thimmasandra Narayanappa *et al.*, 2015; Lelli *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2017), aunque otras investigaciones han detectado infecciones por MRV1, MRV2 o MRV3 en los sistemas respiratorio, gastrointestinal y nervioso de cerdos tanto sanos como enfermos (Zimmerman *et al.*, 2019). Los estudios de desafío experimental también ofrecen resultados contradictorios (Thimmasandra Narayanappa *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2017). El desafío experimental de lechones de dos días de edad con un aislado de MRV3 de origen americano se asoció a signos clínicos graves desde el día 1 postinoculación (Thimmasandra Narayanappa *et al.*, 2015), mientras que un aislado de MRV3 de origen chino solo indujo un cuadro leve en lechones de la misma edad, sin diarrea ni vómitos (Qin *et al.*, 2017). En este mismo sentido, un trabajo para determinar la eficacia de una vacuna frente a MRV3 en cerdas, diseñada para inducir protección pasiva en los lechones, comprobó que los signos clínicos asociados al desafío experimental con un aislado de MRV3 americano eran leves en los lechones del grupo control (cerdas no vacunadas) (Cao *et al.*, 2018).

También se ha propuesto desde hace años la participación de estos virus en trastornos de la reproducción ya que se han detectado MRV en fetos porcinos abortados (Kirkbride y McAdaragh, 1978). La inoculación intravenosa o intramuscular de cerdas

gestantes con MRV entre el día 40 y 85 de la gestación se asoció a abortos con cerdos momificados, nacidos muertos, camadas con nacidos vivos débiles y camadas normales (Robl *et al.*, 1971).

No se suelen observar lesiones macroscópicas asociadas a las infecciones por MRV en cerdos. Microscópicamente, las lesiones descritas en el intestino delgado incluyen acortamiento y fusión de las vellosidades, necrosis multifocal del epitelio y gránulos en el citoplasma y vacuolización en los enterocitos del epitelio de las vellosidades intestinales. La inoculación por vía respiratoria con MRV1 en cerdos libres de patógenos específicos (SPF) de 4 semanas de edad produjo infiltración de linfocitos y macrófagos en el parénquima pulmonar y una leve hiperplasia linfocítica nodular peribronquiolar (Baskerville *et al.*, 1971). Por su parte, la inoculación intranasal de un MRV3 aislado del tracto respiratorio en cerdos SPF de 70 kg de peso produjo enfisema, atelectasia lobular e hiperplasia linfocítica nodular peribronquiolar, con intensidad variable entre los lóbulos (Zimmerman *et al.*, 2019).

4.12 Adenovirus

Los adenovirus (AdV) se clasifican en el género *Mastadenovirus* de la familia *Adenoviridae*, orden *Rowavirales* e incluyen virus que pueden infectar tanto al hombre como a una gran variedad de animales. Son virus icosaédricos, sin envoltura, con un diámetro de unos 70-100 nm y un genoma de ADN lineal de doble cadena que varía entre 26 y 45 kb dependiendo de la especie. Este genoma codifica 40 proteínas diferentes gracias a un complejo mecanismo de empalme de ARN (Zimmerman *et al.*, 2019) (Figura 14).

Los AdV tienden a ser específicos de hospedador y los cerdos son la única especie hospedadora conocida para los *Mastadenovirus porcinos* (PAdV), habiéndose identificado tres especies diferentes en los cerdos, denominadas como *Mastadenovirus porcino A* (PAdV A), *Mastadenovirus porcino B* (PAdV B) y *Mastadenovirus porcino C* (PAdV C) y hasta cinco serotipos diferentes. Los PAdV A incluyen los serotipos 1, 2 y 3, los PAdV B el serotipo 4, el más comúnmente aislado, y los PAdV C el serotipo 5 (Zimmerman *et al.*, 2019). El serotipo 1 se aisló de un hisopo rectal de un cerdo con diarrea (Haig *et al.*, 1964), los tipos 2 y 3 se aislaron de las heces de cerdos sanos (Sharpe y Jessett, 1967), el 4 del cerebro de un cerdo con signos neurológicos y enteritis (Kasza, 1966) y el 5 de secreciones nasales de cerdos con enfermedad respiratoria (Hirahara *et al.*,

1990) y del cerebro de un lechón recién nacido (Kadoi *et al.*, 1995). Recientemente, se ha identificado un nuevo serotipo del PAdV, denominado WI, a partir del agua de lavado en una instalación porcina (Sibley *et al.*, 2011) y otro, SVN1, en cultivos primarios de células uroteliales de la vejiga urinaria preparados a partir de muestras de vejiga de cerdos sanos. La infección de estas células uroteliales porcinas con el PAdV no se había descrito anteriormente y el tejido empleado para el cultivo primario no mostraba ninguna lesión evidente (Jerman *et al.*, 2014).

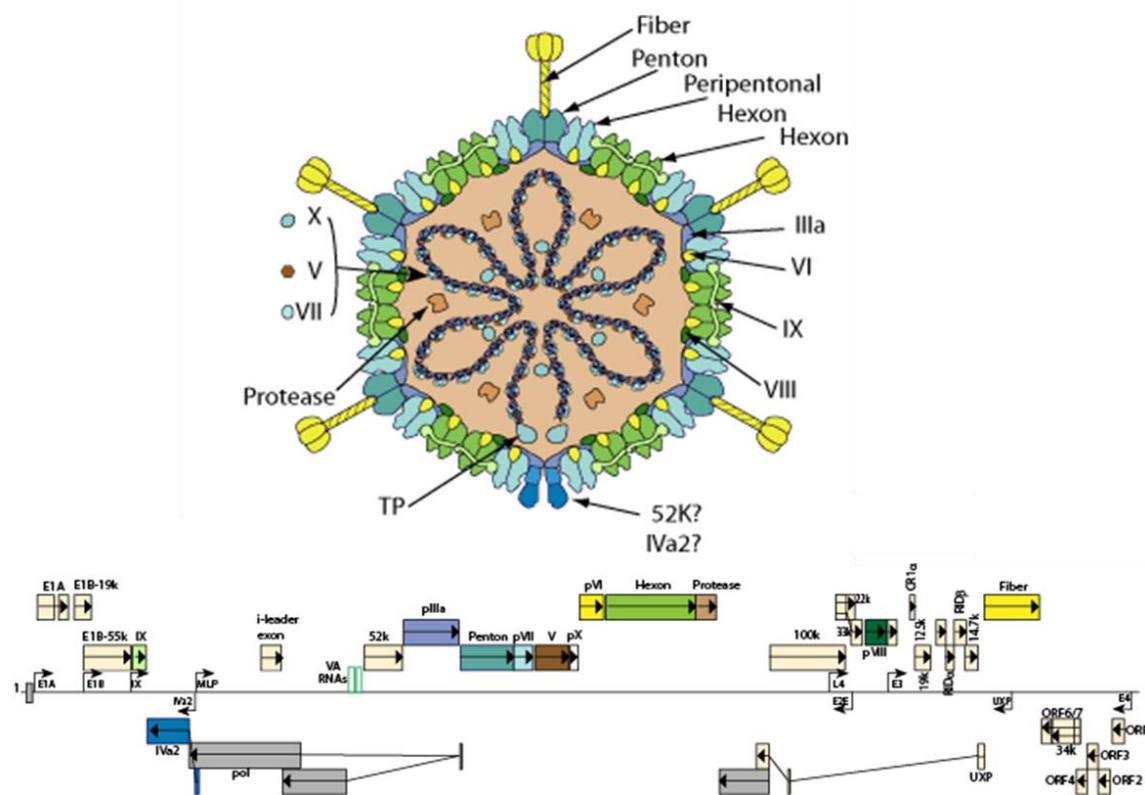


Figura 14: Estructura básica del virión y el genoma de un adenovirus (adaptada de Hulo *et al.*, 2011).

Los viriones son relativamente estables en el medio externo; se mantienen viables a temperatura ambiente durante 10 días, aunque se inactivan fácilmente con lejía, formaldehído, alcohol o compuestos fenólicos (Zimmerman *et al.*, 2019).

4.12.1 Origen y distribución mundial

Hay poca información sobre la distribución y prevalencia de la infección por estos AdV en general y por PAdV en particular. Los estudios serológicos realizados en Inglaterra y Cuba demostraron una prevalencia de la infección por PAdV entre el 15 y el 60 % en los cerdos domésticos (Darbyshire, 1967; Elazhary *et al.*, 1985). Los estudios de vigilancia más recientes describen prevalencias en cerdos sanos del 70 % en España (de

Motes *et al.*, 2004) y del 25 % en Irlanda (Gunn *et al.*, 2015), mientras que en los estudios realizados en Hungría y Tailandia sobre muestras de heces de cerdos con diarrea la proporción de positivos fue del 8 y 24 %, respectivamente (Kumthip *et al.*, 2019; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019). Además, se han detectado PAdV en aguas residuales en Brasil, Nueva Zelanda y Serbia (Wolf *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2012; Lazić *et al.*, 2015).

4.12.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión

La transmisión de los PAdV se produce por la vía fecal-oral, con eliminación del virus en las heces durante varias semanas que favorece el mantenimiento de infecciones endémicas en las granjas de cerdos. La detección de antígenos de PAdV en los enterocitos por técnicas de inmunofluorescencia hasta 45 días tras de la infección sugiere que puede existir una prolongada eliminación fecal (Zimmerman *et al.*, 2019).

No se ha implicado a ningún vector en la propagación del virus, pero la estabilidad de los PAdV en el medio ambiente hace posible la transmisión a través de diferentes vehículos, incluyendo todo tipo de fómites como botas, ropa, vehículos de transporte o utensilios empleados para la alimentación (Zimmerman *et al.*, 2019).

Aunque los PAdV no infectan al hombre, se ha descrito que los cerdos pueden ser infectados experimentalmente con AdV de origen humano (Betts *et al.*, 1962). Son necesarios más estudios para investigar el potencial zoonótico de estos virus.

4.12.3 Patogenicidad, cuadro clínico y lesional

Los PAdV se han asociado frecuentemente con enfermedad gastrointestinal en los cerdos, generalmente en los lechones entre la semana 1 y 4 de vida (Darbyshire, 1967; Sanford y Hoover, 1983). Esta enfermedad entérica suele ser leve, caracterizándose por diarrea acuosa, deshidratación, depresión y vómitos. Ocasionalmente, se han descrito signos respiratorios (Hirahara *et al.*, 1990), reproductivos (Dee, 1995) o neurológicos (Kasza, 1966) asociados a esta infección, aunque los PAdV rara vez se han señalado como el principal patógeno implicado en estas presentaciones clínicas.

La entrada del virus se produce por ingestión y/o inhalación. Existe una replicación primaria en las amígdalas seguida de multiplicación en los enterocitos de las vellosidades y en el tejido linfoide del intestino delgado distal (Zimmerman *et al.*, 2019). En todos los estudios experimentales, independientemente de la vía de inoculación, se

demuestra replicación del virus en el epitelio que recubre y está próximo a las placas de Peyer en el íleon.

El desafío experimental de lechones por vía oral con PAdV del serotipo 4 se asoció con una diarrea acuosa a los 3-4 días de la inoculación que se mantuvo durante 3 a 6 días. La eliminación viral comenzó en el día 9 postinoculación aunque se detectó antígeno viral en las células epiteliales de las vellosidades del yeyuno distal y del íleon ya a las 24 horas y durante al menos 15 días tras la inoculación. En un cerdo, la infección entérica se detectó hasta el día 45 postinoculación (Ducatelle *et al.*, 1982). En otro estudio, la infección reprodujo un cuadro de diarrea en lechones gnotobióticos de 8 días de edad que comenzó en las 48 horas posteriores a la inoculación (McAdaragh *et al.*, 1980).

Las lesiones histológicas en el TGI asociadas a la infección por PAdV incluyen el acortamiento de las vellosidades y la presencia de cuerpos de inclusión basófilos intranucleares en los enterocitos del yeyuno distal y el íleon (Ducatelle *et al.*, 1982). Como hemos indicado, los enterocitos de las vellosidades en las proximidades a las placas de Peyer son diana de la replicación viral y muestran en su núcleo grandes cuerpos de inclusión entre eosinófilos y anfófilos (Sanford y Hoover, 1983).

También se han descrito signos clínicos, lesiones y replicación viral en otros órganos diferentes al TGI. Así, se ha descrito una nefritis intersticial en un cerdo infectado naturalmente por PAdV, con inflamación y cuerpos de inclusión intranucleares en las células que recubren los túbulos de la médula asociados a la replicación viral (Nietfeld y Leslie-Steen, 1993). Un estudio en cerdos privados de calostro describió lesiones de neumonía, así como lesiones en riñón, tiroides y ganglios linfáticos (Shadduck *et al.*, 1967) tras el desafío experimental. También se ha demostrado la replicación de estos PAdV en tejidos fetales y la inducción de aborto tras la inoculación de cerdas gestantes (Dee, 1995) o de encefalitis tras la inoculación por vía intracerebral (Shadduck *et al.*, 1967). Se han descrito cuerpos de inclusión intranucleares en las células de órganos como el pulmón, el riñón o el cerebro, así como el aislamiento del virus de estos tejidos durante varias semanas.

Capítulo 2: Justificación y Objetivos

El adecuado manejo del complejo entérico en las granjas porcinas requiere de un completo diagnóstico etiológico, incluyendo tanto enteropatógenos bacterianos como víricos. El objetivo de esta Tesis Doctoral es profundizar en el conocimiento de las infecciones de etiología vírica implicadas en este complejo entérico en las explotaciones porcinas de España.

Este objetivo general se abordará a través de la consecución de los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación de la importancia de diferentes agentes víricos en la etiología de procesos entéricos en las explotaciones porcinas de España.
2. Determinación de la diversidad genética de las cepas del VDEP circulantes en las explotaciones porcinas de España y de sus posibles recombinantes, así como de otros agentes víricos relevantes como causa de brotes de diarrea neonatal.
3. Desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas para el control de las infecciones entéricas de etiología vírica en las explotaciones porcinas.
4. Caracterización de la infección y la protección cruzada entre las variantes de VDEP más comúnmente detectadas en España.

Capítulo 3: Publicación I

**Detection and Genetic Diversity of Porcine Coronavirus
Involved in Diarrhea Outbreaks in Spain.**

Información sobre el artículo

- **Título:** Detection and Genetic Diversity of Porcine Coronavirus Involved in Diarrhea Outbreaks in Spain.
- **Autores:** Héctor Puente, Héctor Argüello, Óscar Mencía-Ares, Manuel Gómez-García, Pedro Rubio y Ana Carvajal.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Frontiers in Veterinary Science.
- **Año de Publicación:** 2021.
- **DOI:** 10.3389/fvets.2021.651999.
- **Factor de Impacto de la revista en 2021:** 3,471.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2021:** 13/145 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** De acuerdo con la política de acceso abierto de Frontiers, no es necesario un permiso especial para reutilizar todo o parte del artículo, incluidas las figuras y tablas.
- **Información adicional:** Figuras y tablas adicionales están disponibles en el Anexo I.

Capítulo 4: Publicación II

**First identification and characterization of rotavirus H
in swine in Spain.**

Información sobre el artículo

- **Título:** First identification and characterization of rotavirus H in swine in Spain.
- **Autores:** Héctor Puente, Marti Cortey, Pedro J. G. de Nova, Óscar Mencía-Ares, Manuel Gómez-García, Ivan Díaz, Héctor Arguello, Margarita Martín, Pedro Rubio y Ana Carvajal.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Transboundary and Emerging Diseases.
- **Año de Publicación:** 2021.
- **DOI:** 10.1111/tbed.13992.
- **Factor de Impacto de la revista en 2021:** 4,521.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2021:** 7/145 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** Como autor de la publicación, Wiley permite la inclusión de este artículo en esta tesis doctoral sin necesidad de un permiso especial.
- **Información adicional:** Figuras y tablas adicionales están disponibles en el Anexo II.

Capítulo 5: Publicación III

Detection and genetic characterization of enteric viruses in diarrhoea outbreaks from swine farms in Spain.

Información sobre el artículo

- **Título:** Detection and genetic characterization of enteric viruses in diarrhoea outbreaks from swine farms in Spain.
- **Autores:** Héctor Puente, Héctor Arguello, Martí Cortey, Manuel Gómez-García, Oscar Mencía-Ares, Lucía Pérez-Perez, Ivan Díaz y Ana Carvajal.
- **Estado:** En preparación.
- **Revista:** Porcine Health Management.
- **Información adicional:** Figuras y tablas adicionales están disponibles en el Anexo III.

Detection and genetic characterization of enteric viruses in diarrhoea outbreaks from swine farms in Spain.

Héctor Puente^{1*}, Héctor Arguello^{1,2}, Martí Cortey³, Manuel Gómez-García¹, Oscar Mencía-Ares¹, Lucía Pérez-Perez¹, Ivan Díaz^{4,5,6}, Ana Carvajal^{1,2}

Authors details

¹ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León, Spain.

² INDEGSAL, Universidad de León, León, Spain

³ Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

⁴ IRTA, Programa de Sanitat Animal, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

⁵ Unitat mixta d'investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

⁶ WOAHP Reference Laboratory for classical swine fever, IRTA-CReSA, Bellaterra, Spain.

* Correspondence: hpuef@unileon.es

Abstract

Background

The aim of this work was to study the prevalence and distribution and characterize genetically the strains of Porcine astrovirus (PAstV), Porcine kobuvirus (PKoV), Porcine torovirus (PToV), Mammalian orthoreovirus (MRV) and Porcine mastadenovirus (PAdV) detected in diarrhoea outbreaks from Spanish swine farms, as well as on their association with widely recognized virus that cause diarrhoea, such as coronavirus and rotavirus.

Results

PAstV, PKoV, PToV, MRV and PAdV were frequently detected. Particularly, PAstV and PKoV were detected in almost 50% and 30% of the investigated farms, respectively, with an age-dependent distribution: PAstV was mainly detected in postweaning and fattening pigs, while PKoV was more frequent in sucking piglets. Among the virus studied, viral coinfections were detected in almost half of the outbreaks, with a maximum of 5 different viral species reported in three investigated farms.

Using a next generation sequencing approach, we obtained a total of 24 ARN viral genomes (>90% genome sequence obtained), characterizing for first time the full genome of circulating strains of PAstV2, PAstV4, PAstV5 and PToV in Spanish farms. Phylogenetic studies showed that PAstV, PKoV and PToV from Spanish swine farms clustered together with isolates of the same viral species from neighboring pig producing countries.

Conclusions

Although further studies to evaluate the role of these enteric viruses in diarrhoea outbreaks are required, their wide distribution and frequent association with co-infections cannot be disregard. Hence, their inclusion into routine diagnostic panels for diarrhoea in swine should be considered.

Keywords

Swine, multiplex RT-PCR, phylogenetic analysis, *Porcine astrovirus*, *Porcine kobuvirus*, *Porcine torovirus*, *Mammalian orthoreovirus*, *Porcine mastadenovirus*

Capítulo 6: Publicación IV

Rapid Selective Detection of Potentially Infectious Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Exposed to Heat Treatments Using Viability RT-qPCR.

Información sobre el artículo

- **Título:** *Rapid Selective Detection of Potentially Infectious Porcine Epidemic Diarrhea Coronavirus Exposed to Heat Treatments Using Viability RT-qPCR.*
- **Autores:** Héctor Puente, Walter Randazzo, Irene Falcó, Ana Carvajal y Gloria Sánchez.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** *Frontiers in Microbiology.*
- **Año de publicación:** 2020.
- **DOI:** 10.3389/fmicb.2020.01911.
- **Factor de Impacto de la revista en 2020:** 5,640.
- **Puesto en la categoría “Microbiology” en 2020:** 34/137 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** De acuerdo con la política de acceso abierto de *Frontiers*, no es necesario un permiso especial para reutilizar todo o parte del artículo, incluidas las figuras y tablas.

Capítulo 7: Publicación V

Characterization and cross-protection of experimental infections with SeCoV and two PEDV variants.

Información sobre el artículo

- **Título:** Characterization and cross-protection of experimental infections with SeCoV and two PEDV variants.
- **Autores:** Héctor Puente, Ivan Díaz, Héctor Arguello, Óscar Mencía-Ares, Manuel Gómez-García, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Martí Cortey, Margarita Martín, Pedro Rubio y Ana Carvajal.
- **Estado:** Publicado.
- **Revista:** Transboundary and Emerging Diseases.
- **Año de Publicación:** 2022.
- **DOI:** 10.1111/tbed.14674.
- **Factor de Impacto de la revista en 2021:** 4,521.
- **Puesto en la categoría “Veterinary Sciences” en 2021:** 7/145 (Q1).
- **Política de difusión de artículos:** Como autor de la publicación, Wiley permite la inclusión de este artículo en esta tesis doctoral sin necesidad de un permiso especial.

Capítulo 8: Discusión general

Las enfermedades entéricas tienen un impacto importante en la producción porcina, generando significativas pérdidas económicas, tanto directas como indirectas, afectando negativamente al bienestar de los animales y siendo uno de los principales motivos para el uso de antibióticos en las granjas de cerdos. En la etiología de estos procesos entéricos juegan papel tanto agentes bacterianos como virus o incluso algunos parásitos, con distinta relevancia en función de la etapa o fase de la producción. Aunque los mayores esfuerzos en lo que respecta al diagnóstico y el control de estos procesos entéricos se han centrado, en los últimos 20-25 años, en las infecciones causadas por bacterias como ETEC, *Lawsonia intracelularis* o especies del género *Brachyspira*, la emergencia del VDEP en América en 2013 y su reemergencia en Europa, unido al descubrimiento de nuevos virus potencialmente implicados en la etiología de brotes de diarrea en la última década ha incrementado de forma notable el interés por las infecciones entéricas de etiología vírica en la producción porcina.

En esta Tesis Doctoral hemos tratado de abordar, en el ámbito específico de la producción porcina española, aspectos relativos a la importancia, distribución y características más relevantes de las principales infecciones por virus entéricos en los cerdos, todo ello con el objetivo final de aportar conocimientos que permitan mejorar el diagnóstico y el control del complejo entérico porcino.

1. Prevalencia de diferentes agentes víricos en brotes de diarrea en las explotaciones porcinas de España

La presente Tesis Doctoral aporta datos de prevalencia de CoV y RV en las explotaciones porcinas de España, principales agentes víricos asociados a diarrea en los cerdos, así como de otros virus entéricos potencialmente patógenos, PAstV, PKoV, PToV, MRV o PAdV, cuyo papel en la etiología de cuadros clínicos de diarrea está aún por esclarecer.

Se obtuvo un resultado positivo a al menos uno de los virus analizados en el 77,6 % de los 206 brotes investigados, un resultado similar al descrito en estudios previos realizados en países europeos o asiáticos (Zhang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013, 2016; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019; Capai *et al.*, 2022). En concordancia con descripciones previas en granjas europeas (Valkó, Marosi, *et al.*, 2019; Capai *et al.*, 2022), se detectaron

dos o más virus en casi el 40 % de los brotes, habiéndose descrito una mayor proporción de coinfecciones, cercana al 70 %, en las explotaciones porcinas de Asia (Zhang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013).

El VDEP fue el único CoV entérico detectado en los 206 brotes de diarrea investigados entre 2017 y 2020, identificándose en cerca del 20 % de las granjas y confirmándose su reemergencia en España, tal y como se ha descrito en varios países europeos (Choudhury *et al.*, 2016), tras su aparición en 2013 en Estados Unidos. La prevalencia de brotes positivos a VDEP fue claramente superior al 2,3-3,7 % observada en dos estudios en granjas españolas, prácticamente simultáneos a nuestra investigación, pero centrados en brotes de diarrea en lechones lactantes (Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018; Vidal *et al.*, 2019). En este sentido, es importante destacar que la mayoría de los brotes de DEP identificados en nuestro estudio ocurrieron en las fases de crecimiento y engorde, probablemente a consecuencia de una cierta inmunidad en las cerdas reproductoras que protegería a los lechones en las primeras semanas de vida o de un mayor nivel de bioseguridad y limpieza/desinfección en las instalaciones de partos en comparación con las instalaciones que albergan otras fases de la producción.

En contraposición, no se detectó en ninguno de los brotes investigados la infección por el VGET, el SeCoV, el PDCoV o el SADS-CoV. Aunque este resultado no nos permite asegurar que estos virus no circulan en la población porcina de nuestro país, sí que podemos concluir que su prevalencia, en caso de estar presentes, será muy baja, inferior al 1,4 %, en las granjas con brotes de enfermedad entérica. En el caso de la GET, nuestro resultado corrobora los datos de declaración oficial de esta enfermedad a la OMSA, con un único brote declarado en España, en el primer semestre del año 2011, durante los últimos 15 años. Por otro lado, los resultados obtenidos nos permiten sugerir que la reemergencia del VDEP en España en el año 2014 desplazó, probablemente, al virus recombinante SeCoV, que había sido detectado en infecciones esporádicas en el periodo 1993-2014 (de Nova *et al.*, 2020). Finalmente, debemos destacar que esta investigación constituye la primera vigilancia activa del PDCoV y del SADS-CoV en explotaciones porcinas europeas. Mientras que el SADS-CoV tiene una distribución geográfica limitada y sólo se ha detectado en explotaciones porcinas de China (Gong *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018), el PDCoV se ha identificado en diferentes países del continente americano (Estados Unidos, Canadá, México o Perú), en Corea del Sur, en Tailandia y en China (Zhang, 2016; He *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2022; More-Bayona

et al., 2022). Aunque el origen geográfico y las rutas de transmisión de este virus no se han dilucidado completamente, el análisis de las secuencias disponibles demuestra que los PDCoV identificados en EE.UU. en 2014 son muy similares a los descritos anteriormente en China (Dong *et al.*, 2015; Wang, Yue, *et al.*, 2015). Además, se ha propuesto que el PDCoV identificado en Corea fue introducido desde EE.UU. (Zhang, 2016). Todo ello nos permite concluir la capacidad de propagación internacional de este CoV y hace necesaria una vigilancia activa, tanto en los intercambios comerciales como en los brotes de enfermedad entérica, para evitar y limitar su propagación en nuevos ámbitos geográficos.

Se identificaron RV en 51 de los 206 brotes investigados (24,7 %), correspondiendo la mayor prevalencia a RVA (13,6 %), seguido de RVC (6,3 %) y RVB (5,3 %), valores similares a los descritos en estudios realizados en otros países europeos (Zhou *et al.*, 2016; Jackova *et al.*, 2017; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019). La distribución por edades de estos RV fue claramente diferente; así, en nuestro estudio los RVC se detectaron exclusivamente en brotes de diarrea neonatal mientras que los RVA incrementaron su prevalencia tras el destete. Este resultado coincide con lo propuesto por varios investigadores, que describen una mayor prevalencia de RVC en lechones en lactación (Vlasova *et al.*, 2017) y un incremento de la prevalencia de RVA y RVB tras el destete, por encima de las 4-5 semanas de vida, asociada a la pérdida de los anticuerpos maternos y a la mezcla de animales (Zimmerman *et al.*, 2019). En contraposición, los resultados de dos investigaciones realizadas de forma coetánea a nuestro estudio y enfocadas al estudio etiológico de brotes de diarrea neonatal en nuestro país mostraron prevalencias claramente superiores de RVA, detectándose en el 43,1 y el 80,6 % de estos brotes, respectivamente (Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018; Vidal *et al.*, 2019). Este hecho podría estar relacionado con la entrada de una nueva cepa de RVA, probablemente en los primeros meses de 2017, que generó un incremento del número de brotes de diarrea neonatal en las granjas del noreste español (Vidal *et al.*, 2018). Sería de gran interés el poder conocer cuál ha sido la evolución de estos datos de prevalencia de RVA en el tiempo y en diferentes ámbitos geográficos, con el fin de determinar si esta nueva cepa de RVA se extendió a otras regiones del país y si continúa estando implicada en brotes de diarrea en los animales más jóvenes.

Además, se identificaron RVH en un total de 9 explotaciones (4,3 %), siendo esta la primera descripción de esta especie de RV en explotaciones porcinas europeas. Los

RVH han sido detectados, hasta el momento, en explotaciones porcinas de Japón (Wakuda *et al.*, 2011; Suzuki y Inoue, 2018), EE.UU. (Marthaler, Rossow, *et al.*, 2014), Brasil (Molinari *et al.*, 2014), Sudáfrica (Nyaga *et al.*, 2016) y Vietnam (Phan *et al.*, 2016). En coincidencia con los resultados de un estudio realizado en EE.UU. (Marthaler, Rossow, *et al.*, 2014), la mayoría de los casos se detectaron en la etapa de crecimiento o en engorde y tan solo identificamos RVH en un brote de enfermedad entérica en lactación. Aunque nuestro estudio no permitió investigar el papel de estos virus en la etiología del cuadro clínico de diarrea observado, podemos destacar que RVH fue el único agente vírico identificado en dos de los brotes detectados, ocurridos en la etapa de engorde, asociándose en el resto de las granjas con otros RV o con el VDEP.

Además, es importante destacar que las infecciones concomitantes que implican a dos o más especies de RV fue un fenómeno relativamente común en nuestro estudio, detectándose en una de cuatro explotaciones positivas a este género de virus, un hallazgo que coincide con los resultados publicados por otros investigadores (Marthaler, Homwong, *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2019).

La prevalencia y posible implicación en la etiología de enfermedad entérica de PAsV, PKoV, PToV, MRV o PAdV ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones, tanto en Europa como en América o en Asia (Zhou *et al.*, 2016; Chuchaona *et al.*, 2017; Kumthip *et al.*, 2018; Salamunova *et al.*, 2018; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019; Werid *et al.*, 2022). En nuestro estudio, el PAsV fue el virus entérico detectado con mayor frecuencia, identificándose en prácticamente la mitad de los brotes investigados. Las descripciones previas de prevalencia de esta infección muestran una gran variabilidad, con valores entre el 95,4 % en Grecia (Stamelou *et al.*, 2022), el 93,2 % en Eslovaquia (Salamunova *et al.*, 2018), el 77 % en Canadá (Nantel-Fortier *et al.*, 2022) o el 75 % en Dinamarca (Goecke *et al.*, 2017) en el rango superior y el 8,6 % en Francia (Capai *et al.*, 2022), el 8,4 % en Tailandia (Kumthip *et al.*, 2018) o el 7,5 % en Hungría (Valkó, Marosi, *et al.*, 2019) en el rango inferior. Detectamos el PKoV en el 27,2 % de los brotes, un valor muy similar al 24,7 % descrito en muestras de cerdos con diarrea en Hungría (Valkó, Marosi, *et al.*, 2019) y confirmando investigaciones previas en Europa, Asia y América que describen la identificación relativamente frecuente de esos virus en explotaciones porcinas (Zhou *et al.*, 2016; Chuchaona *et al.*, 2017; Goecke *et al.*, 2017; Jackova *et al.*, 2017; Nantel-Fortier *et al.*, 2019; García-Hernández *et al.*, 2021). Los PToV y PAdV se identificaron en el 11,2 % y el 14,1 % de los brotes investigados,

respectivamente, valores próximos a los descritos anteriormente en otros países y regiones productoras de cerdos. Así, nuestro resultado en el caso del PToV es similar al observado en dos estudios en Corea (6,4-8,1 %) (Hosmillo *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010) aunque inferior al descrito en China (28,6-45 %) (Zhou *et al.*, 2013, 2014; Liu *et al.*, 2016). Por su parte, la prevalencia del PAdV fue ligeramente superior al 8,4 % obtenido por Valkó y colaboradores (2019) en Hungría, pero inferior al 24,2 % descrito en Tailandia por Kumthip y colaboradores (2019). Por último, el MRV fue el virus menos detectado, identificándose en el 4,4 % de los brotes investigados. Es importante destacar que no nos constan investigaciones previas, siendo esta la primera aproximación a la prevalencia de MRV en las explotaciones porcinas europeas. Los escasos estudios que aportan información sobre la frecuencia de esta infección en explotaciones porcinas de otras regiones muestran valores de prevalencia más elevados, con un 14 % en China (Luo *et al.*, 2020), un 19 % en Corea (Kwon *et al.*, 2012) o un 20 % en Zambia (Harima *et al.*, 2020).

La distribución por edades de estos virus mostró diferentes patrones. Los PKoV, al igual que ocurría con los RVC, fueron más prevalentes en los brotes de diarrea en lactación, confirmando los resultados obtenidos previamente en explotaciones porcinas de China (Capai *et al.*, 2022; Werid *et al.*, 2022), Canadá (Nantel-Fortier *et al.*, 2022) y de algunos países europeos (Zhou *et al.*, 2016; Jackova *et al.*, 2017; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019). Por el contrario, los PAsV incrementaron su prevalencia en el destete, de forma similar a lo observado con los RVA y los RVB, una tendencia previamente descrita para estos virus en estudios realizados en explotaciones porcinas europeas (Zhou *et al.*, 2016; Salamunova *et al.*, 2018; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019) y que podría tener relación con la pérdida de la inmunidad maternal o con las condiciones de menor higiene y mezclas de animales tras el destete. Finalmente, los PToV, MRV y PAdV aumentaron su prevalencia en los brotes de enfermedad entérica de la etapa de engorde, de forma similar a lo observado para el VDEP o los RVH. Este aumento de la detección con la edad de los animales ha sido propuesto previamente para los PToV o los PAdV (Pignatelli *et al.*, 2010; Marthaler, Rossow, *et al.*, 2014; Valkó, Marosi, *et al.*, 2019), pero no para los MRV.

Las coinfecciones implicando a dos o más agentes víricos diferentes, tanto virus clásicamente reconocidos como causa de diarrea como virus potencialmente enteropatógenos, fueron un hallazgo muy común en nuestro estudio. En concordancia con

estudios previos realizados en Europa (Valkó, Marosi, *et al.*, 2019), Asia (Zhang *et al.*, 2013; Werid *et al.*, 2022) o América (Nantel-Fortier *et al.*, 2022) observamos una clara asociación entre el número de especies diferentes de virus identificadas y la edad o la fase productiva de los cerdos afectados por el brote. Así, las infecciones que implicaron un único agente vírico fueron más comunes en los lechones lactantes, mientras que se observaron coinfecciones con hasta cinco virus diferentes en las etapas de destete-crecimiento y en el engorde. Factores asociados al destete como los cambios en la dieta, el alojamiento en un entorno nuevo y más contaminado, la mezcla de animales de diferentes camadas o incluso de diferentes orígenes o la pérdida de inmunidad maternal pueden, sin lugar a dudas, favorecer la circulación de varios virus entéricos en esta etapa de producción. Además, se ha propuesto que la maduración del sistema inmunitario asociado al intestino tras el destete puede minimizar el impacto clínico de las infecciones causadas por un único agente en aquellos virus con una enteropatogenicidad moderada (Bauer *et al.*, 2006).

Se demostró una clara distribución estacional de las infecciones, detectándose la mayoría de los brotes investigados y la mayoría de los brotes con detección viral positiva en los primeros meses del año (enero-marzo), coincidiendo con las épocas de temperaturas más bajas. Sin embargo, esta distribución estacional solo se pudo demostrar a nivel individual para los brotes causados por el VDEP. Las bajas temperaturas favorecen la supervivencia de este CoV en el ambiente y facilitan su transmisión indirecta, explicando la estacionalidad del VDEP (Carvajal *et al.*, 2015; Dortmans *et al.*, 2018). Además, se ha propuesto que las bajas temperaturas pueden potenciar la replicación del VDEP a través de la sobreexpresión del gen de la proteína de choque térmico Hsp70 en el intestino del cerdo, contribuyendo a su estacionalidad (Kong *et al.*, 2020). Por el contrario, el efecto estacional puede diluirse cuando otros virus como los RV participan en la etiología, ya que, *a priori*, estos virus no presentan ningún patrón estacional en los cerdos (Vlasova *et al.*, 2017).

En resumen y de acuerdo a nuestros resultados, es necesario implementar y mantener programas de monitorización y vigilancia de los diferentes virus entéricos porcinos. En el caso de los CoV, su capacidad para emerger y reemerger y para propagarse internacionalmente junto con el más que probable estatus seronegativo de la población porcina europea para los nuevos CoV como el PDCoV o el SADS-CoV hacen necesarias estrictas medidas de bioseguridad que frenen su entrada y programas de vigilancia que

limiten su propagación en caso de una eventual aparición. En el caso de los RV también resulta fundamental una vigilancia que permita conocer las especies y también los genotipos circulantes en las explotaciones porcinas de cada región. Finalmente y aunque el diseño de nuestro estudio no permite evaluar el papel de los RVH ni de los PAsV, PKoV, PToV, MRV y PAdV en la etiología del complejo entérico porcino, hemos demostrado una prevalencia importante de estos virus en los brotes de diarrea en explotaciones porcinas españolas, particularmente para los PAsV y PKoV. Son necesarios más estudios que permitan evaluar su potencial patógeno, tanto en infecciones experimentales como naturales, y teniendo en cuenta esa información se deberá considerar su inclusión en el diagnóstico diferencial del complejo entérico porcino.

2. Diversidad genética del VDEP y de otros virus entéricos potencialmente implicados en la etiología de brotes de diarrea en las explotaciones porcinas de España

El espectacular desarrollo de las herramientas de secuenciación en los años más recientes ha extendido y generalizado su empleo para la caracterización molecular y los estudios filogenéticos en las infecciones virales. En el caso del VDEP estas herramientas resultaron fundamentales para investigar el origen de los aislados que dieron lugar a la explosiva emergencia de este virus en el continente americano. Así, se pudo demostrar que en la primavera de 2013 se produjo la entrada en EE.UU., prácticamente simultánea, de dos genogrupos de este virus, los denominados aislados INDEL 2 o G1b y aislados No-INDEL o G2b (Lee, 2015). Para ambos se ha demostrado su relación filogenética con aislados del VDEP circulantes en China, siendo este el origen más probable de la emergencia de este virus en los EE.UU. (Lee, 2015).

Posteriormente, ya en Europa, la reemergencia de este CoV en el invierno 2013-2014 también se acompañó de estudios de caracterización molecular que permitieron determinar que, con la única excepción de un aislado detectado en un brote en Ucrania (Dastjerdi *et al.*, 2015), los aislados del VDEP que circulaban en Europa eran aislados INDEL 2 o G1b (Grasland *et al.*, 2015; Hanke *et al.*, 2015; Theuns *et al.*, 2015; de Nova *et al.*, 2020). Nuestro grupo de investigación caracterizó, mediante secuenciación del genoma completo, un total de 23 aislados del VDEP recuperados en brotes de diarrea

ocurridos en España entre 2014 y 2019 (de Nova *et al.*, 2020), demostrando que todos ellos eran aislados INDEL 2 o G1b, muy similares a los detectados en otros países europeos. Dentro de este genogrupo, los aislados españoles se agruparon en 4 subgrupos, identificados como SP1 a SP4. Los aislados más recientes, recuperados entre 2017 y 2019, se incluyeron en el subgrupo SP4 que mostró una elevada homología con aislados descritos en Centroeuropa y que se caracterizó por presentar un fragmento recombinante de 392 pares de bases del genoma del SeCoV en el extremo 5' del gen S (Valkó *et al.*, 2017; Boniotti *et al.*, 2018; Valkó, Albert, *et al.*, 2019; de Nova *et al.*, 2020). En este trabajo de Tesis Doctoral decidimos ampliar esta caracterización molecular, identificando las variantes del VDEP que circulaban en las granjas porcinas españolas en el periodo 2017-2020.

La experiencia previa en los estudios de caracterización molecular del VDEP ha demostrado que la secuenciación del gen de la proteína S, más concretamente de la región S1, aporta, generalmente, una información prácticamente idéntica a la de la secuenciación del genoma completo (Song y Park, 2012; Song *et al.*, 2015) y, por ello, decidimos obtener mediante secuenciación Sanger las secuencias completas de este gen S para el total de los 41 aislados del VDEP identificados en el estudio etiológico de brotes de diarrea. Estas secuencias fueron comparadas con una selección representativa de 44 secuencias del genoma del VDEP de Europa, Asia y América disponibles en GenBank.

Nuestros resultados confirmaron que únicamente se detecta circulación de aislados del genogrupo INDEL 2 o G1b, en concordancia con los resultados de otros países europeos (Grasland *et al.*, 2015; Hanke *et al.*, 2015; Theuns *et al.*, 2015; Dortmans *et al.*, 2018; Antas *et al.*, 2021). Se ha demostrado que el cuadro clínico asociado a este genogrupo es más leve que el causado por los aislados del genogrupo no INDEL o G2b (Vlasova *et al.*, 2020), hecho que podría explicar el limitado impacto económico de la reemergencia del VDEP en España y, en general, en Europa en comparación con sus dramáticas consecuencias en el continente Americano o en distintos países de Asia (Alvarez *et al.*, 2015).

El análisis filogenético nos permitió clasificar los aislados españoles recientes del VDEP en tres subgrupos o clados, con algunas relaciones geográficas. Dos de estos clados, identificados como INDEL 2.1 y 2.2, mostraron una distribución geográfica limitada, estando el primero restringido a dos aislados recuperados de dos granjas del noreste del país, de Cataluña, e incluyendo el segundo varios aislados de granjas situadas

en una única provincia del noroeste y pertenecientes a la misma empresa productora de cerdos. Por el contrario, el tercer subgrupo o clado, identificado como INDEL 2.3, mostró una amplia distribución geográfica y se asoció a aislados descritos en Hungría, Eslovenia, Italia o España (Valkó *et al.*, 2017; Boniotti *et al.*, 2018; Valkó, Albert, *et al.*, 2019; de Nova *et al.*, 2020) y más recientemente en Holanda, Alemania o Francia (Dortmans *et al.*, 2018; Bigault *et al.*, 2020; Karte *et al.*, 2020). Todos ellos se caracterizan por albergar un fragmento recombinante de casi 400 nucleótidos en el extremo 5' del gen S, siendo el VDEP y el SeCoV los progenitores principal y menor, respectivamente. Así pues, nuestros resultados confirman que esta variante recombinante se ha convertido en la más extendida en España entre 2017 y 2020, tal y como había sugerido la investigación previa de nuestro grupo con un número limitado de aislados recientes del VDEP (de Nova *et al.*, 2020). Un resultado similar ha sido descrito en Italia y en Polonia, desplazando este subgrupo recombinante VDEP-SeCoV a otros subgrupos del VDEP (Boniotti *et al.*, 2018; Antas *et al.*, 2021). Dado que la proteína S es la diana principal para los anticuerpos neutralizantes del VDEP, se ha propuesto que este evento de recombinación podría proporcionar algunas ventajas frente a otros aislados de este virus (Li *et al.*, 2017; Boniotti *et al.*, 2018).

Adicionalmente, se extendió este trabajo de caracterización a otros virus entéricos detectados en las explotaciones porcinas españolas, empleando técnicas de secuenciación masiva o NGS sobre una selección de muestras. Así, a partir de un total de 14 muestras de heces y empleando un protocolo específico para la secuenciación de virus ARN desarrollado por el Dr. Martí Cortey en la Universidad Autónoma de Barcelona, se obtuvieron un total de 28 secuencias del genoma completo o casi completo (>90%), incluyendo PAstV (16), PKoV (3), PToV (1), VDEP (4) y RVH (4).

Se detectaron cuatro especies de PAstV, PAstV2 a PAstV5, en los brotes de enfermedad entérica investigados en las explotaciones españolas. El análisis filogenético identificó la mayoría de las cepas como PAstV 4 (50 %) y PAstV 2 (31,2 %), siendo estas dos especies de PAstV las más prevalentes en el ganado porcino con diarrea en España, en coincidencia con lo descrito en varios países europeos (Dufkova *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016; Salamunova *et al.*, 2018), en América del Norte (Mor *et al.*, 2012) o en Asia (Lee *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2016; Kumthip *et al.*, 2018). El análisis filogenético de los PKoV reveló que todas las secuencias completas correspondientes a aislados recuperados en granjas porcinas españolas, incluidas las tres identificadas en nuestro estudio, están

incluidas en un único clado local junto con una cepa húngara y bien diferenciadas de otros aislados europeos (Jackova *et al.*, 2017). Por su parte, la única secuencia completa de PToV obtenida en nuestra investigación se agrupó junto con otros aislados de PToV de Europa, América o Asia, de forma similar a descripciones previas (Hu *et al.*, 2019; Fujii *et al.*, 2020).

También obtuvimos la secuencia completa de todos los segmentos genómicos de 4 cepas españolas de RVH. Los análisis filogenéticos demostraron que estas cepas de RVH recuperadas en brotes de enfermedad entérica en granjas españolas están estrechamente relacionadas con cepas de RVH de origen porcino de Japón, EE.UU., Brasil, Sudáfrica o Vietnam. Por el contrario, su relación fue mucho más distante con las cepas de RVH recuperadas de humanos en Bangladesh y en China o con una cepa de RVH de murciélago identificada en Camerún. A pesar de que el número de secuencias disponibles es limitado, estos resultados permiten sugerir la ausencia de eventos recientes de reordenamiento entre estos virus (Nyaga *et al.*, 2016; Phan *et al.*, 2016; Suzuki y Inoue, 2018). En concordancia con nuestros resultados, los segmentos NSP5, NSP2 y VP1, que codifican proteínas directamente relacionadas con la replicación y el ensamblaje virales (fosfoproteína, NTPasa y RdRp, respectivamente), se han propuesto como regiones altamente conservadas entre los RVH. Por su parte, los segmentos VP3 y NSP4 que codifican la guaniltransferasa y la enterotoxina, respectivamente, tienen una mayor diversidad (Estes y Kapikian, 2007). Recientemente, se ha propuesto un nuevo sistema de genotipado para los RVH basado en la secuencia completa y con valores de identidad nucleotídica entre genotipos que oscilan entre el 67 % y el 89 % (Suzuki y Inoue, 2018). Sobre la base de los valores de corte propuestos, las cepas de RVH porcinas españolas se clasificaron en uno o dos genotipos diferentes para cada segmento genómico. Dos cepas superaron los valores de corte propuestos para el segmento VP7 (86 %), permitiéndonos proponer la identificación de un nuevo genotipo de RVH para este segmento. Sin embargo, este resultado debe tomarse con precaución debido al limitado número de secuencias de RVH disponibles.

En base a la bibliografía consultada, nuestros resultados incluyen las primeras secuencias completas de PAsV2, PAsV4, PAsV5, PToV y RVH en España. En el caso del RVH se trata, además, de las primeras cepas identificadas en Europa. El riesgo de aparición de nuevos virus o nuevas variantes, bien por su llegada desde otras regiones o por eventos de mutación, recombinación o reordenamiento, hace que la vigilancia de los

virus entéricos porcinos sea fundamental para prevenir su propagación y permitir la actualización de las herramientas de diagnóstico o incluso de control. Además, la secuenciación completa del genoma demostró su utilidad en la caracterización molecular de los aislados, permitiendo el estudio de las relaciones entre virus de muy diversos ámbitos geográficos y orígenes.

3. Nuevas herramientas diagnósticas para el control de las infecciones entéricas de etiología vírica en las explotaciones porcinas: PCR de viabilidad

La propagación internacional del VDEP o del PDCoV y la capacidad de estos virus para involucrarse en presentaciones epidémicas de gran magnitud en áreas sin exposición previa ha renovado el interés por el estudio de las principales fuentes de infección y mecanismos implicados en su transmisión. Para este estudio, más allá de las técnicas de detección, resultan necesarias herramientas analíticas que proporcionen información sobre la infectividad viral y que puedan ser empleadas para la monitorización de potenciales fuentes o vías de contaminación incluyendo otros hospedadores, vectores, ambiente, aire o alimentos. El aislamiento en cultivo celular es la técnica de referencia o “gold-estándar” en el estudio de la infectividad viral, pero presenta limitaciones asociadas a las dificultades para adaptar estos virus al cultivo *in vitro*, a la contaminación por otros microorganismos en las muestras de partida, así como a su baja sensibilidad (Oka *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2016b). En este sentido, se han descrito en los años más recientes técnicas moleculares de detección de virus viables o PCR de viabilidad (vPCR) basadas en el empleo de moléculas que se intercalan en los ácidos nucleicos, inhibiendo la amplificación en el caso de que existan daños en la envoltura o cápside viral (Elizaquível *et al.*, 2014).

En el caso concreto del VDEP se ha descrito que la transmisión indirecta se ve facilitada por la resistencia del virus en el ambiente cuando las temperaturas son bajas (Carvajal *et al.*, 2015) y los piensos e ingredientes de piensos contaminados con heces han sido identificados como fuentes de infección en brotes tanto locales como transfronterizos. Entre estas materias primas empleadas para formular la dieta han generado particular preocupación los derivados de sangre de cerdo como el plasma

porcino atomizado (SDPP) que se emplea en la alimentación de lechones, por poder estar asociados a una contaminación intrínseca a consecuencia de una potencial viremia (Pasick *et al.*, 2014). En este sentido es importante mencionar que, aunque no se ha demostrado la presencia de virus viable en la sangre de cerdos infectados, la detección de ARN viral en bajas concentraciones en el suero es un hallazgo frecuente en los cerdos infectados por el VDEP (Jung, Annamalai, *et al.*, 2015).

Una investigación llevada a cabo por las autoridades canadienses demostró que la inoculación oral de lechones con un SDPP en el que se detectaba ARN del VDEP por PCR era capaz de reproducir la infección (Pasick *et al.*, 2014). En contraposición, un estudio similar llevado a cabo por las autoridades de EE.UU. no logró reproducir la infección tras la administración de elevadas dosis de SDPP positivo al VDEP por vía oral y tanto este estudio como el de las autoridades canadienses fueron incapaces de reproducir la infección experimental tras la administración de piensos suplementados con SDPP positivo por técnicas moleculares (Opriessnig *et al.*, 2014; Pasick *et al.*, 2014). Adicionalmente y en condiciones experimentales se ha comprobado que la combinación de temperatura y tiempo utilizada habitualmente durante el proceso de fabricación del SDPP junto con su almacenamiento durante al menos dos semanas a 20°C antes del empleo en alimentación animal garantizan la inactivación del VDEP, en caso de que este virus pudiera estar presente (Gerber *et al.*, 2014; Pujols y Segalés, 2014; Hulst *et al.*, 2019). A pesar de todo ello, la detección de este CoV por técnicas moleculares en las materias primas de los piensos y particularmente en el SDPP continúa siendo un problema pendiente de resolver en la industria porcina. Además, variaciones en los procesos empleados durante la producción del SDPP podrían limitar la eficacia de este procesado en la inactivación del VDEP (EFSA, 2014).

En nuestro estudio hemos desarrollado una RT-qPCR de viabilidad o vRT-qPCR capaz de discriminar el VDEP viable del inactivado térmicamente, tanto en suspensiones virales obtenidas del sobrenadante de cultivos celulares infectados como en muestras de suero. Valoramos diferentes marcadores de viabilidad, obteniéndose los mejores resultados tras el pretratamiento de las muestras con un marcador fotoactivable, propidio de monoazida (PMAxx™). Los resultados obtenidos empleando este marcador mostraron una mejor correlación con las observaciones realizadas en cultivo celular en comparación con el cloruro de platino (IV) (PtCl₄) o el dicloruro de cis-diamina-platino (II) (CDDP). Además, valoramos la posible utilidad de esta vRT-qPCR en muestras de una matriz

compleja como es el suero porcino, comprobando que la adición de Triton X-100 en el pretratamiento de las muestras con PMAxx™, PtCl₄ y CDDP mejoraba el rendimiento de la técnica, de forma similar a lo descrito para otros virus entéricos como los norovirus humano y murino o el virus de la hepatitis A (Coudray-Meunier *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2015; Randazzo *et al.*, 2016).

La cinética de inactivación térmica demostrada para el VDEP en nuestra investigación coincide con los resultados de Zentkovich y colaboradores (2016) que no recuperaron VDEP viable tras un tratamiento de diez o más segundos a 76°C. De forma similar se ha descrito que el VDEP inoculado en el pienso reduce su título en casi cuatro unidades logarítmicas cuando se calienta a 90°C durante 30 minutos (Trudeau *et al.*, 2016). Asumiendo que la inactivación térmica del VDEP se ajusta a la distribución de Weibull se ha estimado que es necesario un tratamiento térmico a 60°C durante seis minutos o menos en diferentes matrices relacionadas con el alimento, incluido el SDPP, para lograr la reducción de un logaritmo decimal del VDEP viable (Trudeau *et al.*, 2016).

Además, en nuestro estudio valoramos dos ensayos moleculares, un ensayo desarrollado por Zhou y colaboradores (2017) que emplea como diana el gen de la proteína M y una técnica comercial, ya que la longitud del amplicón y/o la riqueza de estructuras secundarias del ARN diana pueden afectar a la eficacia de la vRT-qPCR (Fittipaldi *et al.*, 2012). Aunque los marcadores de viabilidad se comportaron de forma similar con independencia de la técnica, existieron diferencias en la sensibilidad analítica, siendo más sensible la técnica de Zhou y colaboradores que, por tanto, podría ajustarse mejor al empleo en muestras ambientales con concentraciones virales previsiblemente bajas. Además, esta técnica se basa en la amplificación de una secuencia altamente conservada del gen de la proteína M del VDEP, permitiendo inferir resultados de viabilidad en cepas de diferentes variantes o genotipos (Zhou *et al.*, 2017).

En conclusión, la vRT-qPCR es una herramienta analítica rápida y económica que permite inferir la viabilidad del VDEP en muestras de diversos orígenes. Su utilidad para discriminar entre virus viable y no viable fue valorada recientemente, en el marco de un trabajo fin de grado, en un número limitado de muestras de SDPP positivas al VDEP por técnicas moleculares, demostrándose que en todos los casos se trataba de una detección no asociada a viriones íntegros. Así pues, esta técnica tiene una aplicación clara en la monitorización de piensos e ingredientes de piensos así como en el muestreo ambiental en programas de prevención y control.

4. Caracterización de la infección y la inmunidad cruzada asociada a las variantes del VDEP más frecuentemente detectadas en las explotaciones porcinas de España

En coincidencia con otras investigaciones, nuestros estudios han demostrado que el VDEP presenta una amplia diversidad genética, bien sea a través de mutaciones o de recombinaciones (Wang *et al.*, 2019). Asimismo, se han descrito diferencias clínicas y epidemiológicas, en términos de virulencia y transmisibilidad, entre las cepas de los genogrupos G1b y G2b de este CoV (Chen *et al.*, 2016; Gallien *et al.*, 2018). Sin embargo, no se han caracterizado las posibles diferencias en los signos clínicos, la excreción viral, las lesiones o la intensidad de la inmunidad inducida por diferentes variantes del genogrupo G1b del VDEP. En el caso del CoV quimérico entre el VGET y el VDEP, el SeCoV, existen estudios que describen su detección en granjas con brotes de enfermedad entérica indistinguible de la DEP o la GET en diferentes países europeos (Akimkin *et al.*, 2016; Belsham *et al.*, 2016; Boniotti *et al.*, 2016; de Nova *et al.*, 2020; Papetti *et al.*, 2022), pero su virulencia no ha sido evaluada experimentalmente.

Por otro lado, existe muy limitada información respecto a la duración de la protección tras la infección y la inmunidad cruzada entre diferentes aislados del VDEP. En el marco del proyecto coordinado que ha financiado esta Tesis Doctoral se llevó a cabo, por parte del grupo de investigación del Dr. Ivan Díaz del Centro de Investigación en Sanidad Animal IRTA-CReSA de Barcelona, un estudio que demostró que la inmunidad desarrollada tras el desafío con un aislado del VDEP no protegía frente a la reinfección homóloga cinco meses después de la primoexposición (Díaz *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el último estudio de esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo la caracterización de la infección experimental por un aislado de SeCoV y dos aislados G1b del VDEP, incluyendo un aislado recombinante VDEP-SeCoV (rVDEP-SeCoV) que en los estudios más recientes se ha descrito como el clado del VDEP predominante en Europa (Antas *et al.*, 2021; Puente *et al.*, 2021), así como la determinación del grado de protección cruzada proporcionada por estas variantes del VDEP o el SeCoV frente a la reinfección por el aislado recombinante rVDEP-SeCoV (reinfeción homóloga y heteróloga) en un corto periodo de tiempo.

En lo que respecta al cuadro clínico y de acuerdo con descripciones anteriores en cerdos destetados desafiados con aislados G1b (Gallien *et al.*, 2018; Díaz *et al.*, 2021) o

G2b (Madson *et al.*, 2014; Crawford *et al.*, 2015; Jung, Annamalai, *et al.*, 2015; Gerber *et al.*, 2016; Krishna *et al.*, 2020), la enfermedad clínica tras la primoinfección fue leve o moderada, a pesar de la elevada dosis empleada para el desafío, y afectó de forma significativa al crecimiento de los animales durante la primera semana tras la exposición. No se observaron diferencias en la duración e intensidad de la diarrea, principal signo clínico, entre los dos aislados del VDEP investigados, pero la duración de la enfermedad clínica en los lechones infectados por el SeCoV fue ligeramente mayor, presentando diarrea desde el día 1 tras el desafío y hasta el día 11.

La excreción viral en las heces comenzó a las 24 horas del desafío y se mantuvo en al menos un animal en los dos grupos experimentales expuestos al VDEP hasta el día 15 y en ausencia de signos clínicos, siendo relevante el papel que estos cerdos portadores convalecientes pueden tener en el mantenimiento y la transmisión de la infección en las explotaciones porcinas. Esta eliminación prolongada fue aún más evidente en los animales infectados por SeCoV que mostraron una clara reactivación de la excreción viral, alcanzando un 100 % de cerdos eliminadores entre los días 13 y 15 tras el desafío. Un perfil de excreción similar, con dos olas o picos, ha sido descrito en lechones infectados por el VDEP a los 3-4 días de edad (Lin *et al.*, 2015) o al destete (Madson *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2015) y se ha asociado con una segunda ola de replicación del VDEP en los enterocitos regenerados (Lin *et al.*, 2015). Además, tanto el pico o máximo de excreción como la eliminación viral total fueron significativamente mayores en los cerdos infectados con SeCoV, hecho que sugiere una mayor capacidad de replicación de este virus quimérico en los enterocitos de las vellosidades intestinales en comparación con el VDEP.

Las lesiones microscópicas caracterizadas por la atrofia y la fusión de las vellosidades fueron idénticas en los tres grupos experimentales desafiados con VDEP o SeCoV. Se empleó la ratio entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas para evaluar el grado de estas lesiones microscópicas, tal como se ha descrito anteriormente (Madson *et al.*, 2014; Jung, Annamalai, *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015). Aunque esta relación puede variar dependiendo de factores como la genética o la dieta, normalmente se aproxima al valor 3:1 en lechones destetados (Moon, 1971). En nuestro trabajo, esta relación varió entre 1,58 y 2,71 en los cerdos del grupo testigo, pero se redujo significativamente en los cerdos desafiados por el VDEP o el SeCoV (rango 0,88-1,19). Tanto la ubicación de las lesiones en el intestino delgado como el grado de acortamiento

de las vellosidades fueron similares a las descritas previamente en cerdos destetados expuestos a aislados del genogrupo G2b del VDEP (Madson *et al.*, 2014; Jung, Annamalai, *et al.*, 2015), siendo nuestra investigación pionera en la caracterización de las lesiones asociadas a aislados del genogrupo G1b del VDEP y al SeCoV en lechones destetados.

Se detectaron anticuerpos IgG e IgA específicos contra el VDEP en el suero de los cerdos expuestos al SeCoV utilizando un ELISA comercial basado en la proteína S, confirmando que los métodos de diagnóstico indirecto basados en esta proteína producen una identificación errónea del SeCoV, tal y como ocurre con la detección directa (de Nova *et al.*, 2020). En concordancia con estudios previos (Lin *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015; Gerber *et al.*, 2016; Krishna *et al.*, 2020; Díaz *et al.*, 2021), la mayoría de los cerdos infectados mostraron anticuerpos específicos en el día 14 tras el desafío. Además y a pesar de que demostramos la existencia de varias sustituciones de aminoácidos en los principales epítomos de reconocimiento de anticuerpos neutralizantes entre el SeCoV y los dos aislados del VDEP empleados, todos los cerdos desafiados, con independencia de la cepa empleada, presentaron anticuerpos neutralizantes específicos frente al rVDEP-SeCoV a los 20 días del desafío. El título medio de estos anticuerpos neutralizantes fue significativamente mayor, como cabría esperar, en los cerdos infectados con el aislado rVDEP-SeCoV en comparación con los cerdos desafiados con un aislado diferente del VDEP o con el SeCoV.

El grado y la duración de la protección cruzada contra las reinfecciones, especialmente las heterólogas, son aspectos de gran interés práctico para diseñar estrategias de control del VDEP (Gerds y Zakhartchouk, 2017). Así, se ha descrito una protección total contra la enfermedad y una inmunidad esterilizante a corto plazo (pocas semanas después de la primoinfección), tanto para desafíos homólogos (Crawford *et al.*, 2015; Gerber *et al.*, 2016) como heterólogos (Krishna *et al.*, 2020). Por el contrario, sólo se ha descrito una protección parcial a largo plazo en el desafío homólogo (Díaz *et al.*, 2021). En nuestro estudio, como cabía esperar, los lechones sometidos a un desafío homólogo tres semanas después de la primoinfección no mostraron ningún signo clínico o lesión y sólo un animal excretó una baja cantidad de virus ($1,37 \log_{10}$ DICC₅₀/g) en las heces en los días 2 y 3 tras la reinfección. Por el contrario, el desafío heterólogo con rVDEP-SeCoV en animales primoinfectados con un aislado diferente del VDEP se asoció a excreción fecal en el 66 % de los lechones durante 4 días, aunque en ausencia de

enfermedad clínica o lesiones. Teniendo en cuenta la dosis infecciosa mínima propuesta para el VDEP (Thomas *et al.*, 2015), estos animales con reinfección heteróloga podrían, potencialmente, ser transmisores de la misma, mientras que el único animal que excretó el VDEP tras el desafío homólogo sería, muy probablemente, incapaz de esta transmisión. Por último, se observó cierto grado de diarrea, acortamiento de las vellosidades y reducción de la ganancia de peso diaria en los lechones primoinfectados con SeCoV y reinfectados con rVDEP-SeCoV tres semanas después, sugiriendo un menor grado de protección. Entre estos lechones, el 100 % eliminó el rVDEP-SeCoV tras el desafío en concentraciones superiores a la dosis infecciosa mínima, aunque los títulos virales se redujeron hasta en dos unidades logarítmicas en comparación con los de los animales del grupo control (primoinfección). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la reinfección heteróloga solo genera una protección cruzada parcial. Desde un punto de vista práctico, podrán producirse infecciones recurrentes por el VDEP en las granjas, incluso si la entrada de una nueva cepa viral tiene lugar con pocas semanas de diferencia, hecho que subraya la necesidad de mantener altos niveles de bioseguridad externa en las explotaciones porcinas.

A pesar de las diferencias observadas en la protección alcanzada, los niveles séricos de anticuerpos IgG e IgA contra la proteína S del VDEP fueron similares inmediatamente antes del segundo desafío en los tres grupos expuestos, resultado que sugiere una falta de correlación con la protección. Por el contrario, existió una clara correlación entre la protección y los títulos séricos de anticuerpos neutralizantes. Así, los lechones expuestos inicialmente al rVDEP-SeCoV mostraron inmediatamente antes de la reinfección un título de anticuerpos neutralizantes más elevado que los otros grupos experimentales y tras la reexposición una menor eliminación viral. Se ha descrito que un título elevado de estos anticuerpos neutralizantes en el intestino delgado puede limitar la replicación viral en los enterocitos (Krishna *et al.*, 2020), asociándose, además, a una menor estimulación de la respuesta de memoria. Así, en concordancia con estudios anteriores (Gerber *et al.*, 2016; Krishna *et al.*, 2020), los niveles séricos de IgG, IgA o anticuerpos neutralizantes no mostraron aumento significativo tras la reexposición homóloga en un corto periodo de tiempo.

En resumen, la infección experimental de cerdos destetados con dos variantes G1b del VDEP y una cepa del SeCoV indujo un cuadro clínico y lesional indistinguible, con diarrea y lesiones de acortamiento de las vellosidades en el intestino delgado y una

excreción viral en heces que superó la duración del cuadro clínico. Por su parte, la protección frente a la reinfección depende de la cepa implicada y está correlacionada con el título de anticuerpos neutralizantes específico. La diversidad de los aislados del VDEP unida a las limitaciones observadas en la protección cruzada frente a esta infección debe ser tomada en cuenta en la inmunización de los cerdos frente a este virus y hace necesario un seguimiento continuo de las nuevas variantes que puedan surgir a nivel local o global.

Capítulo 9: Conclusiones/Conclusions

PRIMERA. La prevalencia de los virus entéricos investigados en las en las granjas de cerdos de España fue elevada. Así, en casi el 80 % de los 206 brotes de enfermedad entérica estudiados se detectó al menos uno de estos virus y en el 40 % se detectaron coinfecciones implicando simultáneamente a dos o más virus. La mayor prevalencia se observó para los PAsV, seguidos de PKoV, VDEP, PAdV, RVA, PToV, RVC, RVB, RVH y MRV. Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de los agentes víricos en el complejo entérico porcino y la necesidad de profundizar en el estudio de estas infecciones.

SEGUNDA. El VDEP fue el único coronavirus entérico detectado en las explotaciones porcinas españolas en el periodo 2017-2020 estando implicado en la etiología de hasta el 40 % de los brotes en los que se sospechó, por parte de los veterinarios clínicos, una etiología viral. La gran mayoría de los brotes de enfermedad entérica asociados a este coronavirus ocurrieron en la etapa de engorde, probablemente a consecuencia de un cierto nivel de protección en las primeras semanas de vida a través de anticuerpos maternos o de una mayor bioseguridad en las etapas iniciales de la producción porcina. La caracterización mediante la secuenciación completa del gen de la proteína S demostró que solo circula el genogrupo de G1b o INDEL 2, siendo una variante recombinante que incluye un fragmento de 392 nucleótidos del SeCoV en este gen S la más extendida.

TERCERA. Los rotavirus se detectaron en uno de cada cuatro brotes investigados, siendo los RVC la especie identificada en los brotes de diarrea neonatal y los RVA y RVB más comunes en destete y engorde. Se detectó por primera vez en Europa la presencia de RVH, en cerca del 10 % de los brotes de enfermedad entérica investigados en granjas de cerdos, principalmente a partir del destete. La caracterización molecular demostró que los aislados de RVH recuperados de diferentes hospedadores (porcino, humano y murciélago) se agrupan en clados bien diferenciados, lo que sugiere la ausencia de eventos de salto de especie recientes.

CUARTA. La secuenciación completa del genoma empleando técnicas de NGS demostró gran utilidad en la caracterización molecular de virus entéricos, permitiendo el estudio de las relaciones entre aislados de muy diversos orígenes. Estas herramientas son de gran utilidad en la monitorización de brotes de enfermedad entérica, permitiendo detectar de forma temprana la aparición de nuevos virus o de nuevas variantes, bien por su llegada desde otras regiones o por eventos de mutación, recombinación o reordenamiento.

QUINTA. La PCR de viabilidad permitió discriminar entre el VDEP infeccioso y el VDEP inactivado por tratamiento térmico, confirmando la potencial utilidad de este método para inferir de forma rápida el carácter viable de los virus detectados en muestras de origen animal o ambiental. Esta herramienta es potencialmente útil en la monitorización de piensos e ingredientes de piensos para la industria porcina, así como en muestreos ambientales en programas de prevención y control, permitiendo una mayor precisión en las investigaciones epidemiológicas relativas al origen de brotes.

SEXTA. La infección experimental de cerdos destetados con dos variantes G1b del VDEP y una cepa del SeCoV indujo una enfermedad clínica caracterizada por diarrea, entre leve y moderada, y lesiones microscópicas de acortamiento y fusión de las vellosidades, siendo ambos, signos clínicos y lesiones, indistinguibles entre los diferentes virus. Además, para los tres aislados investigados la eliminación viral en heces se prolongó más allá del periodo de enfermedad clínica, hecho que puede favorecer su mantenimiento y diseminación en las granjas de cerdos.

SÉPTIMA. La protección contra la enfermedad clínica y la excreción viral tras la reexposición al cabo de un corto periodo de tiempo de la primoinfección dependió de la cepa. Además, comprobamos que el título de anticuerpos neutralizantes en suero es un buen indicador del nivel de protección mientras que, por el contrario, los niveles séricos de IgG e IgA no correlacionan con esta protección. La limitada protección cruzada en la infección por diferentes aislados debe tenerse en cuenta al abordar el control de la infección por el VDEP empleando herramientas de inmunoprofilaxis y hace necesario un seguimiento continuo de las nuevas variantes de este coronavirus que puedan emerger a nivel local o global.

FIRST. The prevalence of enteric viruses on pig farms in Spain was high. Thus, at least one of the investigated viruses was detected in almost 80% of the 206 diarrhoea outbreaks analysed, and co-infections, simultaneous detection of two or more viruses, occurred in 40% of the farms evaluated. The highest prevalence was observed for PAsV, followed by PKoV, PEDV, PAdV, RVA, PToV, RVC, RVB, RVH and MRV. These results highlight the relevance of viral agents in swine enteric disease and encourage further research on this topic.

SECOND. No other coronaviruses apart from PEDV were detected on Spanish swine farms in the period 2017-2020. This pathogen was identified in almost 40% of the outbreaks in which a viral aetiology was suspected by practitioners. Most of the outbreaks in which PEDV was detected occurred at the fattening stage, probably as a consequence of protection during the first weeks of life by maternal antibodies or better biosecurity in the early stages of swine production. Characterization by complete sequencing of the protein S gene showed that only the G1b or INDEL 2 genogroup of PEDV was detected, with a recombinant variant that includes a 392-nucleotide fragment of SeCoV in this S gene as the most widespread.

THIRD. Rotaviruses were detected in one of each four investigated outbreaks. RVC was the species identified in neonatal diarrhoea outbreaks while RVA and RVB were the most common species circulating in weaning and fattening stages. RVH were detected for the first time in Europe and this virus was present in 10% of the investigated farms, mainly from weaning onwards. RVH phylogenetic analyses revealed the association of RVH isolates from swine origin which were clustered apart from RVH isolates from other hosts (human and bat), suggesting the absence of recent spill-over events.

FOURTH. Whole-genome sequencing of a set of selected samples allowed to assemble different species genomes, analyse their phylogenetic relatedness and demonstrated the usefulness of this NGS technique in the monitoring of enteric disease outbreaks, supporting an early detection of new viruses or new viral variants spread from other regions or arisen from mutation, recombination or reassortment events.

FIFTH. The development of a viability PCR assay allowed to differentiate infectious from heat-inactivated PEDV, confirming the potential suitability of this method for a rapid and accurate screening of viable viruses in samples of animal or environmental origin. This tool can be used in feed and feed ingredients monitoring for the swine industry as well as in environmental sampling for prevention and control programs, allowing greater precision in epidemiological investigations searching for the source of infection.

SIXTH. The challenge of weaned pigs with two G1b variants of PEDV and a strain of SeCoV caused a clinical disease characterized by mild to moderate diarrhoea and microscopic lesions of shortening and fusion of the villi. Clinical signs and lesions were indistinguishable regardless of the infecting virus. In addition, a prolonged viral shedding in faeces, beyond clinical disease, was observed regardless of the inoculum, a fact that may favour the maintenance and dissemination of PEDV and SeCoV on swine farms.

SEVENTH. Protection against clinical disease and viral shedding after re-exposure within a short period of time after primo-infection was strain-dependent. Furthermore, we found that the serum neutralizing antibody titer is a good indicator of the level of protection while, on the contrary, serum IgG and IgA levels do not correlate with this protection. The limited cross-protection found in our research should be taken into account when using immunoprophylaxis for the control of PEDV infection and requires continuous monitoring of new variants of this coronavirus that may emerge locally or globally.

Capítulo 10: Bibliografía

- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Mushegian, A. R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., Gorbalenya, A. E. y Davison, A. J. (2016) "Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016)", *Archives of Virology*, 161(10), pp. 2921-2949. doi:10.1007/s00705-016-2977-6.
- Akagami, M., Ito, M., Niira, K., Kuroda, M., Masuda, T., Haga, K., Tsuchiaka, S., Naoi, Y., Kishimoto, M., Sano, K., Omatsu, T., Aoki, H., Katayama, Y., Oba, M., Oka, T., Ichimaru, T., Yamasato, H., Ouchi, Y., Shirai, J., Katayama, K., Mizutani, T. y Nagai, M. (2017) "Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan", *Virus Genes*. Springer US, 53(4), pp. 593-602. doi:10.1007/s11262-017-1464-9.
- Akimkin, V., Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Höper, D., Jenckel, M. y Pohlmann, A. (2016) "New chimeric porcine coronavirus in Swine Feces, Germany, 2012", *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), pp. 1314-1315. doi:10.3201/eid2207.160179.
- Almeida, P. R., Lorenzetti, E., Cruz, R. S., Watanabe, T. T., Zlotowski, P., Alfieri, A. A. y Driemeier, D. (2018) "Diarrhea caused by rotavirus A, B, and C in suckling piglets from southern Brazil: molecular detection and histologic and immunohistochemical characterization", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30(3), pp. 370-376. doi:10.1177/1040638718756050.
- Alonso, C., Goede, D. P., Morrison, R. B., Davies, P. R., Rovira, A., Marthaler, D. G. y Torremorell, M. (2014) "Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds", *Veterinary Research*, 45(1), pp. 1-5. doi:10.1186/s13567-014-0073-z.
- Alvarez, J., Sarradell, J., Morrison, R. y Perez, A. (2015) "Impact of porcine epidemic diarrhea on performance of growing pigs", *PLoS ONE*, 10(3), pp. 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0120532.
- Amimo, J. O., Junga, J. O., Ogara, W. O., Vlasova, A. N., Njahira, M. N., Maina, S., Okoth, E. A., Bishop, R. P., Saif, L. J. y Djikeng, A. (2015) "Detection and genetic characterization of porcine group A rotaviruses in asymptomatic pigs in smallholder farms in East Africa: Predominance of P[8] genotype resembling human strains", *Veterinary Microbiology*, 175(2-4), pp. 195-210. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.027.

- Amimo, J. O., Okoth, E., Junga, J. O., Ogara, W. O., Njahira, M. N., Wang, Q., Vlasova, A. N., Saif, L. J. y Djikeng, A. (2014) "Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses and astroviruses in asymptomatic local pigs in East Africa", *Archives of Virology*, 159(6), pp. 1313-1319. doi:10.1007/s00705-013-1942-x.
- Antas, M., Olech, M. y Szczotka-Bochniarz, A. (2021) "Molecular characterization of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in Poland reveals the presence of swine enteric coronavirus (SeCoV) sequence in S gene", *PLoS ONE*, 16, pp. 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0258318.
- Antas, M. y Woźniakowski, G. (2019) "Current status of porcine epidemic diarrhoea (PED) in European pigs", *Journal of Veterinary Research*, 63(4), pp. 465-470. doi:10.2478/jvetres-2019-0064.
- Argüello-Rodríguez, H., Carvajal, A. y Garrido-Pavón, J. J. (2018) "El microbioma intestinal entendiendo la importancia de la microbiota: la interacción patógeno-microbioma", *Suis*, 149, pp. 32-38.
- Arruda, B., Arruda, P., Hensch, M., Chen, Q., Zheng, Y., Yang, C., Gatto, I. R. H., Ferreyra, F. M., Gauger, P., Schwartz, K., Bradner, L., Harmon, K., Hause, B. y Li, G. (2017) "Porcine astrovirus type 3 in central nervous system of swine with polioencephalomyelitis", *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), pp. 2097-2100. doi:10.3201/eid2312.170703.
- Baskerville, A., McFerran, J. B. y Connor, T. (1971) "The pathology of experimental infection of pigs with type I Reovirus of porcine origin", *Research in Veterinary Science*, 12, pp. 172-174.
- Bauer, E., Williams, B. A., Smidt, H., Verstegen, M. W. A. y Mosenthin, R. (2006) "Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals", *Current issues in intestinal microbiology*, 7, pp. 35-52.
- Belsham, G. J., Rasmussen, T. B., Normann, P., Vaclavek, P., Strandbygaard, B. y Bøtner, A. (2016) "Characterization of a Novel Chimeric Swine Enteric Coronavirus from Diseased Pigs in Central Eastern Europe in 2016", *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(6), pp. 595-601. doi:10.1111/tbed.12579.

- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A. y Cattoli, G. (2011) "Astrovirus infections in humans and animals - Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions", *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), pp. 1529-1544. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.024.
- Betts, A. O., Jennings, A. R., Lamont, P. H. y Page, Z. (1962) "Inoculation of Pigs with Adenoviruses of Man", *Nature*, 193, pp. 45-46. doi:10.1038/193045a0.
- Bigault, L., Brown, P., Bernard, C., Blanchard, Y. y Grasland, B. (2020) "Porcine epidemic diarrhea virus: Viral RNA detection and quantification using a validated one-step real time RT-PCR", *Journal of Virological Methods*, 283. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113906.
- Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. y Ruck, B. J. (1973) "Virus Particles in Epithelial Cells of Duodenal Mucosa From Children With Acute Non-Bacterial Gastroenteritis", *The Lancet*, 302(7841), pp. 1281-1283. doi:10.1016/S0140-6736(73)92867-5.
- Blomström, A. L., Ley, C. y Jacobson, M. (2014) "Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type AII in piglets?", *Acta veterinaria Scandinavica*, 56, p. 82. doi:10.1186/s13028-014-0082-y.
- Boehme, K. W., Lai, C. M. y Dermody, T. S. (2013) "Mechanisms of Reovirus Bloodstream Dissemination", *Adv Virus Res*, 87, pp. 1-35. doi:10.1016/B978-0-12-407698-3.00001-6.
- Boley, P. A., Alhamo, M. A., Lossie, G., Yadav, K. K., Vasquez-Lee, M., Saif, L. J. y Kenney, S. P. (2020) "Porcine deltacoronavirus infection and transmission in poultry, United States", *Emerging Infectious Diseases*, 26(2), pp. 255-264. doi:10.3201/eid2602.190346.
- Boniotti, M. B., Papetti, A., Bertasio, C., Giacomini, E., Lazzaro, M., Cerioli, M., Faccini, S., Bonilauri, P., Vezzoli, F., Lavazza, A. y Alborali, G. L. (2018) "Porcine Epidemic Diarrhoea Virus in Italy: Disease spread and the role of transportation", *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), pp. 1935-1942. doi:10.1111/tbed.12974.
- Boniotti, M. B., Papetti, A., Lavazza, A., Alborali, G., Sozzi, E., Chiapponi, C., Faccini, S., Bonilauri, P., Cordioli, P. y Marthaler, D. (2016) "Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric coronavirus, Italy", *Emerging Infectious Diseases*, 22(1), pp. 83-87. doi:10.3201/eid2201.150544.

- Boros, Á., Albert, M., Pankovics, P., Bíró, H., Pesavento, P. A., Phan, T. G., Delwart, E. y Reuter, G. (2017) "Outbreaks of neuroinvasive astrovirus associated with encephalomyelitis, weakness, and paralysis among weaned pigs, Hungary", *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), pp. 1999-2010. doi:10.3201/eid2312.170804.
- Bridger, J. (1980) "Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea", *Veterinary Record*, 107(23), pp. 532-533.
- Brnić, D., Prpić, J., Keros, T., Roić, B., Starešina, V. y Jemeršić, L. (2013) "Porcine astrovirus viremia and high genetic variability in pigs on large holdings in Croatia", *Infection, Genetics and Evolution*, 14(1), pp. 258-264. doi:10.1016/j.meegid.2012.12.027.
- Cai, Y., Yin, W., Zhou, Y., Li, B., Ai, L., Pan, M. y Guo, W. (2016) "Molecular detection of Porcine astrovirus in Sichuan Province, China", *Virology Journal*, 13(1), pp. 1-5. doi:10.1186/s12985-015-0462-6.
- Cao, D., Sooryanarain, H., Yugo, D. M., Tian, D., Rogers, A. J., Heffron, C. L., Thimmasandra Narayanappa, A., LeRoith, T., Overend, C., Matzinger, S. R., Elankumaran, S., Hermann, J. R., Patterson, A. R. y Meng, X. J. (2018) "Evaluation of the pathogenicity of mammalian orthoreovirus type 3 (MRV3) in germ-free gnotobiotic pigs and of the efficacy of an inactivated vaccine against MRV3 infection in neonatal conventional piglets", *Veterinary Microbiology*, 224, pp. 23-30. doi:10.1016/j.vetmic.2018.08.019.
- Capai, L., Piorkowski, G., Maestrini, O., Casabianca, F., Masse, S., de Lamballerie, X., Charrel, R. N. y Falchi, A. (2022) "Detection of porcine enteric viruses (Kobuvirus, Mamastrovirus and Sapelovirus) in domestic pigs in Corsica, France", *PLoS ONE*, 17, pp. 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0260161.
- Carvajal, A., Argüello, H., Martínez-Lobo, F. J., Costillas, S., Miranda, R., de Nova, P. J. G. y Rubio, P. (2015) "Porcine epidemic diarrhoea: New insights into an old disease", *Porcine Health Management*. *Porcine Health Management*, 1, pp. 1-8. doi:10.1186/s40813-015-0007-9.
- Carvajal, A., Argüello, H. y Rubio, P. (2021) *Control de procesos digestivos en cebo*. 1.^a ed. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica.
- Carvajal, A., Rubio, P., Argüello, H., Gómez Laguna, J. y Miranda Hevia, R. (2018) *Diarrea neonatal*. 1.^a ed. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica.

- Chasey, D., Bridger, J. C. y McCrae, M. A. (1986) "A new type of atypical rotavirus in pigs", *Archives of Virology*, 89(1-4), pp. 235-243. doi:10.1007/BF01309892.
- Chen, Q., Gauger, P. C., Stafne, M. R., Thomas, J. T., Madson, D. M., Huang, H., Zheng, Y., Li, G. y Zhang, J. (2016) "Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets", *Journal of General Virology*, 97(5), pp. 1107-1121. doi:10.1099/jgv.0.000419.
- Chen, Q., Gauger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., Madson, D., Brodie, J., Magstadt, D., Derscheid, R., Welch, M. y Zhang, J. (2015) "Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets", *Virology*, 482, pp. 51-59. doi:10.1016/j.virol.2015.03.024.
- Cheon, D. y Chae, C. (1996) "Outbreak of diarrhea associated with *Enterococcus durans* in piglets", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, pp. 123-124.
- Choudhury, B., Dastjerdi, A., Doyle, N., Frossard, J. P. y Steinbach, F. (2016) "From the field to the lab — An European view on the global spread of PEDV", *Virus Research*, 226, pp. 40-49. doi:10.1016/j.virusres.2016.09.003.
- Chuchaona, W., Khamrin, P., Yodmeeklin, A., Kongkaew, A., Vachirachewin, R., Kumthip, K., Ushijima, H. y Maneeakarn, N. (2017) "Detection and molecular characterization of porcine kobuvirus in piglets in 2009–2013 in northern Thailand", *Tropical Animal Health and Production*, 49(5), pp. 1077-1080. doi:10.1007/s11250-017-1298-4.
- Clarke, P. y Tyler, K. L. (2008) "Reoviruses: General Features", en Mahy, B. W. J. y van Regenmortel, M. H. V (eds.) *Encyclopedia of Virology*. 3.^a ed. San Diego: Academic Press, pp. 382-390.
- Collins, P. J., Martella, V. y O'Shea, H. (2008) "Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland", *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), pp. 2973-2979. doi:10.1128/JCM.00809-08.
- Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latit, S., Guillier, L. y Perelle, S. (2013) "Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR", *BMC Microbiology*. *BMC Microbiology*, 13(1), p. 1. doi:10.1186/1471-2180-13-216.

- Crawford, K., Lager, K., Miller, L., Opriessnig, T., Gerber, P. y Hesse, R. (2015) "Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs", *Veterinary Research*, 46(1), pp. 1-9. doi:10.1186/s13567-015-0180-5.
- Cui, J., Li, F. y Shi, Z. L. (2019) "Origin and evolution of pathogenic coronaviruses", *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), pp. 181-192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9.
- Darbyshire, J. (1967) "Adenovirus antibodies in the sera of pigs", *Veterinary Record*, 81(5), pp. 118-121. doi:10.1136/vr.81.5.118.
- Dastjerdi, A., Carr, J., Ellis, R. J., Steinbach, F. y Williamson, S. (2015) "Porcine epidemic diarrhea virus among farmed pigs, Ukraine", *Emerging Infectious Diseases*, 21(12), pp. 2235-2237. doi:10.3201/eid2112.150272.
- Day, J. M. (2009) "The diversity of the orthoreoviruses: Molecular taxonomy and phylogenetic divides", *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), pp. 390-400. doi:10.1016/j.meegid.2009.01.011.
- Decaro, N. y Lorusso, A. (2020) "Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses", *Veterinary Microbiology*, 244, p. 108693. doi:10.1016/j.vetmic.2020.108693.
- Decaro, N., Mari, V., Elia, G., Addie, D. D., Camero, M., Lucente, M. S., Martella, V. y Buonavoglia, C. (2010) "Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe", *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), pp. 41-47. doi:10.3201/eid1601.090726.
- Dee, S. (1995) "Viral causes of porcine reproductive failure", *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 17(7), pp. 962-972.
- Díaz, I., Pujols, J., Cano, E., Cortey, M., Navarro, N., Vidal, A., Mateu, E. y Martín, M. (2021) "Immune response does not prevent homologous Porcine epidemic diarrhoea virus reinfection five months after the initial challenge", *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, pp. 997-1009. doi:10.1111/tbed.14055.
- Dong, N., Fang, L., Zeng, S., Sun, Q., Chen, H. y Xiao, S. (2015) "Porcine Deltacoronavirus in mainland China", *Emerging Infectious Diseases*, 21(12), pp. 2254-2255. doi:10.3201/eid2112.150283.

- Dortmans, J. C. F. M., Li, W., van der Wolf, P. J., Buter, G. J., Franssen, P. J. M., van Schaik, G., Houben, M. y Bosch, B. J. (2018) "Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) introduction into a naive Dutch pig population in 2014", *Veterinary Microbiology*, 221, pp. 13-18. doi:10.1016/j.vetmic.2018.05.014.
- Doyle, L. y Hutchings, L. (1946) "A transmissible gastroenteritis in pigs", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 108, pp. 257-259.
- Ducatelle, R., Coussement, W. y Hoorens, J. (1982) "Sequential Pathological Study of Experimental Porcine Adenovirus Enteritis", *Veterinary Pathology*, 19(2), pp. 179-189. doi:10.1177/030098588201900209.
- Dufkova, L., Scigalkova, I., Moutelikova, R., Malenovska, H. y Prodelalova, J. (2013) "Genetic diversity of porcine sapoviruses, kobuviruses, and astroviruses in asymptomatic pigs: An emerging new sapovirus GIII genotype", *Archives of Virology*, 158(3), pp. 549-558. doi:10.1007/s00705-012-1528-z.
- Edwards, C. E., Yount, B. L., Graham, R. L., Leist, S. R., Hou, Y. J., Dinnon, K. H., Sims, A. C., Swanstrom, J., Gully, K., Scobey, T. D., Cooley, M. R., Currie, C. G., Randell, S. H. y Baric, R. S. (2020) "Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(43), pp. 26915-26925. doi:10.1073/pnas.2001046117.
- EFSA (2014) "Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus", *EFSA Journal*, 12(10), pp. 1-68. doi:10.2903/j.efsa.2014.3877.
- Elazhary, M. A., Dea, S., Mittal, K. R. y Higgins, R. (1985) "Prevalence of Antibodies to Swine Influenza Virus, Porcine Adenovirus Type 4 and Haemophilus pleuropneumoniae in Quebec Pig Farms with Respiratory Problems", *Canadian Veterinary Journal*, 26(6), pp. 190-192.
- Elizaquível, P., Aznar, R. y Sánchez, G. (2014) "Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field", *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), pp. 1-13. doi:10.1111/jam.12365.
- Estes, M. y Kapikian, A. (2007) "Rotaviruses", en Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, M. M. et al (ed.) *Fields Virology*. 5.^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1917-1974.

- Fairbrother, J. M., Nadeau, É. y Gyles, C. L. (2005) "Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies", *Animal Health Research Reviews*, 6(1), pp. 17-39. doi:10.1079/ahr2005105.
- Fittipaldi, M., Nocker, A. y Codony, F. (2012) "Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification", *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V., 91(2), pp. 276-289. doi:10.1016/j.mimet.2012.08.007.
- Fujii, Y., Kashima, Y., Sunaga, F., Aoki, H., Imai, R., Sano, K., Katayama, Y., Omatsu, T., Oba, M., Furuya, T., Tsuzuku, S., Ouchi, Y., Shirai, J., Mizutani, T., Oka, T. y Nagai, M. (2020) "Complete genome sequencing and genetic analysis of a Japanese porcine torovirus strain detected in swine feces", *Archives of Virology*, 165(2), pp. 471-477. doi:10.1007/s00705-019-04514-4.
- Furutani, A., Kawabata, T., Sueyoshi, M. y Sasaki, Y. (2017) "Impact of porcine epidemic diarrhea on herd and individual Berkshire sow productivity", *Animal Reproduction Science*, 183, pp. 1-8. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.06.013.
- Gallien, S., Andraud, M., Moro, A., Lediguerher, G., Morin, N., Gauger, P. C., Bigault, L., Paboeuf, F., Berri, M., Rose, N. y Grasland, B. (2018) "Better horizontal transmission of a US non-InDel strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus", *Transboundary and Emerging Diseases*, pp. 1720-1732. doi:10.1111/tbed.12945.
- Gallien, S., Moro, A., Lediguerher, G., Catinot, V., Paboeuf, F., Bigault, L., Berri, M., Gauger, P. C., Pozzi, N., Aunthié, E., Rose, N. y Grasland, B. (2018) "Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars", *Veterinary Research*, 49(1), pp. 1-9. doi:10.1186/s13567-018-0505-2.
- García-Hernández, M. E., Trujillo-Ortega, M. E., Alcaraz-Estrada, S. L., Lozano-Aguirre-Beltrán, L., Sandoval-Jaime, C., Taboada-Ramírez, B. I. y Sarmiento-Silva, R. E. (2021) "Molecular Detection and Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Porcine Aichivirus C Coinfection in México", *Viruses*, 13, p. 738. doi:10.3390/v13050738.

- Garcia, L. A. T., Viancelli, A., Rigotto, C., Pilotto, M. R., Esteves, P. A., Kunz, A. y Barardi, C. R. M. (2012) "Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, Brazil", *Journal of Water and Health*, 10(3), pp. 445-452. doi:10.2166/wh.2012.190.
- Gebhardt, J. T., Cochrane, R. A., Woodworth, J. C., Jones, C. K., Niederwerder, M. C., Muckey, M. B., Stark, C. R., Tokach, M. D., DeRouchey, J. M., Goodband, R. D., Bai, J., Gauger, P. C., Chen, Q., Zhang, J., Main, R. G. y Dritz, S. S. (2018) "Evaluation of the effects of flushing feed manufacturing equipment with chemically treated rice hulls on porcine epidemic diarrhea virus cross-contamination during feed manufacturing", *Journal of Animal Science*, 96(10), pp. 4149-4158. doi:10.1093/jas/sky295.
- Gerber, P. F., Xiao, C., Chen, Q. y Zhang, J. (2014) "The spray-drying process is sufficient to inactivate infectious porcine epidemic diarrhea virus in plasma", *Veterinary Microbiology*, 174, pp. 86-92. doi:10.1016/j.vetmic.2014.09.008.
- Gerber, P. F., Xiao, C. T., Lager, K., Crawford, K., Kulshreshtha, V., Cao, D., Meng, X. J. y Opriessnig, T. (2016) "Increased frequency of porcine epidemic diarrhea virus shedding and lesions in suckling pigs compared to nursery pigs and protective immunity in nursery pigs after homologous re-challenge", *Veterinary Research*, 47(1), pp. 1-9. doi:10.1186/s13567-016-0402-5.
- Gerdts, V. y Zakhartchouk, A. (2017) "Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses", *Veterinary Microbiology*, 206, pp. 45-51. doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.029.
- Geyer, A., Sebata, T., Peenze, I. y Steele, A. (1996) "Group B and C porcine rotaviruses identified for the first time in South Africa", *Journal of the South African Veterinary Association*, 67(3), pp. 115-116.
- Goecke, N. B., Hjulsager, C. K., Kongsted, H., Boye, M., Rasmussen, S., Granberg, F., Fischer, T. K., Midgley, S. E., Rasmussen, L. D., Angen, Ø., Nielsen, J. P., Jorsal, S. E. y Larsen, L. E. (2017) "No evidence of enteric viral involvement in the new neonatal porcine diarrhoea syndrome in Danish pigs.", *BMC veterinary research*, 13(1), p. 315. doi:10.1186/s12917-017-1239-5.

- Gómez-García, M., Carvajal, A., Puente, H., Mencía-Ares, Ó., Pérez, L., Rubio, P. M. y Argüello-Rodríguez, H. (2021) "La antibioterapia y sus alternativas en producción porcina: Uso de las alternativas a los antibióticos", *Suis*, 174, pp. 34-39.
- Gong, L., Li, J., Zhou, Q., Xu, Z., Chen, L., Zhang, Y., Xue, C., Wen, Z. y Cao, Y. (2017) "A new bat-HKU2-like coronavirus in swine, China, 2017", *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), pp. 1607-1609. doi:10.3201/eid2309.170915.
- Grasland, B., Bigault, L., Bernard, C., Quenault, H., Toulouse, O., Fablet, C., Rose, N., Touzain, F. y Blanchard, Y. (2015) "Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea S gene indel strain isolated in France in December 2014", *Genome Announcements*, 3(3), pp. e00535-15. doi:10.1128/genomeA.00535-15.
- Gunn, L., Collins, P. J., Fanning, S., McKillen, J., Morgan, J., Staines, A. y O'Shea, H. (2015) "Detection and characterisation of novel bocavirus (genus Bocaparvovirus) and gastroenteritis viruses from asymptomatic pigs in Ireland", *Infection Ecology and Epidemiology*, 5(1). doi:10.3402/iee.v5.27270.
- Guo, R., Fan, B., Chang, X., Zhou, J. y Zhao, Y. (2020) "Characterization and evaluation of the pathogenicity of a natural recombinant transmissible gastroenteritis virus in China", *Virology*, 545, pp. 24-32. doi:10.1016/j.virol.2020.03.001.
- Haig, D., Clarke, M. y Pereira, M. (1964) "Isolation of an adenovirus from a pig", *Journal of Comparative Pathology*, 74, pp. 81-84. doi:10.1016/s0368-1742(64)80009-6.
- Hanke, D., Jenckel, M., Petrov, A., Ritzmann, M., Stadler, J., Akimkin, V., Blome, S., Pohlmann, A., Schirrmeyer, H., Beer, M. y Höper, D. (2015) "Comparison of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses from Germany and the United States, 2014", *Emerging Infectious Diseases*, 21(3), pp. 493-496.
- Harima, H., Sasaki, M., Kajihara, M., Gonzalez, G., Simulundu, E., Bwalya, E. C., Qiu, Y., Okuya, K., Isono, M., Orba, Y., Takada, A., Hang'ombe, B. M., Mweene, A. S. y Sawa, H. (2020) "Characterization of mammalian orthoreoviruses isolated from faeces of pigs in Zambia", *Journal of General Virology*, 101(10), pp. 1027-1036. doi:10.1099/jgv.0.001476.

- He, W. T., Ji, X., He, W., Dellicour, S., Wang, S., Li, G., Zhang, L., Gilbert, M., Zhu, H., Xing, G., Veit, M., Huang, Z., Han, G. Z., Huang, Y., Suchard, M. A., Baele, G., Lemey, P. y Su, S. (2020) "Genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of porcine deltacoronavirus", *Molecular Biology and Evolution*, 37(9), pp. 2641-2654. doi:10.1093/molbev/msaa117.
- Hirahara, T., Yasuhara, H., Matsui, O., Yamakana, M., Tanaka, M., Fukuyama, S., Izumida, A., Yoshiki, K., Kodama, K., Nakai, M. y Sasaki, N. (1990) "Isolation of Porcine Adenovirus from Respiratory Tract of Pigs in Japan", *Japanese Journal of Veterinary Science*, 52(2), pp. 407-409.
- Homwong, N., Diaz, A., Rossow, S., Ciarlet, M. y Marthaler, D. (2016) "Three-level mixed-effects logistic regression analysis reveals complex epidemiology of swine rotaviruses in diagnostic samples from North America", *PLoS ONE*, 11(5), pp. 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0154734.
- Hosmillo, M. D. T., Jeong, Y. J., Kim, H. J., Collantes, T. M., Alfajaro, M. M., Park, J. G., Kim, H. H., Kwon, H. J., Park, S. J., Kang, M. Il, Park, S. I. y Cho, K. O. (2010) "Development of universal SYBR Green real-time RT-PCR for the rapid detection and quantitation of bovine and porcine toroviruses", *Journal of Virological Methods*, 168(1-2), pp. 212-217. doi:10.1016/j.jviromet.2010.06.001.
- Hu, H., Jung, K., Vlasova, A. N. y Saif, L. J. (2016) "Experimental infection of gnotobiotic pigs with the cell-culture-adapted porcine deltacoronavirus strain OH-FD22", *Archives of Virology*, 161(12), pp. 3421-3434. doi:10.1007/s00705-016-3056-8.
- Hu, Z. M., Yang, Y. Le, Xu, L. D., Wang, B., Qin, P. y Huang, Y. W. (2019) "Porcine Torovirus (PToV)-A brief review of etiology, diagnostic assays and current epidemiology", *Frontiers in Veterinary Science*, 6(MAR), pp. 1-6. doi:10.3389/fvets.2019.00120.
- Huang, J. A., Nagesha, H. S. y Holmes, I. H. (1993) "Comparative sequence analysis of VP4s from five Australian porcine rotaviruses: implication of an apparent new P type", *Virology*, 196, pp. 319-327. doi:10.1006/viro.1993.1482.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. y Le Mercier, P. (2011) "ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity", *Nucleic Acids Research*, 39, pp. D576-D582.

- Hulst, M. M., Heres, L., Hakze-van der Honing, R. W., Pelser, M., Fox, M. y van der Poel, W. H. M. (2019) "Study on inactivation of porcine epidemic diarrhoea virus, porcine sapelovirus 1 and adenovirus in the production and storage of laboratory spray-dried porcine plasma", *Journal of Applied Microbiology*, 126(6), pp. 1931-1943. doi:10.1111/jam.14235.
- Indik, S., Valíček, L., Šmíd, B., Dvořáková, H. y Rodák, L. (2006) "Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus", *Veterinary Microbiology*, 117(2-4), pp. 276-283. doi:10.1016/j.vetmic.2006.06.020.
- INTERPORC (2021) *El sector porcino español en cifras en 2020*. Disponible en: <https://www.sinfoporc.com/el-sector-porcino-español-en-cifras-en-2020/> (accedido: 28 de noviembre de 2022).
- Isaacson, R. y Kim, H. B. (2012) "The intestinal microbiome of the pig.", *Animal Health Research Reviews*, 13(1), pp. 100-109. doi:10.1017/S1466252312000084.
- Jackova, A., Sliz, I., Mandelik, R., Salamunova, S., Novotny, J., Kolesarova, M., Vlasakova, M. y Vilcek, S. (2017) "Porcine kobuvirus 1 in healthy and diarrheic pigs: Genetic detection and characterization of virus and co-infection with rotavirus A", *Infection, Genetics and Evolution*, 49, pp. 73-77. doi:10.1016/j.meegid.2017.01.011.
- Jerman, U. D., Kolenc, M., Steyer, A., Veranič, P., Prijatelj, M. P. y Kreft, M. E. (2014) "A novel strain of porcine adenovirus detected in urinary bladder urothelial cell culture", *Viruses*, 6(6), pp. 2505-2518. doi:10.3390/v6062505.
- Jonassen, C. M., Jonassen, T., Saif, Y. M., Snodgrass, D. R., Ushijima, H., Shimizu, M. y Grinde, B. (2001) "Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses", *Journal of General Virology*, 82(5), pp. 1061-1067. doi:10.1099/0022-1317-82-5-1061.
- Jordan, B. (2017) "Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge", *Veterinary Microbiology*, 206, pp. 137-143. doi:10.1016/j.vetmic.2017.01.002.
- Jung, K., Annamalai, T., Lu, Z. y Saif, L. J. (2015) "Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs", *Veterinary Microbiology*, 178(1-2), pp. 31-40. doi:10.1016/j.vetmic.2015.04.022.

- Jung, K., Hu, H., Eyerly, B., Lu, Z., Chepngeno, J. y Saif, L. J. (2015) "Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs", *Emerging Infectious Diseases*, 21(4), pp. 650-654. doi:10.3201/eid2104.141859.
- Jung, K., Hu, H. y Saif, L. J. (2016a) "Porcine deltacoronavirus induces apoptosis in swine testicular and LLC porcine kidney cell lines in vitro but not in infected intestinal enterocytes in vivo", *Veterinary Microbiology*, 182, pp. 57-63. doi:10.1016/j.vetmic.2015.10.022.
- Jung, K., Hu, H. y Saif, L. J. (2016b) "Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis", *Virus Research*, 226, pp. 50-59. doi:10.1016/j.virusres.2016.04.009.
- Jung, K., Hu, H. y Saif, L. J. (2017) "Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus", *Archives of Virology*, 162(8), pp. 2357-2362. doi:10.1007/s00705-017-3351-z.
- Kadoi, K., Inoue, Y., Ikeda, T., Kamata, H., Yukawa, M., Iwabuchi, M. y Inaba, Y. (1995) "Isolation of porcine adenovirus as a candidate of 5th serotype", *Journal of Basic Microbiology*, 35(3), pp. 195-204. doi:10.1002/jobm.3620350314.
- Karte, C., Platje, N., Bullermann, J., Beer, M., Höper, D. y Blome, S. (2020) "Re-emergence of porcine epidemic diarrhea virus in a piglet-producing farm in northwestern Germany in 2019", *BMC Veterinary Research*, 16(1), pp. 1-6. doi:10.1186/s12917-020-02548-4.
- Kasza, L. (1966) "Isolation of an adenovirus from the brain of a pig", *American Journal of Veterinary Research*, 27(118), pp. 751-758.
- Kemeny, L. J., Wiltsey, V. L. y Riley, J. L. (1975) "Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected piglets", *The Cornell Veterinarian*, 65(3), pp. 352-362.
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Kongkaew, A., Kongkaew, S., Okitsu, S. y Ushijima, H. (2009) "Porcine Kobuvirus in Piglets, Thailand", *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), pp. 2075-2076. doi:10.3201/eid1512.090724.

- Khamrin, P., Maneeakorn, N., Okitsu, S. y Ushijima, H. (2014) "Epidemiology of human and animal kobuviruses", *VirusDisease*, 25(2), pp. 195-200. doi:10.1007/s13337-014-0200-5.
- Kirkbride, C. y McAdaragh, J. (1978) "Infectious agents associated with fetal and early neonatal death and abortion in swine", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172(4), pp. 480-483.
- Kong, F., Wang, Q., Kenney, S. P., Jung, K., Vlasova, A. N. y Saif, L. J. (2022) "Porcine Deltacoronaviruses: Origin, Evolution, Cross-Species Transmission and Zoonotic Potential", *Pathogens*, 11(1), pp. 1-17. doi:10.3390/pathogens11010079.
- Kong, F., Xu, Y., Ran, W., Yin, B., Feng, L. y Sun, D. (2020) "Cold exposure-induced up-regulation of HSP70 positively regulates PEDV mRNA synthesis and protein expression in vitro", *Pathogens*, 9(4). doi:10.3390/pathogens9040246.
- Kongsted, H., Pedersen, K., Hjulsager, C. K., Larsen, L. E., Pedersen, K. S., Jorsal, S. E. y Bækbo, P. (2018) "Diarrhoea in neonatal piglets: A case control study on microbiological findings", *Porcine Health Managemen*, 4(1), pp. 1-7. doi:10.1186/s40813-018-0094-5.
- Koopmans, M. y Horzinek, M. C. (1994) "Toroviruses of animals and humans: a review", *Advance in Virus Research*, 43, pp. 233-273. doi:10.1016/s0065-3527(08)60050-0.
- Krishna, V. D., Kim, Y., Yang, M., Vannucci, F., Molitor, T., Torremorell, M. y Cheeran, M. C. J. (2020) "Immune responses to porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in swine and protection against subsequent infection", *PLoS ONE*, 15(4), pp. 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0231723.
- Kroneman, A., Cornelissen, L. A. H. M., Horzinek, M. C., de Groot, R. J. y Egberink, H. F. (1998) "Identification and Characterization of a Porcine Torovirus", *Journal of Virology*, 72(5), pp. 3507-3511. doi:10.1128/jvi.72.5.3507-3511.1998.
- Kuga, K., Miyazaki, A., Suzuki, T., Takagi, M., Hattori, N., Katsuda, K., Mase, M., Sugiyama, M. y Tsunemitsu, H. (2009) "Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses", *Archives of Virology*, 154(11), pp. 1785-1795. doi:10.1007/s00705-009-0517-3.

- Kumthip, K., Khamrin, P., Kongkaew, A., Vachirachewin, R., Malasao, R., Ushijima, H. y Maneekarn, N. (2019) "Molecular epidemiology and characterization of porcine adenoviruses in pigs with diarrhea in Thailand", *Infection, Genetics and Evolution*, 67, pp. 73-77. doi:10.1016/j.meegid.2018.10.026.
- Kumthip, K., Khamrin, P., Saikruang, W., Kongkaew, A., Vachirachewin, R., Ushijima, H. y Maneekarn, N. (2018) "Detection and genetic characterization of porcine astroviruses in piglets with and without diarrhea in Thailand", *Archives of Virology*, 163(7), pp. 1823-1829. doi:10.1007/s00705-018-3806-x.
- Kwon, H. J., Kim, H. H., Kim, H. J., Park, J. G., Son, K. Y., Jung, J., Lee, W. S., Cho, K. O., Park, S. J. y Kang, M. Il (2012) "Detection and molecular characterization of porcine type 3 orthoreoviruses circulating in South Korea", *Veterinary Microbiology*, 157(3-4), pp. 456-463. doi:10.1016/j.vetmic.2011.12.032.
- Larsson, J. (2016) *Neonatal Porcine Diarrhoea Aspects on Aetiology and Pathology*. Tesis Doctoral. University of Uppsala.
- Larsson, J., Lindberg, R., Aspán, A., Grandon, R., Westergren, E. y Jacobson, M. (2014) "Neonatal Piglet Diarrhoea Associated with Enteroadherent *Enterococcus hirae*", *Journal of Comparative Pathology*, 151(2-3), pp. 137-147. doi:10.1016/j.jcpa.2014.04.003.
- Lazić, G., Grubač, S., Lupulović, D., Bugarski, D., Lazić, S., Knežević, P. y Petrović, T. (2015) "Presence of Human and Animal Viruses in Surface Waters in Vojvodina Province of Serbia", *Food and Environmental Virology*, 7(2), pp. 149-158. doi:10.1007/s12560-015-9187-3.
- Lednicky, J. A., Tagliamonte, M. S., White, S. K., Elbadry, M. A., Alam, M. M., Stephenson, C. J., Bonny, T. S., Loeb, J. C., Telisma, T., Chavannes, S., Ostrov, D. A., Mavian, C., Beau De Rochars, V. M., Salemi, M. y Morris, J. G. (2021) "Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children", *Nature*, 600(7887), pp. 133-137. doi:10.1038/s41586-021-04111-z.
- Lee, C. (2015) "Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus", *Virology Journal*, 12(1), pp. 1-16. doi:10.1186/s12985-015-0421-2.
- Lee, M. H., Jeoung, H. Y., Park, H. R., Lim, J. A., Song, J. Y. y An, D. J. (2013) "Phylogenetic analysis of porcine astrovirus in domestic pigs and wild boars in South Korea", *Virus Genes*, 46(1), pp. 175-181. doi:10.1007/s11262-012-0816-8.

- Lelli, D., Beato, M. S., Cavicchio, L., Lavazza, A., Chiapponi, C., Leopardi, S., Baioni, L., De Benedictis, P. y Moreno, A. (2016) "First identification of mammalian orthoreovirus type 3 in diarrheic pigs in Europe", *Virology Journal*, 13(1), pp. 1-5. doi:10.1186/s12985-016-0593-4.
- Lelli, D., Moreno, A., Steyer, A., Naglič, T., Chiapponi, C., Prosperi, A., Faccin, F., Sozzi, E. y Lavazza, A. (2015) "Detection and characterization of a novel reassortant mammalian orthoreovirus in bats in Europe", *Viruses*, 7(11), pp. 5844-5854. doi:10.3390/v7112908.
- Li, C., Li, W., Lucio de Esesarte, E., Guo, H., van den Elzen, P., Aarts, E., van den Born, E., Rottier, P. J. M. y Bosch, B. J. (2017) "Cell Attachment Domains of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein Are Key Targets of Neutralizing Antibodies", *Journal of Virology*, 91(12), pp. 1-16. doi:10.1128/jvi.00273-17.
- Li, W., Hulswit, R. J. G., Kenney, S. P., Widjaja, I., Jung, K., Alhamo, M. A., van Dieren, B., van Kuppeveld, F. J. M., Saif, L. J. y Bosch, B. J. (2018) "Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(22), pp. E5135-E5143. doi:10.1073/pnas.1802879115.
- Liang, Q., Zhang, H., Li, B., Ding, Q., Wang, Y., Gao, W., Guo, D., Wei, Z. y Hu, H. (2019) "Susceptibility of chickens to porcine deltacoronavirus infection", *Viruses*, 11(6), pp. 1-13. doi:10.3390/v11060573.
- Lin, C. M., Annamalai, T., Liu, X. X., Gao, X., Lu, Z., El-Tholoth, M., Hu, H., Saif, L. J. y Wang, Q. (2015) "Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection", *Veterinary Research*, 46(1), pp. 1-13. doi:10.1186/s13567-015-0278-9.
- Liu, Q. y Wang, H. Y. (2021) "Porcine enteric coronaviruses: an updated overview of the pathogenesis, prevalence, and diagnosis", *Veterinary Research Communications*, 45(2-3), pp. 75-86. doi:10.1007/s11259-021-09808-0.
- Liu, X., Zhou, Y., Yang, F., Liu, P., Cai, Y., Huang, J., Zhu, L. y Xu, Z. (2016) "Rapid and sensitive detection of porcine torovirus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP)", *Journal of Virological Methods*, 228, pp. 103-107. doi:10.1016/j.jviromet.2015.11.009.

- Luo, Y., Fei, L., Yue, H., Li, S., Ma, H. y Tang, C. (2020) "Prevalence and genomic characteristics of a novel reassortment mammalian orthoreovirus type 2 in diarrhea piglets in Sichuan, China", *Infection, Genetics and Evolution*, 85, p. 104420. doi:10.1016/j.meegid.2020.104420.
- Luo, Z., Roi, S., Dastor, M., Gallice, E., Laurin, M. A. y L'Homme, Y. (2011) "Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs", *Veterinary Microbiology*, 149(3-4), pp. 316-323. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.026.
- Ma, Y., Zhang, Y., Liang, X., Lou, F., Oglesbee, M., Krakowka, S. y Li, J. (2015) "Origin, Evolution, and Virulence of Porcine Deltacoronaviruses in the United States", *mBio*, 6(2), pp. 1-13. doi:10.4135/9781483345727.n826.
- Madson, D. M., Magstadt, D. R., Arruda, P. H. E., Hoang, H., Sun, D., Bower, L. P., Bhandari, M., Burrough, E. R., Gauger, P. C., Pillatzki, A. E., Stevenson, G. W., Wilberts, B. L., Brodie, J., Harmon, K. M., Wang, C., Main, R. G., Zhang, J. y Yoon, K. J. (2014) "Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs", *Veterinary Microbiology*, 174(1-2), pp. 60-68. doi:10.1016/j.vetmic.2014.09.002.
- Mandelik, R., Sarvas, M., Jackova, A., Salamunova, S., Novotny, J. y Vilcek, S. (2018) "First outbreak with chimeric swine enteric coronavirus (SECOV) on pig farms in Slovakia - Lessons to learn", *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(3), pp. 488-492. doi:10.1556/004.2018.043.
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnsens, J., Buonavoglia, C. y Ciarlet, M. (2010) "Zoonotic aspects of rotaviruses", *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), pp. 246-255. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.028.
- Martelli, P., Lavazza, A., Nigrelli, A. D., Merialdi, G., Alborali, L. G. y Pensaert, M. B. (2008) "Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy", *Veterinary Record*, 162(10), pp. 307-310. doi:10.1136/vr.162.10.307.
- Marthaler, D., Homwong, N., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijnsens, J. y Ciarlet, M. (2014) "Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples", *Journal of Virological Methods*, 209, pp. 30-34. doi:10.1016/j.jviromet.2014.08.018.

- Marthaler, D., Raymond, L., Jiang, Y., Collins, J., Rossow, K. y Rovira, A. (2014) "Rapid Detection, Complete Genome Sequencing, and Phylogenetic Analysis of Porcine Deltacoronavirus", *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), pp. 1347-1350. doi:10.3201/eid2008.140526.
- Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijnssens, J., Nelson, M. y Ciarlet, M. (2014) "Widespread rotavirus H in domesticated pigs, United States", *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), pp. 1195-1198. doi:10.3201/eid2007.140034.
- Matiz, K., Kecskeméti, S., Kiss, I., Ádám, Z., Tanyi, J. y Nagy, B. (2002) "Torovirus detection in faecal specimens of calves and pigs in Hungary: Short communication", *Acta Veterinaria Hungarica*, 50(3), pp. 293-296. doi:10.1556/AVet.50.2002.3.5.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., Palombo, E. A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J. T., Rahman, M. y Van Ranst, M. (2008) "Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains", *Journal of Virology*, 82(7), pp. 3204-3219. doi:10.1128/jvi.02257-07.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M. K., Gentsch, J. R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C. D., Martella, V., Mertens, P. P. C., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L. J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J. T., Desselberger, U. y Ranst, M. Van (2011) "Uniformity of Rotavirus Strain Nomenclature Proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)", *Archives of Virology*, 156(8), pp. 1397-1413. doi:10.1007/s00705-011-1006-z.
- Matthijnssens, J., Otto, P. H., Ciarlet, M., Desselberger, U., van Ranst, M. y Johne, R. (2012) "VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation", *Archives of Virology*, 157(6), pp. 1177-1182. doi:10.1007/s00705-012-1273-3.
- McAdaragh, J., Eustis, S. y Benfield, D. (1980) "Adenovirus associated with diarrhea in pigs", en *Conference of Research Workers in Animal Diseases*. Chicago.
- Mencía-Ares, O., Carvajal, A., Puente, H., Gómez-García, M., Pérez, L., Álvarez-Ordóñez, A. y Argüello-Rodríguez, H. (2021) "Radiografiando al enemigo: resistencias a los antibióticos en granja. Cúales, dónde y porqué", *Suis*, 175, pp. 10-16.

- Mesonero-Escuredo, S., Strutzberg-Minder, K., Casanovas, C. y Segalés, J. (2018) "Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhoea cases in Spain", *Porcine Health Management*, 4, pp. 1-6. doi:10.1186/s40813-018-0083-8.
- Midgley, S. E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N., Hjulsgaard, C. K., Jakab, F., Kaplon, J., Larsen, L. E., Monini, M., Poljšak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F. M., Steyer, A., Koopmans, M. y Böttiger, B. (2012) "Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe", *Veterinary Microbiology*, 156(3-4), pp. 238-245. doi:10.1016/j.vetmic.2011.10.027.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, E. y S. A. (2021) *El sector de la carne de cerdo en cifras*. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoressectorporcino2021_tcm30-564427.pdf (accedido: 22 de noviembre de 2022).
- Molinari, B. L. D., Lorenzetti, E., Otonel, R. A. A., Alfieri, A. F. y Alfieri, A. A. (2014) "Rotavirus Detected in Piglets with", *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), pp. 1019-1022. doi:<http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.130776>.
- Molinari, B. L. D., Possatti, F., Lorenzetti, E., Alfieri, A. F. y Alfieri, A. A. (2016) "Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H", *Veterinary Microbiology*, 193, pp. 125-132. doi:10.1016/j.vetmic.2016.08.014.
- Moon, H. W. (1971) "Epithelial Cell Migration in the Alimentary Mucosa of the Suckling Pig", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 137(1), pp. 151-154. doi:10.3181/00379727-137-35533.
- Moon, H. W. (1978) "Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172(4), pp. 443-448.
- Mor, S. K., Chander, Y., Marthaler, D., Patnayak, D. P. y Goyal, S. M. (2012) "Detection and molecular characterization of Porcine astrovirus strains associated with swine diarrhea", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(6), pp. 1064-1067. doi:10.1177/1040638712458781.

- More-Bayona, J. A., Ramirez-Velasquez, M., Hause, B., Nelson, E. y Rivera-Geronimo, H. (2022) "First isolation and whole genome characterization of porcine deltacoronavirus from pigs in Peru", *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, pp. e1561-e1573. doi:10.1111/tbed.14489.
- Moreno, L., Aznar, R. y Sánchez, G. (2015) "Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples", *International Journal of Food Microbiology*, 201, pp. 1-6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.012.
- de Motes, C. M., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Martín, M. y Girones, R. (2004) "Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination", *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), pp. 1448-1454. doi:10.1128/AEM.70.3.1448-1454.2004.
- Nagashima, S., Kobayashi, N., Ishino, M., Alam, M. M., Ahmed, M. U., Shyamal Kumar Paul, S. K., Ganesh, B., Chawla-Sarkar, M., Krishnan, T., Naik, T. N. y Wang, Y. H. (2008) "Whole Genomic Characterization of a Human Rotavirus Strain B219 Belonging to a Novel Group of the Genus Rotavirus Shigeo", *Journal of Medical Virology*, 80, pp. 2023-2033. doi:10.1002/jmv.
- Nantel-Fortier, N., Gauthier, M., L'Homme, Y., Lachapelle, V., Fravallo, P. y Brassard, J. (2022) "The swine enteric virome in a commercial production system and its association with neonatal diarrhea", *Veterinary Microbiology*, 266, p. 109366. doi:10.1016/j.vetmic.2022.109366.
- Nantel-Fortier, N., Lachapelle, V., Letellier, A., L'Homme, Y. y Brassard, J. (2019) "Kobuvirus shedding dynamics in a swine production system and their association with diarrhea", *Veterinary Microbiology*, 235(July), pp. 319-326. doi:10.1016/j.vetmic.2019.07.023.
- Niederwerder, M. C. y Hesse, R. A. (2018) "Swine enteric coronavirus disease: A review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada", *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(3), pp. 660-675. doi:10.1111/tbed.12823.
- Nietfeld, J. C. y Leslie-Steen, P. (1993) "Interstitial nephritis in pigs with adenovirus infection", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(2), pp. 269-273. doi:10.1177/104063879300500223.

- Nova, N. (2021) "Cross-Species Transmission of Coronaviruses in Humans and Domestic Mammals, What Are the Ecological Mechanisms Driving Transmission, Spillover, and Disease Emergence?", *Frontiers in Public Health*, 9, pp. 1-11. doi:10.3389/fpubh.2021.717941.
- de Nova, P. J. G., Cortey, M., Díaz, I., Puente, H., Rubio, P., Martín, M. y Carvajal, A. (2020) "A retrospective study of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) reveals the presence of swine enteric coronavirus (SeCoV) since 1993 and the recent introduction of a recombinant PEDV-SeCoV in Spain", *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, pp. 2911–2922. doi:10.1111/tbed.13666.
- Nyaga, M. M., Peenze, I., Potgieter, C. A., Seheri, L. M., Page, N. A., Yinda, C. K., Steele, A. D., Matthijssens, J. y Mphahlele, M. J. (2016) "Complete genome analyses of the first porcine rotavirus group H identified from a South African pig does not provide evidence for recent interspecies transmission events", *Infection, Genetics and Evolution*, 38, pp. 1-7. doi:10.1016/j.meegid.2015.11.032.
- Oka, T., Saif, L. J., Marthaler, D., Esseili, M. A., Meulia, T., Lin, C.-M., Vlasova, A. N., Jung, K., Zhang, Y. y Wang, Q. (2014) "Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene", *Veterinary Microbiology*, 173(3-4), pp. 258-269. doi:10.1016/j.vetmic.2014.08.012.
- Olanratmanee, E. on, Kunavongkrit, A. y Tummaruk, P. (2010) "Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows", *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), pp. 42-51. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.07.004.
- OMSA (2022) *Sistema Mundial de Información Zoonosológica*. Disponible en: <https://wahis.woah.org/#/home> (accedido: 11 de noviembre de 2022).
- Opriessnig, T., Xiao, C. T., Gerber, P. F., Zhang, J. y Halbur, P. G. (2014) "Porcine epidemic diarrhea virus RNA present in commercial spray-dried porcine plasma is not infectious to naïve pigs", *PLoS ONE*, 9(8). doi:10.1371/journal.pone.0104766.

- Ortiz Sanjuán, J. M., Manzanilla, E. G., Cabrera-Rubio, R., Crispie, F., Cotter, P. D., Garrido, J. J. y Argüello, H. (2022) "Using Shotgun Sequencing to Describe the Changes Induced by In-Feed Zinc Oxide and Apramycin in the Microbiomes of Pigs One Week Postweaning", *Microbiology Spectrum*. American Society for Microbiology, 10(4), pp. 1-14. doi:10.1128/spectrum.01597-22.
- Otto, P. H., Rosenhain, S., Elschner, M. C., Hotzel, H., Machnowska, P., Trojnar, E., Hoffmann, K. y Johne, R. (2015) "Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains", *Veterinary Microbiology*, 179(3-4), pp. 168-176. doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.021.
- Padmanabhan, A. y Hause, B. M. (2016) "Detection and characterization of a novel genotype of porcine astrovirus 4 from nasal swabs from pigs with acute respiratory disease", *Archives of Virology*, 161(9), pp. 2575-2579. doi:10.1007/s00705-016-2937-1.
- Pan, Y., Tian, X., Qin, P., Wang, B., Zhao, P., Yang, Y. Le, Wang, L., Wang, D., Song, Y., Zhang, X. y Huang, Y. W. (2017) "Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China", *Veterinary Microbiology*, 211, pp. 15-21. doi:10.1016/j.vetmic.2017.09.020.
- Papetti, A., Bonilauri, P., Chiapponi, C., Baioni, L. y Boniotti, M. B. (2022) "Complete Genome Sequence of an Italian Swine Enteric Coronavirus Strain 77590/2019", *Microbiology Resource Announcements*, 11(9), pp. 9-11. doi:10.1128/mra.00386-22.
- Park, J. E. y Shin, H. J. (2014) "Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages", *Virus Research*, 191(1), pp. 143-152. doi:10.1016/j.virusres.2014.07.038.
- Park, S. J., Kim, H. K., Moon, H. J., Song, D. S., Rho, S. M., Han, J. Y., Nguyen, V. G. y Park, B. K. (2010) "Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea", *Archives of Virology*, 155(11), pp. 1803-1811. doi:10.1007/s00705-010-0774-1.
- Parlamento Europeo, C. E. (2015) "Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria (2015/C 299/04)", *Diario Oficial de la Unión Europea, Serie C, 11 de septiembre de 2015*, (299), pp. 1-31.

- Pasick, J., Berhane, Y., Ojkic, D., Maxie, G., Embury-Hyatt, C., Swekla, K., Handel, K., Fairles, J. y Alexandersen, S. (2014) "Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada", *Transboundary and emerging diseases*, 61(5), pp. 397-410. doi:10.1111/tbed.12269.
- Peng, R., Li, D., Cai, K., Quin, J., Wang, Y., Lin, Q., Guo, Y., Zhao, C. y Duan, Z. (2013) "The epidemiological characteristics of group C rotavirus in Lulong area and the analysis of diversity of VP6 gene", *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 27(3), pp. 164-166.
- Pensaert, M. (1989) "Transmissible gastroenteritis virus (respiratory variant)", en Pensaert, M. (ed.) *Virus infections of porcines*. 1.^a ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp. 154-165.
- Pensaert, M., Callebaut, P. y Vergote, J. (1986) "Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis", *Veterinary Quarterly*, 8(3), pp. 257-261. doi:10.1080/01652176.1986.9694050.
- Perlman, S. y Netland, J. (2009) "Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis", *Nature Reviews Microbiology*, 7(6), pp. 439-450. doi:10.1038/nrmicro2147.
- Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G. y Petersen, E. (2020) "COVID-19, SARS and MERS: are they closely related?", *Clinical Microbiology and Infection*, 26, pp. 729-734. doi:10.1016/j.cmi.2020.03.026.
- Phan, M. V. T., Anh, P. H., Cuong, N. Van, Munnink, B. B. O., Hoek, L. Vander, My, P. T., Tri, T. N., Bryant, J. E., Baker, S., Thwaites, G., Woolhouse, M., Kellam, P., Rabaa, M. A. y Cotten, M. (2016) "Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection", *Virus Evolution*, 2(2), pp. 1-15. doi:10.1093/ve/vew027.
- Pignatelli, J., Jiménez, M., Grau-Roma, L. y Rodríguez, D. (2010) "Detection of porcine torovirus by real time RT-PCR in piglets from a Spanish farm", *Journal of Virological Methods*, 163(2), pp. 398-404. doi:10.1016/j.jviromet.2009.10.031.
- Pignatelli, J., Jimenez, M., Luque, J., Rejas, M. T., Lavazza, A. y Rodriguez, D. (2009) "Molecular characterization of a new PToV strain. Evolutionary implications", *Virus Research*, 143(1), pp. 33-43. doi:10.1016/j.virusres.2009.02.019.

- Prieto Suárez, C., Martínez Lobo, F. J., Segalés i Coma, J. y Carvajal Urueña, A. (2017) *Enfermedades infecciosas del ganado porcino*. 1.^a ed. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica.
- Puente, H., Argüello, H., Mencía-Ares, Ó., Gómez-García, M., Rubio, P. y Carvajal, A. (2021) "Detection and Genetic Diversity of Porcine Coronavirus Involved in Diarrhea Outbreaks in Spain", *Frontiers in Veterinary Science*, 8, pp. 1-9. doi:10.3389/fvets.2021.651999.
- Pujols, J. y Segalés, J. (2014) "Survivability of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in bovine plasma submitted to spray drying processing and held at different time by temperature storage conditions", *Veterinary Microbiology*, 174, pp. 427-432. doi:10.1016/j.vetmic.2014.10.021.
- Qin, P., Li, H., Wang, J., Wang, B., Xie, R., Xu, H. y Zhao, L. (2017) "Genetic and pathogenic characterization of a novel reassortant mammalian orthoreovirus 3 (MRV3) from a diarrheic piglet and seroepidemiological survey of MRV3 in diarrheic pigs from east China Pan", *Veterinary Microbiology*, 208, pp. 126-136. doi:10.1016/j.vetmic.2017.07.021.
- Randazzo, W., López-Gálvez, F., Allende, A., Aznar, R. y Sánchez, G. (2016) "Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water", *International Journal of Food Microbiology*, 229, pp. 1-6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.010.
- Reuter, G., Boldizsár, Á. y Pankovics, P. (2009) "Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae", *Archives of Virology*, 154(1), pp. 101-108. doi:10.1007/s00705-008-0288-2.
- Reuter, G., Boros, Á. y Pankovics, P. (2011) "Kobuviruses – a comprehensive review", *Reviews in medical virology*, 21, pp. 32-41. doi:10.1002/rmv.
- Reuter, G., Kecskeméti, S. y Pankovics, P. (2010) "Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary", *Emerging Infectious Diseases*, 16(4), pp. 696-698. doi:10.3201/eid1604.090937.
- Reuter, G., Nemes, C., Boros, Á., Kapusinszky, B., Delwart, E. y Pankovics, P. (2013) "Porcine kobuvirus in wild boars (*Sus scrofa*)", *Archives of Virology*, 158(1), pp. 281-282. doi:10.1007/s00705-012-1456-y.

- Reuter, G., Pankovics, P. y Boros, Á. (2018) "Nonsuppurative (Aseptic) Meningoencephalomyelitis Associated with Neurovirulent Astrovirus Infections in Humans and Animals", *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), pp. e00040-18. doi:10.1128/CMR.00040-18.
- Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F. y Letellier, A. (2017) "Post weaning diarrhea in pigs: Risk factors and non-colistin-based control strategies", *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), pp. 1-19. doi:10.1186/s13028-017-0299-7.
- Robl, M., McAdaragh, J., Phillips, C. y Bicknell, E. (1971) "Experimental swine pneumonia caused by reovirus type 3", *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician*, 66(9), pp. 903-909.
- Roczo-Farkas, S., Dunlop, R. H., Donato, C. M., Kirkwood, C. D. y McOrist, S. (2021) "Rotavirus group C infections in neonatal and grower pigs in Australia", *Veterinary Record*, 188(12), p. e296. doi:10.1002/vetr.296.
- Rodger, S. M., Bishop, R. F. y Holmes, I. H. (1982) "Detection of rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant", *Journal of Clinical Microbiology*, 16(4), pp. 724-726. doi:10.1128/jcm.16.4.724-726.1982.
- Rodríguez Ferri, F. E. (2020) "Coronavirus y murciélagos", *AmbioCiencias*, 18, pp. 37-48.
- Rogers, D. G. y Andersen, A. A. (2000) "Intestinal lesions caused by a strain of Chlamydia suis in weanling pigs infected at 21 days of age", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(3), pp. 233-239. doi:10.1177/104063870001200306.
- Rubio, P. y Carvajal, A. (2020) "Coronavirus", *AmbioCiencias*, 18, pp. 5-18.
- Ryu, J., Kang, G. J., Kim, O., Park, J. Y. y Shin, H. J. (2022) "Transplacental Transmission of Porcine Epidemic Diarrhea Virus", *Frontiers in Veterinary Science*, 8(March), pp. 1-6. doi:10.3389/fvets.2021.802816.
- Saif, L. (2004) "Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome?", *Revue Scientifique et Technique*, 23(2), pp. 643-660. doi:10.20506/rst.23.2.1513.
- Saif, L. J. (1994) "Comparative Pathogenesis of Enteric Viral Infections of Swine", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 473, pp. 47-59. doi:10.1007/978-1-4615-4143-1_4.

- Saif, L. J., Bohl, E. H. y Theil, K. W. (1980) "Rotavirus-like, calcivirus-like, and 23nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs", *Journal of Clinical Microbiology*, 12(1), pp. 105-111. doi:10.1128/jcm.12.1.105-111.1980.
- Salamunova, S., Jackova, A., Mandelik, R., Novotny, J., Vlasakova, M. y Vilcek, S. (2018) "Molecular detection of enteric viruses and the genetic characterization of porcine astroviruses and sapoviruses in domestic pigs from Slovakian farms", *BMC Veterinary Research*, 14(1), pp. 1-9. doi:10.1186/s12917-018-1640-8.
- Sanford, S. E. y Hoover, D. M. (1983) "Enteric adenovirus infection in pigs", *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47(4), pp. 396-400.
- Sasaki, J., Nagashima, S. y Taniguchi, K. (2003) "Aichi Virus Leader Protein Is Involved in Viral RNA Replication and Encapsidation", *Journal of Virology*, 77(23), pp. 12928-12929. doi:10.1128/jvi.77.23.12928-12929.2003.
- Schiff, L. A., Nibert, M. L. y Tyler, K. L. (2007) "Orthoreoviruses and Their Replication", en Knipe, D. M. y Howley, P. M. (eds.) *Fields Virology*. 5.^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1853-1915.
- Schwegmann-Wessels, C. y Herrler, G. (2006) "Transmissible gastroenteritis virus infection: a vanishing specter", *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 113(4), pp. 157-159.
- Segalés, J., Rosell, C. y Domingo, M. (2004) "Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease", *Veterinary Microbiology*, 98(2), pp. 137-149. doi:10.1016/j.vetmic.2003.10.006.
- Shadduck, J. A., Koestner, A. y Kasza, L. (1967) "The Lesions of Porcine Adenoviral Infection in Germfree and Pathogen-Free Pigs", *Pathologia veterinaria*, 4, pp. 537-552. doi:10.1177/030098586700400603.
- Shah, H. N. y Collins, M. D. (1989) "Proposal to restrict the genus Bacteroides (Castellani and Chalmers) to Bacteroides fragilis and closely related species", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(1), pp. 85-87. doi:10.1099/00207713-39-1-85.
- Sharpe, H. B. A. y Jessett, D. M. (1967) "Experimental infection of pigs with 2 strains of porcine adenovirus", *Journal of Comparative Pathology*, 77, pp. 45-50. doi:10.1016/S0021-9975(67)80006-9.

- Shimizu, M., Shirai, J., Narita, M. y Yamane, T. (1990) "Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney", *Journal of Clinical Microbiology*, 28(2), pp. 201-206. doi:10.1128/jcm.28.2.201-206.1990.
- Shin, D. J., Park, S. I., Jeong, Y. J., Hosmillo, M., Kim, H. H., Kim, H. J., Kwon, H. J., Kang, M. I., Park, S. J. y Cho, K. O. (2010) "Detection and molecular characterization of porcine toroviruses in Korea", *Archives of Virology*, 155(3), pp. 417-422. doi:10.1007/s00705-010-0595-2.
- Sibley, S. D., Goldberg, T. L. y Pedersen, J. A. (2011) "Detection of known and novel adenoviruses in cattle wastes via broad-spectrum primers", *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), pp. 5001-5008. doi:10.1128/AEM.00625-11.
- Simas, P. V. M., Barnabé, A. C. de S., Durães-Carvalho, R., Neto, D. F. de L., Caserta, L. C., Artacho, L., Jacomassa, F. A. F., Martini, M. C., dos Santos, M. M. A. B., Felipe, P. A. N., Ferreira, H. L. y Arns, C. W. (2015) "Bat Coronavirus in Brazil Related to Appalachian Ridge and Porcine Epidemic Diarrhea Viruses", *Emerging Infectious Diseases*, 21(4), pp. 729-731. doi:10.3201/eid2104.141783 To.
- Singh, F., Rajukumar, K., Senthilkumar, D., Venkatesh, G., Srivastava, D., Kombiah, S., Jhade, S. K. y Singh, V. P. (2022) "First report on co-isolation and whole-genomic characterisation of mammalian orthorubulavirus 5 and mammalian orthoreovirus type 3 from domestic pigs in India", *Archives of Virology*, 167(7), pp. 1529-1545. doi:10.1007/s00705-022-05459-x.
- Sinha, A., Gauger, P., Zhang, J., Yoon, K. J. y Harmon, K. (2015) "PCR-based retrospective evaluation of diagnostic samples for emergence of porcine deltacoronavirus in US swine", *Veterinary Microbiology*, 179(3-4), pp. 296-298. doi:10.1016/j.vetmic.2015.06.005.
- Sitjar, M. (2000) "Enfermedades entéricas en porcino", *Información Veterinaria*, 213, pp. 35-40.
- Smitalova, R., Rodak, L., Smid, B. y Psikal, I. (2009) "Detection of nongroup A rotaviruses in faecal samples of pigs in the Czech Republic", *Veterinarni Medicina*, 54(1), pp. 12-18. doi:10.17221/3081-VETMED.
- Song, D., Moon, H. y Kang, B. (2015) "Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines", *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 4(2), p. 166. doi:10.7774/cevr.2015.4.2.166.

- Song, D. y Park, B. (2012) "Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines", *Virus Genes*, 44(2), pp. 167-175. doi:10.1007/s11262-012-0713-1.
- Stamelou, E., Giantsis, I. A., Papageorgiou, K. V., Petridou, E., Davidson, I., Polizopoulou, Z. S., Papa, A. y Kritas, S. K. (2022) "Epidemiology of Astrovirus, Norovirus and Sapovirus in Greek pig farms indicates high prevalence of Mamastrovirus suggesting the potential need for systematic surveillance", *Porcine Health Management*, 8(1), pp. 1-15. doi:10.1186/s40813-021-00245-8.
- Stevenson, G. W., Hoang, H., Schwartz, K. J., Burrough, E. R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V. L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B. J., Koster, L. G., Killian, M. L. y Yoon, K. J. (2013) "Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: Clinical signs, lesions, and viral genomic sequences", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(5), pp. 649-654. doi:10.1177/1040638713501675.
- Steyer, A., Gutiérrez-Aguire, I., Kolenc, M., Koren, S., Kutnjak, D., Pokorn, M., Poljsak-Prijatelj, M., Racki, N., Ravnikar, M., Sagadin, M., Steyer, A. F. y Toplak, N. (2013) "High similarity of novel orthoreovirus detected in a child hospitalized with acute gastroenteritis to mammalian orthoreoviruses found in bats in Europe", *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), pp. 3818-3825. doi:10.1128/JCM.01531-13.
- Su, M., Qi, S., Yang, D., Guo, D., Yin, B. y Sun, D. (2020) "Coinfection and Genetic Characterization of Porcine Astrovirus in Diarrheic Piglets in China From 2015 to 2018", *Frontiers in Veterinary Science*, 7(August), pp. 3-6. doi:10.3389/fvets.2020.00462.
- Sun, H., Lan, D., Lu, L., Chen, M., Wang, C. y Hua, X. (2014) "Molecular characterization and phylogenetic analysis of the genome of porcine torovirus", *Archives of Virology*, 159(4), pp. 773-778. doi:10.1007/s00705-013-1861-x.
- Suzuki, T. y Inoue, D. (2018) "Full genome-based genotyping system for rotavirus H and detection of potential gene recombination in nonstructural protein 3 between porcine rotavirus H and rotavirus C", *Journal of General Virology*, 99(12), pp. 1582-1589. doi:10.1099/jgv.0.001162.
- Theil, K. W., Saif, L. J., Moorhead, P. D. y Whitmoyer, R. E. (1985) "Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): Characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs", *Journal of Clinical Microbiology*, 21(3), pp. 340-345. doi:10.1128/jcm.21.3.340-345.1985.

- Theuns, S., Conceição-Neto, N., Christiaens, I., Zeller, M., Desmarets, L. M. B., Roukaerts, I. D. M., Acar, D. D., Heylen, E., Matthijssens, J. y Nauwynck, H. J. (2015) "Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015", *Genome Announcements*, 3(3), pp. e00506-15. doi:10.1128/genomeA.00506-15.
- Theuns, S., Vyt, P., Desmarets, L. M. B., Roukaerts, I. D. M., Heylen, E., Zeller, M., Matthijssens, J. y Nauwynck, H. J. (2016) "Presence and characterization of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets", *Virus Research*, 213, pp. 172-183. doi:10.1016/j.virusres.2015.12.004.
- Thimmasandra Narayanappa, A., Sooryanarain, H., Deventhiran, J., Cao, D., Ammayappan Venkatachalam, B., Kambiranda, D., LeRoith, T., Heffron, C. L., Lindstrom, N., Hall, K., Jobst, P., Sexton, C., Meng, X.-J. y Elankumaran, S. (2015) "A novel pathogenic Mammalian orthoreovirus from diarrheic pigs and Swine blood meal in the United States.", *mBio*, 6(3), pp. e00593-15. doi:10.1128/mBio.00593-15.
- Thomas, J. T., Chen, Q., Gauger, P. C., Giménez-Lirola, L. G., Sinha, A., Harmon, K. M., Madson, D. M., Burrough, E. R., Magstadt, D. R., Salzbrenner, H. M., Welch, M. W., Yoon, K. J., Zimmerman, J. J. y Zhang, J. (2015) "Effect of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infectious Doses on Infection Outcomes in Naïve Conventional Neonatal and Weaned Pigs", *PLoS ONE*, 10(10), p. e0139266. doi:10.1371/journal.pone.0139266.
- Trudeau, M. P., Verma, H., Sampedro, F., Urriola, P. E., Shurson, G. C., McKelvey, J., Pillai, S. D. y Goyal, S. M. (2016) "Comparison of thermal and non-thermal processing of swine feed and the use of selected feed additives on inactivation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)", *PLoS ONE*, 11(6), pp. 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0158128.
- Ulloa, J. C., Olarte-Aponte, A. M., Ospina, J. C. y Rincon, M. A. (2019) "Experimental infection of conventional newly-weaned piglets with porcine astrovirus", *Acta Virologica*, 63(1), pp. 96-102. doi:10.4149/av_2019_112.
- Underdahl, N. R., Mebus, C. A. y Torres-Medina, A. (1975) "Recovery of transmissible gastroenteritis virus from chronically infected experimental pigs", *American Journal of Veterinary Research*, 36(10), pp. 1473-1476.

- Valkó, A., Albert, E., Cságola, A., Varga, T., Kiss, K., Farkas, R., Rónai, Z., Biksi, I. y Dán, Á. (2019) "Isolation and characterisation of porcine epidemic diarrhoea virus in Hungary – Short communication", *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(2), pp. 307-313. doi:10.1556/004.2019.031.
- Valkó, A., Biksi, I., Cságola, A., Tuboly, T., Kiss, K., Ursu, K. y Dán, Á. (2017) "Porcine epidemic diarrhoea virus with a recombinant S gene detected in Hungary, 2016", *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(2), pp. 253-261. doi:10.1556/004.2017.025.
- Valkó, A., Marosi, A., Cságola, A., Farkas, R., Rónai, Z. y Dán, Á. (2019) "Frequency of diarrhoea-associated viruses in swine of various ages in Hungary", *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(1), pp. 140-150. doi:10.1556/004.2019.016.
- Verma, H., Mor, S. K., Abdel-Glil, M. Y. y Goyal, S. M. (2013) "Identification and molecular characterization of porcine kobuvirus in U. S. swine", *Virus Genes*, 46(3), pp. 551-553. doi:10.1007/s11262-013-0879-1.
- Vidal, A., Clilverd, H., Cortey, M., Martín-Valls, G. E., Franzo, G., Darwich, L., Martín, M. y Mateu, E. (2018) "Full-genome characterization by deep sequencing of rotavirus A isolates from outbreaks of neonatal diarrhoea in pigs in Spain", *Veterinary Microbiology* 227, pp. 12-19. doi:10.1016/J.VETMIC.2018.10.002.
- Vidal, A., Martín-valls, G. E., Tello, M., Mateu, E. y Martín, M. (2019) "Prevalence of enteric pathogens in diarrheic and non-diarrheic samples from pig farms with neonatal diarrhea in the North East of Spain", *Veterinary Microbiology*, 237, p. 108419. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108419.
- Vlasova, A. N., Amimo, J. O. y Saif, L. J. (2017) "Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies", *Viruses*, 9(3), pp. 1-27. doi:10.3390/v9030048.
- Vlasova, A., Wang, Q., Jung, K., Langel, S., Malik, YS y Saif, L. (2020) "Porcine Coronaviruses", en Malik, Y., Singh, R., y Yadav, M. (eds.) *Emerging and Transboundary Animal Viruses . Livestock Diseases and Management*. 1.^a ed. Singapore: Springer, pp. 79-110. doi:10.1007/978-981-15-0402-0_4.
- Wakuda, M., Ide, T., Sasaki, J., Komoto, S., Ishii, J., Sanekata, T. y Taniguchi, K. (2011) "Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses", *Emerging Infectious Diseases*, 17(8), pp. 1491-1493. doi:10.3201/eid1708.101466.

- Wang, B., Liu, Y., Ji, C.-M., Yang, Y.-L., Liang, Q.-Z., Zhao, P., Xu, L.-D., Lei, X.-M., Luo, W.-T., Qin, P., Zhou, J. y Huang, Y.-W. (2018) "Porcine Deltacoronavirus Engages the Transmissible Gastroenteritis Virus Functional Receptor Porcine Aminopeptidase N for Infectious Cellular Entry", *Journal of Virology*, 92(12), pp. 1-13. doi:10.1128/jvi.00318-18.
- Wang, L., Byrum, B. y Zhang, Y. (2014) "Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014.", *Emerging infectious diseases*, 20(7), pp. 1227-30. doi:10.3201/eid2007.140296.
- Wang, L., Fu, S., Cao, L., Lei, W., Cao, Y., Song, J., Tang, Q., Zhang, H., Feng, Y., Yang, W. y Liang, G. (2015) "Isolation and identification of a natural reassortant mammalian orthoreovirus from least horseshoe bat in China", *PLoS ONE*, 10(3), pp. 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0118598.
- Wang, P., Zhu, J., Liu, X., Guo, J., Gu, X. y Ruan, W. (2019) "Isolation and recombinant analysis of variants of porcine epidemic diarrhea virus strains from Beijing, China", *VirusDisease*, 30(2), pp. 294-301. doi:10.1007/s13337-019-00513-w.
- Wang, Y. W., Yue, H., Fang, W. y Huang, Y. W. (2015) "Complete genome sequence of porcine deltacoronavirus strain CH/Sichuan/S27/2012 from mainland China", *Genome Announcements*, 3(5), pp. 5-6. doi:10.1128/genomeA.00945-15.
- Weiss, M., Steck, F. y Horzinek, M. C. (1983) "Purification and partial characterization of a new enveloped RNA virus (Berne virus).", *The Journal of general virology*, 64, pp. 1849-1858. doi:10.1099/0022-1317-64-9-1849.
- Werid, G. M., Ibrahim, Y. M., Chen, H., Fu, L. y Wang, Y. (2022) "Molecular Detection and Genetic Characterization of Potential Zoonotic Swine Enteric Viruses in Northern China", *Pathogens*, 11(4), pp. 28-30. doi:10.3390/pathogens11040417.
- Wills, R. W. (2000) "Diarrhea in growing-finishing swine.", *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 16(1), pp. 135-161. doi:10.1016/S0749-0720(15)30140-7.
- Wohlgemuth, N., Honce, R. y Schultz-cherry, S. (2019) "Astrovirus evolution and emergence", *Infection, Genetics and Evolution*, 69, pp. 30-37. doi:10.1016/j.meegid.2019.01.009.

- Wolf, S., Hewitt, J. y Greening, G. E. (2010) "Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination", *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), pp. 1388-1394. doi:10.1128/AEM.02249-09.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H. y Yuen, K.-Y. (2012) "Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus", *Journal of Virology*, 86(7), pp. 3995-4008. doi:10.1128/jvi.06540-11.
- Woode, G. N., Reed, D. E., Runnels, P. L., Herrig, M. A. y Hill, H. T. (1982) "Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves", *Veterinary Microbiology*, 7, pp. 221-240.
- Woods, R. D. y Wesley, R. D. (1998) "Transmissible gastroenteritis coronavirus carrier sow", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 440, pp. 641-647. doi:10.1007/978-1-4615-5331-1_83.
- Xiao, C. T., Giménez-Lirola, L. G., Gerber, P. F., Jiang, Y. H., Halbur, P. G. y Opriessnig, T. (2013) "Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types", *Journal of General Virology*, 94(3), pp. 570-582. doi:10.1099/vir.0.048744-0.
- Xu, Z., Zhang, Y., Gong, L., Huang, L., Lin, Y., Qin, J., Du, Y., Zhou, Q., Xue, C. y Cao, Y. (2018) "Isolation and characterization of a highly pathogenic strain of Porcine enteric alphacoronavirus causing watery diarrhoea and high mortality in newborn piglets", *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), pp. 119-130. doi:10.1111/tbed.12992.
- Yang, X. Lou, Tan, B., Wang, B., Li, W., Wang, N., Luo, C. M., Wang, M. N., Zhang, W., Li, B., Peng, C., Ge, X. Y., Zhang, L. B. y Shi, Z. L. (2015) "Isolation and identification of bat viruses closely related to human, porcine and mink orthoreoviruses", *Journal of General Virology*, 96(12), pp. 3525-3531. doi:10.1099/jgv.0.000314.

- Yang, Y.-L., Qin, P., Wang, B., Liu, Y., Xu, G.-H., Peng, L., Zhou, J., Zhu, S. J. y Huang, Y. W. (2019) "Broad Cross-Species Infection of Cultured Cells by Bat HKU2-Related Swine Acute Diarrhea Syndrome Coronavirus and Identification of Its Replication in Murine Dendritic Cells In Vivo Highlight Its Potential for Diverse Interspecies Transmission", *Journal of Virology*, 93(24), pp. 1-17. doi:10.1128/jvi.01448-19.
- Yang, Y., Yu, J. y Huang, Y. (2020) "Swine enteric alphacoronavirus (swine acute diarrhea syndrome coronavirus): An update three years after its discovery", *Virus Research*, 285, p. 198024. doi:10.1016/j.virusres.2020.198024.
- Ye, X., Chen, Y., Zhu, X., Guo, J., Xie, D., Hou, Z., Xu, S., Zhou, J., Fang, L., Wang, D. y Xiao, S. (2020) "Cross-species transmission of deltacoronavirus and the origin of porcine deltacoronavirus", *Evolutionary Applications*, 13, pp. 2246-2253. doi:10.1111/eva.12997.
- Zentkovich, M. M., Nelson, S. W., Stull, J. W., Nolting, J. M. y Bowman, A. S. (2016) "Inactivation of porcine epidemic diarrhea virus using heated water", *Veterinary and Animal Science*, 1-2, pp. 1-3. doi:10.1016/j.vas.2016.09.001.
- Zhang, C., Liu, L., Wang, P., Liu, S., Lin, W., Hu, F., Wu, W., Chen, W. y Cui, S. (2011) "A potentially novel reovirus isolated from swine in northeastern China in 2007", *Virus Genes*, 43(3), pp. 342-349. doi:10.1007/s11262-011-0642-4.
- Zhang, J. (2016) "Porcine deltacoronavirus: Overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution", *Virus Research*, 226, pp. 71-84. doi:10.1016/j.virusres.2016.05.028.
- Zhang, Q., Hu, R., Tang, X., Wu, C., He, Q., Zhao, Z., Chen, H. y Wu, B. (2013) "Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China", *Archives of Virology*, 158(8), pp. 1631-1636. doi:10.1007/s00705-013-1659-x.
- Zhang, X., Zhu, Y., Zhu, X., Shi, H., Chen, J., Shi, D., Yuan, J., Cao, L., Liu, J., Dong, H., Jing, Z., Zhang, J., Wang, X. y Feng, L. (2017) "Identification of a natural recombinant transmissible gastroenteritis virus between Purdue and Miller clusters in China: Emerging of a natural recombinant TGEV in China", *Emerging Microbes and Infections*, 6(1), pp. 1-10. doi:10.1038/emi.2017.62.

- Zhou, L., Li, Q. N., Su, J. N., Chen, G. H., Wu, Z. X., Luo, Y., Wu, R. T., Sun, Y., Lan, T. y Ma, J. Y. (2019) "The re-emerging of SADS-CoV infection in pig herds in Southern China", *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), pp. 2180-2183. doi:10.1111/tbed.13270.
- Zhou, L., Wei, H., Zhou, Y., Xu, Z., Zhu, L. y Horne, J. (2014) "Molecular epidemiology of Porcine torovirus (PToV) in Sichuan Province, China: 2011-2013", *Virology Journal*, 11(1), pp. 1-9. doi:10.1186/1743-422X-11-106.
- Zhou, P., Fan, H., Lan, T., Yang, X. Lou, Shi, W. F., Zhang, W., Zhu, Y., Zhang, Y. W., Xie, Q. M., Mani, S., Zheng, X. S., Li, B., Li, J. M., Guo, H., Pei, G. Q., An, X. P., Chen, J. W., Zhou, L., Mai, K. J., Wu, Z. X., Li, D., Anderson, D. E., Zhang, L. B., Li, S. Y., Mi, Z. Q., He, T. T., Cong, F., Guo, P. J., Huang, R., Luo, Y., Liu, X. L., Chen, J., Huang, Y., Sun, Q., Zhang, X. L. L., Wang, Y. Y., Xing, S. Z., Chen, Y. S., Sun, Y., Li, J., Daszak, P., Wang, L. F., Shi, Z. L., Tong, Y. G. y Ma, J. Y. (2018) "Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin", *Nature*, 556(7700), pp. 255-259. doi:10.1038/s41586-018-0010-9.
- Zhou, W., Ullman, K., Chowdry, V., Reining, M., Benyeda, Z., Baule, C., Juremalm, M., Wallgren, P., Schwarz, L., Zhou, E., Pedrero, S. P., Hennig-Pauka, I., Segales, J. y Liu, L. (2016) "Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five European countries", *Veterinary Microbiology*, 182, pp. 75-81. doi:10.1016/j.vetmic.2015.10.019.
- Zhou, X., Zhang, T., Song, D., Huang, T., Peng, Q., Chen, Y., Li, A., Zhang, F., Wu, Q., Ye, Y. y Tang, Y. (2017) "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", *Molecular and Cellular Probes*, 33, pp. 36-41. doi:10.1016/j.mcp.2017.02.002.
- Zhou, Y., Chen, L., Zhu, L. y Xu, Z. (2013) "Molecular detection of porcine torovirus in piglets with diarrhea in southwest China", *The Scientific World Journal*, 2013. doi:10.1155/2013/984282.
- Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G. W. y Zhang, J. (2019) *Diseases of Swine*. 11.^a ed. Hoboken: John Wiley & Sons. doi:10.1002/9781119350927.

Capítulo 11: Anexos

Anexo I: Información adicional de la Publicación I

Supplementary data 1. Comparison of S1 amino acid sequences of PEDV isolates from this study with those of reference strains (GenBank accession nos. AF353511, KJ399978 and KY019623). Amino acid sequence variations in three major epitope regions (aa 220-233, aa 770-776, and aa 784-792) in the S1 genes of 41 Spanish PEDV strains.

		aa220 to aa233	aa770 to aa776	aa784 to aa792
INDEL 1	PEDV_Belgium_1977_(AF353511)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQYGGQVKI
INDEL 2	PEDV_USA_2014_(KJ399978)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2	PEDV_Slovenia_2015_(KY019623)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.1	PEDV_SP-VC55_Spain_2018_(MW251355)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.1	PEDV_SP-VC87_Spain_2019_(MW251363)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQFGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC27_Spain_2017_(MW251348)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC29_Spain_2017_(MW251349)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC51_Spain_2018_(MN692788)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC52_Spain_2018_(MW251351)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC77_Spain_2018_(MW251361)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC81_Spain_2018_(MW251362)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC89_Spain_2019_(MW251367)	FAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC90_Spain_2019_(MW251368)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC92_Spain_2019_(MW251369)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC94_Spain_2019_(MW251371)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC97_Spain_2019_(MW251374)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC96_Spain_2019_(MW251373)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC98_Spain_2019_(MW251375)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC99_Spain_2019_(MW251376)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC100_Spain_2019_(MN692791)	CAMQYVYTPTYYML	SNICVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.2	PEDV_SP-VC101_Spain_2019_(MW251377)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC2_Spain_2017_(MN692784)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC3_Spain_2017_(MW251343)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC4_Spain_2017_(MW251344)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC16_Spain_2017_(MW251345)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC19_Spain_2017_(MW251347)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC18_Spain_2017_(MW251346)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC46_Spain_2018_(MW251350)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC53_Spain_2018_(MW251352)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC54_Spain_2018_(MW251354)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC57_Spain_2018_(MN692789)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC61_Spain_2018_(MW251356)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC62_Spain_2018_(MN692790)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC63_Spain_2018_(MW251357)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC66_Spain_2018_(MW251358)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC68_Spain_2018_(MW251359)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	LSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC75_Spain_2018_(MW251360)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC93_Spain_2019_(MW251370)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VC95_Spain_2019_(MW251372)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_POR-VC102_Portugal_2019_(MW251378)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VT13_Spain_2018_(MW251353)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VT86_Spain_2018_(MW251364)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VT87_Spain_2019_(MW251365)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI
INDEL 2.3	PEDV_SP-VT108_Spain_2019_(MW251366)	CAMQYVYTPTYYML	SNIGVCK	PSQSGQVKI

Anexo II: Información adicional de la Publicación II

APPENDIX A: Nucleotide identities of different RVH genotypes for each genomic segments.

VP7	Genotype (86%)	RVH-SP-VC18	RVH-SP-VC19H	RVH-SP-VC29H	RVH-SP-VC36	AB5766 27.1	DQ1139 05.1	DQ1680 34.1	KM3594 85.1	KM3594 82.1	KM3594 87.1	KT9620 32.1	KU2545 83.2	MH2301 24.1	LC3484 70.1	LC4162 63.1	KX3625 53.1	KX3625 42.1	LC3484 63.1	LC3484 66.1	LC4162 74.1	LC4162 54.1	LC3484 69.1	MG6931 62.1
RVH-SP-VC18	G3																							
RVH-SP-VC19H	G3	0,974																						
RVH-SP-VC29H	GX	0,820	0,825																					
RVH-SP-VC36	GX	0,834	0,821	0,882																				
AB57662 7.1	G1	0,778	0,781	0,824	0,802																			
DQ11390 5.1	G2	0,491	0,439	0,539	0,486	0,508																		
DQ16803 4.1	G2	0,487	0,438	0,541	0,498	0,500	0,939																	
KM35948 5.1	G3	0,880	0,877	0,806	0,818	0,786	0,517	0,517																
KM35948 2.1	G3	0,878	0,875	0,804	0,817	0,775	0,505	0,505																
KM35948 7.1	G4	0,751	0,733	0,828	0,810	0,856	0,493	0,501	0,792	0,783														
KT962032 .1	G4	0,780	0,765	0,844	0,842	0,845	0,499	0,494	0,793	0,789	0,870													
KU25458 3.2	G5	0,834	0,834	0,847	0,832	0,792	0,512	0,520	0,801	0,798	0,785	0,801												
MH23012 4.1	G5	0,822	0,817	0,826	0,805	0,786	0,495	0,501	0,801	0,798	0,779	0,786	0,935											
LC348470 .1	G5	0,831	0,818	0,850	0,832	0,788	0,495	0,506	0,799	0,799	0,784	0,801	0,925	0,912										
LC416263 .1	G5	0,828	0,798	0,824	0,801	0,780	0,506	0,519	0,806	0,803	0,769	0,809	0,911	0,903	0,914									
KX362553 .1	G6	0,768	0,739	0,780	0,797	0,822	0,476	0,502	0,770	0,763	0,802	0,814	0,785	0,771	0,771	0,772								
KX362542 .1	G6	0,768	0,744	0,785	0,793	0,825	0,483	0,503	0,783	0,776	0,807	0,816	0,783	0,773	0,772	0,764	0,968							
LC348463 .1	G7	0,768	0,755	0,797	0,801	0,857	0,467	0,478	0,775	0,776	0,827	0,849	0,778	0,765	0,779	0,764	0,808	0,804						
LC348466 .1	G8	0,744	0,732	0,721	0,710	0,708	0,477	0,468	0,758	0,754	0,738	0,758	0,731	0,719	0,744	0,723	0,733	0,737	0,713					
LC416274 .1	G9	0,752	0,742	0,797	0,799	0,828	0,502	0,500	0,785	0,782	0,815	0,823	0,776	0,759	0,771	0,751	0,813	0,809	0,823	0,714				
LC416254 .1s	G9	0,723	0,694	0,783	0,792	0,808	0,491	0,491	0,778	0,777	0,803	0,817	0,756	0,744	0,764	0,741	0,816	0,808	0,808	0,721	0,961			
LC348469 .1	G10	0,786	0,754	0,768	0,756	0,756	0,459	0,462	0,772	0,772	0,733	0,777	0,821	0,815	0,809	0,800	0,747	0,743	0,755	0,711	0,728	0,703		
MG69316 2.1	G?	0,226	0,159	0,167	0,180	0,210	0,193	0,135	0,206	0,190	0,192	0,227	0,242	0,246	0,213	0,223	0,199	0,216	0,151	0,172	0,164	0,160	0,171	

VP4	Genotype (86%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	RVH-VC29	RVH-VC36	MH23011 9.1	AB57662 5.1	KU25459 0.2	KM35948 8.1	KM3594 91	EF453358 .1	DQ11389 9.1	KT962030 .1	KX36251 6.1	KX36254 0.1	LC416252 .1	LC416272 .1	KX36255 1.1	LC348479 .1	LC348481 .1	MG69316 0.1	
RVH-VC18H	P1																					
RVH-VC19H	P1	0,951																				
RVH-VC29	P3	0,834	0,840																			
RVH-VC36	P3	0,832	0,857	0,895																		
MH23011 9.1	P1	0,827	0,836	0,817	0,832																	
AB57662.1	P1	0,822	0,823	0,841	0,817	0,854																
KU254590.2	P1	0,868	0,873	0,829	0,829	0,909	0,861															
KM359488.1	P1	0,826	0,828	0,833	0,824	0,874	0,873	0,878														
KM359491.1	P1	0,827	0,829	0,832	0,824	0,874	0,872	0,878														
EF453358.1	P2	0,534	0,544	0,557	0,553	0,518	0,496	0,516	0,511	0,510												
DQ113899.1	P2	0,525	0,525	0,553	0,540	0,501	0,480	0,498	0,502	0,501	0,914											
KT962030.1	P3	0,837	0,845	0,886	0,884	0,832	0,840	0,830	0,840	0,840	0,529	0,512										
KX362516.1	P4	0,803	0,814	0,833	0,831	0,805	0,817	0,811	0,808	0,807	0,506	0,497	0,854									
KX362540.1	P4	0,807	0,817	0,840	0,838	0,811	0,818	0,814	0,812	0,811	0,516	0,513	0,854	0,970								
LC416252.1	P5	0,780	0,782	0,792	0,804	0,781	0,781	0,776	0,787	0,787	0,522	0,508	0,797	0,784	0,787							
LC416272.1	P5	0,790	0,792	0,809	0,814	0,795	0,811	0,786	0,800	0,799	0,526	0,514	0,819	0,800	0,799	0,953						
KX362551.1	P5	0,789	0,793	0,802	0,808	0,789	0,791	0,786	0,793	0,792	0,524	0,505	0,814	0,796	0,794	0,915	0,912					
LC348479.1	P6	0,803	0,793	0,828	0,822	0,800	0,805	0,799	0,818	0,818	0,502	0,488	0,829	0,799	0,800	0,790	0,805	0,800				
LC348481.1	P6	0,815	0,806	0,833	0,838	0,810	0,819	0,814	0,837	0,837	0,520	0,509	0,842	0,812	0,817	0,804	0,816	0,801	0,922			
MG69316 0.1	P?	0,349	0,354	0,314	0,317	0,338	0,333	0,345	0,336	0,337	0,544	0,524	0,348	0,351	0,349	0,378	0,370	0,373	0,337	0,353		

VP6	Genotipo (87%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	RVH-VC29	RVH-VC36	MH2301 21.1	LC4162 53.1	LC4162 73.1	AB5766 26.1	KU2545 87.2	DQ1139 02.1	AY6320 80.1	DQ1680 33.1	KT9620 31.1	KF0216 19.1	KM3594 79.1	KX3625 17.1	KX3625 41.1	LC3484 74.1	LC3484 71.1	KX3625 52.1	KX3625 28.1	LC3484 78.1	MG6931 61.1
RVH-VC18H	I3																							
RVH-VC19H	I3	0,896																						
RVH-VC29	I3	0,874	0,881																					
RVH-VC36	I3	0,861	0,865	0,910																				
MH2301 21.1	I1	0,863	0,866	0,841	0,834																			
LC41625 3.1	I1	0,828	0,855	0,823	0,824	0,881																		
LC41627 3.1	I1	0,846	0,857	0,832	0,830	0,891	0,899																	
AB57662 6.1	I1	0,842	0,863	0,829	0,828	0,911	0,896	0,909																
KU25458 7.2	I1	0,868	0,874	0,841	0,835	0,953	0,881	0,897	0,916															
DQ1139 02.1	I2	0,640	0,652	0,634	0,617	0,640	0,626	0,639	0,662	0,652														
AY63208 0.1	I2	0,640	0,652	0,634	0,617	0,638	0,626	0,636	0,659	0,649	0,998													
DQ1680 33.1	I2	0,630	0,639	0,634	0,623	0,644	0,627	0,640	0,649	0,652	0,937	0,937												
KT96203 1.1	I3	0,876	0,882	0,861	0,861	0,859	0,841	0,856	0,854	0,860	0,654	0,652	0,638											
KF02161 9.1	I3	0,872	0,883	0,865	0,862	0,841	0,834	0,839	0,835	0,837	0,632	0,632	0,630	0,938										
KM3594 79.1	I3	0,872	0,883	0,866	0,862	0,842	0,833	0,839	0,836	0,837	0,631	0,631	0,630	0,937	0,835									
KX36251 7.1	I4	0,857	0,846	0,839	0,815	0,827	0,830	0,830	0,833	0,835	0,628	0,626	0,628	0,855	0,835	0,835								
KX36254 1.1	I4	0,860	0,854	0,848	0,832	0,831	0,827	0,835	0,839	0,843	0,643	0,641	0,638	0,858	0,841	0,840	0,964							
LC34847 4.1	I5	0,858	0,874	0,848	0,842	0,849	0,840	0,833	0,845	0,844	0,652	0,652	0,643	0,872	0,853	0,852	0,844	0,839						
LC34847 1.1	I5	0,857	0,869	0,845	0,841	0,846	0,835	0,832	0,844	0,847	0,657	0,657	0,647	0,864	0,851	0,850	0,840	0,841	0,978					
KX36255 2.	I5	0,864	0,885	0,852	0,837	0,855	0,825	0,843	0,853	0,856	0,659	0,656	0,652	0,870	0,861	0,860	0,860	0,862	0,933	0,932				
KX36252 8.1	I5	0,864	0,883	0,848	0,839	0,848	0,821	0,837	0,848	0,852	0,653	0,652	0,648	0,864	0,859	0,858	0,857	0,861	0,930	0,929	0,995			
LC34847 8.1	I6	0,851	0,861	0,855	0,840	0,838	0,845	0,827	0,842	0,844	0,618	0,618	0,619	0,848	0,837	0,836	0,840	0,844	0,853	0,854	0,850	0,845		
MG6931 61.1	I7	0,459	0,481	0,471	0,465	0,491	0,475	0,475	0,491	0,491	0,527	0,523	0,528	0,477	0,449	0,451	0,464	0,490	0,479	0,475	0,480	0,474	0,467	

VP1	Genotipo (85%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	RVH-VC29	RVH-VC36	MH230116.1	LC416249.1	LC416269.1	AB576629.1	KU254592.2	EF453355.1	DQ113897.1	KT962027.1	KX362548.1	KX362537.1	MG693157.1
RVH-VC18H	R1															
RVH-VC19H	R1	0,954														
RVH-VC29	R3	0,900	0,870													
RVH-VC36	R3	0,904	0,874	0,936												
MH230116.1	R1	0,862	0,868	0,858	0,855											
LC416249.1	R1	0,829	0,825	0,833	0,827	0,864										
LC416269.1	R1	0,849	0,847	0,852	0,845	0,881	0,844									
AB576629.1	R1	0,856	0,855	0,847	0,843	0,897	0,859	0,874								
KU254592.2	R1	0,896	0,897	0,851	0,855	0,882	0,842	0,859	0,868							
EF453355.1	R2	0,647	0,646	0,650	0,645	0,651	0,640	0,655	0,643	0,640						
DQ113897.1	R2	0,632	0,634	0,637	0,633	0,648	0,631	0,649	0,642	0,632	0,927					
KT962027.1	R3	0,861	0,862	0,867	0,868	0,869	0,827	0,844	0,847	0,849	0,647	0,648				
KX362548.1	R3	0,850	0,847	0,853	0,845	0,856	0,823	0,838	0,836	0,842	0,648	0,643	0,870			
KX362537.1	R3	0,848	0,850	0,850	0,847	0,858	0,819	0,841	0,839	0,845	0,639	0,641	0,874	0,944		
MG693157.1	R?	0,626	0,627	0,627	0,623	0,631	0,618	0,629	0,626	0,621	0,604	0,609	0,624	0,621	0,621	

VP2	Genotipo (87%)	Pig_RVH-VC18H	Pig_RVH-VC19H	Pig_RVH-VC29	Pig_RVH-VC36	MH23011 7.1	LC41624 1.1	LC41624 3.1	AB57663 0.1	KU25459 1.2	DQ11389 8.1	EF45335 6.1	LC41623 9.1	LC41624 2.1	KT96202 8.1	KX36254 9.1	KX36253 8.1	LC41626 0.1	LC41627 0.1	MG69315 8.1	
Pig_RVH-VC18H	C3																				
Pig_RVH-VC19H	C1	0,889																			
Pig_RVH-VC29	C3	0,862	0,847																		
Pig_RVH-VC36	C1	0,844	0,844	0,856																	
MH230117.1	C1	0,850	0,862	0,851	0,868																
LC416241.1	C1	0,846	0,851	0,846	0,866	0,896															
LC416243.1	C1	0,844	0,853	0,840	0,859	0,938	0,874														
AB576630.1	C1	0,858	0,857	0,856	0,855	0,893	0,872	0,878													
KU254591.2	C1	0,860	0,874	0,852	0,873	0,933	0,890	0,911	0,889												
DQ113898.1	C2	0,663	0,713	0,657	0,664	0,666	0,683	0,665	0,658	0,668											
EF453356.1	C2	0,655	0,708	0,661	0,664	0,672	0,675	0,664	0,658	0,671	0,930										
LC416239.1	C3	0,865	0,838	0,840	0,826	0,836	0,837	0,824	0,836	0,830	0,659	0,654									
LC416242.1	C3	0,870	0,844	0,847	0,828	0,842	0,837	0,831	0,840	0,838	0,659	0,657	0,967								
KT962028.1	C3	0,885	0,853	0,864	0,846	0,856	0,852	0,837	0,856	0,853	0,651	0,650	0,873	0,879							
KX362549.1	C3	0,889	0,853	0,871	0,848	0,854	0,860	0,840	0,860	0,855	0,702	0,700	0,929	0,934	0,894						
KX362538.1	C3	0,851	0,842	0,847	0,839	0,842	0,838	0,829	0,846	0,844	0,694	0,687	0,851	0,852	0,880	0,870					
LC416260.1	C4	0,835	0,839	0,834	0,842	0,866	0,864	0,854	0,864	0,867	0,673	0,666	0,819	0,822	0,832	0,848	0,833				
LC416270.1	C4	0,834	0,837	0,833	0,841	0,865	0,862	0,852	0,863	0,863	0,669	0,661	0,816	0,819	0,829	0,845	0,831	0,997			
MG693158.1	C?	0,649	0,680	0,653	0,656	0,648	0,651	0,630	0,645	0,653	0,636	0,643	0,644	0,642	0,639	0,674	0,657	0,642	0,640		

VP3	Genotipo (86%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	RVH-VC29	RVH-VC36	MH230118.1	AB576631.1	KU254588.2	DQ113900.1	EF453357.1	KT962029.1	KX362550.1	KX362539.1	KX362515.1	LC416240.1	LC416261.1	LC416271.1	MG693159.1	
RVH-VC18H	M1																		
RVH-VC19H	M1	0,901																	
RVH-VC29	M3	0,826	0,868																
RVH-VC36	M3	0,816	0,870	0,884															
MH230118.1	M1	0,893	0,856	0,815	0,806														
AB576631.1	M1	0,865	0,849	0,811	0,805	0,892													
KU254588.2	M1	0,937	0,885	0,823	0,815	0,941	0,893												
DQ113900.1	M2	0,513	0,572	0,526	0,505	0,527	0,512	0,515											
EF453357.1	M2	0,650	0,661	0,653	0,632	0,679	0,662	0,653	0,910										
KT962029.1	M3	0,822	0,853	0,858	0,859	0,816	0,819	0,820	0,532	0,669									
KX362550.1	M4	0,800	0,868	0,830	0,827	0,812	0,792	0,804	0,525	0,661	0,827								
KX362539.1	M4	0,781	0,845	0,808	0,805	0,795	0,778	0,782	0,514	0,658	0,804	0,976							
KX362515.1	M5	0,808	0,850	0,829	0,827	0,814	0,803	0,809	0,511	0,657	0,846	0,819	0,800						
LC416240.1	M6	0,819	0,841	0,835	0,810	0,798	0,805	0,809	0,494	0,634	0,818	0,854	0,834	0,813					
LC416261.1	M7	0,836	0,856	0,808	0,800	0,850	0,848	0,857	0,525	0,661	0,808	0,793	0,779	0,796	0,809				
LC416271.1	M7	0,839	0,855	0,808	0,801	0,851	0,850	0,861	0,522	0,667	0,807	0,791	0,777	0,796	0,809	0,995			
MG693159.1	M?	0,540	0,582	0,524	0,510	0,533	0,523	0,533	0,527	0,602	0,528	0,551	0,541	0,547	0,520	0,545	0,542		

NSP1	Genotipo (84%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	PRVH-VC29	RVH-VC36	MH23012 0.1	AB57663 2.1	AY63207 9.1	DQ11390 1.1	DQ16803 2.1	KX36251 9.1	LC34848 2.1	LC34848 3.1	KX36253 1.1	KX36255 4.1	LC34848 8.1	LC34848 9.1	KU25458 9.2	LC41625 5.1	LC41626 4.1	KT96203 3.1	MG69316 3.1	
RVH-VC18H	A6																						
RVH-VC19H	A6	0,935																					
RVH-VC29	A6	0,875	0,887																				
RVH-VC36	A5	0,841	0,853	0,839																			
MH23012 0.1	A5	0,849	0,859	0,849	0,868																		
AB576632 .1	A1	0,838	0,842	0,831	0,836	0,847																	
AY632079 .1	A2	0,369	0,403	0,371	0,410	0,408	0,436																
DQ11390 1.1	A2	0,369	0,403	0,371	0,410	0,408	0,436																
DQ16803 2.1	A2	0,377	0,394	0,365	0,404	0,398	0,434	0,918	0,918														
KX362519 .1	A3	0,799	0,819	0,800	0,830	0,839	0,820	0,395	0,395	0,417													
LC348482 .1	A4	0,793	0,788	0,786	0,829	0,826	0,798	0,397	0,397	0,383	0,790												
LC348483 .1	A4	0,795	0,787	0,782	0,828	0,824	0,797	0,396	0,396	0,381	0,791	0,994											
KX362531 .1	A4	0,819	0,823	0,793	0,848	0,845	0,830	0,415	0,415	0,402	0,824	0,931	0,932										
KX362554 .1	A4	0,814	0,818	0,787	0,844	0,831	0,815	0,417	0,417	0,403	0,810	0,930	0,930	0,998									
LC348488 .1	A5	0,844	0,848	0,839	0,866	0,942	0,839	0,403	0,403	0,403	0,822	0,810	0,809	0,826	0,818								
LC348489 .1	A5	0,844	0,850	0,842	0,869	0,946	0,841	0,403	0,403	0,399	0,823	0,812	0,811	0,828	0,822	0,994							
KU25458 9.2	A5	0,858	0,867	0,855	0,871	0,932	0,848	0,434	0,434	0,420	0,845	0,827	0,826	0,846	0,835	0,927	0,928						
LC416255 .1	A6	0,872	0,886	0,860	0,828	0,845	0,838	0,408	0,408	0,397	0,823	0,809	0,807	0,837	0,827	0,819	0,821	0,842					
LC416264 .1	A6	0,871	0,885	0,861	0,827	0,844	0,839	0,411	0,411	0,400	0,822	0,807	0,806	0,836	0,826	0,818	0,820	0,841	0,998				
KT962033 .1	A6	0,877	0,890	0,884	0,830	0,840	0,849	0,396	0,396	0,408	0,825	0,803	0,804	0,836	0,828	0,826	0,826	0,836	0,912	0,914			
MG69316 3.1	A?	0,208	0,221	0,196	0,219	0,239	0,236	0,206	0,206	0,209	0,171	0,234	0,231	0,240	0,226	0,237	0,230	0,234	0,202	0,199	0,228		

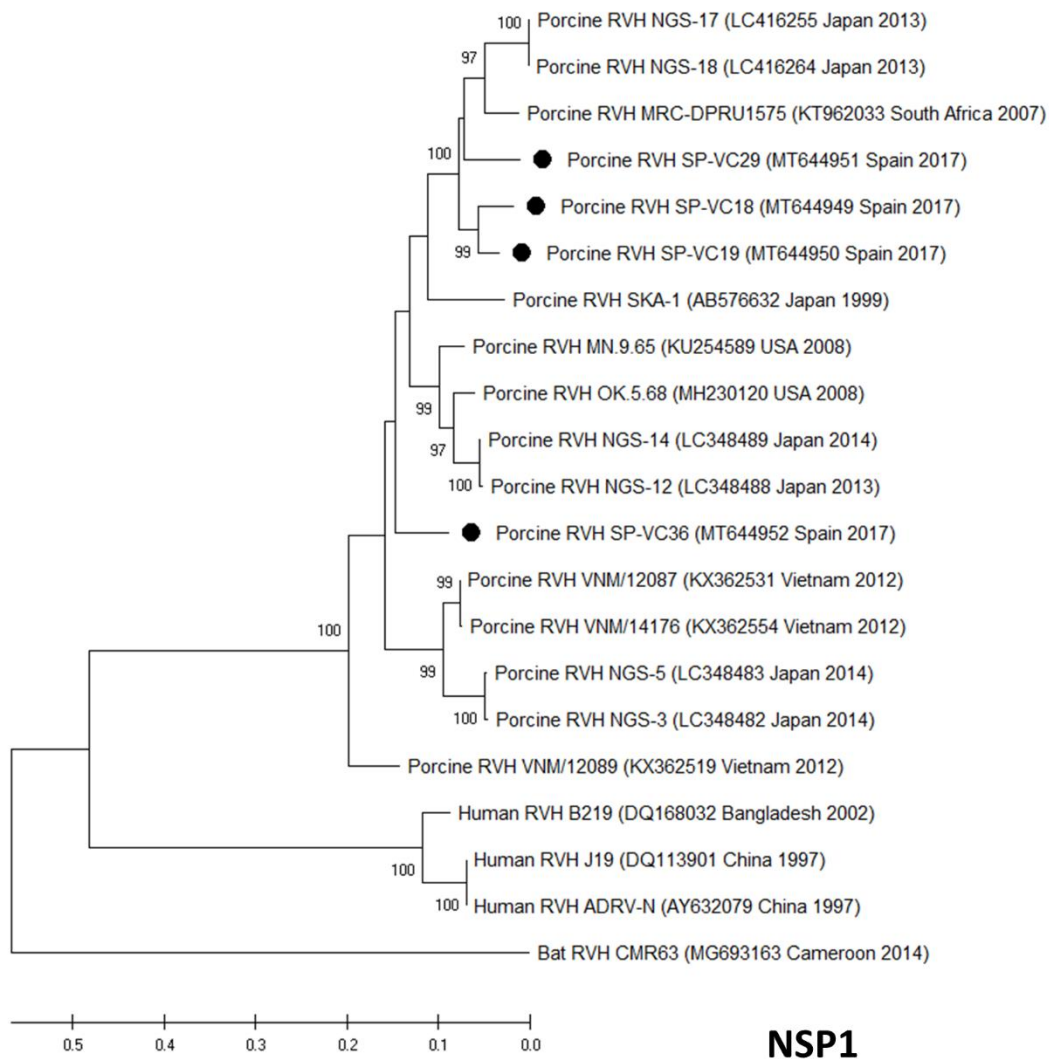
NSP2	Genotipo (67%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	RVH-VC29	RVH-VC36	AB576633.1	LC348499.1	LC416256.1	LC416265.1	KU254586.2	MH230123.1	KT962034.1	KX362555.1	KX362544.1	DQ168035.1	DQ113903.1	MG693164.1
RVH-VC18H	N1																
RVH-VC19H	N1	0,963															
RVH-VC29	N1	0,911	0,910														
RVH-VC36	N1	0,914	0,924	0,911													
AB576633.1	N1	0,902	0,906	0,887	0,889												
LC348499.1	N1	0,878	0,893	0,888	0,873	0,884											
LC416256.1	N1	0,901	0,911	0,890	0,899	0,914	0,883										
LC416265.1	N1	0,903	0,914	0,890	0,902	0,916	0,885	0,997									
KU254586.2	N1	0,898	0,910	0,891	0,886	0,911	0,891	0,900	0,903								
MH230123.1	N1	0,896	0,907	0,894	0,900	0,915	0,893	0,902	0,904	0,927							
KT962034.1	N1	0,879	0,889	0,870	0,865	0,865	0,871	0,881	0,883	0,873	0,881						
KX362555.1	N1	0,893	0,907	0,888	0,884	0,887	0,884	0,895	0,899	0,903	0,911	0,875					
KX362544.1	N1	0,872	0,880	0,864	0,869	0,880	0,883	0,880	0,883	0,893	0,880	0,861	0,879				
DQ168035.1	N2	0,641	0,653	0,653	0,643	0,648	0,648	0,644	0,642	0,649	0,656	0,640	0,640	0,635			
DQ113903.1	N2	0,641	0,649	0,673	0,667	0,654	0,660	0,662	0,658	0,662	0,679	0,658	0,656	0,648	0,917		
MG693164.1	N?	0,584	0,590	0,598	0,608	0,605	0,604	0,608	0,606	0,604	0,608	0,594	0,578	0,593	0,563	0,572	

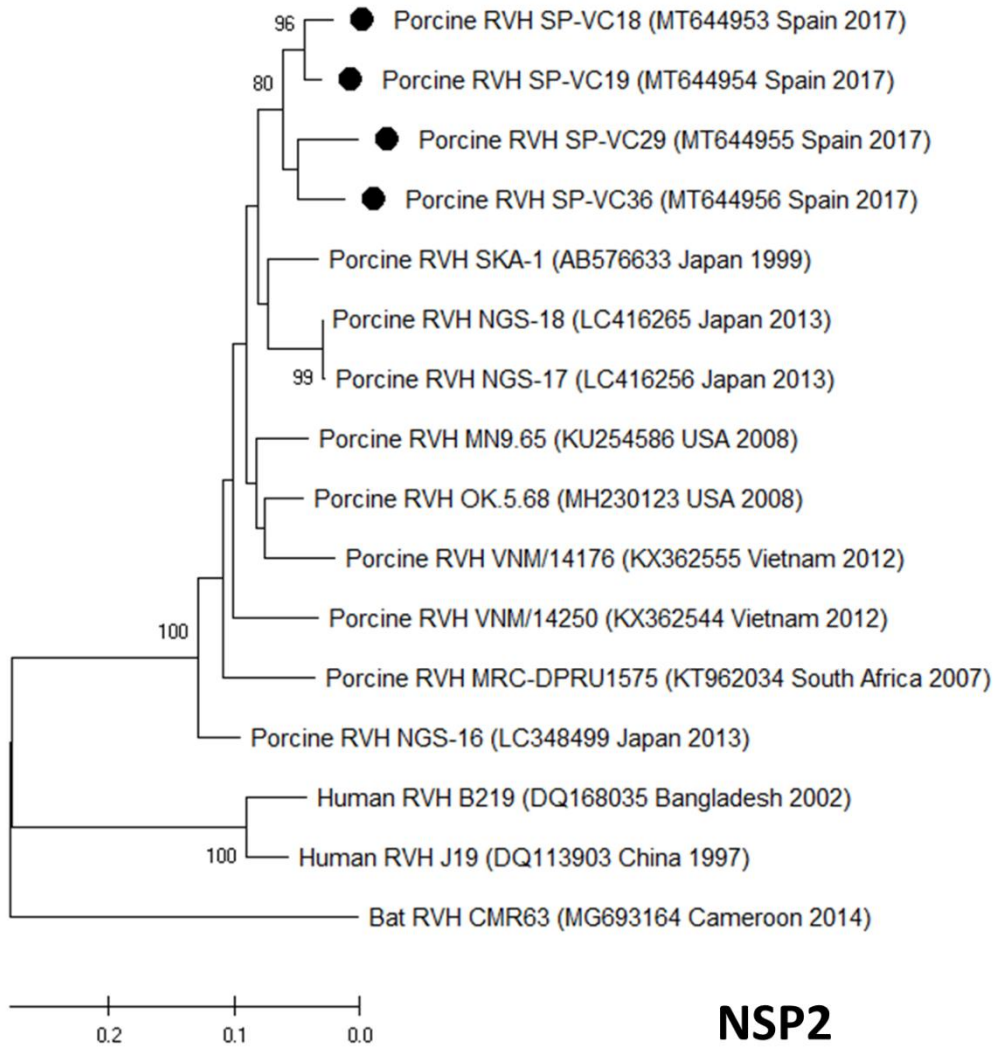
NSP3	Genotipo (87%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	RVH-VC29	RVH-VC36	MH23012 2,1	AB57663 4.1	LC348503 .1	LC416246 .1	KU25458 2.2	KT96203 5.1	DQ11390 4.1	DQ16803 6.1	AY63208 1.1	KX36254 5.1	KX36253 4.1	LC348500 .1	LC348501 .1	LC416266 .1	LC416257 .1	MG69316 5.1	
RVH-VC18H	T1																					
RVH-VC19H	T1	0,961																				
RVH-VC29	T1	0,901	0,921																			
RVH-VC36	T1	0,835	0,837	0,847																		
MH23012 2.1	T1	0,863	0,862	0,879	0,871																	
AB576634. 1	T1	0,852	0,853	0,865	0,861	0,906																
LC348503. 1	T1	0,865	0,859	0,881	0,862	0,911	0,897															
LC416246. 1	T1	0,867	0,847	0,871	0,856	0,902	0,891	0,930														
KU254582. 2	T1	0,896	0,889	0,881	0,881	0,909	0,894	0,891	0,888													
KT962035. 1	T1	0,853	0,840	0,858	0,833	0,898	0,886	0,875	0,883	0,882												
DQ113904 .1	T2	0,544	0,565	0,572	0,558	0,533	0,498	0,526	0,549	0,526	0,520											
DQ168036 .1	T2	0,546	0,569	0,595	0,550	0,527	0,500	0,553	0,556	0,544	0,506	0,871										
AY632081. 1	T2	0,544	0,565	0,572	0,558	0,543	0,503	0,528	0,551	0,532	0,524	0,999	0,865									
KX362545. 1	T3	0,863	0,841	0,840	0,854	0,864	0,837	0,860	0,860	0,870	0,830	0,567	0,541	0,567								
KX362534. 1	T3	0,854	0,838	0,835	0,868	0,864	0,851	0,863	0,856	0,875	0,841	0,581	0,570	0,581	0,961							
LC348500. 1	T3	0,815	0,798	0,807	0,830	0,765	0,773	0,771	0,781	0,778	0,748	0,427	0,425	0,429	0,886	0,892						
LC348501. 1	T3	0,820	0,807	0,824	0,841	0,763	0,773	0,769	0,786	0,773	0,742	0,447	0,433	0,449	0,898	0,897	0,952					
LC416266. 1	T4	0,867	0,853	0,871	0,864	0,912	0,898	0,942	0,939	0,895	0,897	0,527	0,543	0,529	0,862	0,866	0,772	0,770				
LC416257. 1	T4	0,865	0,849	0,870	0,862	0,912	0,893	0,944	0,942	0,895	0,892	0,523	0,539	0,525	0,862	0,861	0,769	0,767	0,993			
MG69316 5.1	T7	0,463	0,532	0,475	0,451	0,427	0,428	0,401	0,405	0,407	0,396	0,379	0,399	0,377	0,410	0,454	0,203	0,206	0,398	0,387		

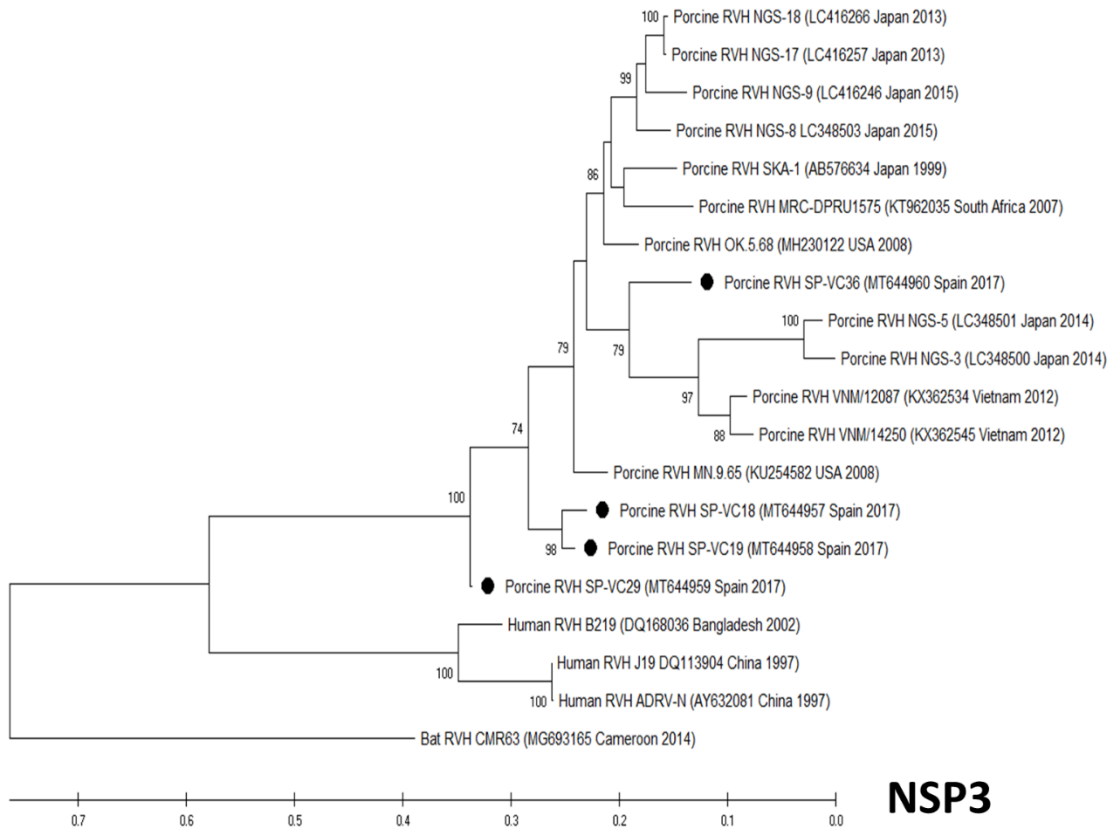
NSP4	Genotipo (83%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	RVH-VC29	RVH-VC36	MH23012 5.1	LC34851 2.1	AB57662 8.1	DQ11390 6.1	EF45335 9.1	KT96203 6.1	KM35949 4.1	KM35949 7.1	KU25458 5.2	KX36253 5.1	KX36254 6.1	LC34851 1.1	LC41625 8.1	KX36255 6.1	KX36252 2.1	MG69316 6.1	
RVH-VC18H	E4																					
RVH-VC19H	E4	0,964																				
RVH-VC29	E3	0,815	0,819																			
RVH-VC36	E4	0,836	0,841	0,848																		
MH23012 5.1	E1	0,787	0,786	0,784	0,785																	
LC34851.1	E1	0,744	0,750	0,766	0,764	0,883																
AB57662.1	E1	0,762	0,763	0,777	0,796	0,876	0,861															
DQ11390.1	E2	0,473	0,386	0,418	0,491	0,473	0,483	0,442														
EF45335.1	E2	0,351	0,329	0,313	0,340	0,418	0,339	0,413	0,900													
KT96203.1	E3	0,811	0,827	0,850	0,841	0,835	0,818	0,794	0,449	0,380												
KM35949.1	E3	0,807	0,819	0,819	0,836	0,802	0,769	0,777	0,511	0,386	0,919											
KM35949.1	E3	0,807	0,819	0,819	0,836	0,800	0,767	0,775	0,511	0,385	0,919	1,000										
KU25458.2	E4	0,850	0,859	0,825	0,845	0,841	0,820	0,839	0,483	0,389	0,831	0,823	0,821									
KX36253.1	E5	0,750	0,757	0,812	0,801	0,798	0,779	0,770	0,512	0,372	0,860	0,843	0,842	0,804								
KX36254.1	E5	0,752	0,759	0,814	0,808	0,787	0,776	0,754	0,502	0,353	0,844	0,841	0,840	0,793	0,979							
LC34851.1	E6	0,788	0,786	0,809	0,798	0,767	0,782	0,764	0,501	0,424	0,817	0,819	0,818	0,796	0,791	0,788						
LC41625.1	E6	0,809	0,807	0,817	0,811	0,792	0,790	0,795	0,470	0,427	0,828	0,829	0,828	0,820	0,807	0,796	0,964					
KX36255.1	E6	0,791	0,793	0,811	0,806	0,801	0,792	0,786	0,538	0,446	0,843	0,830	0,829	0,812	0,806	0,788	0,912	0,906				
KX36252.1	E6	0,780	0,785	0,809	0,807	0,782	0,782	0,762	0,530	0,420	0,840	0,835	0,834	0,795	0,814	0,805	0,927	0,919	0,910			
MG69316 6.1	E?	0,199	0,195	0,238	0,231	0,222	0,233	0,219	-0,040	0,136	0,235	0,238	0,238	0,234	0,232	0,232	0,229	0,235	0,203	0,218		

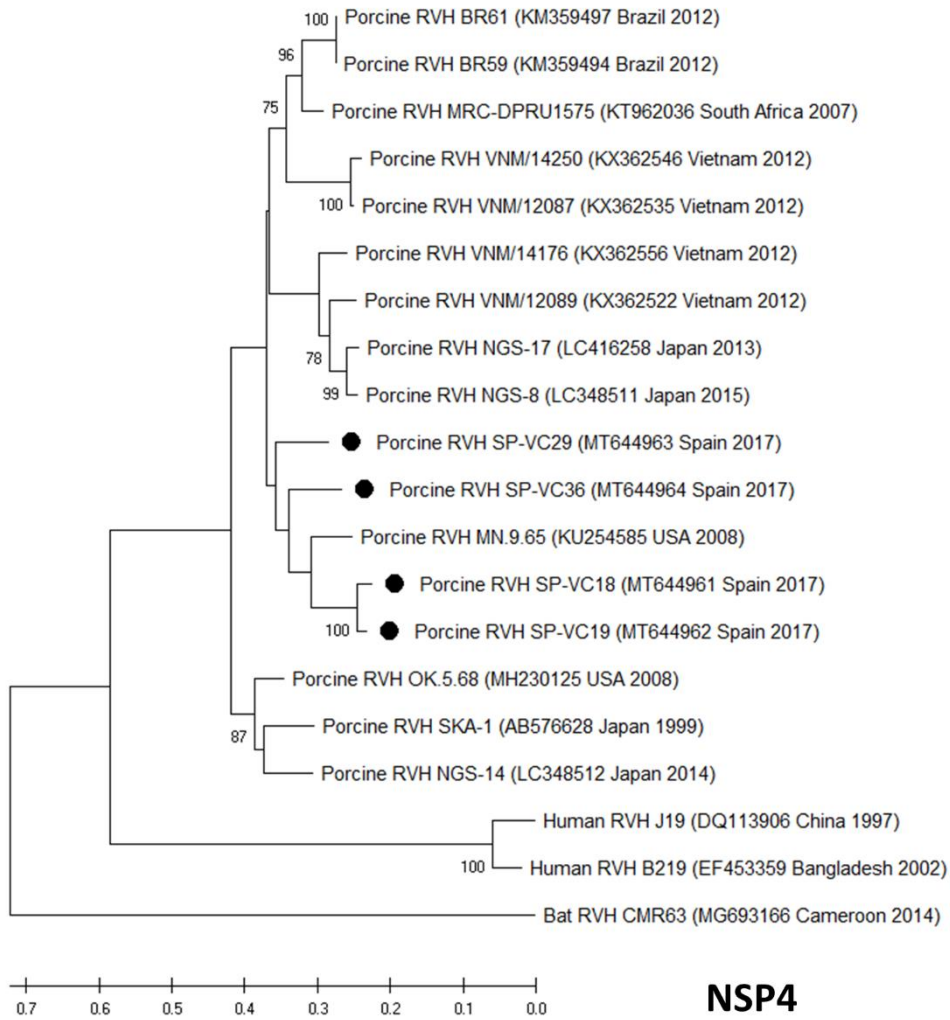
NSP5	Genotipo (89%)	RVH-VC18H	RVH-VC19H	RVH-VC29	RVH-VC36	MH230126	AB576635	LC416259	LC416268	KU254584	KT962037	KX362547	KX362523	EF453360	DQ113907	LC348513	LC348514	KX362557	KX362568	MG693167
RVH-VC18H	H3					.1	.1	1	1	.2	.1	.1	.1	1	.1	1	1	.1	.1	.1
RVH-VC19H	H3	0,936																		
RVH-VC29	H3	0,923	0,925																	
RVH-VC36	H3	0,952	0,946	0,940																
MH230126	H1	0,895	0,890	0,899	0,915															
AB576635	H1	0,868	0,884	0,870	0,884	0,940														
LC416259	H1	0,870	0,875	0,875	0,882	0,939	0,920													
LC416268	H1	0,863	0,868	0,872	0,875	0,934	0,914	0,995												
KU254584	H1	0,888	0,895	0,872	0,902	0,948	0,935	0,918	0,913											
KT962037	H1	0,879	0,883	0,869	0,890	0,943	0,946	0,940	0,935	0,941										
KX362547	H1	0,889	0,889	0,912	0,917	0,944	0,935	0,939	0,939	0,909	0,934									
KX362523	H1	0,864	0,869	0,854	0,878	0,919	0,911	0,891	0,885	0,911	0,905	0,978								
EF453360	H2	0,567	0,549	0,554	0,571	0,614	0,609	0,585	0,588	0,604	0,619	0,673	0,602							
DQ113907	H2	0,587	0,581	0,568	0,585	0,646	0,652	0,622	0,625	0,631	0,656	0,701	0,643	0,933						
LC348513	H3	0,910	0,908	0,910	0,925	0,907	0,895	0,887	0,883	0,896	0,890	0,914	0,882	0,630	0,643					
LC348514	H3	0,914	0,908	0,905	0,925	0,910	0,895	0,892	0,887	0,894	0,897	0,904	0,881	0,624	0,645	0,980				
KX362557	H3	0,915	0,907	0,907	0,926	0,880	0,867	0,864	0,855	0,863	0,865	0,851	0,845	0,513	0,554	0,941	0,943			
KX362568	H3	0,925	0,918	0,916	0,936	0,918	0,900	0,893	0,887	0,904	0,902	0,915	0,888	0,619	0,649	0,960	0,965	0,970		
MG693167	H?	0,392	0,402	0,401	0,417	0,383	0,426	0,349	0,323	0,399	0,408	0,413	0,371	0,356	0,365	0,377	0,384	0,394	0,408	

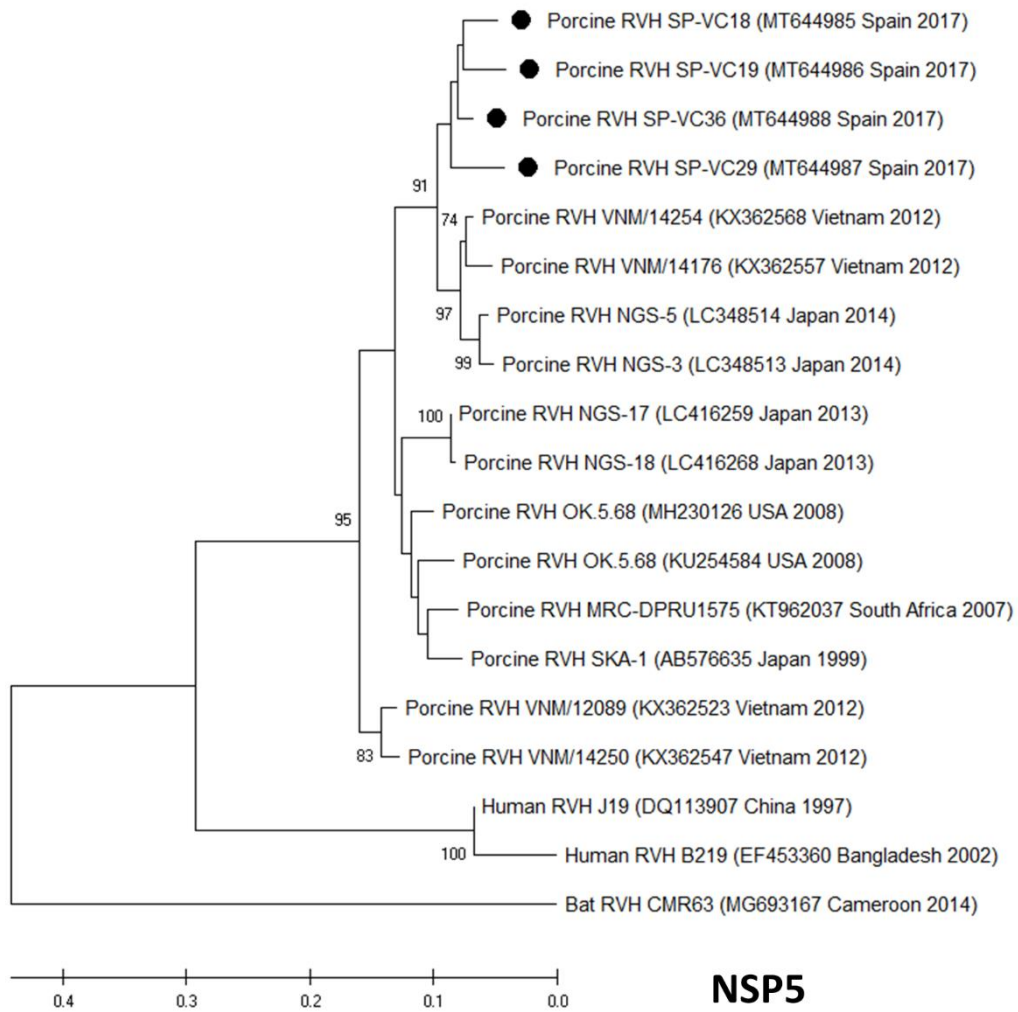
APPENDIX B: Maximum-likelihood trees constructed with the Tamura-Nei model for the NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, VP1, VP2 and VP3 RVH segments. Numbers along the tree represents the confidence value for a given internal branch based on 500 Bootstrap replicates, only values larger than 70 are shown. The symbols (filled circles) above the strains indicate the porcine Spanish RVH strains identified in this study. GenBank accession number, country and year of collection of faecal sample are also shown below the strains. Scale bars indicate nucleotide substitutions per site.

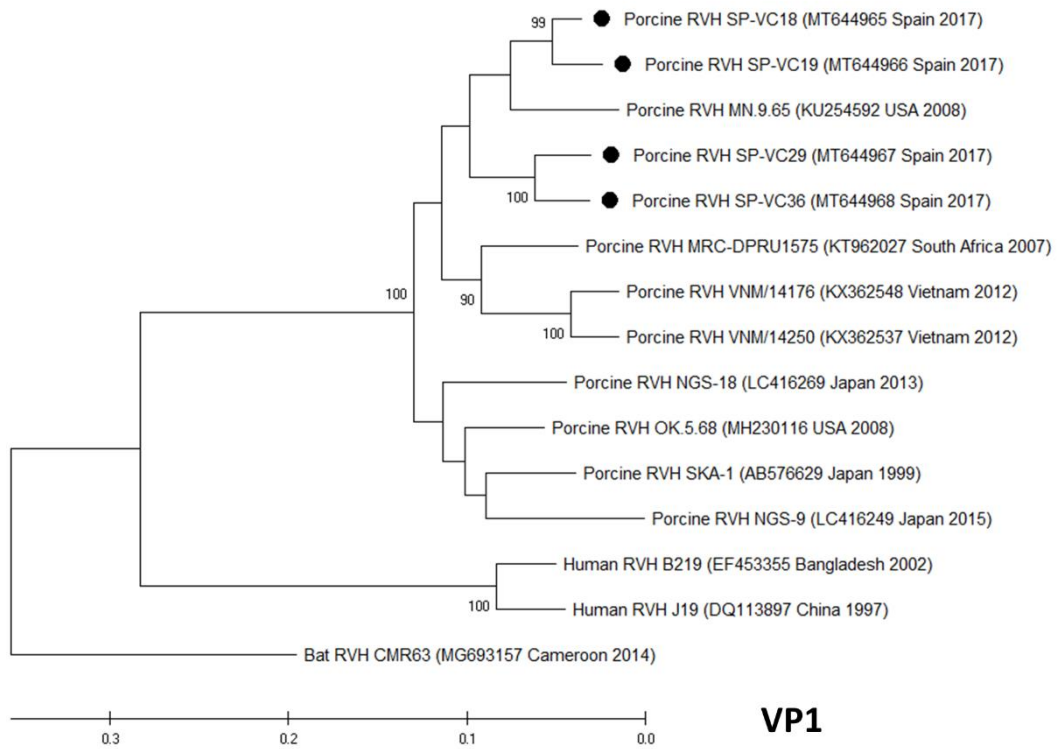


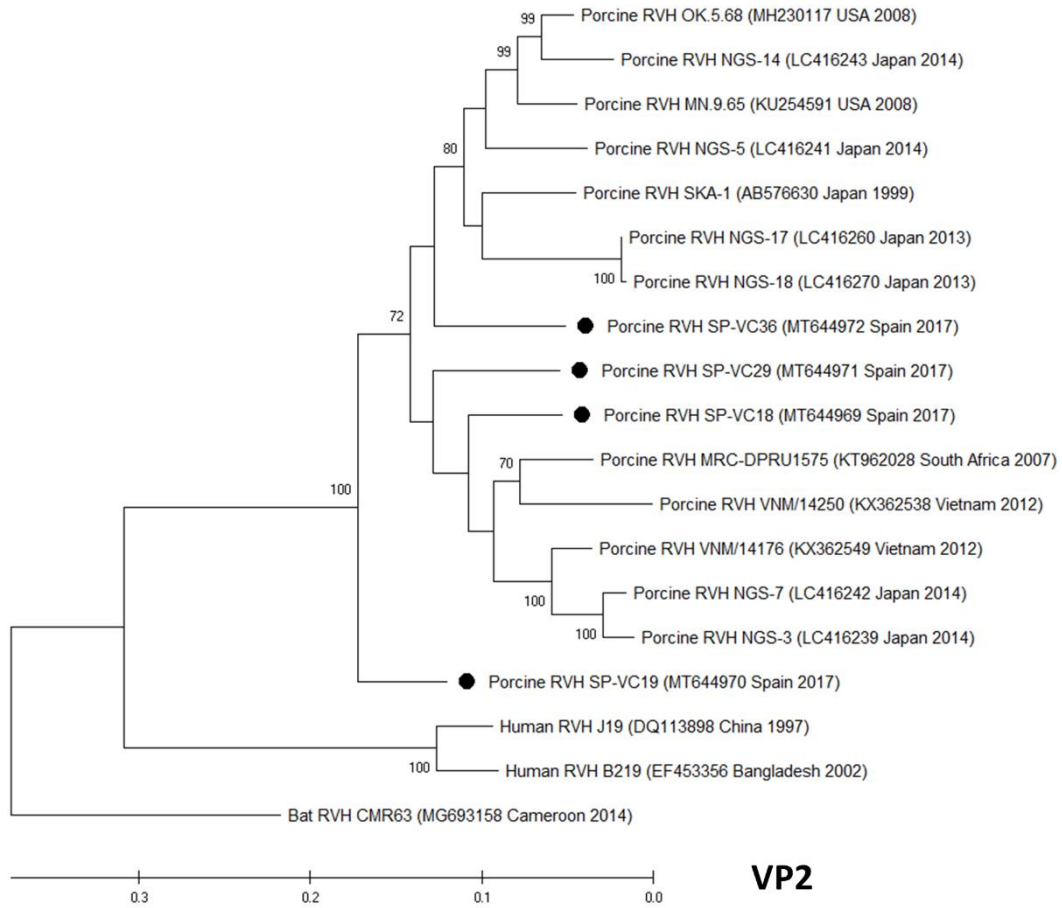


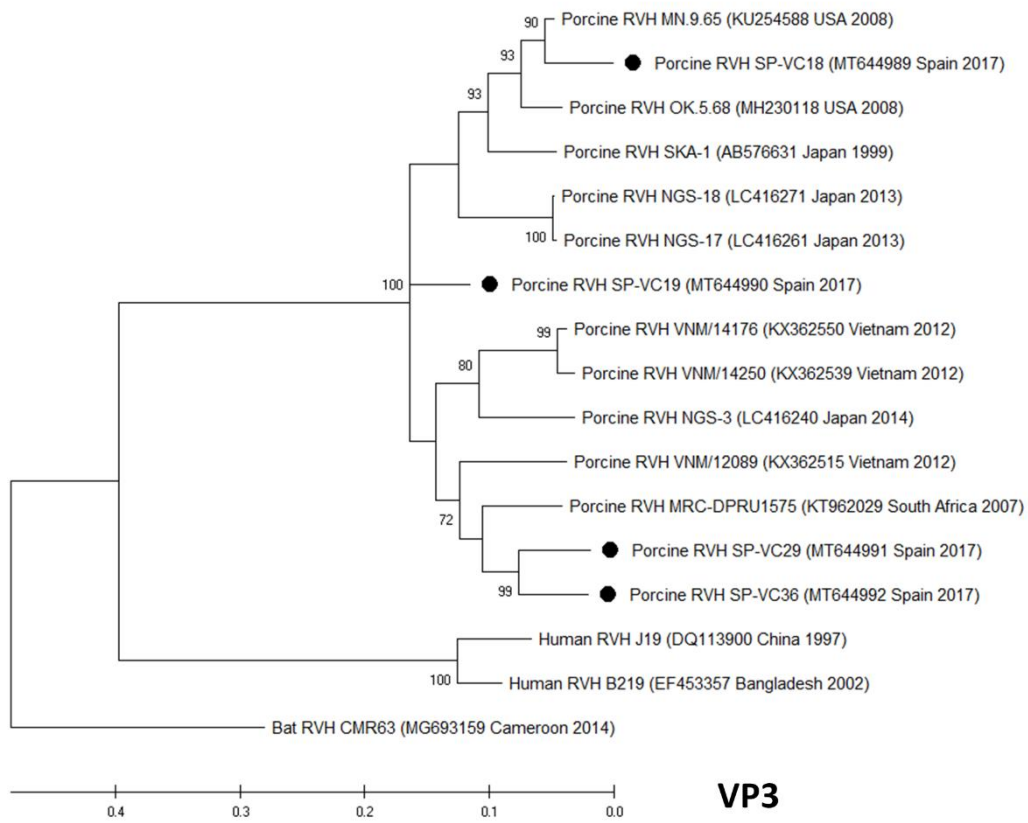












Anexo III: Información adicional de la Publicación III

Additional file 1: Summary of the results of next generation sequencing (NGS) in 14 selected faecal samples. C, consensus sequence (whole genome obtained or near complete genome, >90%); P, partial sequence (less than 90% genome covered) and T, traces (less than 10% of the genome covered). N is the number of viruses detected per sample. An asterisk indicates PEDV genomes that were already published [7].

ID	Age	PAstV2	PAstV3	PAstV4	PAstV5	PKoV	PToV	PEDV	RVA	RVC	MRV	N
VC4*	Nursing			P		C		C				3
VC9	Nursing	C	T	C	C	T		T				6
VC18	Nursing					C		T				2
VC19	Nursing			C	T		P	T				4
VC29	Postweaning	C	T	C	T	T	C	T	P	T		9
VC35	Postweaning		T	T					T		T	4
VC36	Fattening	C	C	C	T	C		T				6
VC41	Nursing	C	T	C		T			T	P		6
VC46*	Postweaning	C	P	P	P	P	P	C				7
VC57*	Nursing	T	T	C		T	P	C			T	7
VC64	Postweaning	T	T	T		T	T	T	T	T		8
VC100*	Fattening		T	T		T		C	T		T	4
VT9	Fattening		T	C	C			T				4
VT41	Postweaning			C	T		P	T				4

