

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño *in silico* de un método de detección por medio de la técnica de RT-PCR diferencial para coronavirus respiratorio porcino y virus de la gastroenteritis transmisible en muestras de hisopado nasal de cerdo doméstico, *Sus scrofa*.

Trabajo de graduación presentado por Paola Ortiz Hahmann para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2020

Diseño *in silico* de un método de detección por medio de la técnica de RT-PCR diferencial para coronavirus respiratorio porcino y virus de la gastroenteritis transmisible en muestras de hisopado nasal de cerdo doméstico, *Sus scrofa*.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



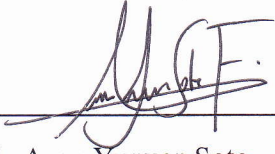
Diseño *in silico* de un método de detección por medio de la técnica de RT-PCR diferencial para coronavirus respiratorio porcino y virus de la gastroenteritis transmisible en muestras de hisopado nasal de cerdo doméstico, *Sus scrofa*.

Trabajo de graduación presentado por Paola Ortiz Hahmann para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2020

Vo. Bo.

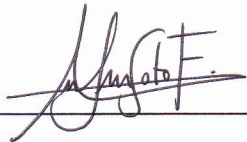


Licenciada Anna Yunuen Soto

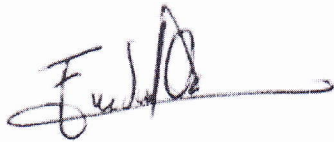
Tribunal examinador:



Doctora Dalia Lau



Licenciada Anna Yunuen Soto



Licenciada Elizabeth Solórzano

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 7 de diciembre de 2020

Contenido

Lista de cuadros	vi
Lista de figuras.....	vii
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
A. Industria porcina	3
1. Crianza de cerdos.....	3
a. Demanda de carne de cerdo y derivados.....	3
b. Problemas comunes.....	3
B. Infecciones respiratorias en cerdos	4
1. Síntomas comunes.....	4
2. Infecciones simples	4
3. Complejo respiratorio porcino	4
a. Factores ambientales y de manejo.....	7
b. Agentes bacterianos importantes.....	7
1) <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	7
2) <i>Bordetella bronchiseptica</i>	8
3) <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	8
c. Agentes virales importantes	8
1) Virus de Influenza Porcino	8
2) Virus reproductivo y respiratorio porcino	9
3) Virus de la Pseudorrabia	9
4) Circovirus porcino tipo 2	9
5) Coronavirus respiratorio porcino	10
C. Coronavirus en cerdos.....	10
1. Coronavirus respiratorios en cerdos.....	10
a. Virus de la gastroenteritis transmisible	10
b. Coronavirus respiratorio porcino	11

2.	Importancia de los coronavirus en co-infecciones	11
3.	Estadísticas de prevalencia.....	12
D.	Técnicas de detección de coronavirus.....	12
1.	Inmunológicas.....	12
2.	Moleculares.....	13
a.	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR)	13
III.	Justificación	14
IV.	Objetivos	17
A.	Objetivo general.....	17
B.	Objetivos específicos	17
V.	Hipótesis	18
VI.	Metodología.....	19
A.	Selección de regiones para la amplificación	20
B.	Alineamiento de secuencias	20
C.	Diseño de cebadores.....	20
D.	Evaluación y comparación de las parejas de cebadores obtenidos	21
VII.	Resultados	23
VIII.	Discusión de resultados.....	34
IX.	Conclusiones	37
X.	Recomendaciones.....	38
XI.	Bibliografía	39
XII.	Anexos	47

Lista de cuadros

Cuadro 1. Parámetros de búsqueda para los alineamientos por Blast.....	22
Cuadro 2. Características, homodímeros y heterodímeros posibles de los cebadores obtenidos para la región S del TGEV.....	26
Cuadro 3. Estructuras tallo-bucle posibles de los cebadores obtenidos para la región S del TGEV.	26
Cuadro 4. Características, homodímeros y heterodímeros posibles de los cebadores obtenidos para la región ORF1a conservada en TGEV y PRCV.	28
Cuadro 5. Estructuras tallo-bucle posibles de los cebadores obtenidos para la región ORF1a conservada en TGEV y PRCV.....	28
Cuadro 6. Codificación de los nombres de los cebadores seleccionados.....	29
Cuadro 7. Resumen de los resultados de PCR <i>in silico</i> realizados contra el genoma del cerdo y bacterias que infectan comúnmente su tracto respiratorio.	32
Cuadro 8. Resumen de los resultados de PCR <i>in silico</i> realizados contra otros virus que infectan comúnmente su tracto respiratorio.....	33

Lista de figuras

Figura 1. Interacción viral, bacteriana y ambiental resultan en complejo respiratorio porcino (CRP).	5
Figura 2. Resumen de los posibles mecanismos y resultados de infecciones bacterianas del tracto respiratorio en cerdos	6
Figura 3. Diagrama resumido de la metodología propuesta.....	19
Figura 5. Alineamiento de secuencias del genoma completo del TGEV y PRCV.	23
Figura 6. Alineamiento de secuencias de la región S del TGEV.	24
.....	25
Figura 8. Alineamiento de secuencias de la región ORF1 del TGEV y PRCV.	25
Figura 9. Diagrama del alineamiento de los cebadores en los genes objetivo para ambos virus....	30
Figura 10. Imagen del gel con los tamaños esperados de los amplicones de los distintos cebadores.	31
Figura 11. Estructura tallo-bucle 1 cebador 1F región S TGEV.....	73
Figura 12. Estructura tallo-bucle 2 cebador 1F región S TGEV.....	73
Figura 13. Estructura tallo-bucle 3 cebador 1F región S TGEV.....	73
Figura 14. Estructura tallo-bucle 1 cebador 1R región S TGEV.....	73
Figura 15. Estructura tallo-bucle 2 cebador 1R región S TGEV.....	74
Figura 16. Estructura tallo-bucle 3 cebador 1R región S TGEV.....	74
Figura 17. Estructura tallo-bucle 4 cebador 1R región S TGEV.....	74
Figura 18. Estructura tallo-bucle 5 cebador 1R región S TGEV.....	74
Figura 19. Estructura tallo-bucle 6 cebador 1R región S TGEV.....	75
Figura 20. Estructura tallo-bucle 7 cebador 1R región S TGEV.....	75
Figura 21. Estructura tallo-bucle 1 cebador 2F región S TGEV.....	75
Figura 22. Estructura tallo-bucle 2 cebador 2F región S TGEV.....	75
Figura 23. Estructura tallo-bucle 3 cebador 2F región S TGEV.....	76
Figura 24. Estructura tallo-bucle 1 cebador 2R región S TGEV.....	76
Figura 25. Estructura tallo-bucle 2 cebador 2R región S TGEV.....	76

Figura 26. Estructura tallo-bucle 3 cebador 2R región S TGEV.	76
Figura 27. Estructura tallo-bucle 1 cebador 3F región S TGEV.	77
Figura 28. Estructura tallo-bucle 2 cebador 3F región S TGEV.	77
Figura 29. Estructura tallo-bucle 3 cebador 3F región S TGEV.	77
Figura 30. Estructura tallo-bucle 1 cebador 3R región S TGEV.	77
Figura 31. Estructura tallo-bucle 2 cebador 3R región S TGEV.	78
Figura 32. Estructura tallo-bucle 3 cebador 3R región S TGEV.	78
Figura 32. Estructura tallo-bucle 1 cebador 1F región ORF1.	78
Figura 33. Estructura tallo-bucle 2 cebador 1F región ORF1.	78
Figura 33. Estructura tallo-bucle 1 cebador 1R región ORF1.	79
Figura 34. Estructura tallo-bucle 1 cebador 2F región ORF1.	79
Figura 35. Estructura tallo-bucle 2 cebador 2F región ORF1.	79
Figura 36. Estructura tallo-bucle 3 cebador 2F región ORF1.	79
Figura 37. Estructura tallo-bucle 4 cebador 2F región ORF1.	80
Figura 38. Estructura tallo-bucle 1 cebador 2R región ORF1.	80
Figura 39. Estructura tallo-bucle 2 cebador 2R región ORF1.	80
Figura 40. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”.	81
Figura 41. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 168 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”.	81
Figura 42. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”.	82
Figura 43. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”.	82
Figura 44. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 168 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR	

amplification”	83
Figura 45. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	83
Figura 46. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	84
Figura 47. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 168 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	84
Figura 48. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	85
Figura 49. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	85
Figura 50. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 168 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	86
Figura 51. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF de TGEV y PRCV contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	86
Figura 52. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra <i>Bordetella bronchiseptica</i> por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	87
Figura 53. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 168 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	87
Figura 54. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF de TGEV y PRCV contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 por medio de la plataforma “ <i>In</i>	

<i>in silico</i> PCR amplification”	88
Figura 55. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra el virus de Influenza A (H1N1) por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	88
Figura 56. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra el virus de Influenza A (H1N1) por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	89
Figura 57. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra el virus de Influenza A (H1N1) por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	89
Figura 58. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	90
Figura 59. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	90
Figura 60. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	91
Figura 61. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	91
Figura 62. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	92
Figura 63. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	92
Figura 64. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	93
Figura 64. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región ORF1 de	

TGEV y PRCV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	93
Figura 65. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región s de TGEV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”.	94
Figura 66. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región s de TGEV contra el circovirus porcino 2 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”.	94
Figura 67. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 3F-3R de la región s de TGEV contra el circovirus porcino 2 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”.	95
Figura 68. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región s de ORF1 de TGEV y PRCV contra el circovirus porcino 2 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”.	95
Figura 69. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región s de ORF1 de TGEV y PRCV contra el circovirus porcino 2 por medio de la plataforma “ <i>In silico</i> PCR amplification”	96
Figura 70. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra <i>Sus scrofa</i> (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR... ..	97
Figura 71. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra <i>Sus scrofa</i> (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR... ..	97
Figura 72. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra <i>Sus scrofa</i> (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR... ..	98
Figura 73. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra <i>Sus scrofa</i> (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR.....	98
.....	99
Figura 74. Resultados de PCR <i>in silico</i> para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra <i>Sus scrofa</i> (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR.....	99

Resumen

El complejo respiratorio porcino (CRP) representa una gran amenaza para la industria porcina. Se caracteriza por coinfección de patógenos virales y/o bacterianos, disminuyendo la tasa de crecimiento de los cerdos y frecuentemente causando su muerte. El coronavirus respiratorio porcino y el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), que son muy similares a nivel genómico, pueden participar en el CRP. Es importante diagnosticar y determinar la prevalencia de estos virus porque coinfecciones de estos con otros patógenos pueden ser muy perjudiciales. Por esto, el objetivo del estudio fue diseñar un método de diagnóstico molecular que permita detectar y diferenciar a estos dos virus por medio de RT-PCR convencional, diseñando cebadores para la amplificación de la región de la glicoproteína espiga (S) específica del TGEV y de la región ORF1 (open reading frame 1) conservada en ambos virus. Esto se realizó con ayuda de herramientas bioinformáticas para el diseño de cebadores, evaluación de parámetros de calidad y especificidad de los mismos. Se obtuvo tres juegos de cebadores específicos para la región S del TGEV y dos para la región conservada, compatibles con hisopados porcinos. Estos últimos podrían amplificar también coronavirus canino y felino, pero por la naturaleza de las muestras, no suponen un problema para la efectividad del método.

Abstract

Porcine respiratory complex is a multifactorial infectious disease characterized by coinfection of viral and/ or bacterial pathogens. It includes symptoms like slow growth and frequently causing the death of the animal. Thus, it represents a great threat to the porcine industry. Porcine respiratory coronavirus (PRCV) and transmissible gastroenteritis virus (TGEV) can be a part of such coinfections and are very similar genomically. It's important to diagnose these viruses and determine their prevalence because their coinfections with other pathogens may be very harmful. The aim of this research was to design a molecular diagnostic method to differentiate and diagnose TGEV and PRCV by conventional RT-PCR, designing primers for the amplification of the spike glycoprotein region specific for TGEV and the Open Reading Frame 1 (ORF1) which is conserved in both viruses. This was done with the help of bioinformatics tools for primer design, evaluation of quality parameters and their specificity. Three sets of specific primers were obtained for the S region of TGEV and two for the conserved region, compatible with porcine swabs. The latter could also amplify canine and feline coronaviruses, but due to the nature of the samples, they do not pose a problem for the effectiveness of the method.

I. Introducción

La industria porcina es una parte importante de la industria agraria. Esta consiste en la crianza y venta de cerdos para su consumo.

Uno de los mayores problemas con la crianza de cerdos son los trastornos respiratorios, que son de las principales causas de muerte en la industria, especialmente la enfermedad del complejo respiratorio porcino, que se caracteriza por coinfección de patógenos virales y/o patógenos bacterianos (Thacker & Thanawongnuwech, 2002). La pérdida económica para los productores es considerable (Bencomo, 2010).

Aunque existen numerosos agentes etiológicos de enfermedades respiratorias en cerdos entre los que se encuentran bacterias, virus y parásitos, se ha encontrado que infecciones por coronavirus, aunque suelen tener una mortalidad baja, son un factor de riesgo para contraer otras patógenos respiratorios (Charley, Riffault, & Van Reeth, 2006), lo que puede favorecer el desarrollo de una nueva infección. Esto hace la detección de coronavirus respiratorios en cerdo de sumo interés.

Dentro de los agentes causales de infecciones respiratorias en cerdos se encuentran los coronavirus, especialmente el coronavirus respiratorio porcino (*PRCV* por sus siglas en inglés) y el virus de gastroenteritis transmisible (TGEV) que, aunque infecta principalmente tejido intestinal, puede infectar también el tracto respiratorio (Kwon, Saf y Jackwood, 1998).

Se han descrito múltiples casos de coinfecciones de coronavirus respiratorio porcino con otros patógenos que aumentan la intensidad de las infecciones, haciéndolas más agresivas (Opriessnig, Giménez-Lirola, & Halbur, 2011). Entre los más destacados se ha encontrado coinfecciones con virus reproductor y respiratorio porcino (Kristien Van Reeth, Nauwynck, & Pensaert, 1996), con el virus de influenza porcina (K. Van Reeth & Pensaert, 1994) y con *Bordetella bronchiseptica* (Brockmeier, Loving, Nicholson, & Palmer, 2008). Todos estos patógenos son considerados patógenos de alta

relevancia en enfermedades respiratorias en cerdos (Opriessnig *et al.*, 2011).

II. Antecedentes

A. Industria porcina

1. Crianza de cerdos

La crianza de cerdos para su consumo está regulada para que se lleve a cabo de manera eficiente. Existen diversos sistemas de crianzas, pero todos ellos toman en cuenta vacunación contra enfermedades importantes como diarrea por *Escherichia coli*, cólera porcino, erisipela porcina, etc, desparasitaciones y suplementaciones de hierro y vitaminas según edad y función del individuo (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, 2010).

a. Demanda de carne de cerdo y derivados

El consumo de carne de cerdo a nivel mundial se ha mantenido alrededor de los 100 millones de toneladas desde el año 2016 con una tendencia creciente. Una tonelada vale aproximadamente \$1800 (USDA Foreign Agricultural Service, 2018). Esto hace de la industria porcina un factor importante para economía a nivel mundial.

b. Problemas comunes

Uno de los mayores problemas en la crianza de cerdos son las enfermedades respiratorias que estos sufren, sobre todo el Complejo Respiratorio Porcino. Estos trastornos se han visto más en cerdos jóvenes, después del destete y en la etapa de engorde. Es menos común que cerdos adultos se vean afectados por esto (Bencomo, 2010).

Se ha encontrado que estas enfermedades se ven favorecidas por factores ambientales de baja higiene, sobrepoblación de corrales, transporte y destete (Bencomo, 2010; United States Department of Agriculture, 2016).

B. Infecciones respiratorias en cerdos

1. Síntomas comunes

Dentro de los síntomas más comunes de las infecciones respiratorias en cerdos se encuentran la tos, estornudos, pérdida de apetito, fiebre, postración, disnea, secreciones nasales y pérdida de peso, entre otros (Bencomo, 2010).

2. Infecciones simples

Por lo general, las infecciones en los cerdos son causadas por más de un patógeno. Las infecciones con un solo agente causal suelen ser más leves y con sintomatología específica del patógeno infeccioso. Estas, por lo tanto, suelen no ser tan relevantes como infecciones polimicrobianas. Sin embargo, representan un factor de riesgo frente a la infección de un nuevo patógeno (T. Opriessnig *et al.*, 2011).

3. Complejo respiratorio porcino

El complejo respiratorio porcino se define como las infecciones respiratorias en cerdos que son causadas por una combinación de patógenos que pueden ser tanto agentes infecciosos principales como oportunistas, donde juegan un rol importante los factores ambientales en los que se mantiene a los cerdos. Esto se conoce como el Complejo Respiratorio Porcino (CRP). El término surge para describir neumonías en cerdos de acabado y engorde que tienen una etiología multifactorial.

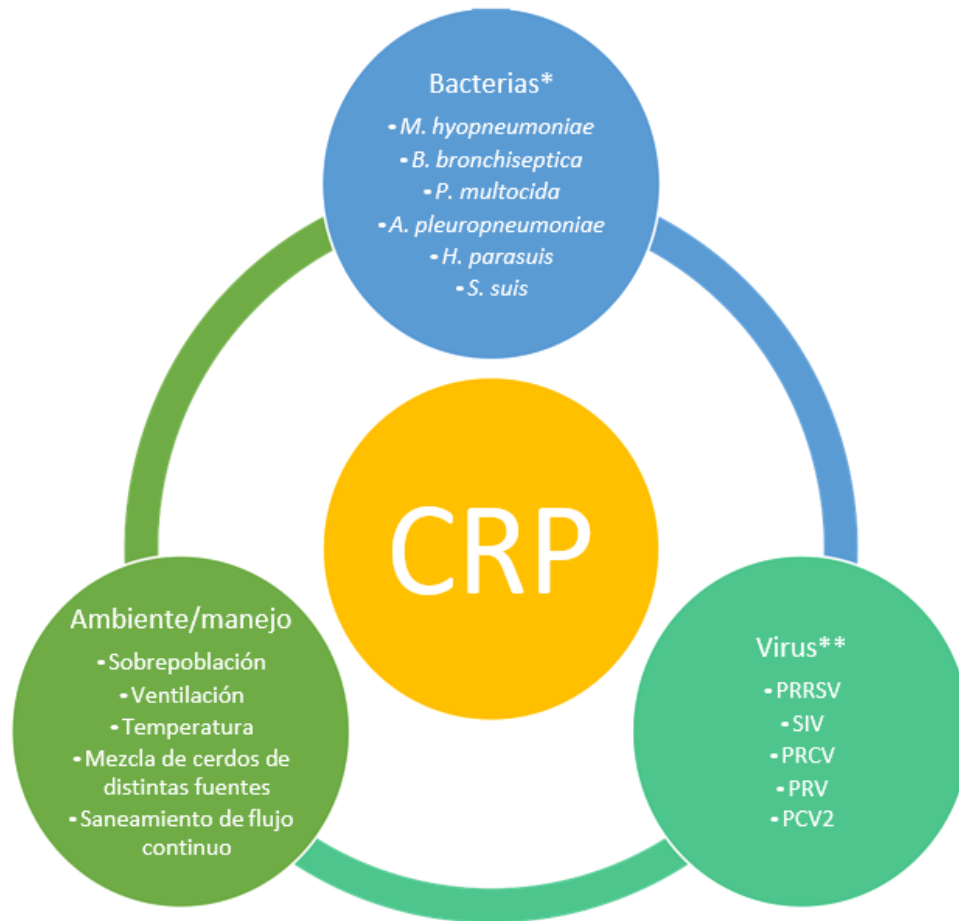


Figura 1. Interacción viral, bacteriana y ambiental resultan en complejo respiratorio porcino (CRP).

*Donde *M. hyopneumoniae* es *Mycoplasma hyopneumoniae*, *B. bronchiseptica* es *Bordetella bronchiseptica*, *P. multocida* es *Pasteurella multocida*, *A. pleuropneumoniae* es *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *H. parasuis* es *Haemophilus parasuis* y *S. suis* es *Streptococcus suis*.

**Donde las siglas en inglés representan lo siguiente: PRRSV Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino, SIV virus de influenza porcina, PRCV coronavirus respiratorio porcino, PRV virus de pseudorabia y PCV2 Circovirus porcino tipo 2.

El complejo se caracteriza por crecimiento lento, anorexia, letargo, fiebre, tos y dificultad para respirar. Se encuentra más frecuentemente en cerdos de 10 a 20 semanas de edad. Debido a la pérdida de apetito y el crecimiento lento de los cerdos, el complejo respiratorio porcino es una causa de pérdidas económicas significativas para los productores de cerdos en todo el mundo (Thacker & Thanawongnuwech, 2002).

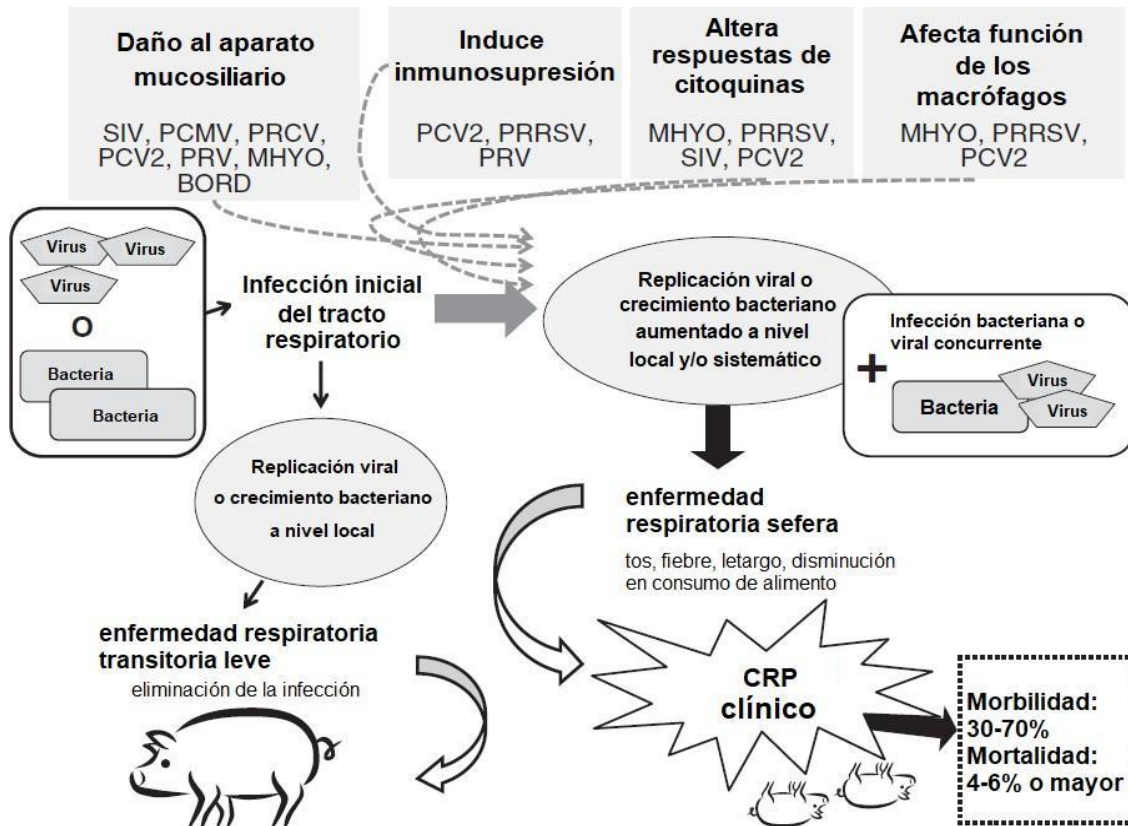


Figura 2. Resumen de los posibles mecanismos y resultados de infecciones bacterianas del tracto respiratorio en cerdos

*SIV, virus de influenza porcina; PCMV, citomegalovirus porcino; PRCV, coronavirus respiratorio porcino; PCV2, circovirus porcino tipo 2; PRV, virus de la pseudorrabia; MHYO, *Mycoplasma hyopneumoniae*, BORD, *Bordetella bronchiseptica*; PRRSV, virus reproductivo y respiratorio porcino.

(Adaptado al español de T. Opriessnig *et al.*, 2011).

Los patógenos pueden ser tanto bacterianos como virales (ver Figura 1) y la co-infección puede darse a partir de varias bacterias o virus, o bien, una combinación de patógenos bacterianos y virales.

Como se muestra en la Figura 2, el complejo respiratorio porcino empieza con una infección común, que predispone al hospedero a contraer nuevas infecciones de diversas formas posibles, como dañando al aparato mucociliar o induciendo inmunodeficiencia, etc. Al haber una infección confluyente, los patógenos tienden a actuar sinérgicamente, volviendo la enfermedad muy agresiva y dando lugar al complejo respiratorio porcino

(Allan, Mcneilly, Ellis, Krakowka, & Meehan, 2000; Hansen *et al.*, 2010). Existe una alta tasa de morbilidad entre el 30 y 70% y una mortalidad entre el 4 y 6% (Halbur, 1998).

Sin embargo, las pérdidas económicas debido al CRP no se deben únicamente a los cerdos que mueren a causa de este, sino que existen también pérdidas considerables por la baja en el consumo de alimento, lo que tiene una relación directa con el aumento de peso de los cerdos (Halbur, 1998).

a. Factores ambientales y de manejo

Los factores ambientales o de manejo son causas no infecciosas del CRP por dos vías principales, ya sea al aumentar la transmisión de los patógenos por condiciones específicas como la temperatura y sobrepoblación de los corrales o al generar estrés al animal, disminuyendo sus defensas y, por lo tanto, haciéndolo más vulnerable a contraer una infección (Palzer, Ritzmann, Wolf, & Heinritzi, 2015).

b. Agentes bacterianos importantes

1) *Mycoplasma hyopneumoniae*

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina, que es una infección crónica y muy contagiosa. Se encuentra también entre los patógenos respiratorios más comunes en cerdos. Una infección con esta bacteria disminuye considerablemente las defensas de los cerdos, lo que facilita que el individuo sea infectado por otros patógenos (Palzer *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2012).

La infección por *M. hyopneumoniae* se caracteriza por la unión de la bacteria a los cilios de las células del epitelio pulmonar del cerdo, esto, con el tiempo lleva a la pérdida de los cilios y muerte de estas células (Kobisch *et al.*, 1993).

M. hyopneumoniae es una bacteria pequeña en tamaño y en su genoma, además de carecer de pared celular. Esta bacteria se adhiere a los cilios de las células epiteliales de los pulmones de los cerdos, lo que lleva a ciliostasis y eventualmente a la muerte de las células epiteliales. El daño causado por *M. hyopneumoniae* suele predisponer a infecciones secundarias (Tajima y Yagihashi, 198; Minion, 2002).

2) Bordetella bronchiseptica

B. bronchiseptica es un patógeno de numerosas especies animales. En cerdos causa rinitis y establece una relación sinérgica con *Pasteurella multocida* causando rinitis atrófica. Está ampliamente distribuida a nivel mundial. Una infección por *B. bronchiseptica* no suele representar una amenaza fuerte para los cerdos, pero puede ser causante de neumonías cuando infecta como patógeno secundario (Collings & Rutter, 1985; Pedersen & Barfod, 1981).

B. bronchiseptica está estrechamente relacionada a *Bordetella pertussis* y expresa los mismos factores de virulencia; tales como filamentos de hemaglutinina, fimbrias y adenilato ciclasa – hemolisina, entre otros. Tiene pili que utiliza para la unión al epitelio ciliado del tracto respiratorio. Se adhiere activamente y produce ciliostasis significativa minutos después del contacto (Laber, Whary, Bingel, Goodrich, Smith y Swindle, 2002).

3) Actinobacillus pleuropneumoniae

A. pleuropneumoniae es el agente causal de pleuroneumonía porcina contagiosa. Su distribución es a nivel mundial y representa pérdidas económicas importantes para la industria porcina (Haesebrouck, Chiers, Overbeke, & Ducatelle, 1997).

Esta bacteria coloniza de forma rápida y se adhieren a las células epiteliales de las amígdalas. Al replicarse, liberan toxinas, hemolisinas y LPS, lo que lleva a la lisis de los macrófagos y liberando lisozimas, que llevan al daño característico de la pleuroneumonía porcina (Brownfield, 2020)

c. Agentes virales importantes

1) Virus de Influenza Porcino

El virus de influenza porcino o SIV por sus siglas en inglés es uno de los patógenos más importantes relacionados con el complejo respiratorio porcino (Nakharuthai *et al.*, 2008). Por sí solo, el virus tiene una morbilidad alta, pero una mortalidad menor al 5% (Kida *et al.*, 1994). Las infecciones causadas únicamente por SIV no suelen ser muy severas. Sin embargo, infecciones múltiples con SIV y otros patógenos genera infecciones

respiratorias severas o crónicas (Halbur, 1996; Thacker, 2001).

Existen datos de la presencia del virus de influenza porcino en Guatemala, pero no hay información para la mayoría de otros patógenos importantes en el complejo respiratorio porcino (Gonzalez-Reiche *et al.*, 2017).

2) Virus reproductivo y respiratorio porcino

El virus reproductivo y respiratorio porcino se abrevia PRRSV por sus siglas en inglés. Causa neumonía en los cerdos, además de afectar la reproducción y reducir la tasa de crecimiento (Hill, 1990). Todo esto se ha relacionado con pérdidas económicas significativas. Solo en Estados Unidos se calculó una pérdida de 664 millones de dólares en 2010 debido a infecciones con PRRSV (Holtkamp, Kliebenstein, Neumann, & Zimmerman, 2013).

3) Virus de la Pseudorrabia

También conocido como el herpesvirus porcino 1, es el agente etiológico de la pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky. Esta es una de las enfermedades virales más severas en cerdos. Aunque pueden presentarse casos asintomáticos, suele generar tos, estornudos, fiebre, depresión entre otros síntomas. Tiene una alta mortalidad en lechones y puede causar abortos (Ettenleiter, 2000).

El virus de la pseudorrabia se reproduce en macrófagos y monocitos alveolares, llevando a rinitis necrotizante y a una inmunosupresión severa para el animal, esto se ha visto relacionado con una mayor dificultad para eliminar nuevos patógenos y una mayor facilidad de adherencia para patógenos secundarios (Iglesias, Pijoan, & Molitor, 1992; Narita, Kawashima, Matsuura, Uchimura, & Miura, 1994).

4) Circovirus porcino tipo 2

El circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) es el agente causal del síndrome multisistémico de desmejoramiento posdestete que se caracteriza por múltiples padecimientos clínicos que incluyen palidez en la piel, estrés respiratorio, diarrea e incluso ictericia (Segalés, Allan, & Domingo, 2005).

Además de causar esta enfermedad, se ha relacionado con el complejo respiratorio porcino como patógeno secundario, luego de la previa infección de otros patógenos bacterianos o virales (Opriessnig, Meng, & Halbur, 2007).

5) Coronavirus respiratorio porcino

El coronavirus respiratorio porcino (PRCV, por sus siglas en inglés) es patógeno de cerdos exclusivamente. Suele generar infecciones respiratorias leves y que muchas veces quedan en estado subclínico. El virus se replica en células epiteliales del tracto respiratorio inferior, neumocitos tipo 2 y en menor medida en epitelio bronquiolar (Atanasova *et al.*, 2008).

En el transcurso de la infección, el PRCV induce rupturas en el aparato mucociliar y genera pérdida parcial de la función de macrófagos alveolares, lo que promueve nuevas infecciones respiratorias por la incapacidad de los macrófagos de eliminar a las bacterias (Charley *et al.*, 2006; Laude, Van Reeth, & Pensaert, 1993).

C. Coronavirus en cerdos

1. Coronavirus respiratorios en cerdos

Hasta el momento se han presentado casos de infecciones respiratorias en cerdos causadas por dos tipos de coronavirus, el virus de la gastroenteritis transmisible y el coronavirus respiratorio porcino.

a. Virus de la gastroenteritis transmisible

El virus de la gastroenteritis transmisible infecta generalmente el tracto gastrointestinal, como su nombre lo indica. Esta fue descrita en 1946 y se caracteriza por diarrea severa en cerdos de todas las edades (Doyle & Hutchings, 1946). Sin embargo, se ha descrito numerosas veces la capacidad del virus de replicarse e infectar el tracto respiratorio (Harada, Furuuchi, Kumagai, & Sasahara, 1969; Sprino & Ristic, 1982; Underdahl *et al.*, 1974) y se ha encontrado que utiliza los macrófagos alveolares para su reproducción (Laude, Charley, & Gelfi, 1984). Las infecciones respiratorias por el virus

de la gastroenteritis transmisible no son de mayor relevancia, pues son muy leves y poco frecuentes (Harada *et al.*, 1969).

b. Coronavirus respiratorio porcino

El coronavirus respiratorio porcino está estrechamente relacionado con el virus de la gastroenteritis transmisible. La principal diferencia es que este virus solo infecta el tracto respiratorio de los cerdos (Pensaert, Callebaut, & Vergote, 1986). Genéticamente, la mayor diferencia es la delección de un fragmento del gen S que codifica la proteína S, que se ha relacionado con la patogenicidad enterogénica y con la actividad de hemaglutinación (Krempl, Schultze, Laude, & Herrler, 1997), lo que explica que el PRCV no se replique en células entéricas.

Como se mencionó en el inciso 3. c) (5) las infecciones respiratorias en las cuales PRCV es el único patógeno, tienden a ser leves y de poca importancia clínica. Pero predisponen al hospedero a contraer nuevas infecciones que pueden volverse muy severas por la acción sinérgica de los patógenos. También se ha observado que al actuar como patógeno secundario PRCV aumenta la intensidad de las infecciones de manera considerable (Kristien Van Reeth *et al.*, 1996).

2. Importancia de los coronavirus en co-infecciones

Las infecciones respiratorias por coronavirus en cerdos suelen tener una mortalidad baja, pero son un factor de riesgo para contraer otros patógenos respiratorios (Charley *et al.*, 2006), lo que puede favorecer el desarrollo de una nueva infección. Se han descrito múltiples casos de coinfecciones de coronavirus respiratorio porcino con otros patógenos que aumentan la intensidad de las infecciones, haciéndolas más agresivas (T. Opriessnig *et al.*, 2011). Entre los más destacados se ha encontrado coinfecciones con virus reproductor y respiratorio porcino (Kristien Van Reeth *et al.*, 1996), con el virus de influenza porcina (Van Reeth y Pensaer, 1994) y con *Bordetella bronchiseptica* (Brockmeier *et al.*, 2008). Todos estos patógenos son considerados patógenos de alta relevancia en enfermedades respiratorias en cerdos y se han relacionado fuertemente con el complejo respiratorio porcino (T. Opriessnig *et al.*, 2011).

3. Estadísticas de prevalencia

Lo que hace tan importante al coronavirus respiratorio porcino es su alta prevalencia a nivel mundial. Se ha encontrado que, en cerdos introducidos a 22 granjas diferentes en Iowa, los individuos de en 12 de las 22 granjas se contagiaron con coronavirus respiratorio porcino en menos de 23 días de haber llegado (Wesley, Woods, Mckean, Senn, & Elazhary, 1997). Esto no solo indica la alta prevalencia del virus, sino también su facilidad de transmisión entre individuos.

En Corea se ha encontrado una prevalencia del 53% de todos los individuos muestreados y se encuentra presente en aproximadamente el 61.4% de las granjas muestradas (Chae et al., 2000). En Canadá se ha encontrado una prevalencia de PRCV de muestras nasales de 57% y 63% dependiendo del método de detección (Costantini, Lewis, Alsop, Templeton, & Saif, 2004)

En Guatemala no se tienen registros de coronavirus respiratorio porcino, pues no se han realizado pruebas para diagnosticarlo en el país. Sin embargo, sí se han reportado pérdidas económicas causadas por enfermedades respiratorias de los cerdos (Lacayo, 2012). Es importante tener un conocimiento de su prevalencia, pues si se controlan las infecciones por PRCV, podrían disminuirse los casos de otras infecciones y evitar que las infecciones por otros patógenos sean agravadas por una coinfección con el coronavirus respiratorio porcino.

D. Técnicas de detección de coronavirus

1. Inmunológicas

Dentro de las técnicas inmunológicas más utilizadas para la detección de coronavirus se encuentra la prueba ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Chae *et al.*, 2000) y la inmunofluorescencia en cultivo celular (Sirinarumitr, Paul, Halbur, & Kluge, 1997). Por lo general, las pruebas inmunológicas se basan en la unión de antígeno y anticuerpo. Para su detección, uno de los anteriores debe estar modificado de modo que genere un cambio visible, ya sea con una enzima cuya reacción genere un cambio de color (ELISA) o con un marcador inmunofluorescente para su observación en un microscopio

específico (Inmunofluorescencia) (Costantini *et al.*, 2004).

2. Moleculares

Los coronavirus son virus de ARN de una sola hebra con polaridad positiva (Laude *et al.*, 1993) por lo que para la detección de su material genómico por medio de PCR se debe llevar a cabo una retrotranscripción para obtener el ADN complementario de alguna región conocida del genoma.

a. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR)

Esta técnica lleva el nombre de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa. Es utilizada para detectar el ARN existente en una muestra al convertirlo en su ADN complementario por medio de la acción de la transcriptasa reversa. Inicialmente se debe obtener el ADN para que pueda darse la amplificación como en un PCR tradicional (Freeman, Walker, & Vrana, 1999).

Esta técnica ha probado ser muy efectiva para el diagnóstico de coronavirus, además de ser práctica por sus costos relativamente bajos y tiempo de realización. Una de las desventajas de esta técnica es que puede dar falsos negativos en infecciones con bajas copias del virus por estar en etapas muy tempranas o en etapas finales de la enfermedad (Costantini *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 1999).

III. Justificación

Para una adecuada nutrición es importante consumir una cantidad adecuada de nutrientes, especialmente de los macronutrientes, que deben consumirse en grandes cantidades, como lo son los carbohidratos, las grasas y la proteína. La proteína y sus monómeros, los aminoácidos, son de suma importancia para el buen funcionamiento del metabolismo, pues forman proteínas que tienen diversas funciones muy importantes como funciones estructurales, como en los músculos, de señalización y como catalizadores de reacciones enzimáticas. Además, existen aminoácidos esenciales, que necesitan ser consumidos en la dieta, pues no pueden ser producidos en el cuerpo. Por los factores antes mencionados, un adecuado consumo de proteína en la dieta humana es muy importante.

La proteína de la carne es de muy buena calidad y esta suele ser una mejor fuente de proteína que la mayoría de las fuentes de proteína vegetal.

En los últimos años, debido a la creciente población mundial, la demanda de carne va en aumento. Los animales de rápido crecimiento presentan una ventaja, ya que el tiempo de producción es menor y, por lo tanto, los gastos son menores. Un ejemplo de este tipo de animales es el cerdo. El consumo de carne de cerdo provee proteína de alta calidad con costos más bajos de producción en relación con otras carnes animales como la carne de res. La producción de cerdos a nivel mundial también se ha visto en aumento, especialmente en Asia y Europa (FAO, 2014).

Un cerdo de engorde tarda por lo general en llegar a un peso adecuado unas 21 a 23 semanas, sin embargo, existen diversas complicaciones que pueden alargar este tiempo. Uno de los mayores problemas con la crianza de cerdos son los trastornos respiratorios, que son de las principales causas de muerte en la industria y retraso en el crecimiento de los animales, especialmente la enfermedad del complejo respiratorio porcino, que se caracteriza por coinfección de patógenos virales y/o patógenos bacterianos. Esto genera altas pérdidas económicas para la industria porcina.

Existen numerosos agentes etiológicos de enfermedades respiratorias en cerdos entre los que se encuentran bacterias, virus y parásitos como: *Mycoplasma hyopneumoniae*, el virus de influenza porcina y *Metastrongylus* spp. Dentro de los agentes causales de infecciones respiratorias en cerdos se encuentran los coronavirus, especialmente el coronavirus respiratorio porcino (PRCV) y el virus de gastroenteritis transmisible que, aunque infecta principalmente tejido intestinal, puede infectar también el tracto respiratorio

Las infecciones respiratorias por coronavirus en cerdos suelen tener una mortalidad baja, pero son un factor de riesgo para contraer otros patógenos respiratorios, lo que puede favorecer el desarrollo de una nueva infección. Se han descrito múltiples casos de coinfecciones de coronavirus respiratorio porcino con otros patógenos que aumentan la intensidad de las infecciones, haciéndolas más agresivas. Entre los más destacados se ha encontrado coinfecciones con virus reproductor y respiratorio porcino, con el virus de influenza porcina y con *Bordetella bronchiseptica*. Todos estos patógenos son considerados patógenos de alta relevancia en enfermedades respiratorias en cerdos.

Si se logra controlar las infecciones por coronavirus, las infecciones por otros patógenos pueden ser menos severas y generar un menor impacto en la economía de los productores de cerdos. Conocer la prevalencia de coronavirus en cerdos en granjas tecnificadas del país puede ayudar a evaluar si es necesario tomar medidas para combatir estas infecciones, como la vacunación contra PRCV, y así, proteger a los cerdos de infecciones respiratorias más severas en la coinfección con otros patógenos.

Actualmente no se realizan pruebas para detectar el coronavirus respiratorio porcino en las granjas de engorde en Guatemala. Dentro de los métodos que se utilizan para diagnosticarlo se encuentran métodos como hibridación in situ, que es costosa y requiere equipo especializado y personal altamente capacitado para el desarrollo de esta técnica (Sirinarumitr, Paul, Kluge y Halbur, 1996; Franco, 2013) y técnicas inmunológicas que son menos sensibles y, dependiendo de la prueba, puede detectar al virus de manera indirecta únicamente (Costantini *et al.*, 2004). El objetivo de este proyecto es diseñar las herramientas necesarias para realizar un diagnóstico específico, sensible y de costo moderado, como oportunidad para diagnosticar este virus en los

cerdos de engorde y controlar la enfermedad, colaborando en el control del complejo respiratorio porcino.

IV. Objetivos

A. Objetivo general

Diseñar un método para el diagnóstico molecular diferencial del coronavirus respiratorio porcino y del virus de la gastroenteritis transmisible.

B. Objetivos específicos

Diseñar parejas de cebadores para RT-PCR para una región conservada entre el coronavirus respiratorio porcino y el virus de la gastroenteritis transmisible.

Obtener parejas de cebadores para RT-PCR específico para la región S del virus de la gastroenteritis transmisible.

Evaluar parámetros de calidad de las parejas de cebadores y probabilidad de amplificación mediante un RT-PCR *in-silico* en muestras de origen porcino.

Seleccionar la pareja de cebadores con mejores posibilidades de amplificación para la región conservada y específica que permitan identificar el coronavirus respiratorio porcino y el virus de la gastroenteritis transmisible en muestras de origen porcino.

V. Hipótesis

Existen secuencias en los genomas de los virus porcinos, coronavirus respiratorio porcino y del virus de la gastroenteritis transmisible que permiten diferenciarlos y detectarlos en muestras de hisopados nasales de cerdos.

VI. Metodología

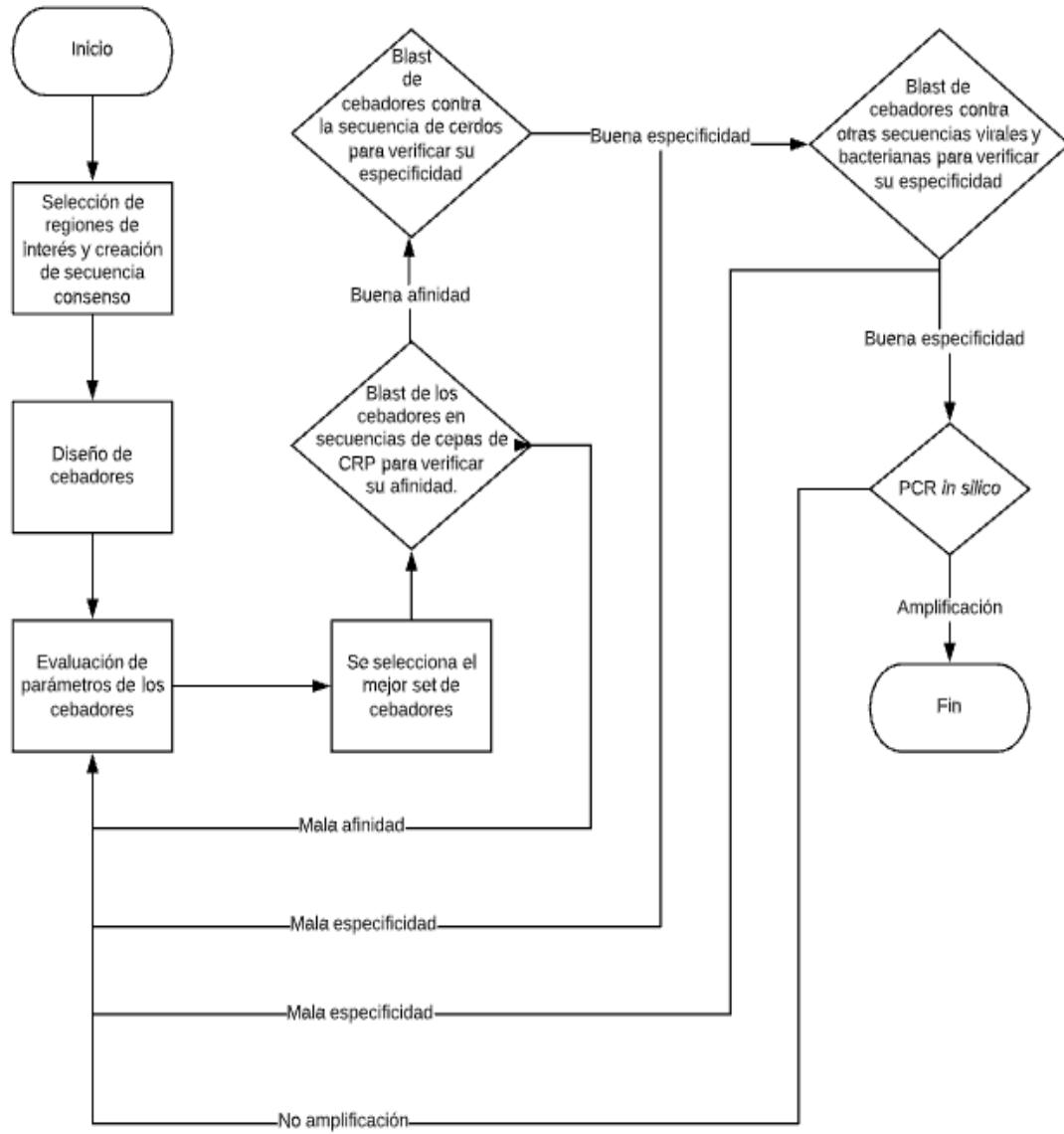


Figura 3. Diagrama resumido de la metodología propuesta.

A. Selección de regiones para la amplificación

Se trabajó con dos regiones de interés, ya que el coronavirus respiratorio porcino y el virus de la gastroenteritis transmisible son genéticamente iguales, salvo que el primero no tiene un fragmento de la región que codifica para la proteína S. Esto se representa en la Figura 4. Se seleccionó otra región, específica para estos dos organismos para el diseño de cebadores.



Figura 4. Representación esquemática de los genomas de los virus TGEV y PRCV.

B. Alineamiento de secuencias

Se utilizó el software UGENE con el algoritmo MUSCLE (método iterativo) (Okonechnikov, Golosova y Fursov, 2012) para alinear secuencias de las regiones de interés de distintas cepas para obtener las secuencias consenso para diseñar los cebadores.

C. Diseño de cebadores

Se realizó el diseño de cebadores para las regiones seleccionadas por medio de la herramienta Primer blast® de NCBI (Ye, Coulouris, Zaretskaya, Cutcutache, Rozen y Madden, 2012), con cinco opciones de salida. Como parámetros de selección se mantuvieron las opciones por defecto Para la región ORF1 no se restringió el largo de los amplicones. Sin embargo, para la región S se restringió a 100-300 pares de bases.

D. Evaluación y comparación de las parejas de cebadores obtenidos

Se evaluaron las distintas parejas de cebadores obtenidos de acuerdo con su longitud, especificidad, T_m , T_a , estabilidad, autocomplementariedad, su contenido GC y energías libres de Gibbs, así como la posibilidad de formación de estructuras secundarias.

Para analizar las estructuras secundarias que se pueden formar, tales como hairpins, homodimers y heterodimers se utilizó el OligoAnalyzer Tool de Integrated DNA technologies (IDT, 2020).

Se seleccionaron tres parejas de cebadores que se consideraron más adecuadas con base en los parámetros antes mencionados. Se procedió a realizar los siguientes análisis con estos cebadores.

Para evaluar la especificidad de los cebadores, se utilizó NucleotideBlast (NCBI). Se evaluó el alineamiento con las secuencias del coronavirus respiratorio porcino y el virus de la gastroenteritis transmisible para ver que sean específicos para la región y especie(s) para la(s) que fueron diseñados. Se realizó el mismo análisis para evaluar que los cebadores no pudieran amplificar genes del genoma y transcriptoma del cerdo, así como con otras cepas virales y bacterianas que se podrían encontrar en un hisopado nasal de cerdo. En el Cuadro 1 se muestran los parámetros de búsqueda utilizados para todos los alineamientos en Blast. Es importante notar que los parámetros no fueron ajustados manualmente, sino que estos

Cuadro 1. Parámetros de búsqueda para los alineamientos por Blast.

Programa	Blastn
Tamaño de palabra	7
Valor esperado	1000
Tamaño de la lista de coincidencias	100
Puntajes de coincidencia/no coincidencia	1,-3
Costos de brecha	5,2
Cadena de filtro	F
Código genético	1

*Los valores fueron ajustados automáticamente por el programa para una secuencia de entrada corta.

Se realizó un PCR *in silico* por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification” (Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004) para estimar los resultados posibles a obtener en un PCR con las parejas de cebadores propuestos y obtención de los resultados esperados del PCR previstos en la electroforesis posterior al PCR. Esto se realizó con la secuencia de los virus de interés y bacterias que infectan comúnmente el tracto respiratorio porcino (*B. bronchiseptica*, *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae*). Contra el genoma del cerdo se realizó por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR (Kent, 2013).

La simulación del gel de electroforesis se realizó con el software de SnapGene (de Insightful Science; disponible en snapgene.com)

VII. Resultados

Los genomas de los virus TGEV y PRCV son muy similares salvo por un fragmento de la región S y algunas variaciones puntuales a partir de la posición nucleotídica 24724, como se observa en la Figura 5.

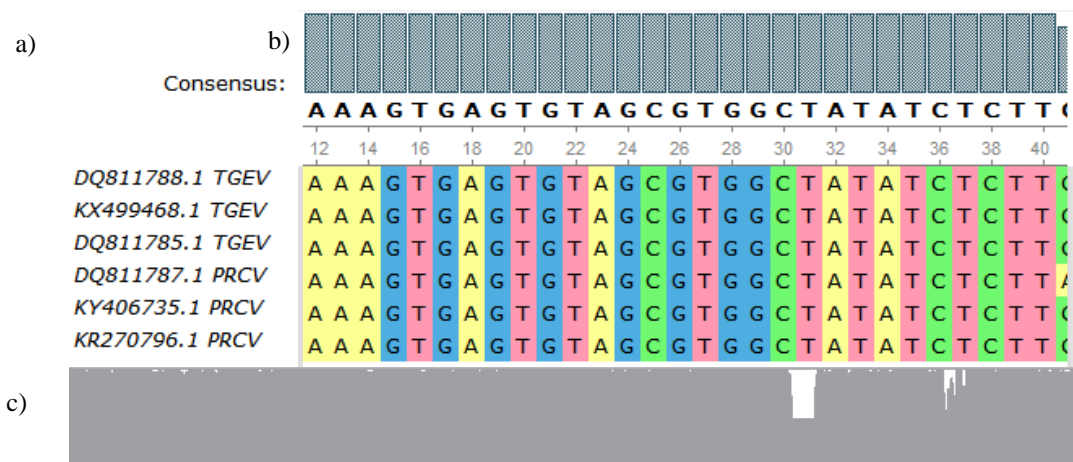


Figura 5. Alineamiento de secuencias del genoma completo del TGEV y PRCV.

*a) muestra los códigos de acceso de las secuencias utilizadas para el alineamiento, b) muestra el alineamiento de las secuencias y c) muestra una visión en conjunto del alineamiento y la similitud a lo largo de toda la secuencia ingresada.

La región S de las distintas cepas de TGEV es muy conservada. Ver figura 6. Al introducir algunas cepas del coronavirus respiratorio porcino, se puede observar la delección de un fragmento de la región S de aproximadamente el nucleótido 60 al 732, como se observa en la Figura 7.

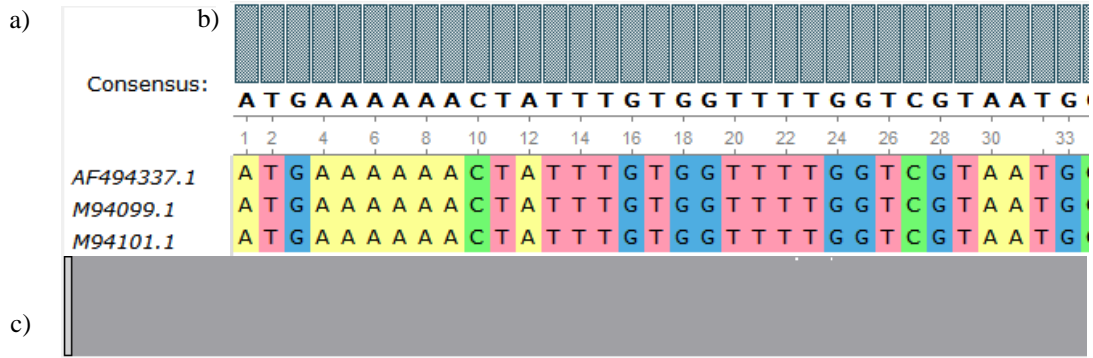


Figura 6. Alineamiento de secuencias de la región S del TGEV.

*a) muestra los códigos de acceso de las secuencias utilizadas para el alineamiento, b) muestra el alineamiento de las secuencias y c) muestra una visión en conjunto del alineamiento y la similitud a lo largo de toda la secuencia ingresada.

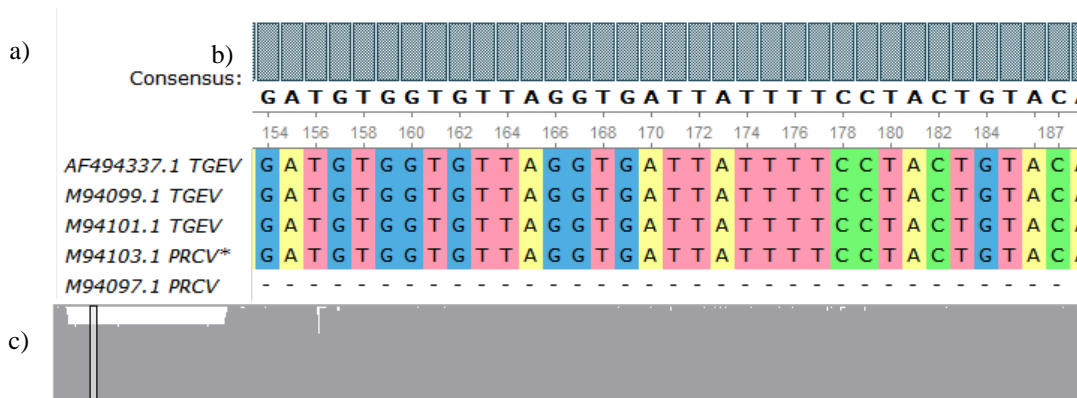


Figura 7. Alineamiento de secuencias de la región S del TGEV y PRCV.

*a) muestra los códigos de acceso de las secuencias utilizadas para el alineamiento, b) muestra el alineamiento de las secuencias y c) muestra una visión en conjunto del alineamiento y la similitud a lo largo de toda la secuencia ingresada. *La cepa marcada (TOY56-165) no presenta la delección característica de PRCV

La región ORF1 está bastante conservada en ambos virus, lo que se puede observar en la Figura 8. Las secuencias consenso obtenidas se encuentran en anexos.

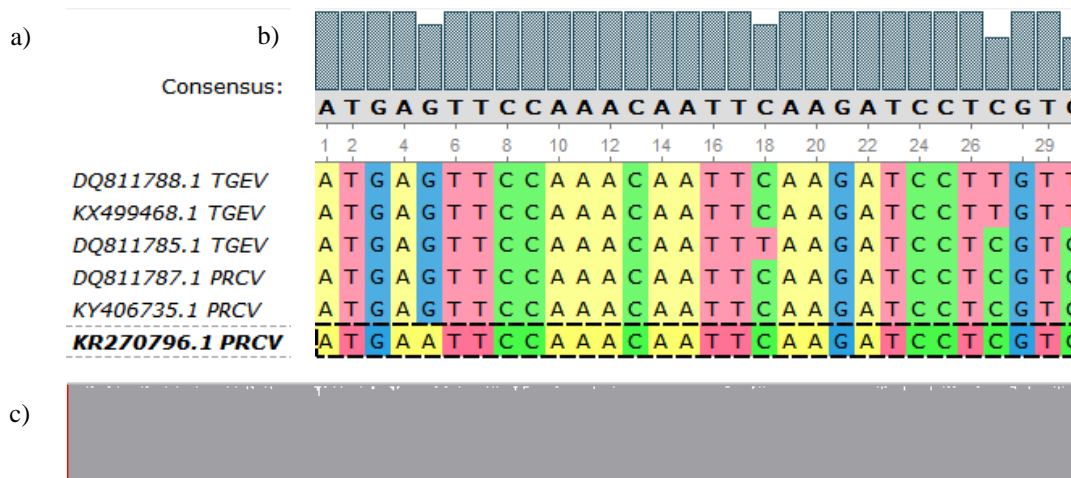


Figura 8. Alineamiento de secuencias de la región ORF1 del TGEV y PRCV.

*a) muestra los códigos de acceso de las secuencias utilizadas para el alineamiento, b) muestra el alineamiento de las secuencias y c) muestra una visión en conjunto del alineamiento y la similitud a lo largo de toda la secuencia ingresada.

En los cuadros 2 y 3 se muestran las parejas de cebadores obtenidas a través de Primer Blast y Oligo Analyzer para la región S del TGEV y sus características. Los tamaños esperados para los amplicones de las parejas de cebadores se encuentran entre 136 pares de bases y 270 pares de bases. La temperatura de fusión de todos los cebadores se encuentra entre 58 y 61°C y su contenido GC está entre 45.5 y 55%. Todos los cebadores pueden formar entre 10 y 16 homodímeros con una energía libre de Gibbs total de entre -41 y -36. Las parejas de cebadores pueden formar entre 12 y 16 heterodímeros con energía libre de Gibbs total entre -41 y -36. Los cebadores pueden formar entre 3 y 7 estructuras tallo-bucle (hairpins) con temperaturas de fusión entre 4.6 y 40.7°C.

Cuadro 2. Características, homodímeros y heterodímeros posibles de los cebadores obtenidos para la región S del TGEV.

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	%GC	Tamaño esperado (pb)	Homodímeros		Heterodímeros	
					Cantidad	ΔG total (kcal/mol)	Cantidad	ΔG total (kcal/mol)
1F	TGTAAGGGCTCACCACCTACT	60.2	52.4	270	13	-38.48	14	-38.97
1R	CTAATGTTGTCGCACGCATATC	60.04	45.5		12	-38.97		
2F	AAGGGCTCACCACCTACTAC	58.43	55	266	10	-36.53	12	-38.96
2R	AAGCGTGCCAGGACTTCTAA	59.31	50		13	-38.96		
3F	GTAAGGGCTCACCACCTACT	58.43	55	222	11	-36.53	14	-36.53
3R	TGACAGTGCCAGACCATTGA	59.24	50		10	-36.36		
4F	TGTAAGGGCTCACCACCTACTA	59.96	50	224	16	-39.44	16	-39.44
4R	GTGACAGTGCCAGACCATTG	59.12	55		12	-36.13		
5F	GGCCTACAATGGTTTGCAGAT	58.9	47.62	136	11	-40.5	15	-40.5
5R	AGCGTGCCAGGACTTCTAAT	59.09	50		14	-38.49		

*datos obtenidos con Primer Blast y Oligo Analyzer.

Cuadro 3. Estructuras tallo-bucle posibles de los cebadores obtenidos para la región S del TGEV.

Cebadores	Estructuras tallo-bucle (Hairpin)									
	Enlaces estructura 1	ΔG (kcal/mol)	Tm(°C)	Enlaces estructura 2	ΔG (kcal/mol)	Tm(°C)	Enlaces estructura 3	ΔG (kcal/mol)	Tm(°C)	Total estructuras
1F	2	-1.08	40.7	2	-0.83	37.6	3	-0.45	32.5	3
1R	2	0.65	5.8	3	0.84	9.9	1	1.11	4.6	7
2F	2	-1.08	40.7	2	-0.83	37.6	3	-0.45	32.5	3
2R	2	0.65	5.8	3	1.05	6.9	1	1.11	4.6	3
3F	2	-1.08	40.7	2	-0.83	37.6	3	-0.45	32.5	3
3R	5	-0.07	25.7	2	1.55	16.1	2	0.58	14.3	3
4F	2	-1.08	40.7	2	-0.83	37.6	3	-0.45	32.5	3
4R	2	0.58	14.7	5	0.73	17.2	2	1.35	1.5	3
5F	3	-0.51	31.2	2/2	-0.1	25.8	2	-0.04	25.6	5
5R	2	0.65	5.8	2	1.17	7.8	1	1.11	4.6	4

*datos obtenidos con Primer Blast y Oligo Analyzer.

En los cuadros 4 y 5 se muestran los mismos datos que en el cuadro 1, pero para las parejas de cebadores de la región ORF1. Los tamaños esperados para los amplicones de las parejas de cebadores se encuentran entre 435 pares de bases y 871 pares de bases. La temperatura de fusión de todos los cebadores se encuentra entre 58 y 61°C y su contenido GC está entre 50 y 55%. Todos los cebadores pueden formar entre 8 y 13 homodímeros con una energía libre de Gibbs total de entre -42 y -36. Las parejas de cebadores pueden formar entre 14 y 18 heterodímeros con energía libre de Gibbs total entre -42 y -38. Los cebadores pueden formar entre una y cuatro estructuras tallo-bucle (hairpins) con temperaturas de fusión entre 18.9 y 64.2°C.

En los cuadros 1-4 se muestran únicamente las características de tres de las estructuras (las que tienen una mayor temperatura de fusión) en los casos, aun cuando hay más estructuras posibles.

Las imágenes de todas las estructuras tallo-bucle posibles de las parejas de cebadores seleccionadas que se encontraron específicas para la región objetivo se encuentran en anexos. La mayoría tiene uno o dos enlaces, sin embargo, hay algunas estructuras con 3 y 4 enlaces.

Todos los cebadores diseñados tienen un largo alrededor de 21 nucleótidos, una temperatura de fusión cercana a 60°C y contenido GC entre 45 y 55%, lo que está dentro de los parámetros óptimos para el diseño de cebadores. El número de homodímeros, heterodímeros y energías libres de Gibbs no varían mucho entre cebadores, por lo que el primer factor para seleccionar los cebadores fue la cantidad de estructuras de tipo tallo-bucle y sus temperaturas de fusión. La mayoría de las estructuras tallo-bucle obtenidas tienen temperaturas de fusión alrededor de 40°C o menores. Los cebadores con temperaturas de fusión más altas son los ORF1 3R y ORF1 4F con 64.2 y 55.4°C respectivamente. Estas, al ser más altas que la temperatura de fusión de sus cebadores implican un problema para la amplificación. Por esto, estas parejas de cebadores fueron descartadas. Con esto, se seleccionaron por descarte las otras tres parejas para continuar el análisis de la región ORF1.

Cuadro 4. Características, homodímeros y heterodímeros posibles de los cebadores obtenidos para la región ORF1a conservada en TGEV y PRCV.*datos obtenidos con Primer Blast y Oligo Analyzer

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	%GC	Tamaño esperado (pb)	Homodímeros		Heterodímeros	
					Cantidad	ΔG total (kcal/mol)	Cantidad	ΔG total (kcal/mol)
1F	TGTCTTCGGACACCAACTCG	59.97	55	699	9	-37.98	14	-38.97
1R	TGTCCAAGCGCAATGGTACT	59.96	50		9	-38.97		
2F	CAGGCTCGTAACGGTGTCT	60.04	55	581	10	-38.57	16	-38.57
2R	AGACGAACTGTTGCACCGAT	59.97	50		10	-37.95		
3F	GCCTGTTGACATGCAAGGTG	60.04	55	871	11	-38.3	18	-41.16
3R	AGCGCGAGCTTTTTCAAGTG	60.04	50		12	-41.16		
4F	GTGATTTTTGAGCGCGAAGCA	60.11	50	734	11	-41.02	17	-41.02
4R	AACGGCACCACGTCTAAGAG	60.04	55		9	-38.57		
5F	TCAGAGCGTCAGCACTCTTG	60.04	55	435	13	-36.63	16	-38.18
5R	ACCAGCACCATTGAGAGCA	58.89	50		8	-38.18		

Cuadro 5. Estructuras tallo-bucle posibles de los cebadores obtenidos para la región ORF1a conservada en TGEV y PRCV.

Cebadores	Estructuras tallo-bucle (Hairpin)									
	Enlaces estructura 1	ΔG (kcal/mol)	Tm(°C)	Enlaces estructura 2	ΔG (kcal/mol)	Tm(°C)	Enlaces estructura 3	ΔG (kcal/mol)	Tm(°C)	Total estructuras
1F	3	-2.01	44.1	4	-1.81	44.8	--	--	--	2
1R	3	-0.7	32.6	--	--	--	--	--	--	1
2F	2	0.24	21.2	2	0.39	18.9	3	0.39	19.5	4
2R	2	-0.57	32.6	2	0.37	10.5	--	--	--	2
3F	3	-0.44	29.9	2+2	-0.4	28.8	3	0.07	24.1	4
3R	3	-2.17	64.2	--	--	--	--	--	--	1
4F	2	-2.01	55.4	2	-1.58	45.5	--	--	--	2
4R	3	-1	40.3	--	--	--	--	--	--	1
5F	2	-1.39	42.9	4	-0.67	34.9	--	--	--	2
5R	2	-0.43	30.9	2	-0.08	26.5	--	--	--	2

*datos obtenidos con Primer Blast y Oligo Analyzer.

En el caso de la selección de las parejas de cebadores de la región S, se eliminó la pareja 5F-5R por tener la mayor cantidad de estructuras tallo-bucle y las mayores energías libres de Gibbs tanto para la formación de homodímeros, como de heterodímeros. El cebador 1R es el que tiene mayor cantidad de estructuras tallo-bucle, pero las temperaturas de fusión de estos son sumamente bajas, por lo que se decidió conservar. Se descartó también la pareja 4F-4R por tener las energías libres de Gibbs más altas para heterodímeros y uno de los cebadores, la mayor para los homodímeros.

Se seleccionaron para continuar en las siguientes fases, las parejas de cebadores 1F-1R, 2F-2R y 3F-3R para la región S y las parejas 1F-1R, 2F-2R y 5F-5R para la región ORF1. Los resultados de los alineamientos por Blast (NCBI) mostraron que todos los cebadores seleccionados para la región S son específicos para TGEV y una única cepa de PRCV; TOY56-165.

Los cebadores 1F, 1R, 2F y 2R para la región ORF1 hibridan tanto en TGEV como en PRCV, pero también en otros coronavirus, como el coronavirus felino y el coronavirus canino. Los cebadores 5F y 5R no presentaron alineamientos significativos con secuencias de cepas de los virus PRCV y TGEV y fueron descartados para los siguientes pasos. Los resultados de los alineamientos se pueden encontrar en anexos.

A los cebadores restantes se le asignó un nuevo nombre codificado a modo de facilitar su diferenciación. Los nuevos nombres se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Codificación de los nombres de los cebadores seleccionados.

Nombre original	Nombre codificado	Secuencia (5' a 3')
S 1F	TGEV-S-399(266)	TGTAAGGGCTCACCACCTACT
S 1R	TGEV-S-664(266)	CTAATGTTGTCGCACGCATATC
S 2F	TGEV-S-396(253)	AAGGGCTCACCACCTACTAC
S 2R	TGEV-S-648(253)	AAGCGTGCCAGGACTTCTAA
S 3F	TGEV-S-397(222)	GTAAGGGCTCACCACCTACT
S 3R	TGEV-S-618(222)	TGACAGTGCCAGACCATTGA
ORF1 1F	TGEV/PRCV-ORF1-64(699)	TGTCTTCGGACACCAACTCG
ORF1 1R	TGEV/PRCV-ORF1-763(699)	TGTCCAAGCGCAATGGTACT

Nombre original	Nombre codificado	Secuencia (5' a 3')
ORF1 2F	TGEV/PRCV-ORF1-11150(581)	CAGGCTCGTAACGGTGTCT
ORF1 2R	TGEV/PRCV-ORF1-11730(581)	AGACGAACTGTTGCACCGAT

*La codificación se llevó a cabo de la siguiente manera (nombre del virus - región objetivo o gen - nucleótido inicial del alineamiento dentro del gen (tamaño esperado del amplicón)).

Los cebadores seleccionados de la región S hibridan en la región del gen en la que PRCV tiene una deleción, como se ve en la Figura 9. Los cebadores seleccionados para la región ORF1 hibridan en fragmentos distintos de la región, como se ve en la Figura 9.

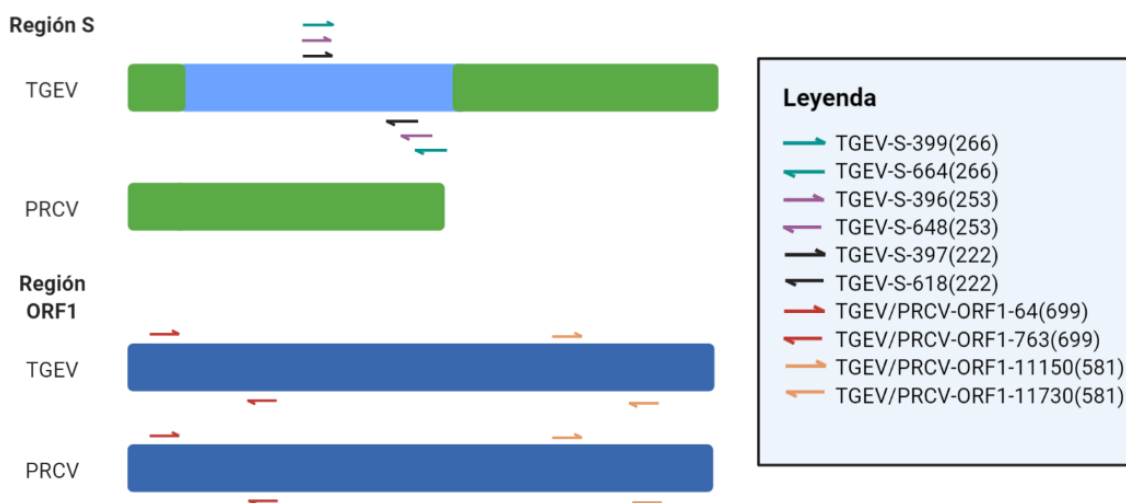


Figura 9. Diagrama del alineamiento de los cebadores en los genes objetivo para ambos virus.

En la Figura 10 se muestran las bandas esperadas en la electroforesis posterior al RT-PCR de muestras positivas para estas regiones. Los tamaños de banda son comparados con una escalera de peso molecular GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder de Thermo Fisher (pozo 1). Los tamaños moleculares de los amplicones de ambas regiones son distintos. Los amplicones esperados para la región ORF1 se encuentran entre 500 y 700 pares de bases, mientras que los de la región S se encuentran alrededor de 200 pares de bases.

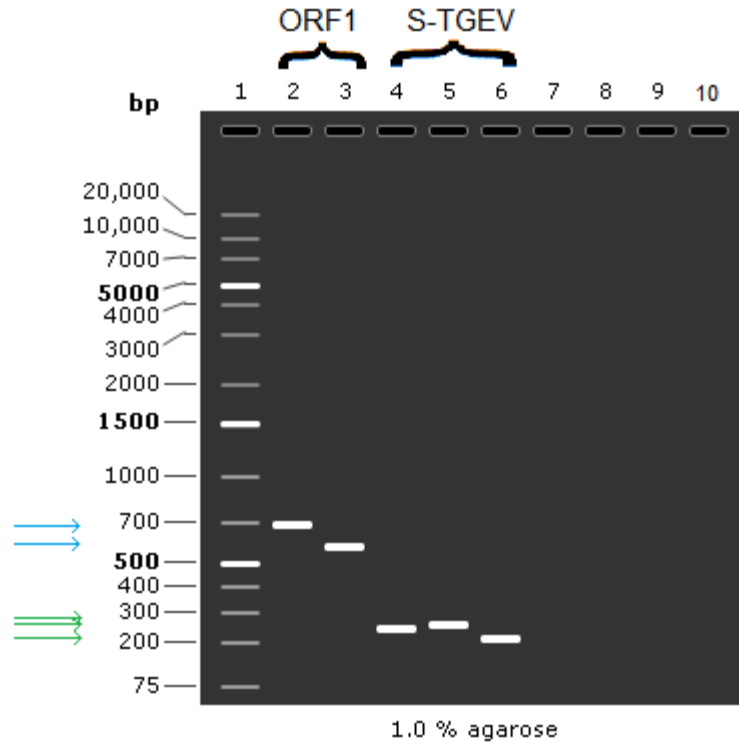


Figura 10. Imagen del gel con los tamaños esperados de los amplicones de los distintos cebadores.

*En el pozo 1 está la escalera de peso molecular GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder de Thermo Fisher. En los pozos 2 y 3 se muestran los resultados esperados para los amplicones de la región ORF1 con las parejas de cebadores 1 y 2 respectivamente. En los pozos 4, 5 y 6 se muestran los amplicones de la región S del TGEV con las parejas de cebadores 1, 2 y 3 respectivamente. Los tamaños moleculares esperados para los amplicones están señalados con las flechas en azul y verde, para la región ORF1 y S, respectivamente.

Se encontró que ninguna de las parejas de cebadores amplifica genes del cerdo, ni de algunas bacterias y virus comunes en infecciones respiratorias porcinas por medio de PCR *in silico*. Los resultados de estos análisis se resumen en los Cuadros 7 y 8, y se muestran específicamente en las Figuras 40, en adelante.

Cuadro 7. Resumen de los resultados de PCR *in silico* realizados contra el genoma del cerdo y bacterias que infectan comúnmente su tracto respiratorio.

Parejas de cebadores	Resultados de PCR <i>in silico</i>			
	<i>Sus scrofa</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ,	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
TGEV-S-399(266)	--	--	--	--
TGEV-S-664(266)				
TGEV-S-396(253)	--	--	--	--
TGEV-S-648(253)				
TGEV-S-397(222)	--	--	--	--
TGEV-S-618(222)				
TGEV/PRCV-ORF1-64(699)	--	--	--	--
TGEV/PRCV-ORF1-763(699)				
TGEV/PRCV-ORF1-11150(581)	--	--	--	--
TGEV/PRCV-ORF1-11730(581)				

*Se muestran los resultados de las reacciones de PCR *in silico* de los cebadores seleccionados. Los resultados negativos se muestran con “—” y los positivos con “x”. Los resultados específicos pueden encontrarse en anexos a partir de la página 82. Para los análisis contra el genoma de cerdo se utilizó la secuencia: sscrofa 11.1/susScr11 de UCSC. Para los bacterianos se utilizaron las cepas: AP014582.1 para *B. bronchiseptica*, CP002274.1 para *M. hyopneumoniae* y CP000569.1 para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En todos los análisis se permitieron 0 no coincidencias (mismatches).

Cuadro 8. Resumen de los resultados de PCR *in silico* realizados contra otros virus que infectan comúnmente su tracto respiratorio.

Parejas de cebadores	Resultados de PCR <i>in silico</i>		
	Virus de Influenza A	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino	Circovirus porcino 2
TGEV-S-399(266)	--	--	--
TGEV-S-664(266)	--	--	--
TGEV-S-396(253)	--	--	--
TGEV-S-648(253)	--	--	--
TGEV-S-397(222)	--	--	--
TGEV-S-618(222)	--	--	--
TGEV/PRCV-ORF1-64(699)	--	--	--
TGEV/PRCV-ORF1-763(699)	--	--	--
TGEV/PRCV-ORF1-11150(581)	--	--	--
TGEV/PRCV-ORF1-11730(581)	--	--	--

*Se muestran los resultados de las reacciones de PCR *in silico* de los cebadores seleccionados. Los resultados negativos se muestran con “—” y los positivos con “x”. Los resultados específicos pueden encontrarse a partir de la página 89. Para las secuencias virales se utilizaron las secuencias: NC_002023.1, NC_002021.1, NC_002022.1, NC_002017.1, NC_002019.1, NC_002018.1, NC_002016.1 y NC_002020.1 para el virus de Influenza A, AB288356.1 para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y KY084478.1 para Circovirus porcino 2. En todos los análisis se permitieron 0 no coincidencias (mismatches).

VIII. Discusión de resultados

Se logró diseñar cebadores específicos para la detección y diferenciación por medio de RT-PCR dúplex de los virus PRCV y TGEV. El alineamiento de las secuencias de distintas cepas del TGEV y el PRCV presentó alta similitud (97%), salvo por una delección observada en un fragmento de la región S de los virus. Esto coincide con la literatura, que lo marca como la mayor diferencia genética entre el TGEV y el PRCV y a la cual se le atribuye la incapacidad del PRCV de infectar el tracto gastrointestinal de los cerdos (Krempl, Schultze, Laude, & Herrler, 1997; Pensaert, Callebaut, & Vergote, 1986). Aprovechando esta delección, se diseñaron los cebadores de la región S, específicamente para una región que el coronavirus respiratorio porcino no tiene, lo que facilita su diferenciación.

El algoritmo utilizado, MUSCLE, al ser un algoritmo iterativo, permite ir mejorando el alineamiento inicial para obtener la mejor solución posible, por lo que presenta una ventaja frente a un algoritmo progresivo. En este último, la calidad del alineamiento depende completamente de los emparejamientos y análisis iniciales, a partir de los cuales se completa el alineamiento. Por esto, si se comete un error en los pasos iniciales, este afecta todo el alineamiento.

Al momento de hacer el alineamiento por medio de Blast (NCBI), se obtuvo resultados específicos para TGEV con los cebadores de la región S. La única cepa de PRCV que presenta un alineamiento es la cepa TOY56-165, con porcentajes de identidad del 100% para todos los cebadores y valores E variables, estando la mayoría por debajo de 1, aunque algunos tienen valores E de hasta 8.0. Al realizar el alineamiento de la región S de cepas de TGEV con 2 cepas del PRCV, incluyendo la TOY56-165, se pudo observar que esta no tiene presente la delección característica, lo que explica que los cebadores diseñados para la región S puedan hibridarse a esta cepa. Esto resulta inesperado, pues la característica

principal que diferencia al PRCV del TGEV es justamente esta delección (Pensaert, Callebaut, & Vergote, 1986). Al investigar las fuentes de la secuencia en NCBI, se encontró que se trata realmente de una cepa de TGEV aislada por primera vez en Japón en 1956, no de una cepa de PRCV (Sánchez, Gebauer, Suñé, Mendez, Dopazo y Enjuanes, 1992; Furuchi, Shimizu y Kumagai, 1976). Esto pareciera indicar un error en el nombre en la base de datos de NCBI, por lo que no se trata de una cepa de PRCV, sino de una TGEV mal anotada.

Como región conservada para la detección de ambos virus se seleccionó la región ORF debido a que presentaba alta similitud entre las cepas de TGEV y PRCV. Los cebadores diseñados para la región ORF1 son complementarios para ambos virus y esto se puede ver en los alineamientos en anexos. Sin embargo, también algunos cebadores son complementarios para coronavirus canino y felino y podrían, teóricamente, amplificar estos virus además de los objetivo. Estos alineamientos se encuentran en anexos en las páginas 60-67. Dado que el método está diseñado para hisopados nasales de cerdos y los coronavirus felino y canino no infectan el tracto respiratorio sino de forma gastrointestinal (Foley, Poland, Carlson y Pedersen, 1997; Tennant, Gaskell, Kelly, Carter y Gaskell, 1991) esto no debería implicar un problema para el método.

Los tamaños esperados de los amplicones de ambas regiones son diferentes, lo que permite que sean amplificados en dúplex. Al ser la diferencia de tamaños moleculares esperados para todos los cebadores de las distintas regiones de más de 300 pares de bases, estos serían fácilmente diferenciables por medio de electroforesis para poder detectar ambas regiones. Por esto, y porque las temperaturas de fusión de los cebadores son muy similares, se considera que se podría llevar a cabo un RT-PCR dúplex para la identificación y diferenciación de los dos virus. Esto permite una identificación más rápida y de menor costo que si se realizara por medio de reacciones de RT-PCR separadas.

Los cebadores no amplifican genes de *Sus scrofa* (cerdo doméstico), ni de bacterias y virus que infectan frecuentemente el tracto respiratorio de los cerdos: *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Virus de Influenza A, Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y Circovirus porcino 2 (Collings & Rutter, 1985; Palzer *et al.*, 2015; Haesebrouck, Chiers, Overbeke, &

Ducatelle, 1997) como se puede ver en los resultados de los PCRs *in silico* mostrados en anexos. Esto respalda la especificidad del método y que su uso con muestras de hisopado es apropiado. Sin embargo, es importante que se evalúen los cebadores en el laboratorio para verificar que amplifiquen las regiones y optimizar las condiciones de reacción para obtener los mejores resultados posibles.

Dentro de las limitaciones más relevantes de la investigación se encuentran, primero, que todo el trabajo fue realizado *in silico*, por lo que depende de las herramientas bioinformáticas a disposición, así como de las secuencias y datos que ya han sido publicados. En el caso de los virus en cuyos se enfoca el estudio, no hay muchas secuencias publicadas, especialmente de PRCV. Como segunda limitación importante, se realizó el análisis de PCR *in silico* para descartar que los cebadores pudieran amplificar otros organismos comúnmente patógenos del tracto respiratorio del cerdo y del cerdo como tal, pero solo se realizó con una cepa por cada organismo, por cuestiones de tiempo y disponibilidad de secuencias para el análisis y las herramientas utilizadas no presentan estadísticas que respalden el resultado.

Dentro de los próximos pasos para esta investigación se encuentran: evaluar los cebadores en el laboratorio para comprobar su eficiencia y optimizar la reacción de RT-PCR para seleccionar una pareja para cada región, así como decidir si se desea realizar un tamizaje para coronavirus respiratorios porcinos en hisopados nasales de cerdos con los cebadores para la región ORF1 y posteriormente pasar las muestras positivas al RT-PCR dúplex para diferenciar los virus o realizar el análisis en simultáneo desde el inicio.

Se considera que sería muy valioso iniciar una investigación que permita determinar la prevalencia de estos virus en las poblaciones porcinas del país y compararlas con estadísticas mundiales, así como evaluar si vale la pena iniciar un programa de prevención contra el PRCV, que es el más frecuente en infecciones respiratorias en cerdos.

IX. Conclusiones

Se obtuvieron cinco parejas de cebadores para la región ORF1, que es conservada en el TGEV y el PRCV.

Se obtuvieron cinco parejas de cebadores para un fragmento de la región S, específico del TGEV, exceptuando la cepa TOY56-165 de PRCV, que se cree está mal nombrada en la base de datos del NCBI.

Se seleccionaron dos parejas de cebadores para la región ORF1 y tres para la región S del TGEV que cumplen con los parámetros de contenido GC, temperatura de fusión y estructuras secundarias óptimas para la amplificación y son específicas para las regiones objetivo, con algunas excepciones.

Las parejas seleccionadas son específicas y no amplifican genes del cerdo o de patógenos comunes en infecciones respiratorias del cerdo (*Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Virus de Influenza A, Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y *Circovirus porcino 2*), por lo que son apropiados para la detección de los virus de muestras de hisopados nasales de origen porcino.

X. Recomendaciones

Se recomienda que se puedan realizar los alineamientos con un mayor número de secuencias para asegurar una secuencia consenso más robusta.

Se considera importante incluir otros patógenos importantes en los análisis de PCR *in silico* para descartar que los cebadores puedan amplificar otro patógeno importante del tracto respiratorio porcino, dando lugar a falsos positivos.

Se recomienda que se evalúen los cebadores en el laboratorio para verificar que amplifiquen las regiones y optimizar las condiciones de reacción del RT-PCR para seleccionar la pareja con mejor rendimiento para su uso en el método de identificación diferencial de TGEV y PRCV.

Se puede evaluar la posibilidad de realizar un tamizaje para coronavirus porcinos en hisopados nasales de cerdos con los cebadores para la región ORF1 y posteriormente pasar las muestras positivas al RT-PCR dúplex con amplificación de ambas regiones para identificar si la infección es dada por TGEV o PRCV y la posibilidad de realizar el análisis en simultáneo desde el inicio.

Una vez optimizado el método en el laboratorio, se recomienda iniciar una investigación que permita determinar la prevalencia de estos virus en las poblaciones porcinas del país y compararlas con estadísticas mundiales, para evaluar la necesidad de implementar un programa de vacunación contra el PRCV, que es el más frecuente en infecciones respiratorias en cerdos.

XI. Bibliografía

- Allan, G. M., Mcneilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., & Meehan, B. (2000). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication Brief Report. *Archives of Virology*, *145*(11), 2421–2422.
- Atanasova, K., Van Gucht, S., Barbé, F., Lefebvre, D. J., Chiers, K., & Van Reeth, K. (2008). Lung cell tropism and inflammatory cytokine-profile of porcine respiratory lung cell tropism and inflammatory cytokine-profile of porcine respiratory coronavirus infection. *Open Veterinary Science Journal*, *2*, 117–126. <https://doi.org/10.2174/1874318800802010117>
- Bencomo, B. G. (2010). *Principales Enfermedades de los Cerdos*. Managua.
- Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. (2004). *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics* *20*:798-9.
- Brockmeier, S. L., Loving, C. L., Nicholson, T. L., & Palmer, M. V. (2008). Coinfection of pigs with porcine respiratory coronavirus and *Bordetella bronchiseptica*, *128*, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.025>
- Brownfield, B. (2020). Actinobacillus pleuropneumoniae in swine. Purdue University-Animal Disease Diagnostic Laboratory. Revisado el [08/12/2020] en: <https://www.addl.purdue.edu/newsletters/2007/Summer/SwineAPP.html>
- Chae, C., Kim, O., Min, K., Choi, C., Kim, J., & Cho, W. (2000). Seroprevalence of porcine respiratory coronavirus in selected Korean pigs. *Preventi*, *46*(4), 294–297.
- Charley, B., Riffault, S., & Van Reeth, K. (2006). Porcine innate and adaptative immune

- responses to influenza and coronavirus infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 130–136. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.014>
- Collings, A., & Rutter, J. M. (1985). Virulence of *Bordetella bronchiseptica* in the porcine respiratory tract. *Journal of Medical Microbiology*, 19(2), 247–258.
- Costantini, V., Lewis, P., Alsop, J., Templeton, C., & Saif, L. J. (2004). Respiratory and fecal shedding of Porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel weaned pigs and sequence of the partial S-gene of the PRCV isolates, 957–974. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0245-z>
- Doyle, L. P., & Hutchings, L. M. (1946). A transmissible gastroenteritis in pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 108, 257–259.
- Ettenleiter, T. C. M. (2000). Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis. *Veterinary Research*, 31(1), 99–115.
- FAO. (2014). Cerdos y la producción animal. Retrieved July 18, 2019, from <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/production.html>
- Foley, J. E., Poland, A., Carlson, J., & Pedersen, N. C. (1997). Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 210(9), 1307-1312.
- Franco Mesa, M. L. (2013). Características, ventajas y desventajas de la hibridización in situ para la identificación de agentes patógenos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(25), 63-78.
- Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26(1), 112–125.
- Furuuchi, S., Shimizu, Y., & Kumagai, T. (1976). Vaccination of newborn pigs with an attenuated strain of transmissible gastroenteritis virus. *American Journal of Veterinary Research*, 37(12), 1401-1404.
- Gonzalez-reiche, A. S., Ramírez, A. L., Müller, M. L., Orellana, D., Sosa, S. M., Ola, P., ... Perez, C. C. D. R. (2017). Origin, distribution, and potential risk factors associated with influenza A virus in swine in two production systems in

- Guatemala. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 11(2), 182–192.
<https://doi.org/10.1111/irv.12437>
- Haesebrouck, F., Chiers, K., Overbeke, I. Van, & Ducatelle, R. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology*, 58(2–4), 239–249.
- Halbur, P. G. (1996). Defining the causes of PRDC. *Swine Consultant*, 4–15.
- Halbur, P. G. (1998). Porcine viral respiratory diseases. In *Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society* (pp. 1–10).
- Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M., & Nielsen, O. L. (2010). An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2–3), 120–131.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.012>
- Harada, K., Furuuchi, S., Kumagai, T., & Sasahara, J. (1969). Pathogenicity, immunogenicity and distribution of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *National Institute of Animal Health Quarterly*, 9(4), 185–192.
- Hill, H. (1990). Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome). In *Proceedings of the mystery swine disease committee meeting* (pp. 29–30).
- Holtkamp, D. J., Kliebenstein, J. B., Neumann, E., & Zimmerman, J. J. (2013). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production*, 21(2), 72.
- Iglesias, G., Pijoan, C., & Molitor, T. (1992). Effects of pseudorabies virus infection upon cytotoxicity and antiviral activities of porcine alveolar macrophages. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 15(4), 249–259.

- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (2010). *Manejo sanitario eficiente de los cerdos*. Managua.
- Kent, J. (2013). UCSC In-Silico PCR. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
- Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K. F., ... Webster, R. G. (1994). Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *Journal of General Virology*, 75(9), 2183–2188.
- Kobisch, M., Blanchard, B., Potier, M. Le, Kobisch, M., Blanchard, B., Le, M., & Mycoplasma, P. (1993). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Veterinary Research*, 24(1), 67–77.
- Krempl, C., Schultze, B., Laude, H., & Herrler, G. (1997). Point mutations in the s protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Journal of Virology*, 71(4), 3285–3287.
- Laber, K. E., Whary, M. T., Bingel, S. A., Goodrich, J. A., Smith, A. C., & Swindle, M. M. (2002). Biology and diseases of swine. *Laboratory Animal Medicine*, 615.
- Lacayo, L. N. (2012). Enfermedades respiratorias en cerdos causan pérdidas económicas; control y prevención. *Productor Agropecuario* (Guatemala) no. 18 p. 38-40.
- Lanza, I., Brown, I. H., & Paton, D. J. (1992). Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus, 53(3), 309–314.
- Laude, H., Charley, B., & Gelfi, J. (1984). Replication of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) in swine alveolar macrophages. *Journal of General Virology*, 65(2), 327–332.
- Laude, H., Van Reeth, K., & Pensaert, M. (1993). Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Veterinary Research*, 24(2), 125–150.
- Minion, F. C. (2002). Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory

- pathogens. *Front Biosci*, 7, 1410-1422.
- Moës, E., Vijgen, L., Keyaerts, E., Zlateva, K., Li, S., Maes, P., ... Van, M. (2005). A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infectious Diseases*, 5(1), 1– 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-6>
- Nakharuthai, C., Boonsoongnern, A., Poolperm, P., Wajjwalku, W., Urairong, K., Chumsing, W., ... Medicine, P. (2008). Occurrence of swine influenza virus infection in. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 39(6), 1045–1053.
- Narita, M., Kawashima, K., Matsuura, S., Uchimura, A., & Miura, Y. (1994). Pneumonia in Pigs Infected with Pseudorabies Virus and *Haemophilus parasuis* Serovar 4. *Journal of Comparative Pathology*, 110(4), 329–339.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., & Fursov, M. (2012). UGENE team. 2012. *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit*. *Bioinformatics*, 28(8), 1166-1167.
- OligoAnalyzer® program, IDT, Coralville, Iowa, USA. Accessed August-September, 2020. <https://www.idtdna.com/SciTools>.
- Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L. G., & Halbur, P. G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*, 12(2), 133–148. <https://doi.org/10.1017/S1466252311000120>
- Opriessnig, T., Meng, X., & Halbur, P. G. (2007). Porcine circovirus type 2 – associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations , pathogenesis , diagnosis , and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(6), 591–615.
- Palzer, A., Ritzmann, M., Wolf, G., & Heinritzi, K. (2015). Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Veterinary Record*, 162(9), 267–271.
- Pedersen, K. B., & Barfod, K. (1981). The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. *Nordisk Veterinaermedicin*, 33(12), 513—522. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/7335484>

- Pensaert, M., Callebaut, P., & Vergote, J. (1986). Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Veterinary Quarterly*, 8(3), 257–261.
- Sánchez, C. M., Gebauer, F., Suñé, C., Mendez, A., Dopazo, J., & Enjuanes, L. (1992). Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology*, 190(1), 92-105.
- Segalés, J., Allan, G. M., & Domingo, M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*, 6(2), 119–142. <https://doi.org/10.1079/AHR2005106>
- Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Fablet, C., Madec, F., & Rose, N. (2012). Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study, 157, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.015>
- Sirinarumitr, T., Paul, P. S., Halbur, P. G., & Kluge, J. P. (1997). *An overview of immunological and genetic methods for detecting swine coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus, and porcine respiratory coronavirus in tissues*. Boston, MA: Springer.
- Sirinarumitr, T., Paul, P. S., Kluge, J. P., & Halbur, P. G. (1996). In situ hybridization technique for the detection of swine enteric and respiratory coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV), in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Journal of virological methods*, 56(2), 149-160.
- Sprino, P. J., & Ristic, M. (1982). Intestinal, pulmonary, and serum antibody responses of feeder pigs exposed to transmissible gastroenteritis virus by the oral and the oral-intranasal routes in inoculation. *American Journal of Veterinary Research*, 43(2), 255–261.
- Tajima, M. A. S. A. N. O. R. I., & Yagihashi, T. A. K. E. S. H. I. (1982). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infection and immunity*, 37(3), 1162-1169.
- Tennant, B. J., Gaskell, R. M., Kelly, D. F., Carter, S. D., & Gaskell, C. J. (1991).

- Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation.
Research in veterinary science, 51(1), 11-18.
- Thacker, E. (2001). Thacker, E. L. (2001). Porcine respiratory disease complex-what is it and why does it remain a problem? *Pig Journal*, 48, 66–70.
- Thacker, E., & Thanawongnuwech, R. (2002). Porcine respiratory disease complex (PRDC). *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 32, 125–134.
- Underdahl, N. R., Mebus, C. A., Stair, E. L., Rhodes, M. B., McGill, L. D., & Twiehaus, M. J. (1974). Isolation of transmissible gastroenteritis virus from lungs of market-weight swine. *American Journal of Veterinary Research*, 35(9), 1209.
- United States Department of Agriculture. (2016). *Swine Part II: Reference of Swine Health and Health Management in the United States, 2012*.
- USDA Foreign Agricultural Service. (2018). USDA Foreign Agricultural Service Production, Supply, and Distribution Database. Foreign Agricultural Service, Department of Agriculture. Retrieved from <https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-foreign-agricultural-service-production-supply-and-distribution-database>
- Van Reeth, K., Nauwynck, H., & Pensaert, M. (1996). Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Veterinary Microbiology*, 48(3–4), 325–335.
- Van Reeth, K., & Pensaert, M. B. (1994). Porcine respiratory coronavirus-mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 9, 1275–1281.
- Wesley, R. D., Woods, R. D., Mckean, J. D., Senn, M. K., & Elazhary, Y. (1997). Short communications prevalence of coronavirus antibodies in iowa swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61(4), 305–308.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Tsang, C., Lau, C. C. Y., Chow, F. W. N., Fong, J. Y. H., ... Yuen, K. (2017). Coronavirus HKU15 in respiratory tract of pigs and first

discovery of coronavirus quasispecies in 5' - untranslated region Coronavirus HKU15 in respiratory tract of pigs and first discovery of coronavirus quasispecies in 5' -untranslated region. *Emerging Microbes & Infections*, 1751(6), 1–7.
<https://doi.org/10.1038/emi.2017.37>

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134

XII. Anexos

>Secuencia consenso obtenida para la región S de TGEV

ATGAAAAAACTATTTGTGGTTTTGGTCGTAATGCCATTGATTTATGGAGACAATTTTCCTTGTTCTAAATGACTAATAGAACTATAGGCAACCAGTGGAATCTCATTGAAACCTTCCTTCTAAACTATAGTAGTAGGTTACCACCTAATTCAGATGTGGTGTAGGTGATTATTTTCCTACTGTACAACCTTGGTTAAATTCGATTTCGCAATATAGTAATGACCTTTATGTTACACTGGAAAATCTTAAAGCATTGTATGTTGGGATTATGCTACAGAAAATATCACTTGGAAATCACAGACAACGGTTAAACGTAGTCGTTAATGGATACCCATACTCCATCACAGTTACAACAACCCGCAATTTTAAATCTGCTGAAGGTGCTATTATATGCATTTGTAAGGGCTCACCACCTACTACCACCACAGAATCTAGTTTGAAGTTGCAATTTGGGGTAGTGAGTGCAGGTTAAACCATAAGTTCCCTATATGTCTTCTAATTCAGAGGCAAATTTGTGGTAATATGCTGTATGGCCTACAATGGTTTTGCAGATGAGGTTGTTGCTTATTTACATGGTGCTAGTTACCGTATTAGTTTTGAAAATCAATGGTCTGGCAGTGTACATTTGGTGATATGCGTGCGACAACATTAGAAATGTCCTGGCAGCCTTGTAGACCTTTGGTGGTTTTAATCCTGTTTATGATGTCAGTTATTATAGGGTTAATAATAAAAATGGTACTACCGTAGTTTCCAATTGCACTGATCAATGTGCTAGTTATGTGGCTAATGTTTTTACACACAGCCAGGAGGTTTTATAACCATCAGATTTTAGTTTTAATAAATTGGTTCCTTCTAATAATAGCTCCACGTTGGTTAGTGGTAAATTAGTTACCAAACAGCCGTTATTAGTTAATTGCTTATGGCCAGTCCCTAGCTTTGAAGAAGCAGCTTCTACATTTTGTGGTGGGTTGCTGGCTTTGATCAATGTAATGGTGCTGTTTTAATAATACTGTAGACGTCATTAGGTTCAACCTTAATTTTACTACAATGTACAATCAGGTAAGGGTGCCACAGTGTTCATTGAACACAACGGGTGGTGCTACTCTTGAATTTTCATGTTATAACAGTGAGTGACTCGAGCTTTTTCAGTTACGGTGAATTTCCGTTCCGGCGTAACTGATGGACCACGGTACTGTTTCGTACACTATAATGGCACAGCTCTTAAGTATTTAGGAACATTACCACCTAGTGCAAGGAGATTGCTATTAGTAAGTGGGGCCATTTTTATATTAATGGTTACAATTTCTTTAGCACATTTCCATTGATTGTATATCTTTTAAATTTGACCAGTGGTGATAGTGACGTTTTCTGGACAATAGCTTACACATCGTACACTGAAGCATTAGTACAAGTTGAAAACACAGCTATTACAAAGGTGACGTATTGTAATAGTCACGTTAATAACATTAATGCTCTCAAATTACTGCTAATTTGAATAATGATTTTTATCCTGTTTTCTTCAAGTGAAGTTGGTCTTGTCAATAAGAGTGTTGTGTTACTACCTAGCTTTTACACACATAACCATTTGTTAACATAACTATTGGTCTTGGTATGAAGCGTAGTGGTTATGGTCAACCCATAGCCTCAACATTAAGTAACATCACACTACCAATGCAGGATCACAACACCGATGTGTACTGTATTCGTTCTGACCAATTTTTCAGTTTATGTTTCATTCTACTTGCAAAAGTGCTTTATGGGACAATATTTTAAAGCGAACTGCACGGACGTTTTTAGATGCCACAGCTGTTATAAAAACCTGGTACTTGTCCTTTCTCATTTGATAAATTGAACAATTACTTAACTTTTAAACAAGTTCTGTTTGTGCTTGAGTCCTGTTGGTGCTAATTGTAAGTTTGATGTAGCTGCCCCGTACAAGAACCAATGAGCAGGTTGTTAGAGTTTGTATGTAATATATGAAGAAGGAGACAACATAGTGGGTGTACCGTCTGATAATAGTGGTGTGCACGATTTGTGCTAGTGTACACCTAGATTCCTGCACAGATTACAATATATATGGTAGAACTGGTGTGGTATTATTAGAAAATAACAGGACGCTACTTAGTGGCTTATATTACACATCACTATCAGGTGATTTGTTAGGTTTTTAAAAATGTTAGTGATGGTGTGCATCTACTCTGTAACGCCATGTGATGTAAGCGCACAAGCAGCTGTTATTGATGGTACCATAGTTGGGGCTATCACTTCCATTAACAGTGAACGTTAGGTTAAACACATTTGGACAACAACACCTAATTTTTTATTACTACTCTATATATAATTACACAAATGATAGACTCGTGGCACTGCAATTTGACAGTAATGATGTTGATTGTGAACCTGTCATAACCTATTCTAACAATAGGTGTTTTGTAAAAATGGTGTCTTTTGTTTTTTATTAACGTCACACATTTCTGATGGAGACGTGCCAACCAATTAGCACTGGTAATGTCACGATACCTACAACTTTACCATATCCGTGCAAGTCAATATATATTCAGTTTTACACTACACCAGTGTCAATAGACTGTTCAAGATATGTTTGTAAATGGTAACCCTAGGT

GTAACAATTGTTAACACAATACGTTTCTGCATGTCAAACCTATTGAGCAAGCACTTGCAATGGGTG
CCAGACTTGAAAACATGGAGGTTGATTCATGTTGTTTCTGAAAATGCCCTTAAATTGGCA
TCTGTTGAAGCATTCAATAGTTCAGAACTTTAGACCCTATTTACAAAGAATGGCCTAATATAGG
TGGTCTTGGCTAGAAGGTCTAAAATACATACTCCGTCCTATAATAGCAAACGTAAGTATCGTT
CAGCTATAGAGGACTTGCTTTTTGATAAGGTTGTAACATCTGGTTTAGGTACAGTTGATGAAGAT
TATAAACGTGTACAGGTGGTTATGACATAGCTGACTTAGTATGTGCTCAATACTATAATGGCATC
ATGGGCTACCTGGTGTGGCTAATGCTGACAAAATGACTATGTACACAGCATCCCTTGCAGGGGTA
TAACATTAGGTGCACTTGGTGGAGGCGCCGTGGCTATACCTTTGCAGTACAGTTTCCAGGCTAGACT
TAATTATGTTGCTCTACAACTGATGTATTGACAAAACCAGCAGATTCTGGCTAGTGCTTTCAA
TCAAGCTATTGGTAACATTACACAGTCATTTGGTAAGGTTAATGATGCTATAACATCAACTCCGAG
GTCTTGCTACTGTGCTAAAGCATTGGCAAAGTGAAGATGTTGTCACATACAAGGGCAAGCTTT
AAGCCACCTAACAGTACAATTGCAAATAATTTCCAAGCCATTAGTAGTTCTATTAGTGACATTTA
TAATAGGCTTGACGAATTGAGTGCTGATGCACAAGTTGACAGGCTGATCACAGGAAGACTTACAG
CACTTAATGCATTTGTCTCAGACTCTAACCAGACAAGCGGAGGTTAGGGCTAGTAGACAACCTT
GCCAAAGACAAGGTTAATGAATGCGTTAGGTCTCAGTCTCAGAGATTCGGATTCTGTGGTAATGG
TACACATTTGTTTTCACTCGCAAATGCAGCACCAAATGGCATGATTTTCTTTCACACAGTGCTAT
TACCAACGGCTTATGAACTGTGACTGCTTGGCCAGGATTTTGTGCTTCCAGATGGTGATCGCACT
TTTGGACTTGTGCTTAAAGATGTCCAGTTGACTTTGTTTGAATCTAGATGACAAGTTCTATTTG
ACCCCAAGAACTATGTATCAGCCTAGAGTTGCAACTAGTTCTGACTTTGTTCAAAATGAAGGGTG
CGATGTGCTGTTTGTAAATGCAACTGTAAGTGATTTGCCTAGTATTATACCTGATTATATTGATA
TTAATCAGACTGTTCAAGACATATTAGAAAATTTTAGACCAAATGGACTGTACCTGAGTTGACA
TTTGACATTTTTAACGCAACCTATTTAAACCTGACTGGTGAATTTGATGACTTAGAATTTAGGTC
AGAAAAGCTACATAACACCCTGTAGAATTTGCCATTTCTCATTGACAACATTAACAATACATTAG
TCAATCTTGAATGGCTCAATAGAATTTGAAACCTATGTAAAATGGCCTTGGTATGTGTGGCTACTA
ATAGGCTTAGTAGTAATATTTTGCATACCATTACTGCTATTTTGTGTTGTAGTACAGGTTGCTG
TGGATGCATAGGTTGTTTAGGAAGTTGTTGTCACTCTATATGTAGTAGAAGACAATTTGAAAAT
ACGAACCAATTGAAAAGTGCACGTCATTAA

>Secuencia consenso obtenida para la región ORF1 del TGEV y PRCV

ATGAGTTCCAAACAATTCAAGATCCTCGTCAATGAGGACTACCAAGTCAACGTGCCTAGTCTTCC
TATTCGTGACGTGTTACAGGAAATCAAGTACTGTTACCGTAATGGATTTGAGGGCTATGTTTTCG
TACCAGAATACTGTGCTGACCTAGTTGATTGCGATCGTAAGGATCACTACGTCAATGGTGTCTT
GGTAACGGAGTAAGTGATCTTAAACCTGTTCTTCTTACCGAACCTCCGTCATGTTGCAAGGCTT
TATTGTTAGACTAACTGCAATGGCGTTCTTGGAGACTTTGACTTTAAAATTGCTCGACTGGCAGA
GGTGCATATATGTTGATCAATATATGTGTGGTGCTGATGGAAAACCAGTCATTGAAGGCGATTTT
AAGGACTACTTCGGTGATGAAGACATCATTGAATTTGAAGGAGAGGAGTACCATTGCGCTTGGAC
AACTGTGCGGATGAGAAACCGCTGAATCAGCAAACCTCTCTTTACCATTTCAGGAAATCAATACAA
CTGGACATTCCTCATAATTGCCAAACTGTGCTACTAGACATGTAGCACCACCAGTCAAAAAGAAC
TCTAAAATAGTTCTGTCTGAAGATTACAAGAAGCTTTATGATATCTTCGGATCACCTTTATGGGA
AATGGTACTGTCTTAGCAAATGCTTTGACACTCTTCATTTTATCGCTGCACTCTTAGATGCCCC
TGTGGTTCTGAAAGTAGCGGCGTTGGAGATTGGACTGGTTTTAAGACTGCTGTTGTGGTCTTTCT
GGCAAAGTTAAGGGTGTCACTTTGGTGTATTTAAGCCTGGTGTGCTGTTGTCACTAGTATGAGC
GCAGGTAAGGGAGTTAAGTTCTTTGCCAATTGTGTTCTTCAATATGCTGGTGCAGTTGAAGGTGT
CTCTATATGGAAAGTTATTTAAACTTTTACAGTTGATGAGACGTTGCACCCTGGTTTTGAAGGCG
AATTGAACGACTTCATCAAACCTGAGAGCAAATCACTAATTGCATGCAGGTTAAAAGAGCATTCA
TTACTGGTGAGATTGATGATGCTGTACATGATTGTATCATTACAGGAAAATTGGATCTTAGTACA
AACCTTTTTGGTAACGTTGGTCTATTATTCAAGAAGACTCCATGGTTTTGTACAAAAGTGTGGTGC
ACTTTTTGTGGATGCTTGGAAAGTAGTGAGGAGCTTTGTGGTTCACTCACACTTACATACAAGCA
AATTTATGAAGTTGTAGCATCACTTTGCATTCTGTTTTACGATTGTAAACTACAAGCCAACATTT

GTGGTTCAGACAATCGTGTTAAAGACTTGTAGACAAGTGTGTGAAAGTTCTTGTAAGCATT
GATGTTTTTACGCAGATATAAATAGCTGGTATTGAGGCCAAATGCTTTGTCTTGGTGCTAAATAC
CTGTTGTTCAATAATGCACCTTGTCAAACCTGTGAGTGTAAAATCCTTGGCAAGAAGCAAAGGG
TCTTGAATGTGCATTCTTTGCTACTAGCTTGGTTGGTGCAACTGCTAATGTGACACCTAAAGAAC
GAGACTGCCACTATCAGCTTGAACAAGGTTGATGATGTTGTAGCACCAGGAGAGGGTTATATCGT
CATTGTTGGTGATATGGCTTTCTACAAGAGTGGTGAATATTATTTTCATGATGTCTAGTCCTAATT
CTGTTCTTACTAACAATGTTTTTAAAGCAGTTAAAGTTCCATCTTATGACATCGTTATGATGTTG
ATAATGATACCAAAAAGCAAATGATTGCAAACTTGGTTCATCATTGAATATGATGGTGATATT
GATGCTGCTATTGTAAGTCAATGAATTACTCATTGAATTTAGGCAGCAAAGCTTGTGCTTCAG
AGCTCTTAAGGACGACAAAATTTTTGTTGAAGCCTATTTAAAAAGTATAAAATGCCAGCATGCC
TTGCAAAACATATTGGTTTGTGGAACATCATAAAGAAAGATTGATGTAAGAGGGTTTTCTTAATC
TCTTCAATCATTGAATGAATTGGAAGATATCAAAGAACTAATATCAGGCTATTA AAAACATTCT
TTGCCTGATCCTCTTCTTGATCTGGATTATGGTGCCATTTGGTACAATTGCATGCCAAGTTGCTC
TGATCCTCAGTTTTGGGAGTGTTCACCTTTGATTGGTAATGGTGTGAAAGTGGTTTGTGATGG
TGCAAAGTTTTGCTAATCACTTTCAAAGGTTACAACAAGCTCTGTAATGCGGCTCGAATGAT
ATTGAGATCGGTGGTATACCATTTTCCACTTTTAAAACACCTACAAATACTTTTATTGAAATGAC
AGATGCTATCTATTCAGTTTTGAACAAGGTGAGGCATTATCCTTTAGAGATGCTGATGTGCCAGT
TGTAGACATGGTACCATTGCTACTGTGATTGGTCTGAACCCATTCTGCTTGAACCTGCTGAATAT
GTA AAACCAAAGAACAATGGTAATGTCATTGTTATTGCAGGTTATACATTTTATAAAGATGAGGA
TGAACATTTTTATCCTTATGGTTTTGGTAAAATTGTGCAGAGAATGTATAATAAAATGGGTGGTG
GTGACAAATGTCTCATTTTTCAGACGAAGTAGATGTTCAAGAAATTGCACCTGTTACACGTGTTAA
ACTTGAATTCGAATTTGAAATGAAATTGTA ACTGGTGTCTTGAACGGGCTATTGGTACTAGATA
CAATTTACTGGTACAACCTGGGAAGAATTTGAAGAGTCTATTTCTGAAGAACTCGATGCAATCTT
TGATACTTAGCAAACCAAGGTGTGCAACTTGAAGGTTACTTCATTTATGACACTTGTGGTGGCTT
TGATATAAAAAATCCAGATGGTATTATGATCTCTCAGTATGATATTACTGCTGATGAAAAATCAG
AAGTTAGTGCATCAAGTGA AAAGAAGAAGTTGATCTGTTGAAGAAAATCCTGGTGAAGTGAAGCA
TCTGAAGGTGCTGAAGGGATTTCTTCTCAAGAAGAGGTGAAACAGTAGAAGTTGCAGATTTACTT
CTACAGAAGAAGATGTTGACATTGTTGAAGTATCTGCTAAAGATGACCCTTGGGCTGCAGCTGTT
GATGTACAAGAAGCTGAACAATTTAATCCTTCTTACCACCTTTCAAGACAACGAATCTCAACGGA
AAAAATATCCTTAAGCAAGGGGATAATAATTGTTGGATAAATGCTTGTGCTACAGCTT CAGGCT
TTGATTTTTTCAACAATGAAGCTTGGGAGAAATTTAAGAAAGGTGATGTCATGGACTTTGTAAAC
CTTGTATGCAGCAACAACACTAGCAAGAGGTGATCTGGTGATGCAGATATCTTCTTGAACCTA
TGCTCAATGATTATAGCACAGCCAAGATAGTACTTGCAGCTAAGTGTGGTTGTGGTGAAAAAGAA
ATTGTTTTGGAAAGAGCTGTTTTTAAACTCACCCACTTAAGGAGAGTTTTAATTATGGTGTTTG
TGGTGA CTGCATGCAAGTTAACACCTGTAGATTTTTAAGTGTGAAAGCTCGGTGTTTTTGTTC
TGACATATTAAGCAAGCAAACGCCAGA ACTATGTTTTTGTCAAACCTGTTATGCAGCAGTTTACA
CTGGCACA ACTCAAAATGGCCATTACATGGTTGATGATATTGAACACGGTTATTGTGTAGATGGT
ATGGGTATTA AACCACTTAAGAAACGGTGT TATACATCCACATTGTTCAATTAATGCCAATGTAAT
GACTAGAGCTGAAAAACCAAAACAAGAGTTTAAAGTTGAAAAAGTAGAACAGCAACTATAGTGGA
GGAACAAATCCTCTATTGAAAAAGAGGAAATTCAAAGTCTTAAAAACGATGATCTTATACTCCA
TTTTACAAAGTGGTAAACTTTCTTTTATCAGGGTGCTTTGGATGTTTTGATCAATTTCTTGGAA
CCTGATGTTATTGTTAATGCTGCTAATGGTGATCTTAAACACATGGGTGGTGTGCGCAAGAGCCAT
CGATGTTTTTCACTGGTGGCAAATTAACAGAACGTTCTAAGGATTATCTTAAAAAGAACAAATCTA
TTGCTCCTGGTAATGCTGTTTTCTTTGAAAATGTCATTGAGCATCTTAGTGTTTTGAATGCAGTT
GGACCAGTAATGGTGACAGCCGAGTTGAAGCCAACTTTGTAATGTTTACAAAGCAATTGCAAA
GTGTGAAGGAAAAATATTAACACCCTTATTAGTGTGGTATCTTTAATGTTAGACTTGAACAT
CATTGCAGTGCTTACTTAAGACTGTGAATGACAGGGGATTGAATGTCTTCGTATAACTGACCAGG
AAAGGCAA ACTATTGAGAATTTCTTTCTTGTCTATCCCTGTCAATGTTACTGAGGATAATGTTA

ACCATGAACGTGTGTCTGTTTCTTTTGACAAAACATAGGTGAACAGCTTAAGGGCACCGTTGTCA
TCAAAGAAAAGATGTTACAAACCAGTTGCCTAGCGCTTTGATGTTGGTCAAAAAGTTGTTAAGGC
TATTGATATAGATTGGCAAGCTCATTATGGTTTTCCGTGATGCTGCTGCTTTTTAGCGCTAGTAGTC
ATGATGCTTAAAATTTGAAGTTGTTACACATAGCAATTTTCATTGTGCATAAGCAGACTGACAACA
ACTGTTGGATTAATGCAATTTGTCTTGCATTACAGAGACTCAAGCCACAGTGGAAATTTCCCTGGT
GTTAGAGGTCTCTGGAATGAATTTCTTGAGCGTAAAACACAAGGTTTTGTACATATGTTGTATCA
CATTTCTGGAGTAAAAGAAAGGTGAGCCAGGTGATGCTGAATTAATGTGCATAAACTTGGTGACTT
GATGGACAATGATTGTGAAATCATTGTCCACACACTACAGCATGTGACAAGTGCGCAAAAGTAG
AAAAGTTTTGTTGGACCAGTGGTAGCAGCACCTCTTGCAATTCATGGCACTGACGAAACATGTGTG
CATGGCGTTAGTGTCAATGTCAAAGTCACCCAAATTAAGGGCACTGTTGCTATTACTTCTTTGAT
TGGTCCATTATTGGAGAAGTACTAGAAGCAACTGGTTATATTTGTTATAGCGGTTCTAAAGGAA
TGGTCATTACACCTATTACGATAACCGTAATGGATTAGTGGTTGATGCAGAAAAGGCTTACCATT
TTAATAGAGACTTATTACAGGTCACAACAGCTATTGCAAGTAATTTTCGTTGTCAAGAAACCACAA
GCAGAGAAAGACCTAAGAATTGTGCTTTTAAAAAGTTGAGCATCTCCTAAGATTGTACAAGAACA
AAAATTTGTTGGCTATTGAAAGTGGTGCTAACTATGCTCTTACTGAATTTGGAAATATGCTGACAT
GTTCTTTAGGCTGGAGATAAAATTTCTTAGGTTGCTGCTTGAGTCTTTAAATATTTGCTGGTTTTA
TTTATGTGTCTTAGAAGTACTAAGATGCCTAAAGTTAAAGTCAAACCGCCTTTGCATTTAAAGAT
TTTGGTGCTAAGGTCAGAACCTCAATTACATGAGACAATTGAACAAACCCTCTGTTGGCGTTACG
CAAACTAGTTTTATTTGTTGATAGCAATATATAATTTCTTTTATTTGTTTGTGTCAGTATACCAGTA
GTGCATAAATTAACATGTAATGGTGTGTACAGGCATATAAAAATTTCTAGTTTTATAAAGTCAGC
AGTCTGTGGCAACTCTATTTTTATGCAAAGCCTGTTTGGCTTCTTATGATGAGTTGGCGATTTTCA
ACATCTCCAAGTTACTTGGGATTTCAAATCTGACCCATTATGGAACAGACTGGTACAATTGTCTT
ACTTTGCATTCTTGGCTGTTTTTGGTAATAACTATGTTAGGTGTTTTCTTATGTATTTTGTATCT
CAGTACCTCAACCTTTGGCTTTCTTATTTTGGTTATGTAGAGTACAGTTGGTTTTTGCATGTTGT
CAACTTTGAATCATCTCAGCTGAGTTTGTGATCTAGTTATAGTGGTTAAGGCAGTTCTCGCCCTT
AAACATATTGTTTTTCATGCTCAAACCCTCTTGCAAACGTGCTCTAGGACTGCAAGGCAGACAC
GATTCCATTCAAGTTGTTGTTAATGGTTCAATGAAGACTGTTTATGTTTCATGCTAATGGTACTG
GTAAATTTCTGCAAGAAACACAATTTTTATTGTAAGAACTGTGATCTTATGGTTTTGAAAACACAT
TCATCTGTGACGAAATTTGTACGTGATCTCAGTAATAGTGTAAACAAACTGTTTACGCCACTGAT
AGATCTCATCAAGAAGTCACAAAAGTTGAATGTTTCAGATGGCTTTTACAGATTTTATGTTGGTGA
TGAATTCATTCATATGATATGATGTAAAACACAAGAAATATAGTAGTCAAGAGGTTCTCAAGAA
CATGCTCTTGCTTGATGACTTCATTGTGTACAGTCCATCTGGTTCTGCTCTTGCAAATGTTAGAA
ATGCCTGTGTTTACTTTTCACAACTTATTGGTAAGCCTATTAAGATTGTTAACAGTGATTTGCTT
GAAGACTCTCTGTAGATTTTTAAAGGGCACTTTTTAATGCTAAAAAGAATGTAATTAAGAATTCT
TTCAATGTTGATGTCTCAGAATGCAAAAATCTTGACGAATGTTACAGGCTTGCAATCTTAATGTT
TCATTTTCTACATTTGAAATGGCTGTAACAATGCTCATAGATTTGGTATTCTGATTACTGATCGT
TCTTTTAAACAATTTCTGGCCATCAAAGTTAAGCCTGGTTTCATCTGGTGTGTGCGCCATGGACAT
TGGTAAGTGTATGACTTCTGATGCTAAGATTGTTAATGCTAAAGTTTTAACTCAACGTGGTAAAA
GTGTTGTTTGGCTTAGCCAGGATTTTGCTGCACTTAGCTCAACTGCTCAGAAAGTTTTGGTTAAA
ACTTTTGTAGAAGAAGGTGTCAACTTTTCACTCACATTTAATGCTGTAGGTTTCAAGATGATGATCT
TCCTTATGAAAGATTCACTGAATCTGTGTCTCCAAAAGTGGTTTCAAGGCTTTTTGATGTAATTAC
ACAGCTTAAACAAATTTGTGATTTTTGTTTTTGTTTTTATTTTTATTTGTGGTTTTGTGCTCTGTTT
ACAGTGTGCTACACAGTCCACATTGAATCTGCTGAAGGCTATGATACATGGTTATTAAGAATG
GAATGTTCAACCTTTTGACGATAACATTTTCATGTGTTTATAACACTTATAAAGGATTCGTGACT
GGTTTTAAGCTAAGTATGGTTTTATCCCTACTTTTGGTAAATCATGTCCAATTGTTGTAGGAACT
GTTTTTGTATCTTGAAAATATGAGACCAATTCCTGAGTGCCTGCATATGTTTCTATTGTGGGTAGA
TCTCTTGTGTTTTGCTATTAATGCTGCTTTTGGTGTACTAATATGTGTATGATCATACTGGCAATG
CAGTTAGTAAGGACTCTTACTTTGATACTTGTGTGTTAATACTGCGTGCACCACTCTTACAGGT

CTTGGTGGTACAATTGTTATTGTGCAAAGCAAGGTTTAGTTGAAGGTGCTAAGCTCTATAGTGAT
CTTATGCCAGACTATTATATGAGCATGCTAGTGGTAACATGGTTAAATTGCCAGCAATTATTAGA
GGACTTGGTCTACGTTTTGTGAAAACACAGGCTACAACCTATTGTAGAGTGGGAGAGTGCATTGA
TAGTAAAGCTGGTTTTTGGCTTTGGTGGGATAACTGGTTTTGTCTACGACAATGAGTTTGGAAATGGA
TACATTGTGGTAATTCTGTGCTAGGATTTTTAAGAATGTCTTCAAACCTTTAACTCTAACATGT
CTGTGGTAGCTACATCTGGTGCGATGCTTGTTAACATTATTATTGCATGCTTAGCTATTGCAATG
TGTTATGGTGTCTTAAGTTTAAGAAGATTTTTGGTGATTGTACTTTCCTCATTGTTATGATCAT
TGTCACTCTTGTGTGAAAATGTGTCTTATTTTTGTCACCTCAAAACACGTTCTTTATGATCATTAC
GCCATTGTTTTACTATTTTACAACAAGAAATTGCATACCCAGGCATTTTGATGCTGGGTTTTATTAT
TGCTATATTAATATGGCTCCATGGTACGTGATTACCGCATATGTCTAGTTTTCTTATGACTCAC
TCCCTTCACTGTTTAACTTAAAGTTTCACAAATCTTTTTGAAGGTGACAAATTTGTGGGTAAC
TTGAATCTGCTGCTATGGGTACTTTTTGTTATTGAATGCGTTTCATATGAACTATTGTTAATTCTA
CTCCTATTGATAGAATTAAATCATATGCTAACAGCTTCAATAAATAAAGTACTACACAGGTTCA
ATGGGAGAAGCTGACTACAGAATGGCTTGCTATGCTCATCTTGGTAAAGCTCTTATGGACTATTC
TGTTAATAGAACGACATGCTTTACACACCTCCTACTGTTAGTGTAAATCCACACTTCAGTCAGG
TTTACGGAAAATGGCACAGCCTAGTGGTCTTGTAGAGCCTTGCAATTGTAAGAGTCTCCTATGGTA
ACAATGTGCTTAATGGTTTTATGGTTAGGAGATGAAGTCATTTGCCCTAGACATGTTATTGCTAGT
GATACCACACGTGTTATCAACTATGAAAATGAAATGTCTAGTGTGAGACTTCACAACTTTTCAGT
TTCTAAGAATAATGTTTCTTGGGTGTTGTGTCTGCCAGATATAAGGGTGTGAATCTTGTACTTAA
AGTCAACCAGGTTAATCCTAATACACCAGAACATAAATTTAAGTCTATTAAGCTGGTGAAAGTT
TTAACATTCTGCTTGTATTGAAGGATGTCCTGGCAGTGTATTATGGTGTCAACATGAGAAGTCAAG
GTACCATTAAGGGATCTTTTATAGCTGGTACTTGTGGATCAGTAGGTTATGTGTTAGAAAATGGA
ATTCTCTATTTTGTATACATGCATCACTTAGAACTTGAAAATGGCTCGCATGTTGGTTCCAATTT
TGAAGGAGAAAATGTACGGTGGTATGAAGATCAACCTAGCATGCAATTGGAAGGTACTAATGTCAT
GTCATCAGATAATGTGGTTGCATTCTATATGCCGCACCTTATCAATGGTGAAGGTGGTTTTGTTAC
AAACACATCGATGTCATTAGAATCATAACAATACATGGGCCAAAACCTAACAGTTTCACAGAACCTT
CTCAACTGATGCTTTTAGCATGTTGGCTGCAAAAACCTGGTCAAAGTGTGAGAAAATTAAGATA
GTATCGTAAGACTCAACAAGGGTTTTGGAGGTGCTACTATACTTTCTTATGGCTCATTGTGTGAC
GAGTTCACCTCAACTGAAGTCATAAGGCAAATGTAGGTGTAAATCTTCAGGCTGGTAAAGTAAAA
TCTTTCTTCTACCCTATTATGACTGCAATGACAATCTTTTTGCCTTTTGGCTTGAATCTTTTATG
TACACACCCTTCACGTGGATTAATCCAACCTTTTGTAGTATTGTATTGGCTGTTACAACCTTGAT
CTCGACGTTTTTTGTCTCTGGCATCAAACATAAAAATGTTGTTCTTTATGTCTTTTGTCTTCTAG
TGTTATCCTGTGACAGCACACAATTTGTTCTGGGACTTTTTCTTACTATGAAGTCTTCAGTCATTG
TTGAGAATACTAACACTATGTTTTTGCCTGTTGACATGCAAGGTGTCATGCTCACAGTGTGTTGTT
TATTGTCTTTGTTACATATAGTGTAGATTCTTCACTTGCAAACAATCATGGTTCTCACTTGCTG
TGACAACCTATTCTTGTGATCTTTAACATGGTTAAAATCTTTGGAACATCTGATGAACCATGGATG
AAAACCAAATCTTTTGTGTTGTTGTAACATGCTTACTATGATTGTCAGTCTTACTACAAAGGATTG
GATGGTTGTGCGTTGCATCATAACAGAATTGCATATTTATATTGTTGTTGTGTAATGCCATCTGCTTT
TGTATCTGACTTTGGGTTTTATGAAGTGTATTAGCATTTGTTTACATGGCTGCGGTTATTTGTTTTG
TTGCTATTATGGCATCTTTTATTGGGTTAACAGATTTACATGCATGACTTGTGGTGTGTTATCAAT
TCACTGTGTCTGCAGCTGAACCTAAATACATGACCGCTAACCAACCTTCTGCACCTAAGAACGCAT
AGAGCTATGATTCTTAGTGCTAAAATTGATTGGTGTGGAGGTAAGAGAAACATCAAATTTTCAAC
TGTACAGTCAAACCTTACAGAGATGAAATGTACCAATGTTGTCTTGCTTGGTCTTTTGTCTAAAA
TGCATGTGATCTAATCAAAGAGTGGAACCTATTGTGTTGGACTACATAATGAGATAAACTTTGTG
ACGACCTGAAATCGTTCTTGAGAAAATGTTAGCTCTTATTGCATTTTTCTTGTCCAAACATAACA
CTTGTGACCTTAGCGAACTTATTGAATCATACTTTGAGAACACCACCATACTCCAAAGTGTGGCC
TCAGCTTATGCTGCATTCCTTAGCTGGATTGCACCTGAAAAGCTCGCGCTGATCTTGAAGAGGC
TAAGAAAATGATGTTAGCCCTCAAATTTTGAAGCAGCTTACTAAAGCATTTAACATTGCCAAGA

GTGATTTTGAGCGCGAAGCATCAGTGCAAAAGAACTGACAAAATGGCTGAGCAGGCTGCAGCTA
GTATGTATAAAGAGCACGAGCTGTGGACAGAAAGTCAAGATTGTTTCTGCTATGCATAGCCTACT
TTTTGGTATGCTTAAGAACTTGATATGTCCAGTGTCAACACTATTATTGACCAGGCTCGTAACG
GTGTTCTACCTTTAAGTATCATTCCAGCTGCATCAGCTACAAGACTTGTTGTTATTACACCTAGC
CTTGAAGTGTTTTCCAAGATTAGGCAGGAAAACAATGTTTCATTATGCTGGTGTCTATTTGGACTAT
TGTTGAAGTTAAAGATGCTAATGGTTCACATGTACATCTTAAGGAAGTACCGCTGCAATGAATTA
AACCTTACTTGGCCATTGAGCATTACTTGTGAGAGAACCACAAAGCTTCAGAACAATGAAATTAT
GCCAGGTAAACTTAAAGAGAGAGCTGTCCAGAGCGTCAGCACTCTTGATGGTGAAGCTTTGGCAGT
GGAAGGCTCTTATGGCGCTGAAAGTGGA AAAAGCTTTATGTATGCATTTATAGCCTCAGACAACA
ATCTTAAGTATGTTAAGTGGGAGAGCAATAATGATATTATACCTATTGAACTTGAAGCTCCATTG
CGTTTCTATGTTGACGGCGCTAATGGTCCTGAAGTAAGTATTTGTATTTGTAAGAATTTAAACAC
TCTTAGACGTGGTGCCGTTCTTGGTTATATCGGTGCAACAGTTCGTCTGCAAGCTGGTAAACCCA
CTGAACATCCATCTAACAGTAGTTTATTGACATTGTGTGCTTTTGCACCTGATCCTGCTAAAGCA
TATGTTGATGCTGTTAAGAGAGGATGCAACCAGTTAATAACTGTGTAAAAATGCTCTCAAATGGT
GCTGGTAATGGTATGGCTGTTACAAACGGTGTGCGAAGCTAACACGCACAGGACTCTTATGGTGGT
GCTTCAGTTGTATTTATTGCAGATGCCATGTTGAACATCCTGCTATTGATGGATTTGCCGCTAAA
AGGTAAGTTGTGCAAATACCAACTGGCACACAAGATCCAATTCGGTTTGTATTGAAAATGAAGTT
TGTGTTGTCTGTGGTTGTTGGCTTAACAATGGTTGATGTGCGATCGTACTTCTATGCAGAGTTCT
ACTGTTGATCAAGTTATTTAAACGAGTGCG GGGTCTAGTGCAGCTCGACT

Resultados del alineamiento del cebador 1F región S

Job Title:Nucleotide Sequence
 Program: BLASTN
 Database: nt Nucleotide collection (nt)
 Query #1: Query ID: lcl|Query_50553 Length: 21

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Transmissible gastroenteritis virus isolate FS-WS spike protei...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	MK272773.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900410.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900409.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900408.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900407.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900406.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900405.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900404.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900403.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900401.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900400.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX990399.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900398.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900397.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900396.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900395.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX900393.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HQ2016 spike protei...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	MH167923.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV AHHF, complete...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX499468.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KX083668.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KU729220.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KP202848.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate H1 spike protein...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KC800687.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TGEV-HX, complete...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	KC962433.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT2 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	J0693051.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate DAE spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	JQ693050.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate 133 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	JQ693049.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HR/DN1 spike prote...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	JN624756.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	DQ811789.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	HQ462571.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TMK22 S protein gen...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	GQ907020.2
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	EU302819.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-YM2007 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	EU292750.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-HJ2007 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	EU292749.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XZ2007 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	EU292748.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-NY2007 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	EU292747.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-KF2007...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	EU292746.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XYYYT-2007 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	EU287428.1
TGEV Purdue P115, complete genome	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	DQ811788.1
Transmissible gastroenteritis virus strain SC-Y, complete genome	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	DQ443743.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TH-98 S protein (S...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF494337.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HKT2 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF481366.1
Transmissible gastroenteritis virus strain 133 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF481365.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT4 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF481362.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT2 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF481360.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus nonfunctional spik...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF298211.1

Continuación de resultados del alineamiento del cebador 1F región S

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
-------------	-----------	-------------	-------------	---------	------------	-----------

Transmissible gastroenteritis virus strain KT6 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF481364.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT5 spike...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF481363.1
Transmissible gastroenteritis virus partial gene for S protein...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AJ884686.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	NC_038861.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein S...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	AF302263.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus peplomer protein...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	M21950.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus PUR46-MAD ST S...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	M94101.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein (S) gene...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	M94099.1
Porcine respiratory coronavirus strain TOY56-165 S protein (S)...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	M94103.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike gene, strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	Y15447.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike gene, strain...	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	Y15449.1
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for protein E2	42.1	42.1	100%	0.13	100.00	X05695.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT3 spike...	38.2	38.2	90%	2.0	100.00	JQ693052.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT3 spike...	38.2	38.2	90%	2.0	100.00	AF481361.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB/FP/2017...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	MN510432.1
Neostethus bicornis genome assembly, chromosome: 3	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	LR738543.1
Mastacembelus armatus genome assembly, chromosome: 2	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	LR535834.1
Fusarium verticillioides 7600 hypothetical protein (FVEG_17431...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	XM_018906675.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	KT696544.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate ZH spike protein...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	KC609371.1
Transmissible gastroenteritis virus strain FJ spike glycoprote...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	JQ700304.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB-FP/2017...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	MN548093.1
TGEV Miller M60, complete genome	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	EU074218.2
TGEV Miller M6, complete genome	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	DQ811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	AY587882.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	AY539716.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S),...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	AY335549.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	AY335548.1
POL=polymerase, E2=peplomer protein [transmissible...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	S51223.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TS, complete genome	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	DQ201447.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein gene...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	AF179882.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein gene,...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	U26215.1
Transmissible gastroenteritis virus TFI virion protein genes	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	Z35758.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for...	36.2	36.2	85%	8.0	100.00	X53128.1
Erithacus rubecula genome assembly, chromosome: 23	34.2	34.2	80%	31	100.00	LR812126.1
Halorubrum sp. CBA1229 chromosome, complete genome	34.2	34.2	80%	31	100.00	CP054585.1
PREDICTED: Etheostoma cragini sorbin and SH3 domain containing...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_034888431.1
PREDICTED: Etheostoma cragini sorbin and SH3 domain containing...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_034888423.1
PREDICTED: Hippoglossus hippoglossus sorbin and SH3 domain...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_034588896.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035638029.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035638028.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035638027.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035638026.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035638025.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035638024.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035638023.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035638022.1
PREDICTED: Hippoglossus stenolepis sorbin and SH3 domain...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035173813.1
PREDICTED: Hippoglossus stenolepis sorbin and SH3 domain...	34.2	34.2	80%	31	100.00	XM_035173802.1
Anas platyrhynchos genome assembly, chromosome: 13	34.2	34.2	80%	31	100.00	LS423623.1

Resultados del alineamiento del cebador 1R región S

Job Title:Nucleotide Sequence
 Program: BLASTN
 Database: nt Nucleotide collection (nt)
 Query #1: Query ID: lcl|Query_44291 Length: 22

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Ident	Per. Accession
Transmissible gastroenteritis virus isolate FS-WS spike protei...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	MK272773.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KX900393.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HQ2016 spike protei...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	MH167923.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV AHHF, complete...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KX499468.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KX083668.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KU729220.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KP202848.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate H1 spike protein...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KC800687.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TGEV-HX, complete...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KC962433.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT3 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	JQ693052.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT2 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	JQ693051.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate 133 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	JQ693049.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HR/DN1 spike prote...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	JN624756.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	DQ811789.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	HQ462571.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	KU302819.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-YM2007 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	EU292750.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-HJ2007 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	EU292749.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XZ2007 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	EU292748.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-KF2007...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	EU292746.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XYTYT-2007 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	EU287428.1
TGEV Purdue P115, complete genome	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	DQ811788.1
Transmissible gastroenteritis virus strain SC-Y, complete genome	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	DQ443743.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TH-98 S protein (S...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	AF494337.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HKT2 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	AF481366.1
Transmissible gastroenteritis virus strain 133 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	AF481365.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT4 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	AF481362.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT3 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	AF481361.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT2 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	AF481360.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT6 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	AF481364.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT5 spike...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	AF481363.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	NC_038861.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus peplomer protein...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	M21950.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus PUR46-MAD ST S...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	M94101.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein (S) gene...	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	M94099.1
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for protein E2	44.1	44.1	100%	0.033	100.00	X05695.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB/FP/2017...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	MN510432.1
Takifugu rubripes genome assembly, chromosome: 14	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	LR584244.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	KT696544.1
PREDICTED: Polistes dominula aldose 1-epimerase-like...	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	XR_001475988.1
PREDICTED: Polistes dominula aldose 1-epimerase-like...	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	XM_015324486.1
PREDICTED: Polistes canadensis aldose 1-epimerase-like...	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	XM_014760157.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate ZH spike protein...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	KC609371.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate DAE spike...	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	JQ693050.1
Transmissible gastroenteritis virus strain FJ spike glycoprote...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	JQ700304.1
Thermophilavioides terrestris NRRL 8126 uncharacterized prote...	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	XM_003656631.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB-FP/2017...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	MN548093.1
Thielavia terrestris NRRL 8126 chromosome 5, complete sequence	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	CP003013.1
TGEV Miller M60, complete genome	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain TMK22 S protein gen...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	GQ907020.2
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	EU074218.2
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-NY2007 spike...	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	EU292747.1
TGEV Miller M6, complete genome	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	DQ811785.1

Continuación de resultados del alineamiento del cebador 1R región S

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Transmissible gastroenteritis virus strain TMK22 S protein gen...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	GQ907020.2
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	EU074218.2
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-NY2007 spike...	36.2	36.2	81%	8.0	100.00	EU292747.1
TGEV Miller M6, complete genome	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	DQ811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	AY587882.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	AY539716.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S),...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	AY335549.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	AY335548.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus nonfunctional spik...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	AF298211.1
POL=polymerase, E2-peplomer protein [transmissible...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	S51223.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TS, complete genome	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	DQ201447.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein S...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	AF302263.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein gene,...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	U26215.1
Porcine respiratory coronavirus strain TOY56-165 S protein (S)...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	M94103.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for...	36.2	36.2	100%	8.0	95.45	X53128.1
Malassezia globosa strain CBS7966 chromosome 1	34.2	64.4	77%	31	100.00	CP046431.1
Serratia symbiotica strain SeCistrobi genome assembly,...	34.2	34.2	77%	31	100.00	LR025083.1
Brassica oleracea HDEM genome, scaffold: C2	34.2	34.2	77%	31	100.00	LR031874.1
Malassezia globosa CBS 7966 hypothetical protein MGL_0603...	34.2	34.2	77%	31	100.00	XM_001732776.1
Populus trichocarpa clone POP040-A04, complete sequence	34.2	34.2	77%	31	100.00	AC216414.1
PREDICTED: Hippocampus comes tropomyosin alpha-3 chain...	34.2	34.2	77%	31	100.00	XM_019867874.1
Xylona heveae TC161 ADAM family of metalloprotease ADM-B mRNA	34.2	34.2	77%	31	100.00	XM_018333314.1
Drosophila busckii chromosome X sequence	34.2	34.2	77%	31	100.00	CP012528.1
PREDICTED: Callorhinchus milii ADAM metallopeptidase domain 11...	34.2	34.2	77%	31	100.00	XM_007901577.1
Alcanivorax dieselolei B5, complete genome	34.2	34.2	77%	31	100.00	CP003466.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 25	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812087.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 24	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812086.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 13	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812075.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 7	32.2	62.4	86%	124	100.00	LR812069.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 3	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812065.1
Buttiaxella phage vb_ButM_Gul6, complete genome	32.2	32.2	90%	124	95.00	MT334653.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 13	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812050.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 8	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812045.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 3	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812040.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 8	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812601.1
Danio rerio strain Nadia (NA) genome assembly, chromosome: 25	32.2	62.4	86%	124	100.00	LR812593.1
Danio rerio strain Nadia (NA) genome assembly, chromosome: 15	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812583.1
Danio rerio strain Nadia (NA) genome assembly, chromosome: 13	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812581.1
Danio rerio strain Nadia (NA) genome assembly, chromosome: 8	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812576.1
Danio rerio strain Cooch Behar (CB) genome assembly, chromosom...	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812565.1
Danio rerio strain Cooch Behar (CB) genome assembly, chromosom...	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812551.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 17	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812079.1
Pseudochaenichthys georgianus genome assembly, chromosome: 17	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR792562.1
Natrinema sp. YPL30 strain YPL13 chromosome, complete genome	32.2	32.2	72%	124	100.00	CP059154.1
Paraburkholderia sp. PGU16 plasmid PPGU16_p1 DNA, complete...	32.2	32.2	72%	124	100.00	AP023176.1
Danio rerio genome assembly, chromosome: 22	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812059.1
Danio rerio strain Cooch Behar (CB) genome assembly, chromosom...	32.2	32.2	72%	124	100.00	LR812563.1

Resultados del alineamiento del cebador 2F región S

Job Title:Nucleotide Sequence
 Program: BLASTN
 Database: nt Nucleotide collection (nt)
 Query #1: Query ID: lc1|Query_44897 Length: 20

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB/FP/2017...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	MN510432.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate FS-WS spike protei...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	MK272773.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900410.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900409.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900408.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900407.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900406.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900405.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900404.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900403.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900401.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900400.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900399.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900398.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900397.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900396.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900395.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX900393.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HQ2016 spike protei...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	MH167923.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV AHHF, complete...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KJ499468.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KX083668.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KU729220.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KT696544.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KP202848.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate H1 spike protein...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	KC800687.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	JQ693051.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate DAE spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	JQ693050.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate 133 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	JQ693049.1
Transmissible gastroenteritis virus strain FJ spike glycoprote...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	JQ700304.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HR/DN1 spike prote...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	JN624756.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB-FP/2017...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	MN548093.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	DQ811789.2
TGEV Miller M60, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	HQ462571.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TMK22 S protein gen...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	GQ907020.2
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	EU074218.2
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	EU302819.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-YM2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	EU292750.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-HJ2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	EU292749.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XZ2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	EU292748.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-NY2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	EU292747.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-KF2007...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	EU292746.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XYYYT-2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	EU287428.1
TGEV Purdue P115, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	DQ811788.1
TGEV Miller M6, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	DQ811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain SC-Y, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	DQ443743.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AY587882.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AY539716.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S),...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AY335549.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AY335548.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TH-98 S protein (S...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF494337.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HKT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF481366.1
Transmissible gastroenteritis virus strain 133 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF481365.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT4 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF481362.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF481360.1

Continuación de resultados del alineamiento del cebador 2F región S

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Porcine transmissible gastroenteritis virus nonfunctional spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF298211.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT6 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF481364.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT5 spike...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF481363.1
POL=polymerase, E2=peplomer protein [transmissible...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	S51223.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TS, complete genome	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	DQ201447.1
Transmissible gastroenteritis virus partial gene for S protein...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AJ884686.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	NC_038861.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein S...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF302263.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein gene...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	AF179882.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein gene,...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	U26215.1
Transmissible gastroenteritis virus TFI virion protein genes	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	Z35758.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus peplomer protein...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	M21950.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus PUR46-MAD ST S...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	M94101.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein (S) gene...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	M94099.1
Porcine respiratory coronavirus strain TOY56-165 S protein (S)...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	M94103.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike gene, strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	Y15447.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike gene, strain...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	Y15449.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for...	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	X53128.1
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for protein E2	40.1	40.1	100%	0.53	100.00	X05695.1
Mastacembelus armatus genome assembly, chromosome: 2	36.2	36.2	90%	8.3	100.00	LR535834.1
Candidatus Desulforudis audaxviator strain BYF chromosome,...	36.2	36.2	90%	8.3	100.00	CP034260.2
Halomonas beimenensis strain NTU-111 chromosome, complete genome	36.2	36.2	90%	8.3	100.00	CP021435.1
Fusarium verticillioides 7600 hypothetical protein (FVEG_17431...	36.2	36.2	90%	8.3	100.00	XM_018906675.1
Acanthamoeba castellanii str. Neff hypothetical protein...	36.2	36.2	90%	8.3	100.00	XM_004356667.1
Onychomys torridus genome assembly, chromosome: 11	36.2	96.6	95%	8.3	100.00	LR877198.1
Candidatus Desulforudis audaxviator MP104C, complete genome	36.2	36.2	90%	8.3	100.00	CP000860.1
Sphingopyxis sp. OPL5 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	33	100.00	CP060725.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000964.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000963.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000962.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000961.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000960.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_031302301.2
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000959.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000958.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000957.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000956.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000955.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000954.1
PREDICTED: Sander lucioperca sorbin and SH3 domain containing ...	34.2	34.2	85%	33	100.00	XM_036000953.1

Resultados del alineamiento del cebador 2R región S

Job Title:Nucleotide Sequence
 Program: BLASTN
 Database: nt Nucleotide collection (nt)
 Query #1: Query ID: lcl|Query_54987 Length: 20

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Ident	Per. Accession
Transmissible gastroenteritis virus isolate FS-WS spike protei...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MK272773.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900393.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HQ2016 spike protei...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MH167923.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV-AHHF, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX499468.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MK083668.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU729220.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP202848.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate H1 spike protein...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC800687.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TGEV-HX, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC962433.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT3 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ693052.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ693051.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate DAE spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ693050.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HR/DN1 spike prote...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JN624756.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811789.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ462571.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU302819.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-YM2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292750.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-HJ2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292749.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XZ2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292748.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-NY2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292747.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-KF2007...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292746.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XYTYT-2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU287428.1
TGEV Purdue P115, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811788.1
Transmissible gastroenteritis virus strain SC-Y, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ443743.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TH-98 S protein (S...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF494337.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HKT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481366.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT4 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481362.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT3 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481361.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481360.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus nonfunctional spik...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF298211.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT6 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481364.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT5 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481363.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	NC_038861.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus peplomer protein...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M21950.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus PUR46-MAD ST S...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94101.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein (S) gene...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94099.1
Porcine respiratory coronavirus strain TOY56-165 S protein (S)...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94103.1
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for protein E2	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	X05695.1
Enterobacteriaceae bacterium Kacie_13 chromosome, complete genome	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	CP045665.1
Canine coronavirus strain 68/09 spike protein (S), nonstructur...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	HQ450377.1
Canine coronavirus strain 66/09 spike protein (S), nonstructur...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	HQ450376.1
Canine coronavirus strain 119/08 spike protein, nonstructural...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	EU924791.1
Canine coronavirus strain 430/07 spike protein, nonstructural...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	EU924790.1
Canine coronavirus strain 174/06 polyprotein lab and polyprote...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	EU856362.1
Canine coronavirus strain 341/05 polyprotein lab and polyprote...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	EU856361.1
PREDICTED: Drosophila guanche flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267877.1
PREDICTED: Drosophila guanche flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267876.1
PREDICTED: Drosophila guanche flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267875.1
PREDICTED: Drosophila guanche flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267874.1
PREDICTED: Drosophila guanche flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267873.1
PREDICTED: Drosophila guanche flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267872.1
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_030223689.1
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_023303787.2
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_030223688.1
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_030223687.1
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_030223686.1

Continuación resultados del alineamiento del cebador 2R región S

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0, scaffold...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	LK065388.1
Methanosalsum zhilinae DSM 4017, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	CP002101.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB/FP/2017...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	MN510432.1
Sciurus vulgaris genome assembly, chromosome: 19	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	LR738630.1
Vibrio sp. HBUAS61001 chromosome 2, complete sequence	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	CP033078.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900411.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900410.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900409.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900408.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900407.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900406.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900405.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900404.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900403.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900401.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900400.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900399.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900398.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900397.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900396.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900395.1
PREDICTED: Heterocephalus glaber G protein-coupled receptor 20...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_021251375.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KT696544.1
Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0, scaffold...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	LK064705.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate ZH spike protein...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KC609371.1
Transmissible gastroenteritis virus strain FJ spike glycoprote...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	JQ700304.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB-FP/2017...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	MN548093.1
Danio aesculapii genome assembly, chromosome: 9	36.2	66.4	90%	8.0	100.00	LR812510.1
TGEV Miller M60, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain TMK22 S protein gen...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	GQ907020.2
Transmissible gastroenteritis virus S gene for spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AB514163.1
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	EU074218.2
Phaeodactylum tricornutum CCAP 1055/1 predicted protein partia...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_002182480.1
TGEV Miller M6, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	D0811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY587882.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY539716.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY335549.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY335548.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein S...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AF302263.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein gene...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AF179882.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus RNA dependent RNA...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AF104420.1

Resultados del alineamiento del cebador 3F región S

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Query #1: Query ID: lcl|Query_4423 Length: 20

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Transmissible gastroenteritis virus isolate FS-WS spike protei...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MK272773.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900410.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900409.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900408.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900407.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900406.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900405.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900404.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900403.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900401.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900400.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900399.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900398.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900397.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900396.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900395.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900393.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HQ2016 spike protei...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MH167923.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV AHHF, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX499468.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX083668.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU729220.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP202848.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate H1 spike protein...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC800687.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TGEV-HX, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC962433.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	J0693051.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate DAE spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ693050.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate 133 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ693049.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HR/DN1 spike prote...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JN624756.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811789.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ462571.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TMK22 S protein gen...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GQ907020.2
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC962819.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-YM2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292750.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-HJ2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292749.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XZ2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292748.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-NY2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292747.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-KF2007...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292746.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XYYYT-2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU287428.1
TGEV Purdue P115, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811788.1
Transmissible gastroenteritis virus strain SC-Y, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ443743.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TH-98 S protein (S...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF494337.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HKT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481366.1
Transmissible gastroenteritis virus strain 133 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481365.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT4 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481362.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481360.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus nonfunctional spik...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF298211.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT6 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481364.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT5 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481363.1
Transmissible gastroenteritis virus partial gene for S protein...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AJ884686.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	NC_038861.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein S...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF302263.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus peplomer protein...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M21950.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus PUR46-MAD ST S...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94101.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein (S) gene...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94099.1
Porcine respiratory coronavirus strain TOY56-165 S protein (S)...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94103.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike gene, strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	Y15447.1

Continuación resultados del alineamiento del cebador 3F región S

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike gene, strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	Y15449.1
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for protein E2	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	X05695.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB/FP/2017...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	MN510432.1
Fusarium verticillioides 7600 hypothetical protein (FVEG_17431...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_018906675.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KT696544.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate ZH spike protein...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KC609371.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT3 spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	JQ693052.1
Transmissible gastroenteritis virus strain FJ spike glycoprote...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	JQ700304.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB-FP/2017...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	MN548093.1
TGEV Miller M60, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	EU074218.2
TGEV Miller M6, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	DQ811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY587882.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY539716.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY335549.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY335548.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT3 spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AF481361.1
POL=polymerase, E2=peplomer protein [transmissible...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	S51223.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TS, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	DQ201447.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein gene...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AF179882.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein gene,...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	U26215.1
Transmissible gastroenteritis virus TFI virion protein genes	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	Z35758.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	X53128.1
Mastacembelus armatus genome assembly, chromosome: 2	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	LR535834.1
Halorubrum sp. CBA1229 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	31	100.00	CP054585.1
PREDICTED: Etheostoma cragini sorbin and SH3 domain containing...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_034888431.1
PREDICTED: Etheostoma cragini sorbin and SH3 domain containing...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_034888423.1
PREDICTED: Hippoglossus hippoglossus sorbin and SH3 domain...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_034588896.1
PREDICTED: Hippoglossus hippoglossus sorbin and SH3 domain...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XR_004614192.1
PREDICTED: Hippoglossus hippoglossus sorbin and SH3 domain...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_034588772.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035638029.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035638028.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035638027.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035638026.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035638025.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035638024.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035638023.1
PREDICTED: Scophthalmus maximus sorbin and SH3 domain containi...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035638022.1
PREDICTED: Hippoglossus stenolepis sorbin and SH3 domain...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035173813.1
PREDICTED: Hippoglossus stenolepis sorbin and SH3 domain...	34.2	34.2	85%	31	100.00	XM_035173802.1
Erithacus rubecula genome assembly, chromosome: 23	34.2	34.2	85%	31	100.00	LR812126.1

Resultados del alineamiento del cebador 3R región S

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Query #1: Query ID: lc1|Query_24131 Length: 20

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Transmissible gastroenteritis virus isolate FS-WS spike protei...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MK272773.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900393.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HQ2016 spike protei...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MH167923.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV AHHF, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX499468.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX083668.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU729220.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP202848.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate H1 spike protein...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC800687.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TGEV-HX, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC962433.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT3 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ693052.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate KT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ693051.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate DAE spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ693050.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HR/DN1 spike prote...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JN624756.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811789.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ462571.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU302819.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-YM2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292750.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-HJ2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292749.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XZ2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292748.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-NY2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292747.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-KF2007...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU292746.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN-XYYYT-2007 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU287428.1
TGEV Purdue P115, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811788.1
Transmissible gastroenteritis virus strain SC-Y, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ443743.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TH-98 S protein (S...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF494337.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HKT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481366.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT4 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481362.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT3 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481361.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT2 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481360.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus nonfunctional spik...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF298211.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT6 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481364.1
Transmissible gastroenteritis virus strain KT5 spike...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AF481363.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	NC_038861.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus peplomer protein...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M21950.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus PUR46-MAD ST S...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94101.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein (S) gene...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94099.1
Porcine respiratory coronavirus strain TOY56-165 S protein (S)...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	M94103.1
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) mRNA for protein E2	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	X05695.1
Enterobacteriaceae bacterium Kacie_13 chromosome, complete genome	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	CP045665.1
Canine coronavirus strain 68/09 spike protein (S), nonstructur...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	HQ450377.1
Canine coronavirus strain 66/09 spike protein (S), nonstructur...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	HQ450376.1
Canine coronavirus strain 119/08 spike protein, nonstructural...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	EU924791.1
Canine coronavirus strain 430/07 spike protein, nonstructural...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	EU924790.1
Canine coronavirus strain 174/06 polyprotein 1ab and polyprote...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	EU856362.1
Canine coronavirus strain 341/05 polyprotein 1ab and polyprote...	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	EU856361.1
PREDICTED: Drosophila guanache flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267877.1
PREDICTED: Drosophila guanache flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267876.1
PREDICTED: Drosophila guanache flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267875.1
PREDICTED: Drosophila guanache flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267874.1
PREDICTED: Drosophila guanache flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267873.1
PREDICTED: Drosophila guanache flotillin-2 (LOC117581042),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_034267872.1
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_030223689.1
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_023303787.2
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_030223688.1
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_030223687.1
PREDICTED: Drosophila hydei flotillin-2 (LOC111591884),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_030223686.1

Continuación resultados del alineamiento del cebador 3R región S

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0, scaffold...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	LK065388.1
Methanosalsum zhilinae DSM 4017, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	CP002101.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB/FP/2017...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	MN510432.1
Sciurus vulgaris genome assembly, chromosome: 19	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	LR738630.1
Vibrio sp. HBUAS61001 chromosome 2, complete sequence	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	CP033078.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900411.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900410.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900409.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900408.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900407.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900406.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900405.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900404.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900403.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900401.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900400.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900399.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900398.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900397.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900396.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KX900395.1
PREDICTED: Heterocephalus glaber G protein-coupled receptor 20...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_021251375.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KT696544.1
Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0, scaffold...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	LK064705.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate ZH spike protein...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KC609371.1
Transmissible gastroenteritis virus strain FJ spike glycoprote...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	JQ700304.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/CH/HB-FP/2017...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	MN548093.1
Danio aesculapii genome assembly, chromosome: 9	36.2	66.4	90%	8.0	100.00	LR812510.1
TGEV Miller M60, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain TMK22 S protein gen...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	G0907020.2
Transmissible gastroenteritis virus S gene for spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AB514163.1
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	EU074218.2
Phaeodactylum tricornutum CCAP 1055/1 predicted protein partia...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	XM_002182480.1
TGEV Miller M6, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	DQ811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY587882.1
Transmissible gastroenteritis virus strain HN2002 spike...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY539716.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S),...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY335549.1
Transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein (S) gen...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AY335548.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein S...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AF302263.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein gene...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AF179882.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus RNA dependent RNA...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	AF104420.1

Resultados del alineamiento del cebador 1F región ORF1

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Query #1: Query ID: lc1|Query_53357 Length: 20

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Swine enteric coronavirus isolate SeCoV-1480-Murcia-Lorca,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MN692770.1
Feline coronavirus isolate XXN, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MN165107.1
Feline Alphacoronavirus 1 strain FCoV-SB22, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MH817484.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900411.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900410.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900409.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900408.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900407.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900406.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900405.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900404.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900403.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900401.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900400.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900399.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900398.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900397.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900396.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900395.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900393.1
Porcine respiratory coronavirus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY406735.1
Feline coronavirus isolate Felix, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MG893511.1
Feline coronavirus isolate Cat 1 Karlslunde, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX722530.1
Feline coronavirus isolate UG-FH8, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX722529.1
Feline coronavirus strain HLJ/HRB/2016/13, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY566211.1
Feline coronavirus strain HLJ/HRB/2016/11, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY566210.1
Feline coronavirus strain HLJ/HRB/2016/10, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY566209.1
Feline coronavirus strain HLJ/DQ/2016/01, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY292377.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX083668.1
Swine enteric coronavirus isolate SeCoV_GER_L00930_2012 genome...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	LT545990.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU729220.1
Feline coronavirus isolate Cat3_day28_withoutdeletion, complet...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215428.1
Feline coronavirus isolate Cat3_day28_deletion, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215427.1
Feline coronavirus isolate Cat2_day84, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215426.1
Feline coronavirus isolate Cat1_day28_withoutdeletion, complet...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215425.1
Feline coronavirus isolate Cat1_day28_deletion, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215424.1
Feline coronavirus isolate Cat3_day9, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215423.1
Feline coronavirus isolate Cat2_day21_withoutdeletion, complet...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215422.1
Feline coronavirus isolate Cat2_day21_deletion, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215421.1
Feline coronavirus isolate Cat1_day7, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215420.1
Feline coronavirus isolate inoculum, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215419.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KT696544.1
Porcine respiratory coronavirus strain OH7269, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KR270796.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP202848.1
Canine coronavirus strain CB/05, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP981644.1
Feline infectious peritonitis virus isolate FCoVWSU791146_P50,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC461237.1
Feline infectious peritonitis virus isolate FCoVWSU791146_P8,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC461236.1
Feline infectious peritonitis virus isolate FCoVWSU791146_P1,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC461235.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TGEV-HX, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC962433.1
Canine coronavirus strain S378, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC175341.1
Canine coronavirus strain K378, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC175340.1
Canine coronavirus strain 171, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC175339.1
Canine coronavirus strain A76, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JN856008.2
Feline coronavirus strain WSU 79-1683, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JN634064.1

Continuación resultados del alineamiento del cebador 1F región ORF1

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Feline infectious peritonitis virus strain DF-2, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ408981.1
Feline coronavirus strain DF-2 R3i, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ408980.1
Canine coronavirus strain TN-449, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ404410.1
Canine coronavirus strain 1-71, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ404409.1
Feline coronavirus UU54, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JN183883.1
Feline coronavirus UU47, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JN183882.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811789.2
TGEV Miller M60, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ462571.1
Feline coronavirus UU30, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ392472.1
Feline coronavirus UU20, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ392471.1
Feline coronavirus UU19, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ392470.1
Feline coronavirus UU40, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ392469.1
Feline coronavirus UU34, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012372.1
Feline coronavirus UU31, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012371.1
Feline coronavirus UU24, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012370.1
Feline coronavirus UU21, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012369.1
Feline coronavirus UU18, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012368.1
Feline coronavirus UU17, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012367.1
Feline coronavirus S, 3a, 3b, 3c, E, M, N, 7a, 7b genes,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AB535528.1
Feline coronavirus UU23 isolate TCVSP-ROTTIER-00023, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GU553362.1
Feline coronavirus UU22 isolate TCVSP-ROTTIER-00022, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GU553361.1
Canine coronavirus strain CCoV/NTU336/F/2008, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GQ477367.1
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU074218.2
Feline coronavirus UU9, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938062.1
Feline coronavirus UU3, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938061.1
Feline coronavirus UU2, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938060.1
Feline coronavirus UU10, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938059.1
Feline coronavirus UU16, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938058.1
Feline coronavirus UU15, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938057.1
Feline coronavirus UU5, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938056.1
Feline coronavirus UU4, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938054.1
Feline coronavirus UU7, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938053.1
Feline coronavirus UU11, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938052.1
Feline coronavirus RM, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938051.1
Feline coronavirus strain FCoV/NTU156/P/2007, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GQ152141.1
Feline coronavirus isolate Black, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU186072.1
Feline coronavirus strain FCoV C1Je, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ848678.1
TGEV Purdue P115, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811788.1
PRCV ISU-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811787.1
TGEV Miller M6, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain SC-Y, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ443743.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	NC_038861.1

Resultados del alineamiento del cebador 1R región ORF1

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Query #1: Query ID: lcl|Query_44301 Length: 20

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Query Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Canine coronavirus strain B194_GZ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114543.1
Canine coronavirus strain B203_GZ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114542.1
Canine coronavirus strain B447_ZJ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114540.1
Canine coronavirus strain B600_ZJ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114539.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900411.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900407.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900406.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900405.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900401.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900398.1
Transmissible gastroenteritis virus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900395.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900393.1
Porcine respiratory coronavirus strain...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY406735.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV AHHF, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX499468.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX083668.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KJ729220.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KT696544.1
Alphacoronavirus 1 strain 23/03, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP849472.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP202848.1
Canine coronavirus strain CB/05, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP981644.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TGEV-HX, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC962433.1
Canine coronavirus strain S378, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC175341.1
Canine coronavirus strain K378, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC175340.1
Canine coronavirus strain A76, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JN856008.2
Canine coronavirus strain 1-71, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	J0404409.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811789.2
TGEV Miller M60, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ462571.1
TGEV Purdue P115, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811788.1
PRCV ISU-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811787.1
TGEV Miller M6, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain SC-Y, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ443743.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SC-Y replicase 1a...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ390461.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TS, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ201447.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	NC_038861.1
Porcine transmissible gastroenteritis virus minigenome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	AJ011482.1
Transmissible gastroenteritis virus (Purdue-115) mRNA for...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	Z34093.1
Canine coronavirus strain B363_ZJ_2019, partial genome	38.2	38.2	95%	2.0	100.00	MT114541.1
Swine enteric coronavirus isolate SeCoV-1480-Murcia-Lorca,...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	MN692770.1
Legionella clemsonensis strain CDC-D5610, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	CP016397.1
Swine enteric coronavirus isolate SeCoV_GER_L00930_2012 genome...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	LT545990.1
Swine enteric coronavirus strain Italy/213306/2009, complete...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KR061459.1
Canis lupus familiaris breed Labrador retriever chromosome 26a	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP050570.1
Canis lupus familiaris breed Labrador retriever chromosome 26b	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP050610.1
Feline coronavirus isolate XXN, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	MN165107.1
Myripristis murdjan genome assembly, chromosome: 4	34.2	64.4	90%	32	100.00	LR597553.1
Daphnia dolichocephala mRNA for EOG090X00VK (EOG090X00VK gene)...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR005334.1
Daphnia barbata mRNA for EOG090X00VK (EOG090X00VK gene), isola...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR004395.1
Eubosmina coregoni mRNA for EOG090X00VK (EOG090X00VK gene),...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR000011.1
Scleropages formosus genome assembly, chromosome: 5	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR584070.1
Citrobacter sp. SNU WT2 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP038469.1
Streptomyces phage EGole, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	MK494112.1
Streptomyces phage Teutsch, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	MK460248.1
Serratia fonticola strain NCTC13193 genome assembly, chromosom...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR134492.1
Feline coronavirus isolate Cat 1 Karlslunde, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	KX722530.1
Canine coronavirus isolate HLJ-073, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	KY063618.2

Continuación resultados del alineamiento del cebador 1R región ORF1

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Streptomyces phage Samisti12, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	NC_042012.1
Streptomyces phage Peebs, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	NC_042011.1
Streptomyces phage Sushi23, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	MF358542.1
Canine coronavirus isolate HLJ-072, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	KY063617.1
Canine coronavirus isolate HLJ-071, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	KY063616.1
Pandoraea thiooxydans strain ATSB16, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP014839.1
Pandoraea thiooxydans strain DSM 25325, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP011568.3
PREDICTED: Tribolium castaneum choline transporter-like protei...	34.2	34.2	85%	32	100.00	XM_015977845.1
PREDICTED: Tribolium castaneum choline transporter-like protei...	34.2	34.2	85%	32	100.00	XM_008193874.2
Penicillium digitatum Pd1 hypothetical protein mRNA	34.2	34.2	85%	32	100.00	XM_014681792.1
Thioalkalivibrio versutus strain D301, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP011367.1
Canine coronavirus strain TN-449, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	Q404410.1
Feline coronavirus UU47, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	JN183882.1
Feline coronavirus UU40, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	HQ392469.1
Feline coronavirus UU31, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	HQ012371.1
Canine coronavirus strain CCoV/NTU336/F/2008, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	GQ477367.1
Feline coronavirus UU4, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	FJ938054.1
Feline coronavirus UU7, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	FJ938053.1
Dothidotthia symphoricarpi CBS 119687 uncharacterized protein...	32.2	32.2	80%	125	100.00	XM_033664917.1
Lactobacillus hilgardii strain LMG 07934 chromosome, complete...	32.2	32.2	80%	125	100.00	CP050262.1
Lysobacter sp. HDW10 chromosome, complete genome	32.2	32.2	80%	125	100.00	CP049864.1
Pseudomonas aeruginosa strain VIT PC9 chromosome, complete genome	32.2	32.2	80%	125	100.00	CP048791.1
Aphantopus hyperantus genome assembly, chromosome: 16	32.2	32.2	80%	125	100.00	LR761663.1
Pandoraea fibrosis strain 6399 chromosome, complete genome	32.2	62.4	80%	125	100.00	CP047385.1
Pandoraea fibrosis strain 7641 chromosome, complete genome	32.2	62.4	80%	125	100.00	CP047386.1
Lutra lutra genome assembly, chromosome: 17	32.2	32.2	80%	125	100.00	LR738419.1
Pecten maximus genome assembly, chromosome: 17	32.2	32.2	80%	125	100.00	LR736854.1
Streptomyces phage Tribute, complete genome	32.2	32.2	80%	125	100.00	MN369743.1
Sideroxydans sp. CL21 genome assembly, chromosome: 1	32.2	32.2	80%	125	100.00	LR699166.1
Caligus rogercresseyi isolate FCH chromosome 11	32.2	32.2	80%	125	100.00	CP045900.1
Talaromyces marneffei isolate 11CN-20-091 chromosome 1, comple...	32.2	32.2	80%	125	100.00	CP045653.1
Dyadobacter sp. 32 isolate Dyadobacter sp. 32 sample 2 genome...	32.2	62.4	80%	125	100.00	LR735258.1
Lactobacillus hilgardii strain LH500 chromosome, complete genome	32.2	32.2	80%	125	100.00	CP044119.1
Terriglobus albidus strain ORNL chromosome, complete genome	32.2	32.2	80%	125	100.00	CP042806.1
Sparus aurata genome assembly, chromosome: 15	32.2	32.2	100%	125	95.00	LR537135.1
Heteroscyphus argutus voucher 16-8542 chloroplast, complete...	32.2	32.2	80%	125	100.00	NC_043788.1
Aureobasidium pullulans EXF-150 uncharacterized protein...	32.2	32.2	80%	125	100.00	XM_029910019.1
Pandoraea pnomenusa strain M202 chromosome, complete genome	32.2	32.2	80%	125	100.00	CP041237.1
Aeromonas veronii DNA, complete genome, strain: WP8-W19-CRE-03	32.2	32.2	80%	125	100.00	AP022281.1
Paraburkholderia sp. PGU16 DNA, chromosome 2, complete genome	32.2	32.2	80%	125	100.00	AP023175.1
Colletotrichum scovillei uncharacterized protein...	32.2	32.2	80%	125	100.00	XM_035469893.1
Schistosoma mansoni strain Puerto Rico genome assembly,...	32.2	32.2	80%	125	100.00	HE601624.2

Resultados del alineamiento del cebador 2F región ORF1

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Query #1: Query ID: lcl|Query_44247 Length: 20

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KT696544.1
Porcine respiratory coronavirus strain OH7269, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KR270796.1
TGEV Miller M60, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU074218.2
TGEV Miller M6, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811785.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TS, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ201447.1
Brevibacillus brevis strain DZQ7 chromosome, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	CP030117.1
Canine coronavirus isolate HLJ-073, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KY063618.2
Brevibacillus brevis X23 chromosome, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	CP023474.1
Canine coronavirus isolate HLJ-072, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KY063617.1
Canine coronavirus isolate HLJ-071, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	KY063616.1
Canine coronavirus strain TN-449, complete genome	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	JQ404410.1
Uncultured organism CA915 glycopeptide biosynthetic gene...	36.2	36.2	90%	8.0	100.00	HM486076.1
Swine enteric coronavirus isolate SeCoV-1480-Murcia-Lorca,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	MN692770.1
Enterococcus faecium strain E1077 plasmid pE1077-217, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	MT074686.1
Enterococcus hirae strain CQP3-9 plasmid pCQP3-9_1, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP037956.1
Enterococcus faecium strain BIOPOP-3 WT plasmid pBIOPOP-3_WT	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP050651.1
Enterococcus faecium strain BIOPOP-3 ALE plasmid pBIOPOP-3_ALE	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP050649.1
Jeotgalibaca arthritidis strain CECT 9157 chromosome, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP049740.1
Enterococcus gallinarum strain FDAARGOS_728 chromosome, comple...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP046307.1
Weissella koreensis strain CBA3615 plasmid unnamed1, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP046071.1
Listeria monocytogenes plasmid pLM1686, complete sequence	34.2	34.2	85%	32	100.00	MK134858.1
Enterococcus faecium strain LAC7.2 plasmid pI, complete sequence	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP045013.1
Enterococcus faecium strain V2937 plasmid pHVH-V2937-1, comple...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP044275.1
[Clostridium] hylemonae DSM 15053 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP036524.1
Enterococcus faecium strain FA3 plasmid unnamed1	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP042833.1
Enterococcus sp. DA9 plasmid unnamed4	34.2	68.4	85%	32	100.00	CP042840.1
Leuconostoc carnosum strain CBA3620 plasmid unnamed2, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP042376.1
Enterococcus faecium strain 4928STDY7387800 genome assembly,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR607382.1
Enterococcus durans strain 4928STDY7387704 genome assembly,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR607372.1
Enterococcus faecium strain 4928STDY7071735 genome assembly,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR607355.1
Enterococcus faecium strain 4928STDY7071283 genome assembly,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR607353.1
Enterococcus faecium strain 4928STDY7071282 genome assembly,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR607349.1
Enterococcus durans strain 4928STDY7071430 genome assembly,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR607335.1
Enterococcus faecium strain N56454 plasmid unnamed, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP040905.1
Enterococcus faecium strain HB-1 plasmid punnamed, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP040877.1
Enterococcus faecium strain F17E0263 plasmid p_unnamed1,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP040850.1
Enterococcus faecium strain HOU503 plasmid p1, complete sequence	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP040704.1
Lactobacillus sp. Koumiss chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP028928.1
Enterococcus faecium QU 50 plasmid pQL50 DNA, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	AP019395.1
Enterococcus faecium isolate E7246 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR536651.1
Enterococcus faecium SMVRE20 plasmid pSMVRE20L DNA, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	AP019409.1
Enterococcus faecium isolate E1334 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR134096.1
Enterococcus faecium isolate E0139 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR132068.1
Jeotgalibaca ciconiae strain H21T32 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP034465.1
Enterococcus sp. FDAARGOS_553 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP033740.1
Tetragenococcus koreensis strain KCTC 3924 chromosome, complet...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP027786.1
Enterococcus casseliflavus strain EC-369 chromosome, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP032739.1
Enterococcus faecium strain HY07 plasmid unnamed2, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP032307.1
Auritidibacter sp. NML130574 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP031746.1
Enterococcus faecium strain CBA7134 plasmid pCBA710401, comple...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP025687.1
Enterococcus faecium isolate E8377 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135402.1
Enterococcus faecium isolate E8290 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135395.1
Enterococcus faecium isolate E7933 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135385.1
Enterococcus faecium isolate E8172 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135373.1
Enterococcus faecium isolate E8195 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135365.1
Enterococcus faecium isolate E8202 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135345.1

Continuación resultados del alineamiento del cebador 2F región ORF1

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecium isolate E7356 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135340.1
Enterococcus faecium isolate E7429 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135298.1
Enterococcus faecium isolate E7237 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135294.1
Enterococcus faecium isolate E6975 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135279.1
Enterococcus faecium isolate E4457 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135259.1
Enterococcus faecium isolate E7098 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135255.1
Enterococcus faecium isolate E6988 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135244.1
Enterococcus faecium isolate E7171 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135204.1
Enterococcus faecium isolate E6055 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135198.1
Enterococcus faecium isolate E8414 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135489.1
Enterococcus faecium isolate E7114 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135444.1
Enterococcus faecium isolate E8691 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135436.1
Enterococcus faecium isolate E8927 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135429.1
Enterococcus faecium isolate E8328 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135415.1
Enterococcus faecium isolate E8284 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135409.1
Enterococcus faecium isolate E4438 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135192.1
Enterococcus faecium isolate E4413 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135186.1
Enterococcus faecium isolate E1774 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135182.1
Enterococcus faecium isolate E0595 genome assembly, plasmid: 2	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR135180.1
Enterococcus hirae strain NCTC12368 genome assembly, chromosom...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LR134297.1
Enterococcus gilvus strain CR1 plasmid pCR1C, complete sequence	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP030935.1
Lactobacillus curvatus strain ZJUNIT8 plasmid pnunamed1,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP029967.1
PREDICTED: Alligator sinensis potassium voltage-gated channel...	34.2	34.2	85%	32	100.00	XM_025196245.1
Enterococcus faecium strain HL1 plasmid pHLA, complete sequence	34.2	34.2	85%	32	100.00	MG674581.1
Listeria monocytogenes strain PIR00540 plasmid pPIR00540,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP025569.1
Enterococcus faecium strain AUSMDU00004028 plasmid unnamed1,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP027513.1
Enterococcus faecium strain FDAARGOS_323 plasmid unnamed,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP027401.1
Weissella koreensis strain WiKim0080 plasmid pWKW_1, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP026848.1
Streptococcus parauberis strain SPOF3K chromosome, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP025420.1
Vibrio tapetis subsp. tapetis isolate Vibrio tapetis CECT4600...	34.2	34.2	85%	32	100.00	LT960612.1
Listeria monocytogenes strain MF4626 plasmid pMF4626, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP025083.1
Lactobacillus salivarius strain BCRC 14759 plasmid unnamed1,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP024068.1
Lactobacillus salivarius strain BCRC 12574 plasmid unnamed2,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP024065.1
Listeria monocytogenes strain AT3E plasmid pLM58, complete...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP023753.1
Enterococcus sp. FDAARGOS_375 chromosome, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP023515.1
Jeotgalibaca sp. PTS2502, complete genome	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP019433.1
Enterococcus faecium strain ISMMS_VRE_11 plasmid ISMMS_VRE11_p...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP016164.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. suionicum strain DSM 20241...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP015248.1
Enterococcus faecium strain E1 plasmid pE1_230, complete sequence	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP018066.1
Enterococcus faecium strain ISMMS_VRE_8 plasmid ISMMS_VRE8_p1,...	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP012467.1
Lactobacillus salivarius strain CICC23174 plasmid pLS_1 sequence	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP017108.1
Lactobacillus sp. 2D plasmid unnamed1, complete sequence	34.2	34.2	85%	32	100.00	CP047413.1

Resultados del alineamiento del cebador 2R región ORF1

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Query #1: Query ID: lcl|Query_19917 Length: 20

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Canine coronavirus strain B135_JS_2018, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114544.1
Canine coronavirus strain B194_GZ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114543.1
Canine coronavirus strain B203_GZ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114542.1
Canine coronavirus strain B363_ZJ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114541.1
Canine coronavirus strain B447_ZJ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114540.1
Canine coronavirus strain B600_ZJ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114539.1
Canine coronavirus strain B639_ZJ_2019, partial genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	MT114538.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/Mex/145/2008,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900402.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/HB/1988,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900394.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV/USA/Z/1986,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX900393.1
Feline coronavirus strain HLJ/HRB/2016/13, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY566211.1
Feline coronavirus strain HLJ/HRB/2016/11, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY566210.1
Feline coronavirus strain HLJ/HRB/2016/10, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY566209.1
Canine coronavirus isolate HLJ-073, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY063618.2
Feline coronavirus strain HLJ/DQ/2016/01, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY292377.1
Canine coronavirus isolate HLJ-072, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY063617.1
Canine coronavirus isolate HLJ-071, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KY063616.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TGEV AHHF, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX499468.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate HE-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KX083668.1
Transmissible gastroenteritis virus strain TH-98, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU729220.1
Feline coronavirus isolate Cat3_day28_withoutdeletion, complet...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215428.1
Feline coronavirus isolate Cat3_day28_deletion, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215427.1
Feline coronavirus isolate Cat2_day84, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215426.1
Feline coronavirus isolate Cat1_day28_withoutdeletion, complet...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215425.1
Feline coronavirus isolate Cat1_day28_deletion, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215424.1
Feline coronavirus isolate Cat3_day9, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215423.1
Feline coronavirus isolate Cat2_day21_withoutdeletion, complet...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215422.1
Feline coronavirus isolate Cat2_day21_deletion, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215421.1
Feline coronavirus isolate Cat1_day7, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215420.1
Feline coronavirus isolate inoculum, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KU215419.1
Transmissible gastroenteritis virus strain JS2012, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KT696544.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate SHXB, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP202848.1
Canine coronavirus strain CB/05, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KP981644.1
Transmissible gastroenteritis virus isolate TGEV-HX, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC962433.1
Canine coronavirus strain S378, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC175341.1
Canine coronavirus strain K378, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	KC175340.1
Canine coronavirus strain TN-449, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ404410.1
Canine coronavirus strain 1-71, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	JQ404409.1
TGEV virulent Purdue, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811789.2
TGEV Miller M60, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	DQ811786.2
Transmissible gastroenteritis virus strain WH-1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ462571.1
Feline coronavirus UU30, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ392472.1
Feline coronavirus UU20, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ392471.1
Feline coronavirus UU19, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ392470.1
Feline coronavirus UU40, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ392469.1
Feline coronavirus UU34, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012372.1
Feline coronavirus UU31, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012371.1
Feline coronavirus UU21, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012369.1
Feline coronavirus UU17, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	HQ012367.1
Feline coronavirus UU23 isolate TCVSP-ROTTIER-00023, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GU553362.1
Feline coronavirus UU22 isolate TCVSP-ROTTIER-00022, complete...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GU553361.1
Canine coronavirus strain CCoV/NTU336/F/2008, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GQ477367.1
Transmissible gastroenteritis virus strain H16, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ755618.2
Transmissible gastroenteritis virus strain attenuated H,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU074218.2
Feline coronavirus UU3, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938061.1
Feline coronavirus UU2, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938060.1
Feline coronavirus UU10, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938059.1

Continuación resultados del alineamiento del cebador 2F región ORF1

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E Value	Per. Ident	Accession
Feline coronavirus UU5, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938056.1
Feline coronavirus UU4, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938054.1
Feline coronavirus UU7, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938053.1
Feline coronavirus UU11, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	FJ938052.1
Feline coronavirus strain FCoV/NTU156/P/2007, complete genome	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	GQ152141.1
Feline coronavirus isolate 4663in2A09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664274.1
Feline coronavirus isolate 4594fe062F04 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664273.1
Feline coronavirus isolate 4591fe2E09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664271.1
Feline coronavirus isolate 45661i2D10 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664270.1
Feline coronavirus isolate 4663li2G09b pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664267.1
Feline coronavirus isolate 4624fe2D06 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664266.1
Feline coronavirus isolate 4595fe2E09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664264.1
Feline coronavirus isolate 45661i2B10 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664263.1
Feline coronavirus isolate 45491i2H07 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664262.1
Feline coronavirus isolate 4595fe2B09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664261.1
Feline coronavirus isolate 4663in2B09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664259.1
Feline coronavirus isolate 4663li2A09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664258.1
Feline coronavirus isolate 4621fe2C10 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664257.1
Feline coronavirus isolate 4663in2F09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664256.1
Feline coronavirus isolate 45491i2F05 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664255.1
Feline coronavirus isolate 4566in2D08b pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664254.1
Feline coronavirus isolate 4663in2E09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664253.1
Feline coronavirus isolate 4663li2C09b pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664251.1
Feline coronavirus isolate 4594fe062D04 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664249.1
Feline coronavirus isolate 4663in2C09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664248.1
Feline coronavirus isolate 4662in2H06 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664247.1
Feline coronavirus isolate 4624fe2H06 nonfunctional pol...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664246.1
Feline coronavirus isolate 45491i2A05b nonfunctional pol...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664245.1
Feline coronavirus isolate 4549in2E08b pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664244.1
Feline coronavirus isolate 4549co2D08 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664243.1
Feline coronavirus isolate 45491i2B07 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664242.1
Feline coronavirus isolate 4625FEdom6d6a pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664234.1
Feline coronavirus isolate 4662in2D06 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664233.1
Feline coronavirus isolate 45661i2A10b pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664232.1
Feline coronavirus isolate 4549in2B08b pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664231.1
Feline coronavirus isolate 4566in2G08 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664230.1
Feline coronavirus isolate 4549in2H08b pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664229.1
Feline coronavirus isolate 4662in2G06 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664228.1
Feline coronavirus isolate 4595fe2D09 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664227.1
Feline coronavirus isolate 4566in2C08b pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664226.1
Feline coronavirus isolate 4625FEdom6d6h pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664225.1
Feline coronavirus isolate 4549co2A08 pol polyprotein gene,...	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	EU664224.1
Transmissible gastroenteritis virus complete genome, genomic RNA	40.1	40.1	100%	0.51	100.00	NC_038861.1

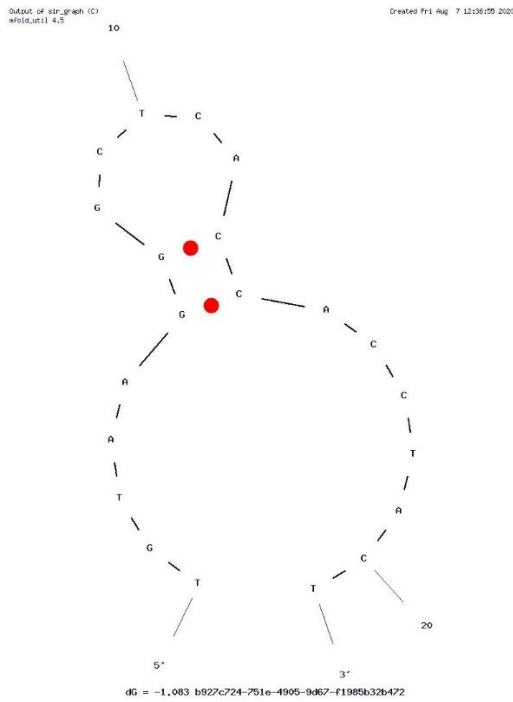


Figura 11. Estructura tallo-bucle 1 cebador 1F región S TGEV.

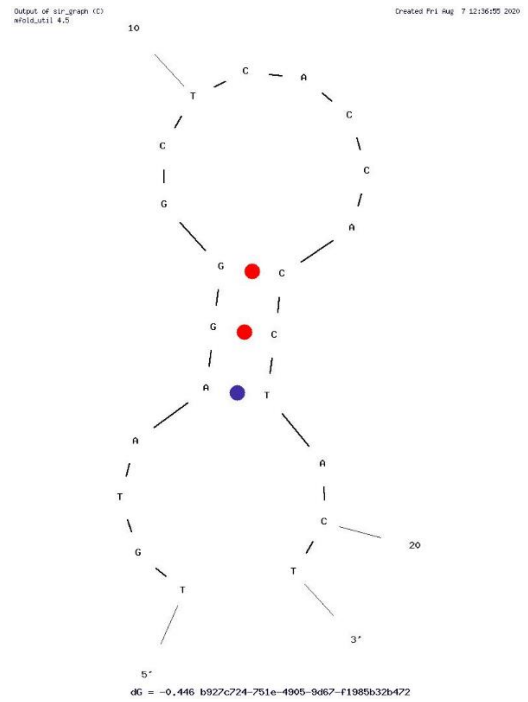


Figura 13. Estructura tallo-bucle 3 cebador 1F región S TGEV.

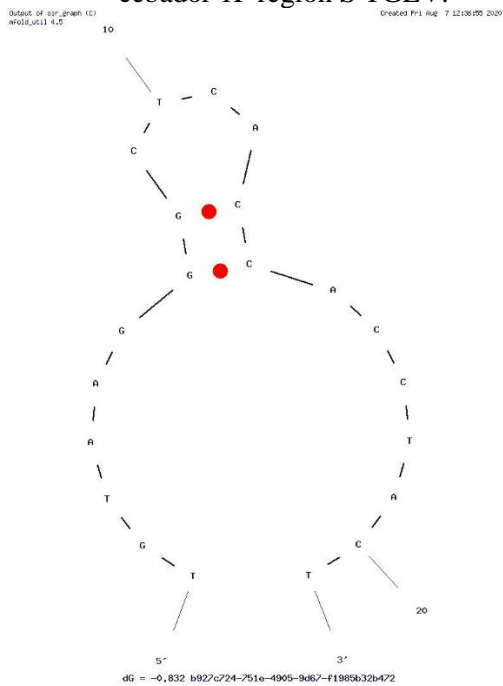


Figura 12. Estructura tallo-bucle 2 cebador 1F región S TGEV.

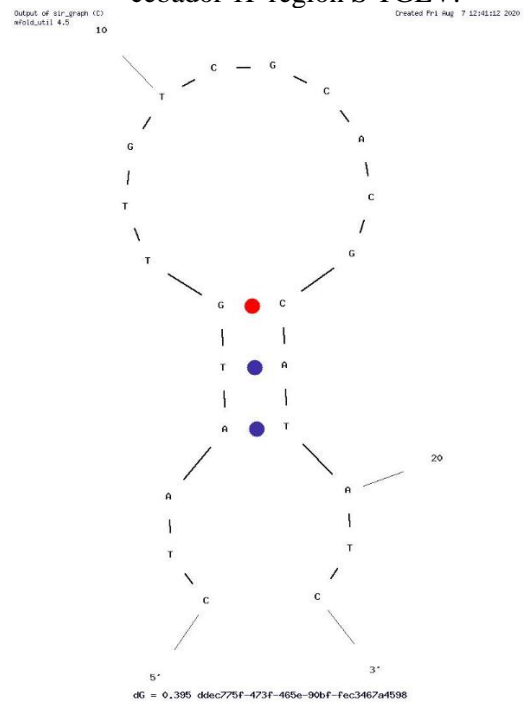


Figura 14. Estructura tallo-bucle 1 cebador 1R región S TGEV.

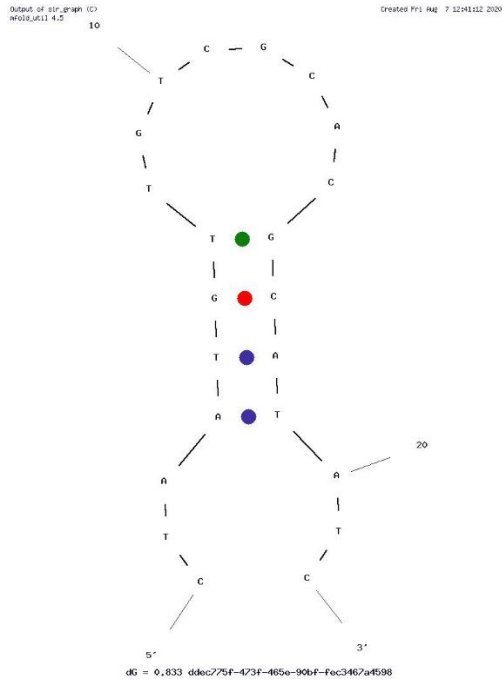


Figura 15. Estructura tallo-bucle 2 cebador 1R región S TGEV.

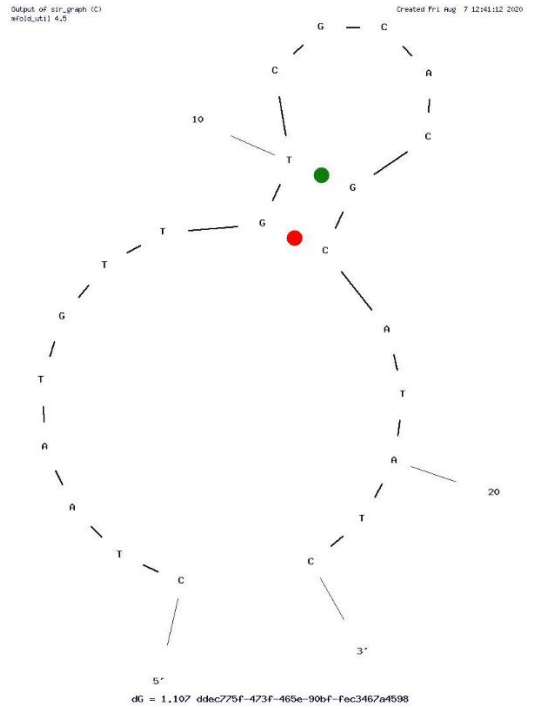


Figura 17. Estructura tallo-bucle 4 cebador 1R región S TGEV.

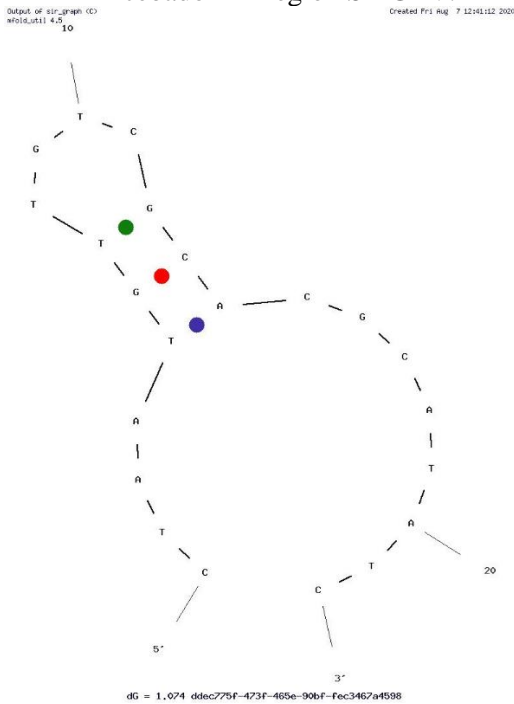


Figura 16. Estructura tallo-bucle 3 cebador 1R región S TGEV.

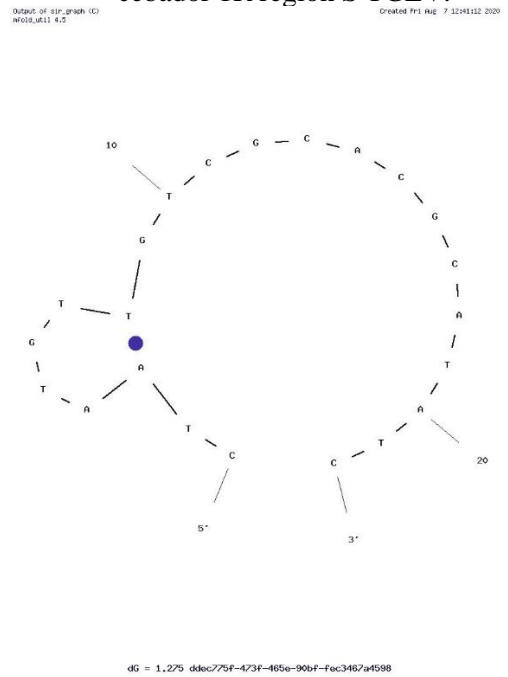


Figura 18. Estructura tallo-bucle 5 cebador 1R región S TGEV.

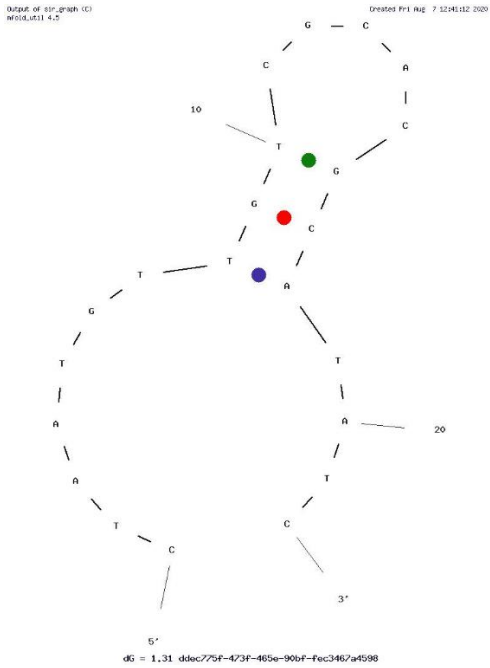


Figura 19. Estructura tallo-bucle 6 cebador 1R región S TGEV.

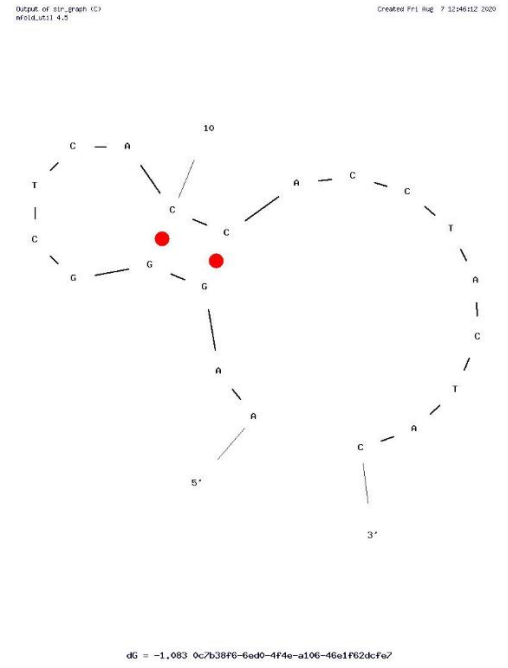


Figura 21. Estructura tallo-bucle 1 cebador 2F región S TGEV.

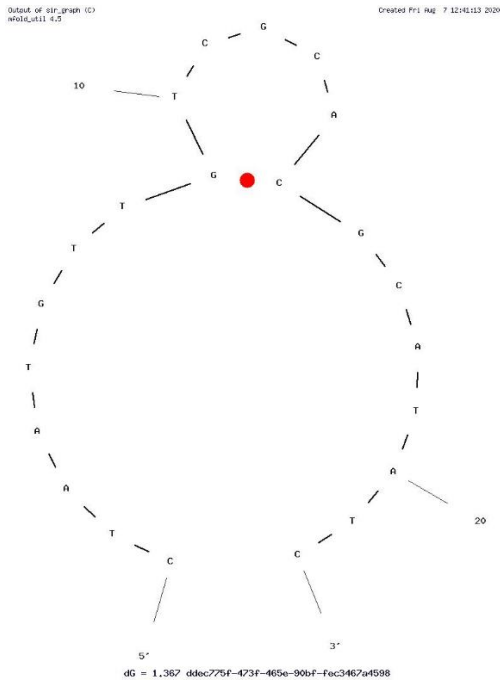


Figura 20. Estructura tallo-bucle 7 cebador 1R región S TGEV.

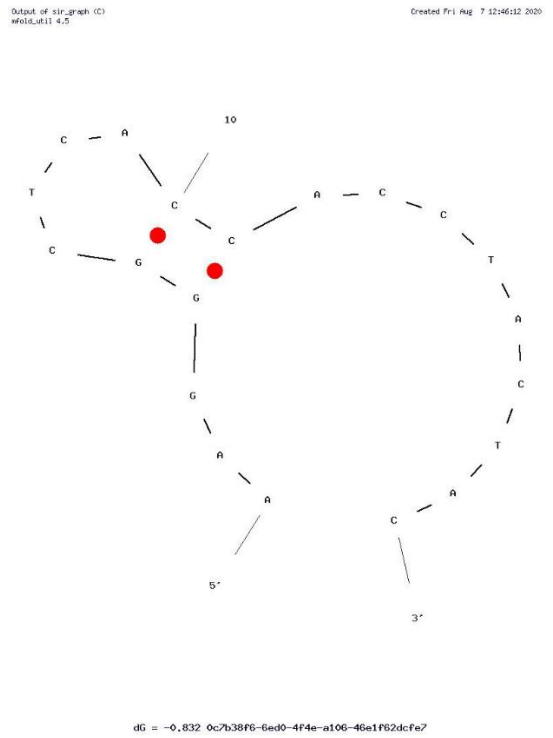


Figura 22. Estructura tallo-bucle 2 cebador 2F región S TGEV.

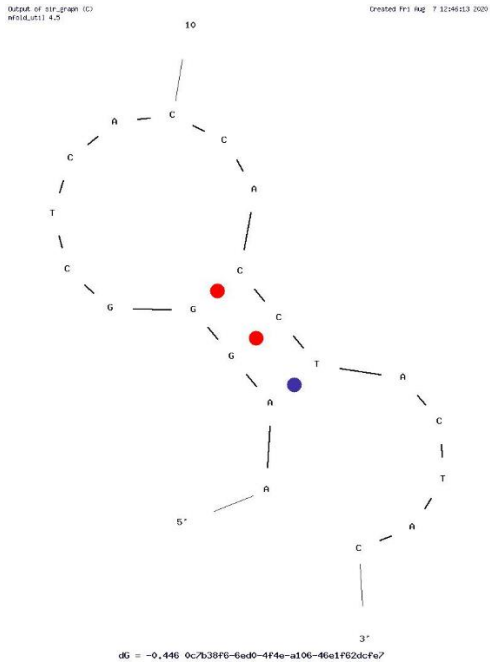


Figura 23. Estructura tallo-bucle 3 cebador 2F región S TGEV.

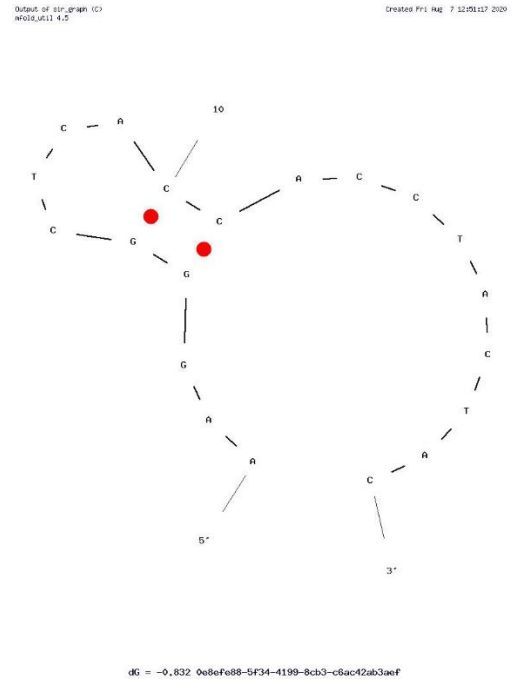


Figura 25. Estructura tallo-bucle 2 cebador 2R región S TGEV.

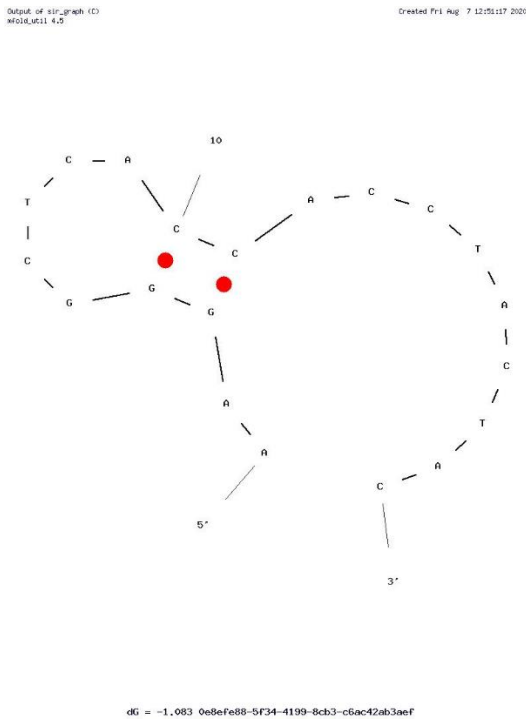


Figura 24. Estructura tallo-bucle 1 cebador 2R región S TGEV.

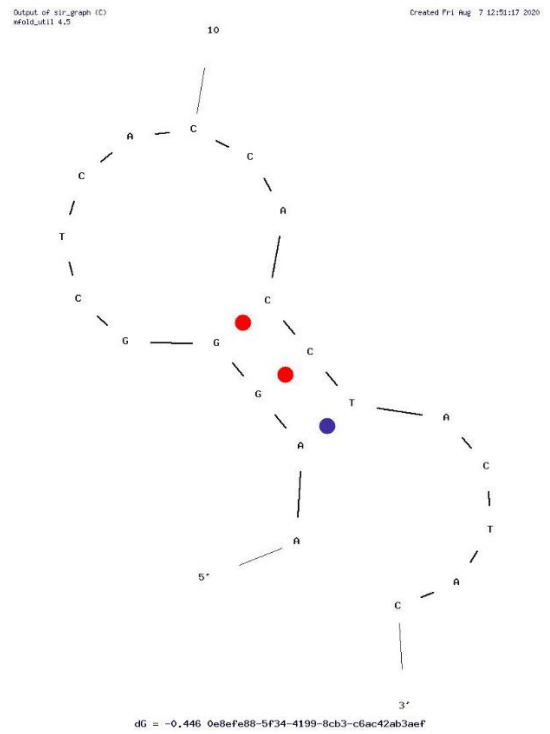


Figura 26. Estructura tallo-bucle 3 cebador 2R región S TGEV.

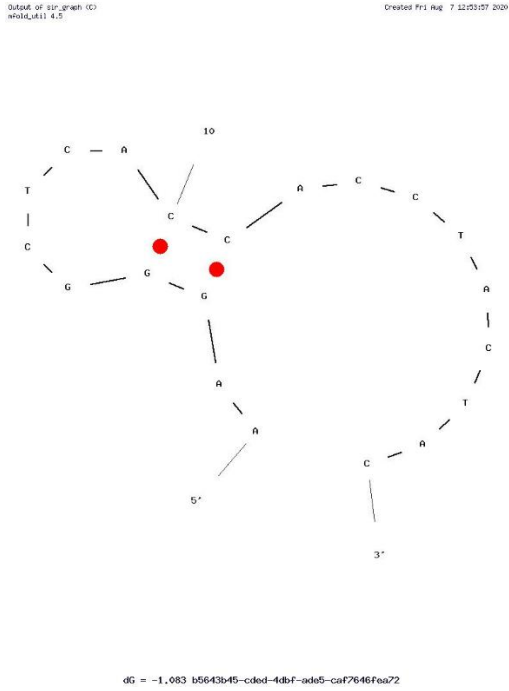


Figura 27. Estructura tallo-bucle 1 cebador 3F región S TGEV.

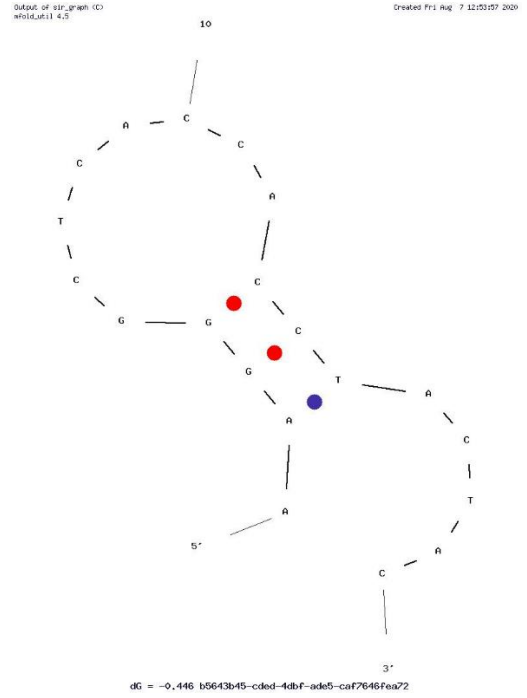


Figura 29. Estructura tallo-bucle 3 cebador 3F región S TGEV.

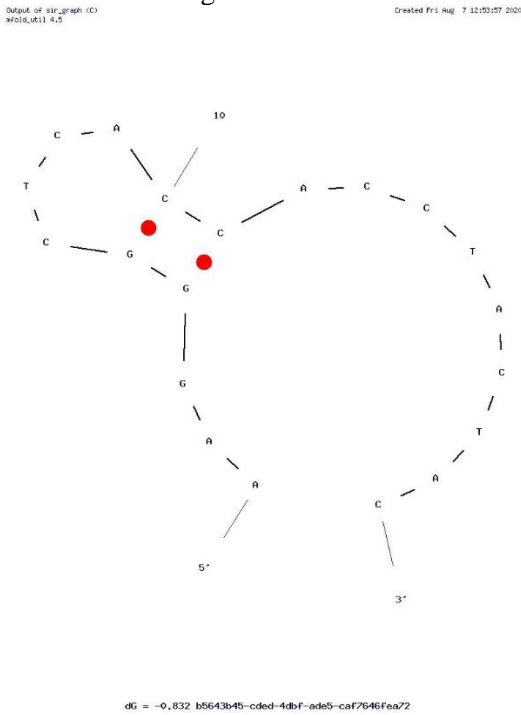


Figura 28. Estructura tallo-bucle 2 cebador 3F región S TGEV.

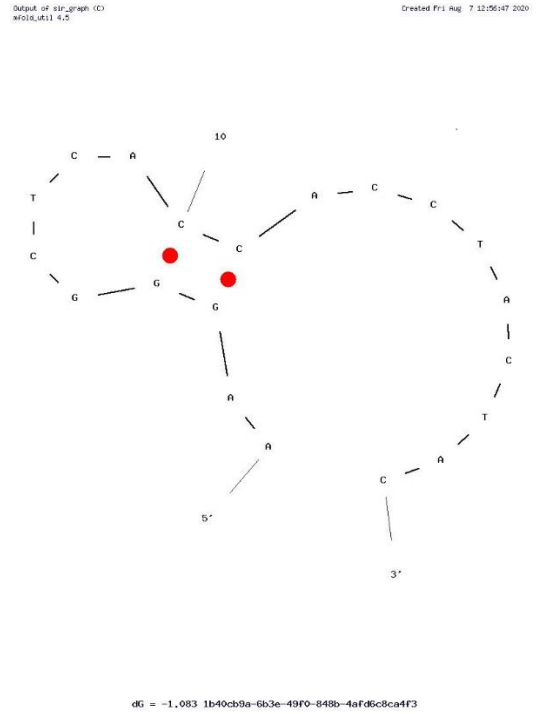
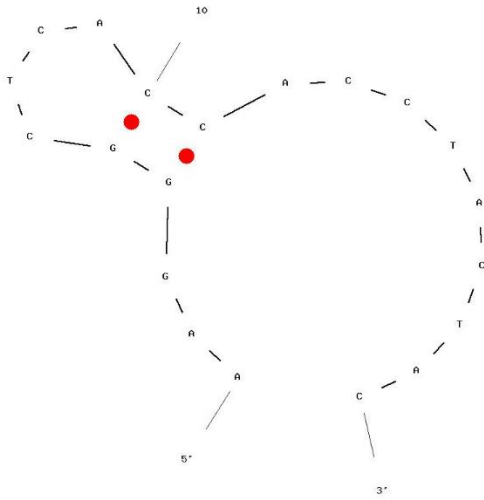
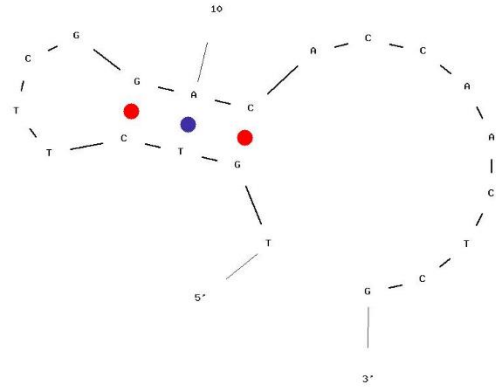


Figura 30. Estructura tallo-bucle 1 cebador 3R región S TGEV.



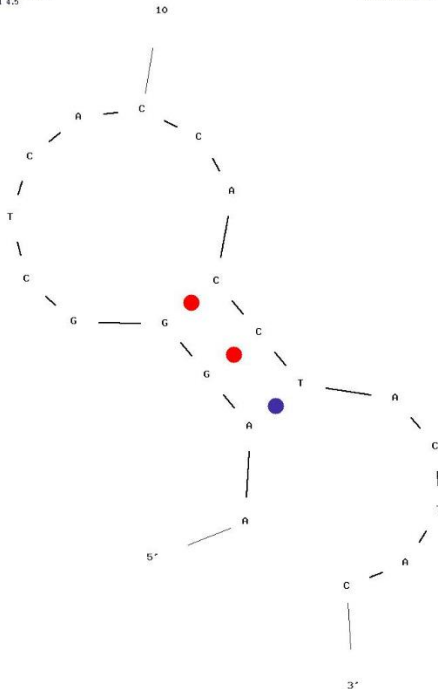
dG = -0.832 1b40cb9a-6b3e-49f0-848b-4afdb8c8ca4f3

Figura 31. Estructura tallo-bucle 2 cebador 3R región S TGEV.



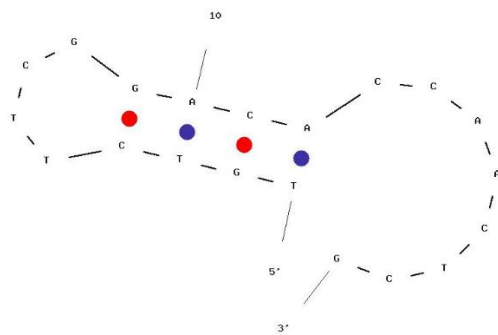
dG = -2.012 93e9f767-c234-4c88-a442-890e62309bff

Figura 32. Estructura tallo-bucle 1 cebador 1F región ORF1.



dG = -0.446 1b40cb9a-6b3e-49f0-848b-4afdb8c8ca4f3

Figura 32. Estructura tallo-bucle 3 cebador 3R región S TGEV.



dG = -1.809 93e9f767-c234-4c88-a442-890e62309bff

Figura 33. Estructura tallo-bucle 2 cebador 1F región ORF1.

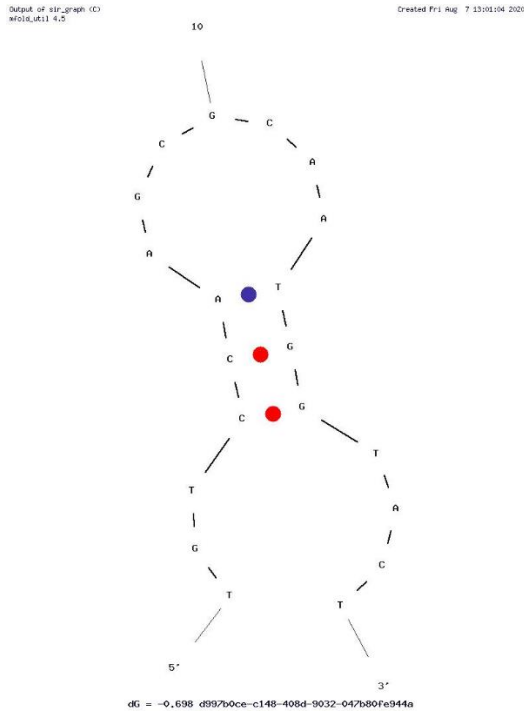


Figura 33. Estructura tallo-bucle 1 cebador 1R región ORF1.

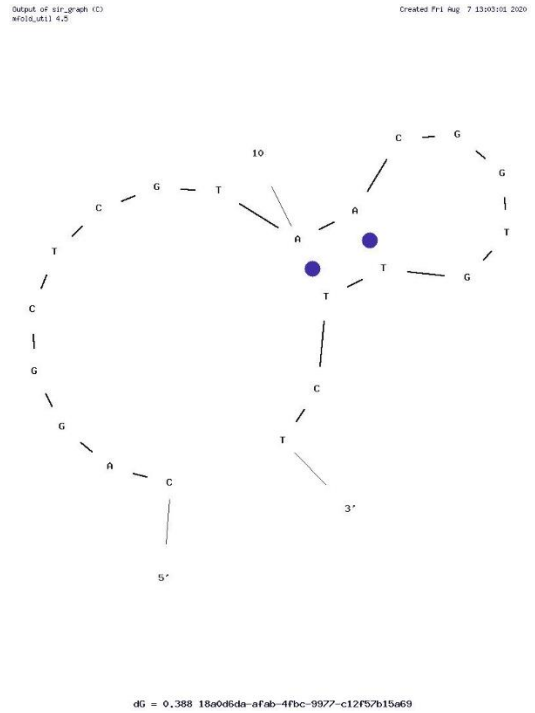


Figura 35. Estructura tallo-bucle 2 cebador 2F región ORF1.

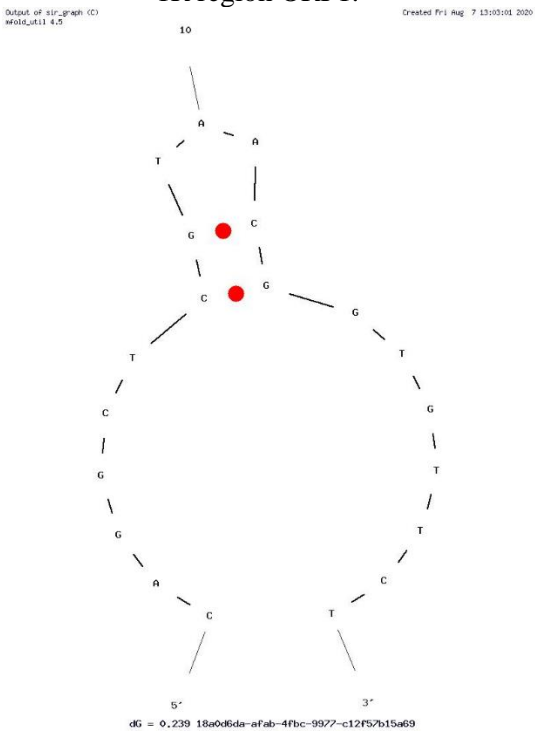


Figura 34. Estructura tallo-bucle 1 cebador 2F región ORF1.

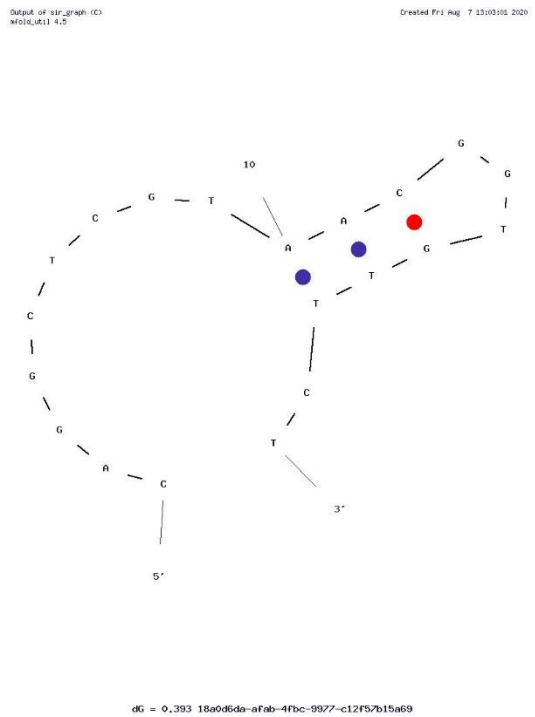
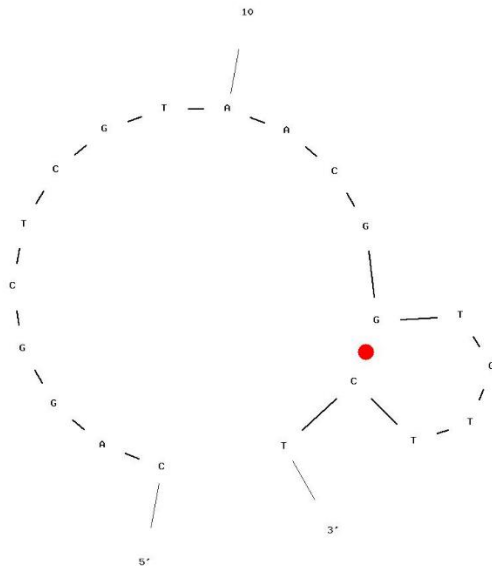
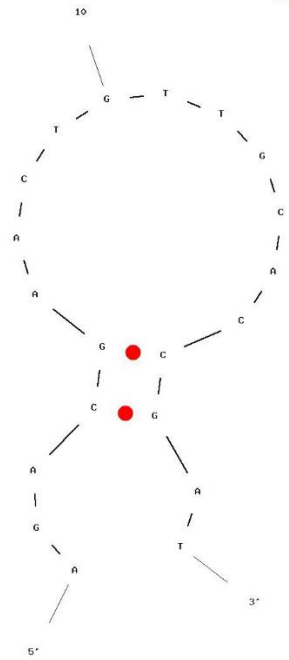


Figura 36. Estructura tallo-bucle 3 cebador 2F región ORF1



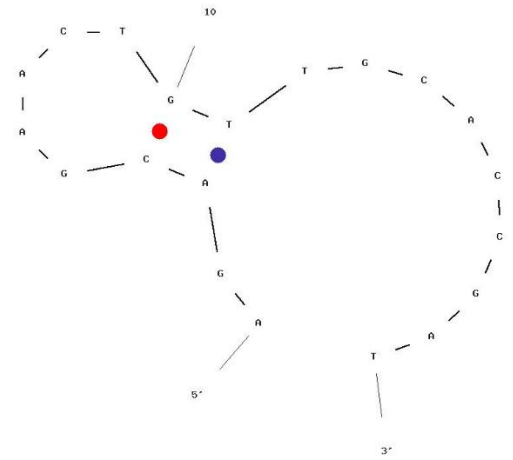
dG = 1.202 18a0d6da-afab-4fbc-9977-c12f57b15a69

Figura 37. Estructura tallo-bucle 4 cebador
2F región ORF1.



dG = -0.57 a1670e8c-bc7b-4b78-a9c7-c94fb47ce478

Figura 38. Estructura tallo-bucle 1 cebador
2R región ORF1.



dG = 0.373 a1670e8c-bc7b-4b78-a9c7-c94fb47ce478

Figura 39. Estructura tallo-bucle 2 cebador
2R región ORF1.

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-TGTAAGGGCTCACCACTACT-3'
Primer 2 -> 5'-CTAATGTTGTCGCACGCATATC-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)
G+C: 68.1

Bordetella bronchiseptica (5339179 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 40. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra *Bordetella bronchiseptica* por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-TGTAAGGGCTCACCACTACT-3'
Primer 2 -> 5'-GATATGCGTGCGACAACATTAG-3'
No mismatches allowed.

G+C: 28.5

Mycoplasma hyopneumoniae 168 (925576 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 41. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-TGTAAGGGCTCACCACCTACT-3'
Primer 2 -> 5'-CTAATGTTGTCGCACGCATATC-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)

G+C: 41.3

Actinobacillus pleuropneumoniae L20 (2274482 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 42. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-AAGGGCTCACCACCTACTAC-3'
Primer 2 -> 5'-AAGCGTGCCAGGACTTCTAA-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)

G+C: 68.1

Bordetella bronchiseptica (5339179 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 43. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra *Bordetella bronchiseptica* por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-AAGGGCTCACCACCTACTAC-3'
Primer 2 -> 5'-AAGCGTGCCAGGACTTCTAA-3'
No mismatches allowed.

G+C: 28.5

Mycoplasma hyopneumoniae 168 (925576 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 44. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-AAGGGCTCACCACCTACTAC-3'
Primer 2 -> 5'-AAGCGTGCCAGGACTTCTAA-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)

G+C: 41.3

Actinobacillus pleuropneumoniae L20 (2274482 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 45. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-GTAAGGGCTCACCACCTACT-3'
Primer 2 -> 5'-TGACAGTGCCAGACCATTGA-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)
G+C: 68.1

Bordetella bronchiseptica (5339179 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 46. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra *Bordetella bronchiseptica* por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-GTAAGGGCTCACCACCTACT-3'
Primer 2 -> 5'-TGACAGTGCCAGACCATTGA-3'
No mismatches allowed.

G+C: 28.5

Mycoplasma hyopneumoniae 168 (925576 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 47. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-GTAAGGGCTCACCACTACT-3'
Primer 2 -> 5'-TGACAGTGCCAGACCATTGA-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)
G+C: 41.3

Actinobacillus pleuropneumoniae L20 (2274482 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 48. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-TGTCTTCGGACACCAACTCG-3'
Primer 2 -> 5'-TGTCCAAGCGCAATGGTACT-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)
G+C: 68.1

Bordetella bronchiseptica (5339179 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 49. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra *Bordetella bronchiseptica* por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-TGTCTTCGGACACCAACTCG-3'
Primer 2 -> 5'-TGTCCAAGCGCAATGGTACT-3'
No mismatches allowed.

G+C: 28.5

Mycoplasma hyopneumoniae 168 (925576 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 50. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-TGTCTTCGGACACCAACTCG-3'
Primer 2 -> 5'-TGTCCAAGCGCAATGGTACT-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)

G+C: 41.3

Actinobacillus pleuropneumoniae L20 (2274482 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 51. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF de TGEV y PRCV contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-CAGGCTCGTAACGGTGTCT-3'
Primer 2 -> 5'-AGACGAACTGTTGCACCGAT-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)

G+C: 68.1

Bordetella bronchiseptica (5339179 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 52. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra *Bordetella bronchiseptica* por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-CAGGCTCGTAACGGTGTCT-3'
Primer 2 -> 5'-AGACGAACTGTTGCACCGAT-3'
No mismatches allowed.

G+C: 28.5

Mycoplasma hyopneumoniae 168 (925576 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 53. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-CAGGCTCGTAACGGTGTCT-3'
Primer 2 -> 5'-AGACGAACTGTTGCACCGAT-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)
G+C: 41.3

Actinobacillus pleuropneumoniae L20 (2274482 bp)

No bands amplified [info](#)

Computed in 0 seconds

Figura 54. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF de TGEV y PRCV contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-TGTAAGGGCTCACCACTACT-3'
Primer 2 -> 5'-CTAATGTTGTCGCACGCATATC-3'
No mismatches allowed.
```

influenzaa.txt (13588 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

Figura 55. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra el virus de Influenza A (H1N1) por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-AAGGGCTCACCTACTAC-3'
Primer 2 -> 5'-AAGCGTGCCAGGACTTCTAA-3'
No mismatches allowed.
```

influenzaa.txt (13588 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

Figura 56. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra el virus de Influenza A (H1N1) por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-GTAAGGGCTCACCTACT-3'
Primer 2 -> 5'-TGACAGTGCCAGACCATTGA-3'
No mismatches allowed.
```

influenzaa.txt (13588 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

Figura 57. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra el virus de Influenza A (H1N1) por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-TGTCTTCGGACACCAACTCG-3'
Primer 2 -> 5'-TGTCCAAGCGCAATGGTACT-3'
No mismatches allowed.
```

```
influenzaa.txt (13588 bp)
```

```
No bands amplified
```

```
Computed in 0 seconds
```

Figura 58. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.
*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-CAGGCTCGTAACGGTGTCT-3'
Primer 2 -> 5'-AGACGAACTGTTGCACCGAT-3'
No mismatches allowed.
```

```
influenzaa.txt (13588 bp)
```

```
No bands amplified
```

```
Computed in 0 seconds
```

Figura 59. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.
*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-TGTAAGGGCTCACCACCTACT-3'
Primer 2 -> 5'-CTAATGTTGTCGCACGCATATC-3'
No mismatches allowed.
```

```
virus_sindrome_respiratorio_y_reproductivo_porcino.txt (15401 bp)
```

```
No bands amplified
```

```
Computed in 0 seconds
```

Figura 60. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”
*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-AAGGGCTCACCACCTACTAC-3'
Primer 2 -> 5'-AAGCGTGCCAGGACTTCTAA-3'
No mismatches allowed.
```

```
virus_sindrome_respiratorio_y_reproductivo_porcino.txt (15401 bp)
```

```
No bands amplified
```

```
Computed in 0 seconds
```

Figura 61. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.
*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-GTAAGGGCTCACCACTACT-3'
Primer 2 -> 5'-TGACAGTGCCAGACCATTGA-3'
No mismatches allowed.
```

```
virus_sindrome_respiratorio_y_reproductivo_porcino.txt (15401 bp)
```

```
No bands amplified
```

```
Computed in 0 seconds
```

Figura 62. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-TGTCTTCGGACACCAACTCG-3'
Primer 2 -> 5'-TGCCAAGCGCAATGGTACT-3'
No mismatches allowed.
```

```
virus_sindrome_respiratorio_y_reproductivo_porcino.txt (15401 bp)
```

```
No bands amplified
```

```
Computed in 0 seconds
```

Figura 63. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-CAGGCTCGTAACGGTGTCT-3'
Primer 2 -> 5'-AGACGAACTGTTGCACCGAT-3'
No mismatches allowed.

-----

virus_sindrome_respiratorio_y_reproductivo_porcino.txt (15401 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

-----
```

Figura 64. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.
*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-CAGGCTCGTAACGGTGTCT-3'
Primer 2 -> 5'-AGACGAACTGTTGCACCGAT-3'
No mismatches allowed.

-----

virus_sindrome_respiratorio_y_reproductivo_porcino.txt (15401 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

-----
```

Figura 64. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification” .
*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-TGTAAGGGCTCACCACCTACT-3'
Primer 2 -> 5'-CTAATGTTGTCGCACGCATATC-3'
No mismatches allowed.
```

circovirus_tipo2.txt (1767 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

Figura 65. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región s de TGEV contra el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.
*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-AAGGGCTCACCACCTACTAC-3'
Primer 2 -> 5'-AAGCGTGCCAGGACTTCTAA-3'
No mismatches allowed.
```

circovirus_tipo2.txt (1767 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

Figura 66. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región s de TGEV contra el circovirus porcino 2 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”.
*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-GTAAGGGCTCACCACCTACT-3'
Primer 2 -> 5'-TGACAGTGCCAGACCATTGA-3'
No mismatches allowed.
```

circovirus_tipo2.txt (1767 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

Figura 67. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 3F-3R de la región s de TGEV contra el circovirus porcino 2 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”. *(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-TGTCTTCGGACACCAACTCG-3'
Primer 2 -> 5'-TGTCCAAGCGCAATGGTACT-3'
No mismatches allowed.
```

circovirus_tipo2.txt (1767 bp)

No bands amplified

Computed in 0 seconds

Figura 68. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región s de ORF1 de TGEV y PRCV contra el circovirus porcino 2 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”. *(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

```
In silico PCR amplification
Primer 1 -> 5'-CAGGCTCGTAACGGTGTCT-3'
Primer 2 -> 5'-AGACGAACTGTTGCACCGAT-3'
No mismatches allowed.
```

```
circovirus_tipo2.txt (1767 bp)
```

```
No bands amplified
```

```
Computed in 0 seconds
```

Figura 69. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región s de ORF1 de TGEV y PRCV contra el circovirus porcino 2 por medio de la plataforma “*In silico* PCR amplification”

*(Bikandi, San Millán, Rementeria y Garaizar, 2004).

UCSC In-Silico PCR
No matches to tgtaagggtcaccacactact gatatgctgacgacaacattag in Pig Feb. 2017 (Sscrofa11.1/susScr11)
Primer Melting Temperatures
Forward: 58.7 C tgtaagggtcaccacactact Reverse: 60.5 C ctaatgttgcgcacgcatatc The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from Primer3 .

Figura 70. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región S de TGEV contra *Sus scrofa* (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR.
*(Kent, 2013).

UCSC In-Silico PCR
No matches to aagggtcaccacactactac ttagaagtcctggcagcctt in Pig Feb. 2017 (Sscrofa11.1/susScr11)
Primer Melting Temperatures
Forward: 55.8 C aagggtcaccacactactac Reverse: 60.0 C aagcgtgccaggacttctaa The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from Primer3 .

Figura 71. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 2F-2R de la región S de TGEV contra *Sus scrofa* (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR.
*(Kent, 2013).

UCSC In-Silico PCR
No matches to gtaagggtcaccacactact tcaatggctggcactgtca in Pig Feb. 2017 (Sscrofa11.1/susScr11)
Primer Melting Temperatures
Forward: 55.8 C gtaagggtcaccacactact Reverse: 61.3 C tgacagtgcagaccattga The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from Primer3 .

Figura 72. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 3F-3R de la región S de TGEV contra *Sus scrofa* (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR

*(Kent, 2013).

UCSC In-Silico PCR
No matches to caggctcgtaacgggtgttct atcggtgcaacagttcgtct in Pig Feb. 2017 (Sscrofa11.1/susScr11)
Primer Melting Temperatures
Forward: 60.3 C caggctcgtaacgggtgttct Reverse: 60.7 C agacgaactgttgaccgat The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from Primer3 .

Figura 73. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra *Sus scrofa* (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR

*(Kent, 2013).

UCSC In-Silico PCR
No matches to tgtcttcggacaccaactcg agtaccattgcgcttggaca in Pig Feb. 2017 (Sscrofa11.1/susScr11)
Primer Melting Temperatures
Forward: 62.3 C tgtcttcggacaccaactcg Reverse: 61.6 C tgtccaagcgcaatggact The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from Primer3 .

Figura 74. Resultados de PCR *in silico* para la parejas de cebadores 1F-1R de la región ORF1 de TGEV y PRCV contra *Sus scrofa* (cerdo doméstico) por medio de la herramienta UCSC In-Silico PCR.
*(Kent, 2013).