

DETECCION DE ROTAVIRUS EN CAPRINOS DE SAN JOSE DE MAIPO REGION METROPOLITANA. CHILE

Patricio Berríos E. (MV, MS, Ph.D), Fernando Núñez S. (MV, LSP),
María O. Celedón V. (MV, MSc), Peter Fiegehen C. (MV),
María de la Cruz Santibáñez Z. (TEP)

DETECTION OF ROTAVIRUS IN GOATS FROM SAN JOSE DE MAIPO REGION METROPOLITANA, CHILE

A search for rotavirus was performed in fecal samples of 160 goat kids less than 4 years old, with diarrhea or not, from ten goat herds of San José de Maipo Región Metropolitana, Chile. The techniques used were ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) electron microscopy, electrophoresis of viral RNA and inoculation in MA-104 cells,

By the ELISA test (Rotazyme II. Abbott (R)) 25 positive samples (15.6%), 15 suspicious (3.4%) and 120 negatives (75%) were found. Nine of the positive samples were from kids less than one month old, and 16 from kids less than 4 months old; seven positive samples came from diarrheic kids (7/45), and 18 from non diarrheic kids (18/115). There were no significant differences between age, diarrhea, and presence of rotavirus antigens ($p > 0.05$). Electronic microscopy observation of one positive samples, showed viral particles resembled rotavirus. Nine strains produced characteristic cytopathic effect in MA-104 cells. Viral electropherotypes were not detected in 32 samples. It is discussed the results obtained according to the limited caprine rotavirus information.

Las infecciones entéricas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los animales domésticos, especialmente durante las primeras semanas de vida (Babiuk y col., 1985).

En la especie caprina los antecedentes sobre agentes etiológicos de diarrea neonatal son escasos. Lincicome, en 1982, asocia el parasitismo por helmintos y coccidias con este síndrome. Según Nagy y col. (1984) la principal causa de diarrea en cabritos es *Cryptosporidium*. Otros agentes descritos en relación a diarrea neonatal son: rotavirus (Scott y col., 1978; Nagy y col., 1983, 1984; Yvone y col., 1984); herpesvirus (Berríos y col., 1975); coronavirus (Nagy y col. 1983, 1984); adenovirus (Nagy y col., 1984); *Escherichia coli* (Nagy y col., 1983, 1984) y *Cryptosporidium* (Yvone y col., 1984).

Con respecto a rotavirus fue en Inglaterra, en 1978, donde se encontró, por primera vez rotavirus

asociados a un brote de diarrea que afectó a 4 de 6 cabritos de 4 meses de edad. En dos muestras se observaron rotavirus mediante microscopía electrónica, hallazgo que fue confirmado por inmunofluorescencia indirecta en células inoculadas (línea celular LLC MK y cultivo primario de riñón de ternero).

Posteriormente, en Hungría, Nagy y col. (1983) detectaron rotavirus, por microscopía electrónica, en cabritos menores de 4 meses con diarrea (5/25) y sin diarrea (3/3). Otros agentes encontrados fueron: *Cryptosporidium*, coronavirus, *E. coli* y coccidia. En 1984, Nagy y col. detectaron rotavirus mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) y microscopía electrónica, en 6 de 29 cabritos menores de 4 meses, con diarrea, y en 3 de 6 cabritos sin diarrea. Simultáneamente se determinó la presencia de adenovirus, coronavirus, *E. coli* K 99⁺ y *Cryptosporidium*. La infección con rotavirus y adenovirus fue confirmada mediante la detección de anticuerpos específicos.

En Francia, en 1984, Yvone y col. constataron la presencia de rotavirus, mediante ELISA, en cabritos pertenecientes a 22 majadas, sin establecer una relación aparente con la existencia de diarrea.

Departamento de Medicina Preventiva Animal.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile.

Trabajo financiado por Proyecto A 1648-87. DTI. Universidad de Chile.

Evidencias serológicas de la infección por rotavirus en caprinos han sido informadas, aunque en forma muy general, por Woode y col. (1976) y McNulty (1978). En un estudio serológico realizado por Takahashi y col. (1978) en Aomori, Japón, en 12 especies animales, utilizando como antígeno para la prueba de fijación del complemento, la cepa Lincoln de rotavirus bovino (NCDV), se determinaron títulos de anticuerpos, entre 2 y 8, en 18 cabras adultas de un total de 30. Nagy y col. (1984) detectaron anticuerpos neutralizantes en 55 sueros pertenecientes a 81 cabritos (16 en 37 cabritos menores de 4 meses; 18 en 22 cabritos de 7 a 8 meses, y 21 de 22 adultos).

En Chile, en un estudio realizado en pequeños rumiantes del Zoológico Nacional de Santiago no se encontraron antígenos de rotavirus en heces de 9 cabras enanas adultas (*Capra hircus*) de un grupo de 27 animales, analizadas mediante ELISA* (Berríos y col., 1988). Recientemente, Gorman y col. (1986) comunican el hallazgo de *Cryptosporidium* en 12 bovinos, 17 porcinos y 2 caprinos. Los cabritos, de corta edad o recién nacidos presentaban diarrea en el momento de tomar las muestras.

El objetivo de este trabajo es detectar la presencia de rotavirus en cabritos menores de 4 meses, con y sin diarrea, de la comuna de San José de Maipo, Región Metropolitana, utilizando las técnicas de ELISA, electroforesis del ARN viral, microscopía electrónica e inoculación en cultivos celulares MA-104.

MATERIAL Y METODOS

En cabritos menores de 4 meses de edad se pesquisó la existencia de antígenos rotavirales mediante la técnica inmunoenzimática ELISA y electroforesis del ARN viral.

El muestreo se realizó, en noviembre y diciembre de 1986, en cuatro sectores de la comuna de San José de Maipo (laguna Negra, embalse El Yeso, Melosas; El Volcán; río Colorado, Lagunillas y El Toyo), obteniéndose 160 muestras fecales que provenían de 43 cabritos menores de 1 mes y 117 de 1 mes a menos de 4 meses. Las muestras se recolectaron directamente del recto y de la zona perianal, correspondiendo 115 a cabritos sin diarrea, y 45 a cabritos con diarrea, los que además presentaban depresión, disminución de la ingesta de leche o pasto, deshidratación, tendencia a la inmovilidad, temperatura normal o disminuida e inflamación de la zona perianal.

Cada muestra fue diluida al 20% en una solución tampón fosfato pH 7,4 y centrifugada a $1.200 \times G$

por 15 minutos y a $8.000 \times G$ por 20 minutos; los sobrenadantes obtenidos se mantuvieron a $-20^{\circ}C$.

La prueba de ELISA se realizó con el "kit" comercial, Rotazyme II Abbott, que contiene perlas de poliestireno cubiertas con anticuerpos de cobayo antirrotavirus y un sistema enzima-sustrato formado por anticuerpos de conejo antirrotavirus conjugados con peroxidasa de rábano picante y 0-fenilenediamina 2 HCl. La lectura se hizo visualmente comparando los resultados obtenidos con una carta de colores, interpretando como positivas las muestras con 2 a 4 cruces, sospechosas con una cruz y negativas con \pm y 0 (Abbott Laboratories. Diagnostic Division, 1984).

La electroforesis del ARN viral se realizó con el "kit" Rotagel del Instituto de Salud Pública de Chile, de acuerdo a la técnica descrita por Espejo y col. (1978).

Cinco muestras positivas (4+) en ELISA, se observaron en un microscopio electrónico Philips EM 300, mediante tinción negativa con fosfotungstato de potasio 2% y pH 6,0 (Flewett, 1978).

Nueve muestras positivas (3 y 4+) en ELISA, se inocularon en células MA-104, previo tratamiento con tripsina (8 $\mu g/ml$) (Chasey y Banks, 1986).

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de independencia de X^2 .

RESULTADOS

Mediante la prueba de ELISA se detectaron 25 muestras positivas (15,6%), 11 con 4+, 7 con 3+ y 7 con 2+; 15 sospechosas (9,4%) y 120 negativas (75%).

Las muestras positivas provenían de cabritos de El Volcán (2); Melosas (3); embalse El Yeso (8) y río Colorado - El Toyo (12); 9 de ellas correspondían a cabritos menores de 1 mes (9/43) y las 16 restantes a cabritos de 1 a 4 meses (16/117); 7 a cabritos con diarrea (7/45) y 18 a cabritos sin diarrea (18/115). No se encontró asociación entre edad, diarrea y presencia de antígeno rotaviral ($p > 0,05$).

En una muestra positiva de ELISA con 4+ se observaron, en microscopía electrónica, partículas virales con un diámetro aproximado de 65 nm y una morfología semejante a la descrita para los rotavirus (figura 1).

En cultivos celulares MA-104 inoculados con nueve muestras positivas en ELISA con 3 y 4+, se observó efecto citopático semejante al causado por rotavirus y caracterizado por la presencia de células vacuolares y redondas, con desprendimiento celular, aproximadamente a los 5 días de su inoculación. Este efecto se apreció luego de tres pasajes seriados, determinándose en los sobrenadantes la presencia de antígenos rotavirales mediante las

*Rotazyme II Abbott.

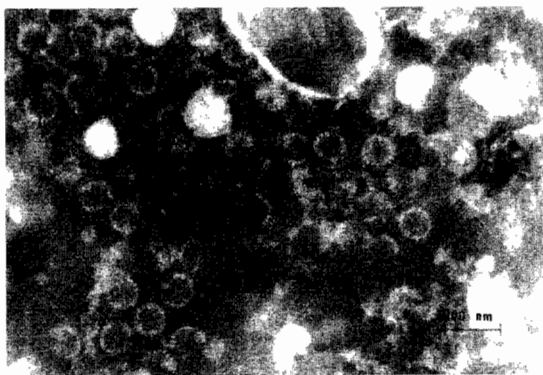


Figura 1. Partículas rotavirales en heces de cabritos (112.500 X).

pruebas de ELISA (Rotazyme II, Abbott) y aglutinación en látex (Slidex Rota-kit bio Merieux); y de electroferotipos de rotavirus mediante electroforesis (Rotagel).

En 32 muestras analizadas por electroforesis (Rotagel) no se evidenciaron electroferotipos correspondientes a rotavirus.

DISCUSION

La detección de rotavirus en heces de cabritos menores de 4 meses de edad con y sin diarrea, confirma la presencia de estos virus en la especie caprina reportada anteriormente en Inglaterra (Scott y col., 1978), Hungría (Nagy y col., 1983, 1984) y Francia (Yvone y col., 1984).

El 15,6% de positividad obtenido con la prueba de ELISA es inferior al 26,6% detectado en caprinos por Nagy y col. (1984) con la misma técnica; sin embargo, este valor se encuentra en el rango de los obtenidos en Chile: en terneros 15,6% y 23,8% (Berríos y col., 1987), 15,7% (Reinhardt y col., 1986), 24,6% (Núñez, 1986); potrillos 20% (Berríos y col., 1987); corderos 9,4% (Berríos y col., 1988); cerditos 14,3% (Rivas, 1982), 14,7% (Reinhardt y col., 1986), 23% (Pinochet, 1986).

La observación de partículas virales semejantes a rotavirus en un tamaño de aproximadamente 65 nm, y en su morfología en que los capsómeros de la cápside interna se disponen como proyecciones semejantes a rayos de una rueda de carreta, ratifica la presencia de rotavirus en cabritos positivos en ELISA.

Con respecto a la negatividad del estudio por electroforesis del ARN viral, esta situación podría ser explicada por la existencia de una menor cantidad de partículas rotavirales que las necesarias para que se visualicen los electroferotipos, estimada entre 10^7 y 10^{10} partículas de virus por gramo de

fecas (Espejo y col., 1978), o por la presencia de una gran cantidad de partículas virales libres de ARN (Babiuk y col., 1985).

El rol etiológico de los rotavirus en la enteritis neonatal en diversas especies animales, ha sido establecido en conexión con otros virus, bacterias o parásitos enteropatógenos. En el caso de los caprinos, solamente existe un trabajo experimental en que se inocularon 30 cabritos con material fecal filtrado y no filtrado que contenía *Cryptosporidium*, produciéndose un cuadro de diarrea con una duración entre 0,6 y 3,3 días promedio. En 19 cabritos se detectó *Cryptosporidium* y en 5 cabritos adenovirus y rotavirus, mediante ELISA y microscopía electrónica (Nagy y col., 1984).

En cuanto a la no asociación entre las variables edad y diarrea, con respecto a la presencia de rotavirus en las heces de los cabritos estudiados, cabe señalar que en los diversos estudios realizados en el país, solamente se ha encontrado en corderos asociación entre diarrea y rotavirus (Berríos y col., 1988). Para entender mejor la etiología de las diarreas neonatales es necesario considerar otras variables que han sido asociadas con este problema, tales como dieta, privación de calostro, medidas de manejo, estado sanitario, temperatura ambiental, humedad y estrés (Manzullo, 1985).

Finalmente, es importante indicar que la adaptación de nueve cepas de rotavirus caprino en cultivos celulares MA-104, situación no descrita en la literatura consultada, permitiría caracterizarlas y estudiar su patogenicidad en caprinos y otras especies.

RESUMEN

Se estudió la presencia de rotavirus en 160 muestras fecales de caprinos menores de 4 meses de edad, con o sin diarrea, provenientes de 10 majadas de San José de Maipo, Región Metropolitana, utilizando la prueba de ELISA, microscopía electrónica, electroforesis del ARN viral e inoculación en cultivos celulares MA-104.

Mediante ELISA se detectaron 25 muestras positivas (15,6%); 15 sospechosas (9,4%) y 120 negativas (75%). De las muestras positivas 9 correspondían a cabritos menores de 1 mes (9/43); 16 a cabritos de 1 a 4 meses (16/117); 7 a cabritos con diarrea (7/45) y 18 a cabritos sin diarrea (18/115). No se encontró asociación entre edad, diarrea, y presencia de antígeno rotaviral ($p > 0,05$). En cultivos celulares MA-104, inoculados con nueve muestras positivas en ELISA, se observó efecto citopático semejante al causado por rotavirus, constatándose la presencia de antígenos rotavirales mediante ELISA y aglutinación en látex, y de electroferotipos rotavirales mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. En microscopía electrónica se ob-

servaron partículas virales semejantes a rotavirus en una muestra positiva en ELISA. No se evidenciaron electroferotipos de rotavirus en 32 muestras analizadas por electroforesis del ARN viral. Se discuten los resultados obtenidos a base de la escasa información existente de rotavirus en cabritos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración a Dra. Olga Palacios F. y Víctor Monasterio C.

REFERENCIAS

- ABBOTT LABORATORIES. DIAGNOSTIC DIVISION. Enzyme immunoassay for the detection of rotavirus antigens in human fecal specimens. Rotazyme (R) II. 83-0374/R8: 53-69, 1984.
- BABIUK, L.A.; M. SABARA, G.R. HUDSON. Rotavirus and coronavirus infections in animals. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.* 1: 80-120, 1985.
- BERRÍOS, P.; D.G. Mc KERCHER, H. KNIGHT. Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 36: 1736-1769, 1975.
- BERRÍOS, P.; J. MALDONADO, M.O. CELEDÓN, D. RAZMILIC, V. MONASTERIO. Detección de rotavirus en equinos. Estudio preliminar. *Arch. Med. Vet.* 19: 13-17, 1987.
- BERRÍOS, P.; M. CELEDÓN, L. MORAGA, C. MATHIEU, V. MONASTERIO. Detección de rotavirus en terneros de la Región Metropolitana. *Agro-Ciencia* 3: 35-39, 1987.
- BERRÍOS, P.; M. CELEDÓN, P. GECELLE, I. ACEVEDO. Detección de rotavirus en conejo angora. *Monografías Med. Vet.* 9: 46-48, 1987.
- BERRÍOS, P.; C. PEDRAZA, L. MORAGA, M. CELEDÓN, M. MACCHIARELLO. Detección de rotavirus en terneros y vacas de una lechería de la Región Metropolitana. *Agricultura Técnica* 47: 345-349, 1987.
- BERRÍOS, P.; M.O. CELEDÓN, V. RAMÍREZ. Rotavirus en ovinos: Detección mediante ELISA y aislamiento en cultivos celulares MA-104. *Arch. Med. Vet.* 20: 108-112, 1988.
- BERRÍOS, P.; V. RIVEROS, M.O. CELEDÓN, M. CUZMAR. Rotavirus en pequeños rumiantes del Zoológico Nacional de Santiago. *Monografías Med. Vet.* 10: 45-49, 1988.
- CHASEY, D.; J. BANKS. Replication of atypical ovine rotavirus in small intestine and cell cultures. *J. Gen. Virol.* 67: 567-576, 1986.
- ESPEJO, R.; P. ROMERO, E. CALDERÓN, N. GONZÁLEZ. Diagnóstico de rotavirus por electroforesis del RNA viral. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 35: 323-331, 1978.
- FLEWETT, T.H. Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 538-543, 1978.
- GORMAN, T.; H. ALCAÍNO, J.C. WEITZ. Hallazgo de *Cryptosporidium* en animales de Chile. *Parasitol. al día.* 10: 31-32, 1986.
- LINCICOME, D.R. Goat diseases: Prevalence in the United States and Canada as reflected in autopsy reports for 1977-1979. *In: Proceedings of the third international conference on goat production and diseases.* Tucson, Arizona, USA, January 10 to 15, 1982, pp. 602.
- MANZULLO, A. Etiopatogenia de las diarreas de los animales domésticos. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires).* 66: 252-263, 1985.
- MCCULTY, M.S. Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40: 1-18, 1978.
- NAGY, B.; G. NAGY, V. PALFI, M. BOZSO. Occurrence of cryptosporidia, rotaviruses, coronaviruses-like particles and K 99⁺ *Escherichia coli* in goat kids and lambs. *In: Proceeding of the third international symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians.* Ames, Iowa, U.S.A. June 13-15, 2: 525-531, 1983.
- NAGY, B.; M. BOZSO, V. PALFI, G. NAGY, M.A. SAHIBY. Studies on cryptosporidial infection of goat kid. *In: Les maladies de la chèvre. Colloque international.* Niort, France, 9-11 october, 1984. Paris, France 28: 443-451, 1984.
- NÚÑEZ, C. Determinación de *Escherichia coli* K 99⁺ y rotavirus en terneros neonatos afectados de diarrea. Tesis Medicina Veterinaria. Santiago. Universidad de Chile, 1986.
- PINOCHET, L. Síndrome diarreico agudo en cerdo lactante. Resumen general. *Monografías Med. Vet.* 8: 7-15, 1986.
- REINHARDT, G.; S. RIEDMANN, M. POLETTE, M. AGUILAR, M. NIEDDA. Diarrea neonatal, Infección por rotavirus en bovinos y porcinos. *Arch. Med. Vet.* 18: 23-27, 1986.
- RIVAS, C. Detección y caracterización de rotavirus en cerdos lactantes en la Región Metropolitana. Tesis Medicina Veterinaria. Santiago. Universidad de Chile, 1983.
- SCOTT, A.C.; J. LUDDINGTON, M. LUCAS, F.R. GILBERT. Rotavirus in goats. *Vet. Rec.* 103: 145, 1978.
- TAKAHASHI, E.; Y. INABA, K. SATO, A. KUROGI, H. AKASHI, K. SATODA, T. OMORI. Antibody to rotavirus in various animal species. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 19: 72-73, 1978.
- WOODE, G.; J. BRIDGER, J. JONES, T. FLEWETT, A. BRYDEN, H. DAVIES, G. WHITE. Morphological and antigenic relationships between viruses (Rotaviruses), from acute gastroenteritis of children calves, piglets, mice and foals. *Infect. Immun.* 14: 804-810, 1976.
- YVORE, P.; A. ESNAULT, M. NACIRI, C. LECLER, J.L. BOND, M. CONTREPOIS, D. LEVIEUX, J. LAPORTE. Enquete épidémiologique sur les diarrhées néonatales des chevreaux dans les élevages de Touraine. *In: Les maladies de la chèvre. Colloque international,* Niort, France 9-11 october, 1984. Paris, France 28: 437-442, 1984.

Recibido en octubre de 1988, aprobado en diciembre de 1988.