

CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA EN CULTIVOS CELULARES

Rivera-Benítez JF^{1*}, Gómez-Núñez L¹, Diosdado VF¹, Soçci EG¹, Ramírez-Mendoza H², De la Luz AJ², Pérez-Torres A³, Quintero V⁴, Martínez LAC¹.

¹CENID-Microbiología animal, INIFAP. ²FMVZ-UNAM; ³FM, UNAM; ⁴FES-Cuautitlán.

e-mail: rivera.francisco@inifap.gob.mx

Palabras clave: caracterización, virus de la diarrea epidémica porcina, aislamiento viral

Introducción

El virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP) pertenece al género *Alphacoronavirus*, familia *Coronaviridae*, orden Nidovirales. Es un virus envuelto de cadena sencilla de ARN en sentido positivo. La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad altamente contagiosa, que clínicamente se confunde con la gastroenteritis transmisible porcina (GET) y con la diarrea ocasionada por el rotavirus porcino tipo A (RVA). Morfológicamente es un virus similar a los miembros de la familia *Coronaviridae*. En cultivos celulares se ha reportado el aislamiento viral preferentemente en células Vero, sin embargo, otras alternativas de cultivos deben ser evaluadas. El objetivo del presente estudio fue aislar el vDEP en dos diferentes líneas celulares y observar las características ultraestructurales en la infección *in vitro*.

Material y métodos

Con la finalidad de aislar el agente causal, se analizaron muestras de intestino delgado y grueso, así como en heces de cerdos que presentaban el cuadro clínico agudo en condiciones de campo. Se evaluaron 13 muestras de tres granjas de ciclo completo de Guanajuato y Michoacán. Las muestras colectadas (n=5: Guanajuato; n= 8: Michoacán) se analizaron por medio de una RT-PCR diferencial para la detección del virus de la diarrea epidémica porcina (vDEP), gastroenteritis transmisible (vGET) y el Rotavirus porcino tipo A (RVA).^{1,2} Para el aislamiento viral se emplearon las líneas celulares de riñón de mono *Cercopithecus aethiops* (Vero; CCL-81™, ATCC) y *Macaca mulatta* (MARC-145). Las células se cultivaron en medio de crecimiento (suplementado con 10% suero fetal bovino; 10% de caldo triptosa fosfato). Los intestinos fueron macerados en medio sin suero (1:10 P/V) y centrifugados a 600 × g/ 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado empleando una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm. Los cultivos celulares que presentaban un 80% de confluencia a las 24 h, se inocularon con la suspensión de intestinos diluido 1:5 V/V. Se dejó adsorber por 60 min a 37 °C y posteriormente se desechó el inóculo, se agregó medio de mantenimiento fresco y se dejó incubar en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37 °C. Los cultivos fueron observados diariamente por cinco días en busca de efecto citopático (ECP). Al presentarse el ECP característico por vDEP (formación de sincitios), los cultivos fueron congelados a -80 °C. Una réplica de los cultivos fue fijada con glutaraldehído y procesada para la visualización en microscopio electrónico de transmisión, empleando métodos estandarizados de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Resultados

Mediante la RT-PCR diferencial se detectaron 11/13 muestras positivas para vDEP (84.6%) y ninguna para vGET y RVA. Posterior a la detección molecular, se seleccionaron tres muestras para realizar el aislamiento viral en la línea celular Vero y MARC-145, sin embargo, solamente en dos casos se logró identificar la infección por vDEP, mediante la presencia de efecto citopático (ECP) a las 48 h postinfección (hpi) y confirmación por RT-PCR (en línea celular Vero). Los sobrenadantes de los cultivos con ECP fueron transferidos para un segundo pase y se observó daño en los monoestratos (formación de sincitios, lisis celular) a las 48 hpi. Los dos cultivos celulares inoculados con el tercer pase continuaron positivos a la presencia del ARN viral por RT-PCR y se procesaron para su visualización por microscopía electrónica de transmisión. En el análisis fue posible observar partículas virales en citoplasma y en el medio extracelular con morfología similar a la de los miembros de la familia *Coronaviridae* (en ocho campos analizados a 20,000 aumentos). En la envoltura viral se observaron proyecciones largas (peplómeros) que asemejaban una corona solar. En general, el diámetro promedio de los viriones fue de 150 nm.

Discusión

Desde la aparición del vDEP en el continente Americano, se han realizado diversos estudios que permitan obtener aislamientos virales adaptados a diferentes sustratos celulares,³ con un eficiente índice de replicación, y adecuada producción de masa antigénica, que contribuya al desarrollo de biológicos.⁴ En el presente estudio los aislamientos positivos fueron realizados en la línea celular Vero, en la línea MARC-145 se detectó ARN viral, sin embargo el ECP no fue representativo.

Conclusión

Se observaron partículas virales con morfología similar a la descrita para virus de la familia *Coronaviridae*, la confirmación molecular indica la presencia del vDEP. Con el aislamiento del vDEP se establece una línea de investigación, misma que conducirá al desarrollo de técnicas diagnósticas y al desarrollo de biológicos experimentales que reduzcan los cuadros clínicos.

Referencias

1. Dae et al. J Vet Diagn Invest (2016) 18:278-281.4.
 2. Ogawa et al. J Virol Methods (2009) 160:210-214.
 3. Lawrence et al. Genome Announc (2014) 2:e00503-14.
 4. Collin et al. BMC Veterinary Research (2015) 11:62.
- Financiado por Recursos Fiscales INIFAP (SIGI: 13592932977).

