

Rotavirus en animales asintomáticos: Detección y clasificación antigénica

Rotavirus in asymptomatic animals: Detection and antigenic classification

G. POLANCO, Q.F.B.; M. GONZÁLEZ, Dr. Ciencias Médicas; L. MANZANO, Q.F.B.;
J. CÁMARA, i.d.r.; M. PUERTO, Mg. Cs.

Laboratorio de Virología, Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán,
Avenida Itzáes por calle 59 #490, CENTRO. CP 97000, Mérida, Yucatán, México.

SUMMARY

Rotavirus (RV) group A is associated with gastroenteritis in mammals and birds. The most frequently identified strains in sick animals belong to the serotypes G1-G3. Knowledge of the epidemiology of RV among asymptomatic animals is very limited.

The objective of this study was to determine the frequency and antigenic classification of RV strains isolated from asymptomatic animals that live both inside and outside homes. Five hundred houses were studied, of which 3773 faecal samples from different species of animals were collected. They were analyzed using the ELISA method specific for RV group A. Antigenic classification of RV was carried out using monoclonal antibodies from the subgroup and serotypes G and P.

Twenty houses were identified in which one animal each (4%) was found to be infected with rotavirus. Eight different serotype-subgroup antigenic combinations were detected. Fifteen out of the 20 positive samples (75%) belonged to subgroup no I/no II. All the samples reacted to antibodies against serotype G., the most common was G3 found in 50% of the samples.

The following 3 lines are not in the resumen and therefore should not be included in the summary either (or vice versa). Grammar and spelling are corrected below:

Serotype G1 was found in 35%, G2 15% and G4 in 10% and two animals had mixed infections. Only 30% of the samples reacted with antibodies against serotype P, the most common was P1A in 25% of the samples.

The presence of RV strains with antigenic characteristics frequently reported in humans, suggests that asymptomatic domesticated animals could act as reservoirs for infection with RV, maintaining this virus in circulation between the annual outbreaks in our environment.

Palabras claves: Rotavirus, animales asintomáticos, serotipo, subgrupo.

Key words: Rotavirus, asymptomatic animals, serotypes, subgroups.

INTRODUCCIÓN

El rotavirus (RV) del grupo A, se asocia con la gastroenteritis en diversas especies de mamíferos y aves, entre los que se reportan: mono, cerdo, caballo, oveja, chivo, perro, gato,

bovino, conejo, rata, ratón, pájaro, paloma, pavo, pato, gallo (Kapikian y col., 2001).

El rotavirus está compuesto por un genoma segmentado de doble cadena de RNA, envuelto en tres capas de proteínas (Kapikian y col., 2001).

La proteína VP6 conforma la cápside interna, y por sus características antigénicas, RV se clasifica en grupos de la A-G y subgrupos (SG) I, II, I y II, no I y no II, detectándose con mayor frecuencia los grupos de la A-C, con subgrupo II en los humanos y el I en los animales (Cardoso y col., 2000).

Aceptado: 10.12.2003.

Proyecto Financiado por el Consejo de Ciencia y Tecnología de México, Convenio # 25009M.

Las proteínas VP7 y VP4 de la cápside externa, poseen epítomos de clasificación de los serotipos G y P. Hasta la fecha se han reportado 14 G y 20 P, los que circulan con mayor frecuencia en animales y humanos son G1-G4, P1A y P1B (Ahijas y col., 1996).

Investigaciones efectuadas en animales con diarrea infecciosa aguda, han reportado cepas de RV G1 y G3, con una homología del 85% con cepas de humanos (Nagesha y Holmes, 1998; Bellinzoni y col., 1990; Nakagomi y col., 1990; Nakagomi y Nakagomi, 1991).

En algunas especies de animales, se han reportado serotipos muy específicos, un ejemplo de estos es el G7, el cual se ha encontrado solamente en aves de corral, lo que ha llevado a los investigadores a pensar que algunas cepas de RV son especies específicas y otras se comparten entre humanos y animales (Hoshino y col., 1984).

Los estudios de RV realizados en animales asintomáticos son esporádicos, reportándose en: perros, gatos, caballos, vacas y cerdos frecuencias de 1 a 15%, dependiendo de la especie estudiada (Conner y col., 1983; Hoshino y col., 1983; Marshall y col., 1984; Marshall y col., 1987; Pocock, 1987; Gatti y col., 1993).

Estudios realizados en diferentes partes del mundo, en los cuales se analizaron los genes de la VP4 y VP7 de cepas de RV aislados de niños con diarrea infecciosa aguda severa, demostraron que dichas cepas tienen una homología mayor del 90% con cepas provenientes de cerdos, gatos, perros y bovinos (Vonsover y col., 1993; Govea y col., 1994; Okada y col., 2000; Ward y col., 1996).

En la Ciudad de Mérida, Yucatán, México, se presentan brotes de RV en población infantil durante los meses de invierno, así mismo existe una amplia zona urbana en donde la convivencia de los infantes con los animales es estrecha y cotidiana, pudiendo jugar la infección asintomática en estos animales un papel importante en la aparición de los brotes anuales. Lo que nos llevó a plantearnos la necesidad de conocer la frecuencia y clasificación antigénica de los RV detectados en los animales asintomáticos que conviven en el interior y exterior de la vivienda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada. Un estudio prospectivo, descriptivo y transversal, se realizó durante 1998 y 1999. Se visitaron viviendas de la periferia sur y poniente de la Ciudad de Mérida, Yucatán, con el objeto de identificar aquellas con las siguientes características: presencia de animales sanos dentro de la vivienda y/o en el traspatio, carencia de agua potable y servicio sanitario, condiciones de higiene deficiente, promiscuidad y hacinamiento (presencia de más de tres personas que utilizan la misma habitación para dormir). Una vez identificadas las viviendas se procedió a explicar a los miembros que se encontraban en ese momento, qué es el RV, cómo se transmite, qué enfermedad causa en los humanos y el posible papel de los animales en la infección, solicitándose la autorización para recolectar materia fecal recién emitida de sus animales. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta que fueron procesados en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigaciones Regionales “ Dr Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Detección de rotavirus y clasificación antigénica. Para detectar RV del grupo A, se aplicó el método de ELISA, usando un estuche comercial (Dako, Denmark).

La asignación de subgrupo y serotipos G y P se realizó directamente de la materia fecal, utilizando el método de ELISA con anticuerpos monoclonales donados por el Dr. Koki Taniguchi (Fujita Health University, Toyoake, Japan). Los siguientes anticuerpos fueron usados: S237 y YO-5 para subgrupo I y II respectivamente; KU4, S22G10, YOIE2, ST2G7 para serotipos G1, G2, G3 y G4 y IYO2C2 y S2-2F2 para serotipos P1A y P1B.

Como controles positivos se utilizaron cepas de RV de referencia: SA11 y W161 para los subgrupos I y II y para los serotipos G1, G2, G3 y G4 se utilizaron WA, G2S2. SA11 y una muestra fecal de humano (801) ya clasificada como G4; SA11 y G2S2 para serotipos P1A y P1B.

La metodología, brevemente fue la siguiente: las inmunoplasmas (NUNC, Dinamarca) fueron

sensibilizadas con los diferentes monoclonales por 24 horas a 4°C; posteriormente fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina (ASB) al 1% en buffer de fosfatos (PBS) por otras 24 horas a la misma temperatura. Al término del bloqueo se añadieron 100 µl de la muestra fecales diluidas al 5% en PBS e incubadas a 37 °C por dos horas. Posteriormente, se añadió un anticuerpo policlonal contra RV obtenido en conejo diluido en PBS/ABS e incubadas de nuevo a 37 °C por dos horas. Al finalizar la incubación se agregó un anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (sigma, USA) dejando reaccionar a 37 °C por una hora; posteriormente se agregó el sustrato OPD (Sigma USA) y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Es importante señalar que las placas fueron lavadas con PBS al término de cada incubación. La reacción fue detenida con ácido sulfúrico e interpretada en un lector de ELISA con un filtro de 492 nm de longitud de onda. Las muestras cuya absorbancia fueron dos veces mayor que el control negativo fueron consideradas positivas. (Taniguchi y col.,1987; Greenberg y col.,1987).

RESULTADOS

Se estudiaron 500 viviendas, en las cuales se recolectaron 3773 muestras de materia fecal que provinieron de los siguientes animales sanos: 51 caballos, 62 borregos, 243 cerdos, 28 pájaros, 1257 gallos, 172 gatos, 29 palomas, 384 patos, 669 pavos, 416 perros, 331 pollos, 45 toros, 6 zorros, 20 chivos, 30 gansos y 30 conejos.

En 20 viviendas (4%) se encontró un animal infectados con RV, 18 (90%) presentaron infección con un solo virus y 2 (10%) tuvieron infección mixta.

En las 20 muestras positivas se detectaron 8 diferentes combinaciones de serotipos y subgrupos (cuadro 1). La especie con mayor prevalencia de infección por RV fueron los porcinos con el 3.3% .

En cuanto a subgrupo encontramos SGII, SGI/II, SG noI/II, predominando este último en el 75% de las muestras (cuadro 1).

Se detectaron los cuatro serotipos G más comunes G1-4, predominado el G3 en el 50%

de las muestras, G1 en el 35%, G2 en el 15%, y G4 se encontró el 10%, y solamente en infecciones mixtas (cuadro 1).

Solamente 6 muestras (30%) reaccionaron con monoclonales para serotipo P, 5 (25%) fueron P1A y una (5%) P1B (cuadro 1).

CUADRO 1. Características antigénicas de los RV aislados de animales asintomáticos

Antigenic characteristics of the RV isolated from asymptomatic animals.

Características antigénicas de origen de las cepas de RV	Especie de origen de las cepas de RV
G2, SG no I/II	1 pavo y 2 cerdos
G3, SG no I/II	1 perro, 4 cerdos, 1 bovino
G3, P1A, SG no I/II	1, pavo 1 cerdo
G1, P1B, SG II	1 cerdo
G1, P1A, SG II	1 pavo, 1 gallo
G3, SG II	1 perro
G1, SG no I/II	1perro, 1 pato,1 ganso
G3, G4, SG no I/II	1 gato
G1, G4, P1A, SG I/II	1 gato

En la columna de la izquierda, se observan las diferentes combinaciones antigénicas de las cepas de RV aisladas de animales. En la columna de la derecha la especie y el número de animales de los que se aislaron los RV.

DISCUSIÓN

El papel de los RV como causantes de diarrea infecciosa aguda en algunas especies de animales ha sido ampliamente documentado, sin embargo, los reportes en animales sanos, son escasos y aislados, sin considerar su posible relación con la infección en humanos (Conner y col., 1983; Marshall y col.,1984; Marshall y col., 1987; Pocock, 1987; Gatti y col., 1993).

Este es el primer trabajo que aborda el estudio de los RV en animales sanos, que conviven estrechamente con los humanos en circunstancias propicias para la transmisión interespecie. En nuestro estudio encontramos que en el 4% de las casas, existían animales infectados con cepas de RV.

Entre las especies infectadas encontramos aves, perros y gatos, los cuales de manera cotidiana viven tanto en el exterior como en el interior de las viviendas, otros animales infectados fueron varios porcinos y un vacuno, los cuales no entran a las viviendas pero deambulan libremente por los patios de las casas.

Un común denominador de las viviendas estudiadas fue la carencia de servicios sanitarios, de manera que los habitantes designan un espacio no cerrado del patio para depositar sus excretas, a donde los animales tienen acceso a la materia fecal, la que ingieren de manera cotidianamente.

Otra característica, es la presencia de materia fecal de los animales dispersa en el interior y exterior de las viviendas.

En este contexto los seres humanos, se encuentran expuestos continuamente a contaminación con materia fecal de diversas especies de animales.

En la última década se han realizado numerosos estudios en los cuales se caracterizan cepas aisladas de humanos, encontrándose una alta homología con cepas de animales. Sin embargo, no se ha podido demostrar transmisión natural de RV interespecie, a pesar de la presencia de los factores de riesgo (Kapikian y col., 2001).

Nuestros resultados demuestran una diversidad antigénica entre las cepas de RV aisladas, en 20 muestras se encontraron 8 combinaciones de serotipos y subgrupos diferentes.

En nuestro estudio encontramos 12 cepas con características antigénicas propias de RV de animales, sin embargo, es importante señalar que las cepas G3, SG no I-II, las detectamos en 4 cerdos, 1 perro y 1 toro, originalmente éstas fueron reportadas en caballo (Gomara y col., 2002). Encontrar estas cepas en especies diferentes a la reportada originalmente, nos hace pensar que no son especie específicas.

Tres cepas G2, SG no I/II fueron encontradas en un pavo y dos porcinos, estos virus podrían ser el resultado de un rearreglo entre cepas de RV de origen humano y animal, debido a que el serotipo G2 no circula en animales, pero el SG no I/II, predomina en ellos (Gomara y col., 2002).

El 25% de las cepas de RV detectadas, presentaron características antigénicas que con

frecuencia se reportan en humanos, tal es el caso de las cepas G3, SG II; G1, P1A, SG II; G1, P1B, SG II; G1, G4, P1A, SGI/II (Taniguchi y col., 1987; Ahijes y col., 1996). Este hecho nos obliga a pensar en la posibilidad de circulación de cepas de RV entre los humanos y animales.

Las dos muestras de materia fecal de gato mostraron infecciones mixtas. Estas coinfecciones pudieron provenir de dos cepas de origen humano (G1, G4, P1A, SG I/II), o de una cepa de origen humano y una de origen animal (G3, G4, no I/II).

Nuestros resultados, sugieren que los animales domésticos asintomáticos, podrían actuar como reservorios de la infección por RV, manteniendo la circulación de este virus entre los brotes anuales. Para poder confirmar esto es necesario realizar estudios epidemiológicos y moleculares de las cepas provenientes de animales y de humanos durante todo el transcurso del año, de manera que se pueda establecer con precisión la homología y la dinámica de transmisión.

RESUMEN

El rotavirus (RV) del grupo A, se asocia con gastroenteritis en mamíferos y aves, las cepas que más frecuentemente se han identificado en animales enfermos pertenecen a los serotipos G1-3. El conocimiento de la epidemiología del RV entre los animales asintomáticos es muy limitado.

El objetivo fue determinar la frecuencia y clasificación antigénica de los RV aislados de animales asintomáticos que viven en el interior y exterior de las viviendas. Por lo que se estudiaron 500 viviendas, en las cuales se colectaron 3773 muestras de materia fecal de diferentes especies de animales. Se analizaron utilizando el método de ELISA específico para RV del grupo A. La clasificación antigénica de los RV se realizó con monoclonales de subgrupo y serotipos G y P. En 20 viviendas (4%) se encontró algún animal infectado con RV. Se detectaron 8 diferentes combinaciones antigénicas serotipo-subgrupo. En cuanto al subgrupo el 75% fueron SG no I/no II. Se detectaron los cuatro serotipos G más comunes

G1-4, predominado el G3 en el 50% de las muestras. La presencia de cepas de RV con características antigénicas frecuentemente reportadas en humanos, sugieren que los animales domésticos asintomáticos, podrían actuar como reservorios de la infección por RV, manteniendo la circulación de este virus entre los brotes anuales en nuestro medio.

BIBLIOGRAFÍA

- AHIJAS, S., K. GOWDA, H. JAGANNATH, R. REEDY, P. MAIYA P. 1996. Epidemiology of symptomatic human rotaviruses in Bangalore and Mysore, India, from 1988 to 1994 as determined by electroferotype, subgroup and serotype analysis. *Arch. Virol.* 141:715-726.
- BELLINZONI, R. B., N. M. MATTION, D. O. MATSON, J. BLAC, J. L. LA TORRE, E. A. SCODELLER, S. URASAWA, K. TANIGUCHI, M. K. ESTES. 1990. Porcine rotaviruses antigenically relation human rotavirus serotypes 1 and 2. *J Clinical. Microbiol.* 28: 633-636.
- CARDOSO, D. D. P., C. M. A. SOARES, M. P. S. AZEVEDO, J. P. G. LEITE, V. MUNFORD, M. L. RÁCZ. 2000. Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *J. Health. Popul. Nutr.* 18:39-43.
- CONNER, M. E., J. H. GILLESPIE, E. L. SCHIFF, M. S. FREY . 1983. Detection of rotavirus in horses with and without diarrhoea by electron microscopy and Rotazyme test. *Cornell. Vet.* 73:280-287.
- GATTI, M. S., M. M. FERAZ, M. L. RACZ, A. F. DE CASTRO. 1993. Rotavirus excretion in naturally infected pigs with and without diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 37:187-190.
- GOMARA, M. I., C. WONG, S. BLOME, U. DESSELBERGER, J. GRAY. 2002. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolated: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J. Virol.* 76:6596-6601.
- GOVEA, V., A. D. STEELE, Y. HOSHINO, M. SERENO, D. GARCIA, A. SARASINI, J. FLORES. 1994. Comparison of the VP7 gene sequences of human and bovine rotavirus. *J. Gen. Virol.* 75:1781-1784.
- GREENBERG, H. B., V. MC AULIFFE, J. VALDESUSO, R. WYATT, J. FLORES, A. KALICA, Y. HOSHINO, N. SINGH. 1987. Serological analysis of the subgroup proteins of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 39:91-99.
- HOSHINO, Y., R. G. WYATT, H. B. GREENBERG, A. R. KALICA, J. FLORES. 1983. Isolation and characterization of an equine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 18:585-589.
- HOSHINO, Y., R. G. WYATT, H. B. GREENBERG, J. FLORES, A. Z. KAPIKIAN. 1984. Serotypic similarity and diversity of rotavirus of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J. Infect. Dis.* 149:694-702.
- KAPIKIAN, A. Z., Y. HOSHINO, R. M. CHANOC. 2001. *Virology*. 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
- MARSHALL, J. A., D. S. HEALEY, M. J. STUDDERT, P. C. SCOTT, B. K. WARD, I. D. GUST. 1984. Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 61:33-38.
- MARSHALL, J. A., M. L. KENNETT, S. M. RODGER, M. J. STUDDERT, W. L. THOMPSON, I. D. GUST. 1987. Virus and virus-like particles in the faeces of cats with and without diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 4:100-105.
- NAGESHA, H., I. H. HOLMES. 1998. New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. *J. Clin. Microbiol.* 26:171-174.
- NAKAGOMI, O., A. OHSHIMA, Y. ABOUDY, I. SHIF, M. MOCHIZUKI, T. NAKAGOMI, T. GOTLIEB-STEMATSKY. 1990. Molecular identification by rna-rna hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J. Clin. Microbiol.* 28:1198-1203.
- NAKAGOMI, O., T. NAKAGOMI. 1991. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interespecie transmission of rotavirus. *Arch. Virol.* 120:43-55.
- OKADA, J., T. URASAWA, N. KOBAYASHI, K. TANIGUCHI, A. HASEGAWA, K. MISE, S. URASAWA. 2000. New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J. Med. Virol.* 60:63-69.
- POCOCK, D. H. 1987. Characterization of rotavirus isolates from sub-clinically infected calves by genome profile analysis. *Vet. Microbiol.* 13:27-34.
- TANIGUCHI, K., T. URASAWA, Y. MORITA, H. B. GREENBERG, S. URASAWA. 1987. Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-2-3-, and 4 specific monoclonal antibodies to VP7. *J. Infect. Dis.* 155:159-166.

- VONSOVER, A., I. SHIF, I. BILBERSTEIN, H. RUDICH, Y. ABODUY, E. MENDELSON. 1993. Identification on feline and canine like rotaviruses isolated from human by restriction fragment length polymorphism assay. *J. Clin. Microbiol.* 31:1783-1787.
- WARD, R. L., Q. JIN, O. NAKAGOMI, D. S. SANDER, J. R. GENTSH. 1996. Isolation of a human rotavirus containing a bovine rotavirus VP4 gene that suppresses replication of other rotaviruses in co-infected cells. *Arch. Virol.* 141:615-633.