



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Salud Global: Integración de la Salud Ambiental, Humana y Animal

Identificación y caracterización molecular del Norovirus circulante en la ganadería porcina española.

Identification and molecular characterization of circulating Norovirus in Spanish swine herd.

Autor/es

Celia Martínez Saz

Director/es

Alfredo A. Benito Zúñiga

Inma Martín Burriel



Curso 2021/2022

Índice

1. Resumen.....	3
Abstract.....	4
2. Antecedentes.....	5
2.1. Género Norovirus	5
2.2. Características generales de Norovirus.....	5
2.2.1. Morfología del virión	5
2.2.2. Genoma y proteínas virales.....	6
2.2.3. Ciclo de replicación viral: interacción virus-hospedador	7
2.2.4. Diversidad genética y evolución.....	9
2.3. Transmisión y epidemiología	11
2.4. Patogénesis	12
2.5. Diagnóstico de Norovirus	13
2.6. Tratamiento y prevención	14
2.7. Producción de ganado porcino en España	15
2.7.1. Sector porcino.....	15
2.7.2. Ciclo productivo	16
2.8. Norovirus en la Salud Global	17
3. Objetivos	18
4. Materiales y métodos.....	19
4.1. Selección y clasificación de las muestras: casos clínicos	19
4.2. Procesamiento de muestras biológicas y extracción de ácidos nucleicos.....	21
4.3. Ensayos de RT-qPCR para la identificación de Norovirus porcino	21
4.3.1. Desarrollo de los ensayos de RT-qPCR.....	22
4.4. Caracterización molecular de Norovirus porcino	24
4.4.1. Amplificación de productos mediante RT-PCR	25
4.4.2. Visualización del producto en gel de agarosa.....	26
4.4.3. Secuenciación Sanger y análisis filogenético	26
4.5. Análisis estadístico y representación de datos.....	27
4.6. Revisión bibliográfica	28
5. Resultado y discusión	29
5.1. Identificación de Norovirus porcino Genogrupo II por RT-qPCR	29
5.2. Identificación molecular del Norovirus porcino en muestras clínicas.....	30
5.3. Estudio filogenético de los genotipos de Norovirus porcino	35

5.3.1. Amplificación y secuenciación de Sanger de los genes <i>VP1</i> y <i>RdRp</i>	35
5.3.2. Determinación del subtipo de las muestras secuenciadas mediante herramientas bioinformáticas.....	36
5.3.3. Análisis de homología nucleotídica entre las muestras secuenciadas	38
5.3.4. Análisis filogenético.....	40
5.4. Discusión general.....	43
6. Conclusiones	46
Conclusions.....	46
7. Bibliografía.....	47
Anexos	

1. Resumen

Norovirus es un agente patógeno que causa la mayoría de gastroenteritis de origen no bacteriano en humanos a nivel mundial. Es capaz de infectar a un gran rango de hospedadores aparte del ser humano. Entre los Norovirus animales, el de porcino (genogrupo II) es el que más se asemeja genéticamente al Norovirus que afecta al ser humano. Así mismo, España representa uno de los principales países productores de porcino en Europa y a nivel mundial. A pesar de la relevancia del sector porcino y el posible potencial zoonótico del Norovirus que afecta a esta especie, existe poca información sobre la circulación de Norovirus porcino en nuestro país. El objetivo de este trabajo es identificar y evaluar la incidencia de este virus en la cabaña porcina española mediante el análisis de 480 muestras clínicas recibidas por Exopol S.L. durante un período de tres años (2020-2022) y analizar las relaciones filogenéticas entre estas cepas y otras previamente descritas en porcinos y humanos.

Para la identificación de Norovirus porcino en diferentes tipos de muestras biológicas, se diseñó un ensayo de RT-PCR en tiempo real que presentó una mayor sensibilidad que otro ensayo previamente descrito. Mediante esta metodología, Norovirus fue identificado en un 10,8 % (52/480) de las muestras clínicas del estudio. La frecuencia de detección fue mayor en las muestras de cerdo ibérico y parece asociarse al sistema de producción característico de esta raza autóctona. La circulación de Norovirus en cerdo blanco resultó particularmente alta en el caso de cerdos de cebo (11,5 %), al igual que en estudios similares.

Este trabajo describe la primera caracterización molecular de Norovirus porcino en España, identificando dos genotipos de cepas diferentes (GII.18 y GII.11) y que corroboran los resultados de estudios previos de genotipado realizados para este agente en otros países europeos. Por otro lado, el análisis filogenético demostró una gran variabilidad entre los dos genotipos identificados, y plantea la necesidad de hacer posteriores estudios con el fin de evaluar mejor el origen de estas cepas, así como un seguimiento para rastrear la aparición de virus potencialmente zoonóticos derivados de eventos de recombinación. Por tanto, este trabajo resulta un esfuerzo por poner en práctica el concepto “One Health”.

Abstract

Norovirus is a pathological agent that causes most human non-bacterial gastroenteritis worldwide, although it can infect a wide range of hosts apart from humans. For example, porcine Norovirus (genogroup II) is the closest genetically to human Norovirus. At the same time, Spain is one of the largest producers of pork both in Europe and worldwide. Despite the importance of the pork industry and the potential zoonotic capability of the virus affecting this species, there is little information about the spread of swine Norovirus in our country. The aim of this project is to identify and evaluate the incidence of this virus in the Spanish pig herd by analysing 480 clinical samples received by Exopol S.L. over a period of three years (2020-2022) and to analyse the phylogenetic relationships among these strains and others previously described in both, pigs, and humans.

For the identification of porcine Norovirus in different biological samples, a real-time RT-PCR assay was designed that showed a higher sensitivity than another previously described assay. Using this methodology, Norovirus was identified in 10,8 % (52/480) of the clinical samples in the study. The detection rate was higher in samples from Iberian pigs and seems to be associated with the production system characteristic of this native breed. Norovirus circulation in white pigs was particularly high in the case of fattening pigs (11,5 %), as in similar studies.

This study describes the first molecular characterisation of swine Norovirus in Spain, identifying two genotypes of different strains (GII.18 and GII.11) and corroborating the results of previous genotyping reports carried out for this agent in other European countries. On the other hand, the phylogenetic analysis showed a great variability between the two genotypes identified and raises the need for further studies to better assess the origin of these strains, as well as monitoring to track the emergence of potentially zoonotic viruses arising from recombination events.

2. Antecedentes

2.1. Género Norovirus

Norovirus (NoVs) es un miembro de la familia *Caliciviridae*, constituida por virus de RNA no segmentado de cadena sencilla (ssRNA) y de polaridad positiva que actúan como agentes patógenos en animales y humanos. Sus genomas presentan una longitud aproximada de 7500 nucleótidos; y estructuralmente carecen de envoltura. Este virus es la mayor causa de gastroenteritis aguda de origen no bacteriano en varias especies de mamíferos, sobre todo en humano (1).

Además de NoVs, dentro de esta familia, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) reconoce otros géneros como: Bavovirus, Lagovirus, Minovirus, Nacovirus, Nebovirus, Recovirus, Salovirus, Sapovirus, Vesivirus y Valovirus. Estos infectan primordialmente a mamíferos, a excepción de Bavovirus y Nacovirus que son específicos de aves, y Minovirus y Savovirus de peces (2).

Norovirus, además de infectar a humanos (3), tiene la capacidad de infectar a un amplio rango de hospedadores incluyendo mascotas, animales domésticos y silvestres como: perros (4), gatos (5), cerdos (6,7), ratones (8), ovejas (9), vacas (10) e incluso animales como murciélagos (11).

Este virus fue descrito por primera vez en 1968, tras un brote de gastroenteritis aguda (inicialmente denominada la “enfermedad de los vómitos de invierno” en 1929 (12)). Concretamente se produjo en la ciudad de Norwalk, Ohio (Estados Unidos), lugar que le da el nombre a este virus (13). Posteriormente, en 1972 Kapikian y colaboradores identificaron mediante microscopía electrónica el agente causante: una partícula viral de 27-nm detectada a partir de un filtrado de heces procedente del brote (14). El Norovirus porcino, objetivo de estudio de este Trabajo de Fin de Máster, se descubrió treinta años más tarde mediante RT-PCR en el contenido del ciego de cerdos (6).

2.2. Características generales de Norovirus

2.2.1. Morfología del virión

Caliciviridae, deriva del latín *Calix* por la forma que presentan los miembros de dicha familia (15). Los viriones de Norovirus son esféricos, carentes de envuelta lipídica y de 27-40 nm de diámetro ([Figura 1](#)). Su cápside está compuesta por 180 copias del monómero de la proteína mayor VP1. Esta proteína, comprende una región N-terminal cuya función es desconocida, hacia el interior de la cápside se dispone un dominio S (del inglés *shell*) y hacia el exterior un dominio P (del inglés *protruding*) (17). La parte conservada del dominio S forma una superficie que rodea al RNA viral; este dominio, ligado al dominio P, constituye la parte C-terminal de VP1, la cual se postula que confiere mayor estabilidad y control para el tamaño de las partículas virales (16). Por su parte, el dominio P se divide en un subdominio proximal P1 y un subdominio distal P2. Este último, presenta una región hipervariable que interactúa con anticuerpos y

con los receptores de superficie en células del hospedador en especies como ratón (17) y humano (18). Por tanto, es particularmente importante para la clasificación de los miembros de la familia viral (15,19).

Los viriones contienen también una proteína estructural menor VP2 (20), que se encuentra en el interior de la cápside asociada al dominio S de VP1. Esta proteína vírica es esencial para la producción de viriones infecciosos e incrementa la estabilidad de VP1 (19).

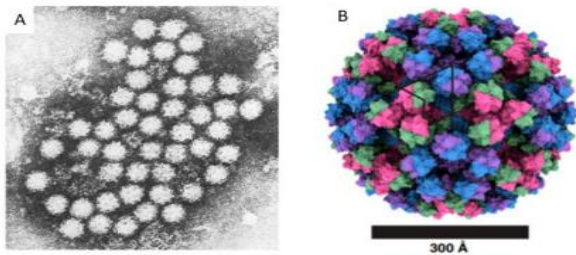


Figura 1. (A) Microscopía electrónica de Norovirus de Kapikian y colaboradores (1972). (B) Imagen de Norovirus por microscopía crioelectrónica de alta resolución de Norovirus GII.4 Jung y colaboradores (2019). Figura en conjunto tomada de Lucero y colaboradores (2021).

2.2.2. Genoma y proteínas virales

El genoma de la partícula vírica contiene toda la información necesaria para la expresión de proteínas virales en la célula hospedadora, así como las secuencias y estructuras para regular los procesos de transcripción, replicación y traducción del virus.

El genoma del Norovirus está caracterizado por ser un virus de RNA monocatenario y polaridad positiva con un tamaño de 7,3 a 7,5 kb. Además del RNA genómico (gRNA), se ha descrito la presencia de un RNA subgenómico (sgRNA) idéntico a los últimos 2,3 kb del extremo 3' del gRNA. Este sgRNA se expresa en niveles más altos que el gRNA en las células infectadas (21). En el extremo 5' de ambos RNAs, genómico y subgenómico, encontramos una proteína unida covalentemente denominada proteína viral (VPg) (22). Por otro lado, el genoma de este virus presenta regiones no traducidas en ambos extremos (5'UTR y 3'UTR). Estas regiones contienen estructuras secundarias de RNA altamente conservadas, las cuales se repiten a lo largo de todo el genoma desempeñando un papel funcional en la replicación, traducción y patogénesis mediante la unión del virus a determinados factores del hospedador (23).

Como se muestra en la [Figura 2](#), el genoma de Norovirus está organizado en tres *open reading frames* (ORFs) o marcos de lectura abiertos. Cada uno de estos segmentos codifica tanto para proteínas no estructurales (ORF1), como estructurales (ORF2, ORF3) que forman parte del virión (1). Si bien es cierto, esta organización genómica la comparten todos los Norovirus a excepción del murino que presenta un ORF adicional que se solapa con el ORF2 (24).

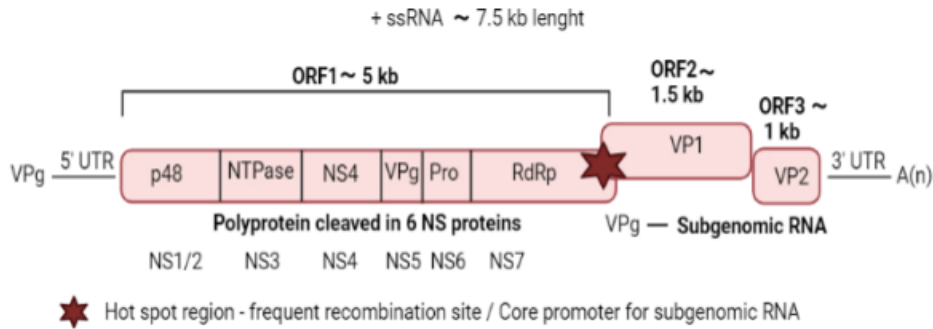


Figura 2. Representación de la organización genómica de *Norovirus*. Figura tomada de Cavicchio *et al* (2022)

El primer ORF de una longitud aproximada de 5 kb codifica una poliproteína que genera 6 proteínas no estructurales (NS1/2 a NS7) tras la escisión post-traducciona por parte de la proteasa viral. Destacan la proteína viral unida a genoma (VPg), una proteasa (Pro) y la polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) (25). El ORF2, codifica para la principal proteína de la cápside llamada proteína viral 1 (VP1) o proteína mayor de la cápside. Mientras, el ORF3 codifica la proteína de la cápside menor llamada VP2 (1). En la [Tabla 1](#), se detallan las proteínas virales codificadas por los segmentos genómicos, así como su nomenclatura, y la función que desempeñan.

Tabla 1. Proteínas virales, y su función. Adaptada de Campillay-Véliz y colaboradores (2020).

Marco de lectura	Proteínas	Nomenclatura	Función
ORF1	NS 1/2	P48	Modulación de la actividad de RdRp. Formación del complejo de replicación
	NS3	NTPasa	Actividad similar a helicasa. Unión e hidrólisis de nucleósidos trifosfatos.
	NS4	NS4	Formación del complejo de replicación
	NS5	VPg	Interacción con los factores de iniciación Síntesis directa con las proteínas virales
	NS6	Proteasa (Pro)	Procesamiento de la poliproteína viral
	NS7	RdRp	Transcripción del RNA viral
ORF2	VP1	Proteína viral 1 o proteína mayor de la cápside viral	Proteína estructural de la cápside Escape del sistema inmune Unión del virus a receptores para su entrada en la célula
ORF3	VP2	Proteína viral 2 o proteína menor de la cápside viral	Traducción del RNA viral Proteína estructural Estabilidad de la cápside

2.2.3. Ciclo de replicación viral: interacción virus-hospedador

La [Figura 3](#) muestra un esquema representativo de las distintas fases del ciclo de replicación de *Norovirus*. El paso inicial es la adhesión del virión a la superficie celular, mediado por la unión a receptores y factores solubles asociados a células. Concretamente intervienen los receptores de la VP1 y

factores carbohidratados del hospedador asociados a células. En la segunda etapa participan los receptores del hospedador para promover el acceso viral a las células. Al unirse a la superficie celular, el virus entra a la célula hospedadora (26). Una vez dentro, se libera el genoma viral al citoplasma donde tiene lugar la replicación y traducción.

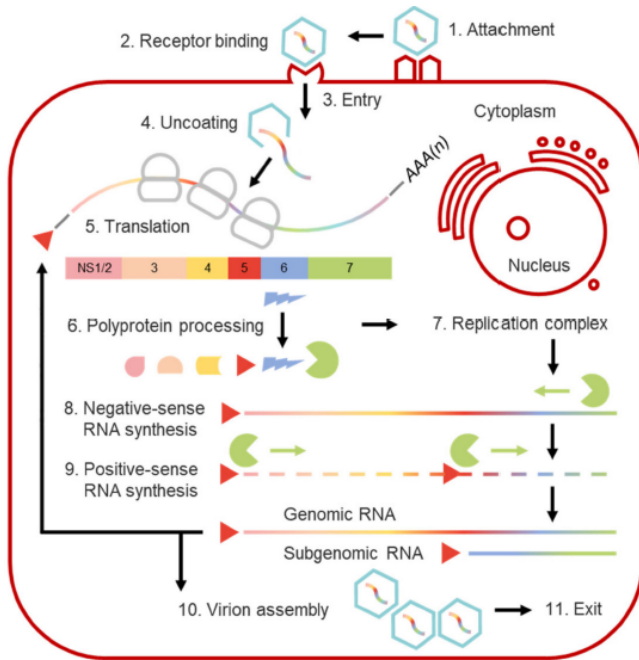


Figura 3. Esquema del ciclo de replicación de *Norovirus*. (1) Ensamblaje; (2, 3) unión al receptor y entrada a la célula; (4) liberación del genoma viral en el citosol; (5) traducción mediada por VPg (triángulo rojo); (6,7) procesamiento de la poliproteína codificada por el ORF1 por medio de la proteasa (rayo azul), dando lugar a proteínas maduras que forman el complejo de replicación; (8,9) replicación vía RNA de cadena negativa intermedio, y posterior producción de RNA genómico y subgenómico a partir de la RdRP (NS7, círculo dentado verde); (10,11) ensamblaje del virión y salida de la célula. Imagen tomada de Ludwig-Begall y colaboradores (2021).

El genoma viral se traduce a través de interacciones con la proteína VPg ligada al genoma en 5', ya que actúa como un RNA mensajero (mRNA) (15). Esta proteína media la traducción de RNA viral en proteínas utilizando la maquinaria de la célula huésped. El ORF1 codifica una poliproteína que se escinde co- y post- traduccionalmente por una proteasa viral para liberar proteínas virales maduras y sus precursores (27). Estas proteínas ya maduras sirven para ensamblar el complejo de replicación mediante el reclutamiento de membranas celulares a la región perinuclear de la célula a través de interacciones con NS 1/2 y NS4. La replicación del genoma se produce mediante la síntesis de un RNA intermedio de cadena negativa que sirve como molde para sintetizar gRNA y sgRNA de sentido positivo. Posteriormente, los genomas replicados se traducen o empaquetan en la cápside para el ensamblaje de viriones; una vez completado, la salida del virión es el último paso del ciclo replicativo (24,27,28).

En cuanto al ciclo de replicación en porcino, se le supone un ciclo de replicación similar, dada su similitud con el HuNoV y MNoV, pero habría que realizar más estudios para confirmar esta hipótesis (19).

2.2.4. Diversidad genética y evolución

Los estudios moleculares han confirmado la compleja diversidad genómica de los NoVs circulantes, que varían según la localización, edad del hospedador y, a veces, la presentación clínica, con la aparición de nuevas variantes cada pocos años (29,30). Esta alta variabilidad no sólo se debe a la aparición de mutaciones genéticas, sino a la recombinación intragenómica. De hecho, los procesos de recombinación entre el ORF1 y el ORF2 ocurren con frecuencia, causando una mayor diversidad genética (31).

Por esta gran variabilidad, surgió la necesidad de agrupar y clasificar filogenéticamente las cepas. Los primeros intentos de clasificación se remontan a los años 90, cuando se dividieron en genogrupos y genotipos según las secuencias parciales del gen *RdRp*. A principio de los 2000, a medida que se disponía de más secuencias, se consideró más adecuado el análisis de la secuencia de *VP1* (24). La clasificación actual (Figura 4) se basa en la secuenciación de ambos genes (*RdRp* y *VP1*): la secuencia del gen *RdRp* designa el grupo P, mientras que el gen *VP1* agrupa a este virus en genogrupos.

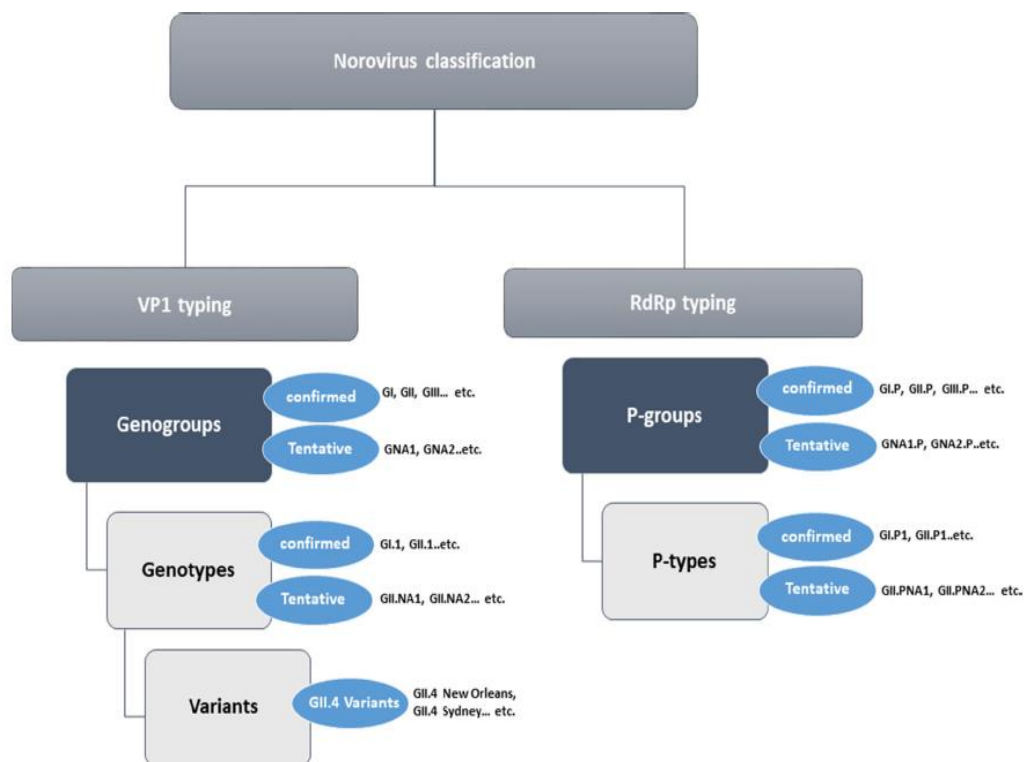


Figura 4. Clasificación de Norovirus en genogrupos, genotipos, variantes, grupos P y tipos P. Los genogrupos, genotipos, grupos P y tipos P tentativos suelen estar representados por una única secuencia o por múltiples secuencias no idénticas procedentes de una misma localización geográfica y, por lo tanto, se denominan no asignados (NA). Figura tomada de Chhabra y colaboradores (2019).

Actualmente encontramos 10 genogrupos (GI a GX), subdivididos en 48 genotipos confirmados basados en los aminoácidos de la secuencia de *VP1* completa; por otro lado, se han confirmado 60 tipos

P a partir de las secuencias parciales de nucleótidos de las regiones de la polimerasa. Aquellas cepas de las que solo se dispone de una secuencia, se clasifican en genogrupos, genotipos, grupos P o tipos P tentativos y se nombran como NA (no asignado) (32).

Cada uno de estos genogrupos infecta a una especie diferente: GI a humanos, GII a humanos y porcino, GIII a ovino y bovino, GIV a humanos, perros y gatos, GV a ratones y ratas, GVI a perros y gatos, GVII a perros, GVIII y GIX (anteriormente GII.15) a humanos y finalmente, el GX infecta a murciélagos (26,32). Asimismo, los estudios filogenéticos han revelado que hasta el momento el Norovirus porcino es el más similar al de humano; incluyendo tres genotipos: GII.11, GII.18 y GII.19 (7,33).

Respecto a la evolución de este virus, viene determinada tanto por la acumulación de mutaciones puntuales (deriva genética) como por la recombinación viral (cambio genético), así como por la interacción de ambos procesos evolutivos (24). Algunos de los mecanismos de evolución, son la variación antigénica que se produce en el dominio P de la proteína de la cápside VP1. Estas variaciones permiten al virus evadir la respuesta inmunitaria. Respecto a la recombinación, este mecanismo evolutivo tiene lugar cuando coexisten distintos virus en la célula hospedadora. La recombinación se produce cuando la RdRp inicia la síntesis del RNA de polaridad positiva en el promotor situado en el extremo 3' de un RNA de polaridad negativa, pero se detiene en el promotor subgenómico y cambia de molde al RNA negativo subgenómico de un virus co-infectante. Tras la recombinación, se produce una cepa de virus recombinante con un RNA viral que tiene una nueva combinación de ORF1 y ORF2-ORF3 (3).

Atendiendo a su capacidad evolutiva, Norovirus se ha diferenciado en genogrupo GII.4, el que más cambios experimenta, y diferente de GII.4. Diversos estudios de vigilancia han demostrado que las cepas GII.4 circulantes a nivel mundial, tienen altas tasas de mutación y evolución, lo que probablemente facilita la aparición de estas cepas antigénicamente divergentes (34). Al contrario, los genotipos diferentes de GII.4 experimentan cambios limitados y pueden persistir durante décadas con una modificación mínima de la VP1, por lo que estas cepas están sujetas a una menor presión adaptativa (35).

La aparición de los virus GII.4 y diferentes de GII.4 se ha relacionado con cambios de la proteína viral RdRp, lo que la convierte, junto con otras proteínas no estructurales, en el motor de la evolución de Norovirus. Así mismo, también se han asociado con la adquisición de una nueva polimerasa viral por recombinación (36).

2.3. Transmisión y epidemiología

Respecto a la transmisión de este virus, tanto en el ser humano como en animales, la principal vía de transmisión, como en casi todas las enfermedades gastrointestinales, es directa de carácter feco-oral. Aunque también puede transmitirse por alimentos y aguas contaminadas (33).

Desde la primera detección de Norovirus en animales, se ha intentado investigar si este virus es capaz de saltar la barrera interespecie. Hasta el momento, no existen estudios de brotes controlados en los que se hayan tomado muestras de animales y personas simultáneamente. Si bien es cierto, un brote de *calicivirus* en el Reino Unido se relacionó epidemiológicamente con un perro enfermo (33).

Hasta la fecha, no se ha detectado Norovirus animal en heces humanas, pero algunas pruebas serológicas apuntan a una posible transmisión animal-humano, incluyendo estudios que informaron de la seroprevalencia contra el Norovirus bovino (37) y canino (38) en humanos. Además, se han realizado varios estudios serológicos en especialistas veterinarios con el objetivo de evaluar si una mayor exposición a los animales se refleja en un aumento de los títulos contra Norovirus específico de animales. De hecho, Widdowson y colaboradores (2005), mostraron un mayor título de anticuerpos en el personal veterinario (39). También existen estudios que investigan el caso contrario, la posibilidad de transmisión de Norovirus humanos a animales ya sea mediante el cribado de muestras fecales de animales o la seroprevalencia frente a cepas humanas. En cuanto a la especie de interés en este trabajo, varios estudios en cerdos demostraron la presencia de Norovirus humanos en las heces de los animales, llegando a informar más de un genotipo presente en la muestra (40).

Desde el punto de vista epidemiológico, en el ser humano estas infecciones son causadas principalmente por el genotipo GII.4, pero la prevalencia de los genotipos difiere entre las poblaciones humanas y vías de transmisión. El GII.4 se asocia a la transmisión persona a persona, mientras que el resto a alimentos contaminados por una manipulación incorrecta o en su producción (3). En relación con la estacionalidad, en el ser humano los brotes siguen un patrón típico, con un pico de incidentes durante los meses de invierno en el hemisferio norte (41), de ahí que en su día se denominara “enfermedad de los vómitos de invierno”. Aunque no está del todo claro, este patrón se atribuye a una compleja combinación de factores del huésped, climáticos, ambientales y virales (24).

Centrándonos en el Norovirus porcino, éste se ha notificado en Asia, Europa, África, América y Oceanía. Resulta complicado comparar la prevalencia entre países y/o continentes, sin embargo, en Europa y Asia la frecuencia de detección parece comparable (5,9 %, y 4,49 % de media,

respectivamente), mientras que en Norteamérica se ha determinado una frecuencia ligeramente superior (media = 9,37 %) (19). Con relación a la estacionalidad, los estudios que evalúan el impacto de las estaciones en la frecuencia de detección son muy limitados y contradictorios. La primera detección en porcino se produjo entre febrero y julio a partir de muestras fecales (6) y en Norteamérica se mostró una mayor prevalencia en primavera (42). Por el contrario, Silva y colaboradores (2015) detectaron mayor frecuencia en invierno que en verano, aunque la diferencia no fue significativa (43).

Por otro lado, hasta el momento el Norovirus porcino es el más similar genéticamente al humano; se ha clasificado entre una amplia gama de genotipos de Norovirus humanos en GII como GII.11, GII.18 y GII.19 (33). No obstante, en 2007, se describió una cepa humana GII.4 en muestras de cerdos, lo que suscitó gran preocupación por el papel de los cerdos como reservorio de Norovirus zoonóticos (44). Desde entonces, el genotipo humano ha sido detectado en cerdos en diferentes países, junto con otros genotipos atípicos (19). Es por ello que la detección de nuevas cepas de NoVs y de cepas similares a las humanas en muestras de heces de cerdos sintomáticos y asintomáticos pone de manifiesto a esta especie como reservorio de las cepas emergentes de NoVs y con un gran potencial zoonótico (44,45).

2.4. Patogénesis

La infección por Norovirus conlleva cambios histopatológicos en el intestino delgado que ocasionan una disminución de la actividad enzimática, malabsorción transitoria, alteración de las funciones de la barrera epitelial, entre otros cambios, dando lugar a diarrea malabsortiva (24). Además, hay que tener en cuenta que es posible la aparición de infecciones concurrentes con otros patógenos entéricos que pueden desencadenar efectos sinérgicos, produciendo un cuadro clínico más grave (46).

En la especie humana, Norovirus causa gastroenteritis viral esporádica y epidémica. Después de un breve período de incubación (48 horas), los síntomas clínicos, en el caso de que los haya, suelen durar de dos a tres días (47). Dentro de los síntomas, los principales en humano son la diarrea aguda y vómitos, siendo posible la aparición de patologías intestinales más graves (36). Si nos centramos en la infección de animales, ésta se ha relacionado con brotes de gastroenteritis y episodios de diarrea aguda de diversa gravedad principalmente en bovinos (48), cerdos (49), gatos (50) y perros (51). En cuanto a la especie de interés, la infección suele ser asintomática y se ha descrito principalmente en cerdos adultos (42,46). Este virus podría expresar su patogenicidad en solo un pequeño porcentaje de casos debido a la coinfección con otros virus gastrointestinales o la inmunodeficiencia de los animales. De hecho, en porcino, una coinfección con el circovirus porcino-2 (PCV-2) podría aumentar la patogenicidad de otros patógenos, incluyendo NoVs (52).

2.5. Diagnóstico de Norovirus

La presencia de Norovirus se determina, principalmente, en heces y contenido intestinal, ya que este último representa el tejido objetivo de la infección (19). La interpretación de las pruebas de diagnóstico de este patógeno depende de la calidad de las muestras, por lo que requiere un adecuado manipulado. Para una identificación rápida de brotes es fundamental detectar el patógeno con la mayor brevedad posible desde la aparición de los signos clínicos, en el caso de que los haya. No obstante, existen una serie de factores que dificultan el diagnóstico de Norovirus, llegando a afectar a la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas: su genoma diversificado y variable, así como el alto nivel de diversidad antigénica y genética entre las cepas (15).

El método clásico de identificación de virus, basado en el aislamiento del patógeno en cultivos celulares, no resulta una opción para determinar su presencia ya que resulta una técnica laboriosa y larga. Por ello, actualmente, el *gold standard* para la identificación de Norovirus, tanto en humano como en porcino, son las técnicas moleculares.

Se han desarrollado diversas metodologías basadas en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) (45); principalmente se lleva a cabo la retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR), técnica que presenta una gran dificultad en la selección de cebadores apropiados para detectar las cepas circulantes debido a la gran diversidad genética de las mismas (7,42). De hecho, los primeros ensayos de RT-PCR para Norovirus humano usaron una gran variedad de cebadores basados únicamente en el primer genoma descrito del virus Norwalk (53); esto hizo que se subestimara la diversidad genética de los Norovirus. Posteriormente, la identificación de este agente mejoró con la utilización de cebadores dirigidos a regiones conservadas del gen de la polimerasa viral (54). Los ensayos de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) emplean numerosos métodos de detección como el *SYBR Green* (55), hidrólisis mediante sondas *TaqMan* (56) o sondas de hibridación. Estos ensayos son más sensibles y fiables, sin embargo, el costo de las sondas solo es asequible para el análisis de un gran número de muestras o un seguimiento continuo (45). En la mayoría de estos ensayos, los cebadores están dirigidos al gen *RdRp* de la polimerasa viral presente en el ORF1 y la unión de la polimerasa y la cápside (ORF1-ORF2). Esta última región, al ser más conservada, se utiliza como diana eficaz para la detección del virus (19,45).

Atendiendo a NoV porcino, una de las parejas de oligonucleótidos más usados para su identificación son los cebadores p289/p290, estos originalmente se utilizaron para Norovirus humanos y sapovirus (46). Cabe destacar que tras realizar la amplificación por PCR es necesario que todas las muestras

positivas se confirmen posteriormente por secuenciación y comparación con las bases de datos mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (45).

Además de las técnicas moleculares, encontramos la microscopía electrónica, fundamental para su descubrimiento. Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones: baja sensibilidad, equipo costoso y personal capacitado (19). Asimismo, a pesar de la característica morfología de todos los virus de la familia *caliciviridae*, Norovirus es difícil de diferenciar de otros pequeños virus entéricos comúnmente presentes en las heces (46). Debido a todas estas limitaciones, la microscopía electrónica solo se empleó en los primeros estudios de Norovirus.

En cuanto a los métodos serológicos, se desarrollaron pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) basadas en antígenos VLP, *virus-like particles*, para la detección de anticuerpos contra el Norovirus porcino en suero (57). Estos ensayos no han sido muy aplicados para investigar la circulación de este patógeno en porcino por su baja sensibilidad en comparación con los métodos de detección de ácidos nucleicos y su baja especificidad debido a la presencia de genotipos de NoVs antigénicamente distintos y la deriva antigénica continua de algunas cepas. Además, es un ensayo indirecto que depende de la inmunidad del animal, respuesta a la infección y carga viral, sumado a que es laborioso (19,45). Cabe resaltar que, además de ELISA, también se han empleado ensayos de inmunofluorescencia para la detección serológica de este virus (57) y existen test rápidos de inmunocromatografía con el mismo propósito para Norovirus humano (47).

2.6. Tratamiento y prevención

A pesar de la importancia clínica de las infecciones causadas por Norovirus en el ser humano, no se dispone de ningún antiviral aprobado. En ausencia de medidas terapéuticas específicas, el tratamiento se centra en la rehidratación y reposición de electrolitos. No obstante, se están investigando terapias antivirales de acción directa que se dirigen a varias etapas de la replicación, como la unión a la superficie celular del hospedador, la proteasa viral, la RdRp y factores esenciales para la replicación (58). Atendiendo a Norovirus porcino, además de no existir ningún tipo de tratamiento, hasta el momento no hay investigaciones relacionadas por el poco conocimiento del virus en esta especie.

Dado que en el ser humano NoV es la principal causa de gastroenteritis aguda a nivel mundial, y que no existe una terapia antiviral específica; prevenir las infecciones causadas por NoVs es crucial. Medidas como una buena higiene personal, lavado de manos, manipulación y preparado de alimentos de forma segura y desinfección resultan de gran importancia. Por otro lado, en el ser humano la vacunación contra

Norovirus es una prioridad para la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 2016 (59). Sin embargo, el desarrollo de una vacuna tiene grandes desafíos tales como: la diversidad genética y antigénica, múltiples variantes co-circulantes, la ausencia de una línea celular para cultivar el virus y de un modelo animal apropiado, así como un conocimiento incompleto acerca de la inmunidad de Norovirus.

Hasta ahora las vacunas más avanzadas en ensayos clínicos son las basadas en la proteína viral 1, con seguridad, inmunogenicidad y eficacia protectora comprobadas, lo que respalda una alta probabilidad de éxito (30,60). De hecho, existen cuatro vacunas candidatas en fase clínico basadas en esta proteína de la cápside.

Con relación al porcino, así como otras especies ganaderas, la medida de prevención por excelencia tanto para este patógeno, como para muchos otros es la bioseguridad en las granjas, tanto a nivel interno como externo. La bioseguridad se entiende como el conjunto de medidas, a nivel de infraestructura como de manejo, para impedir o disminuir el riesgo de entrada de enfermedades, y su posterior difusión dentro de una explotación o hacia otras explotaciones ganaderas (61).

La bioseguridad es determinante en la producción porcina en España, al ser la herramienta más eficaz que tenemos a nuestra disposición para mejorar y mantener el estatus sanitario del sector porcino en su conjunto. Ya que, en este sector, hay factores que hacen que las explotaciones porcinas estén sometidas a un alto riesgo en relación con la entrada y difusión de enfermedades (62) . Así mismo, la vigilancia epidemiológica será clave para prevenir posibles brotes.

2.7. Producción de ganado porcino en España

2.7.1. Sector porcino

El sector porcino español tiene una importancia clave en la economía de nuestro país ya que, dentro del sector ganadero, ocupa el primer lugar en cuanto a su importancia económica. A nivel mundial, España es la cuarta potencia en el sector porcino, en la Unión Europea la segunda, por detrás de Alemania. Durante los últimos años el sector porcino ha crecido notablemente, tanto en producción, como en censo y en número de explotaciones, gracias al empuje de los mercados exteriores apoyado, a su vez, en la competitividad del sector en el mercado mundial. Todo bajo el modelo europeo que garantiza una producción sostenible bajo uno de los estándares de bienestar animal, calidad, seguridad alimentaria y de trazabilidad más exigentes del mundo (63).

Por otro lado, la producción porcina en España está claramente diferenciada en dos vertientes, por un lado, la de cerdos de capa blanca, basada en una producción intensiva dirigida a producir la mayor cantidad de carne posible a un precio asequible. Por otro lado, la de las distintas razas autóctonas de cerdo ibérico en el suroeste de España, cuya producción es muy apreciada por la calidad organoléptica de su carne y se realiza en sistemas de producción en libertad (64,65).

2.7.2. Ciclo productivo

En la producción del ganado porcino se pueden considerar dos líneas que funcionan de forma paralela: el ciclo de las madres para la producción de lechones y el ciclo de lechones cuyo destino es el matadero (66). El ciclo productivo de una cerda puede dividirse en: cubrición, gestación, parto y lactación. Los lechones, por su parte, pasan por una serie de fases productivas empezando por el periodo de lactación, esta fase dura unos 28 días hasta que los lechones alcanzan un peso de 4 a 6 kg. Tras el destete, los animales pueden seguir diferentes vías en función del tipo de manejo de la granja. Pueden pasar a la fase de transición dentro de la propia granja (semana 5 a 11 hasta alcanzar 16 – 20 kg) y luego se mueven a un cebadero hasta alcanzar un peso de 120 kg; otro posible escenario son las granjas sin transición donde los lechones pasan directamente a los cebaderos (*wean to finish*), o también encontramos otro tipo de granjas en las que los lechones pasan a un *isowean*, donde se encuentran aislados libres de patógenos y posteriormente pasan a un cebadero convencional (66).

En el caso de cerdo ibérico, predomina el sistema extensivo o semi-extensivo, por lo que las diferentes fases están normalmente relacionadas con el ciclo productivo de los recursos de la dehesa. El ciclo de la cerda ibérica es el mismo que el de la cerda blanca: cubrición, gestación y parto. En cuanto a los lechones se destetan con 28 días igualmente, luego permanecen en la fase de destete hasta que alcanzan un peso aproximado de 23 kg. Alcanzado este peso, la siguiente fase es la de transición con una duración muy variable. Tras la transición pasan a cebo, estos cebaderos pueden ser diferentes según su alimentación (67). Encontramos de este modo el cebo de bellota o montanera, donde su dieta se basa exclusivamente en bellota, hierba y otros recursos naturales de la dehesa; cebo de campo o recebo donde los animales aprovechan los recursos de la dehesa, pero también se alimentan con piensos naturales en explotaciones al aire libre, y finalmente, encontramos cebaderos convencionales.

Cabe destacar que el ciclo productivo del cerdo ibérico finaliza mayoritariamente con el engorde mediante la alimentación de la montanera de bellota en las denominadas "dehesas". Éstas son sistemas complejos que mantienen la producción mixta extensiva de animales domésticos como el porcino, el bovino, el ovino y el caprino, pero también se utilizan para la caza mayor, principalmente, el ciervo

(*Cervus elaphus*) y el jabalí (*Sus scrofa*). Aunque suelen estar valladas, muchas veces se producen interacciones entre fauna silvestre y rebaños, lo que conlleva cierto riesgo epidemiológico (65).

2.8. Norovirus en la Salud Global

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la filosofía *One Health* se basa en un enfoque integrado para equilibrar la salud humana, animal y medioambiental.

Desde el punto de vista medioambiental, el cambio climático está previsto que afecte a las infecciones víricas en tres niveles: cambio en los patrones de transmisión, en la ecología del hospedador y los cambios socioeconómicos consecuentes. En el caso de Norovirus, se ha postulado que afectará en su transmisión, susceptibilidad del hospedador y resistencia del virus a las condiciones ambientales (68).

Por otro lado, los determinantes más importantes de zoonosis emergentes son de origen antrópico. Además, existen varios factores que posibilitan el salto de especie; por tanto, el estudio de zoonosis emergentes debería llevarse a cabo desde una aproximación *One Health*. Bajo este pretexto, la falta de certeza sobre el origen de los nuevos HuNoV y el estrecho parentesco genético entre ciertos Norovirus animales y humanos, en especial el porcino, ha generado interés en el posible papel de los animales como reservorio zoonótico de las cepas emergentes de este patógeno (33). Por ello, ya que la mayoría de las nuevas enfermedades en humanos son causadas por patógenos animales, sumado a factores como la globalización de la industria alimentaria, la rápida tasa de la evolución genética, la posibilidad de que infecte a hospedadores de diversas especies animales, pero sobre todo, la similitud genética entre Norovirus porcino y humano, las infecciones causadas por Norovirus, en especial el específico de cerdo, están suponiendo un desafío en el ámbito de la salud a nivel global (3,19,52).

En este contexto, deberían realizarse más esfuerzos para aumentar el número de secuencias disponibles de Norovirus porcinos, ya que aclararían varios aspectos de la infección. Sin embargo, la falta de disponibilidad de secuencias completas, la no replicabilidad en los virus secuenciados y la imposibilidad de reproducirlos en cultivos celulares representan un obstáculo para la investigación de la enfermedad. Por tanto, es necesaria una profunda investigación de los genotipos circulantes en cerdos al ser compartidos entre ambas especies (19), motivo de la realización de este estudio.

3. Objetivos

El presente estudio analiza la situación epidemiológica actual del agente patógeno Norovirus genogrupo II en casos clínicos de porcino procedente de distintas provincias del territorio nacional. El objetivo general es, por tanto, identificar y evaluar las frecuencias y relaciones filogenéticas de Norovirus circulante en la cabaña porcina española durante un período de tres años (2020-2022). Para ello, los objetivos específicos son:

1. Evaluar la presencia de Norovirus genogrupo II en muestras de procesos digestivos recibidas en el laboratorio de Exopol S.L durante los años 2020-2022, mediante ensayos de transcripción reversa y amplificación por PCR a tiempo real (RT-qPCR).
2. Caracterizar mediante secuenciación de Sanger los casos positivos a Norovirus para la posterior realización del análisis filogenético entre las cepas.
3. Evaluar la diversidad genética de Norovirus genogrupo II circulantes hoy en día en la cabaña porcina del territorio español.

4. Materiales y métodos

4.1. Selección y clasificación de las muestras: casos clínicos

Durante el periodo comprendido entre abril de 2020 a mayo de 2022, en la empresa de diagnóstico y autovacunas veterinarias Exopol, contabilizaron aproximadamente 9000 casos clínicos de procesos digestivos en porcino remitidos para el diagnóstico de diversos patógenos entéricos. Tras el respectivo análisis, el ácido nucleico contenido en estas muestras se almacenó a - 80 °C para un posterior uso. Un total de 480 de estos casos fueron seleccionadas para llevar a cabo el presente estudio; por tanto, se trata de un estudio individual, de tipo observacional y transversal basado en datos históricos. Además, el muestreo es de tipo no probabilístico al estar basado en muestras con patologías digestivas enviadas a un laboratorio.

Todas las muestras clínicas recibidas, incluido las seleccionadas (n = 480), fueron recibidas por el laboratorio en el área de necropsias; en donde se les asignó un número de caso clínico y fueron introducidas en el *software* de gestión de la empresa para llevar un control de la trazabilidad. En el caso de las muestras seleccionadas, el 67,08 % fueron analizadas en *pools* (n = 322), mientras que el 32,92 % restante fueron evaluadas de forma individual (n = 158). Las muestras fueron analizadas de forma individual o en pool en base a los criterios de cada cliente. Respecto al tipo de muestra, más de la mitad fueron hisopos digestivos, concretamente un 55,21% (n = 265), también se analizaron heces (30,21 %, n = 145) y tejido digestivo (14,17 %, n = 68) por lo general de íleon, colon, intestino delgado e intestino grueso. Adicionalmente se evaluaron dos muestras procedentes de calzas ([Tabla A.1.1, Anexo I](#)).

Con respecto a la procedencia de las muestras, se incluyeron casos clínicos de explotaciones ganaderas localizadas en un total de 38 provincias representando a 13 de las 17 comunidades autónomas del territorio español ([Tabla A.1.1 Anexo I](#)) ([Tabla 2](#)). Por otro lado, el origen de una muestra no pudo ser determinada y otras tres procedían de Portugal.

Tabla 2: Distribución de las muestras clínica del estudio según su procedencia.

PROCEDENCIA DE LOS CASOS CLÍNICOS ^a			
Comunidad Autónoma	Provincia	Muestras seleccionadas por provincia	Muestras seleccionadas por CCAA
Andalucía	Almería	1	21
	Cádiz	2	
	Córdoba	3	
	Huelva	3	
	Málaga	2	
	Sevilla	10	
Aragón	Huesca	79	214
	Teruel	25	

	Zaragoza	110	
Castilla-La Mancha	Albacete	2	6
	Toledo	4	
Castilla y León	Ávila	12	44
	Burgos	6	
	León	1	
	Salamanca	8	
	Segovia	7	
	Soria	4	
	Valladolid	5	
	Zamora	1	
	Cataluña	Barcelona	
Girona		12	
Lleida		26	
Tarragona		1	
Comunidad Foral de Navarra	Navarra	9	9
Comunidad de Madrid	Madrid	11	11
Comunidad Valenciana	Alicante	2	26
	Castellón	15	
	Valencia	9	
Extremadura	Badajoz	57	60
	Cáceres	3	
Galicia	A Coruña	1	3
	Lugo	1	
	Pontevedra	1	
La Rioja	La Rioja	1	1
Región de Murcia	Murcia	9	9
País Vasco	Álava	2	4
	Bizkaia	1	
	Guipuzkoa	1	

^a. En esta tabla no están representadas las muestras de Portugal (n = 3), ni aquella que se desconoce su localización).

Las muestras del estudio también se separaron según el tipo de explotación, en cerdo ibérico (15,42 %, n = 74) y cerdo blanco (81,25 %, n = 390); ya que estos dos sistemas presentan diferencias tanto en la genética del animal como en el manejo en cada una de las fases de su ciclo productivo, las cuales pueden influir en los resultados obtenidos. No obstante, en un 3,33 % del total de casos no fue posible determinar el tipo de sistema productivo por la insuficiente información facilitada por el cliente ([Tabla A.1.1, Anexo I](#)).

Según el tipo de explotación, las muestras se agruparon en cuatro o cinco categorías distintas, teniendo en cuenta el flujo productivo de los animales en función de si son cerdos blancos (n = 390) o ibéricos (n = 74). En ambos tipos de sistema productivo la categoría de cebo representó el mayor

número de casos evaluados, con un 53 % (200/380) y un 47 % (35/74) para el cerdo blanco y el cerdo ibérico, respectivamente; aunque también fue posible evaluar animales del grupo de transición, lactantes y adultos en ambas categorías. Se debe mencionar que, en caso del cerdo blanco, no fue posible obtener la información correspondiente en un pequeño porcentaje (4,45 %) de las muestras seleccionadas para el estudio ([Tabla A.1.1, Anexo I](#)).

4.2. Procesamiento de muestras biológicas y extracción de ácidos nucleicos

Las muestras clínicas (tejido digestivo, hisopos, heces o calzas) fueron transferidas al área de extracción de ácidos nucleicos. Para llevar a cabo este procedimiento se siguió el Protocolo Normalizado de Trabajo (PNT) instaurado en el laboratorio con el objetivo de automatizar y homogeneizar la extracción del RNA en las diversas clases de material biológico, ya sea en *pool* o de forma individual.

En función del tipo de muestra recibido, se realizó un pre-tratamiento diferente. Brevemente, los hisopos y las calzas fueron re-suspendidas en PBS y posteriormente, un pequeño volumen (aproximadamente 300 µl) fue transferido a tubos Eppendorf con perlas de zirconio de 1 mm de diámetro. Por otro lado, una pequeña cantidad de las muestras sólidas, como heces o tejido digestivo, se pasaron directamente a tubos con tampón de lisis y perlas. Estos tubos fueron sometidos a homogenización dos veces a 6000 rpm durante 30 segundos empleando el equipo *MagNaLyser* (Roche Diagnostics S.L Molecular Solutions, Barcelona, España) y posteriormente centrifugados 2 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante se sometió al proceso de extracción de ácidos nucleicos.

La extracción de ácido nucleico fue realizada con el robot de extracción *KingFisher™ Flex* (KingFisher™ Flex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.E.U.U) y el kit comercial correspondiente al equipo, *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit* (MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.E.U.U), siguiendo las instrucciones aportadas por el fabricante. Este método de extracción se basa en el uso de proteinasa K y nanopartículas magnéticas que se adhieren al ácido nucleico. Este complejo perlas-ácido nucleico a su vez se une al imán del robot que lo transfiere a varias placas, dos de ellas de lavado y la última de elución. Tras los sucesivos lavados y elución, se consigue la extracción de los ácidos nucleicos de cada muestra.

4.3. Ensayos de RT-qPCR para la identificación de Norovirus porcino

La identificación de Norovirus porcino en las muestras clínicas seleccionadas fue realizada mediante ensayos de RT-qPCR. En primer lugar, se utilizó un diseño descrito por Da Silva y colaboradores (2007), el cual tiene como diana una región muy conservada de este virus en la unión del ORF1 y el ORF2 (56);

entre el final del gen *RdRp* y el inicio del gen que codifica para la cápside. Las secuencias del ensayo de Da Silva y colaboradores (2007) (Tabla 3), están basadas en cebadores previamente descritos por otros investigadores (56,69).

Tabla 3: Sondas y cebadores del ensayo de RT-qPCR descrito por Da Silva y colaboradores para la identificación de Norovirus GII.

Cebador/Sonda	Secuencia 5' – 3' ^d	Localización	Secuencia de referencia
QNIF2d (+) ^a	ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	5012–5037	AF145896
COG2R (-) ^b	TCGACGCCATCTTCATTCACA	5080–5100	AF145896
QNIFS (+) ^a	FAM-AGCACGTGGGAGGGGATCG-TAMRA ^c	5042–5061	AF145896

^a. Cebador y sonda descrito previamente por Loisy y colaboradores (2005)(69).

^b. Cebador descrito previamente por Kageyama y colaboradores (2003)(56).

^c. La sonda fue marcada con 6-carboxi fluoresceína (FAM) en el extremo 5' y 6-carboxi-tetrametilrodamina (TAMRA) como *quencher* en el extremo 3' para el ensayo de RT-qPCR.

^d. Las bases degeneradas se corresponden con lo siguiente: R= A o G; W= A o T.

Considerando que el ensayo de Da Silva y colaboradores (2007) fue diseñado para la detección de Norovirus GII con secuencias aisladas del virus de humano, se procedió a diseñar un ensayo propio y específico para Norovirus porcino usando la misma región diana. Para este fin se obtuvieron las secuencias de Norovirus porcino, disponibles en la base de datos *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (70) y se alinearon con el programa bioinformático online MAFFT v.7 (71). Las secuencias de los cebadores diseñados para la realización de este ensayo no se pueden indicar por temas de propiedad intelectual de la empresa. Las sondas y cebadores de estos dos ensayos fueron sintetizados por la casa comercial *Integrated DNA Technologies* (Coralville, Iowa, E.E.U.U).

Para analizar la concordancia entre ambas pruebas diagnósticas se determinó el valor kappa o coeficiente de Cohen mediante la aplicación epidemiológica Winepi (72).

4.3.1. Desarrollo de los ensayos de RT-qPCR

El RNA extraído fue amplificado mediante RT-qPCR usando el kit comercial *SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step* (Meridian Biosciences, Cincinnati, Ohio, E.E.U.U) que contiene los reactivos necesarios para la RT-qPCR: dNTPs, enzimas, inhibidores de RNasas y tampón de reacción. La mezcla fue preparada siguiendo las indicaciones del fabricante (Tabla 4), incluyendo adicionalmente los cebadores y sonda de cada ensayo, en un volumen final de reacción de 20 µl.

Tabla 4. Mezcla de reacción de la RT-qPCR en los ensayos para la identificación de Norovirus porcino

Componente	Concentración
SensiFAST™ (2x)	10 µl
Agua molecular o mili-Q libre de DNAsas y RNAsas	3,4 µl
Enzima transcriptasa reversa	0,2 µl
Inhibidor de RNAsas	0,4 µl
Cebadores/sonda del ensayo NGII	1 µl
RNA	5 µl

La concentración final en la reacción de los cebadores mencionados previamente ([Tabla 3](#)) y las sondas TaqMan, fueron de 500 nM y 250 nM respectivamente. Adicionalmente, la identificación del gen constitucional de la beta actina (*ACTB*) fue realizada en todas las muestras a manera de control endógeno, con el fin de evitar resultados falsos negativos. La RT-qPCR fue realizada en un termociclador *StepOne Real-Time PCR™* (Applied Biosystems®, Waltham, Massachusetts, E.E.U.U), con el protocolo térmico descrito en la [Tabla 5](#).

Tabla 5. Protocolo térmico utilizado en la RT-qPCR para ensayo general de Norovirus Genogrupo II

Nº de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapas
1	45	15 min	Retrotranscripción de RNA a cDNA
1	95	5 min	Activación Taq DNA polimerasa
40	95	15 s	Desnaturalización de DNA
	60	1 min	Hibridación de cebadores, extensión y lectura de fluorescencia

Los resultados de la RT-qPCR, se expresaron en términos de Cq ó ciclo de cuantificación, definido como el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia alcance una cuantificación límite y pueda identificarse la muestra como positiva. Este parámetro es inversamente proporcional a la cantidad de material genético presente en la muestra. Por tanto, a menor Cq, habrá una mayor cantidad de material genético (73). Los resultados se analizaron con el *software* del termociclador (*Real-Time PCR StepOne™*, Applied Biosystems®, Waltham, Massachusetts, E.E.U.U) y se consideraron como positivas todas aquellas muestras con un Cq < 38.

4.4. Caracterización molecular de Norovirus porcino

Los genes *RdRp* y *VP1* que codifican para la RNA polimerasa dependiente de RNA y la proteína viral 1 de la cápside se han descrito en la bibliografía como las principales dianas para la caracterización de Norovirus. Del mismo modo que para el ensayo general de RT-qPCR, se realizó una búsqueda bibliográfica de los cebadores empleados para la secuenciación de estas regiones. Por otro lado, considerando la gran variabilidad observada en esta especie viral, se procedió a diseñar oligonucleótidos específicos para las secuencias de Norovirus porcino con el fin de incrementar el éxito de la secuenciación. En la siguiente la [Tabla 6](#) se describen las secuencias y respectivas referencias de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de Norovirus porcino en este estudio.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *RdRp* y *VP1* de Norovirus porcino.

Set y referencia	Diana	Nombre	Región	Secuencia ^a	Tamaño del amplicón	Referencia
A Wollants y colaboradores (2015) (74)	Unión <i>RdRp</i> - <i>VP1</i>	COG2F	3' <i>RdRp</i>	5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'	390 pb (aprox.)	Kageyama y colaboradores (2002) (56)
		G2SKR	5' <i>VP1</i>	5'-CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT-3'		Kojima y colaboradores (2002) (75)
B Andrade y colaboradores (2017) (76)	Unión <i>RdRp</i> - <i>VP1</i>	Mon431	3' <i>RdRp</i>	5'-TGGACIAGRGGICCYAAYCA-3'	560 pb (aprox.)	Beuret y colaboradores (2002) (77)
		G2SKR	5' <i>VP1</i>	5'-CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT-3'		Kojima y colaboradores (2002) (75)
C Kabue y colaboradores (2017) (78)	<i>RdRp</i>	JV12	5' <i>RdRp</i>	5'-ATACCACTATGATGCAGATTA-3'	330 pb (aprox.)	Vinje y Koopmasn(1996) (79)
		JV13	3' <i>RdRp</i>	5'-TCATCATCACCATAGAAAGAG-3'		Vinje y Koopmasn (1996) (79)
Wang y colaboradores (2007) (46)	<i>RdRp</i>	P290	5' <i>RdRp</i>	5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3'	300pb (aprox.)	Jiang y colaboradores (1999)(80)
		P110	3' <i>RdRp</i>	5'-ACDATYTCATCATCACCATA-3'		Le Guyader y colaboradores (1996) (54)
E Exopol	Unión <i>RdRp</i> - <i>VP1</i>	NGIIfw	3' <i>RdRp</i>	5'-TGGABTTTTACGTGCCMAG-3'	350 pb (aprox.)	ExopolS.L
		EXNG2R3	5' <i>VP1</i>	5'-CCACCNGCRTAVCCRTRTACAT-3'		ExopolS. L

F Exopol	Unión RdRp-VP1	NGIIfw	3' RdRp	5'-TGGABTTTTACGTGCCMAG-3'	300 pb (aprox.)	ExopolS.L
		NG2Rv4	5' VP1	5'-GGGAAACTGTAAAYTCTCCA-3'		ExopolS. L
G Exopol	RdRp-VP1	NG2Fw3	5' RdRp	5'-ACCTACCACCTTGATGCTGA-3'	1 kb (aprox.)	ExopolS.L
		NG2Rv4	5' VP1	5'-GGGAAACTGTAAAYTCTCCA-3'		ExopolS.L

a. Las bases degeneradas se corresponden con lo siguiente: **R**, A o G; **B**, C o G o T; **N**, A o C o G o T; **Y**, C o T; **H**, A o C o T; **I**.

Se debe mencionar que, para el proceso de secuenciación, se seleccionaron 15 muestras con un Cq < 32 en el ensayo de RT-qPCR, debido a que, por encima de ese Cq, las muestras son consideradas positivas débiles y con muy poca carga viral. Sin embargo, dado el poco número de muestras se amplió la selección a casos positivos con un Cq < 35 (n = 39).

4.4.1. Amplificación de productos mediante RT-PCR

Los protocolos térmicos empleados para amplificar los productos de PCR, previo a la secuenciación, fueron diversos en función del par de cebadores utilizados. En general se empleó el protocolo descrito en la [Tabla 7](#), variando la temperatura de hibridación de los cebadores según el par de oligonucleótidos utilizados. Por otro lado, se añadió una etapa de elongación a 72 °C por 30 segundos en los experimentos con el set de cebadores F, y en algunos otros se programó un gradiente de temperaturas.

Tabla 7. Protocolo térmico general de la RT-PCR para la secuenciación de Norovirus Genogrupo II

Nº de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapas
1	45	20 min.	Retrotranscripción de RNA a cDNA
1	95	5 min.	Activación Taq DNA polimerasa
40	95	15 s.	Desnaturalización de DNA
	58 ó 60	1 min.	Hibridación de cebadores
	72	30 s.	Elongación

En esta etapa del estudio, además de la PCR convencional, se empleó una variante denominada *Touchdown-PCR* (TD-PCR). Esta técnica ofrece una manera simple y rápida para optimizar la PCR, aumentando la especificidad, sensibilidad y rendimiento. TD-PCR emplea una temperatura de *annealing* (unión de los cebadores o anillado) inicial superior a la temperatura de *melting* ó fusión (T_m , temperatura en la que el 50 % de los cebadores está unido en forma de doble cadena) de los cebadores empleados. Luego pasa progresivamente a una T_m más baja, por tanto, más permisiva, disminuyendo un grado por

cada ciclo. Esta variante de la PCR convencional se empleó en aquellas muestras que resultaba difícil conseguir una única banda en el gel de electroforesis.

Para el desarrollo de la RT-PCR se emplearon los mismos reactivos que en la qPCR, aunque para un volumen final de 30 μ l y siempre manteniendo las cantidades de concentración final indicadas por el fabricante. Brevemente, para realizar la mezcla de reacción a un volumen final de 30 μ L por pocillo se usaron: 15 μ L de *SensiFAST™ Probe No-ROX One-Step* (Meridian Biosciences, Cincinnati, Ohio, E.E.U.U) (2X), 1,1 μ L de agua molecular libre de DNAsas, 0,6 μ L de inhibidor de RNAsas, 0,3 μ L de transcriptasa reversa y 2,5 μ L de cada cebador (*reverse* y *forward* a una concentración final de 500 nM). Finalmente se añadieron 10 μ L de la muestra de ARN. Posteriormente, se procedió a amplificar el material genético en un termociclador *BioRad MiniOpticon™ Real-Time PCR System*, siguiendo el protocolo térmico indicados en la [Tabla 7](#).

4.4.2. Visualización del producto en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de amplificación, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa, preparados al 2 % con tampón Tris-acetato-EDTA al 1X y teñidos con *Midori Green Advance DNA stain 20X* (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Alemania), una alternativa al bromuro de etidio más segura y no carcinogénica. En cada carril del gel se cargaron 8 μ l del producto amplificado junto con 2 μ l de tampón de carga 6X *IBIAN® Loading Buffer II* (IBIAN Technologies, Zaragoza, España). Para determinar el tamaño del producto se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb *IBIAN® 100 BP DNA Ladder* (IBIAN Technologies, Zaragoza, España). La electroforesis se realizó a 100 V durante 25 minutos o bien 100 V durante 45 minutos en función de la cubeta utilizada para la preparación del gel (RunOne™ Embitec, San Diego, California, E.E.U.U; Powerpac Basic Bio-RAD, California, E.E.U.U). Una vez terminada la electroforesis se procedió a la visualización de los geles mediante el equipo de captura de imágenes *E-BOX* (Vilber, Marne-la-Vallee, Francia). Las muestras con bandas del tamaño apropiado para la pareja de cebadores que se empleó, y que adicionalmente no presentaran alguna otra banda inespecífica, se guardaron para su posterior secuenciación.

4.4.3. Secuenciación Sanger y análisis filogenético

El producto amplificado fue enviado a la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal) para su secuenciación por el método de Sanger. La secuenciación de cada muestra fue realizada en ambos sentidos, con los mismos cebadores utilizados para la respectiva amplificación por PCR convencional.

Los archivos obtenidos tras la secuenciación (en formato .ab1) se evaluaron a través de diferentes programas bioinformáticos. En primer lugar, la calidad de la secuencia se comprobó mediante el programa Chromas 2.6.6 (81) (Technelysium, South Brisbane, Australia) y U-GENE 43.0 (82) (Unipro, Novosibirsk, Rusia); posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas con los cebadores directo (*forward*) y reverso (*reverse*), utilizando el programa U-GENE 43.0 (82) y una secuencia de referencia de Norovirus porcino como plantilla. La secuencia revisada se guardó en formato FASTA y se analizó con la herramienta bioinformática de dominio público BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del *NCBI* (83), la cual busca información de secuencias relacionadas con mayor homología nucleotídica, comparándolas con las secuencias depositadas en la base de datos del *GenBank* (70).

La construcción de los árboles filogenéticos se realizó mediante el *software* online MAFFT v.7 (71); realiza en primer lugar un alineamiento múltiple de las secuencias en estudio, así como de las secuencias de referencia. Tras alinear dichas secuencias, se construyó el árbol filogenético empleando el método de *Neighbor-joining* y realizando un número de repeticiones (*bootstrap*) de 1000. La visualización y edición del árbol filogenético se llevó a cabo mediante el programa Archaeopteryx versión 0.9933 beta (84). Las secuencias de referencia empleadas en el análisis filogenético fueron obtenidas de la base de datos del *GenBank*. Se seleccionaron secuencias de Norovirus GII tanto de humano como de porcino con el fin de poder observar mejor la diversidad filogenética ([Tabla A.2.1., Anexo II](#)). Para el genotipado de las secuencias obtenidas en este estudio, se empleó la herramienta bioinformática *Norovirus Typing Tool Version 2.0* (85). Finalmente, la herramienta SDTv1.2 se empleó para evaluar el grado de similitud nucleotídica entre las secuencias obtenidas y de referencia mediante matrices de homología. Este programa permite clasificar las secuencias de los virus basándose en la identidad de los pares de secuencias, calculando las puntuaciones de similitud por pares y muestra una matriz codificada por colores de estas puntuaciones (86).

4.5. Análisis estadístico y representación de datos

Los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo utilizando el *software* PSPP (GNU PSPP 0.10.2; PSPP) (87). Para determinar la existencia de posibles diferencias significativas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$) entre los diferentes grupos (tipo de muestra, tipo de procesamiento, edades y categoría) se llevó a cabo un estudio con distribución Chi cuadrado (χ^2) o Test exacto de Fisher en el caso de que más del 20 % de las celdas presentase una frecuencia esperada menor a 5, según aplique. Así como observando los residuos ajustados tipificados. Los resultados se muestran en frecuencia relativa de los positivos respecto del número total del grupo correspondiente. La representación de datos se realizó

mediante la versión de Microsoft Excel (88) para Windows 10 y Microsoft Power Bi versión 2.110.1161.0 (89).

4.6. Revisión bibliográfica

Para la realización de este estudio, se llevó a cabo una revisión bibliográfica basada en la búsqueda, y posterior análisis, de diferentes fuentes de información, principalmente artículos de revistas científicas, extraídas de diversas bases de datos bibliográficas electrónicas (Google Scholar, Pubmed y Scopus). Respecto a la estrategia de búsqueda se emplearon los operadores booleanos “AND” y “OR” combinados con las palabras clave: “*Norovirus*”, “*Calicivirus*”, “*Swine*”, “*Pig*”, “*Genogroup II*”, “*Phylogenic diversity*”, “*Diagnostic*”, “*Electronmicroscopy*”, “*Prevention*”, “*Vaccine*”, “*Vaccination*”, “*One Health*”, “*Sanger sequencing*”, “*RT-PCR*”, “*Molecular detection*” y “*Primer*”.

5. Resultado y discusión

5.1. Identificación de Norovirus porcino Genogrupo II por RT-qPCR

La identificación de Norovirus actualmente se lleva a cabo mediante técnicas moleculares (véase apartado 2.5); en este estudio en concreto se ha utilizado la RT-qPCR dirigida a la región genética más conservada del genoma de este virus, la unión del ORF1 y ORF2.

Con el fin de elegir la mejor metodología diagnóstica se procedió a evaluar dos ensayos de RT-qPCR; uno previamente descrito por Da Silva y colaboradores y un diseño propio, en un total de 74 muestras clínicas (Tabla A.3.1 Anexo III). Con el ensayo descrito por Da Silva y colaboradores se detectó Norovirus porcino en un 5,4 % de las muestras (4/74), mientras que con el ensayo propio se identificó un 13,5 % de positivos (10/74). Las muestras positivas con el ensayo descrito por Da Silva también lo fueron con el nuevo ensayo. Por tanto, como se muestra en la Figura 5, el ensayo propio mejoró la identificación de Norovirus porcino. Esto puede deberse a que mientras el ensayo de Da Silva y col. (2007) fue diseñado para amplificar el Genogrupo II en humano, el propio era específico del Genogrupo II porcino.

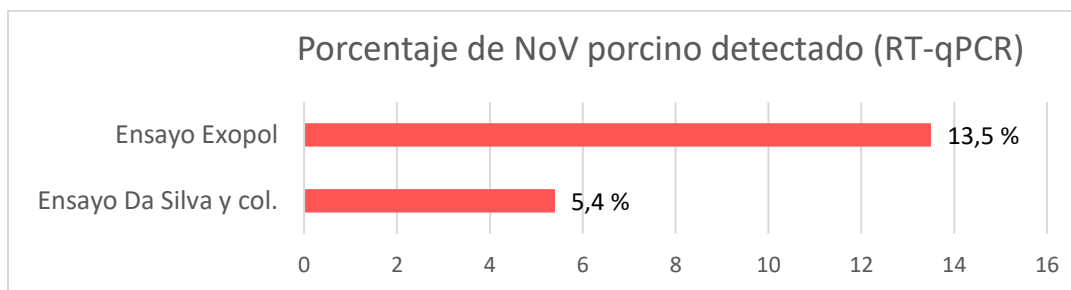


Figura 5: Porcentaje de muestras identificadas como Norovirus Genogrupo II con el ensayo descrito por Da Silva y con el ensayo propio desarrollado para este estudio (n = 74). Los resultados se muestran como frecuencia relativa del número de positivos entre el total de muestras clínicas

Para comparar estas pruebas diagnósticas, se determinó el valor kappa (coeficiente de Cohen) mediante la aplicación epidemiológica WinEpi (72) para estimar el grado de concordancia entre ambas pruebas. Con un 95% de confianza, el ensayo de Da Silva y col. (2007) y el ensayo de Exopol presentaron un grado de concordancia moderado ($kappa = 0,536$). No obstante, en las muestras positivas en ambos ensayos, la media de valores C_q fue ligeramente menor con el nuevo ensayo comparado con el descrito por Da Silva y colaboradores (33 frente a 33,8). Todos estos resultados en conjunto confirmaron la mayor sensibilidad diagnóstica en el ensayo diseñado en este estudio. La Figura 6 muestra las diferencias de C_q en las muestras positivas concordantes analizadas de forma individual.

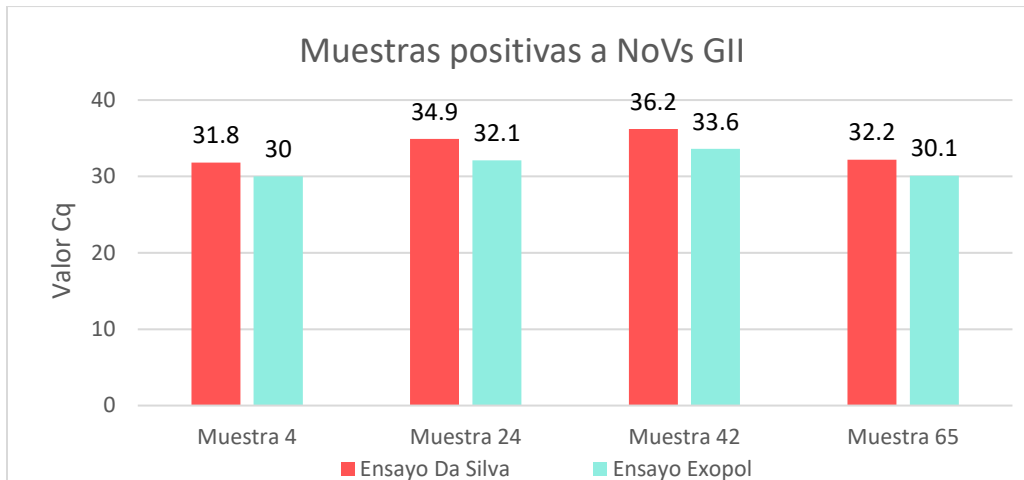


Figura 6. Comparación de los valores Cq obtenidos en las 4 muestras positivas a NoVs GII con el ensayo de RT-qPCR descrito Da Silva y colaboradores y el ensayo propio diseñado para este estudio. A menor Cq más positiva se considera la muestra.

Debido a la mejora en la identificación del virus, se empleó el ensayo propio para llevar a cabo la detección de casos positivos en las muestras seleccionadas en el resto del estudio.

5.2. Identificación molecular del Norovirus porcino en muestras clínicas.

En el presente estudio se incluyeron 480 muestras clínicas procedentes de animales con patologías digestivas de diferentes explotaciones del país. En estas muestras, la frecuencia de detección de Norovirus porcino Genogrupo II fue del 10,83 % (52/480); con rangos de Cq entre 25,86 - 37,88 y un Cq promedio de 33 ([Tabla A.4.1 Anexo IV](#)). Los Cqs obtenidos en nuestro estudio fueron bastante altos; concretamente en el 55,7 % de las muestras positivas (29/52) el Cq fue mayor que 33, lo que implica una baja carga viral en las muestras; comparado con un control positivo cuantificado este Cq correspondería a unas 100-500 copias por reacción aproximadamente.

La frecuencia de detección de Norovirus en este estudio (10,83 %), está entre los rangos de detección descritos en Europa (0,5 % - 18,9%, media = 5,9 %) (19) y es muy similar a los detectados en un estudio en Italia (11,4 %) en granjas de cerdos con diferentes etapas del ciclo productivo (90), y otro en Bélgica (11,6 %) a partir de las muestras recibidas por un laboratorio veterinario (49). Como se ha mencionado previamente, para la detección del Norovirus suelen emplearse muestras de heces y tejido digestivo, al ser la diana de este patógeno las células de tracto digestivo. Teniendo en cuenta que ambos tipos de muestra, son matrices complejas que pueden comprometer la identificación del virus (19), en nuestro estudio el uso de un control endógeno ayudo a eliminar la posibilidad de resultados falsos negativos. La identificación de Norovirus fue confirmada principalmente en heces, con un 14,48 % de las muestras

positivas (21/145), tejido digestivo 11,76 % (8/68), en menor medida en hisopos con un 8,68 % (23/265) y, no fue detectado en calzas (0/2). Sin embargo, la diferencia en estos porcentajes no fue estadísticamente significativa, por lo que no se encontró asociación entre el tipo de muestra y la detección del virus. Tal y como se esperaba, tampoco hubo diferencias estadísticas significativas en el análisis de las muestra en *pool* o individualmente.

Las explotaciones de cerdo ibérico y blanco presentan ciertas diferencias en el ciclo productivo. En el presente estudio se ha evaluado por vez primera, la presencia de Norovirus tanto en razas de cerdo blanco como de cerdo ibérico. En cerdo blanco, este agente fue detectado en un 7,44 % de las muestras (29/390), mientras que, en cerdo ibérico, la frecuencia de detección fue del 31,08 % (23/74). Como se muestra en la [Figura 7](#), se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambos sistemas productivos, por lo que en nuestro estudio pudo asociarse el sistema de producción y la identificación de Norovirus (intensivo para cerdo blanco y extensivo o semi-extensivo para ibérico). Una mayor detección en cerdo ibérico puede deberse a una alta frecuencia de interacción entre fauna silvestre como jabalíes, y el porcino ibérico durante el período de montanera; siendo un riesgo en la posibilidad de transmisión de patógenos, tal como se indica en un estudio reciente sobre las interacciones fauna silvestre-ganadería en las explotaciones porcinas extensivas de cerdo ibérico en España durante la época de montanera (65). Aunque hasta el momento no se han descrito casos de Norovirus en jabalíes, es probable que también sean susceptibles al ser de la misma especie (*Sus scrofa*) como está pasando con otras enfermedades víricas como la Peste Porcina Clásica, que ha desencadenado una gran problemática en el continente (91).

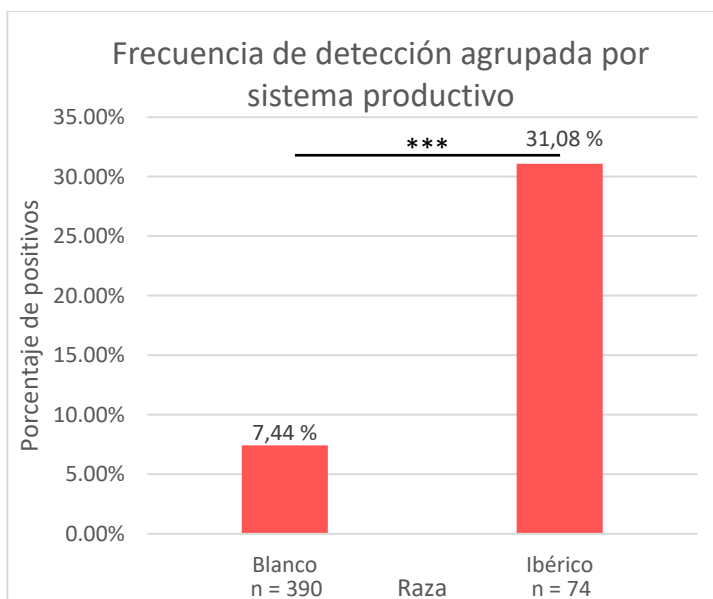


Figura 7: Frecuencia de detección de Norovirus porcino Genogrupo II en función del sistema productivo. Los resultados muestran la frecuencia relativa del número de positivos respecto al total de casos clínicos evaluados en cerdo blanco (n = 390) o ibérico (n = 74): *** indica diferencias estadísticamente significativas $p < 0,001$

Como se ha mencionado anteriormente tanto las granjas intensivas, predominantes en cerdo blanco, como las granjas de ibérico establecen un sistema de producción en fases. Por tanto, en este estudio se ha evaluado la asociación entre la fase del ciclo productivo diferenciado por raza y la detección del patógeno. En cerdo blanco, la mayor frecuencia de casos positivos, un 11,50 % (23/200), se observó en los animales en fase de cebo o engorde; seguido de cerdos en transición 2,27 % (2/88) y animales adultos (1,89 %; 1/52); mientras que no se encontró ningún caso positivo en lechones lactantes (0/33). Como se observa en la [Figura 8](#), se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la fase del cebo con respecto a las otras fases del ciclo productivo, a excepción de lactantes cuya diferencia tiende a la significación ($p = 0,052$). Nuestros resultados indican que al menos en razas de cerdo blanco, los animales en fase de cebo tienen una mayor predisposición a infectarse por este agente. Estos datos concuerdan con estudios previos y en sistemas productivos similares, que mostraron que los NoV porcinos se detectaron principalmente, si no exclusivamente, en animales en la fase de engorde o cebo (40,90,92). La razón por la que estos animales presentan una mayor probabilidad de ser positivos a este virus tendrá que ser investigada en futuros estudios.

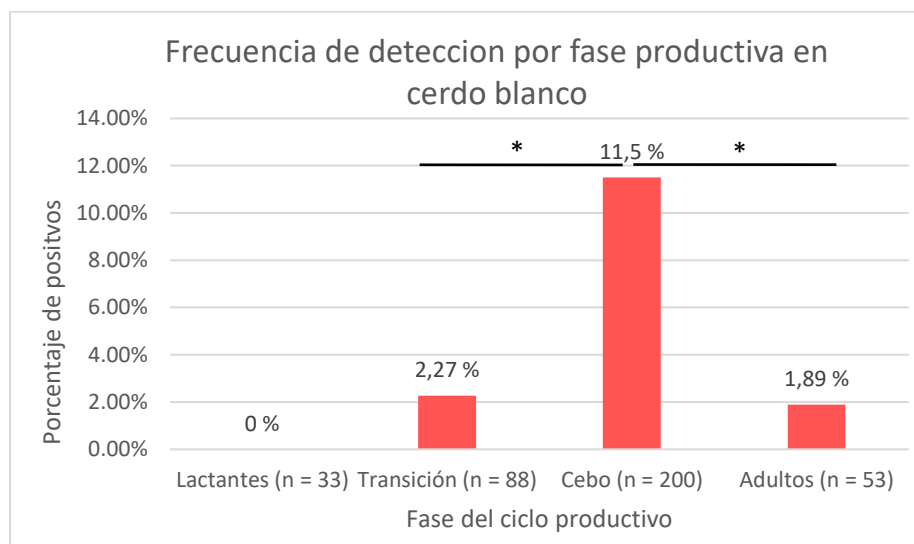


Figura 8: Frecuencia de detección de Norovirus porcino Genogrupo II en función de la fase productiva en cerdo blanco. Los resultados muestran la frecuencia relativa del número de positivos respecto al total de casos clínicos evaluados en cada una de las fases: lactantes, transición, cebo y adultos. * indica diferencias significativas $p < 0,05$ respecto a cebo. Los casos clínicos en los cuales no hubo datos suficientes para determinar la fase del ciclo productivo a la que pertenecían no se representan en esta gráfica ($n = 16$).

En las muestras procedentes de cerdo ibérico se detectaron frecuencias de infección relativamente altas en diferentes fases del ciclo productivo y en comparación con el cerdo blanco ([Figura 9](#)). La mayor frecuencia de detección de Norovirus fue encontrada en los animales destetados con un 42,86 % (3/7), seguido de los cerdos de cebo o engorde con 37,14 % (13/35) y los cerdos en fase de transición con

26,92 % (7/26). Por otro lado, en las muestras de lechones lactantes o de cerdo adulto ibérico, no se detectó el agente etiológico en estudio. Cabe mencionar que, a diferencia de lo observado en cerdo blanco, en el grupo de cerdo ibérico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la infección y la etapa del ciclo productivo. Sin embargo, es necesario realizar un estudio más amplio en este tipo de animales, para poder evaluar correctamente la presencia o ausencia de algún tipo de asociación.

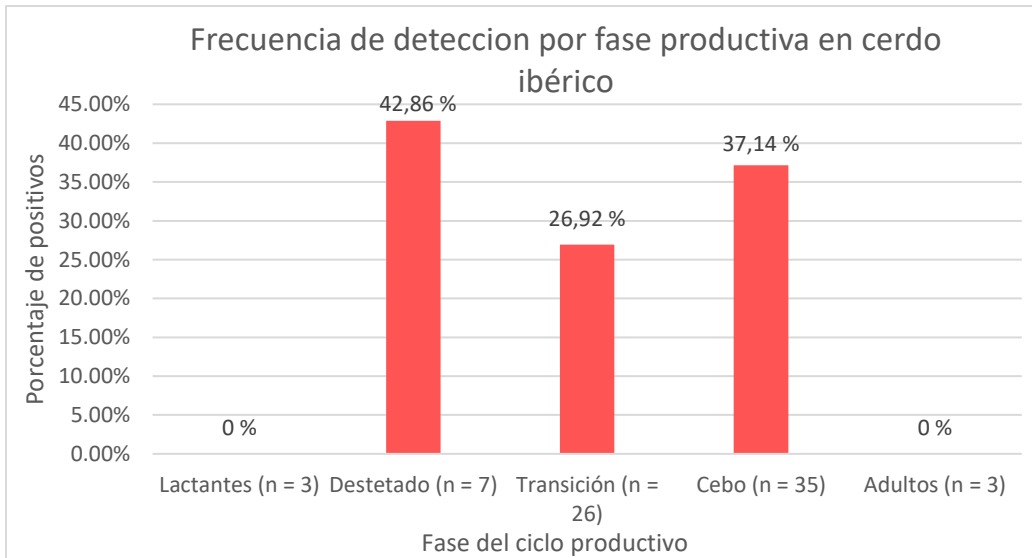


Figura 9: Frecuencia de detección de Norovirus porcino Genogrupo II en función de la fase productiva en cerdo blanco. Los resultados se muestran como frecuencia relativa del número de positivos respecto al total de casos clínicos evaluados en las diferentes fases.

Los estudios que evalúan la estacionalidad del Norovirus porcino son escasos. Encontramos investigaciones que describen una prevalencia mayor en primavera respecto a verano u otoño (42), mientras que otros muestran una prevalencia mayor durante el invierno (43). Por tanto, la estacionalidad del virus presenta cierta controversia en la epidemiología de la infección por este agente. Considerando estos datos, se procedió a evaluar la frecuencia de detección de Norovirus porcino en función de la estación en la que el laboratorio recibió la muestra; obteniéndose un 9,89 % (29/293) de positivos en invierno (21 de diciembre a 20 de marzo), 12,01 % (20/166) en primavera (20 de marzo a 21 de junio), 7,69 % (1/13) en verano (21 de junio a 23 de septiembre) y un 25 % (2/8) en otoño. El análisis demostró que no había diferencia estadística significativa entre las estaciones y la infección por Norovirus porcino; sin embargo, no es posible descartar algún tipo de asociación dado la diferencia de casos analizados en las distintas estaciones en nuestro estudio.

En cuanto a la distribución geográfica, en este estudio se encuentran representadas las Comunidades Autónomas con mayor número de explotaciones porcinas: Cataluña, Aragón, Navarra, País vasco, Valencia, Castilla León, Galicia, Murcia, Andalucía, Castilla la Mancha y La Rioja; siendo Aragón la comunidad más representada por la localización de la empresa. Las muestras positivas como podemos ver en la [Figura 10](#), se distribuyen principalmente en la Comunidad Autónoma de Extremadura con una frecuencia de identificación del virus de 36,67 % (22/60) y en la Comunidad Foral de Navarra (22,22 %, 2/9). Con porcentajes de detección similares encontramos Andalucía (9,52 %, 2/21), Comunidad Valenciana (7,69 %, 2/26), Aragón (7,48 %, 16/214), Castilla y León (6,82 %, 3/44) y por último Cataluña (5,88 %, 4/68). Por tanto, Norovirus porcino ha sido identificado en granjas de la mayoría de regiones evaluadas, predominando la zona suroeste donde encontramos la mayor parte del porcino ibérico, lo que concuerda con los datos previos, y en la zona noroeste con una gran producción en el sector porcino.

Frecuencia de detección molecular de Norovirus porcino GII en España



Figura 10: Distribución geográfica de la frecuencia de detección de Norovirus porcino Genogrupo II en función de la Comunidad Autónoma. Los resultados muestran la frecuencia relativa del número de positivos respecto al total de casos clínicos evaluados en las diferentes Comunidades Autónomas españolas. El porcentaje de casos positivos está representando en función de la escala de colores indicada. Aquellas CCAA que se encuentran en gris es que no han sido incluidas en este estudio. Mapa de formas creado con Power Bi (89).

Los procesos digestivos son de carácter multifactorial y pueden producirse por un gran número de agentes etiológicos, de hecho se han detectado casos de coinfección de Norovirus con otros patógenos tanto en porcino (52,93) como en humano (94). Por este motivo, en este estudio se evaluaron los resultados de un panel diagnóstico digestivo específico de porcino desarrollado por la empresa Exopol,

así como de otros agentes causantes de cuadros clínicos digestivos. Concretamente, se investigó la coinfección con: *Brachyspirasp*, *Br. hyodysenteriae*, *Br. intermedia*, *Br. pilosicoli*, *Clostridium* tipo A, *Entamoeba suis*, *Lawsonia intracelullaris*, PEDV (virus de la diarrea epidémica porcina), *Rotavirus* tipo A y *Salmonella entérica*.

En más de la mitad de las muestras positivas a Norovirus (51,92 %, 27/52) se detectó coinfección con al menos uno de los agentes patógenos evaluados, en un 28,85 % (15/52) se encontró coinfección con dos agentes y en solo 3 muestras (5,77 %) se identificaron otros 3 agentes causantes de procesos digestivos. En el restante 13,46 % (7/52) de las muestras, Norovirus fue el único agente identificado ([Tabla A.5.1, Anexo V](#)). Los casos de coinfección fueron observados principalmente con *Brachyspira hyosysenteriae* (33 %, 17/52) y *Lawsonia intracelullaris* (29 %, 15/52), dos agentes causantes de procesos digestivos muy comunes en cerdos en etapa de cebo o transición (95), con valores de Cq promedio bastante más bajos (26,87 y 26,92 respectivamente) que los encontrados para Norovirus. La mayor carga promedio de estos otros patógenos en las muestras con coinfección, sugieren su relevancia como principal agente causal del cuadro clínico digestivo. Sin embargo, considerando que en casi un 14 % de las muestras Norovirus fue el único patógeno detectado, es necesario realizar estudios más detallados para determinar el verdadero rol de este agente en los procesos digestivos del porcino. Cabe resaltar que en este estudio no se pudo evaluar la coinfección con *circovirus* porcino tipo 2 reportada en investigaciones previas (52,93) dado que este agente no se evalúa de rutina en los procesos digestivos. Por otro lado, aunque en humano la coinfección de Norovirus suele ser asociada principalmente a *Rotavirus A* (94), en nuestro estudio solo se encontró coinfección con este agente en el 8 % de las muestras (4/52).

5.3. Estudio filogenético de los genotipos de Norovirus porcino

5.3.1. Amplificación y secuenciación de Sanger de los genes *VP1* y *RdRp*

Con el propósito de conseguir información sobre la diversidad genética del Norovirus porcino circulante en la cabaña porcina nacional, se seleccionaron 39 muestras con un Cq < 35 para la secuenciación de los genes *VP1* y *RdRp*. La selección de muestras con Cqs tan altos, fue realizada debido a la escasa proporción de casos positivos con Cq < 32, que es lo recomendado para secuenciar considerando la carga viral del agente en la muestra.

Aunque se evaluaron los 7 protocolos de secuenciación previamente descritos en materiales y métodos, solo fue posible obtener productos de amplificación apropiados con los protocolos diseñados por el laboratorio. Concretamente funcionaron tres parejas de cebadores: NG1lf/NG2Rv4 que amplifica la

región de 300 pb de unión de 3' *RdRp* y 5' *VP1*, este mismo, pero con diferente cebador reverso NG1If/EXNG2R3 que amplifica aproximadamente 350 pb de la misma región y la pareja NG2Fw3/NG2Rv4 cuya secuencia diana es más grande (1 kb) y amplifica desde el inicio del gen *RdRp* hasta 5' *VP1*.

Tras la amplificación respectiva, se seleccionaron solo aquellas muestras que en el gel de electroforesis presentaban una banda única con el tamaño adecuado en función del par de oligonucleótidos elegidos para cada experimento (Figura 11). Debido al alto porcentaje de muestras con un Cq elevado, se obtuvo un producto correcto en el 48,71 % (19/39) de ellas. Estas muestras fueron enviadas a secuenciar y de ellas únicamente se pudo obtener una secuencia curada en siete casos (Anexo VI).

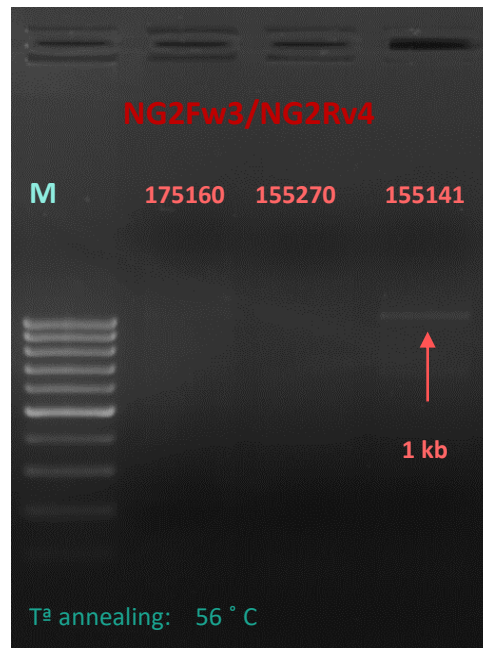


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos amplificados por PCR convencional para la región de unión de la cápside y la RNA polimerasa del Norovirus porcino Genogrupo II. A) El fragmento que aparece fue amplificado con los cebadores NG2Fw3/NG2Rv4 a una temperatura de *annealing* de 56°C con una fase de elongación a 72°C.

5.3.2. Determinación del subtipo de las muestras secuenciadas mediante herramientas bioinformáticas

Como se describe en el apartado [2.2.4 Diversidad genética y evolución](#), el genotipado de Norovirus puede realizarse en función de la secuencia del gen *VP1* y *RdRp*, en Genogrupo y Grupo P respectivamente. Para tal fin se usó la herramienta bioinformática *Norovirus Typing Tool Version 2.0* (85).

Para el gen *RdRp* se obtuvo tan solo una secuencia casi completa, correspondiente a la secuencia 150952_NVG2_RdRp_Huesca; mientras que el resto de secuencias fueron parciales y de la parte final de la región 3' de este gen. En el caso del gen *VP1*, solo se logró obtener secuencias parciales de la región 5' incluidas en la zona de unión de ambos genes (*RdRp-VP1*). Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, gracias a la herramienta bioinformática *Norovirus Typing Tool Version 2.0* (85), fue posible tipificar la polimerasa y la cápside en algunos casos. En las secuencias que no fue posible tipificar, es probable que se debiera a que la longitud de la secuencia no era lo suficientemente larga para asignar un genotipo o grupo P determinado (Tabla 8).

Tabla 8: Genotipado de las cepas de Norovirus porcino del estudio (n = 7) en base a la secuencia de la región de unión entre la polimerasa y la cápside. La nomenclatura de las secuencias se basa en el número de caso clínico seguido del NVG2 haciendo referencia a Norovirus Genogrupo II y de la provincia de la que procedencia.

Nombre	Longitud (pb)	Familia Género Genogrupo	Polimerasa (<i>RdRp</i>)	Cápside (<i>VP1</i>)
154710_NVG2_Navarra	304	Caliciviridae Norovirus GII	No se puede asignar	GII.11
155968_NVG2_Zaragoza	260	Caliciviridae Norovirus GII	GII.P18	GII.18
169856_NVG2_Salamanca	324	Caliciviridae Norovirus GII	GII.P18	GII.18
150952_NVG2_Huesca	1010	Caliciviridae Norovirus GII	No se puede asignar	GII.11
175980_NVG2_Huesca	304	Caliciviridae Norovirus GII	No se puede asignar	GII.11
155141_NVG2_Badajoz	659	Caliciviridae Norovirus GII	GII.P18	No se puede asignar
153762_NVG2_Zaragoza	257	Caliciviridae Norovirus GII	No se puede asignar	GII.11

Con la aplicación *Norovirus Typing Tool Version 2.0* (85) se determinó el genotipo de las secuencias 154710_NVG2_Navarra, 150952_NVG2_Huesca, 175980_NVG2_Huesca, 153762_NVG2_Zaragoza como GII.11 representando el 57,14 % (4/7) de las secuencias obtenidas en este estudio. Mientras, que las secuencias 155968_NVG2_Zaragoza, 169856_NVG2_Salamanca, y 155141_NVG2_Badajoz pertenecían al genotipo GII.18; cabe resaltar que en las dos primeras también fue posible identificar su grupo P correspondiendo a GII.P18. Estos resultados constituyen la primera descripción del genotipo de cepas de Norovirus porcino circulante en España.

En general, el estudio de secuenciación permitió obtener una aproximación a la diversidad genética existente de las cepas de Norovirus en nuestro país. Debido al bajo número de muestras secuenciadas no es posible inferir que el subtipo viral identificado sea representativo de las mismas en cada región. Si bien, el GII.11 aparece en las muestras del norte de España y el GII.18 aparece más en la zona suroeste, en la provincia de Zaragoza se detectó co-circulación de ambos tipos de Norovirus porcinos. Por otro lado, cabe resaltar que, aunque la mayor parte de muestras positivas procedían de la Comunidad Autónoma de Extremadura, solo fue posible obtener una secuencia de esta zona.

5.3.3. Análisis de homología nucleotídica entre las muestras secuenciadas

El grado de similitud nucleotídica existente entre las secuencias identificadas se evaluó mediante matrices de identidad realizadas con ayuda del programa SDT v1.2 (86). Para llevar a cabo este análisis se emplearon secuencias alineadas tanto de referencia como las obtenidas en el estudio con la misma longitud; concretamente una región de 256 pares de bases que se corresponde con la unión de los genes de la polimerasa (*RdRp*) y la cápside (*VP1*). No obstante, la secuencia 155141 procedente de Badajoz no fue incluida en el análisis, ya que solo fue posible secuenciar un fragmento parcial del gen *RdRP* el cual tenía muy poca zona en común con el resto de las secuencias obtenidas.

Los porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas de los virus secuenciados en el presente estudio y otras secuencias descritas en el *Genbank* (70) para Norovirus de origen porcino y humano, aparecen representados en la [Figura 12](#) y [Tabla 9](#). El análisis demostró porcentajes de identidad de entre un 78,5 % y un 98,4 % entre las cepas del estudio y refleja la diferencia nucleotídica entre los dos genotipos de Norovirus encontrados (GII.11 y GII.18).

En lo que respecta a la matriz de identidad, se observan dos zonas en las que hay secuencias con alto grado de identidad entre ellas y que se corresponden a los genotipos GII.11 y el genotipo GII.18 grupo GII.P18. Por otro lado, se observó también un grado de similitud relativamente bajo (79 % - 82,5 %) entre las muestras agrupadas en genotipos diferentes, es decir GII.11 y GII.18.

Al comparar las secuencias de las cepas del estudio con cepas de referencia de humano y porcino, encontramos unos porcentajes de similitud más bajos, comprendidos entre un 78,5 % y 84 %. Siendo las tres cepas de GII.11 más similares a la secuencia de Norovirus porcino HQ392821 (90,3% a 94,2%) que también es clasificada como GII.11. Algo similar se aprecia para las dos cepas GII.18 con la cepa de referencia de Norovirus porcino AY823304 del mismo genotipo. Por otro lado, al comparar las cepas del

estudio con las cepas de referencia de Norovirus humano (AY772730 y KX452703), se observó una menor identidad nucleotídica (79,4% a 84,0 %).

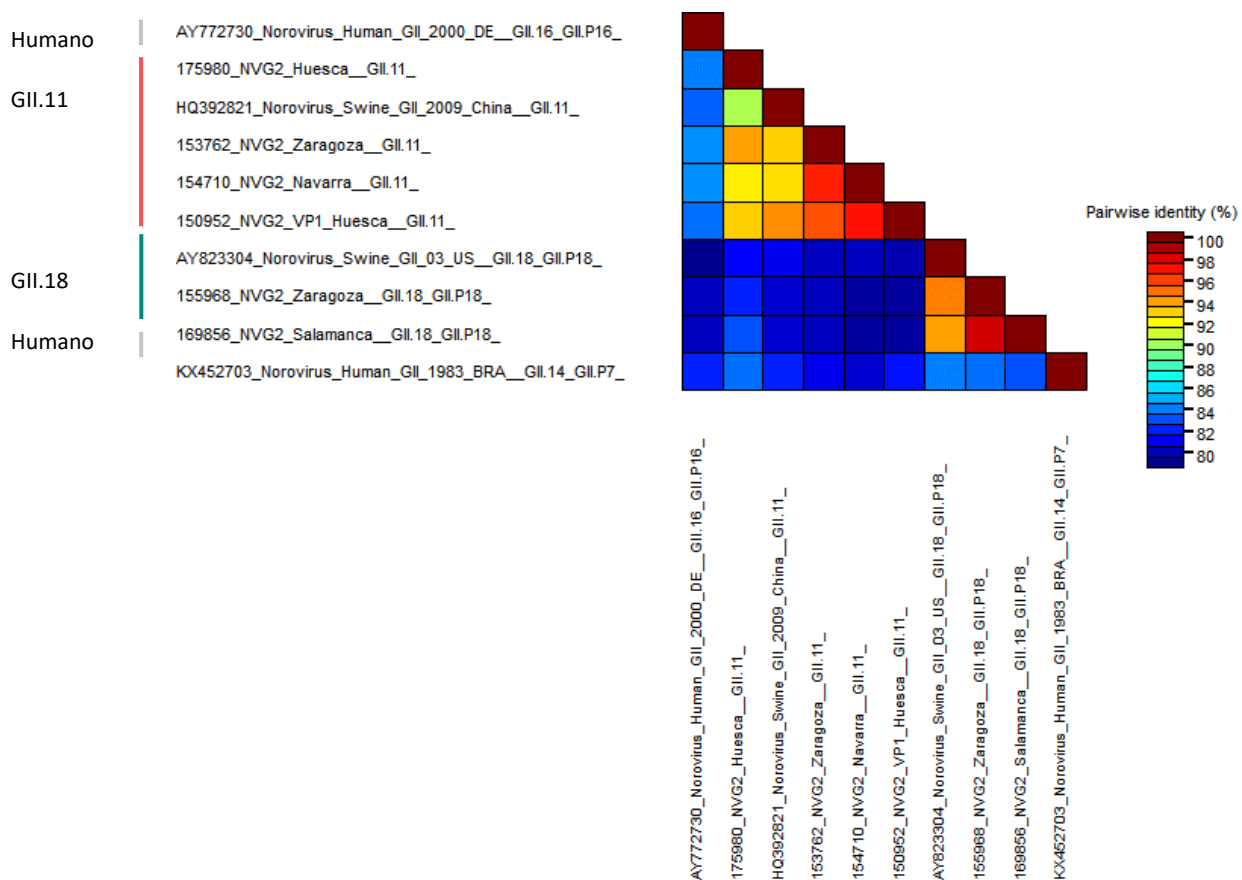


Figura 12. Matriz de identidad de las secuencias nucleotídicas (en porcentaje) de referencia y obtenidas en el estudio. La matriz fue generada con el programa SDTv1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso. Cada celda coloreada representa el porcentaje de identidad entre las secuencias de las dos muestras indicadas en los laterales.

Los porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas de los virus de tipo GII.11 aparecen en la [Tabla 9](#); el análisis demuestra que estas secuencias están más conservadas entre sí (90,3 % al 96,5 %). Sin embargo, a pesar del alto grado de identidad entre estas secuencias no es posible asegurar que sea una cepa viral emparentada, dado a que la región de unión del *RdRP* y *VP1* es una zona conservada del Norovirus.

En lo que respecta a las secuencias GII.18/GII.P18, éstas presentan un grado de similitud bastante alto, de entre un 93,8 % a un 98,4 % ([Tabla 9](#)). Por lo que el grado de similitud entre estas es bastante alto, siendo las muestras 155968 (Zaragoza) y 169856 (Salamanca) las que presentan una mayor identidad (98,4 %) de secuencia entre todas las analizadas.

Tabla 9. Matriz de identidad nucleotídica para las secuencias (en porcentaje) de Norovirus identificadas en el estudio y las secuencias de referencia porcinas y humanas. La matriz fue generada con el programa SDT v 1.2 mediante el alineamiento de las secuencias consenso (86).

Secuencia	AY772730	175980	HQ392821	153762	154710	150952	AY823304	155968	169856	KX452703
AY772730_Hu_GII.16_GII.P16	100									
175980_GII.11	83.7	100								
HQ392821_GII.11	82.9	90.3	100							
153762_GII.11	84.0	93.8	93.0	100.0						
154710_GII.11	84.0	92.2	92.6	96.5	100					
150952_GII.11	83.3	93.0	94.2	95.7	96.9	100				
AY823304_GII.18_GII.P18	78.5	80.9	80.5	79.7	79.7	79.3	100			
155968_GII.18_GII.P18	79.4	81.7	79.8	79.4	79.0	79.0	94.5	100		
169856_GII.18_GII.P18	79.4	82.5	79.8	79.4	79.0	79.0	93.8	98.4	100	
KX452703_Hu_GII.14_GII.P7	81.7	83.3	81.7	80.5	79.8	81.3	83.6	83.3	82.5	100

5.3.4. Análisis filogenético

Con el objetivo de analizar la diversidad evolutiva de los diferentes Norovirus GII circulantes en nuestro país, se realizó un análisis filogenético con 6 de las siete secuencias correspondientes a la unión de los genes *RdRp-VP1* obtenidas en el estudio ([Figura 13](#)) y también con otras secuencias de referencia ([Tabla A.2.1, Anexo II](#)) para cada genotipo descritas en la literatura, tanto de humano como de porcino ([Figura 14](#)). Para llevar a cabo este análisis, al igual que las matrices de identidad, se emplearon secuencias de 256 pb que comprendían la región de unión de la polimerasa y la cápside. Por este motivo, la secuencia 155141, procedente de Badajoz, tampoco se pudo incluir dado que su secuencia no abarcaba esta región sino la región 5' de *RdRp*.

En la [Figura 13](#) se muestra el árbol filogenético obtenido con las secuencias de España, en el cual encontramos dos grupos muy diferenciados que se corresponden con el GII.18 GII.P18 y el GII.11. Este filograma concuerda con lo esperado, ya que en otros estudios también se clasifican en distintos clusters (90,96). Atendiendo a los valores de *Bootstrap*, son bastante elevados, lo que demuestra la fiabilidad de la filogenia. En el caso de las secuencias obtenidas del genotipo GII.18, poseen un *Bootstrap* del 100 % debido a su alto porcentaje de identidad (98,4 %). En cuanto al grupo perteneciente al genotipo GII.11, la muestra número 5 (175980) procedente de Huesca es la más distinta dentro de ese genotipo, ya que el resto se agrupan en un mismo clúster con valor de *Bootstrap* de 99 %.

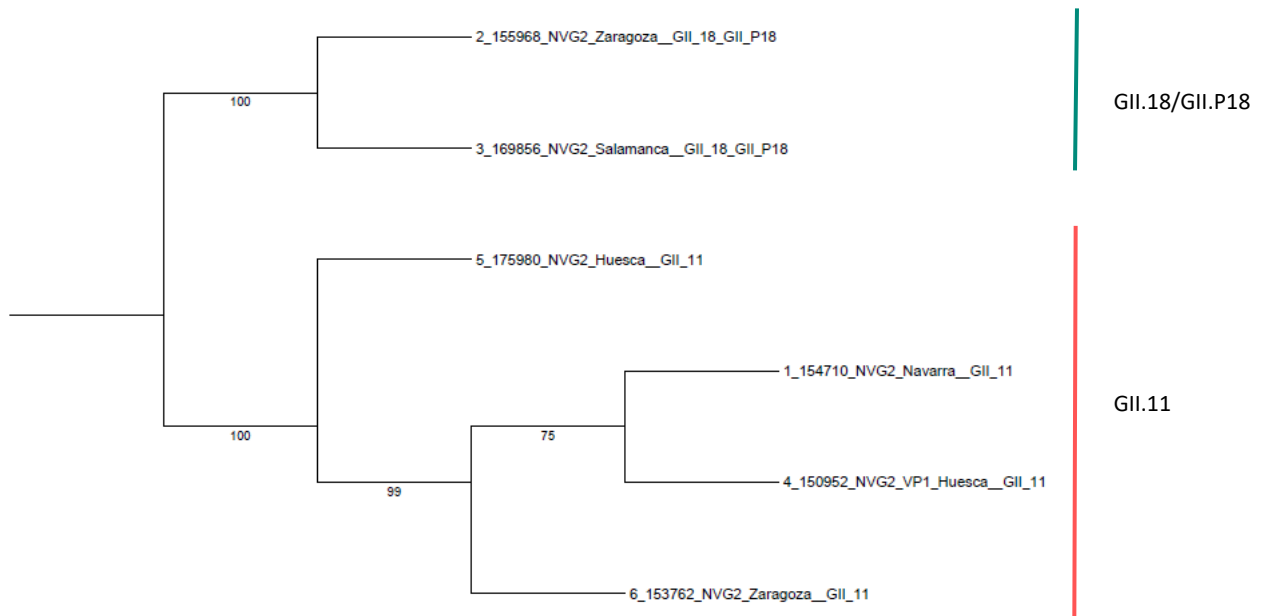


Figura 13. Análisis filogenético de las secuencias de la unión de *RdRp-VP1* obtenidas en España. El árbol filogenético se elaboró mediante el método *Neighbor-joining* y usando un *bootstrap* $n=1000$ cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas.

Cuando evaluamos el filograma obtenido con las secuencias del estudio y las de referencia ([Figura 14](#)), en primer lugar, se observan dos clados muy diferenciados dentro del Genogrupo II de Norovirus, el clado A correspondiente al GII.18-GII.P18 junto con una secuencia de humano (secuencia nº 12), y el clado B que agrupa el GII.11 y GII.19 porcino, así como el resto de secuencias humanas de referencia. Estudios filogenéticos previos usando el gen *RdRp*, han demostrado que este virus muestra una clara separación entre las cepas pertenecientes al tipo GII.P11 y tipo GII.P18. En nuestro filograma también observamos que las cepas identificadas con GII.P18 se agrupan en un mismo clado, el clado A, mientras que las secuencias GII.11 de nuestro estudio, en las cuales no se pudo asignar el tipo P, se agrupan junto con otras secuencias de referencia caracterizadas como GII.11_GII.P11 o solo GII.11 en el clado B.

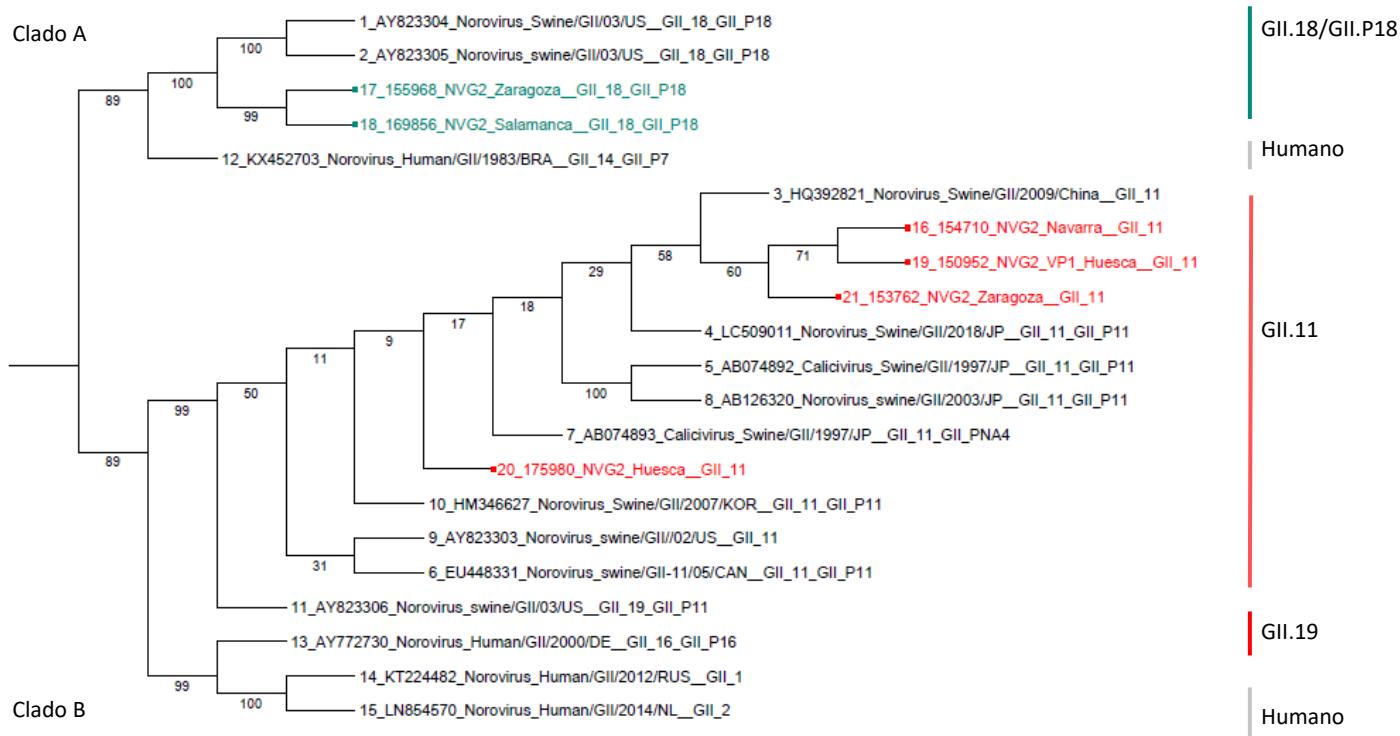


Figura 14. Análisis filogenético de las secuencias obtenidas en el estudio. El árbol filogenético se elaboró mediante el método y usando un *bootstrap* $n = 1000$ cuyos valores se muestran en porcentaje sobre las ramas. Las secuencias en rojo son las evaluadas en este estudio del GII.11, en verde claro aquellas que se han identificado como GII.18 GII.P18, y en verde oscuro la secuencia asignada como GII.P18 únicamente. El resto de secuencias son las cepas de referencia obtenidas de la base de datos GenBank ([Tabla A.2.1. del Anexo II](#)).

En concordancia con el análisis de identidad genética, dentro del clúster GII.18 GII.P18 del clado A, las secuencias obtenidas en este estudio número 13 y 14 se agrupan juntas formando un grupo monofilético debido a un valor de *Bootstrap* muy elevado (99 %). Por su parte, las secuencias de referencia también se encuentran dentro de un mismo grupo monofilético con un valor de *Bootstrap* alto (100 %). Tanto las de referencia como las obtenidas en nuestro estudio en el 100 % de las veces se agrupan dentro del mismo clúster. Por otro lado, en el clado A observamos una secuencia de Norovirus humano, que en lugar de agruparse con el resto de secuencias humanas se agrupa con las secuencias obtenidas de Norovirus porcino GII.18-GII.P18.

Respecto al clado B en el que se encuentran agrupadas una mayor diversidad de cepas, tanto humanas como porcinas, encontramos un subcluster con las secuencias de referencia de Norovirus humano (GII). Estas secuencias se agrupan en genotipos diversos (GII.1, GII.2 y GII.16) diferenciados de las secuencias de porcino. Por otro lado, encontramos un clúster con secuencias de Norovirus porcino.

Respecto a estas secuencias de porcino, encontramos diferenciada la secuencia del genotipo GII.19 (secuencia 11), por lo que este genotipo sería más cercano filogenéticamente al Norovirus porcino GII.11 que al GII.18, aunque presenten ciertas diferencias. Dentro del subcluster GII.11 encontramos que la secuencia 20 procedente de Huesca se encuentra más alejada filogenéticamente del resto de secuencias obtenidas en nuestro estudio con su mismo genotipo. En cuanto a las secuencias número 16 y 19 procedentes de Navarra y Huesca respectivamente, se sitúan en un mismo grupo monofilético dentro del árbol, con un valor de *Bootstrap* relativamente alto (71 %). Por otro lado, aunque no se haya podido determinar el grupo P en ninguna de las secuencias originadas en este trabajo del Genogrupo GII.11, su posición en el filograma sugiere que podrían presentar el grupo P GII.11 GII.P11.

La presencia de subgrupos genéticos distintos en una misma región sugiere la co-circulación de Norovirus porcinos con alta diversidad genética en la misma zona geográfica (19). Esto sucede con las muestras procedentes de Zaragoza, que presentan genogrupos distintos.

5.4. Discusión general

Norovirus ha sido ampliamente estudiado en humano, desde hace poco tiempo se le está prestando atención por su posible potencial zoonótico y su capacidad para infectar a un gran número de mamíferos, entre ellos el cerdo. A pesar de que en los últimos años se están realizando esfuerzos por investigar este virus en porcino (19), estos estudios de NoV GII siguen siendo escasos. Reforzar la vigilancia es sumamente necesario para explicar la evolución y ecología del Norovirus porcino (97). El presente trabajo ha permitido obtener una aproximación de la situación epidemiológica del Norovirus porcino en las granjas españolas. Para ello, se han analizado 480 muestras clínicas procedentes de casi todas las Comunidades Autónomas y se ha realizado una identificación y caracterización molecular del subtipo de los virus circulantes mediante RT-qPCR y secuenciación.

En este estudio, se ha logrado la identificación de Norovirus porcino en un 10,83 % de las muestras evaluadas; porcentaje similar a los obtenidos por Cavicchio y colaboradores (2020) de un 11,4 % en el norte de Italia y por Mauroy y colaboradores (2008) de 11,6 % en Bélgica, y concordante con los estudios europeos (0,5 – 18,9 %) (19). Estos valores tan diferentes en Europa podrían explicarse por las diferentes estrategias de muestreo, edades de los cerdos, o métodos de detección. Dada la diversidad de este agente, este último factor parece tener gran relevancia; de hecho varios estudios han propuesto el uso de varios pares de cebadores para aumentar la sensibilidad de la detección del NoV (49,98,99). En este estudio también hemos visto que el uso de ensayos basados en secuencias de Norovirus porcino incrementa la sensibilidad en comparación con ensayos basados en secuencias de Norovirus humano,

como el descrito por Da Silva y colaboradores (2007). Aunque, en general, las muestras positivas identificadas en nuestro estudio presentaban valores de Cq bastante elevados indicando pocas copias virales por reacción.

En el presente trabajo, estratificado por raza y fase del sistema productivo, se han observado diferencias estadísticamente significativas entre cerdo ibérico, y cerdo blanco; predominando el virus en cerdo ibérico. Por ende, se encontró un mayor número de muestras positivas en la Comunidad Autónoma de Extremadura. Es posible que en el sistema productivo de cerdo ibérico las interacciones con la fauna silvestre tenga algún tipo de rol, ya que se ha descrito como fuente de transmisión para otros patógenos virales en el porcino (65,91). Por otro lado, en cerdo blanco se detectó una frecuencia mayor en animales de cebo que concuerda con lo obtenido en otros estudios similares (40,90,92). Respecto a la estacionalidad del virus, esta investigación no ha encontrado diferencias significativas entre las estaciones de recogida de muestras. Este aspecto necesita ser más estudiado dado que los pocos estudios que hay son contradictorios (42,43). Finalmente, por medio de la identificación del virus, se observó que en la gran parte de muestras positivas existía una coinfección con otros agentes causantes de cuadros clínicos digestivos en porcino, tales como *Brachyspira hyosysenteriae* y *Lawsonia intracelullaris*.

Este trabajo describe por primera vez la circulación de la cepa GII.18 en cerdo en España, siendo ya el cuarto país en Europa en el que se diagnostica; anteriormente se ha identificado en Eslovenia, Alemania e Italia (96,97,99). Así mismo, también se ha detectado GII.11, lo que evidencia la co-circulación y variabilidad genética de este virus en nuestro país. Este hecho podría facilitar coinfecciones por distintas cepas de Norovirus de cerdo en la población porcina española, dando lugar a la aparición de virus recombinantes con diferentes propiedades genéticas y antigénicas en comparación con sus cepas parentales (100). Si bien, en la provincia de Zaragoza se ha identificado la circulación de ambos genotipos, es necesario realizar más estudios para determinar si es posible la coinfección de cepas con genotipos diferentes en una misma explotación.

En general, la secuenciación de las muestras, el estudio de identidad genética y la posterior realización de los árboles filogenéticos, nos permitió obtener una aproximación de la diversidad evolutiva del Norovirus porcino circulante en nuestro país.

Por último, si los NoV tienen el potencial de transmisión zoonótica, la detección de cepas circulantes y el seguimiento es crucial para limitar el potencial de futuras epidemias. Además, investigar si los niveles

de NoV porcinos están relacionados con la aparición de gastroenteritis en el personal expuesto, y de qué manera, ayudará a poner en práctica medidas de mitigación del riesgo de transmisión zoonótica (90).

El presente estudio representa un esfuerzo para poner en práctica el concepto de "One Health", investigando la presencia y distribución en la especie porcina de los Norovirus, que representan el principal patógeno de la gastroenteritis en el ser humano, y del que se dispone de poca información sobre el espectro de especies hospedadoras animales y de su ecología. La investigación científica en el sector de la virología veterinaria suele limitarse a patógenos que causan enfermedades epizooticas y/o notificables; desde la perspectiva "One Health", el estudio de los virus animales que infectan a los humanos, aunque no sean patógenos para los animales, debería recibir más atención por su potencial zoonótico.

6. Conclusiones

1. El presente estudio demuestra el uso de un ensayo de RT-qPCR para la identificación de Norovirus porcino Genogrupo II con una mejor sensibilidad que un protocolo previamente descrito para Norovirus GII en humanos.
2. La frecuencia de identificación de Norovirus porcino en nuestro país fue similar a estudios realizados en otros países europeos como Italia y Bélgica; encontrándose una frecuencia de detección significativamente mayor en los sistemas de producción de cerdo ibérico en comparación con las de cerdo blanco.
3. Este estudio describe por primera vez la circulación de cepas de Norovirus GII.11 y GII.18 en la cabaña porcina nacional. Así como la co-circulación de ambos genotipos en una misma provincia (Zaragoza).
4. El análisis filogenético y la comparación de identidad nucleotídica demuestran una gran diversidad de las cepas de Norovirus GII.11 y GII.18 en estudio; y corroboran estos genotipos como circulantes en el ganado porcino, tal como se describen en estudios previos.

7. Bibliografía

1. Chan MCW, Shan Kwan H, Chan PKS. Structure and Genotypes of Noroviruses. En: The Norovirus [Internet]. Elsevier; 2017 [citado 15 de mayo de 2022]. p. 51-63. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012804177200004X>
2. Vinjé J, Estes MK, Esteves P, Green KY, Katayama K, Knowles NJ, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *J. Gen. Virol.* 2019;100(11):1469-70.
3. de Graaf M, van Beek J, Koopmans MPG. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(7):421-33.
4. Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MSJ, Vinjé J. Novel Norovirus in Dogs with Diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16(6):3.
5. Di Martino B, Di Profio F, Melegari I, Sarchese V, Cafiero MA, Robetto S, et al. A novel feline norovirus in diarrheic cats. *Infect, Genet. Evol.* 2016;38:132-7.
6. Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol.* 1998;143(6):1215-21.
7. Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine Noroviruses Related to Human Noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(12):1874-81.
8. Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Sci.* 2003;299(5612):1575-8.
9. Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, et al. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet. Microbiol.* 2009;133(1-2):184-9.
10. Liu BL, Lambden PR, Günther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular Characterization of a Bovine Enteric Calicivirus: Relationship to the Norwalk-Like Viruses. *J Virol.* 1999;73(1):819-25.
11. Hu D, Zhu C, Wang Y, Ai L, Yang L, Ye F, et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Sci Rep.* 2017;7(1):10917.
12. Zahorsky, John. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr.* 1929;46:391-5.
13. Adler Jonathan L., Zickl Raymond. Winter Vomiting Disease. *J Infect Dis.* 1969;119(6):668-73.
14. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *J Virol.* 1972;10(5):1075-81.
15. Ghosh, S., Malik, Y.S., Kobayashi, N. Animal Caliciviruses [Internet]. Vol. Animal-Origin Viral Zoonoses. *Livestock Diseases and Management.* Singapore: Springer; 2020. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-981-15-2651-0_4
16. Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BVV, Estes MK. Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles. *J Virol.* 2002;76(8):4044-55.

17. Graziano VR, Walker FC, Kennedy EA, Wei J, Ettayebi K, Strine MS, et al. CD300lf is the primary physiologic receptor of murine norovirus but not human norovirus. Pierson TC, editor. *PLoS Pathog.* 2020;16(4):e1008242.
18. Chakravarty S, Hutson AM, Estes MK, Prasad BVV. Evolutionary Trace Residues in Noroviruses: Importance in Receptor Binding, Antigenicity, Virion Assembly, and Strain Diversity. *J Virol.* 2005;79(1):554-68.
19. Cavicchio L, Laconi A, Piccirillo A, Beato MS. Swine Norovirus: Past, Present, and Future. *Viruses.* 2022;14(3):537.
20. Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparac-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol.* 2000;74(14):6581-91.
21. Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(29):10327-32.
22. Olsper A, Hosmillo M, Chaudhry Y, Peil L, Truve E, Goodfellow I. Protein-RNA linkage and posttranslational modifications of feline calicivirus and murine norovirus VPg proteins. *PeerJ.* 2016;4:e2134.
23. Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: a Novel Function for the VP2 Protein. *J VIROL.* 2003;77:13.
24. Ludwig-Begall LF, Mauroy A, Thiry E. Noroviruses—The State of the Art, Nearly Fifty Years after Their Initial Discovery. *Viruses.* 2021;13(8):1541.
25. Lee S, Liu H, Wilen CB, Sychev ZE, Desai C, Hykes BL, et al. A Secreted Viral Nonstructural Protein Determines Intestinal Norovirus Pathogenesis. *Cell Host & Microbe.* 2019;25(6):845-857.e5.
26. Graziano VR, Wei J, Wilen CB. Norovirus Attachment and Entry. *Viruses.* 2019; 11(6):495.
27. Campillay-Véliz CP, Carvajal JJ, Avellaneda AM, Escobar D, Covián C, Kalergis AM, et al. Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response. *Front Immunol.* 2020;11:961.
28. Thorne LG, Goodfellow IG. Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 2014;95(2):278-91.
29. Farahmand M, Moghoofei M, Dorost A, Shoja Z, Ghorbani S, Kiani SJ, et al. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: A meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020. *Rev. Med. Virol.* [Internet]. 2021 [citado 17 de octubre de 2022];32(1). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2237>
30. Lucero Y, Matson DO, Ashkenazi S, George S, O’Ryan M. Norovirus: Facts and Reflections from Past, Present, and Future. *Viruses* 2021; 13(12), 2399.

31. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus Recombination in ORF1/ORF2 Overlap. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(7):1079-85.
32. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MCW, Green K, Martella V, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. of Gen. Virol.* 2019;14.
33. Villabruna N, Koopmans MPG, de Graaf M. Animals as Reservoir for Human Norovirus. *Viruses.* 2019;11(5):478.
34. Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA. Rapid Evolution of Pandemic Noroviruses of the GII.4 Lineage. Domingo E, editor. *PLoS Pathog.* 2010;6(3):e1000831.
35. Parra GI. Emergence of norovirus strains: A tale of two genes. *Virus Evol.* 2019;5(2):vez048.
36. Cannon JL, Barclay L, Collins NR, Wikswo ME, Castro CJ, Magaña LC, et al. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses. Tang YW, editor. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2208-21.
37. Menon VK, George S, Shanti AA, Saravanabavan A, Samuel P, Ramani S, et al. Exposure to Human and Bovine Noroviruses in a Birth Cohort in Southern India from 2002 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7):2391-5.
38. Mesquita JR, Costantini VP, Cannon JL, Lin S ching, Nascimento MSJ, Vinjé J. Presence of Antibodies against Genogroup VI Norovirus in Humans. *Virol J.* 2013;10(1):176.
39. Widdowson MA, Rockx B, Schepp R, van der Poel WHM, Vinje J, van Duynhoven YT, et al. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol.* 2005;76(1):119-28.
40. Chao DY, Wei JY, Chang WF, Wang J, Wang LC. Detection of Multiple Genotypes of Calicivirus Infection in Asymptomatic Swine in Taiwan: Multiple Genotypes of Noroviruses Co-Circulate in Swine. *Zoonoses and Public Health.* 2012;59(6):434-44.
41. Lopman B, Armstrong B, Atchison C, Gray JJ. Host, Weather and Virological Factors Drive Norovirus Epidemiology: Time-Series Analysis of Laboratory Surveillance Data in England and Wales. Pybus OG, editor. *PLoS ONE.* 2009;4(8):e6671.
42. Wang QH, Chang KO, Han MG, Sreevatsan S, Saif LJ. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods.* 2006;132(1-2):135-45.
43. Silva PFN, Alfieri AF, Barry AF, de Arruda Leme R, Gardinali NR, van der Poel WHM, et al. High frequency of porcine norovirus infection in finisher units of Brazilian pig-production systems. *Trop Anim Health Prod.* 2015;47(1):237-41.
44. van der Poel WHM, Vinjé J, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MPG. Norwalk-Like Calicivirus Genes in Farm Animals. *Emerg Infect Dis.* 2000;6(1):36-41.

45. Davidson I, Stamelou E, Giantsis IA, Papageorgiou KV, Petridou E, Kritas SK. The Complexity of Swine Caliciviruses. A Mini Review on Genomic Diversity, Infection Diagnostics, World Prevalence and Pathogenicity. *Pathogens*. 2022;11(4):413.
46. Wang QH, Costantini V, Saif LJ. Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine*. 2007;25(30):5453-66.
47. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(1):134-64.
48. Di Felice E, Mauroy A, Pozzo FD, Thiry D, Ceci C, Di Martino B, et al. Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea diagnosis. *Vet. J.* 2016;207:53-62.
49. Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Miry C, Ziant D, Thys C, et al. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Arch Virol*. 2008;153(10):1927-31.
50. Pinto P, Wang Q, Chen N, Dubovi EJ, Daniels JB, Millward LM, et al. Discovery and Genomic Characterization of Noroviruses from a Gastroenteritis Outbreak in Domestic Cats in the US. Thiel V, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e32739.
51. Mesquita JR, Nascimento MSJ. Gastroenteritis Outbreak Associated With Faecal Shedding of Canine Norovirus in a Portuguese Kennel Following Introduction of Imported Dogs From Russia: Canine Norovirus Outbreak. *Transbound Emerg Dis*. 2012;59(5):456-9.
52. Shulman LM, Davidson I. Viruses with Circular Single-Stranded DNA Genomes Are Everywhere! *Annu Rev Virol*. 2017;4(1):159-80.
53. Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(10):2529-34.
54. Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DWG, et al. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch. Virol*. 1996;141(11):2225-35.
55. Richards GP, Watson MA, Kingsley DH. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. *J. Virol. Methods*. 2004;116(1):63-70.
56. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1548-57.
57. Farkas T, Nakajima S, Sugieda M, Deng X, Zhong W, Jiang X. Seroprevalence of Noroviruses in Swine. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):657-61.
58. Netzler NE, Enosi Tuipulotu D, White PA. Norovirus antivirals: Where are we now? *Med Res Rev*. 2019;39(3):860-86.
59. Giersing BK, Modjarrad K, Kaslow DC, Moorthy VS, Bavdekar A, Cichutek K, et al. Report from the World Health Organization's Product Development for Vaccines Advisory Committee (PDVAC) meeting, Geneva, 7–9th Sep 2015. *Vaccine*. 2016;34(26):2865-9.

60. Tan M. Norovirus Vaccines: Current Clinical Development and Challenges. *Pathogens*. 2021;10(12):1641.
61. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Bioseguridad [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/bioseguridad-buenas-practicas/>
62. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Bioseguridad en el sector porcino [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/bioseguridad-buenas-practicas/porcino_bioseg.aspx
63. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Porcino [Internet]. [citado 19 de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/>
64. de Andrés M.A, Aparicio M, Piñeiro C. Cerdo blanco e ibérico, ¿son tan diferentes? 2014 [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/cerdo-blanco-e-iberico-¿son-tan-diferentes_33070/
65. Triguero-Ocaña R, Laguna E, Jiménez-Ruiz S, Fernández-López J, García-Bocanegra I, Barasona JÁ, et al. The wildlife-livestock interface on extensive free-ranging pig farms in central Spain during the “montanera” period. *Transbound Emerg Dis*. 2021;68(4):2066-78.
66. Paramio MT, Manteca X, Piedrafita J, Izquierdo MD, Gasa J, Mateu E, et al. “MANEJO Y PRODUCCIÓN DE PORCINO” Breve manual de aproximación a la empresa porcina para estudiantes de veterinaria. Departament de Ciència Animal i dels Aliments Unitat de Ciència Animal Facultat de Veterinària UAB. 2000;52.
67. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico. Sec. 1, 10 ene 11, 2014 p. 1569-85.
68. Rohayem J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin. Microbiol. Infect.*. 2009;15(6):524-7.
69. Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*. 2005;123(1):1-7.
70. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2012;41(D1):D36-42.
71. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform*. 2019;20(4):1160-6.
72. de Blas I, Ruiz-Zarzuela A, Vallejo A. WinEpi : Working in epidemiology. An online epidemiological tool. En: ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Theme 4 - Tools & training for epidemiologists: Poster session session. Cairns (Australia); 2006.

73. Ruiz-Villalba A, Ruijter JM, van den Hoff MJB. Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life*. 2021;11(6):496.
74. Wollants E, De Coster S, Van Ranst M, Maes P. A decade of norovirus genetic diversity in Belgium. *Infect. Genet. and Evol.* 2015;30:37-44.
75. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods*. 2002;100(1-2):107-14.
76. Andrade JSR, Fumian TM, Leite JPG, Assis MR de, Bello G, Mir D, et al. Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015. *Infect. Genet. Evol.* 2017;51:28-32.
77. Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-Like Virus Sequences in Mineral Waters: One-Year Monitoring of Three Brands. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(4):1925-31.
78. Kabue JP, Meader E, Hunter PR, Potgieter N. Genetic characterisation of Norovirus strains in outpatient children from rural communities of Vhembe district/South Africa, 2014–2015. *J. Clin. Microbiol.* 2017;94:100-6.
79. Vinje J, Koopmans MPG. Molecular Detection and Epidemiology of Small Round-Structured Viruses in Outbreaks of Gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* 1996;174(3):610-5.
80. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Methods*. 1999;83(1-2):145-54.
81. Chromas | Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia [Internet]. 2018 [citado 24 de noviembre de 2022]. Disponible en: <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>
82. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *J. Bioinform.* 2012;28(8):1166-7.
83. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server):W5-9.
84. Han MV, Zmasek CM. phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. *BMC Bioinform.* 2009;10(1):356.
85. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H v. d., Peñaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* 2011;51(2):121-5.
86. Muhire BM, Varsani A, Martin DP. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. Kuhn JH, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e108277.
87. PSPP [Internet]. GNU Project - Free Software Foundation 2022 [citado 24 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.gnu.org/software/pspp/>
88. Microsoft Excel [Internet]. [citado 24 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.microsoft.com/es-es/microsoft-365/excel>

89. Knight D, Knight B, Pearson M, Quintana M, Powell B. Microsoft Power BI Complete Reference: Bring your data to life with the powerful features of Microsoft Power BI. Packt Publishing Ltd; 2018. 780 p.
90. Cavicchio L, Tassoni L, Laconi A, Cunial G, Gagliazzo L, Milani A, et al. Unrevealed genetic diversity of GII Norovirus in the swine population of North East Italy. *Sci Rep.* 2020;119(6):9217.
91. Gortázar C, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K, Vicente J. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *Eur J Wildl Res.* 2007;53(4):241-56.
92. Wang QH, Souza M, Funk JA, Zhang W, Saif LJ. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2057-62.
93. Shen Q, Zhang W, Yang S, Yang Z, Chen Y, Cui L, et al. Recombinant porcine norovirus identified from piglet with diarrhea. *BMC Vet. Res.* 2012;8(1):155.
94. Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Jee YM. Coinfection of Viral Agents in Korean Children with Acute Watery Diarrhea. *J Korean Med Sci.* 2008;23(6):937-40.
95. Herbst W, Willems H, Baljer G. Distribution of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in healthy and diarrhoeic pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2004;117(11-12):493-8.
96. Machnowska P, Ellerbroek L, John R. Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet Microbiol.* 2014;168(1):60-8.
97. Laconi A, Cavicchio L, Tassoni L, Cunial G, Milani A, Ustulin M, et al. Identification of two divergent swine Noroviruses detected at the slaughterhouse in North East Italy. *Porc Health Manag.* 2020;6(1):9.
98. Cunha JB, de Mendonça MCL, Miagostovich MP, Leite JPG. First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America. *Res. Vet. Sci.* 2010;89(1):126-9.
99. Mijovski JZ, Poljšak-Prijatelj M, Steyer A, Barlič-Maganja D, Koren S. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infect. Genet. Evol.* 2010;10(3):413-20.
100. Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol.* 2013;87(11):6270-82.

Anexos

❖ Anexo I

Tabla A.1.1. Descripción de la procedencia, edad del animal, categoría, el tipo de muestra y su procedimiento clínicos de los casos seleccionados para este estudio. Se han excluido de la tabla aquellas muestras que o bien no se conoce su procedencia o pertenecen a Portugal (n = 4).

Muestra	Provincia	Edad	Categoría	Tipo de muestra	Procesamiento
1	Lleida	Lactantes	Blanco	Heces	Individual
2	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
3	Huesca	Lactantes	Blanco	Tejido digestivo	Pool
4	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Heces	Pool
5	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Heces	Individual
6	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Heces	Individual
7	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Heces	Pool
8	Zaragoza	Transición	Blanco	Heces	Individual
9	Barcelona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
10	Huesca	Cebo	Blanco	Heces	Pool
11	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
12	Ávila	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
13	Zaragoza	Transición	Blanco	Heces	Pool
14	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
15	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
16	Badajoz	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
17	Badajoz	Transición	ND	Hisopos	Pool
18	Teruel	Cebo	Blanco	Heces	Individual
19	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
20	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
21	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
22	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
23	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
24	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
25	Girona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
26	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
27	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
28	Ávila	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
29	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
30	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
31	Zaragoza	Transición	Blanco	Heces	Pool
32	Ávila	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
33	León	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
34	Teruel	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
35	Barcelona	Transición	Blanco	Heces	Pool

36	Zaragoza	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
37	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
38	Zaragoza	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
39	Lleida	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
40	Badajoz	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
41	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
42	Murcia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
43	Salamanca	Transición	ND	Hisopos	Pool
44	Huesca	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
45	Barcelona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
46	Lleida	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Individual
47	Ávila	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
48	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
49	Cáceres	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
50	Barcelona	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
51	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
52	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
53	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
54	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
55	Barcelona	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Individual
56	Huesca	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
57	Sevilla	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
58	Zaragoza	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Individual
59	Castellón	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
60	Murcia	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
61	Murcia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
62	Girona	Transición	Blanco	Hisopos	Individual
63	Girona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
64	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
65	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Pool
66	Huesca	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
67	Sevilla	Transición	Blanco	Hisopos	Individual
68	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
69	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
70	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
71	Castellón	Cebo	Blanco	Heces	Individual
72	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
73	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
74	Huesca	Cebo	Blanco	Heces	Individual
75	Huesca	Cebo	Blanco	Heces	Pool
76	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool

77	Huesca	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
78	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Pool
79	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
80	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
81	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
82	Badajoz	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
83	Teruel	Cebo	Blanco	Heces	Individual
84	Ávila	Cebo	ND	Hisopos	Pool
85	Barcelona	Cebo	Blanco	Heces	Individual
86	Huesca	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
87	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
88	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
89	Murcia	Adultos	Blanco	Hisopos	Individual
90	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
91	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
92	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Pool
93	Lleida	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Individual
94	Lleida	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Individual
95	Lleida	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
96	Badajoz	Transición	Blanco	Heces	Pool
97	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
98	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
99	Ávila	Lactantes	Blanco	Heces	Pool
100	Barcelona	Lactantes	Blanco	Tejido digestivo	Individual
101	Lleida	Cebo	Blanco	Heces	Individual
102	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
103	Lleida	Lactantes	Blanco	Heces	Individual
104	Lleida	Lactantes	Blanco	Tejido digestivo	Individual
105	Teruel	Adultos	Blanco	Hisopos	Individual
106	Segovia	Transición	Blanco	Heces	Pool
107	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
108	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
109	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
110	Girona	Cebo	Blanco	Heces	Individual
111	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
112	Navarra	Cebo	Blanco	Heces	Individual
113	Ávila	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
114	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
115	Albacete	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
116	Salamanca	Cebo	ND	Heces	Individual
117	Huelva	Cebo	Ibérico	Heces	Pool

118	Huesca	Cebo	Blanco	Heces	Individual
119	Madrid	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
120	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
121	Valladolid	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
122	Huesca	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
123	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
124	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
125	Lleida	Cebo	Blanco	Heces	Individual
126	Badajoz	Transición	ND	Tejido digestivo	Individual
127	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
128	Badajoz	Transición	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
129	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
130	Valencia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
131	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Pool
132	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
133	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
134	Gipuzkoa	Cebo	Blanco	Heces	Individual
135	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
136	Navarra	Adultos	Blanco	Heces	Individual
137	Huesca	Adultos	Blanco	Heces	Pool
138	Barcelona	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
139	Navarra	Cebo	Blanco	Heces	Pool
140	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
141	Córdoba	Cebo	Blanco	Heces	Individual
142	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
143	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Individual
144	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
145	Navarra	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
146	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
147	Navarra	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
148	Badajoz	Transición	Blanco	Heces	Pool
149	Badajoz	Transición	Blanco	Heces	Pool
150	Sevilla	Lactantes	Ibérico	Heces	Pool
151	Huesca	Lactantes	Blanco	Heces	Individual
152	Huesca	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
153	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
154	Burgos	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
155	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
156	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
157	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
158	Albacete	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool

159	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
160	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
161	Badajoz	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
162	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
163	Navarra	Cebo	Blanco	Heces	Individual
164	Teruel	Lactantes	Blanco	Heces	Pool
165	Zaragoza	Cebo	ND	Hisopos	Individual
166	Zaragoza	Cebo	ND	Hisopos	Individual
167	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
168	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
169	Barcelona	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
170	Sevilla	Adultos	Ibérico	Heces	Individual
171	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
172	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
173	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
174	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
175	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
176	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
177	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
178	Toledo	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
179	Girona	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
180	Cádiz	Lactantes	Ibérico	Hisopos	Pool
181	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
182	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
183	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
184	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
185	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
186	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
187	Valladolid	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
188	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
189	Sevilla	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
190	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
191	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
192	Badajoz	Cebo	Ibérico	Heces	Pool
193	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
194	Teruel	Cebo	Blanco	Heces	Pool
195	Badajoz	Transición	Blanco	Heces	Pool
196	Huesca	Cebo	Blanco	Heces	Pool
197	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
198	Segovia	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
199	Lleida	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual

200	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
201	Zaragoza	Cebo	Blanco	Calzas	Pool
202	Zaragoza	Lactantes	Blanco	Tejido digestivo	Pool
203	La Rioja	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
204	Barcelona	Lactantes	Blanco	Tejido digestivo	Pool
205	Lleida	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
206	Badajoz	Destetado	Ibérico	Heces	Pool
207	Girona	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
208	Ávila	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
209	Huesca	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
210	Segovia	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
211	Huesca	Lactantes	Blanco	Tejido digestivo	Pool
212	Huesca	Lactantes	Blanco	Tejido digestivo	Pool
213	Badajoz	Destetado	Ibérico	Hisopos	Pool
214	Badajoz	Destetado	Ibérico	Hisopos	Pool
215	Badajoz	Destetado	Ibérico	Heces	Pool
216	Badajoz	Destetado	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
217	Valladolid	Destetado	Ibérico	Hisopos	Pool
218	Badajoz	Lactantes	Ibérico	Hisopos	Pool
219	Badajoz	Lactantes	Ibérico	Hisopos	Pool
220	Zaragoza	ND	Blanco	Hisopos	Individual
221	Huesca	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
222	Murcia	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
223	Barcelona	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
224	Huesca	ND	Blanco	Hisopos	Pool
225	Zaragoza	Transición	Blanco	Heces	Individual
226	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Pool
227	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
228	Badajoz	Transición	Ibérico	Heces	Individual
229	Huesca	ND	Blanco	Hisopos	Pool
230	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
231	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
232	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
233	Zaragoza	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Pool
234	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Individual
235	Huesca	Cebo	Blanco	Heces	Individual
236	Zaragoza	ND	Blanco	Hisopos	Pool
237	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
238	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
239	Ávila	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
240	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool

241	Madrid	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
242	Cádiz	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
243	Salamanca	Adultos	Blanco	Heces	Individual
244	Madrid	Adultos	Blanco	Tejido digestivo	Individual
245	Madrid	Adultos	Blanco	Tejido digestivo	Individual
246	Huesca	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
247	Huesca	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
248	Alicante	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
249	Castellón	Cebo	Blanco	Heces	Individual
250	Burgos	Adultos	Blanco	Heces	Individual
251	Segovia	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
252	Girona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
253	Tarragona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
254	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Individual
255	Huesca	Transición	Blanco	Heces	Individual
256	Zaragoza	Transición	Blanco	Heces	Individual
257	Sevilla	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
258	Badajoz	Adultos	Ibérico	Hisopos	Pool
259	Girona	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
260	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
261	Burgos	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
262	Ávila	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
263	Barcelona	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Pool
264	Burgos	Adultos	Blanco	Heces	Individual
265	Madrid	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
266	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
267	Murcia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
268	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
269	Huesca	Cebo	Blanco	Heces	Pool
270	Lleida	ND	Blanco	Heces	Individual
271	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
272	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
273	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
274	Madrid	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
275	Girona	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
276	Madrid	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
277	Huesca	Adultos	Blanco	Heces	Pool
278	Castellón	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Pool
279	Alicante	Transición	Blanco	Hisopos	Individual
280	Badajoz	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
281	Barcelona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool

282	Zamora	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
283	Barcelona	Adultos	Blanco	Heces	Individual
284	Burgos	ND	Blanco	Heces	Pool
285	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
286	Girona	Adultos	Blanco	Heces	Pool
287	Barcelona	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
288	Soria	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Pool
289	Badajoz	Transición	Ibérico	Heces	Individual
290	Valencia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
291	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
292	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
293	Segovia	Cebo	Blanco	Calzas	Pool
294	Salamanca	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
295	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
296	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
297	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
298	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
299	Huesca	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
300	Madrid	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
301	Salamanca	Transición	Ibérico	Heces	Individual
302	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
303	Barcelona	Cebo	Blanco	Heces	Pool
304	Salamanca	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
305	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Individual
306	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Individual
307	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
308	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
309	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
310	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
311	Barcelona	Transición	Blanco	Heces	Individual
312	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
313	Almería	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
314	Cáceres	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
315	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
316	Soria	Cebo	Blanco	Heces	Individual
317	Álava	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
318	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
319	Sevilla	Cebo	Blanco	Heces	Pool
320	Girona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
321	Huesca	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
322	Navarra	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Pool

323	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
324	Bizkaia	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Individual
325	Valladolid	Cebo	ND	Hisopos	Pool
326	Segovia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
327	Girona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
328	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
329	Pontevedra	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
330	Murcia	ND	ND	Heces	Individual
331	Navarra	Cebo	Blanco	Heces	Pool
332	Murcia	ND	ND	Heces	Individual
333	Badajoz	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
334	Burgos	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
335	Badajoz	Transición	Ibérico	Heces	Pool
336	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
337	Teruel	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
338	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
339	Murcia	Cebo	ND	Hisopos	Pool
340	Salamanca	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
341	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
342	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
343	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
344	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
345	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
346	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
347	Badajoz	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
348	Teruel	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
349	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
350	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
351	Soria	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
352	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
353	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
354	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
355	Lleida	ND	Blanco	Heces	Individual
356	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
357	Barcelona	Cebo	Blanco	Heces	Individual
358	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
359	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
360	Zaragoza	Adultos	Blanco	Heces	Individual
361	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
362	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
363	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool

364	Zaragoza	Transición	Blanco	Heces	Pool
365	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
366	Valencia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
367	Huesca	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
368	Lleida	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
369	Lleida	Cebo	Blanco	Heces	Individual
370	Lleida	Cebo	Blanco	Heces	Individual
371	Salamanca	Adultos	Blanco	Heces	Pool
372	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
373	Lleida	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
374	Barcelona	Adultos	Blanco	Heces	Individual
375	Huesca	Adultos	Blanco	Hisopos	Individual
376	Barcelona	Adultos	Blanco	Heces	Individual
377	Ávila	Lactantes	Blanco	Hisopos	Pool
378	Madrid	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
379	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
380	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
381	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
382	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Pool
383	Barcelona	Adultos	Blanco	Heces	Individual
384	Barcelona	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
385	Badajoz	Adultos	Ibérico	Hisopos	Pool
386	Teruel	ND	Blanco	Tejido digestivo	Individual
387	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
388	Segovia	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
389	Badajoz	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
390	Lleida	ND	Blanco	Heces	Individual
391	Badajoz	Cebo	Ibérico	Hisopos	Pool
392	Valencia	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
393	Sevilla	Cebo	Ibérico	Heces	Pool
394	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
395	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
396	Barcelona	Transición	Blanco	Heces	Pool
397	Lleida	ND	Blanco	Heces	Individual
398	Zaragoza	ND	Blanco	Hisopos	Pool
399	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
400	Zaragoza	ND	Blanco	Hisopos	Pool
401	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
402	Toledo	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Pool
403	Toledo	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Pool
404	Toledo	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Pool

405	Barcelona	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
406	Barcelona	Cebo	ND	Heces	Pool
407	Barcelona	Cebo	ND	Heces	Pool
408	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
409	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
410	Lleida	ND	Blanco	Heces	Individual
411	Ávila	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
412	Córdoba	ND	ND	Heces	Pool
413	Lleida	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
414	Lleida	Destetado	Blanco	Hisopos	Pool
415	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
416	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
417	Coruña, A	Lactantes	Blanco	Heces	Individual
418	Lleida	ND	Blanco	Heces	Individual
419	Lleida	ND	Blanco	Heces	Individual
420	Valencia	Cebo	Blanco	Heces	Pool
421	Cáceres	Transición	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
422	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
423	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
424	Málaga	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
425	Madrid	Adultos	Blanco	Tejido digestivo	Pool
426	Madrid	Adultos	Blanco	Heces	Individual
427	Huelva	Transición	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
428	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
429	Zaragoza	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
430	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
431	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
432	Zaragoza	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
433	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
434	Sevilla	Transición	Ibérico	Tejido digestivo	Individual
435	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
436	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
437	Álava	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
438	Castellón	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
439	Castellón	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
440	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
441	Barcelona	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
442	Badajoz	Transición	Ibérico	Hisopos	Pool
443	Córdoba	Transición	Ibérico	Heces	Pool
444	Soria	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
445	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool

446	Valencia	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
447	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
448	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
449	Huesca	Cebo	Blanco	Heces	Individual
450	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Individual
451	Valladolid	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
452	Zaragoza	Cebo	Blanco	Heces	Pool
453	Lleida	Cebo	Blanco	Heces	Individual
454	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
455	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
456	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
457	Zaragoza	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
458	Barcelona	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
459	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
460	Zaragoza	Cebo	Blanco	Tejido digestivo	Individual
461	Barcelona	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
462	Sevilla	Adultos	Blanco	Hisopos	Pool
463	Málaga	Transición	Ibérico	Heces	Individual
464	Zaragoza	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
465	Valencia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
466	Valencia	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
467	Badajoz	Cebo	Ibérico	Tejido digestivo	Pool
468	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
469	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
470	Valencia	Transición	Blanco	Hisopos	Pool
471	Lugo	Transición	Blanco	Tejido digestivo	Pool
472	Teruel	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool
473	Navarra	Transición	Blanco	Heces	Individual
474	Castellón	Cebo	Blanco	Hisopos	Individual
475	Huelva	Cebo	Ibérico	Heces	Individual
476	Huesca	Cebo	Blanco	Hisopos	Pool

❖ Anexo II

Tabla A.2.1. Secuencias de referencia seleccionadas para la realización del árbol filogenético de norovirus basadas en la cápside. Todas las secuencias se encuentran depositadas en la base de datos GenBank.

Número de acceso GenBank	Especie	Genogrupo según la cápside	Región Geográfica
AY823304	Porcino	GII.18	E.E.U. U
AY823305	Porcino	GII.18	E.E.U. U
HQ392821	Porcino	GII.11/GII.19	China
LC509011	Porcino	GII.11	Japón
AB074892	Porcino	GII.11	Japón
EU448331	Porcino	GII.11	Canadá
AB074893	Porcino	GII.11	Japón
AB126320	Porcino	GII.11	Japón
AY823303	Porcino	GII.11	E.E.U. U
HM346627	Porcino	GII.11	Corea del Sur
AY823306	Porcino	GII.19	E.E.U. U
EU652843	Porcino	GII.19	Bélgica
KX452703	Humano	GII.14	Brasil
AY772730	Humano	GII.16	Alemania
KT224482	Humano	GII.1	Rusia
LN854570	Humano	GII.1	Holanda
MZ220331	Humano	GI.1	E.E.U. U

❖ Anexo III

Tabla A.3.1 Comparación de Ensayo de Da Silva y colaboradores (2007) con el ensayo de Exopol para la identificación de norovirus porcino mediante RT-qPCR. Se muestra la detección de norovirus porcino genogrupo II en muestras clínicas (n = 74), expresando el valor de Cq en los casos positivos

Muestra	Da Silva (2007)	Ensayo Exopol	Categoría	Ensayo Da Silva (2007)	Ensayo Exopol
1	Neg	Neg	38	Neg	Neg
2	Neg	Neg	39	Neg	Neg
3	31.8	30	40	Neg	Neg
4	Neg	Neg	41	36.2	33.6
5	Neg	32.9	42	Neg	36.6
6	Neg	Neg	43	Neg	Neg
7	Neg	Neg	44	Neg	Neg
8	Neg	Neg	45	Neg	Neg
9	Neg	Neg	46	Neg	Neg
10	Neg	33,1	47	Neg	Neg
11	Neg	Neg	48	Neg	Neg
12	Neg	36.1	49	Neg	Neg
13	Neg	Neg	50	Neg	Neg
14	Neg	Neg	51	Neg	Neg
15	Neg	34	52	Neg	Neg
16	Neg	Neg	53	Neg	Neg
17	Neg	Neg	54	Neg	Neg
18	Neg	Neg	55	Neg	Neg
19	Neg	Neg	56	Neg	Neg
20	Neg	Neg	57	Neg	Neg
21	Neg	Neg	58	Neg	Neg
22	Neg	Neg	59	Neg	Neg
23	34.9	32.1	60	Neg	Neg
24	Neg	Neg	61	Neg	Neg
25	Neg	Neg	62	Neg	Neg
26	Neg	Neg	63	Neg	Neg
27	Neg	Neg	64	32.2	30.1
28	Neg	Neg	65	Neg	Neg
29	Neg	Neg	66	Neg	Neg
30	Neg	Neg	67	Neg	Neg
31	Neg	Neg	68	Neg	Neg
32	Neg	Neg	69	Neg	Neg
33	Neg	Neg	70	Neg	Neg
34	Neg	Neg	71	Neg	Neg
35	Neg	Neg	72	Neg	Neg
36	Neg	Neg	73	Neg	Neg
37	Neg	32.4	74	Neg	Neg

❖ Anexo IV

Tabla A.4.1. Detección de norovirus genogrupo II mediante ensayos de RT-qPCR. En el caso de los positivos se muestran los valores Cq obtenidos en los ensayos de RT-qPCR.

Muestra	Resultado Cq	Muestra	Resultado Cq	Muestra	Resultado Cq	Muestra	Resultado Cq
1	Neg	121	Neg	241	Neg	361	Neg
2	Neg	122	Neg	242	Neg	362	36.25
3	Neg	123	Neg	243	Neg	363	Neg
4	Neg	124	32.13	244	Neg	364	Neg
5	Neg	125	Neg	245	Neg	365	Neg
6	Neg	126	Neg	246	Neg	366	Neg
7	Neg	127	Neg	247	Neg	367	Neg
8	Neg	128	Neg	248	Neg	368	Neg
9	Neg	129	Neg	249	Neg	369	Neg
10	Neg	130	33.2	250	Neg	370	Neg
11	Neg	131	Neg	251	Neg	371	Neg
12	Neg	132	Neg	252	Neg	372	Neg
13	Neg	133	34.93	253	Neg	373	29.97
14	Neg	134	Neg	254	Neg	374	Neg
15	Neg	135	Neg	255	Neg	375	Neg
16	Neg	136	Neg	256	Neg	376	Neg
17	Neg	137	Neg	257	Neg	377	Neg
18	Neg	138	Neg	258	Neg	378	Neg
19	Neg	139	Neg	259	Neg	379	Neg
20	33.9	140	26.84	260	Neg	380	Neg
21	35.89	141	Neg	261	Neg	381	Neg
22	Neg	142	33.85	262	Neg	382	Neg
23	Neg	143	Neg	263	Neg	383	Neg
24	Neg	144	Neg	264	Neg	384	Neg
25	Neg	145	Neg	265	Neg	385	Neg
26	Neg	146	26.35	266	Neg	386	Neg
27	Neg	147	Neg	267	Neg	387	Neg
28	34.29	148	Neg	268	Neg	388	Neg
29	Neg	149	32.7	269	Neg	389	Neg
30	Neg	150	Neg	270	Neg	390	Neg
31	Neg	151	Neg	271	Neg	391	36.89
32	Neg	152	Neg	272	Neg	392	Neg
33	Neg	153	Neg	273	Neg	393	Neg
34	Neg	154	Neg	274	Neg	394	Neg
35	Neg	155	Neg	275	Neg	395	Neg
36	Neg	156	Neg	276	Neg	396	Neg
37	Neg	157	Neg	277	Neg	397	Neg

38	Neg	158	Neg	278	Neg	398	Neg
39	Neg	159	Neg	279	Neg	399	Neg
40	Neg	160	Neg	280	Neg	400	Neg
41	31.16	161	Neg	281	Neg	401	Neg
42	Neg	162	33.81	282	Neg	402	Neg
43	Neg	163	Neg	283	Neg	403	Neg
44	Neg	164	Neg	284	Neg	404	Neg
45	Neg	165	Neg	285	Neg	405	Neg
46	Neg	166	Neg	286	Neg	406	Neg
47	Neg	167	Neg	287	Neg	407	Neg
48	Neg	168	31.65	288	Neg	408	Neg
49	Neg	169	Neg	289	Neg	409	Neg
50	Neg	170	Neg	290	Neg	410	Neg
51	Neg	171	Neg	291	33.31	411	Neg
52	Neg	172	Neg	292	Neg	412	Neg
53	Neg	173	Neg	293	Neg	413	Neg
54	Neg	174	36.14	294	Neg	414	Neg
55	Neg	175	Neg	295	Neg	415	Neg
56	Neg	176	Neg	296	29.72	416	Neg
57	Neg	177	29.97	297	Neg	417	Neg
58	Neg	178	Neg	298	33.81	418	Neg
59	Neg	179	Neg	299	Neg	419	37.28
60	Neg	180	Neg	300	Neg	420	Neg
61	Neg	181	Neg	301	Neg	421	Neg
62	Neg	182	Neg	302	Neg	422	Neg
63	Neg	183	Neg	303	Neg	423	Neg
64	Neg	184	Neg	304	Neg	424	Neg
65	Neg	185	Neg	305	30	425	Neg
66	Neg	186	Neg	306	32,9	426	Neg
67	Neg	187	Neg	307	Neg	427	Neg
68	Neg	188	Neg	308	Neg	428	Neg
69	Neg	189	Neg	309	33,1	429	Neg
70	Neg	190	Neg	310	Neg	430	Neg
71	Neg	191	Neg	311	Neg	431	Neg
72	Neg	192	Neg	312	Neg	432	Neg
73	33.25	193	Neg	313	Neg	433	Neg
74	Neg	194	30.68	314	Neg	434	Neg
75	Neg	195	Neg	315	Neg	435	Neg
76	30.31	196	Neg	316	34	436	Neg
77	Neg	197	33.41	317	36.1	437	Neg
78	Neg	198	Neg	318	Neg	438	30,1
79	Neg	199	Neg	319	Neg	439	Neg

80	Neg	200	Neg	320	Neg	440	Neg
81	Neg	201	37.86	321	Neg	441	Neg
82	Neg	202	Neg	322	Neg	442	Neg
83	32.94	203	Neg	323	Neg	443	Neg
84	Neg	204	Neg	324	Neg	444	Neg
85	Neg	205	Neg	325	32,1	445	Neg
86	30.89	206	Neg	326	Neg	446	Neg
87	Neg	207	34.05	327	Neg	447	Neg
88	Neg	208	Neg	328	Neg	448	34.56
89	Neg	209	Neg	329	Neg	449	Neg
90	Neg	210	Neg	330	Neg	450	Neg
91	Neg	211	Neg	331	Neg	451	Neg
92	Neg	212	Neg	332	Neg	452	Neg
93	Neg	213	Neg	333	Neg	453	Neg
94	Neg	214	Neg	334	Neg	454	Neg
95	Neg	215	37.26	335	Neg	455	Neg
96	Neg	216	33.85	336	Neg	456	Neg
97	Neg	217	Neg	337	Neg	457	Neg
98	Neg	218	Neg	338	Neg	458	Neg
99	33.27	219	Neg	339	Neg	459	Neg
100	Neg	220	Neg	340	Neg	460	Neg
101	Neg	221	Neg	341	Neg	461	Neg
102	Neg	222	Neg	342	Neg	462	36.42
103	Neg	223	Neg	343	Neg	463	Neg
104	Neg	224	Neg	344	Neg	464	Neg
105	Neg	225	Neg	345	Neg	465	Neg
106	Neg	226	Neg	346	Neg	466	32.29
107	Neg	227	Neg	347	Neg	467	Neg
108	Neg	228	Neg	348	32,4	468	Neg
109	Neg	229	34.33	349	33,	469	Neg
110	Neg	230	Neg	350	36.6	470	Neg
111	Neg	231	37.88	351	Neg	471	28.2
112	Neg	232	Neg	352	Neg	472	Neg
113	Neg	233	Neg	353	Neg	473	Neg
114	Neg	234	Neg	354	Neg	474	Neg
115	25.86	235	Neg	355	Neg	475	Neg
116	Neg	236	Neg	356	Neg	476	Neg
117	Neg	237	33.39	357	Neg	477	Neg
118	Neg	238	Neg	358	29.96	478	Neg
119	Neg	239	Neg	359	Neg	479	Neg
120	Neg	240	Neg	360	Neg	480	Neg

❖ Anexo V

Tabla A.5.1. Evaluación del panel digestivo en las muestras positivas a norovirus. En el caso de los positivos se muestran los valores Cq obtenidos en los ensayos de qPCR. Siendo CPTA *Clostridium* tipo A *E. suis* *Entamoeba suis*, *S* entérica *Salmonella enterica*

Muestra	<i>Br. hyodysenteriae</i>	<i>Br. intermedia</i>	<i>Br. pilosicoli</i>	<i>Brachyspira</i> sp.	CPTA	<i>E. suis</i>	<i>L. intracellularis</i>	PEDV	Rotavirus tipo A	<i>S. enterica</i>
1	23.26									Neg
2	28.24									
3			Neg		35.84		Neg	25.95		
4	Neg	Neg	Neg		32.4		30.01	Neg		Neg
5	Neg	Neg	Neg		34.36		Neg	Neg		Neg
6	Neg						Neg			
7	30.31									
8	Neg						21.15			Neg
9	30.15						23.36			
10	Neg	Neg	Neg		30.99		Neg	Neg		28
11	Neg	35.23	Neg		32.53		Neg	Neg		29
12	Neg	Neg	Neg		27.28		Neg	Neg		Neg
13	27.4									
14	24.75	Neg	Neg		29.39		Neg	Neg		Neg
15	26.73		Neg		34.19		Neg	Neg		Neg
16								21.91		
17	Neg									
18		30.98	32							
19							22.22			
20						27.09				
21					30.41		22.13			
22							31.12			
23	Neg	Neg	Neg		30.24		Neg	25.66		Neg
24			30.3				27.84			34.98
25	25.84									
26	26.56									
27	Neg	29.42	Neg					Neg		Neg
28				36.3			Neg	Neg		
29	27.56						35.23			Neg
30	24.15	27.9	Neg				Neg	Neg		37.12
31	Neg						24.46			
32	Neg						23.59			
33				30			Neg			
34	24.72									
35								Neg	28.37	Neg
36							22.81			
37										

38	28.5	Neg	Neg				36.61	Neg		Neg
39	Neg	Neg	31.5				31.47	Neg		Neg
40								Neg	35.62	32.2
41				33.6			29.53			
42	27.35	Neg	Neg				Neg	Neg		Neg
43	23.55									
44	Neg	Neg	Neg				Neg	Neg		Neg
45	33.94						22.28	Neg		
46	23.76						Neg			
47	Neg						Neg	Neg		
48								Neg		
49							Neg	Neg	33.6	
50						29.3				
51								Neg	Neg	
52								Neg	35.24	

❖ Anexo VI

Secuencias parciales en formato FASTA obtenidas mediante secuenciación de Sanger en el presente estudio. La nomenclatura de las secuencias se basa en el número de caso clínico seguido del NVG2 haciendo referencia a norovirus genogrupo II y de la provincia de la que procedencia.

>154710_NVG2_Navarra

```
TGGAGTTTTACGTGCCAGACACGAGGCTATGTTCCGCTGGATGCGGTTTTTCAGACCTCAGCACGTGGGAGGGCG
ATCGCAATCTGGCTCCCAGTGGTGTGAATGAAGATGGCGTCTAACGACGCTGCCCCATCTACGGATGGATCTGCTG
GTCTCGTGCCAGAGTTAAACAACGAGACTATGGCCCTGGAGCCAGTCGTGGGAGCTCCTCTTGCTGCCCCCGTAGC
TGGCCAACACAATATTATAGACCCCTGGATTAAAATGAATTTTGTACAGGCACCCAATGGAGAATTTACAGTTTCCC
```

>155968_NVG2_Zaragoza

```
TGGAGTTTTACGTGCCAGGCAAGAGGCCATGTTTCAGGTGGATGAGATTTTCTGACCTCAGCACGTGGGAGGGCG
ATCGCAATCTGGCTCCCGAGGGTGTGAATGATGATGGCATCGAATGATGCCAGCGCTCCGACTGACGGAGCTGCC
GGTCTCGTCCCAGAGGTCACAAATGAGACCATGGCACTAGAACCCGTGGCGGGGGCGGCACTAGCCGCGCCTGTC
GTAGGGCAACATAATGTTATTGACCCCTGGATTAG
```

>169856_NVG2_Salamanca

```
TGGAGTTTTACGTGCCAGGCAAGAGGCCATGTTTCAGGTGGATGAGGTTCTCTGACCTCAGCACGTGGGAGGGCG
ATCGCAATCTGGCTCCCGAGGGTGTGAATGATGATGGCATCGAATGATGTCAGCGCTCCGACTGACGGAGCTGCC
GGTCTCGTCCCAGAGGTCACAAATGAGACCATGGCACTAGAACCCGTGGCGGGGGCGGCACTAGCCGCGCCTGTC
GTAGGGCAACACAATGTTATTGACCCCTGGATTAGAGGCAACTTTGATCAAGCCCCCAATGGAGAATTTACTGTTT
CCCCCGTAATCCCCTGGAGAG
```

>150952_NVG2_RdRp_Huesca

```
ACCTACCACCTTGATGCTGACTACTCGAGATGGGACTCCACCCAGCAAAGGGGCATCTTAGCCGCTGCCTTGGACA
TCATGGTGAAGTTTCTCCGCCAACCTGAGCTGGCTCAGGTGGTGGCGGAGGACCTTCTTGCCCCAGTATCCTTGA
TGTGGTGATTTCCGCATTTCTATTGTGGAGGGTCTCCCTCCGGGGTTCCGTGTACATCACAATGGAACCTTTTTGC
CCACTGGTTGATCACCTCTGCGCTATGTCAGAAGTGACAGGCCTCTCACCCGATGTGATCCAAGCCCATTCTGTT
TCTCTTTTTACGGTGATGATGAGATCGTGAGCACAGACATCACTTTGGATCCTAACAAAGCTCACAGAGAAGTTGCG
AGAATACGGCCTAAAACCAACTAGACCAGACAAGACTGAAGGCCCACTGGTGATCCAGAAGAACTTATCTGGACT
GACTTTCCTGAGGAGGACGATAGTCCGTGACCCAGCCGGTGGTTTGGCAAGCTTGACAAAGACTCCATCTTGAG
GCAACTCTACTGGACCAGGGGACCAATCACGAGGATCCCATGGAACTATGGTTCCCCATTACAGAGGGCGAT
ACAGTTAATGGCGCTCCTGGGTGAAGCTTCACTGCATGGTTCCAATTCTATGGCAAGGTGAGTAGGATGGTGATC
AATGAGATTAAGAAGGTGGTCTGGAATTTTACGTGCCAGACACGAGGCCATGTTCCGCTGGATGCGGTTCTCA
GACCTCAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGTGGTGTGAATGAAGATGGCGTCTAACGACGCTGC
CCCATCTACGGATGGATCCGCTGGTCTCGTGCCAGAGGTCAACAACGAGACTATGGCCCTGGAGCCAGTTGTGGG
AGCTCCTTGTGCTGCCCCGTGGCTGGCCAACATAATTATAGACCCCTGGATTAAAATGAATTTTGTGCAGGCAC
CCAATGGAGAATTTACAGTTTCCC
```

>175980_NVG2_Huesca

```
TGGAGTTTTACGTGCCAGACATGAGGCCATGTTCCGCTGGATGCGGTTCTCAGACCTCAGCACGTGGGAGGGCG
ATCGCAATCTGGCTCCCAGTGGTGTGAATGAAGATGGCGTCTAATGACGCTTCTCCATCTGCGGATGGATCCGCCG
GTCTCGTACCAGAGGTCAACAATGAGACCATGGCCCTAGAACCAGTGGTGGGCGCTCCTCTTGCCGCCCCCGTCGC
TGGTCAACACAATATTATAGACCCCTGGATTAAAATGAATTTTGTGCAGGCACCCAATGGAGAATTTACAGTTTCCC
```

>155141_NVG2_Badajoz

TCGGTCCTCGAAGGTCTACCCTCAGGTGTCCCATGCACATCACAGTGGAACCTCCATAGCGCACTGGCTGCTGACAC
TCTGTGCAATTTCTGAGTCAACAGGATTATCCCCGATGTGGTGCAGGCCTACTCGTGCTTCTCTTTCTACGGTGAT
GATGAGATCATAAGCACTGACATAGAGATTAATCCAGAGGTTCTTACAGAGAAGATCAAGAGTTACGGTATGATA
CCCACCAGGCCAGATAAGAGTGAGGGTCCGTTGGTCATCAGCAAGGATTTGTCTGGGCTGACTTTTCTACGACGGA
CCATAACTCGTGATCCATCAGGGTGGTTTGGGAACTGGACAAGGACTCTATCTTAAGGCAGCTTTACTGGACTAG
AGGGCCAATCATGATGATCCCTACTAGACCATGACCACGCACTCACAAAGAGCCACACTGCTTATGGCGCTGCTT
GGGGAAGCCTCCTTGACGGTGCAACCTTTTACAGCAAGGTTAGCAAGCTAGTGGTGACAGAAATCAAAGAGAGT
GGCCTGGAGTTTTACGTGCCAGGCAAGAGGCCATGTTTCAGGTGGATGAGATTCTCTGACCTCAGCACGTGGGAG
GGCGATCGCAATCTGGCTCCCGATGGTGTGAATGATGATGGCATCGAATGATG

>153762_NVG2_Zaragoza

TGGAGTTTTACGTGCCAGACATGAGGCCATGTTCCGCTGGATGCGGTTTTTCAGACCTCAGCACGTGGGAGGGCG
ATCGCAATCTGGCTCCCAGTGGTGTGAATGAAGATGGCGTCTAGCGACGCTGCTCCATCTACGGATGGATCTGCTG
GTCTCGTGCCAGAGGTCAATAACGAGACTATGGCCCTGGAACCAGTCGTGGGAGCTCCTCTTGCTGCCCCCGTGGC
TGGTCAACACAATATTATAGACCCCTGGAT