

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA EN CULTIVO CELULAR.

Becerra J.^{1*}, Trujillo M.E.², Beltrán R.², García M.¹, Hernández E.¹, Sotomayor A.¹, Sarmiento R.E.¹.

1. Departamento de Microbiología e Inmunología, 2. Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

Palabras clave: PEDV, aislamiento, células. pepepancho_091@hotmail.com

Introducción.

El virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) fue identificado en México en 2013, esta enfermedad se caracteriza por diarrea severa y vómito que afecta a cerdos de todas las edades causando una mortalidad arriba del 90% en lechones lactantes. El aislamiento del virus se reportó por primera vez en 1988, en diferentes cultivos primarios y líneas celulares, lográndolo solo en la línea celular Vero, en presencia de Tripsina (Hofmann y Wyler, 1988).

Material y métodos.

Se tomaron muestras clínicas de lechones de menos de 8 horas de nacidos, de heces, contenido gástrico, intestino y pulmón, de una granja con cuadro clínico sugerente a diarrea epidémica porcina. Se realizó el diagnóstico diferencial con los virus TGE y Rotavirus mediante el uso del kit TGE/PED Ag Test y PED/Rota Ag Test de BIONOTE.

Para el aislamiento viral en las células Vero se utilizaron 10 muestras (3 de pulmón, 4 de intestino y 3 de contenido gástrico), se realizaron 5 pases ciegos y en el 5° pase se realizó RT-PCR para la amplificación de una región del gen M, para confirmar la presencia del virus, los cultivos positivos se siguieron hasta por 10 pases. Para el aislamiento en las células MARC-145 e IPEC-J2 se usaron 2 muestras de intestino y 2 de pulmón. Se realizaron 5 pases ciegos, para confirmar la presencia del virus en los cultivos se utilizó la técnica de RT-PCR. Los sobrenadantes de los cultivos positivos se titularon mediante el método descrito por Reed-Münch expresando el título en dosis infectivas en cultivo celular al 50%/ml (DICC₅₀%/ml).

Resultados y Discusión.

Las muestras resultaron negativas a los virus TGE y Rotavirus y fueron positivas a PEDV (Ag Test de BIONOTE). Al igual que en el trabajo de Hofmann y Wyler en este caso el aislamiento fue posible en la línea celular Vero a partir de la muestra de pulmón (Hofmann y Wyler, 1988), en las cuales el virus se propagó de manera eficiente, mostrando efecto citopático (ECP) caracterizado por la fusión de células infectadas (sincitio o formación polykaryon) desde el pase 3 y RT-PCR positivo. La tasa de aislamiento del virus PED en células Vero fue del 10%, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura ya que estudios recientes en Estados Unidos

reportan una variación que va desde 5 a 10% (Chen et al., 2014 y Oka et al., 2014). Los títulos infecciosos virales obtenidos durante los 10 pases en células Vero oscilaron entre 1×10^5 - 1×10^8 DICC₅₀%/ml. Sin embargo las características de crecimiento, variaron entre los pases, entre los pases 1-6 se observó formación de sincitio y desprendimiento celular a las 48 hpi, mientras que de los pases 7-10, se observó formación de sincitio y sin desprendimiento celular aun a las 72 hpi.

Mientras que en las células MARC-145 e IPEC-J2 solo se intentó el el aislamiento a partir de 2 muestras de intestino y 2 de pulmón (debido a la disponibilidad de las muestras), el ECP fue desprendimiento y vacuolización en los pases 1-5, sin embargo el RT-PCR fue positivo en ambos casos. La tasa de aislamiento en estas líneas celulares fue del 100%, aunque tenemos que considerar que solo se utilizaron dos tipos de muestra. Las células MARC-145 y IPEC-J2 solo se han utilizado para la propagación de cepas virales no para el aislamiento del virus PED, nuestro trabajo reportamos la posibilidad de ser usadas con fines de aislamiento.

Conclusiones.

En el presente estudio se logró el aislamiento del virus PED en diferentes líneas celulares, Vero, Marc-145 e IPEC-J2. Aunque el aislamiento PEDV podría verse afectada por varios factores, se necesitan más estudios para mejorar la metodología de aislamiento o para determinar el factor (s) que contribuyen a mejorar la tasa de éxito de aislamiento PEDV en cultivo celular.

Referencias.

- CHEN, Q., LI, G., STASKO, J., & ZHANG, J. 2014. *J Clin Microbiol*, 52: 234-43.
- HOFMANN, M. & WYLER, R. 1988. *J Clin Microbiol*, 26: 2235-9.
- LEE, S., KIM, Y. & LEE, C. 2015. *Virus Res*, 208: 215-24.
- ZHAO, S., GAO, J., ZHU, L. & YANG, Q. 2014. *Virus Res*, 192: 34-45.