

DIARREA EN LECHONES LACTANTES Y POSDESTETE DE CUATRO CRIADEROS INTENSIVOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA: IDENTIFICACIÓN E ÍNDICE DE DETECCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES EN MATERIA FECAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

J.I. Aguirre^{1,2}; M.A. Petruccelli^{1, 2}; A.D. Armocida²; F.S. Moredo³;
M. Risso^{2, 4}; L. Venturini⁵; J.R. Idiart²; C.J. Perfumo²

¹Servicio Central de Microscopía Electrónica "Dr. S.I. Itagaki", ²Instituto de Patología "Dr. B. Epstein",
³Cátedra de Microbiología, ⁴Cátedra de Bioestadística, ⁵Cátedra de Parasitología.
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Resumen. El presente estudio preliminar tuvo como objetivo identificar y determinar el índice de detección de partículas virales en heces diarreicas de lechones de 4 establecimientos intensivos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, empleando la técnica de tinción negativa en microscopía electrónica (TNME). Esta técnica ha venido empleándose durante décadas por su rapidez, sencillez y sensibilidad. Se estudiaron un total de 146 muestras pertenecientes a lechones lactantes (50) y a lechones posdestete (96), detectándose partículas virales en un 58% y en un 53,1% de las heces, respectivamente. Se identificaron partículas virales compatibles con rotavirus, coronavirus, adenovirus, parvovirus y pequeños virus redondos en 32% y 34,4%, 18% y 16,7%, 10% y 9,4%, 4 y 3,1% y 2 y 1% de las muestras de lechones lactantes y posdestete, respectivamente. Se observaron combinaciones virales en un 8% y en un 10,4% de las muestras, respectivamente. En ambas categorías, la combinación más frecuente fue de partículas compatibles con rotavirus y coronavirus. El presente estudio permitió la identificación de diversos géneros de virus considerados agentes causales de diarrea en lechones y que, a excepción de rotavirus, no habían sido previamente descritos en nuestro país. La técnica de TNME demuestra ser un método adecuado como prueba tamiz para identificar partículas virales en materia fecal; sin embargo, necesita de otras pruebas de mayor especificidad para confirmar los resultados obtenidos y también para determinar a qué grupo o variante pertenecen los virus identificados.

Palabras claves: virus entéricos, diarrea en lechones, tinción negativa en microscopía electrónica.

DIARRHOEA IN SUCKLING AND POSTWEANING PIGLETS FROM FOUR PIGHERDS SITUATED IN BUENOS AIRES PROVINCE, ARGENTINA: IDENTIFICATION AND DETECTION RATE OF VIRAL PARTICLES IN FAECAL SAMPLES BY ELECTRON MICROSCOPY

Abstract. The aim of this pilot study was to identify and to determine the detection rate of viral particles in faecal specimens recovered from suckling and postweaning piglets with diarrhoea from 4 pigherds situated in Buenos Aires Province, Argentina. We used the negative staining for electron microscopy (NSEM) technique, which has been applied for decades because of its simplicity, rapidness and sensitivity. One hundred and forty six samples were collected during one year from suckling (50) and postweaning (96) young pigs. Viral particles were identified in 58% and 53.1% of the suckling and postweaning faecal samples, respectively. Rotavirus-like, coronavirus-like, adenovirus-like, parvovirus-like and small round viruses (SRV) were detected in 32% and 34.4%, 18% and 16.7%, 10% and 9.4%, 4% and 3.1% and, 2% and 1% of suckling and postweaning faecal samples, respectively. Viral combinations were observed in 8% and 10.4% of suckling and postweaning samples, respectively. Rotavirus-like and coronavirus-like particles was the most frequent combination in both categories. The present study identified the presence of several viruses known to be linked to diarrhoea in young pigs. Apart from rotavirus, the detected viruses had never been reported previously in Argentina. The NSEM technique demonstrated to be adequate as a screening test to identify viral particles in faecal specimens. However, more specific tests are needed to confirm the presence of these viruses and also to determine the group or variant of the identified viruses.

Key words: Enteric viruses, diarrhoea in piglets, negative staining in electron microscopy.

Fecha de recepción: 01/03/00

Fecha de aprobación: 10/06/00

Introducción

La intensificación de la producción porcina en la República Argentina, con la importación de núcleos genéticos y el suministro de dietas complejas para lograr un destete precoz, ha ocasionado un aumento de la incidencia de diarrea en lechones. Existen numerosos factores de riesgo involucrados en la presentación de estos cuadros de diarreas entre los que figuran: la edad de los animales, el status inmunológico, el estado nutricional y los factores medio-ambientales (1,2). Estudios sobre heces diarreicas de lechones lactantes y posdestete han identificado diversos géneros de virus considerados agentes causales de enteritis incluyendo rotavirus, coronavirus, calicivirus y astrovirus (3, 4, 5, 6). En condiciones de campo, se han detectado combinaciones entre estos géneros y también asociaciones entre alguno de éstos con bacterias, como *Escherichia coli* (7), o con protozoarios como *Isospora suis* o *Cryptosporidium parvum* (8,9).

Existen numerosos métodos para detectar virus entéricos o sus componentes, entre los que se destacan, por su alta especificidad y sensibilidad, los inmunológicos (10,11) y también los de biología molecular, tales como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (12) y los que emplean sondas de ácidos nucleicos como la hibridización *in situ* (13,14). También existen otras técnicas, como la de tinción negativa en microscopía electrónica (TNME), las que a pesar de ser menos complejas, igual demuestran una adecuada sensibilidad (6,15,16). La TNME se ha utilizado exitosamente en las últimas 3 décadas y se la emplea como prueba tamiz para detectar la presencia de partículas virales en materia fecal. La TNME permite, a través de un criterio morfológico, identificar los géneros de virus presentes y posiblemente involucrados en las diarreas de los animales domésticos. Se diferencia de los métodos inmunológicos o de biología molecular por su menor especificidad, pero, a diferencia de estos, tiene la ventaja de no utilizar reactivos específicos *a priori*, razón que le permite identificar todo el espectro de virus que potencialmente pueda estar presente en la muestra. Además, esta técnica tiene la ventaja de ser rápida y sencilla, en contraste con el aislamiento de virus en cultivos celulares.

En la Argentina, rara vez se realiza el estudio virológico de rutina de las heces diarreicas de lechones. En consecuencia, existe escasa información en nuestro medio sobre los cuadros de diarrea en lechones de etiología viral. Es por ello, que el presente estudio preliminar tuvo como objetivo identificar partículas virales y determinar el

índice de detección de los diferentes géneros, a partir de muestras de heces diarreicas de lechones procedentes de establecimientos de crianza intensiva.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en 4 criaderos intensivos de 120, 150, 220 y 280 madres, ubicados dentro de un radio de 200 Km de la ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires, República Argentina. Todos los establecimientos presentaron antecedentes de diarrea de carácter enzoótico en las etapas de lactancia y posdestete. Los establecimientos fueron periódicamente visitados y se tomaron muestras de materia fecal con una frecuencia semanal, quincenal o mensual, durante el período de un año. Se procesaron un total de 146 muestras de materia fecal, de las cuales 50 correspondieron a lechones lactantes de no más de 25 días de edad y 96 a lechones destetados de no más de 45 días de edad.

Las muestras fueron enviadas al laboratorio refrigeradas a 4°C. A su llegada, fueron suspendidas en solución buffer de fosfato (PBS) pH 7,4 en una dilución al 10% (v/v) y centrifugadas a 6000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante de cada muestra, libre de material grosero, se ultracentrifugó a 45000 rpm durante 2 horas a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspendió en 50 µl de PBS y una gota de la suspensión fue colocada sobre grillas de cobre cubiertas con neoprene al 2% y posteriormente deshidratadas en desecador durante 1 hora (15,16). Finalmente, las muestras fueron coloreadas con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 10% y observadas en un microscopio electrónico JEM 1200 EXII (Jeol Co. Ltd., Tokyo).

Para comparar el índice de detección (expresado en porcentaje) de los diferentes virus identificados se utilizó el análisis de varianza (prueba de Fisher), previa transformación de los datos obtenidos. El nivel de significación utilizado fue del 5%.

Resultados

El índice de detección y la probabilidad de frecuencia de los virus identificados en las heces diarreicas de lechones se detallan en la tabla 1. Se identificaron partículas virales en un 58% y en un 53,1% de las heces diarreicas de lechones lactantes y posdestete, respectivamente. En lechones lactantes, se detectaron partículas virales compatibles con rotavirus en un 32% de las muestras. Estas partículas se caracterizaron por su for-

ma esférica, de entre 67 y 75 nm de diámetro y por presentar una forma distintiva semejante al de una rueda de carro con sus rayos típicos (figura 1). También se identificaron partículas virales compatibles con coronavirus en un 18% de las muestras. Estas partículas se caracterizaron por su pleomorfismo, pero predominando las formas esféricas y con un tamaño que osciló entre 150 y 220 nm de diámetro. La mayoría de las partículas presentaron un centro oscuro rodeado por una corona bien definida y regularmente espaciada con proyecciones semejantes a bastones o pétalos de entre 12 y 20 nm de longitud (peplómeros) (figura 2). Estas partículas también presentaban una segunda hilera de pequeñas proyecciones granulares localizadas cerca de la base de las proyecciones más típicas. Además, se identificaron partículas virales compatibles con adenovirus en un 10% de las muestras. Las mismas presentaron un tamaño de entre 70 y 80 nm de diámetro y forma hexagonal con facetas triangulares. También se observaron partículas muy pequeñas y esféricas de entre 18 y 26 nm de diámetro compatibles con parvovirus en un 4% de las muestras (figura. 3). En su mayoría, se observaron aglutinadas en pequeños acúmulos. Por último, en un 2% de las muestras, se detectaron pequeños virus redondos (PVR) de 28 a 32 nm de diámetro, que podrían corresponderse con la morfología y el tamaño de astrovirus o de calicivirus.

En lechones posdestete se identificaron partículas virales compatibles con rotavirus, coronavirus, adenovirus, parvovirus y PVR en un 34,4%, 16,7%, 9,4%, 3,1% y 1% de las muestras, respectivamente.

No se observaron diferencias significativas en el índice de detección de partículas virales entre lechones lactantes y posdestete ($P > 0,05$). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre los índices de detección total de los diferentes géneros de virus identificados. Se obtuvieron 3 grupos diferentes (a, b y c), dependiendo de la probabilidad de frecuencia obtenida ($F = 7,71$; g.l. = 5/6; $P < 0,05$). El grupo a, correspondiente a partículas compatibles con rotavirus, se presentó como el de mayor frecuencia, siguiéndole el grupo b de partículas compatibles con coronavirus y por último el grupo c, compuesto por partículas virales compatibles con adenovirus, parvovirus y PVR (tabla 1). En algunos de los casos, se detectaron más de un género viral por muestra (tabla 2). Estas combinaciones virales se presentaron en un 8% y en un 10,4% de las muestras de lechones lactantes y posdestete, respectivamente. En ambas categorías, la combinación más frecuente fue de partículas compatibles con rotavirus y partículas compatibles con coronavirus, en un 4% y en un 6,2% de las muestras, respectivamente (tabla 2).

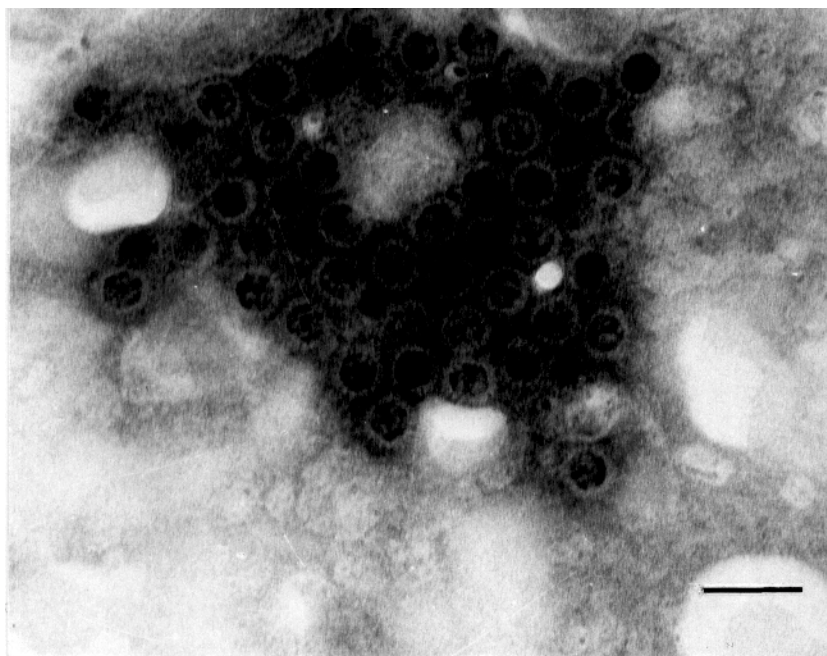


Figura 1. Partículas virales compatibles con rotavirus en heces diarreas de lechones (la barra corresponde a 100 nm). Obsérvese la característica forma semejante al de una rueda de carro con sus rayos típicos.

Figure 1. Rotavirus-like particles in faecal samples of piglets with their distinctive wheellike appearance with its typical spokes. Bar corresponds to 100 nanometers.

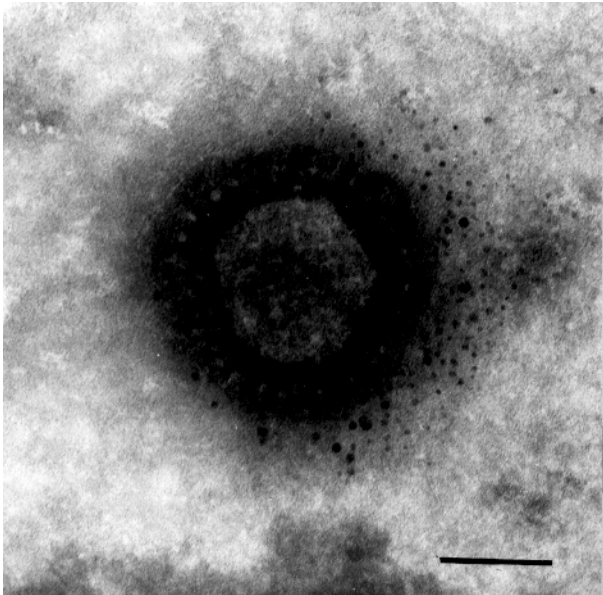


Figura 2. Partícula viral compatible con coronavirus en heces diarreas de lechones (la barra corresponde a 100 nm). Obsérvese el centro electrodenso rodeado por la típica corona de peplómeros.

Figure 2. Coronavirus-like particle in faecal samples of piglets with its electrodense core surrounded by the typical crown composed of peplomers. Bar corresponds to 100 nanometers.

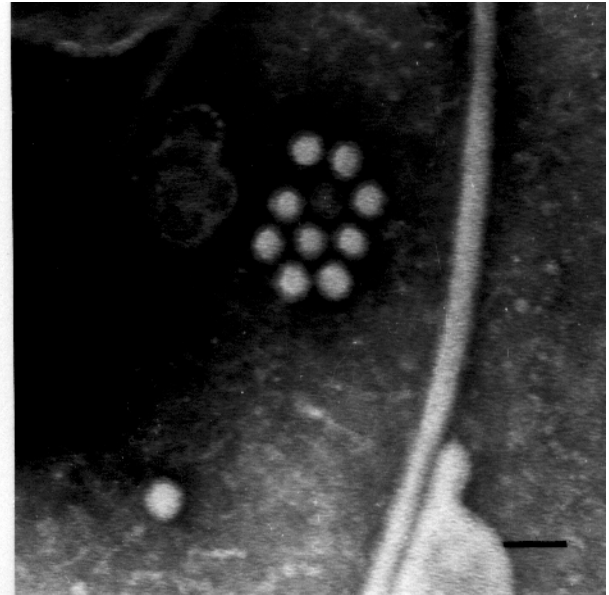


Figura 3. Partículas virales compatibles con parvovirus en heces diarreas de lechones (la barra corresponde a 50 nm).

Figure 3. Parvovirus-like particles in faecal samples of piglets. Bar corresponds to 50 nanometers

Tabla 1. Índice de detección y probabilidad de frecuencia de partículas virales en heces diarreas de lechones lactantes y postdestete

Table 1. Detection rate of viral particles and probability of frequency in faecal specimens of suckling and postweaning piglets

<i>partículas virales compatibles con</i>	<i>muestras- ID* lactancia</i>	<i>muestras- ID* posdestete</i>	<i>muestras- ID total</i>	<i>probabilidad**</i>
<i>rotavirus</i>	16 (32 %)	32 (34,4%)	48 (33,6 %)	<i>a</i>
<i>coronavirus</i>	9 (18 %)	16 (16,7)	25 (17,1 %)	<i>b</i>
<i>adenovirus</i>	5 (10 %)	9 (9,4%)	14 (9,7%)	<i>c</i>
<i>parvovirus</i>	2 (4 %)	3 (3,1 %)	5 (3,4 %)	<i>c</i>
<i>PVR***</i>	1 (2 %)	1 (1 %)	2 (1,4 %)	<i>c</i>
<i>Sumatoria de ID*</i>	33 (66 %)	61 (64,6 %)	94 (64,4 %)	
<i>Muestras positivas♣</i>	29 (58 %)	51 (53,1 %)	80 (54,8 %)	
<i>Muestras negativas</i>	21 (42 %)	45 (46,9 %)	66 (45,2 %)	
<i>Muestras estudiadas</i>	50 (100 %)	96 (100 %)	146 (100 %)	

*índice de detección. **P< 0,05. Las letras difieren cuando los ID totales (expresados en porcentaje) de los diferentes géneros virales encontrados, son significativamente diferentes. Prueba de Fischer. *** pequeños virus redondos.♣ La diferencia entre la sumatoria de ID y las muestras positivas corresponde a las muestras en las que se observaron más de un género viral (combinaciones).

*Detection rate. **P< 0.05. Letters differ when detection rate of different genera (expressed in percentages) were significantly different. Fisher's test. *** Small round viral particle. ♣The differences between the sum of detection rates and positive samples represent the number in which more than one viral genus were detected (combinations).

Tabla 2. Combinación de partículas virales observadas en las heces de lechones lactantes y posdestete
 Table 2. Combination of viral particles observed in faecal samples of suckling and postweaning piglets

Combinaciones virales	muestras- ID*		ID total
	lactancia	posdestete	
<i>rotavirus-coronavirus</i>	2 (4 %)	6 (6,2 %)	8 (5,5 %)
<i>adenovirus-parvovirus</i>	1 (2 %)	2 (2,1 %)	3 (2 %)
<i>adenovirus-PVR**</i>	1 (2 %)	2 (2,1 %)	3 (2 %)
Total de combinaciones	4 (8 %)	10 (10,4 %)	14 (9,5 %)
Muestras estudiadas	50 (100 %)	96 (100 %)	146(100 %)

* Índice de detección. **pequeños virus redondos

Discusión

Este estudio preliminar permitió la identificación de diversos géneros de virus que se consideran agentes causales de diarrea en lechones (3, 4, 5, 6) y que, a excepción de rotavirus (17), no han sido descritos previamente en la República Argentina. Las partículas virales compatibles con rotavirus fueron las más frecuentemente detectadas en las muestras de ambas categorías de lechones. El índice de detección fue similar al obtenido por otros investigadores en Sudáfrica (18) y en Australia (19), utilizando la misma metodología. Asimismo, el índice de detección de rotavirus también se asemejó a la prevalencia de este virus en materia fecal informada por Mattion y col. en lechones de entre 1 y 45 días de edad en la Argentina, empleando las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y de ELISA.

Este estudio mostró también una elevada frecuencia de detección de partículas virales compatibles morfológicamente con miembros del género coronavirus. Dos entidades caracterizadas por diarrea se asocian con este género. Una de ellas, denominada gastroenteritis transmisible (GET), afecta cerdos de todas las edades, pero particularmente animales jóvenes, con una morbilidad cercana al 100% (20). La otra entidad, denominada diarrea epidémica (DE), se caracteriza por afectar lechones posdestete con una morbilidad moderada pero con una baja mortalidad. La GET tiene una ocurrencia esporádica en el Reino Unido y en otros países europeos, pero es común en la zona centro oeste de los Estados Unidos (20). Por el contrario, la DE fue descrita en Europa y Asia pero no fue identificada aún en los Estados Unidos (20). Hasta el presente, no existen datos epidemiológicos en la Argentina sobre la GET y la DE. Serán necesarios estudios serológicos para determinar la prevalencia de estas entidades en nuestro país y también estudios inmu-

nológicos o de biología molecular para determinar a qué variante antigénica del virus corresponden los virus identificados en este estudio.

En publicaciones previas se consignaron los hallazgos parasitológicos y bacteriológicos de estas mismas muestras de heces diarreicas, pertenecientes a los lechones lactantes y de posdestete (21,22). El estudio parasitológico determinó la presencia de *Isoospora suis* en todas las muestras de 2 de los 4 establecimientos estudiados (21). El presente estudio identificó partículas virales compatibles con rotavirus o combinaciones de rotavirus y de coronavirus en esas mismas muestras de materia fecal positivas a *Isoospora suis*. Estos hallazgos no hacen más que confirmar la frecuencia con que se presentan asociaciones entre agentes virales y coccidios (8,9).

El estudio bacteriológico de las heces diarreicas de lechones pre y posdestete realizado previamente permitió el aislamiento de 29 cepas de *Escherichia coli* (22). De éstas, solo 6 mostraron ser productoras de toxina termoestable 1a (ST1a) y solo una de toxina termolábil 1 (LT1). Estas 7 cepas enterotoxigénicas fueron aisladas de muestras de lechones posdestete provenientes de un solo establecimiento (22) y en las que los estudios virológicos y parasitológicos fueron negativos, sugiriendo que esos cuadros de diarrea fueron producidos por las enterotoxinas de *Escherichia coli* sin la acción sinérgica de agentes virales o protozoarios.

En conclusión, el presente estudio preliminar describe, por primera vez en nuestro país, la presencia de partículas virales compatibles con coronavirus, adenovirus, parvovirus y PVR en materia fecal de lechones con diarrea. La frecuencia de detección de partículas virales compatibles con rotavirus y coronavirus sugiere que los mis-

mos pueden contribuir en forma significativa con la presentación de diarreas pre y posdestete en las granjas porcinas estudiadas. Finalmente, la técnica de TNME demuestra ser un método adecuado como prueba tamiz para identificar partículas virales en materia fecal. Sin embargo, necesita de otras pruebas de mayor especificidad, tales como la inmunomicroscopía electrónica, PCR, hibridización *in situ*, ELISA o, de ser posible, el aislamiento viral en cultivos celulares para confirmar los resultados obtenidos y también para determinar a qué grupo o variante pertenecen los virus identificados.

Bibliografía

1. Driesen SJ, Carland PG, Fahy VA. Studies on preweaning piglet diarrhoea. *Aust Vet J* 1993; 70(7): 259-262.
2. Madec F, Josse J. Influence of environmental factors on the onset of digestive disorders of the weaned piglets. *Ann Rech Vet* 1983; 14(4): 456-462.
3. Dea S, Elazhary MA, Martineau GP, Vaillancourt J. Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets. *Can J Comp Med* 1985; 49(3): 343-345.
4. Coussement W, Ducatelle R, Debouck P, Hoorens J. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet Pathol* 1982; 19(1): 46-56.
5. Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J. Sequential pathological study of experimental porcine adenovirus enteritis. *Vet Pathol* 1982; 19(2): 179-189.
6. Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like and 23 nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 105-111.
7. Lecce JG. Dietary regimen, rotavirus, and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weanling diarrhea of pigs. *Ann Rech Vet* 1983; 14(4): 463-468.
8. Roberts J, Walker EJ, Snodgrass DR, Angus KW. Diarrhoea in unweaned pigs associated with rotavirus and coccidial infections. *Vet Rec* 1980; 107: 156-157.
9. Lindsay, D.S.; Blagburn, B.L. *Cryptosporidium parvum* infections of swine. *The Compendium Food Animals* 1991; 13: 891-894.
10. Magar R, Larochelle R. Immunohistochemical detection of porcine rotavirus using immunogold silver staining. *J Vet Diagn Invest* 1992 Jan; 4(1):3-7.
11. Gomez, J.A.; Bercovich, J.A.; Grinstein, S. Comparación entre los métodos de ELISA, contra-inmuno electroforesis y electroforesis en gel de poliacrilamida para el diagnóstico de rotavirus. *Rev Argent Microbiol* 1985; 17(2): 111-114.
12. Woods RD. Development of PCR-based techniques to identify porcine transmissible gastroenteritis coronavirus isolates. *Can J Vet Res* 1997; 61(3): 167-172.
13. Nho W, Sur J, Doster A, Kim S. Detection of canine parvovirus in naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by *in situ* hybridization. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9(3): 255-260.
14. Kulski J, Norval M. Nucleic acid probes in diagnosis of viral diseases of man. *Arch Virol* 1985; 83(1-2): 3-15.
15. Miller SE. Diagnostic virology by electron microscopy. Electron microscopy is a valuable technique for identifying viruses. *ASM news* 1988; 54(9): 475-481.
16. Hammond G, Hazelton P, Chuang I, Klisko B. Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifugation preparation of specimens. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 210-221.
17. Mattion N, Bellinzoni R, Blackhall J, La Torre J, Scodeller E. Antigenic characterization of swine rotaviruses in Argentina. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27(4): 795-798.
18. Geyer A, Sebata T, Peenze I, Steele A. Group B and C porcine rotaviruses identified for the first time in South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 1996; 67(3): 115-116.
19. Ellis GR, Daniels E. Comparison of direct electron microscopy and enzyme immunoassay for the detection of rotaviruses in calves, lambs, piglets and foals. *Aust Vet J* 1988; 65(5): 133-135.
20. Taylor DJ. *Pig Diseases*, 6th ed., Reader in Veterinary Microbiology, Glasgow University, Glasgow, (United Kingdom) 1995; p. 31-39.
21. Perfumo CJ, Venturini L, Sanguinetti HR, Aguirre JI, Armocida AD, Petruccelli MA, Moredo FS. Infección por *Isospora suis* sola o asociada a virus entéricos como causa de alta morbimortalidad en lechones lactantes. *Revista de Medicina Veterinaria* 1998; 79(4): 264-268.
22. Moredo FS, Vigo G, Sanz M, Aguirre JI, Armocida AD, Perfumo CJ. Caracterización enterotoxigénica y estudio de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos con cuadros de diarrea pre y posdestete. *Analecta Veterinaria* 1998; 18, (1/2): 29-34.