



Identificación del calicivirus felino en Chile, *Caliciviridae*¹

Luz Cerda M.V.² luz.cerda@sag.gob.cl

Tamara Muñoz³ tamilok54@gmail.com

Guillermo Quinteros M.V.⁴ guillermo.quinteros@sag.gob.cl

Alfonso García M.V.² alfonso.garcia@sag.gob.cl

Introducción

El objetivo de este estudio fue identificar el calicivirus felino a partir de aislados virales de origen felino, provenientes de animales que presentaron sintomatología de enfermedad respiratoria, en los que previamente se había identificado herpes virus felino-1 (HVF-1), patología que comúnmente actúa en concomitancia con el calicivirus felino. Para ello se utilizaron células CRFK (corteza renal felina), con el objeto de aumentar la carga viral evidenciada microscópicamente por un efecto citopático, y titulación de la cepa. La identificación del agente viral se realizó mediante técnicas de microscopía electrónica, y determinación de características morfométricas del virus, además de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por amplificación del RNA.

Materiales y métodos

Este trabajo se llevó a cabo entre los años 2007 y 2008 en los laboratorios de Virología, Cultivos Celulares y Biotecnología del SAG y en la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de Chile, donde se realizó la microscopía electrónica.

Se trabajó con cinco muestras de campo de secreciones e hisopados de mucosa nasal, orofaríngea y ocular de gatos con enfermedad respiratoria y ocular severa, en los cuales se aisló previamente el HVF-1, y se sospechaba la presencia de calicivirus felino. Estas muestras fueron procesadas e inoculadas en células CRFK, con tres o más inoculaciones sucesivas en cada una de las muestras. Se sembró una concentración de 600.000 células/ml en placas de cultivo de 24 pocillos, las que se incubaron por 24 h con medio de crecimiento MEM con un 10% de suero fetal bovino y gentamicina en dosis de 80 µg/ml y 5 µg/ml de anfotericina B. Transcurrido el tiempo, se eliminó el medio de cultivo y se lavó el tapete celular con solución buffer (PBS) estéril. Considerando la presencia del HVF

¹ Extracto de la tesis para optar al título de Médico Veterinario. Alumna: Tamara Muñoz. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad Santo Tomás.

² Subdepartamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Lo Aguirre. Servicio Agrícola y Ganadero.

³ Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad Santo Tomás.

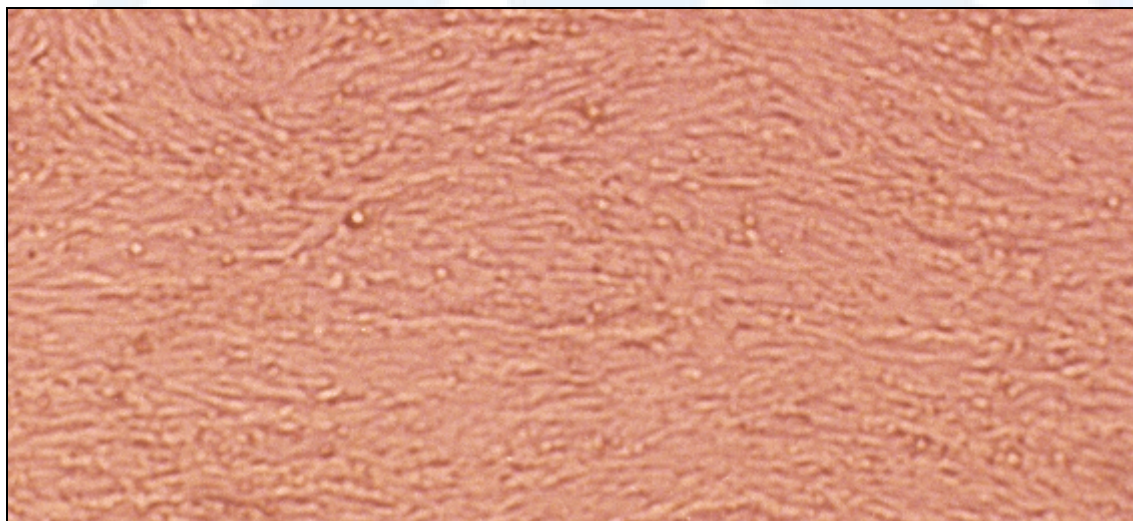
⁴ Subdepartamento de Defensa Pecuaria. División de Protección Pecuaria. Servicio Agrícola y Ganadero.

presente en las muestras del ensayo, previamente se debió neutralizar su acción con suero antiespecífico, a fin de dejar expresar la acción del calicivirus en las células CRFK.

Como control positivo del calicivirus se utilizó cepa vaccinal contenida en el biológico polivalente comercial, la cual se enfrentó previamente a sueros hiperinmunes antiespecíficos contra HVF-1 y panleucopenia felina (PF), empleando para este último virus, un suero antiparvovirus canino, basándose en la reacción cruzada con el virus de la PF, puesto que ambas entidades pertenecen a la familia Parvoviridae, capaz de neutralizar su acción.

Se inocularon 100 µl de cada una de las muestras por pocillo junto con 50 µl de suero hiper anti HVF y parvovirus canino.

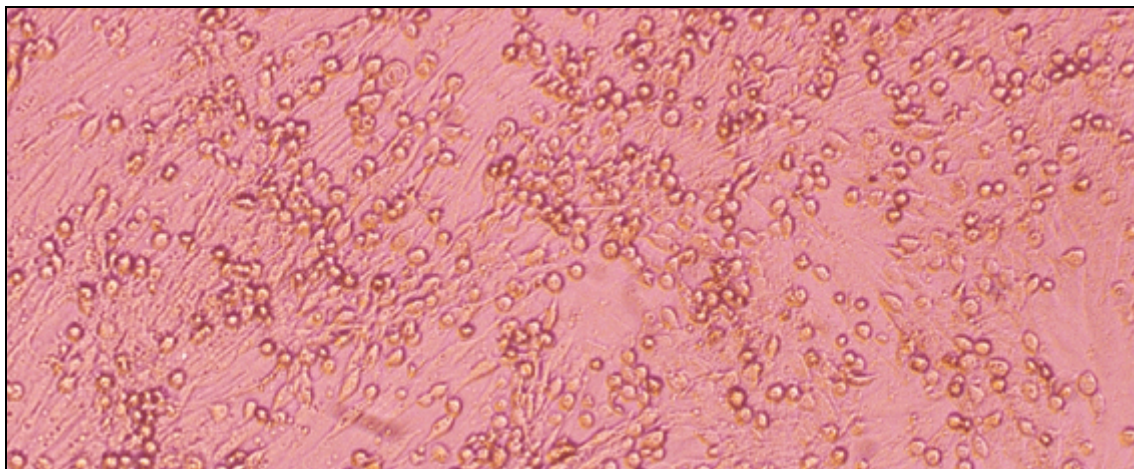
Los controles considerados fueron: un control de células como control negativo, un control de virus cepa de referencia ATCC herpes felino, un control de virus cepa calicivirus vaccinal neutralizado con sueros hiper antiespecífico contra HVF y PF, empleando para este último, suero anti-PVC.



Cultivo celular como control negativo
Fotografía: Dra. Luz Cerda

Las muestras inoculadas en la placa de 24 pocillos y los controles se llevaron a una estufa de cultivo a 37 °C, con una atmósfera de 5% de CO₂ y 97% de humedad relativa por una hora, con el objeto de producir la adsorción del virus a la célula.

Transcurrido el tiempo señalado, se procedió a eliminar el sobrenadante inoculado, se les añadió medio de mantención Mem con 2% de suero fetal bovino, más gentamicina y anfotericina B en las concentraciones anteriormente indicadas. Se incubaron por espacio de 36 a 72 h y se observaron diariamente empleando un microscopio invertido a distintas horas de incubación, hasta observar la aparición de daño en el estrato celular por la acción del virus contenido en las muestras en estudio. La determinación de este daño se realizó por comparación del efecto citopático originado en el control positivo de calicivirus cepa vaccinal en las células CRFK, previamente neutralizado para el HVF y PF.



Efecto citopático del virus en cultivo celular CFR
Fotografía: Dra. Luz Cerda

Una vez obtenidos los aislados virales de cada una de las muestras sospechosas, se seleccionaron las más representativas, producto del efecto citopático evidente. Éstos se inocularon en placas de seis pocillos y su finalidad fue lograr una mayor concentración de virus. Posteriormente se conservaron congeladas a -80 °C.

Producido el aislamiento del agente mediante la observación microscópica de la acción del calicivirus en las células CRFK, éste se replicó por inoculaciones sucesivas y se logró una concentración adecuada para desarrollar las pruebas de RT-PCR y microscopía electrónica.

Para la realización de la PCR, se seleccionaron 3 muestras en estudio junto con la vacuna comercial triple felina.

Para la extracción de ARN se utilizó el kit Qiagen RNeasy y para la conversión del RNA viral a DNAc el kit Geneamp Gold RNA, el cual transforma RNA a DNAc gracias a la acción de la transcriptasa reversa y se realizó la primera PCR. Posteriormente las muestras fueron sometidas a una segunda PCR, sin la transcriptasa reversa y con el segundo par de primers, cuya utilidad es formar parte de la PCR interna o también llamada nested-PCR. Con este resultado final, se agregó a las muestras bromuro de etidio y azul de bromoferol y se cargaron en un gel de agarosa en la cámara de electroforesis conectada a corriente eléctrica de 80 v. Después de transcurridos 40 minutos se evaluó la presencia de productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. Como control y análisis de las bandas amplificadas se fotografió el gel en el transiluminador.

En la microscopía electrónica se seleccionaron dos de las muestras que fueron positivas a la prueba de PCR; se descongelaron y se volvieron a congelar tres veces sucesivas, a fin de producir la ruptura celular y la liberación del virus. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas dos veces a 3.000 RPM, durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se llevó a ultracentrifugación a 26.000 RPM, por 30 min a 4 °C. Se eliminó el pellet que contiene restos celulares y partículas de mayor peso molecular y el sobrenadante se diluyó en agua bidestilada 1:5.

Se extrajeron 25 µl y se depositaron en una grilla de cobre de 200 mesh, cubierta por una lámina de parlodeón, sobre ésta se adicionaron 25 µl de tinción acetato de uranilo al 2%. Posteriormente la grilla se observó al microscopio electrónico. Se tomaron fotografías a 98.000 x y 150.000 x, donde se reconocieron partículas que se observaron repetidamente, especialmente en las zonas donde se encontraban cúmulos de restos celulares, algunas se visualizaron sueltas y con un mínimo espacio entre ellas y otras estaban unidas en pequeños grupos. Estas partículas coincidieron en tamaño y forma con el calicivirus felino. Se fotografió otra muestra con tinción PTA a 150.000 x, donde se utilizó ácido fosfotúngstico al 2% tamponado con KOH de pH 7.

Resultados y discusión

Las muestras en estudio inoculadas en la línea celular CRFK, mostraron evidente daño del estrato celular con presencia de células gigantes, aparición de vesículas citoplasmáticas, pérdida de continuidad de la membrana citoplasmática, células apoptóticas y lisis celular total en la medida que aumentó el tiempo de exposición al virus. Estas observaciones resultan concordantes con las descritas por diversos autores, además de los efectos citopáticos provocados por la cepa vaccinal de calicivirus en la misma línea celular CRFK.

Las células inoculadas con cepa de referencia HVF y PF se enfrentaron a los respectivos sueros hiperinmunes (anti HVF y anti PVC), y mostraron neutralización total del efecto citopático. Este hecho implica que, al utilizar estos mismos biológicos en las muestras problemas, son capaces de neutralizar la acción de los virus presentes en las muestras, permitiendo el desarrollo y expresión viral únicamente del calicivirus felino.

Las muestras en estudio resultaron ser positivas a la prueba de la PCR, puesto que las bandas observadas en el gel de agarosa son totalmente complementarias con las del control positivo vaccinal.

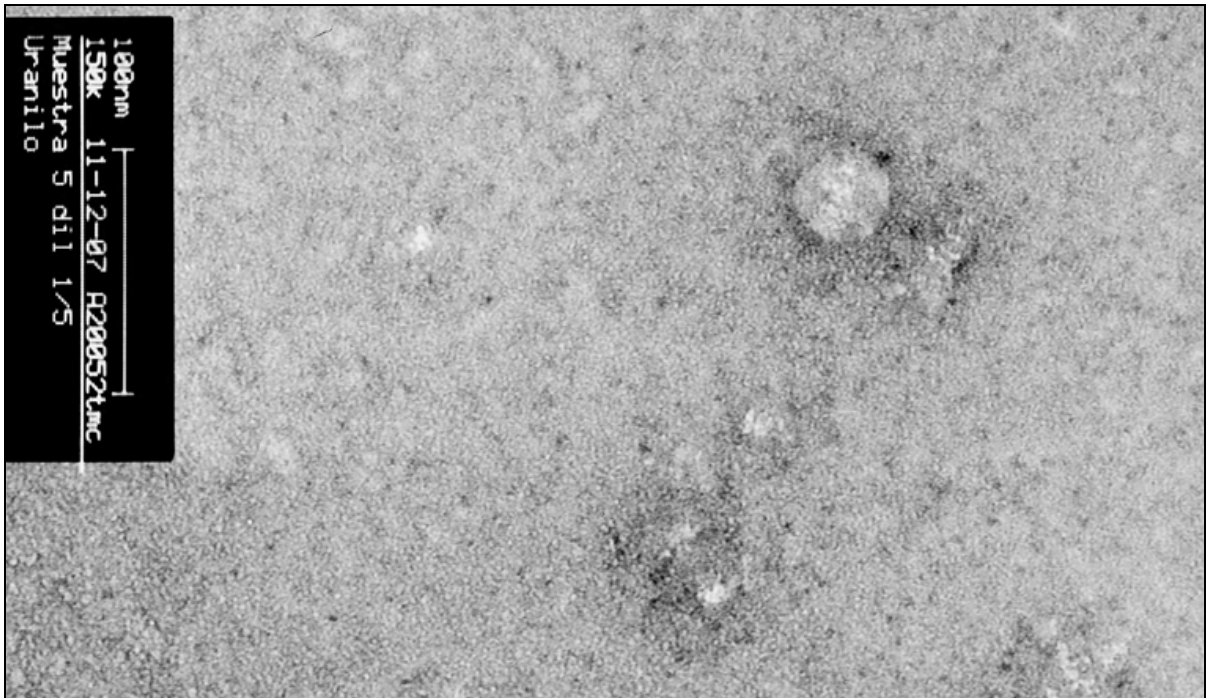
Las secuencias seleccionadas de los partidores fueron complementarias con el de las muestras sospechosas; éstas fueron:

- AACCTGCGCTAACGTGCTTA
- CAGTGACAATACACCCAGAAG
- CCCTTTGTGTTCCAAGCAAATCG

Estas secuencias se obtuvieron de un estudio similar realizado por Marsilio *et al.* (2005), donde realizaron técnicas de PCR con cepas de campo de calicivirus felino de Italia.

Los valores usados en el termociclador fueron: 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, 72 °C por 6 min, T° final de 4°C.

La microscopía electrónica mostró viriones en ambas muestras. En las dos analizadas se determinó que las características morfométricas de las partículas virales son plenamente concordantes con las descritas en otros estudios, puesto que el tamaño de los viriones fluctuó entre 27 y 40 nm.



Microfotografía electrónica de calicivirus felino
Fotografía: Dra. Luz Cerda

El análisis morfológico permitió determinar que se trataba de viriones cuyos bordes presentaban hendiduras con simetría icosaédrica.

Los hallazgos diagnósticos obtenidos mostraron partículas que están de acuerdo con las descritas en diversas referencias bibliográficas relativas a características estructurales y morfométricas de los calicivirus felino, que presentan concavidades en la periferia, bordeando una depresión central. Algunos núcleos se presentan destruidos y otros desplazados. Las partículas virales se presentan con diversas formas, aisladas y también en racimos.

Las mediciones de los viriones se efectuaron con una regleta de calibración graduada en décimas de milímetros, y las dimensiones coinciden con las partículas de virus descritas para los calicivirus.

Con relación a la presencia del virus de la panleucopenia, no se puede establecer categóricamente su presentación, solamente se empleó suero hiperinmune antiespecífico para neutralizarlo, que contenía la cepa vaccinal empleada como referencia, a diferencia de la certeza que se tiene de la coexistencia del herpes virus y calicivirus en las muestras provenientes de los animales que cursaban un cuadro respiratorio.

En el año 2004 se identificó el HVF en Chile en las muestras empleadas en este ensayo. Se utilizaron cepas vaccinales contenidas en el biológico polivalente comercial (vacuna triple felina), con el objeto de lograr un referente estándar, que contenga las tres cepas virales y así poder tener un control con las cepas de campo en estudio y comparar los daños celulares producidos por los virus y el efecto de los sueros en ellos.

Posterior al aislamiento del calicivirus se recurrió a dos técnicas (microscopía electrónica y PCR), que permitieron confirmar el aislado viral.

Conclusiones

En células de CRFK se aisló el calicivirus felino, a partir de muestras de secreciones orofaríngeas de gatos con sintomatología respiratoria.

Se definió un protocolo para el desarrollo de la PCR, prueba que permitió identificar molecularmente el calicivirus, cepa actuante en Chile, a partir de muestras de animales que están cursando la enfermedad.

La cepa de calicivirus identificada es coincidente con las secuencias que poseen las bases nitrogenadas de la cepa vaccinal y una cepa europea; el ordenamiento de esta última es el modelo utilizado para sintetizar el primer que se empleó para el reconocimiento del virus nativo y el contenido en las vacunas comerciales aplicadas en el país.

Lo anterior permite inferir que las cepas de calicivirus causantes de la enfermedad en felinos, están ampliamente difundida a nivel mundial.

Se comprobó la presencia del calicivirus en la muestras de secreciones respiratorias de gatos enfermos, mediante el desarrollo de un protocolo de microscopía electrónica de transmisión, las que resultaron ser plenamente coincidentes con las informadas en diversos estudios científicos a nivel mundial.

Referencias

- Bartlett & Stirling. 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol.* (226):3-6.
- Gaskell, R., & Dawson, S. 1996. *Feline Medicine and Therapeutics*. 2nd ed. The British Small Animal Veterinary Association and Blackwell Scientific Publications. London. 579 p.
- Marsilio, F., Di Martino, B., Decaro, N. & Buonavoglia, C. 2005. A Novel Nested PCR for the Diagnosis of Calicivirus Infections in the Cat. *Department of Scienze Biomediche Comparete, University of Teramo, Piazza Aldo Moro 45, 64100 Teramo, Italy. Veterinary Microbiology* N° 105. Pp.:1-7.
- Pesavento, P., Hurley, A. & Kate, F. 2006. Understanding Virulent Systemic Feline Calicivirus. *The Newsmagazine of Veterinary Medicine*, 37(7): 77.
- Radford, A., Dawson, S., Ryvar, R., Coyne, K., Johnson, D., Cox, M., Acke, E., Addie, D. & Gaskell, R. 2003. High Genetic Diversity of the Immunodominant Region of the Feline Calicivirus Capsid Gene in Endemically Infected Cat Colonies. *Department of Veterinary Clinical Sciences, University of Liverpool, Leahurst Veterinary Teaching Hospital, Chester High Road, Neston, S. Wirral, CH64 7TE, UK.* Pp.: 145-155.
- Técnicas Diagnósticas en Histopatología. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Manual de Patología General, Universidad Católica de Chile.* Capítulo 6.
- Técnicas Diagnósticas en Histopatología. Microscopía Electrónica. *Manual de Patología General, Universidad Católica de Chile.* Capítulo 6.
- Thumfart, O.J. & Meyers, G. 2002. Feline Calicivirus: Recovery of Wild-Type and Recombinant Viruses after Transfection of cRNA or cDNA Construct. *Journal of Virology*, 76(12):6398-6407.