

# AISLAMIENTO DE ROTAVIRUS BOVINO EN CULTIVOS CELULARES DE RIÑÓN FETAL BOVINO

Por M. Alvarez (1)  
M. Fernández (1)  
P. Cármenes (1)

## INTRODUCCION

Los rotavirus tienen una distribución mundial, habiendo sido identificados con gran frecuencia como agentes causantes de diarrea en el hombre y en las principales especies animales domésticas, además de en un importante número de especies silvestres. En los últimos años se ha constatado una gran variabilidad antigénica dentro de los rotavirus, por ello su aislamiento en cultivos celulares es fundamental para poder caracterizarlos serológicamente y así poder conocer los serotipos que afectan a las diferentes especies y su distribución geográfica.

En este trabajo se estudia el efecto citopático de los rotavirus sobre cultivos celulares de riñón fetal bovino y se comunica el aislamiento de rotavirus a partir de muestras fecales de terneros afectados de diarrea.

## MATERIAL Y METODOS

### *Estudio del efecto citopático (ECP).*

Cultivos celulares de riñón fetal bovino (RFB).— Riñones de fetos bovinos fueron recogidos en el matadero y trasladados al laboratorio en una solución salina fosfatada suplementada con 10 % de suero de ternero y antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomina 100 µg/ml y nystatina 50 U/ml). Para la obtención de cultivos celulares primarios y/o secundarios de RFB se han utilizado métodos convencionales<sup>7</sup>. Como medio de crecimiento (MC) se utilizó la solución salina de Hanks complementada con hidrolizado de lactoalbúmina (0,5 %), extracto de levadura (0,05 %), suero de ternera (10 %) y antibióti-

(1) Cátedra de Enfermedades Infecciosas y Epizootiología

cos en la concentración antes citada. Como medio de mantenimiento (MM) se usó la solución salina de Earle suplementada con 5 % de hidrolizado de lactoalbúmina y los antibióticos ya señalados.

**Cepa de virus.**— Se empleó una cepa de rotavirus aislada de ternero, que había experimentado 16 pases en RFB, cedida amablemente por el Dr. Gagliardi del Instituto Zootecnico Sperimentale delle Venezie, Padova (Italia). Después de un pase en cultivos celulares de RFB, se procedió a la producción de virus semilla. Para ello, se infectaron monocapas de RFB crecidas en frascos Roux, previamente lavadas con PBS, con virus resuspendido en medio de mantenimiento en el que se incluían 10  $\mu$ g de tripsina (DIFCO 1:250) por ml (MMT), durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavó la monocapa y se añadió MMT.

Cuando el efecto citopático alcanzó al 80–90 % del tapiz celular, se procedió por tres veces a su congelación y descongelación. Tras una centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se distribuyó en alícuotas y se congeló a –20 °C.

**Titulación vírica.**— Se llevó a cabo en cultivos celulares de RFB crecidos en tubos (160x16 mm.). A partir del virus semilla se efectuaron diluciones factor 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) en MMT. Previo lavado con PBS, se inoculó 1 ml de cada dilución por tubo de cultivo, usándose tres tubos por dilución. En cada titulación se incluyeron tubos testigos de células y de virus. Los tubos se mantuvieron en rotación a 37°C, realizándose lecturas diarias durante una semana. El título final  $DI_{50}$  CC se halló por el método de Kärber. Asimismo, se realizaron titulaciones paralelas con MM sin tripsina.

Para el estudio del ECP, cultivos celulares de RFB, crecidos en tubos Leighton provistos de cubreobjetos, se infectaron con 0,1 ml de virus semilla ( $10^6$  partículas víricas) durante 1 hora a 37°C. Tras tres lavados con MM, a cada tubo se le añadió 1 ml de MMT. A las 24, 48 y 72 horas post-infección, los cubreobjetos fueron teñidos por la técnica May-Grünwald-Giemsa <sup>11</sup>.

#### *Aislamiento a partir de muestras de campo.*

El aislamiento de rotavirus en cultivos celulares de RFB se realizó a partir de muestras de heces procedentes de 4 terneros afectados de diarrea. La identificación de los rotavirus se efectuó mediante microscopía e inmunomicroscopía electrónicas del modo que se describe a continuación.

**Microscopía electrónica (ME).**— Las heces se resuspendieron (1:5) en PBS, se homogeneizaron con un agitador mecánico a 2.000 rpm durante 2 minutos y se centrifugaron a 8.000 g durante 30 minutos. Los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 100.000 g durante 1 hora y, posteriormente, se resuspendió el sedimento en agua.

Se emplearon rejillas de cobre de 150 mesh recubiertas con una capa de colodión y carbón evaporado. Para la tinción negativa se utilizó fosfungstato potásico (2 %) pH 6,8. Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico Jeol CX-100.

**Inmunomicroscopía electrónica (IME).**— Las muestras fueron tratadas de igual manera que para ME. Posteriormente se mezclaron cantidades iguales del sedimento ultracentrifugado y de un suero específico antirrotavirus (serotipo NCDV) (Instituto Behring). Tras su homogeneización por agitación la mezcla se incubó a 4°C durante 14 horas. Transcurrido este tiempo se añadió 1 ml de PBS y se realizó una nueva ultracentrifugación a 40.000 g durante 1 hora. El nuevo sedimento se resuspendió en agua destilada. A continuación se realizó la tinción negativa y su observación al microscopio electrónico.

Preparación del inóculo para el aislamiento en RFB.— Las muestras de heces se resuspendieron (1:5) en PBS, se homogeneizaron en un agitador mecánico a 2.000 rpm durante 2 minutos y se centrifugaron a 10.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró (Millipore 0,45) y se ultracentrifugó a 100.000 g durante 1 hora. El sedimento se resuspendió en MM con 50  $\mu$ g de tripsina/ml, manteniéndose a 37°C durante 1 hora, posteriormente se diluyó con MM hasta obtener una concentración final de tripsina de 10  $\mu$ g/ml. Monocapas de RFB crecidas tanto en tubos Leighton provistos de cubreobjetos como en tubos de 160x16 mm, previamente lavados con MM, se mantuvieron con MMT durante 1 hora a 37°C, añadiéndose a continuación el inóculo, que se mantuvo en contacto con las células durante 1 hora a 37°C. En el transcurso del tiempo de infección los tubos fueron periódicamente movidos ligeramente con la mano. Inmediatamente después se lavaron una vez con MMT y se adicionó 1 ml de MMT por tubo. Los Leighton se incubaron a 37°C en posición estática y los tubos de 160x16 mm en rotación. A intervalos de 7 días se realizaron otros tres pases sucesivos. La evolución de la infección fue seguida por inmunofluorescencia directa.

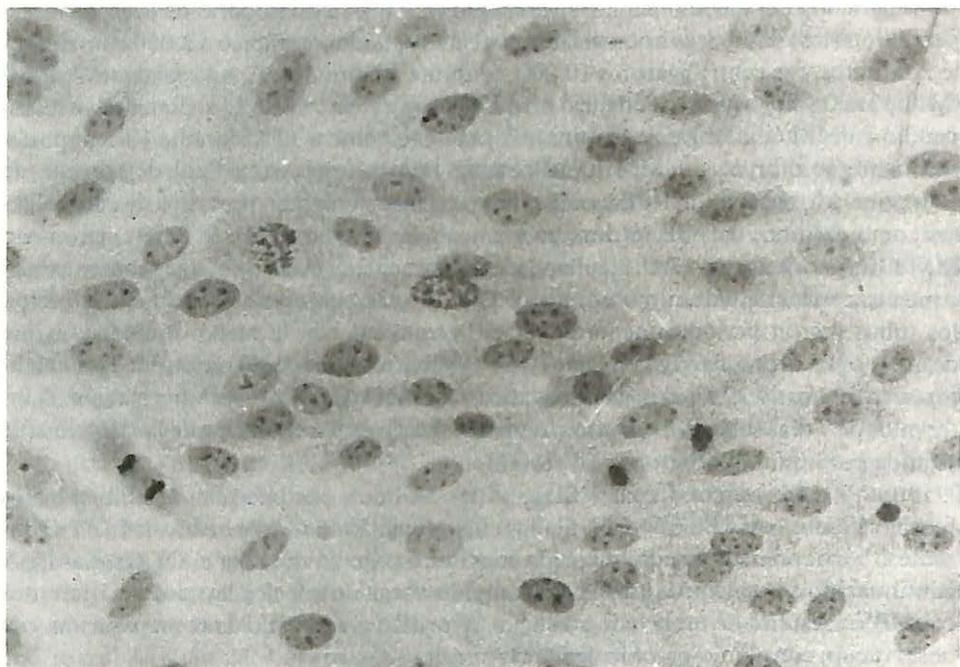
Inmunofluorescencia directa (IFD).— A las 24 horas postinfección los cubreobjetos fueron lavados con PBS (pH 7,2), fijados en acetona (5 minutos) e incubados a 37°C durante 1 hora con un antisuero marcado con fluoresceína (cedido por el Dr. Gagliardi). A continuación se realizaron tres lavados rápidos, seguidos de dos lavados de 5 minutos con PBS. Después de un lavado con agua, se realizó el montaje de la preparación y su observación con el microscopio de fluorescencia.

## RESULTADOS

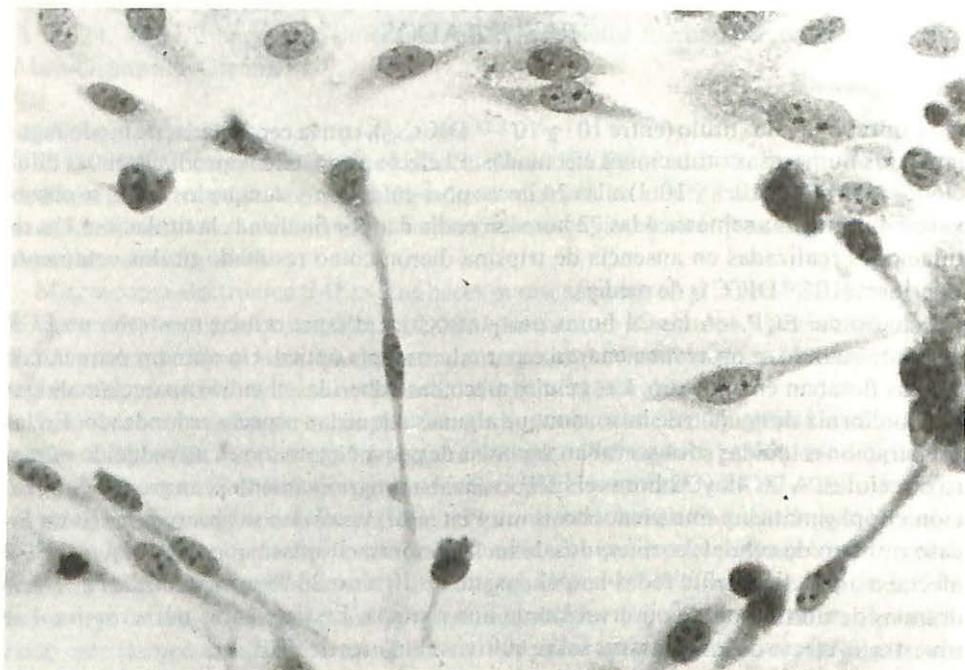
Se obtuvo un alto título (entre  $10^7$  y  $10^{7.25}$  DICC<sub>50</sub>), con la cepa citada, de modo regular en las numerosas titulaciones efectuadas. El efecto citopático se producía en las diluciones más bajas ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) a las 24 horas post-infección y aunque los tubos se observaron durante una semana, a las 72 horas se podía dar por finalizada la titulación. Las titulaciones realizadas en ausencia de tripsina dieron como resultado títulos netamente inferiores ( $10^{5.5}$  DICC<sub>50</sub> de media).

Estudio del ECP.— A las 24 horas post-infección, el tapiz celular mostraba un ECP evidente cuando se observaba en fresco por microscopía óptica. Un número pequeño de células flotaban en el medio. Las células afectadas adheridas al vidrio aparecían alargadas con forma de aguja o de huso, aunque algunas adquirían aspecto redondeado. En las preparaciones teñidas se observaban vacuolas de pequeño tamaño en un reducido número de células. A las 48 y 72 horas el ECP avanzaba progresivamente, con gran vacuolización citoplasmática y una picnocitosis muy intensa. Asimismo se observaron, en un escaso número de células, corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos. Aunque el ECP afectaba a prácticamente todas las células, de un 10 a un 20 % seguían unidas al vidrio después de un tiempo de observación de una semana. En las figuras números 1 a 4 se muestra el efecto de los rotavirus sobre cultivos celulares de RFB.

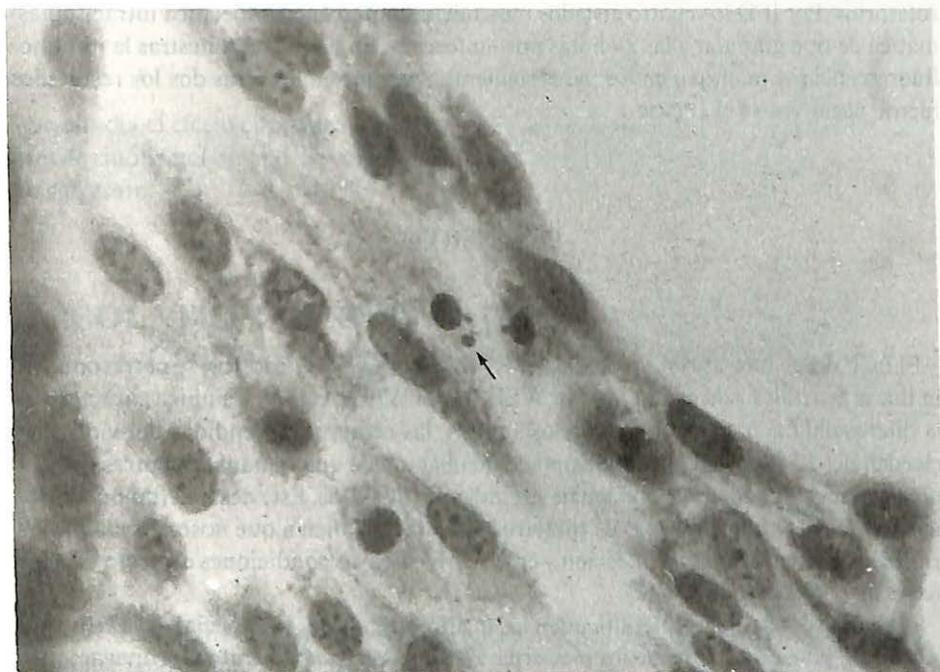
Aislamiento a partir de muestras fecales.— Por microscopía óptica en fresco, no se evidenció ECP en ninguno de los tres pases realizados ni en los cultivos estáticos ni en los



*Fig. 1.- Cultivo celular de RFB sin infectar (100X)*



*Fig. 2.- Alargamiento celular; 24 horas post-infección (100X)*



*Fig. 3.- Corpúsculo intracitoplasmático: 48 horas post-infección (450X)*



*Fig. 4.- Intensa vacuolización celular: 72 horas post-infección (450X)*

rotatorios. Por IFD los cuatro aislados mostraban fluorescencia específica intracitoplasmática de tipo granular a las 24 horas post-infección. En dos de las muestras la inmunofluorescencia se mantuvo en los pases siguientes, aunque en las otras dos los resultados fueron negativos en el 2º pase.

## DISCUSION

El ECP de los rotavirus sobre células de RFB observado por nosotros, se correspondió, en líneas generales, con el descrito por WELCH y TWIEHAUS<sup>13</sup>. La única característica diferencial fue que, según los citados autores, las células desprendidas del vidrio no exceden del 50 % después de un tiempo de incubación de una semana, mientras que según nuestros resultados este porcentaje se elevó a un 80-90 %. Este desacuerdo puede deberse o bien al empleo de cepas de rotavirus distintas y/o bien a que nosotros añadimos tripsina en el momento de la infección y en el MM, en cuyas condiciones el efecto citopático es mayor y se produce antes.

La adición de enzimas proteolíticos en los medios de cultivo, en especial de la tripsina, aumenta el poder infectante de los rotavirus, facilitando su aislamiento y propagación<sup>1</sup>. En el presente trabajo se obtuvo un título casi 100 veces superior cuando la tripsina (10 µg/ml) estaba presente en el MM. Se han emitido diversas teorías sobre su mecanismo de acción<sup>1</sup>, siendo en la actualidad la más aceptada, el que la tripsina actúa sobre un polipéptido estructural glicosilado de la capa externa de la cápsida, escindiéndolo en dos de menor peso molecular y haciendo que las partículas adquieran capacidad infectante<sup>5</sup>.

Para el aislamiento, en cultivos celulares de RFB, se partió de muestras fecales líquidas en las que, por ME, se observaban partículas rotavíricas completas, ya que la capa externa de la cápsida está ligada al poder infectante del virus<sup>2</sup>. Asimismo, las 4 cepas de rotavirus pertenecían al serotipo NCDV, puesto que, por IME, todas ellas fueron aglutinadas por el suero específico.

La IFD fue positiva, en el aislamiento primario, con las cuatro muestras fecales estudiadas (100 %). Resultados parecidos han sido obtenidos por otros autores<sup>3, 6, 9</sup>. Con dos de los aislados, la fluorescencia se observó en los dos pases siguientes, lo que indica la replicación del virus, sin embargo, no se evidenció ECP ni en los cultivos celulares estáticos ni en los rotatorios.

Aunque se ha conseguido el aislamiento y adaptación de cepas de rotavirus con capacidad citopática sobre cultivos celulares de RFB, ello ha sido únicamente posible después de múltiples pases ciegos<sup>10, 12</sup>.

Es nuestra intención adaptar las dos cepas rotavíricas aisladas, en la línea celular MA-104 donde el ECP es más evidente que en RFB<sup>4, 8</sup>.

## RESUMEN

Se estudia el efecto citopático de los rotavirus, aislados de bovino, sobre cultivos celulares de riñón fetal bovino. Se comunica el aislamiento de rotavirus bovino sobre el mismo sustrato.

## ISOLATION OF BOVINE ROTAVIRUSES ON CELL CULTURES OF BOVINE FETAL KIDNEY

### SUMMARY

It was studied the cytopathic effect of rotaviruses isolated from bovine on cell cultures of bovine fetal kidney. The isolation of bovine rotaviruses on the same cell substrate is reported.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) BABIUK, L. A., MOHAMMED, K. A., SPENCE, L., FAUVEL, M. y PETRO, R. (1977).- Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *J. Clin. Microbiol.*, 61:610-617
- 2) BRIDGER, J. C. (1979).- Location of type-specific antigens in calf rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 8:625-628.
- 3) BRIDGER, J. C. y WOODS, G. N. (1975).- Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Br. vet. J.*, 131:528-535.
- 4) CASTRUCCI, G., FERRARI, M., FRIGERI, F., CILLI, V., DONELLI, G., ANGELILLO, G. y BRUGGI, M. (1983).- A study of cytopathic rotavirus strains isolated from calves with acute enteritis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 6: 253-264.
- 5) CLARK, S. M., ROTH, J. R., CLARK, M. L., BARNETT, B.B. y SPENDLOVE, R. S. (1981).- Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanism of enhancement. *J. Virol.*, 39: 816-882.
- 6) ELLENS, D. J., LEEUW, P. W. DE, STRAVER, P. J. y BALKEN, J. A. VAN. (1979).- Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigens in calf faeces. *Med. Microbiol. Immunol.*, 166: 157-163.
- 7) HSIUNG, G. D. (1964).- *Diagnostic Virology*. New Haven and London, Yale University Press.
- 8) KARALAMBIEV, KH. E., GEORGIEV, G. K., BOSTANDZHIEVA, R. y MITOV, B. (1984).- Isolation of cytopathic strains of bovine rotavirus. *Vet. Med. Nauki*, 21: 3-8. En *Vet. Bull.*, 54: 750.
- 9) McNULTY, M. S., ALLAN, G. M. y McFERRAN, J. B. (1977).- Cell culture studies with a cytopathic bovine rotavirus. *Arch. Virol.*, 54: 201-209.
- 10) MEBUS, C. A., KONO, M., UNDERDAHL, N. R. y TWIEHAUS, M. J. (1971).- Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can. Vet. J.*, 12: 69-72.
- 11) MERCHANT, D. J., KAHN, R. H. y MURPHY, W. H. (1964).- *Cell and organ culture*. Burgess Publishing Company, Minnesota, E.E.U.U.
- 12) THEODORIDIS, A., PROZESKY, L. y ELS, H. J. (1979).- The isolation and cultivation of calf rotavirus in the Republic of South Africa. *J. Vet. Res.*, 46: 65-69.
- 13) WELCH, A. B. y TWIEHAUS, M. J. (1973).- Cell culture studies of a neonatal calf diarrhea virus. *Can. J. Comp. Med.*, 37: 287-294.