



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

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

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

JOSÉ FRANCISCO BECERRA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA ELENA TRUJILLO ORTEGA

DRA. ROSA ELENA SARMIETO SILVA

Ciudad universitaria, Cd.Mx., 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi familia por la confianza y el apoyo que me han brindado durante toda mi vida, especialmente ahora para alcanzar esta meta.

¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, quien me brindo su confianza, amistad y tiempo.

A la Dra María Elena Trujillo Ortega por recibirme en el proyecto.

A la Dra. Liliana Valdés Vázquez por su apoyo en el laboratorio.

A mis amigos del laboratorio de Virología por compartir su conocimiento y amistad.

Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt por donar amablemente las células MARC-145.

Al Dr. Pavel Isa por donar amablemente las células IPEC-J2.

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo del proyecto PAPIIT No. IN220515;
Modulación de la Concentración de las Proteínas de Fase Aguda en Cerdos Inmunizados
con Aislados Mexicanos del Virus de la Diarrea Epidémica Porcina y su Asociación con la
Variación Antigénica.

CONTENIDO.

	Pagina
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Diarrea epidémica porcina.....	2
2.2. Agente etiológico.....	4
2.3. Patogénesis.....	8
2.4. Aislamiento viral.....	9
2.5. Ciclo de replicación viral.....	11
2.6. Diagnóstico.....	14
2.7. Inmunoprofilaxis.....	15
2.7.1. Vacunación.....	15
2.7.2. Feedback.....	16
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivo.....	17
6. Material y Métodos.....	17
6.1. Muestras.....	17
6.2. Preparación del inóculo.....	18
6.3. Evaluación de la susceptibilidad de las líneas celulares a tripsina.....	18
6.4. Infección de líneas celulares.....	19
6.4.1. Células Vero (ATCC® CCL-81™).....	19
6.4.2. Células MARC 145.....	19

6.4.3 Células IPEC-J2.....	20
6.5. RT-PCR.....	21
6.6. Titulación de la infectividad viral (DICC _{50%} /ml) en células Vero.....	23
7. Resultados.....	24
7.1. Concentración de tripsina del medio DMEM/Trip/Antb.....	24
7.2. Aislamiento en células Vero.....	25
7.3. Aislamiento en células Marc-145.....	27
7.4. Aislamiento en células IPEC-J2.....	28
7.5. RT-PCR.....	29
7.6. Títulos virales.....	30
8. Discusión.....	31
9. Conclusiones.....	36
10. Referencias.....	37
Anexo I. Índice de cuadros y figuras.....	40
Anexo II. Materiales y reactivos.....	41
Anexo III. Abreviaturas.....	42

1. Resumen.

BECERRA HERNÁNDEZ JOSÉ FRANCISCO. Aislamiento del Virus de la Diarrea Epidémica Porcina en cultivo celular (bajo la dirección de Dra. María Elena Trujillo Ortega y Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva).

La diarrea epidémica porcina (DEP) causada por el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP), es una enfermedad que afecta a cerdos de cualquier edad y se caracteriza por diarrea, vómito y deshidratación. La mortalidad es variable dependiendo de la edad del cerdo siendo de 95% o superior en cerdos lactantes. El primer reporte exitoso del aislamiento de este virus ocurrió en 1988, Hofmann y Wyler lograron el aislamiento de VDEP en la línea celular Vero (células de epitelio renal de mono verde africano). Otros autores han utilizado diferentes líneas celulares y cultivos primarios para intentar el aislamiento de este virus siendo ineficaz en la mayoría de los casos. El aislamiento de VDEP en cultivo celular es necesario para el desarrollo de vacunas efectivas que nos permitan prevenir la enfermedad así como para el desarrollo de técnicas diagnósticas que faciliten diferenciarla de otras enfermedades con cuadro clínico similar. El objetivo de este estudio fue aislar el VDEP en las líneas celulares Vero, MARC-145 (células de epitelio renal de mono verde africano) e IPEC-J2 (enterocitos porcinos) a partir de muestras de campo. Los resultados muestran que las tres líneas fueron susceptibles y permisivas a la infección por este virus.

2. Introducción.

2.1. Diarrea Epidémica Porcina.

La diarrea epidémica porcina (DEP) es una enfermedad que afecta a cerdos de cualquier edad. Se caracteriza por diarrea, vómito y deshidratación, además en cerdas adultas provoca agalactia y ciclos anormales de reproducción. La mortalidad es variable dependiendo de la edad del cerdo, siendo de 95% o superior en cerdos lactantes (Lee *et al.*, 2015, Stevenson *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2014, Song *et al.*, 2015). Las lesiones macroscópicas se localizan principalmente en intestino delgado, donde se observa adelgazamiento de las paredes intestinales con contenido amarillo acuoso. En el estómago se encuentran coágulos de leche y los linfonodos mesentéricos se hallan edematosos. La deshidratación es fácilmente detectable por ojos sumidos y la pérdida de la elasticidad de la piel. Microscópicamente, las lesiones se caracterizan por acortamiento y fusión de las vellosidades intestinales, así como infiltración de linfocitos en la lámina propia. Clínicamente DEP es indistinguible de la gastroenteritis transmisible del cerdo, causada por el virus de la gastroenteritis transmisible (VGET) (Stevenson *et al.*, 2013, Jung y Saif, 2015).

Esta enfermedad fue reconocida por primera vez en Inglaterra en el año de 1971, propagándose a varios países del continente Europeo. Desde 1990, DEP es una enfermedad rara en Europa asociándola principalmente con diarrea en cerdos adultos aunque se han reportado brotes en Holanda en el periodo de 1989-1991, Hungría en 1995, e Inglaterra en 1998. Un brote epidémico se reportó en Italia

durante 2005-2006 y a mediados de 2014 se reportaron dos brotes de DEP en Alemania. En Asia DEP se reportó por primera vez en Japón en 1982, Corea del Sur en 1993 y Tailandia en 2009. En China casos de DEP se reportan desde 1980 y en 2010 ocurrió una epidemia asociada con brotes a gran escala de diarrea con una morbilidad de 80-100% y 50-90% de mortalidad en cerdos lactantes. En 2013 Japón confirmó un brote de DEP a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) después de siete años de ausencia de la enfermedad en ese país. En agosto del 2014 Taiwán reportó 34 granjas positivas a DEP en las regiones del centro y sur del país (Lee *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2014). En América se reportaron brotes de DEP en Estados Unidos en abril de 2013, detectándose en 32 estados, los brotes alcanzaron su punto máximo de presentación entre febrero y marzo del 2014 y desde entonces el número de casos positivos ha disminuido. En Estados Unidos durante ese periodo se calculó que las pérdidas económicas para los poricultores fueron de \$900 millones a \$1.8 mil millones de dólares. DEP fue reportada en México en julio del 2013, la enfermedad se propagó y en mayo de 2014 se reportaron brotes en 17 de los 32 estados del país ante la OIE. En México esta enfermedad se encuentra dentro del grupo 3 en el acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos, el cual está constituido por enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y son consideradas como endémicas y que por representar un riesgo menor desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, son consideradas de

notificación mensual obligatoria a las dependencias oficiales de salud animal y sanidad acuícola del país (SAGARPA, 2016).

En 2013 DEP fue también identificada en Perú y República Dominicana. En 2014 Canadá reportó ante la OIE brotes de DEP que comenzaron en enero de ese año. Un brote agudo de diarrea y muerte en cerdos lactantes comenzó en marzo del 2014 en Colombia. En julio de ese mismo año ocurrió un brote de DEP en una granja comercial en Ecuador el cual fue reportado ante la OIE en septiembre (Lee *et al.*, 2015, Stevenson *et al.*, 2013, Jung y Saif, 2015, Panel, 2014, Song *et al.*, 2015, Annamalai *et al.*, 2015)

2.2. Agente etiológico.

El virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) fue identificado como un coronavirus en 1976, en 2001 se determinó la secuencia genética de la cepa prototipo (CV777) y se dieron cuenta que el genoma y su organización era más parecido a un coronavirus de murciélago que a otros coronavirus lo que sugiere que VDEP pudo haber tenido su origen a partir de estos animales (Huang *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2015). En 2015 se realizó un estudio filogenético que analizó 219 cepas del VDEP, en el cual se clasificaron en dos grupos, el primero incluía a las cepas clásicas aisladas en Europa y el segundo a las cepas pandémicas de reciente aparición (Figura 1). Los autores concluyeron que las cepas pandémicas se originaron en Corea pues la cepa más antigua de este grupo aparece en ese país, posteriormente se propagaron a Japón, Tailandia y China (Davies, 2015, Sun *et al.*, 2015, Huang *et al.*, 2013).

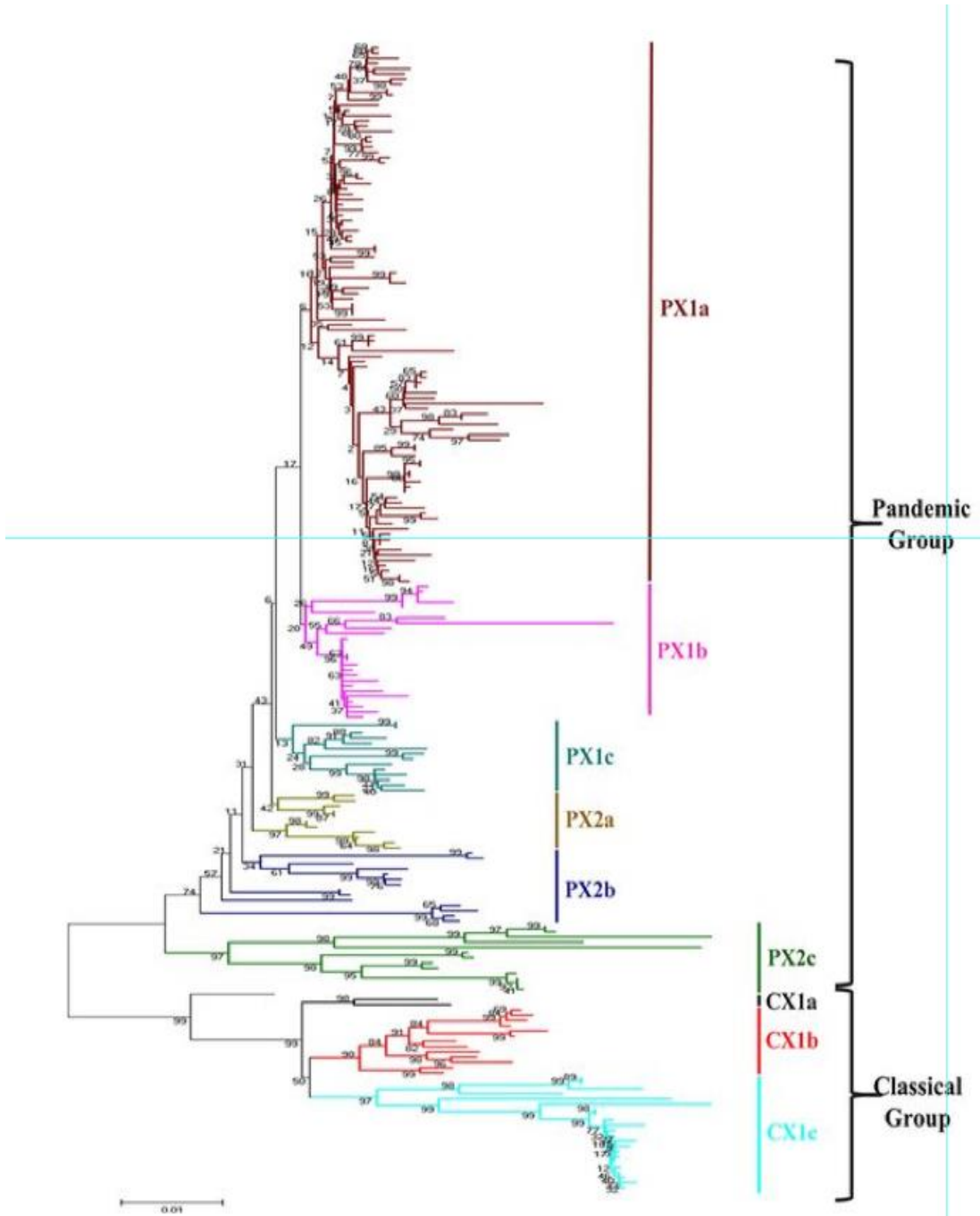


Figura 1. Árbol filogenético de 219 cepas de VDEP que muestra la agrupación de las diferentes cepas en dos grupos, las cepas clásicas y las cepas pandémicas (Sun *et al.*, 2015).

EL VDEP pertenece al género *Alphacoronavirus*, se encuentra dentro de la familia *Coronaviridae* la cual pertenece al orden de los *Nidovirales*. Los coronavirus son los virus RNA con el genoma de mayor tamaño, que afectan a humanos, otros mamíferos y aves. Además, muestran un amplio rango de variación genética debido principalmente a la baja fidelidad de replicación de la polimerasa, que genera alrededor de 0.001 a 0.00001 sustituciones por sitio por año. Aunado al gran tamaño del genoma y la estrategia de replicación que permite recombinaciones genéticas en coinfecciones con otros coronavirus, lo que sugiere un gran riesgo de brote de DEP por nuevas variantes virales (Sun *et al.*, 2015, Belouzard *et al.*, 2012, Diel *et al.*, 2016).

El VDEP es un virus envuelto, pleomórfico, de un diámetro de entre 95-190 nm. Su genoma monocatenario de sentido positivo con aproximadamente 28 kb incluye dos regiones no traducibles (UTRs) y siete marcos de lectura abiertos (ORFs) (Figura 2).

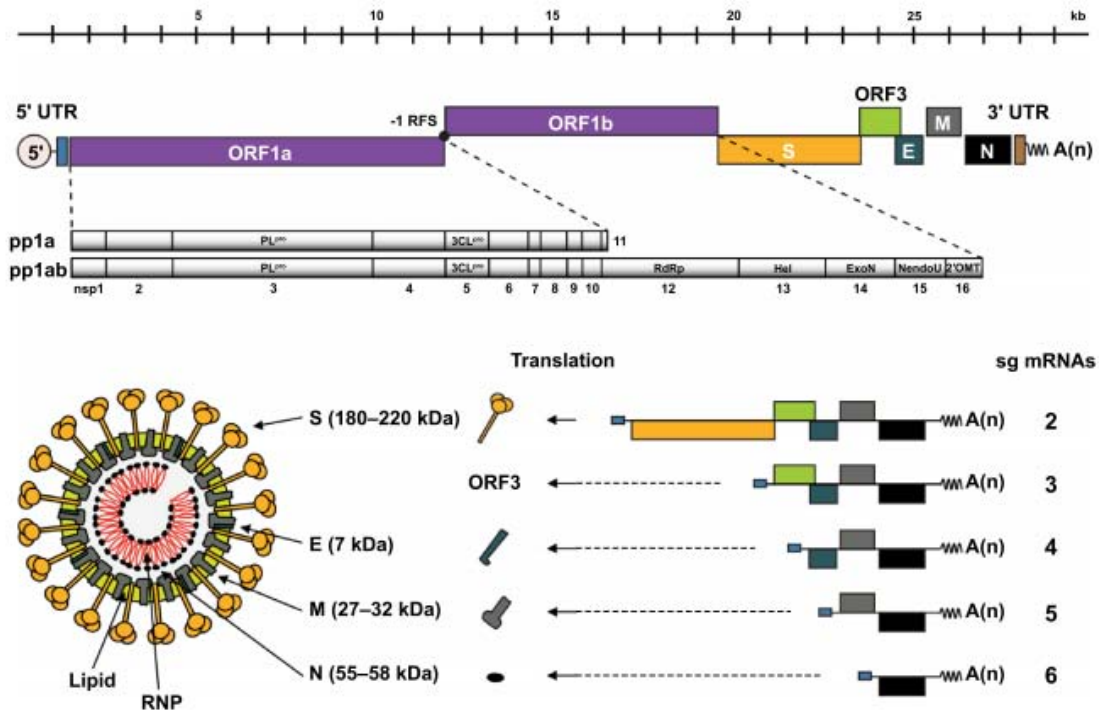


Figura 2. Representación esquemática de la organización del genoma del VDEP así como del virión (Lee, 2015)

El ORF1 se divide en dos, el ORF1a codifica para proteasas y el ORF1b codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA, exonucleasas, endoribonucleasas y metiltransferasas, además se codifican cuatro proteínas estructurales (S, espícula; E, envoltura; M, membrana; N, nucleocapside) y una proteína accesoria codificada por el ORF3. Los ORFs están dispuestos en el genoma en el siguiente orden: 5'-polimerasa (1^a/1b)-S-ORF3-E-M-N-3' y el tamaño de cada ORF es 12,309 pb, 7,638 pb, 4,16 pb, 675 pb, 231 pb, 681 pb, y 1,326 bp, respectivamente (Chen *et al.*, 2014, Song *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2015).

Dentro de las proteínas estructurales, la proteína S es la principal glicoproteína de la envoltura del virión, participa en el reconocimiento del receptor celular así como en la entrada y salida del virus de la célula, propicia la producción de anticuerpos neutralizantes por el hospedador y es utilizada en el desarrollo de ensayos diagnósticos y vacunas. La secuencia genética que codifica para esta proteína es utilizada para determinar la diversidad genética entre cepas y la relación que existe entre ellas. La proteína S es una proteína de fusión clase I que se encuentra altamente glicosilada y se ensambla en trímeros en la membrana viral (Sun *et al.*, 2015, Jung y Saif, 2015).

El análisis genómico del ORF3 es utilizado para diferenciar cepas de campo de las vacunales ya que varias de estas cepas muestran deleciones de hasta 51 pares de bases en este ORF que no han sido identificadas en las cepas de campo (Sun *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2012).

La proteína M participa en el ensamblaje viral mediante la interacción con la proteína S y N, la secuencia genética de esta, junto con la de la proteína N, son las más conservadas entre las cepas virales por lo que se utilizan en pruebas de diagnóstico molecular como el RT-PCR (Diel *et al.*, 2016).

La proteína N se une al genoma viral y lo empaqueta formando la nucleocápside (Jung y Saif, 2015).

2.3. Patogénesis.

La principal vía de transmisión de VDEP es la ruta fecal-oral. Heces, vómito y fomites contaminados como vehículos de transporte y alimento pueden ser

importantes fuentes de transmisión del virus. Otra posible fuente de infección son los cerdos adultos donde la enfermedad se presenta de forma subclínica actuando como reservorios para el virus (Jung y Saif, 2015, Alvarez *et al.*, 2016, Lowe *et al.*, 2014).

El periodo de incubación varía de 1 a 6 días. El VDEP es citolítico causando en los enterocitos infectados necrosis aguda que conduce a una marcada atrofia de las vellosidades intestinales. La pérdida masiva de enterocitos conduce a una inadecuada absorción de nutrientes, además las uniones intercelulares también se ven afectadas provocando deterioro en la integridad intestinal lo que conduce a la pérdida de agua hacia el lumen produciéndose así la diarrea característica de la enfermedad. La deshidratación es exacerbada por el vómito pero el mecanismo por el cual es inducido se desconoce (Jung y Saif, 2015, Zhao *et al.*, 2014). La eliminación de virus en heces comienza de 1 a 3 días después de la infección. Se ha reportado que el periodo de viremia dura entre 1-5 días post infección en cerdos lactantes (Diel *et al.*, 2016).

2.4. Aislamiento viral.

El primer reporte exitoso del aislamiento de este virus ocurrió en 1988, Hofmann y Wyler lograron el aislamiento de VDEP en la línea celular Vero (células de epitelio renal de mono verde africano). Asimismo demostraron que el aislamiento se ve favorecido al suplementar el medio de postinoculación con tripsina, una serin proteasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos precedidos por los aminoácidos básicos arginina y lisina que se encuentran en el interior de una proteína. Aunque el virus es capaz de infectar a la célula en ausencia de tripsina

utilizando la endocitosis como vía de entrada, se ha comprobado que los títulos virales obtenidos de virus cultivados en presencia de tripsina son de 100 a 1000 veces más altos que los obtenidos de virus cultivados en ausencia de esta enzima (Hofmann y Wyler, 1988, Müller-Esterl, 2008, Shirato *et al.*, 2011).

La concentración de tripsina más utilizada son 10 µg/ml de medio, sin embargo no todas las líneas celulares soportan esta concentración por su efecto citotóxico sobre las células, algunos autores aseguran que el daño provocado por la tripsina puede interferir con la infección de VDEP, esta concentración es utilizada en células Vero, las cuales sufren cierto grado de daño aunque el aislamiento ha resultado positivo (Kusanagi *et al.*, 1992, Hofmann y Wyler, 1988).

Además de Hofmann y Wyler, otros autores han utilizado diferentes líneas celulares y cultivos primarios de distintos órganos para intentar el aislamiento de VDEP siendo ineficaz en la mayoría de los casos (Jung y Saif, 2015). A pesar de que son muy pocas las líneas celulares donde se ha reportado el aislamiento de VDEP, también se han utilizado virus adaptados en una línea celular para infectar otro tipo de células siendo en algunos casos posible la replicación del virus, esto se ha reportado en la líneas celulares MARC-145, MA104 (ambas líneas provenientes de riñón de mono verde africano), MPK, ESK (ambas células de riñón de cerdo), entre otras, siendo el efecto citopático parecido al reportado en células Vero (Kusanagi *et al.*, 1992, Hofmann y Wyler, 1988).

2.5. Ciclo de replicación viral.

In vivo VDEP no solo es capaz de replicarse en enterocitos, ya que se ha identificado a otro tipo de células que se ven afectadas por este virus como las células caliciformes encargadas de la producción de mucina en el intestino, la cual es la primer línea de defensa contra microorganismos. También se ha demostrado que el VDEP es capaz de replicarse en macrófagos alveolares aunque no se han encontrado cambios patológicos en pulmón (Park y Shin, 2014).

El receptor celular reconocido por la proteína S es la aminopeptidasa N porcina (APN o CD13), una proteína transmembranal tipo II expresada en la porción apical de los enterocitos. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que el heparan sulfato sirve como receptor para este virus en células Vero (Huan *et al.*, 2015, Belouzard *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2007). La proteína S, una glicoproteína de 180 a 200 kDa, es una proteína de fusión clase I que se encuentra en la envoltura viral formado un homotrímero (espícula). Esta proteína es procesada por proteasas en dos subunidades: la N terminal (S1) y la C-Terminal (S2). S1 se une al receptor mientras que la subunidad S2 es responsable de la actividad fusogénica (Shirato *et al.*, 2011, Spaan *et al.*, 1988, Sturman *et al.*, 1985, Bosch *et al.*, 2003). Además, es la región más conservada de la proteína mientras que la secuencia de S1 varía incluso entre la misma especie de coronavirus. El procesamiento proteolítico es esencial para la entrada del virus a la célula y para la fusión célula-célula (Spaan *et al.*, 1988, Simmons *et al.*, 2004, Matsuyama y Taguchi, 2009, Kawase *et al.*, 2009, Bosch *et al.*, 2003). Una característica típica de las proteínas de fusión es el péptido de fusión que interactúa con la membrana celular para permitir la fusión de

membranas. La localización y secuencia de este péptido en los coronavirus es desconocida pero se cree que se ubica en el dominio S2 (Belouzard *et al.*, 2012).

En los coronavirus, la entrada a la célula puede ocurrir por dos mecanismos: fusión directa, fusionándose la membrana viral con la membrana celular y endocitosis, fusionándose con la membrana de la vesícula endosomal. La fusión de membranas se debe a cambios conformacionales de la proteína S. Estos cambios son iniciados por la unión al receptor pero se necesita de la acidificación del pH o de la activación proteolítica para que la fusión se lleve a cabo (Belouzard *et al.*, 2012, Park *et al.*, 2014).

La tripsina participa en varias etapas del ciclo de replicación del VDEP, favorece la entrada a la célula y la fusión de membranas celulares para la propagación del virus a células vecinas así como en la liberación del virus que queda unido a la membrana celular después de la salida de la célula (Jung y Saif, 2015, Shirato *et al.*, 2011, Wicht *et al.*, 2014).

Después de la entrada y la liberación del genoma en el citoplasma el ORF1a/1b se traduce en una poliproteína la cual es procesada para formar una RNA polimerasa y otras proteínas implicadas en la síntesis de RNA viral. Los productos de esta poliproteína utilizan el RNA genómico como molde para sintetizar RNA de cadena negativa, los cuales son utilizados para sintetizar RNA genómico y los RNAm subgenómicos. Cada RNAm se traduce para producir solo una proteína, estas proteínas incluyen proteínas estructurales (S, E, M, N) y proteínas no estructurales. La proteína N y el RNA genómico recién sintetizados se unen en el citoplasma para formar la nucleocápside helicoidal. La proteína M se transporta

del retículo endoplásmico y se ancla en el aparato de Golgi donde se unen a la nucleocapside. La proteína S y E también se transportan del retículo endoplásmico al aparato de Golgi donde interactúan con la proteína M para desencadenar la gemación de los viriones. El exceso de proteína S que no se incorpora a los viriones es transportado a la membrana plasmática, la activación proteolítica de esta proteína provoca la fusión de membranas celulares formando una célula gigante multinucleada llamada sincitio permitiéndole al virus infectar células vecinas y la evasión del sistema inmune. La salida del virus de la célula se produce mediante exocitosis, y gracias a la acción de proteasas es liberado ya que queda unido a la membrana celular (Figura 3) (Belouzard *et al.*, 2012, Fields *et al.*, 2007, Shirato *et al.*, 2011, Zhu *et al.*, 2013).

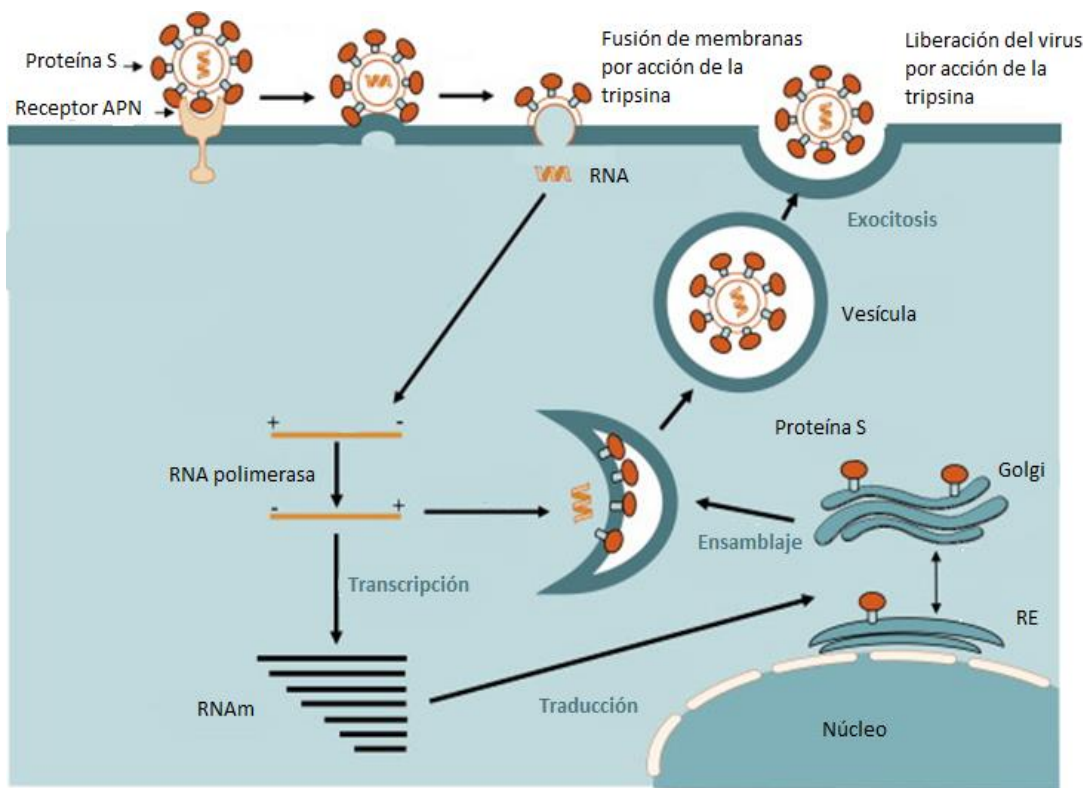


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de replicación del VDEP. Editado de Zhu *et al.*, 2013 .

2.6. Diagnóstico.

Diversas técnicas han sido desarrolladas y empleadas para el diagnóstico de VDEP, ya sea para detectar al agente o los anticuerpos producidos por su hospedador. Una técnica que ha sido utilizada para el diagnóstico es el aislamiento viral, aunque como se mencionó anteriormente el aislamiento llega a ser difícil, costoso y el tiempo en que se obtienen los resultados es tardado, además de que requiere la confirmación del diagnóstico con otras pruebas como la inmunofluorescencia o el RT-PCR. La técnica de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), así como la Inmunofluorescencia, son utilizadas para la detección de anticuerpos o del antígeno viral, diferentes adaptaciones han sido descritas para estas técnicas. Debido a la alta sensibilidad y especificidad, así como la rapidez de estas técnicas la RT-PCR y el qRT-PCR (RT-PCR en tiempo real) son las pruebas de elección para el diagnóstico de VDEP. Los kits de inmunocromatografía pueden ser usados en granjas donde se sospeche de la presencia de VDEP debido a que esta técnica nos permite diferenciar VDEP de VGET y Rotavirus. A pesar de que la técnica es menos sensible que el RT-PCR, tiene la ventaja de que se obtiene un resultado en aproximadamente 10 minutos (Song *et al.*, 2015, Diel *et al.*, 2016, Hou *et al.*, 2007, Kim y Chae, 2002).

2.7. Inmunoprofilaxis.

2.7.1. Vacunación.

Debido a la ocurrencia de severos brotes de DEP y las pérdidas económicas que ha causado, la utilización de diferentes tipos de vacunas ha sido reportada ampliamente en Asia a comparación de Europa donde la presentación de la enfermedad es menos severa. Se han utilizado vacunas atenuadas e inactivadas, algunas de ellas han sido combinadas con VGET y Rotavirus, principalmente en Corea y China. Un virus atenuado en cultivo celular fue utilizado en Japón como vacuna desde 1997. Otra vacuna atenuada administrada vía oral es utilizada en Corea desde el 2004 y en Filipinas desde 2011. Estas vacunas son consideradas como efectivas, sin embargo, existen reportes en donde no todas las cerdas vacunadas desarrollan niveles protectores de anticuerpos para sus camadas. Se cree que son varios los factores a los que se debe esta falta de protección. Uno de ellos es la vía de administración ya que se ha demostrado que inoculando oralmente a cerdas seronegativas a VDEP con una vacuna atenuada se reduce la mortalidad de los lechones de manera más eficiente que con una aplicación intramuscular. Además la pérdida de peso y el periodo de eliminación del virus disminuye en una inoculación vía oral comparada con la inoculación intramuscular. El uso de vacunas activas se ha cuestionado ya que después de la vacunación el virus es detectado en heces. En 2010 se aisló una cepa de VDEP en China que tenía una estrecha relación filogenética con una cepa vacunal. A pesar de que las vacunas de virus activo provocan una mejor respuesta inmune que las vacunas de virus inactivo, la eficacia a largo plazo de estas vacunas a menudo es baja debido

a mutaciones virales y los cambios antigénicos. La emergencia y re-emergencia de VDEP en Europa y Asia indican que el virus es capaz de evadir las estrategias de vacunación actuales debido a la aparición de varias cepas mutantes lo que remarca la necesidad de producir nuevas vacunas basadas en las cepas que circulan actualmente (Song *et al.*, 2015, Song *et al.*, 2007).

2.7.2. “Feedback”.

En los lugares donde no se dispone de vacunas eficaces contra VDEP se ha recomendado la infección de cerdas durante la gestación para proporcionar inmunidad pasiva a sus lechones. El material utilizado para la infección generalmente es una mezcla de heces de lechones con VDEP en la fase aguda de la enfermedad. A cada cerda en la granja se le administra oralmente esta mezcla de manera simultánea propiciando que tanto la recuperación como el cese de eliminación viral ocurran al mismo tiempo. Después del “feedback” los lechones estarán protegidos durante los primeros días después del nacimiento por anticuerpos obtenidos a través del calostro. Una desventaja de este método es el posible riesgo de contaminación del inóculo con otros agentes como es el caso de circovirus porcino, VGET, PRRSV (Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo), *E. coli*, *Salmonella*, entre otros (Song *et al.*, 2015).

3. Justificación.

El aislamiento de VDEP en cultivo celular es necesario para el desarrollo de vacunas efectivas que nos permitan prevenir la enfermedad así como para el desarrollo de técnicas diagnósticas que faciliten diferenciarla de otras

enfermedades con cuadro clínico similar. Sin embargo, se sabe que la tasa de aislamiento de VDEP es baja además de que el virus aislado puede ser incapaz de mantener su infectividad a través de varios pasos por lo que es necesario identificar nuevas líneas celulares para su aislamiento.

4. Hipótesis.

El aislamiento del VDEP a partir de muestras de campo será posible en las líneas celulares Vero, MARC-145 e IPEC-J2 ya que el aislamiento en células Vero se ha logrado en otros estudios y la propagación del virus aislado en células Vero se ha reportado en células MARC-145 e IPEC-J2.

5. Objetivo.

Aislar el VDEP a partir de muestras de campo en las líneas celulares Vero, MARC-145 e IPEC-J2, obtener los títulos virales, confirmar la presencia del virus mediante RT-PCR y comparar la eficiencia de replicación en cada línea celular.

6. Material y Métodos.

6.1. Muestras.

Se obtuvieron muestras de intestino, pulmón y contenido gástrico, de lechones de menos de 8 horas de edad con signología sugerente a DEP de un brote ocurrido en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estas muestras fueron analizadas en un estudio previo mediante RT-PCR para verificar la presencia del virus. Además debido a

que el cuadro clínico de esta enfermedad es similar a otras enfermedades entéricas que afectan al cerdo, fue necesario realizar un ensayo para descartar otros agentes virales como VGET y Rotavirus mediante el uso del kit TGE/PED Ag Test y PED/Rota Ag Test de BIONOTE.

6.2. Preparación del inóculo.

Se eligieron al azar muestras positivas a VDEP de intestino (cuatro), contenido gástrico (tres) y pulmón (tres) las cuales se maceraron en morteros estériles, se les agregó medio de cultivo esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para resuspender el material obteniendo una concentración del 10% que después se colectó en tubos eppendorf de 1.5 ml. Los tubos se centrifugaron a 20,000 gravedades (g) durante 15 min, el sobrenadante de cada muestra se filtró utilizando filtros de 0.22 μm para reducir la contaminación bacteriana y se colectó en un nuevo tubo de 1.5 ml para ser almacenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.3. Evaluación de la susceptibilidad de las líneas celulares a tripsina.

La concentración de tripsina del medio que se utilizó para la infección viral fue la mayor concentración que causó el menor daño a las células. Para conocer esta concentración se preparó una placa de seis pozos de células Vero (células de epitelio renal de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), una vez confluentes se retiró el medio de crecimiento, se hicieron dos lavados con PBS 1x (buffer fosfato salino), se agregaron 3 ml de DMEM con diferentes concentraciones de tripsina (3, 5, 10, 12, 15 $\mu\text{g/ml}$) y se mantuvieron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en

atmósfera de CO₂ al 5% por cinco días. Se revisaron diariamente y se compararon con el control negativo para decidir la concentración de tripsina a utilizar.

6.4. Infección de líneas celulares.

6.4.1. Células Vero (ATCC® CCL-81™).

Estas células se mantuvieron en botellas de cultivo de 25 cm³, el medio de crecimiento utilizado fue DMEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB). Una vez confluyente la monocapa el medio de crecimiento se retiró, se realizaron dos lavados con PBS al 1x y se inocularon 500 µl del macerado de cada muestra por separado el cual se dejó adsorber durante dos horas a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. El control negativo se inoculó con 500 µl de medio DMEM sin SFB con la concentración elegida de tripsina y con una concentración de antibióticos de 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (DMEM/Trip/Antb). Después de la adsorción se retiró el inoculo y se agregaron 2.5 ml de medio DMEM/Trip/Antb, a las 24 h se agregaron 2.5 ml más de medio DMEM/Trip/Antb.

6.4.2. Células MARC-145.

Son células epiteliales de riñón de mono verde africano (amablemente donadas por el Dr. Iván Sánchez Betancourt de la FMVZ, UNAM). Esta línea celular fue mantenida e infectada de igual forma que la línea celular Vero. Las muestras utilizadas para la inoculación fueron dos muestras de pulmón y dos de intestino.

6.4.3 Células IPEC-J2.

Estas son células aisladas de intestino delgado (yeyuno) de cerdos menores de 12 h de edad (amablemente donadas por el Dr. Pavel Isa del Instituto de Biotecnología, UNAM). El medio utilizado para su crecimiento fue DMEM/F12 enriquecido con 5% de SFB, insulina, transferrina, selenio (5 µg/ ml de cada una) y factor de crecimiento epidermal (5 ng/ml). Las células se mantuvieron en botellas de 25 cm³, una vez confluyente la monocapa una botella se utilizó para preparar placas de seis pozos las cuales se utilizaron para la infección. El medio de postinoculación utilizado fue el de crecimiento sin SFB y con una concentración de 3 µg/ml de tripsina. Las muestras utilizadas para la inoculación fueron dos muestras de pulmón y dos de intestino, adicionalmente esta línea celular fue infectada con el sobrenadante del pase 10 de VDEP en células Vero. El método de infección utilizado fue el mismo que en células Vero.

Los cultivos infectados se revisaron diariamente hasta la observación de efecto citopático (ECP), (formación de sincitios, vacuolización y desprendimiento), una vez que el efecto era visible en el 70% de la monocapa, las botellas se congelaron a -20 °C, se descongelaron y se procedió a cosechar el virus en un tubo de 15 ml para ser centrifugado a 2,000 g durante 10 min. El botón celular resultante se desechó y el sobrenadante fue almacenado en tubos de 1.5 ml a -70 °C. Los cultivos que no mostraron ECP fueron cosechados después de cinco días y se les dieron cinco pases ciegos, si no mostraban ECP y resultaban negativos a RT-PCR el aislamiento se consideró negativo (Chen *et al.*, 2014).

6.5. RT-PCR.

La replicación viral fue monitoreada por RT-PCR. A cada pase del virus se le realizó extracción de RNA por el método TRIZOL® (Rio et al., 2010) de la siguiente manera: a 500 µl del sobrenadante del pase cinco en un tubo eppendorf de 1.5 ml se le agregaron 700 µl de TRIZOL®, se mezclaron por pipeteo y se dejaron incubar 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 250 µl de cloroformo y se mezclaron durante 15 seg en vortex seguido de una incubación de 15 min. Al concluir la incubación se centrifugaron a 20,000 g durante 15 min para después coleccionar la fase acuosa en un nuevo tubo de 1.5 ml a la cual se le agregó un volumen igual de isopropanol puro y se dejó precipitar toda la noche. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 20,000 g durante 15 min, se decantó el isopropanol y la pastilla de RNA resultante se lavó con 500 µl de etanol al 75%. Las muestras se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones y al finalizar se decantó el etanol. Las pastillas de RNA se dejaron secar completamente para después ser resuspendidas en 30 µl de agua DEPC (dietil pirocarbonato) y posteriormente ser almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Para la RT-PCR se utilizó el kit Qiagen Onestep con los volúmenes mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Mezcla de reacción para el RT-PCR.

Reactivo.	Cantidad (μL).	Concentración final.
Buffer	2.5	0.625 mM Mg ²⁺
dNTPs	0.5	100 μM de cada dNTP
Iniciadores	0.5 de cada uno	10 μM
Enzima Mix.	0.5	-----
Inhibidor de RNAsas	0.2	8 U
Agua libre de RNAsas	4.8	-----
RNA	3.0	-----

Los iniciadores utilizados, que amplifican una región del genoma de la proteína M (Tabla 2) y las condiciones para el RT-PCR (Tabla 3) fueron las establecidas por Kweon *et al.*, 1997 :

Tabla 2. Iniciadores que amplifican el gen M del VDEP.

Identificación.	Secuencia.	Ubicación.	Fragmento amplificado (pb)
PED3F	5' - GGA CAC ATT CTT GGT GGT CT - 3'	25995-26364	370
PED3R	5' - GTT TAG ACT AAA TGA AGC ACT TTC - 3'		

(Kweon *et al.*, 1997)

Tabla 3. Condiciones para el RT-PCR utilizados para amplificar una región del gen M del VDEP.

Temperatura (°C).	Tiempo (Minutos).	Etapas.	Número de Ciclos.
50	1	Pre calentamiento.	
50	30	Retrotranscripción (RT).	1
95	15	Inactivación de la RT.	
94	2	Desnaturalización.	
58	2	Alineación.	40
72	2	Extensión.	
72	10	Extensión final.	1

(Kweon *et al.*, 1997)

Los productos de la RT-PCR se verificaron por electroforesis utilizando geles de agarosa al 2% que fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio.

6.6. Titulación de la infectividad viral (DICC_{50%}/ml) en células Vero.

Para la titulación de la infectividad viral se prepararon placas de 96 pozos con células Vero, una vez confluentes se retiró el medio de crecimiento, se realizaron dos lavados con PBS 1x y al primer pozo se le agregaron 100 µl de la cosecha viral, del pozo dos al diez se realizaron diluciones décuples seriadas de la suspensión viral en medio DMEM/Trip/Antb y los pozos 11 y 12 se utilizaron como controles negativos. Se realizaron cuatro repeticiones de cada pase para determinar la cantidad de virus requerida para producir ECP en el 50% de las células inoculadas utilizando el método de Reed-Müench expresando el título en dosis infectivas en cultivo celular al 50%/ml (DICC_{50%}/ml). El título viral se tomó a las 96 horas postinoculación (hpi) (Chen *et al.*, 2014).

7. Resultados.

7.1. Concentración de tripsina del medio DMEM/Trip/Antb.

La concentración de Tripsina elegida fue de 5 $\mu\text{g/ml}$ ya que las concentraciones superiores provocaron redondeamiento y desprendimiento de las células Vero desde las 24 hpi (Figura 4).

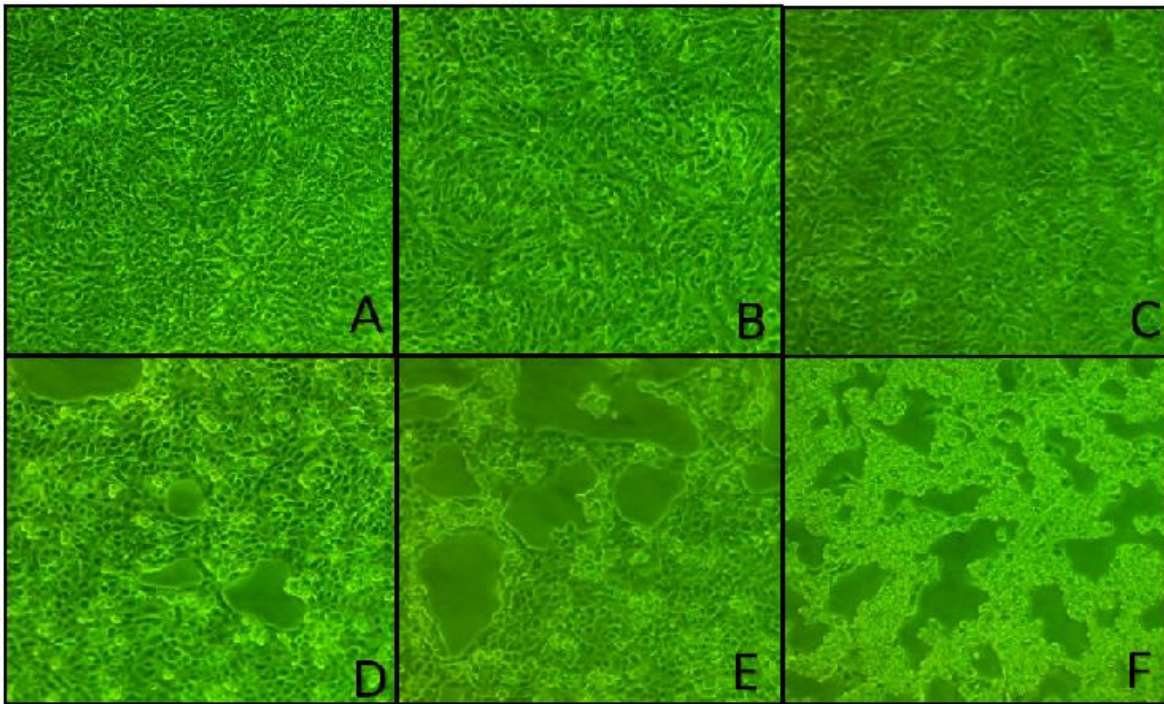


Figura 4. Diferentes concentraciones de tripsina utilizadas en células Vero. Control negativo (A), 3 $\mu\text{g/ml}$ (B), 5 $\mu\text{g/ml}$ (C), 10 $\mu\text{g/ml}$ (D), 12 $\mu\text{g/ml}$ (E) y 15 $\mu\text{g/ml}$ (F) 48 hpi (objetivo 10x).

7.2. Aislamiento en células Vero.

Las muestras utilizadas fueron analizadas mediante del kit TGE/PED Ag Test y PED/Rota Ag Test de BIONOTE, solo dieron positivo al VDEP. Al conocer la concentración de tripsina se procedió a realizar el aislamiento en la línea celular Vero. Después de tres pases y a las 24 hpi, una de las botellas infectada con macerado de pulmón mostró ECP, el cual consistió en formación de sincitios, desprendimiento y vacuolización (Figura 5). Después de cinco pases se realizó RT-PCR y solo el pase de la muestra donde se apreció ECP resultó positivos a VDEP (tasa de aislamiento del 10 %), los pases negativos fueron eliminados.

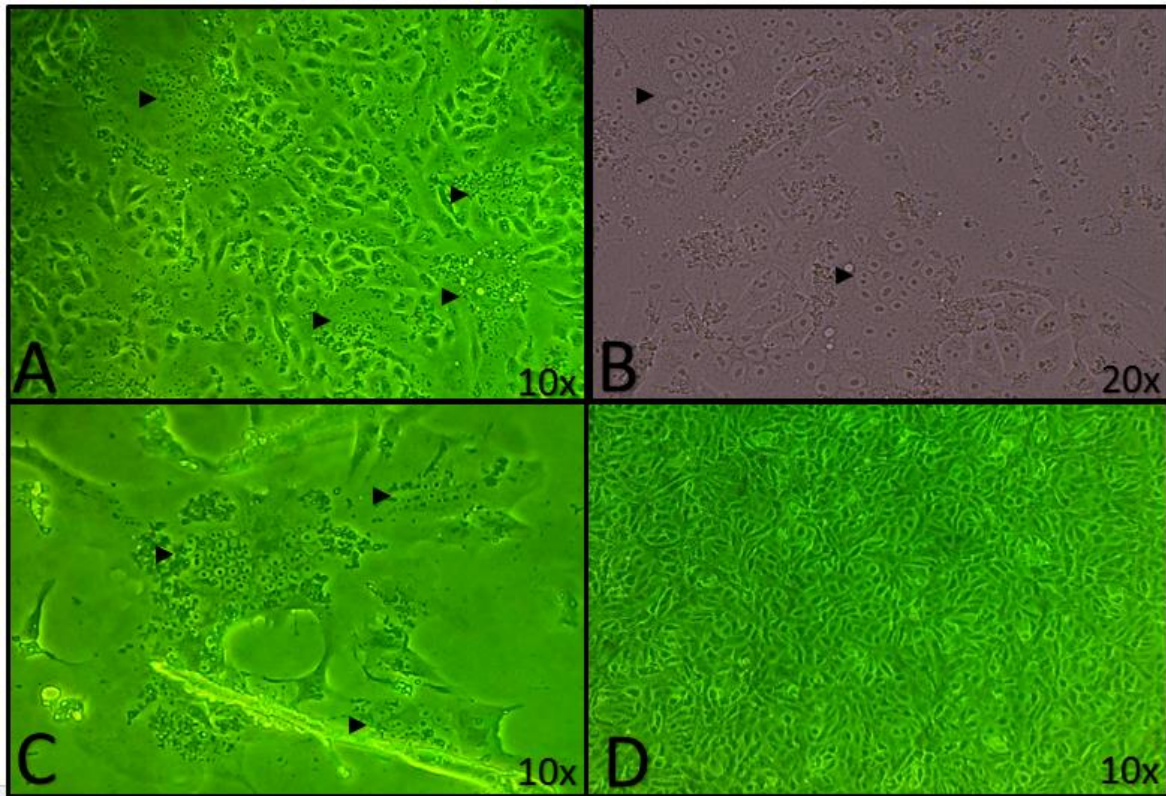


Figura 5. Células Vero infectadas con el sobrenadante del pase 6 del VDEP, (A y B) 24 hpi, (C) 48 hpi, (D) control negativo. Las cabezas de flecha muestran la formación de sincitios, también se puede apreciar el desprendimiento a las 48 hpi (C).

Durante los primeros pases el efecto citopático que predominó fue el desprendimiento, se decidió relizar otros cinco pases de este aislado y en los pases siguientes el desprendimiento disminuyó y la formación de sincitios comenzó a predominar, a las 24 hpi del pase 4 al 6 ya se empezaron a formar sincitios pequeños (2-5 núcleos por sincitio) mientras que a las 48 hpi se observó la formación de sicitios grandes con más de 10 núcleos por sincitio. Del pase 7 al 10 el desprendimiento celular se redujo y la fusión de toda la monocapa era evidente a las 72 hpi (Figura 6).

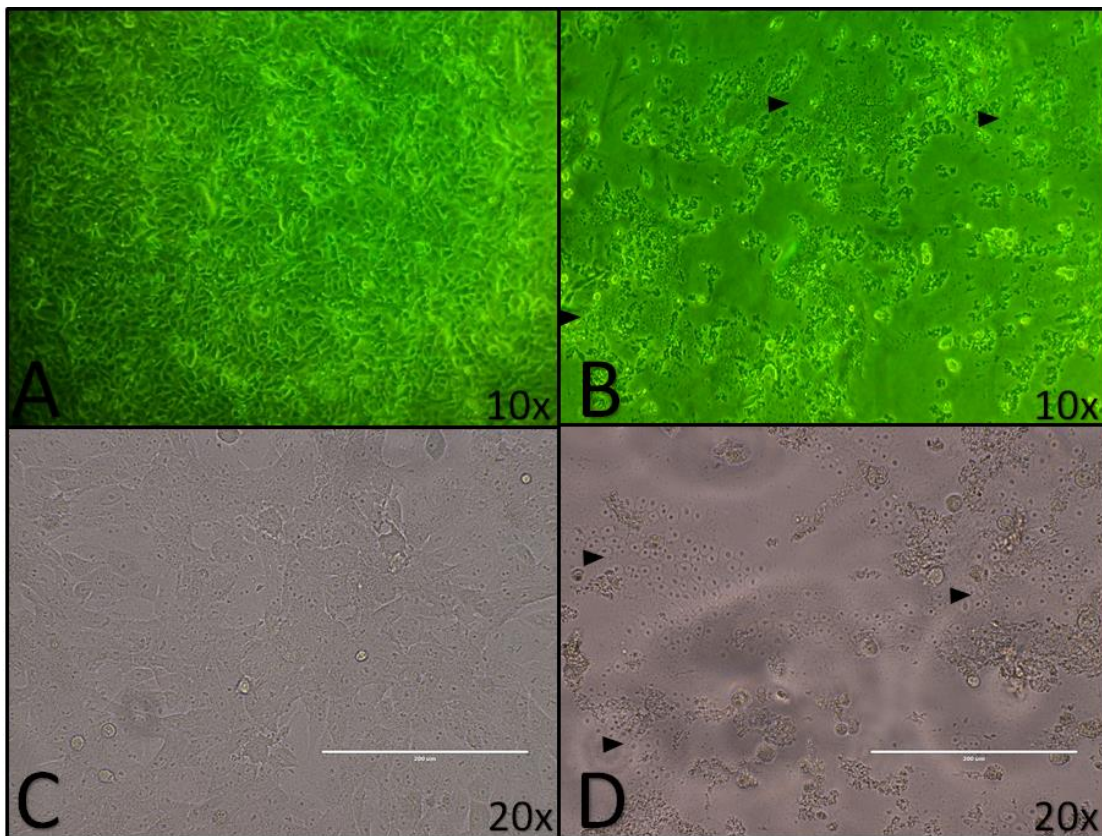


Figura 6. Pase 10 del VDEP en células Vero a las 72 hpi. A y C muestran los controles negativos a diferentes aumentos, B y D muestran la formación de sincitios en el cultivo infectado (cabezas de flecha).

7.3. Aislamiento en células MARC-145.

Después de realizar el aislamiento en las células Vero se procedió a trabajar con las células MARC-145. El quinto pase de las cuatro muestras utilizadas para el aislamiento en estas células fue positivo a RT-PCR. El ECP causado por el virus fue parecido al de las células Vero aunque el grado de fusión celular fue menor (Figura 7).

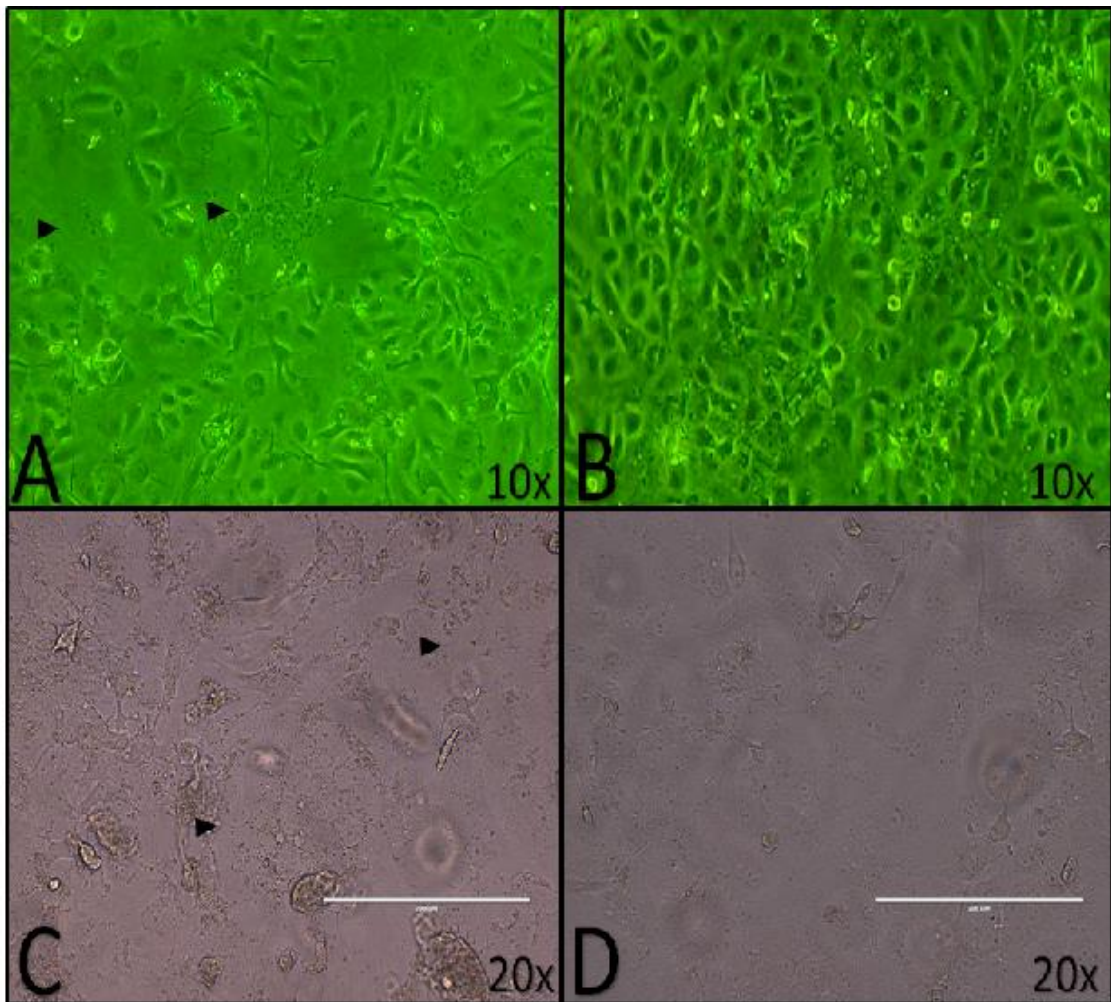


Figura 7. Cultivo de células MARC-145 infectado con VDEP, las cabezas de flecha muestran la fusión celular causada por este virus (A y C), B y D muestran el control negativo (48hpi).

7.4. Aislamiento en células IPEC-J2.

El quinto pase de las cuatro muestras (dos de pulmón y dos de intestino) utilizadas para el aislamiento en estas células fue positivo a RT-PCR, en estas células el ECP predominante fue el desprendimiento (Figura 8).

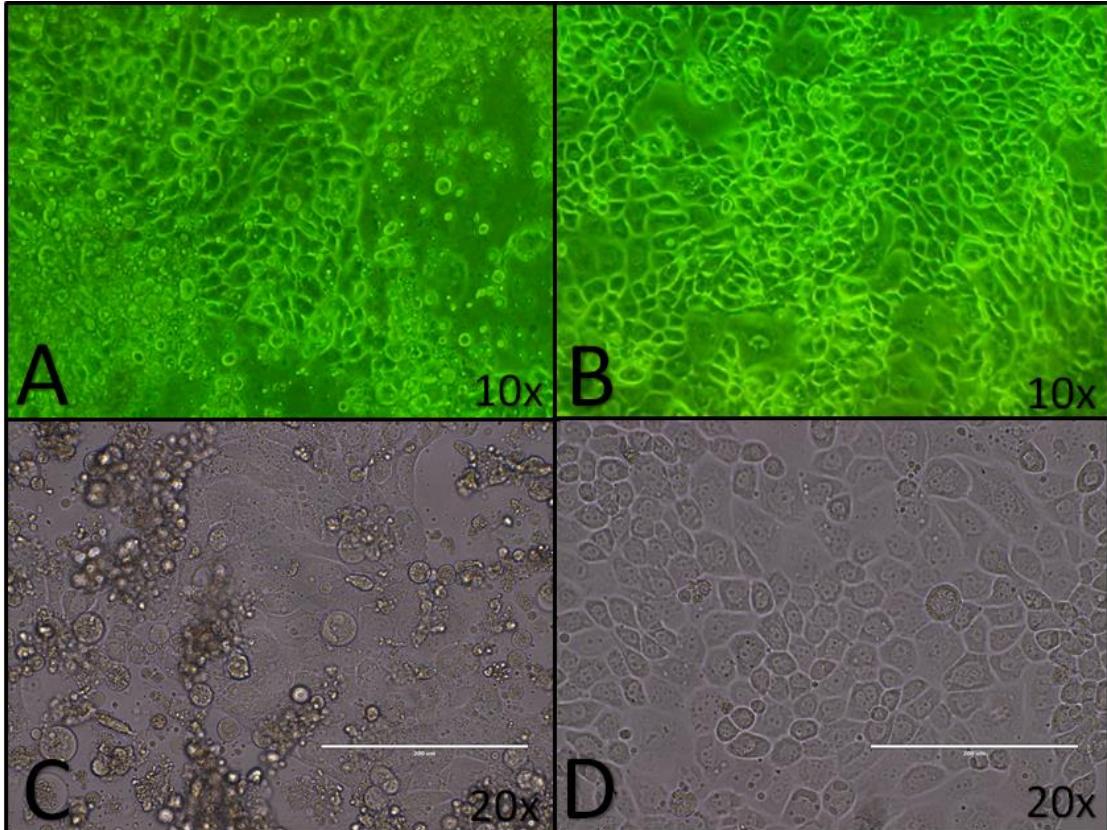


Figura 8. Células IPEC-J2 infectadas con la muestra de Pulmón en el pase 5, la imagen muestra que el desprendimiento celular es mayor en las células infectadas (A y C) a comparación con el control negativo. 48hpi.

Adicionalmente esta línea celular se infectó con el sobrenadante del pase 10 obtenido de las células Vero. Después del cuarto pase se pudo apreciar la formación de sincitios (Figura 9).

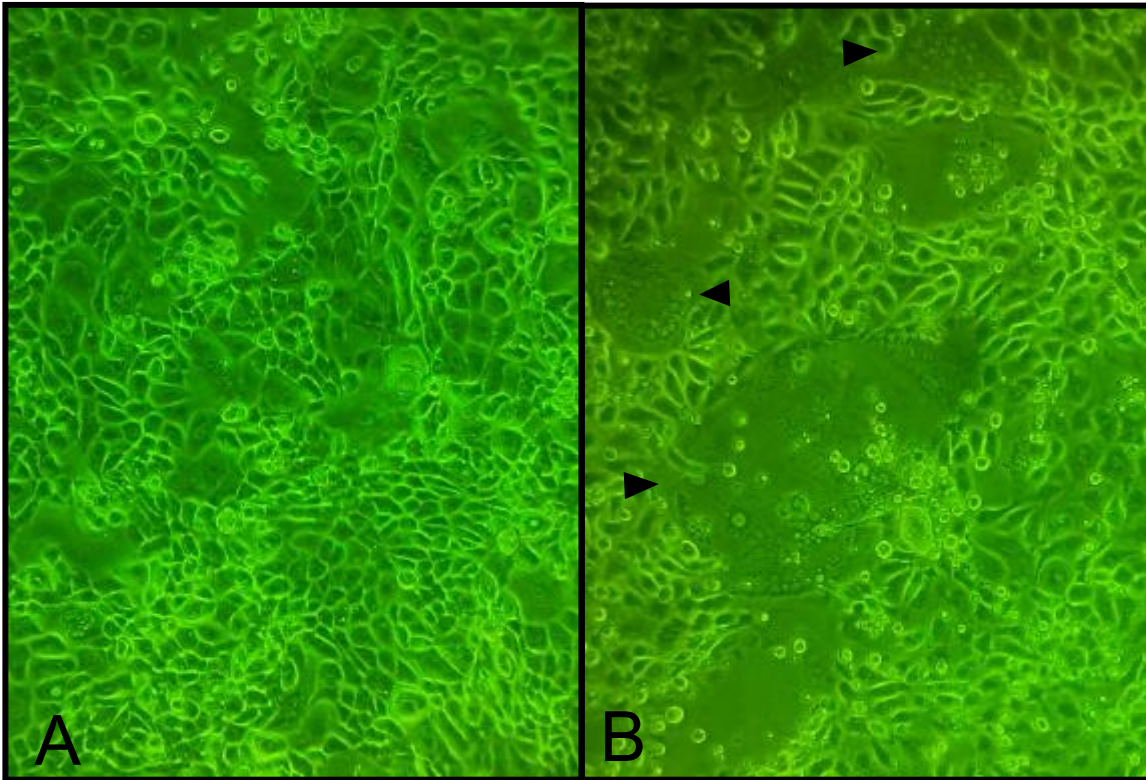


Figura 9. Células IPEC-J2 infectadas con el sobrenadante del pase 10 en células Vero del VDEP (B) y su control negativo (A) a 48hpi. Los cabezas de flecha marcan la formación de sincitios celulares.

7.5. RT-PCR.

Después de cinco pases de cada muestra se realizó RT-PCR para confirmar la presencia del VDEP en los cultivos. En las células Vero, solo el pase 5 del cultivo infectado con uno de los macerados de pulmón resultó positivo. Las células MARC-145 e IPEC-J2 solo se infectaron con cuatro muestras, después de cinco pases en cada línea todas resultaron positivas a este virus por RT-PCR.

7.6. Títulos virales.

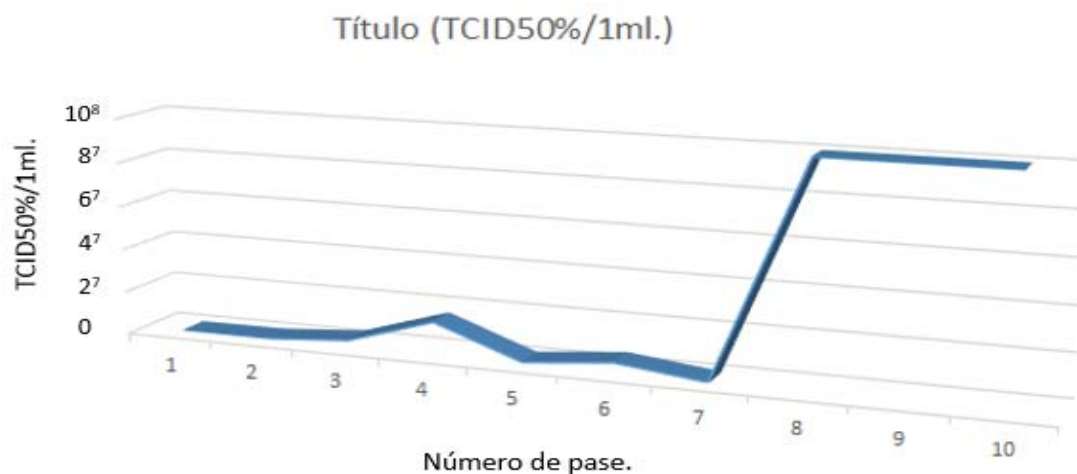
Se calculó el título viral del pase cinco de cada aislamiento positivo al VDEP, el título más alto fue para un aislamiento en células Marc-145 proveniente de una muestra de intestino como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Título viral obtenido del pase 5 en las diferentes líneas celulares utilizadas (DICC_{50%}/ml).

Células	Muestra			
	Pulmón 1	Pulmón 2	Intestino 1	Intestino 2
Vero	1x10 ⁶	-	-	-
Marc-145	1.9x10 ³	4.6x10 ²	2.1x10 ⁹	4.6x10 ²
IPEC-J2	3.1x10 ²	4.6x10 ²	3.1x10 ³	1x10 ⁴

Los pases del virus aislado en células Vero se continuaron hasta el pase 10 para ver el comportamiento del título viral el cual se encontró en un rango entre 1x10⁵ y 1x10⁸ (Figura 10). El título del pase ocho mostró un incremento en comparación con el pase siete que se mantuvo estable hasta el pase 10.

Figura 10. Títulos virales de los diez pases del VDEP obtenidos de macerado de pulmón en células Vero.



Número de pase.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Título (TCID _{50%} /1ml.)	1x10 ⁵	2.6x10 ⁵	3.1x10 ⁵	1.5x10 ⁷	1x10 ⁶	2.7x10 ⁵	2.7x10 ⁵	1x10 ⁸	1x10 ⁸	1x10 ⁸

8. Discusión.

La base del diagnóstico viral es la detección del virus o de sus componentes. El aislamiento del virus era la técnica standard de oro sobre la cual se medían todas las otras pruebas de diagnóstico viral. Sin embargo, hoy en día con el desarrollo de las nuevas técnicas de Biología Molecular ya no es la más sensible. El aislamiento de virus tiene una sensibilidad y una especificidad muy alta, pero es un proceso laborioso y caro que requiere el uso de sistemas de cultivos adecuados para cada virus. Los cultivos celulares son empleados para la propagación de los virus, los de monocapa son los más usados, aunque hay otros sistemas (cultivos en suspensión, explantes, cultivos de órganos, cultivos en microcarriers, etc). El aislamiento de VDEP en cultivo celular es fundamental para el desarrollo de vacunas eficaces que permitan la prevención de la enfermedad, así como la realización de investigación básica y aplicada sobre este agente. Sin embargo, el aislamiento en cultivo celular de este virus ha demostrado ser difícil e incluso el virus aislado puede ser incapaz de mantener la infectividad en otros países en cultivo celular (Chen *et al.*, 2014).

La aparición de VDEP en México reitera la importancia del desarrollo de mejores y más completas estrategias de vigilancia para las enfermedades transfronterizas y extranjeras (Stevenson *et al.*, 2013). Hasta la fecha, en México no hay reportes del aislamiento viral de cepas locales, sólo existen tres reportes de secuencias de genoma completo del VDEP y ocho secuencias parciales de genes S y M del virus (estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, FMVZ, UNAM. Enviado para su publicación en BMC Veterinary research. "Isolation and characterization of porcine

epidemic diarrhea viruses associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: Case report)".

Aunque el aislamiento del VDEP en cultivo celular a partir de muestras clínicas de cerdos infectados de forma natural o experimentalmente es difícil, diversos estudios han mostrado el éxito en el aislamiento y la propagación de varias cepas del VDEP utilizando células Vero suplementando el medio con una proteasa exógena, "tripsina" (Chen *et al.*, 2014, Oka *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015). Las líneas celulares MARC-145 e IPEC-J2, también han sido utilizadas para propagar al VDEP (Lawrence *et al.*, 2014, Jung y Saif, 2015). El incremento de la infectividad viral en los cultivos celulares mediante la adición de una proteasa exógena no es una característica única de VDEP, otro coronavirus, el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARSV por sus siglas en inglés) al igual que VDEP muestran títulos de 100 a 1000 veces mayores cuando se cultivan en presencia de estas enzimas (Belouzard *et al.*, 2012). La tripsina juega un papel importante en la entrada a la célula y la liberación de viriones del VDEP en células Vero ya que estudios *in vitro* han demostrado que contribuye a la replicación y la propagación eficiente del virus a las células vecinas (Shirato *et al.*, 2011, Wicht *et al.*, 2014). La concentración de tripsina más utilizada en el medio de cultivo para el aislamiento de VDEP es de 10 $\mu\text{g/ml}$ aunque se ha reportado que se pueden utilizar concentraciones que van desde 2.5 a 80 $\mu\text{g/ml}$. Aun cuando la tripsina es una enzima que se utiliza rutinariamente para desprender las monocapas de células adherentes y realizar los subcultivos celulares, en este estudio se pudo observar que concentraciones mayores a 5 $\mu\text{g/ml}$ tienen un efecto citotóxico sobre

las células ya que provoca redondeamiento y desprendimiento en la monocapa. Para utilizar concentraciones mayores de esta enzima es necesario dar un tratamiento adicional a las células para evitar el daño causado por esta proteasa lo que dificulta aún más el aislamiento viral (Park *et al.*, 2011, Shibata *et al.*, 2000).

Hofmann y Wiler al describir el aislamiento de VDEP en 1988 realizan cambios del 80% del medio de postinoculación, ellos mencionan que estos cambios son debidos a que la tripsina es una enzima termolábil por lo que su actividad va disminuyendo. Recientemente se ha demostrado que las células Vero inhiben a la tripsina ya que secretan moléculas inhibitoras de esta enzima (Wicht *et al.*, 2014). Actualmente en varios estudios donde se aísla el VDEP no realizan cambios del medio de postinoculación, aunque en este estudio no se realizaron cambios se agregó más medio con tripsina 24 horas después de la inoculación. El título viral obtenido en células Vero no varió al compararlo con otros estudios lo que probablemente sugiere que los cambios de medio o agregar más medio no son necesarios para la replicación del virus.

En nuestro estudio inicialmente se trabajó con células Vero utilizando 10 muestras (tres de pulmón, cuatro de intestino y tres de contenido gástrico) de lechones infectados de forma natural (casos de campo), se realizaron cinco pases ciegos y en el 5º pase se realizó RT-PCR para confirmar la presencia del virus, nuestros resultados mostraron que el aislamiento del VDEP se logró solo a partir de una de las muestras de pulmón en células Vero, en las cuales el virus se propagó de manera eficiente, mostrando ECP caracterizado por la fusión de células infectadas (sincitio o policarión) desde el tercer pase y RT-PCR positivo. La tasa de

aislamiento del VDEP 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, Oka *et al.*, 2014).

En estudios anteriores, se ha reportado el aislamiento viral a partir de contenido intestinal de cerdos infectados de forma natural o inoculados experimentalmente en células Vero, lo que sugiere que las muestras de intestino puede ser la mejor fuente para el aislamiento de virus (Lee *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2014, Kusanagi *et al.*, 1992, Oka *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente estudio no hemos podido aislar al virus a partir de intestino en células Vero, esto pudo haberse debido a diversos factores: la calidad de la muestra, la cantidad de virus infeccioso presente en este tejido y al número de muestras.

El aislamiento del VDEP a partir de la muestra de pulmón es consistente con lo reportado por otros autores que han demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que VDEP es capaz de replicarse en macrófagos alveolares (Park y Shin, 2014, Jung y Saif, 2015).

Los títulos infecciosos virales obtenidos durante los 10 pases en células Vero oscilaron entre 1×10^5 a 1×10^8 DICC₅₀%/ ml. Sin embargo las características de crecimiento variaron entre los pases, en 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 la formación de sincitio que involucraba a toda la monocapa y el desprendimiento celular disminuyó considerablemente. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Lee y colaboradores en 2015 en donde se observa que la cepa KNU-141112 del VDEP mostró efecto citopático hasta el pase

tres alrededor de las 48 hpi. Para esta cepa el título varió de 1.2×10^5 a 6.3×10^7 , siendo este último el título del pase 10 (Lee *et al.*, 2015).

Mientras que en las células MARC-145 e IPEC-J2 solo se intentó el aislamiento a partir de dos muestras de intestino y dos de pulmón (debido a la disponibilidad de las muestras), el ECP observado en estas líneas no fue tan evidente (ya que solo se observó desprendimiento y vacuolización en los pases 1-5), sin embargo el RT-PCR del pase cinco de todas las muestras fue positivo en ambas líneas celulares. La tasa de aislamiento en estas líneas celulares fue del 100%, pero tenemos que considerar que solo se utilizaron dos tipos de muestra. No existen reportes del aislamiento de VDEP en estas células, en ambas solo se ha reportado la propagación de cepas atenuadas en células Vero. Nuestro estudio reporta la posibilidad de que las líneas celulares MARC-145 e IPEC-J2 pueden ser usadas para el aislamiento de VDEP.

En un estudio realizado en 2014 utilizaron la línea celular IPEC-J2 para la propagación de una cepa vacunal del VDEP y el único efecto citopático que observaron fue el desprendimiento celular. Los autores argumentan que este efecto es debido al daño que sufre el citoesqueleto y las uniones intercelulares por la replicación del virus. En este estudio utilizamos muestras de campo para la infección de estas células encontrando al igual que Zhao *et al* que el principal efecto de la replicación del virus fue el desprendimiento celular. Adicionalmente utilizamos para la infección de esta línea celular la cosecha viral del pase 10 en células Vero del VDEP logrando percibir en el cuarto pase la formación de

policariones, efecto que no había sido descrito en esta línea celular (Zhao *et al.*, 2014).

9. Conclusiones.

Aunque el aislamiento del VDEP podría verse afectado por varios factores, que parecen depender de la cantidad de muestras con buena calidad en lugar del tipo de muestras (intestino, contenido gástrico o pulmón) se necesitan más estudios para mejorar la metodología de aislamiento o para determinar los factores que contribuyen a mejorar la tasa de éxito en el aislamiento de VDEP en cultivo celular.

En el presente estudio se logró el aislamiento del VDEP en diferentes líneas celulares, Vero, MARC-145 e IPEC-J2. Mostrando que las tres líneas fueron susceptibles y permisivas a la infección por este virus. El número de aislamientos positivos en las células MARC-145 e IPEC-J2 fue mayor que en las células Vero lo que podría indicar que estas células son las más indicadas para el aislamiento del VDEP. Los títulos virales obtenidos en las células Vero y MARC-145 fueron superiores a los obtenidos en las células IPEC-J2. Las células Vero fueron las únicas donde se desarrollaron sincitios celulares que incluían toda la monocapa lo que indica una mejor propagación del virus en esta línea celular.

10. Referencias.

- ALVAREZ, J., GOEDE, D., MORRISON, R. & PEREZ, A. 2016. Spatial and temporal epidemiology of porcine epidemic diarrhea (PED) in the Midwest and Southeast regions of the United States. *Preventive veterinary medicine*, 123: 155-160.
- ANNAMALAI, T., SAIF, L. J., LU, Z. & JUNG, K. 2015. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 168: 193-202.
- BELOUZARD, S., MILLET, J. K., LICITRA, B. N. & WHITTAKER, G. R. 2012. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4: 1011-33.
- BOSCH, B. J., VAN DER ZEE, R., DE HAAN, C. A. & ROTTIER, P. J. 2003. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of virology*, 77: 8801-8811.
- CHEN, Q., LI, G., STASKO, J., THOMAS, J. T., STENSLAND, W. R., PILLATZKI, A. E., GAUGER, P. C., SCHWARTZ, K. J., MADSON, D., YOON, K. J., STEVENSON, G. W., BURROUGH, E. R., HARMON, K. M., MAIN, R. G. & ZHANG, J. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol*, 52: 234-43.
- DAVIES, P. R. 2015. The dilemma of rare events: Porcine epidemic diarrhea virus in North America. *Preventive veterinary medicine*, 122: 235-241.
- DIEL, D. G., LAWSON, S., OKDA, F., SINGREY, A., CLEMENT, T., FERNANDES, M. H., CHRISTOPHER-HENNINGS, J. & NELSON, E. A. 2016. Porcine epidemic diarrhea virus: an overview of current virological and serological diagnostic methods. *Virus Res*, In press.
- FIELDS, B. N., KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. 2007. *Fields' Virology*, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- HOFMANN, M. & WYLER, R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol*, 26: 2235-9.
- HOU, X. L., YU, L. Y. & LIU, J. 2007. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet Microbiol*, 123: 86-92.
- HUAN, C. C., WANG, Y., NI, B., WANG, R., HUANG, L., REN, X. F., TONG, G. Z., DING, C., FAN, H. J. & MAO, X. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus uses cell-surface heparan sulfate as an attachment factor. *Arch Virol*, 160: 1621-8.
- HUANG, Y. W., DICKERMAN, A. W., PINEYRO, P., LI, L., FANG, L., KIEHNE, R., OPRIESSNIG, T. & MENG, X. J. 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio*, 4: 1-13.
- JUNG, K. & SAIF, L. J. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J*, 204: 134-43.
- KAWASE, M., SHIRATO, K., MATSUYAMA, S. & TAGUCHI, F. 2009. Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *Journal of virology*, 83: 712-721.
- KIM, O. & CHAE, C. 2002. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine epidemic diarrhea virus in pigs. *Can J Vet Res*, 66: 112-6.
- KUSANAGI, K., KUWAHARA, H., KATOH, T., NUNOYA, T., ISHIKAWA, Y., SAMEJIMA, T. & TAJIMA, M. 1992. Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J Vet Med Sci*, 54: 313-8.

- KWEON, C. H., LEE, J. G., HAN, M. G. & KANG, Y. B. 1997. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*, 59: 231-2.
- LAWRENCE, P. K., BUMGARDNER, E., BEY, R. F., STINE, D. & BUMGARDNER, R. E. 2014. Genome sequences of porcine epidemic diarrhea virus: in vivo and in vitro phenotypes. *Genome announcements*, 2: 1-14.
- LEE, C. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology*, 12: 193.
- LEE, S., KIM, Y. & LEE, C. 2015. Isolation and characterization of a Korean porcine epidemic diarrhea virus strain KNU-141112. *Virus Res*, 208: 215-24.
- LI, B. X., GE, J. W. & LI, Y. J. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, 365: 166-72.
- LIU, C., TANG, J., MA, Y., LIANG, X., YANG, Y., PENG, G., QI, Q., JIANG, S., LI, J., DU, L. & LI, F. 2015. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J Virol*, 89: 6121-5.
- LOWE, J., GAUGER, P., HARMON, K., ZHANG, J., CONNOR, J., YESKE, P., LOULA, T., LEVIS, I., DUFRESNE, L. & MAIN, R. 2014. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerg Infect Dis*, 20: 872-4.
- MATSUYAMA, S. & TAGUCHI, F. 2009. Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *Journal of virology*, 83: 11133-11141.
- MÜLLER-ESTERL, W. 2008. *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*, México, Editorial Reverté, S.A.
- OKA, T., SAIF, L. J., MARTHALER, D., ESSEILI, M. A., MEULIA, T., LIN, C. M., VLASOVA, A. N., JUNG, K., ZHANG, Y. & WANG, Q. 2014. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet Microbiol*, 173: 258-69.
- PANEL, E. A. 2014. Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging pig deltacoronavirus. *EFSA J*, 12: 3877.
- PARK, J. E., CRUZ, D. J. & SHIN, H. J. 2011. Receptor-bound porcine epidemic diarrhea virus spike protein cleaved by trypsin induces membrane fusion. *Arch Virol*, 156: 1749-56.
- PARK, J. E., CRUZ, D. J. & SHIN, H. J. 2014. Clathrin- and serine proteases-dependent uptake of porcine epidemic diarrhea virus into Vero cells. *Virus Res*, 191: 21-9.
- PARK, J. E. & SHIN, H. J. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages. *Virus Res*, 191: 143-52.
- SAGARPA. 2016. *Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos*.
- [Online]. Available: dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5436016&fecha=04/05/2016.
- SHIBATA, I., TSUDA, T., MORI, M., ONO, M., SUEYOSHI, M. & URUNO, K. 2000. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet Microbiol*, 72: 173-82.
- SHIRATO, K., MATSUYAMA, S., UJIKE, M. & TAGUCHI, F. 2011. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J Virol*, 85: 7872-80.
- SIMMONS, G., REEVES, J. D., RENNEKAMP, A. J., AMBERG, S. M., PIEFER, A. J. & BATES, P. 2004. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 4240-4245.

- SONG, D., MOON, H. & KANG, B. 2015. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res*, 4: 166-76.
- SONG, D. S., OH, J. S., KANG, B. K., YANG, J. S., MOON, H. J., YOO, H. S., JANG, Y. S. & PARK, B. K. 2007. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res Vet Sci*, 82: 134-40.
- SPAAN, W., CAVANAGH, D. & HORZINEK, M. 1988. Coronaviruses: structure and genome expression. *Journal of General Virology*, 69: 2939-2952.
- STEVENSON, G. W., HOANG, H., SCHWARTZ, K. J., BURROUGH, E. R., SUN, D., MADSON, D., COOPER, V. L., PILLATZKI, A., GAUGER, P., SCHMITT, B. J., KOSTER, L. G., KILLIAN, M. L. & YOON, K. J. 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest*, 25: 649-54.
- STURMAN, L. S., RICARD, C. & HOLMES, K. 1985. Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *Journal of virology*, 56: 904-911.
- SUN, M., MA, J., WANG, Y., WANG, M., SONG, W., ZHANG, W., LU, C. & YAO, H. 2015. Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of porcine epidemic diarrhea virus in Asia. *J Clin Microbiol*, 53: 1484-92.
- WANG, K., LU, W., CHEN, J., XIE, S., SHI, H., HSU, H., YU, W., XU, K., BIAN, C., FISCHER, W. B., SCHWARZ, W., FENG, L. & SUN, B. 2012. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett*, 586: 384-91.
- WICHT, O., LI, W., WILLEMS, L., MEULEMAN, T. J., WUBBOLTS, R. W., VAN KUPPEVELD, F. J., ROTTIER, P. J. & BOSCH, B. J. 2014. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. *J Virol*, 88: 7952-61.
- ZHAO, S., GAO, J., ZHU, L. & YANG, Q. 2014. Transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus infection induces dramatic changes in the tight junctions and microfilaments of polarized IPEC-J2 cells. *Virus Res*, 192: 34-45.
- ZHU, X., LIU, Q., DU, L., LU, L. & JIANG, S. 2013. Receptor-binding domain as a target for developing SARS vaccines. *J Thorac Dis*, 5 Suppl 2: 1-8.

Anexo I. Índice de Tablas y Figuras.

	Pagina
Tabla 1. Mezcla de reacción para el RT-PCR.....	21
Tabla 2. Iniciadores que amplifican el gen M del VDEP.....	22
Tabla 3. Condiciones para el RT-PCR utilizados para amplificar una región del gen M del VDEP.....	23
Tabla 4. Título viral obtenido del pase 5 en las diferentes líneas celulares utilizadas (DICC _{50%} /ml).....	29
Figura 1. Árbol filogenético de 219 cepas de VDEP.....	5
Figura. 2 Representación del genoma de VDEP basado en la cepa CV777.....	6
Figura 3. Representación esquemática del ciclo de replicación del VDEP.....	13
Figura 4. Diferentes concentraciones de tripsina utilizadas en células Vero.....	24
Figura 5. Células Vero infectadas con el sobrenadante del pase 6 del VDEP.....	24
Figura 6. Pase 10 del VDEP en células Vero.....	25
Figura 7. Cultivo de células MARC-145 infectado con VDEP.....	26
Figura 8. Células IPEC-J2 infectadas con el VDEP.....	27
Figura 9. Células IPEC-J2 infectadas con el sobrenadante del pase diez en células Vero del VDEP.....	28
Figura 10. Gráfica de los títulos virales de los 10 pases del VDEP obtenidos de macerado de pulmón.....	30

Anexo II. Materiales y reactivos.

1. Kit PED/Rota Ag Test Kit. Bionote®, Cat. No: RG 14-05.
2. Kit TGE/PED Ag Test Kit. Bionote®, Cat. No: RG 14-05.
3. TRIzol® Reagent. Life technologies®, Cat. No: 15596-026.
4. Kit OneStep RT-PCR. QIAGEN®, Cat. No: 210212.
5. Filtro 0.22 µm. Millex®, Cat. No: SLGP033RB.
6. DMEM. Gibco®, Cat. No: 12800-058.
7. Tripsina. Gibco®, Cat. No: 27250018.
8. Suero fetal bovino. Sigma®, Cat. No: F2442.
9. Penicilina/ estreptomicina. Gibco®, Cat. No: 15140122.
10. Placas de 96 pozos para cultivo celular. Eppendorf®, Cat. No: 0030730011.
11. Placas de 6 pozos para cultivo celular. Eppendorf®, Cat. No: 0030720016.
12. Tubos 1.5 ml. Eppendorf®, Cat. No: T9661.
13. Tubos 15 ml. Nara Biotec®, Cat. No: NR-30215.

Anexo III. Abreviaturas.

1. APN: Aminopeptidasa N porcina.
2. CEIEPP: Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina
3. DEP: Diarrea Epidémica Porcina
4. DICC: Dosis infectiva en cultivo celular.
5. DEPC: dietil piro carbonato
6. DMEM: medio de cultivo esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
7. DMEM/Trip/Antb: medio de cultivo esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco/ Tripsina/ Antibiotico.
8. ECP: Efecto citopático.
9. ELISA: Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas.
10. FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
11. h: horas.
12. hpi: horas postinoculación.
13. min: minutos.
14. ml: mililitro.
15. OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal
16. ORF: Marco de lectura abierto.
17. PRRSV: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo.
18. PBS: Buffer fosfato salino.
19. qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real.
20. RNA: Ácido desoxirribonucleico.
21. RNAm: Ácido desoxirribonucleico mensajero.
22. RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
23. SFB: Suero fetal bovino.
24. seg: segundos.
25. UNAM: Universidad nacional Autónoma de México.
26. UTR: Región no traducible.
27. VDEP: Virus de la Diarrea Epidémica Porcina.
28. VGET: Virus de la Gastroenteritis Transmisible.