



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**TIEMPO DE PROTECCION CONTRA ROTAVIRUS
CONFERIDO POR INMUNOGLOBULINAS SERICAS
ESPECIFICAS ADMINISTRADAS POR VIA ORAL
EN LECHONES.**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM**

T E S I S

Que para obtener el Título de :
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

JAVIER CRUZ SAN PEDRO

A S E S O R E S

DR. HECTOR BARBOSA NAJERA

M.V.Z. JORGE RAUL LOPEZ MORALES

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

Melquiades Cruz López
Valeria San Pedro de Cruz

Con cariño, por todo lo que me han dado.

A MIS HERMANOS:

Emanuel
Olga
Virginia
Fredy

por el apoyo que siempre me han brindado.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Héctor Barbosa Nájera, por su amistad y enseñanza que siempre me ha brindado.

Al Internado Zapotitlán, por todo lo que recibí de él.

A todos mis familiares y amigos que han contribuido en la realización de mi carrera.

C O N T E N I D O

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	26
FIGURAS.....	30
GRÁFICA.....	34
CUADROS.....	35
LITERATURA CITADA.....	40

R E S U M E N

CRUZ SAN PEDRO JAVIER. Tiempo de protección contra Rotavirus conferido por inmunoglobulinas séricas específicas administradas por vía oral en lechones (bajo la dirección de: Héctor Barbosa Nájera y Jorge Raúl López Morales).

Con el objeto de obtener inmunoglobulinas séricas específicas, cinco cerdos adultos de 60 Kg. de peso fueron inoculados con 40 mg por estímulo de Rotavirus porcino, durante cinco veces con intervalos de 15 días, las dos primeras inmunizaciones se realizaron con Adyuvante completo de Freund y las últimas sin él. Ocho días después de la última inmunización los cerdos fueron llevados al rastro, donde fueron sacrificados y se colectó su sangre. Se obtuvo el suero y se precipitaron las inmunoglobulinas con sulfato de amonio, éstas conservaron su capacidad precipitante y neutralizante de la partícula viral en pruebas in vitro. Se utilizaron cuatro camadas de lechones recién nacidos, la mitad de cada una como testigo y la otra como experimental, a los lechones experimentales se les administró desde el nacimiento y durante los primeros cinco días, 4 g de inmunoglobulinas obtenidas de los cerdos inmunizados, por vía oral. Las camadas fueron desafiadas con 10^6 partículas de Rotavirus a las 2, 8, 24, y 96 horas después de la última toma de inmunoglobulinas. Se logró reproducir la enfermedad en el 56% del total de los animales 18/32. De ellos el 66% 12/18, pertenece al grupo experimental y el 42% 6/14 al grupo testigo. El periodo de incubación fue diferente entre ambos grupos, siendo de 81 horas promedio para el grupo experimental y 45 para el grupo control.

I N T R O D U C C I O N

IMPORTANCIA

La causa más frecuente de mortalidad en recién nacidos en nuestro país, tanto en humanos como en otras especies es la diarrea (15, 33).

Los agentes etiológicos frecuentemente productores de diarrea son las bacterias, los virus y los parásitos. Dentro de los virus más comunmente aislados en niños tenemos al Rotavirus (1, 8, 36).

En dos estudios realizados en México se demostró la importancia que tiene el Rotavirus como productor de diarreas en niños. En uno de ellos se demostró la presencia de este virus en la materia fecal del 15.1% de niños menores de cinco años con gastroenteritis infecciosa aguda, de un total de 232 casos (33); en el otro en el 18.2% en un total de 77 niños con diarrea adquirida en hospitales (34). La diarrea por este virus se presenta principalmente en niños en los primeros dos años de vida, aunque pueden ser afectados hasta los doce años de edad (1, 8, 19).

La infección por Rotavirus se incrementa de una manera significativa en lugares donde haya cambios estacionales muy bruscos, ya que en los meses fríos puede llegar a tener una incidencia de 50-60% (8, 19, 31). En India 1.4 millones de niños mueren anualmente por diarrea, asimismo en países subdesarrollados la mortalidad infantil es muy alta, esto se debe principalmente al bajo nivel de nutrición e higiene en que se vive (21). También en Cerdos, Bovinos, Equinos, Ovi-

nos y otras especies este virus tiene gran importancia como agente primario de diarreas en recién nacidos (10, 19, 29, 31) además de que al asociarse con E. coli principalmente las pérdidas que ocasiona por muertes aumentan en gran medida, esto se demuestra en un estudio realizado por House et al (18), en el que se demostró que el Rotavirus en becerros como agente único productor de la enfermedad produce de un 3.2-9.1% de pérdidas y éstas se incrementan a 8.7-21.1% cuando se asocia con E. coli.

Hablando específicamente del cerdo, tenemos que el Rotavirus es de gran importancia como productor de diarreas en la etapa comprendida entre el nacimiento y el destete, que es la edad en que los lechones son más susceptibles (5, 40, 47). La mortalidad que puede provocar esta infección es de un 20 50% y se incrementa cuando se asocia con E. coli (14)

La infección por Rotavirus en cerdos se considera que es muy común y está difundida en la mayoría de las granjas sobre todo en aquellas en las que no se tienen buenas medidas de limpieza y manejo en el área de maternidad (5).

VIRUS

En 1975 la Organización Mundial de la Salud reportó al Rotavirus como productor de diarreas en neonatos (24), y en 1976 se reportó por primera vez a un Rotavirus porcino como causante de diarreas en lechones (5).

El nombre del Rotavirus (del latín rota=rueda), se basa en la apariencia del borde externo de la cápside del vi-

rus el cual simula una rueda con eje ancho, rayos cortos y borde bien definido al ser observado en el microscopio electrónico (5, 19, 24). Las partículas tienen una cápside de doble envoltura y su diámetro es aproximadamente de 60-70 nm; las partículas virales en las que la cápside externa no está presente muestran bordes rugosos y tienen 50-60 nm de diámetro; el centro de la partícula tiene un diámetro de 33-40 nm. Posee un genoma de 11 segmentos de ARN de doble banda, y de acuerdo al patrón de migración de estos segmentos observados por electroforesis en geles de poliacrilamida, es posible de terminar de qué especie se trata (19,32). Otro método para la identificación del virus es la prueba de reducción en placa, la cual es bastante confiable aunque requiere de un antisuero con un título elevado para la identificación del virus, sin embargo es mas simple que la prueba de inhibición de la hemaglutinación, análisis inunisorbente ligado a enzimas (E LISA), inmunofluorescencia, prueba de neutralización o que la electroforesis en gel de poliacrilamida (12).

Los métodos para la replicación del Rotavirus porcino que se utilizan son sistemas in vivo, en los cuales se inoculan lechones recién nacidos, aunque se tienen problemas para ello debido a la transferencia de anticuerpos por el calostro y leche maternas, y a la gran incidencia de diarreas de diferente etiología en los recién nacidos, por ello se prefiere la utilización de lechones gnotobióticos o lechones privados de calostro (lechones "cachados"); para la replicación in vitro, se han utilizado células de riñón de cerdo (PK-15) y células de riñón de embrión de mono rhesus -

(MA-104), estos cultivos se utilizan principalmente para la prueba de reducción en placa o para la prueba de neutralización de anticuerpos y se ha visto que la adición al medio de pancreatina, tripsina, quimiotripsina y DEAE-dextrán favorecen la replicación del virus ya que hay una mejor infección de las células (5, 12, 38, 46).

El Rotavirus es relativamente resistente ya que soporta una variación de 3-9 en el pH; en la materia fecal puede resistir durante 30 minutos a 60°C, y de 7-8 meses a 18-20°C. También es relativamente resistente a desinfectantes a base de iodo, sin embargo es inactivado por medio de la pasteurización a 63°C por 30 minutos (46).

PATOGENESIS

En el intestino delgado el Rotavirus se replica preferentemente en las células del epitelio columnar, lo que causa atrofia, destrucción y descamación de las vellosidades, provocando que se diferencie en un epitelio cuboidal, esto trae como consecuencia una disminución en el proceso de digestión y absorción que se lleva a cabo en la superficie del intestino; las porciones más afectadas del intestino son el yeyuno de íleon (22, 39, 40).

Entre las sustancias que no son absorbidas por el intestino se encuentran el fierro, grasas, glucosa y sodio; la deficiente absorción de estos elementos aunada a la de otros productos de la fermentación, intensifican la fuerza osmótica atrayendo líquidos a la luz intestinal, desarrollándose de

esta manera la diarrea. Debido a la mala absorción y digestión se favorece la proliferación bacteriana en la ingesta parcialmente digerida, y se disminuye el pH agravando aún más el problema (25).

El período de incubación de la infección por Rotavirus, es de 12-36 horas y los signos que se observan son: anorexia, diarrea acuosa o pastosa y blanca o amarilla, depresión, renuencia a moverse y ocasionalmente vómito; también se puede observar una severa deshidratación y una pérdida de peso de hasta un 30% (39, 46). En otros estudios se menciona que los lechones enfermos no pierden el apetito y permanecen alertas durante la enfermedad (42).

MECANISMOS DE DEFENSA GASTROINTESTINALES

La vía oral es una de las puertas de entrada más frecuentes de agentes patógenos, ya que se encuentra constantemente en contacto con ellos. Para evitar el acceso de estos patógenos cuenta con mecanismos de defensa, éstos son: (13, 28, 44). Mecanismos no Inmunológicos.

a) Revestimiento mucoide.- Las mucinas (glicoproteínas y glicolípidos que se encuentran en el revestimiento mucoso del epitelio gastrointestinal), tienen una estructura molecular similar a los componentes del epitelio el cual actúa como receptor para microorganismos o sus toxinas. Las mucinas por lo tanto pueden reducir la adherencia al epitelio intestinal por inhibición competitiva de los sitios receptores epiteliales.

b).- Barrera Gástrica.- La acidez gástrica puede inactivar a un gran número de microorganismos o sus toxinas antes de que alcancen la porción baja del intestino. Esto se observa en individuos con aclorhidria en los cuales se presenta un mayor número de infecciones gastrointestinales.

c).- Enzimas proteolíticas y sales biliares.- Estos compuestos inhiben el crecimiento bacteriano in vitro aunque, en el tracto intestinal, su papel de protección al huésped no está bien comprendido.

d).- Peristaltismo.- La actividad peristáltica normal junto con otros factores que reducen la adherencia microbiana pueden ser considerados como un importante mecanismo de defensa para el huésped.

e).- Flora bacteriana nativa.- Los microorganismos intestinales son importantes en la defensa del huésped hacia agentes patógenos. La flora microbiana normal reduce el número de patógenos compitiendo por sustratos, alternando el microambiente y produciendo sustancias bactericidas, tales como las colicinas producidas por E. coli saprófitas en contra de E coli patógenas.

f).- Barrera hepática.- Ciertas moléculas como las endotoxinas pueden atravesar el intestino delgado y entrar a la circulación portal, en estos casos el hígado actúa como una segunda línea de defensa filtrando las moléculas de la circulación. En casos de destrucción hepática o paso de sangre por tal a la circulación venosa, esta barrera puede perderse,

dando lugar a un incremento de la frecuencia de enfermedades infecciosas.

Mecanismos Inmunológicos

a).- Anticuerpos IgA, IgE, IgG e IgM:

-IgA.- Esta inmunoglobulina es sintetizada por las células plasmáticas que están situadas en el epitelio de los órganos que están en contacto con el medio ambiente externo. De esta manera la IgA es la inmunoglobulina predominante en las secreciones de la glándula mamaria, glándulas salivales, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y tracto genito-urinario. La IgA secretoria a nivel intestinal actúa limitando la entrada de antígenos extraños a través del epitelio intestinal. Una molécula antigénica, de tamaño relativamente pequeño que penetra la superficie epitelial producirá una estimulación para la síntesis de los anticuerpos IgA locales, los cuales prevendrían la subsecuente reentrada del antígeno formando con éste un complejo antígeno-anticuerpo que, debido a su tamaño, no puede penetrar a través del epitelio intestinal. De manera similar las inmunoglobulinas A pueden neutralizar toxinas, o pueden limitar la movilidad y penetración de patógenos potenciales de las superficies externas.

- IgE, IgG e IgM.- Estas inmunoglobulinas pueden ser producidas local o sistemáticamente, y pueden llegar al lumen intestinal por difusión de la corriente sanguínea o de los tejidos locales. En contraste con la IgA, éstas pueden atravesar las células epiteliales de las puntas de las vellosidades y no contienen el componente secretorio, de esta manera

sufren la digestión por lisozimas intracelulares y enzimas intraluminales. Por lo tanto sólo están presentes en el lumen en pequeñas cantidades, excepto en casos de inflamación de la pared intestinal, cuando se incrementa el exudado y resultan concentraciones potenciales para la protección en el lumen.

b) Respuesta inmune mediada por células.- Las células linfoides de la mucosa y de la lámina propia junto con los tejidos linfoides asociados al intestino (placas de Peyer), contienen los tipos celulares necesarios para montar una respuesta inmune mediada por células, y la recirculación de los linfoblastos T hacia el intestino otorgan un mecanismo para colocar a las células sensibilizadas en los lugares apropiados.

INMUNIDAD INTESTINAL PASIVA EN LECHONES

En la cerda al igual que en los equinos y rumiantes debido al tipo de placentación que tienen (cerda y equinos = epiteliocorial, rumiantes = sindesmocorial), no hay paso de inmunoglobulinas de la madre a la cría a través de la placenta (9, 27, 41). A causa de esto los lechones nacen agamaglobulinémicos y requieren de la ingestión de calostro para adquirir inmunoglobulinas, ya que la absorción de macromoléculas incluyendo las inmunoglobulinas son absorbidas por las células epiteliales, intactas en las primeras 24-48 horas de vida (6).

En la infección por Rotavirus se producen anticuerpos-

del tipo IgA, IgG e IgM, sin embargo estos anticuerpos se en encuentran en diferentes concentraciones en el suero, calostro, leche y heces, ya que estudios realizados demuestran que en el calostro y suero se encuentran los tres tipos aunque predominan la IgG e IgM, y en la leche y heces se encuentra prin cipalmente la IgA (7, 17).

Debido a que el Rotavirus tiene una amplia distribución en las granjas porcinas, provoca que la mayoría de los cerdos adultos tengan anticuerpos contra él; esto puede explicar en parte la baja frecuencia de esta enfermedad en forma clínica en las primeras dos semanas de vida de los lechones, que es cuando hay una mayor cantidad de anticuerpos transmitidos de la madre a la cría por el calostro y la leche (17).

Uno de los principales objetivos contra la infección de Rotavirus es su prevención, principalmente por la necesidad de protección que tienen los recién nacidos (37). Se ha estudiado la inmunidad activa en lechones utilizando una vacuna con Rotavirus de becerros, y los resultados no fueron satisfactorios, ya que al ser desafiados con el Rotavirus porcino sufrieron la enfermedad (20).

Por otra parte se sabe también que la administración pasiva de inmunoglobulinas séricas por vía oral a lechones recién nacidos ha logrado disminuir la mortalidad (16, 30, 37), con esta práctica se logró disminuir la mortalidad en un 26. 42% hasta los 45 días de edad (43), en otra prueba se tuvo una disminución en la mortalidad de 22% observado en los

controles a 9% en los animales a los que se les administró suero de cerdos adultos, además de provocar un aumento de peso del 6% más que los testigos y un tiempo al mercado menor (26).

En cuanto a la importancia de las pérdidas económicas que se tienen en la industria porcina en la etapa de lactancia tenemos lo siguiente: en México en 1981 se tenían 17, 562 217 cabezas de ganado porcino y una producción de 1, 306, 617 toneladas de carne (35), y se estima que para 1985 se tendrá un déficit promedio de 34, 800 toneladas anuales de carne de cerdo. Por lo tanto para poder aumentar la producción porcina se debe tener especial atención a la etapa de lactancia, que es donde se tiene la mayor mortalidad (15).

Ahora bien, dentro del marco carencial de proteína de origen animal que padece nuestro país, merece especial atención la producción porcina ya que, la carne de cerdo es un excelente almacén de proteínas, vitaminas, minerales y grasa. En la mayoría de los países latinoamericanos y de otras partes del mundo, forma parte importante de la dieta alimenticia, constituyendo su consumo un hábito difícil de sustituir.

Una vez expuesto lo anterior, considero que la infección por Rotavirus es importante en la industria porcina y merece ser estudiada, y tomando en cuenta los estudios realizados anteriormente (16, 26, 30, 43), creo que la administración por vía oral de inmunoglobulinas séricas específicas a lechones recién nacidos, puede ayudar a evitar una infección gastrointestinal. Por lo tanto se plantea el siguiente obje

tivo: Determinar el tiempo de protección que confieren las inmunoglobulinas séricas administradas por vía oral en lechones recién nacidos a la infección con Rotavirus.

M A T E R I A L Y M É T O D O S

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron cuatro camadas de lechones recién nacidos de las cuales la mitad de cada una se utilizó como experimental y la otra como testigó.

A todos los lechones experimentales se les administraron 4 g de inmunoglobulinas por vía oral diariamente durante los primeros cinco días de vida, posteriormente se desafiaron con 5 ml de heces de lechones enfermos por Rotavirus (aproximadamente 10^6 partículas virales). El desafío se realizó a las 2, 8, 24 y 96 horas después de la última toma.

E S Q U E M A D E D E S A F Í O

camada	Días de vida de los lechones y administración de las inmu- noglobulinas.					Horas después de la última toma y momen- to del desafío.				
1	1	2	3	4	5					96 D
2		1	2	3	4	5				24 D
3			1	2	3	4	5			8 D
4				1	2	3	4	5		2 D

D = Momento del desafío.

Los lechones fueron vigilados estrechamente para determinar la hora de aparición de los signos de la enfermedad, y se tomaron muestras de heces para la identificación del virus.

ANIMALES

Para la obtención del suero hiperinmune, se utilizaron cinco cerdos de aproximadamente 60 kg de peso, machos castrados de la raza Yorkshire-Landrace, provenientes de la Granja Experimental Porcina de la FMVZ, UNAM. Estos cerdos fueron inmunizados en cinco ocasiones con intervalos de quince días, en las dos primeras se utilizaron 40 mg de virus más adyuvante completo de Freund a volúmenes iguales y en las tres últimas sólo se utilizó 40 mg del virus, las aplicaciones fueron por vía subcutánea detrás de la oreja. Siete días después de la última aplicación, los cerdos fueron llevados al rastro donde se sacrificaron y la sangre fue colectada para la obtención del suero.

Para la obtención de lechones, se utilizaron además cuatro cerdas gestantes primerizas de ocho meses de edad, híbridas de la raza Yorkshire-Landrace. Estas cerdas fueron trasladadas siete días antes del parto, de la Granja Experimental Porcina al Departamento de Cerdos de la FMVZ, UNAM, se colocaron en aislamientos individuales que previamente fueron lavados con jabón y cepillo y después desinfectados con vapores de una mezcla formaldehído/permanganato de potasio.

Los lechones hijos de las cerdas se manejaron de la siguiente manera: se atendieron los partos y a los lechones se les suministró una fuente de calor y cama en las lechoneras, a los tres días de edad se les aplicaron 200 mg de hierro a cada lechón por vía intramuscular. Se permitió la lactancia libre y a partir del décimo día se les empezó a dar alimento

concentrado. Las cerdas fueron alimentadas con alimento para lactantes y la cantidad fue en relación con el tamaño de la camada.

ADYUVANTE

Para la inmunización de los cerdos adultos se utilizó adyuvante completo de Freund, el cual se preparó mezclando ochentaicinco partes de aceite mineral más quince partes de lanolina y cinco mg/ml de Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv esterilizado en autoclave y liofilizado.

ANTIGENO

Para la producción de antígeno suficiente para la inmunización de los cerdos y el desafío de los lechones, el Dr. Romilio Espejo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, donó 1 ml de Rotavirus con los cuales se infectaron células MA-104, para obtener una mayor cantidad del virus, utilizando la siguiente técnica para su cultivo: se utilizaron tres botellas BEP con una monocapa completamente confluyente de células MA-104. Se incubó el virus en un tubo Eppendorf estéril con tripsina 10 µg/ml durante una hora a 37°C, la tripsina se diluyó a partir de una concentración de 1% en Medio Mínimo Esencial (MEM) sin Suero Fetal Bovino (SFB). Después de incubar al virus se lavaron las botellas BEP dos veces con MEM sin SFB, posteriormente se infectó cada botella con 0.4 ml de virus, se cerraron las botellas y se incubaron durante una hora a 37°C, distribuyendo el inóculo cada 15 mi

nutos sobre la capa (moviendo las botellas), a continuación se aspiró el inóculo y se agregaron 3 ml de MEM, sin apretar la tapa de las botellas se incubaron a 37°C y 5% de atmósfera de CO₂, se observaban diariamente al microscopio para ver el efecto citopático, a los cinco días y una vez que se observara la lisis de las células por la replicación viral en ellas, se cosechó el virus agitando las botellas para el desprendimiento de las células, y posteriormente se aspiró con vacío todo su contenido (11).

Con el virus obtenido se infectaron tres lechones de cinco días de edad, se colectó la diarrea de estos lechones durante tres días, con una parte de ella se purificó el virus por el método descrito por Bishop et al (4), y con él se inmunizaron a los cerdos. La otra parte de la diarrea se conservó en congelación para la infección de los lechones en la prueba de desafío.

Ensayo en placa para cuantificar partículas virales

Para determinar el número de partículas virales se utilizó la técnica de ensayo en placa.

Se utilizaron botellas de 25 cm², con una monocapa totalmente confluyente de células MA-104. El virus se incubó en tubos Eppendorf estériles con tripsina 10 µg/ml durante una hora; la tripsina se diluyó a partir de una concentración de 1% con MEM sin SFB. Después de incubar el virus se hicieron diluciones con MEM sin SFB. Se infectó cada botella con 0.4 ml de virus. Se cerraron las botellas y se incubaron durante una hora a 37°C, distribuyendo el inóculo

cada 15 minutos sobre la capa. A continuación se aspiró el inóculo y se adicionó agar desde el lado opuesto de la monocapa, dejando que la cubriera poco a poco (3 ml de agar por botella). Posteriormente se dejaron las botellas cerradas durante 30 minutos, con el agar sobre las células y cubiertas con papel. Luego se incubaron las botellas invertidas cubiertas con papel, a 37°C y 5% de atmósfera de CO₂, hasta que se formaron las placas de lisis de las células por la replicación viral.

El agar se prepara en MEM sin SFB y con rojo neutro, de tal manera que el virus que se absorbe a una célula, sólo infecta a las células vecinas, y con el rojo neutro se pueden visualizar las placas.

OBTENCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS

La sangre de los cerdos sacrificados en el rastro se colectó en recipientes individuales y se dejó coagular a temperatura ambiente, posteriormente se desprendió el coágulo de las paredes y se fraccionó para permitir la máxima retracción del mismo, luego se mantuvo 12 horas a 4°C. El suero se separó por decantación y se centrifugó a 850 gravedades (G) durante 25 minutos a 4°C, para eliminar restos celulares.

Para la obtención de las inmunoglobulinas se precipitó el suero con sulfato de amonio al 33% (3), se añadió lentamente al suero en agitación, una solución saturada de sulfato de amonio con pH 8, de tal manera que al final la cantidad añadida fue la mitad de la cantidad total del suero, a

continuación la mezcla se centrifugó a 7,000 G durante 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua destilada, se volvió a agregar sulfato de amonio, y se centrifugó nuevamente, esto se repitió hasta que el sobrenadante fue transparente. El precipitado obtenido finalmente se resuspendió en solución salina isotónica amortiguada con fosfatos 0.01 M, pH 7.4 (PBS), posteriormente fue dializado contra la misma solución para eliminar el sulfato de amonio, esto se continuó durante cuatro días, cambiando dos veces cada día la solución, la cual estuvo en agitación. Una vez eliminado el sulfato de amonio las inmunoglobulinas se conservaron en congelación hasta su utilización.

Identificación de los anticuerpos

Para la identificación de los anticuerpos producidos contra el virus se realizó la prueba de Inmunolectroforesis, para ello se sangraron a los cerdos el mismo día de cada inoculación, el sangrado se realizó en la vena marginal de la oreja y se extrajeron 5 ml de sangre por cerdo, ésta se dejó coagular a temperatura ambiente, se separó el coágulo de las paredes de los tubos y posteriormente se mantuvo en refrigeración durante 12 horas a 4°C, luego se eliminó el coágulo y se centrifugó a 475 G durante 15 minutos a 4°C para separar el suero. También se utilizaron inmunoglobulinas obtenidas del sangrado final para comprobar su funcionalidad.

La técnica de Inmunolectroforesis consiste en una electroforesis inicial del antígeno, utilizando agar al 1% en una

solución amortiguadora de barbituratos 0.05 M, pH 8.6.

El agar se disolvió por ebullición en baño María; ya en forma líquida se colocó sobre portaobjetos y se dejó gelificar, se perforaron dos pozos y en ellos se colocó el antígeno, una vez realizada la electroforesis (2 horas a 1.5 miliamperes por portaobjeto), se horadó un canal en medio de los dos pozos (a 6 mm aproximadamente de cada uno), y se colocó el suero. Posteriormente se dejó difundir durante 24 horas en una cámara húmeda a temperatura ambiente; a continuación las placas se colocaron en solución salina 0.85%, pH 7.4, realizándose tres cambios de la solución una cada 24 horas, se dejó posteriormente en agua destilada durante dos horas. Para su tinción, las placas se secaron con papel filtro y se tiñeron con solución de negro de amido al 1% durante 15 minutos, se retiró el exceso de colorante con agua destilada y después se agregó ácido acético al 10%.

Neutralización del virus en cultivo celular

Para determinar la capacidad neutralizante de las inmunoglobulinas obtenidas, se realizó la prueba de placas de lisis, la cual es semejante al ensayo en placa para cuantificar partículas virales, solo que después de activar al virus con tripsina, éste se incubó durante 30 minutos con diferentes diluciones de las inmunoglobulinas. Se incubaron a volúmenes iguales, las diluciones de las inmunoglobulinas y una cantidad constante de virus (10^6 partículas). Posteriormente se infectaron las células, y se continuó con la técnica.

Al final se observó en que dilución de las inmunoglobulinas se logró inhibir al 50% de las placas de lisis.

ROTAFORESIS

A todos los lechones enfermos con diarrea después del desafío con Rotavirus, se les tomó muestras de heces para la identificación del virus.

Para la identificación de este virus en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, han desarrollado una técnica de diagnóstico, la cual se basa en la identificación electroforética de los once segmentos de ARN que caracterizan al Rotavirus, y se considera positivo al observarse cuando menos los cuatro primeros.

Para el desarrollo de esta técnica, en nueve tubos de ensaye se colocaron 0.4 ml de solución acuosa A (diluída 0.8 ml de sol. A 5 X en 3.6 ml de agua destilada) a un décimo tubo se le agregaron 0.2 ml de esta solución A los nueve primeros tubos se le agregaron una gota (0.05 ml) de la muestra de heces, en caso de que tuviese una consistencia ~~es~~ sólida o semisólida, se añadía una gota de la suspensión diluida al 50% en una solución fisiológica de cloruro de sodio (0.85%). Al décimo tubo se le adicionó 0.2 ml de un control positivo, hecho esto se agregaron a todos los tubos 0.2 ml de solución B, se agitaron vigorosamente y se añadieron 0.2 ml de cloroformo y se continuó con la agitación. Posteriormente se centrifugaron a 475 G durante 10 minutos a 4°C, obteniéndose dos fases y se tomaron tres gotas (0.15 ml) de la fase acuosa (superior) las cuales se colocaron en tubos limpios.

Se puso a fundir la solución C en baño de agua hirviente

te durante 15 minutos, se tomaron de ella 0.05 ml y se depositaron en cada uno de los diez tubos, manteniéndolos a 60°C en baño María. Con una pipeta se colocaron las muestras en los pozos de la placa de poliacrilamida; una vez solidificado el gel, se puso en la cámara de electroforesis, de tal manera que los pozos quedaran hacia la terminal negativa de la cámara y se agregaron 50 ml de solución D (diluida 5 ml de sol. D 10 X en 45 ml de agua destilada). Una vez que el gel estaba totalmente cubierto por esta solución se conectaron los electrodos a una fuente de poder a 150 V, hasta que el colorante hubiese corrido en forma completa.

Una vez terminada la electroforesis, se colocó el gel en un recipiente de vidrio y se lavó durante 30 minutos en solución E (diluida 5 ml de sol. E 10 X en 45 ml de agua destilada). Después de retirar completamente la solución E, se lavó el gel durante 30 minutos con 50 ml de solución F (diluida 0.5 ml de sol. F 100 X en 50 ml de agua destilada), posteriormente se enjuagó dos veces con agua destilada y se agregaron 50 ml de solución G (diluida 0.4 ml de sol. G 125 X en 50 ml de NaOH al 3%). Al aparecer las bandas en el control positivo se retiró la solución G y se detuvo la reacción con ácido acético al 1% (*).

Inhibición de la hemaglutinación

A las cuatro cerdas se les tomó una muestra de calostro

(*) Espejo, T.R. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Comunicación personal 1985.

para determinar la presencia de anticuerpos anti-Rotavirus.

Para esto se desarrolló la técnica de inhibición de la hemaglutinación, tomando en cuenta la propiedad que tiene es te virus de aglutinar eritrocitos de bovino y humano tipo O (41).

Se tomaron 5 ml de calostro por cerda, se mantuvo en refrigeración durante 24 horas a 4°C añadiendo HCl a 0.1 N, para separar el suero, posteriormente se centrifugó a 60,000 G durante 30 minutos a 4°C, se utilizó eritrocitos de humano tipo O⁻ al 2.5% lavados con PBS, pH 7.4. El virus para esta técnica contenía 25 mg/ml. Para las diluciones se utilizó PBS-Albúmina (PBSA) al 0.1%.

En una placa de hemaglutinación se puso 25 µl de PBSA a todos los pozos, luego al primero de cada hilera se adicio nó 25 µl de cada uno de los sueros, se agitó y se iniciaron diluciones dobles pasando 25 µl al pozo siguiente, después se agregaron 50 µl de virus, se dejó reposar durante 15 minutos y se adicionaron 25 µl de eritrocitos. Una hora después se observaron los resultados.

R E S U L T A D O S

Animales:

Las camadas obtenidas, fueron de número y peso adecuado al nacimiento, y se mantuvieron en buenas condiciones durante la administración de las inmunoglobulinas, lo que permitió que el desafío se llevara a cabo sin problemas.

Después de la prueba, los lechones siguieron lactando normalmente hasta los 28 días en que fueron destetados.

Las cerdas tuvieron un parto normal y no presentaron problemas durante la lactancia, y al final de ésta fueron destinadas para el abasto.

PRODUCCIÓN DEL ANTISUERO

Los cerdos utilizados para la producción del antisero respondieron adecuadamente al proceso de inmunización, y llegaron al peso de mercado a la edad adecuada por lo que no hubo problemas para su venta al rastro. Las inmunoglobulinas obtenidas del suero de estos animales, precipitaron el virus en una prueba de Inmunolectroforesis, en la cual se observa una banda nítida de precipitación, que no existe cuando se utilizan inmunoglobulinas de los animales antes del proceso de inmunización, y de esta manera se comprobó la existencia de anticuerpos específicos contra el virus (Figura 1); el título de la preparación final fue de 10^4 , ya que con ella se produjo una reducción del 50% de las placas de lisis, como se observa en la botella A (Figura 2), de tal manera que se probó que los anticuerpos obtenidos además de reconocer la

partícula viral, poseían la capacidad de neutralizar la infectividad del virus en cultivo celular.

IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS

La técnica de Rotaforesis realizada con las muestras de heces, de los lechones enfermos después del desafío con el Rotavirus, resultó positiva en todos los casos, ya que se pudieron observar las bandas características del ARN de este virus en el gel de poliacrilamida, las cuales fueron similares a las observadas en el control positivo colocado en el carril 10 (Figura 3), de esta manera se comprobó que los cuadros de diarrea fueron producidos por el agente inoculado.

RESPUESTA DE LOS LECHONES AL DESAFÍO.

La inoculación de 10^6 partículas virales, ocasionó el cuadro clínico característico en un 56% de los animales retados (18/32), (Cuadro 1).

El cuadro clínico en todos los animales fue muy leve, con aproximadamente 10 evacuaciones diarreicas en 24 horas, tiempo máximo en que se pudo observar el cuadro (Cuadros 2-5).

No hubo diferencias significativas entre los grupos testigo y experimental (Cuadro 1), y en todos los grupos, el número de animales enfermos fue mayor en el grupo experimental que su grupo testigo respectivo.

Tampoco hubo diferencias en la severidad del cuadro clínico, ya que ambos grupos -experimental y testigo- lactaron normalmente durante el tiempo que estuvieron enfermos, no se

observó pérdida de peso aparente, ni hubo cambios en la actividad normal de los animales, los cuales permanecieron alertas sin manifestaciones de enfermedad excepto la diarrea; la cual pudo demostrarse fue causada por el Rotavirus (Figura 3).

La distribución de los cuadros clínicos permite observar una distribución al azar, ya que en las 4 camadas se presentaron animales enfermos.

Algo interesante se hace notar es el periodo de incubación, el cual fue significativamente mayor en el grupo experimental (81 horas promedio), comparativamente al grupo testigo (45 horas promedio).

El título de anticuerpos en el calostro de las cerdas no fue una variable importante, pues ninguno de los cuatro pudo inhibir la hemaglutinación causada por el virus (Figura 4).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los cerdos respondieron satisfactoriamente al proceso de inmunización, ya que produjeron anticuerpos con demostrada capacidad precipitante (Figura 1) y neutralizante (Figura 2), por lo que aunado a los antecedentes (2, 16), permite considerar al cerdo destinado al consumo humano, como una fuente ideal para obtener anticuerpos en forma comercial, lo que significa un cambio importante dentro de la Zootecnia.

La técnica de Rotaforesis permitió identificar al Rotavirus, en la heces de los lechones enfermos después del desafío, lo que confirma que, la diarrea fue causada por el agente inoculado y que los métodos utilizados -cultivo celular y la infección de lechones recién nacidos- tal como lo mencionan otros autores fueron los adecuados para la replicación viral (38, 46).

La dosis de virus administrada resultó baja, pues no permitió el 100% de morbilidad, a pesar de ser 10 veces mayor a la utilizada para enfermar a lechones privados de calostro (23). Además la posibilidad de reproducir el cuadro clínico por Rotavirus parece difícil, ya que como han señalado anteriormente (5, 14, 18), este virus es un agente patógeno poco virulento que causa cuadros leves y de baja mortalidad, excepto cuando se suman otros agentes patógenos como -E. coli y el virus de la GET. Los factores ambientales: humedad, suciedad y frío, son coadyuvantes importantes en la presentación del cuadro clínico, ya que permiten la reinfección de los animales con sus heces diarreicas (5). Dado que

esto no fue permitido en el experimento por la limpieza en que se mantuvieron a los lechones, quizá haya influido importantemente en el número de enfermos que se registró.

No se encontraron diferencias entre el número y severidad del cuadro clínico entre ambos grupos -experimental y testigo-, la distribución de la enfermedad en las camadas demuestra que la cantidad de inmunoglobulinas administrada a los lechones resultó baja, y permite suponer una susceptibilidad mayor de algunos animales que otros, dentro de un mismo grupo sujetos a las mismas condiciones de alimentación y manejo, las que fueron similares al diseñar el experimento, manteniendo al grupo testigo dentro de la misma camada que el experimental, lo cual es válido para cualquier enfermedad infecciosa, ya sea viral, bacteriana o parasitaria.

La concentración de anticuerpos específicos en la muestra de inmunoglobulinas administrada a los lechones resultó baja, pues no se logró influir en la morbilidad de la enfermedad; sin embargo esta cantidad de anticuerpos fue suficiente para modificar el periodo de incubación (45 horas en el grupo experimental contra 81 horas en el grupo testigo), (Gráfica 1), si consideramos que el periodo de incubación está en relación directa a la dosis infectante, se puede suponer que las inmunoglobulinas administradas lograron disminuir el número de partículas virales infectivas, pero no neutralizarlas en su totalidad, de tal manera que el número de virus no neutralizado, fue capaz de infectar la célula y multiplicarse diseminándose a la célula vecina, hasta lograr

infectar un número de células suficiente para que se presentara la enfermedad, en un número reducido de animales, lo que concuerda con los hallazgos de otros autores, como por ejemplo la inoculación accidental de 45, 000 personas con virus de la hepatitis B, de las cuales solamente se manifes-taron clínicamente 1, 000 casos (45).

Por otro lado, aunque en el calostro de las cerdas se pueden encontrar anticuerpos que pueden neutralizar a los agentes patógenos, en este trabajo no se encontraron en can-tidades importantes en contra del virus medido por la prueba de inhibición de la hemaglutinación, por lo que esta varia-ble no fue considerada importante.

En resumen se puede concluir que los resultados obteni-dos en este trabajo concuerdan con los de otros autores, en los que se demuestra que el Rotavirus es un agente patógeno poco virulento, que causa un cuadro ligero de diarrea con baja mortalidad, y que su importancia en la Zootecnia se de-be principalmente a la pérdida de peso ocasionada por la diarrea y mala absorción de los alimentos, retrasando de esta manera el tiempo en que los cerdos deben salir al mercado. (14, 18).

Por otro lado no se logró determinar el tiempo de pro-tección que confieren las inmunoglobulinas séricas adminis-tradas por vía oral, pues como se mencionó anteriormente, el número de partículas virales y la cantidad de inmunoglo-bulinas administradas a los lechones resultaron bajos, aún cuando la cantidad de anticuerpos administrados influyó en

el tiempo de incubación que se observó en los lechones suple
mentados, de esta manera los resultados son buenos para apo-
yar investigaciones posteriores, en las que se debe aumentar
la cantidad de inmunoglobulinas o elevar su título, así como
elevar el número de partículas virales para el desafío de
los lechones.

Figura 1.- Placa de inmunolectroforesis de anticuerpos contra Rotavirus en suero porcino.

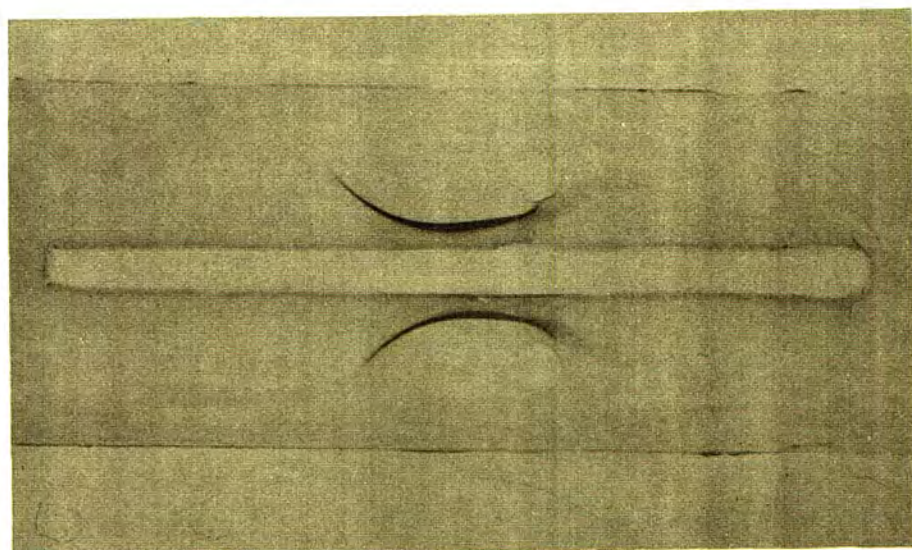
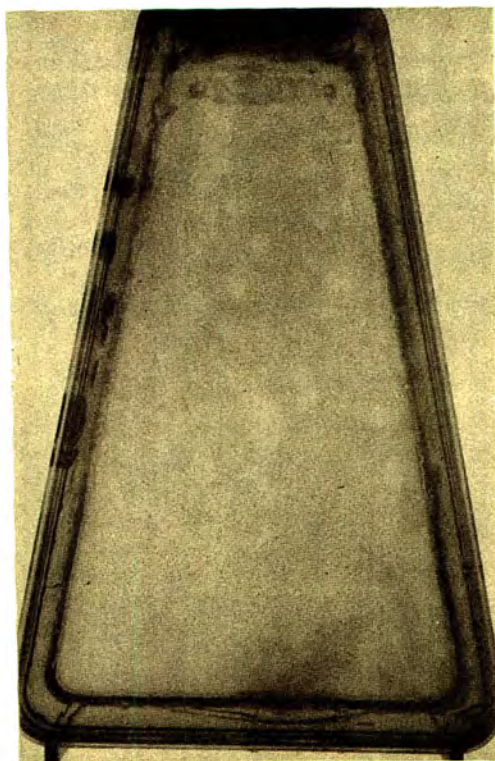
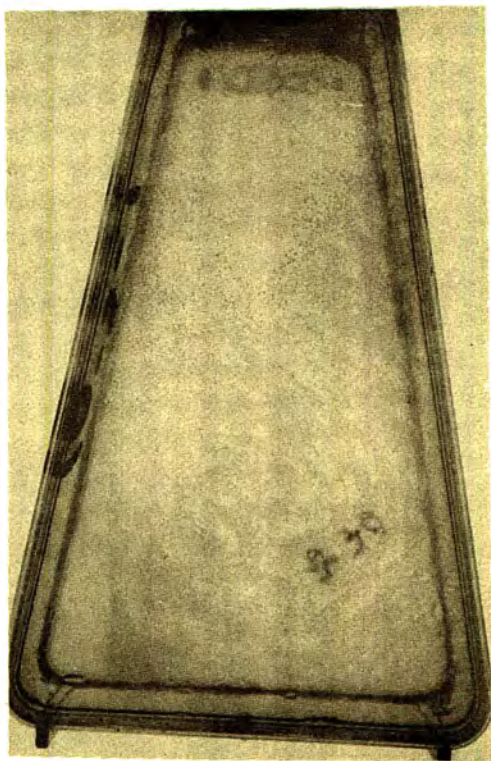


Figura 2.- Neutralización del Rotavirus en
cultivo celular MA-104



A



B

Figura 3.- Rotaforesis en gel de poliacrilamida
del Rotavirus.

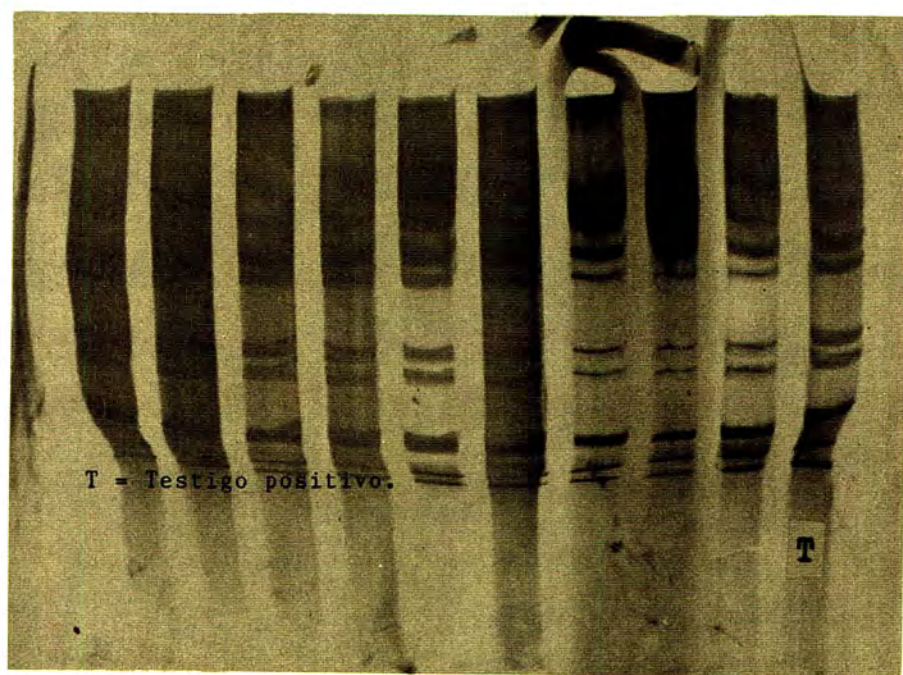
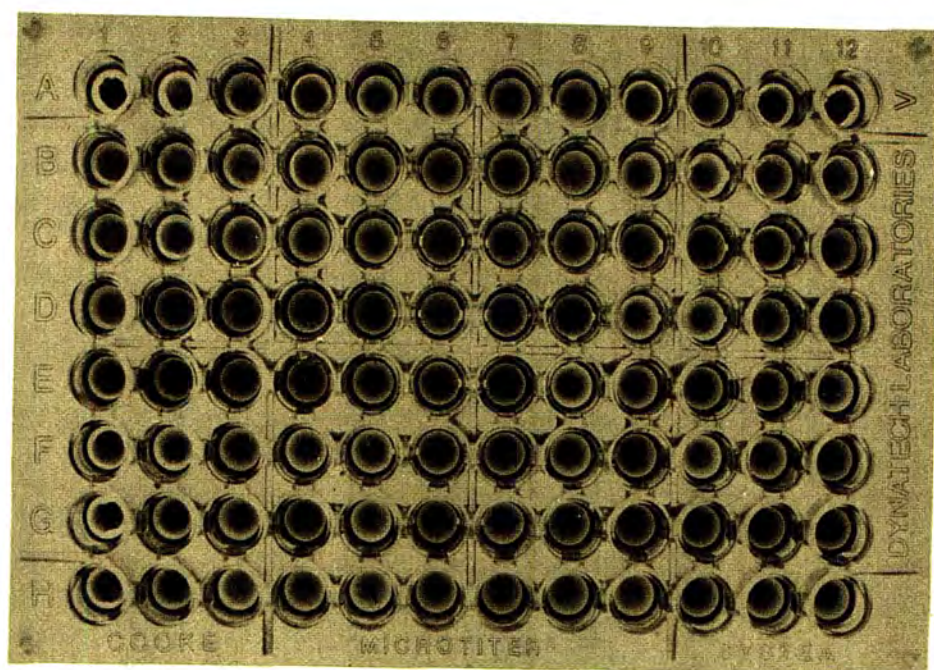
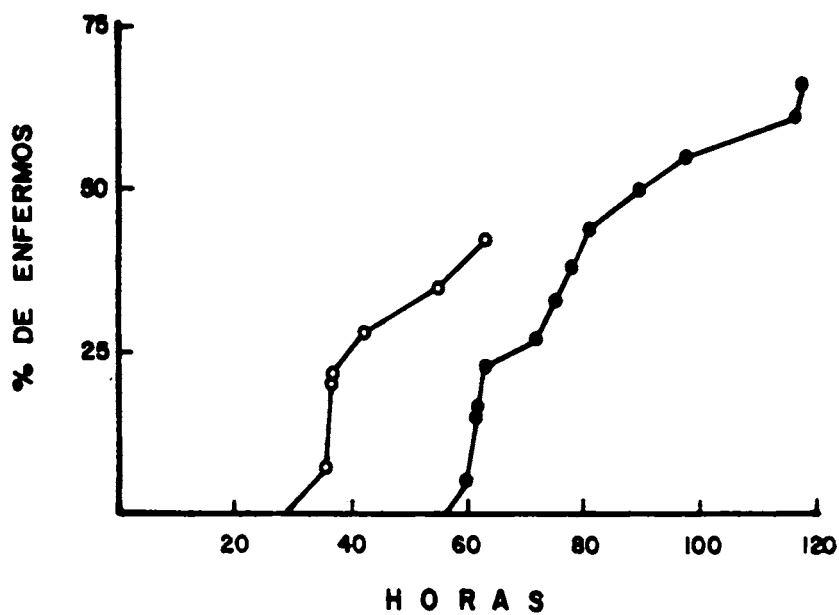


Figura 4.- Prueba de inhibición de la hemaglutinación, utilizando suero de calostro porcino y Rotavírus.



Gráfica 1.- Cinética del periodo de incubación
del Rotavirus en lechones inoculados



○ = Testigo

● = Experimental

Cuadro 1.- Número y porcentajes de animales enfermos en los diferentes tiempos de desafío, entre los grupos experimentales (E) y testigos (T), con Rotavirus porcino

	2h	8 h	24 h	96 h
E	3/5	3/5	3/4	3/4
T	2/4	1/4	2/3	1/3
E	60%	60%	75%	75%
T	50%	25%	66%	33%

Cuadro 2.- Registro de la signología en lechones desafiados con Rotavirus porcino, 2 h después de la última toma de inmunoglobulinas.

D Í A S D E N A C I D O S

Lechón No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	...	28
Grupo Experimental	1	i	i	i	i	iD	'	'	d	'	'	'	'	'	'	'	'		'
	2	i	i	i	i	iD	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'		'
	3	i	i	i	i	iD	'	'	d	'	'	'	'	'	'	'	'		'
	4	i	i	i	i	iD	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'		'
	5	i	i	i	i	iD	'	'	d	'	'	'	'	'	'	'	'		'
Grupo testigo	1	-	-	-	-	-D	'	d	'	'	'	'	'	'	'	'	'		'
	2	-	-	-	-	-D	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'		'
	3	-	-	-	-	-D	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'		'
	4	-	-	-	-	-D	'	d	'	'	'	'	'	'	'	'	'		'

- i = Administración de inmunoglobulinas
- D = Desafío
- d = Diarrea
- ' = Ausencia de signos de enfermedad

Cuadro 3.- Registro de la signología en lechones desafiados con Rotavirus porcino, 8 h después de la última toma de inmunoglobulinas.

D I A S D E N A C I D O S

[illegible]

i = Administración de inmunoglobulinas

D = Desafio

d = Diarrhea

' = Ausencia de signos de enfermedad

Cuadro 4.- Registro de la signología en lechones desafiados con Rotavirus porcino, 24 h después de la última toma de inmunoglobulinas.

D Í A S D E N A C I D O S

	Lechón No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	...	28
	1	i	i	i	i	i	D	'	'	d	'	'	'	'	'	'	'		'
Grupo	2	i	i	i	i	i	D	'	'	'	'	d	'	'	'	'	'		'
Experi	3	i	i	i	i	i	D	'	'	d	'	'	'	'	'	'	'		'
mental	4	i	i	i	i	i	D	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'		'
	1	-	-	-	-	-	D	'	d	'	'	'	'	'	'	'	'		'
Grupo	2	-	-	-	-	-	D	'	'	d	'	'	'	'	'	'	'		'
Testi	3	-	-	-	-	-	D	'	'	'	'	'	'	'	'	'	'		'
go																			

i = Administración de inmunoglobulinas

D = Desafío

d = Diarrea

' = Ausencia de signos de enfermedad

Cuadro 5.- Registro de la signología en lechones desafiados con Rotavirus porcino, 96 h después de la última toma de inmunoglobulinas.

Í A S DE N A C I D O S

	Lechón No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	1	i	i	i	i	i				D	'	'	'	d	'	'	'												
Grupo	2	i	i	i	i	i				D	'	'	d	'	'	'	'												
Experi	3	i	i	i	i	i				D	'	'	'	'	d	'	'												
mental	4	i	i	i	i	i				D	'	'	'	'	'	'	'												
Grupo	1	-	-	-	-	-				D	'	'	d	'	'	'	'												
Testi-	2	-	-	-	-	-				D	'	'	'	'	'	'	'												
go	3	-	-	-	-	-				D	'	'	'	'	'	'	'												

i = Administración de inmunoglobulinas

D = Desafío

d = Diarrea

' = Ausencia de signos de enfermedad

LITERATURA CITADA

- 1.- Banatvala, J.E., Chrystie, I.L. and Totterdell, B.M: Ro-
taviral infections in human neonates. J. Am. vet. med.
Ass., 173: 527-530 (1978).
- 2.- Barbosa, H., Ravines, J., Garza, J. y Larralde, C.: Pro-
ducción masiva de antitoxina tetánica en cerdos. Tec. Pe-
cuaria en México., 41: 42-51 (1981).
- 3.- Becker, E.L. et al.: Methods in immunology and immunoche-
mitry. 3th ed. vol. 1. Edited by: Williams, C.A. and
Chose, M.W., Academic Press, New York and London. 1971.
- 4.- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, J.H. and Rock, B.
J.: Virus particles in epithelial cell of duodenal muco-
sa from children with acute non-bacterial gastroenteri-
tis. Lancet. 2: 1281-1283 (1973).
- 5.- Bohl, E.H.: Rotaviral diarrhea in pigs: Brief review, J.
Am. vet. med. Ass., 174: 613-615 (1979).
- 6.- Carpio, M.M.: Algunos aspectos en la inmunización de
porcinos contra E. coli. Porcírama., 9: 27-30 (1984).
- 7.- Corthier, G. and Franz, J.: Detection of antirotavirus
immunoglobulins A, G, and M in swine colostrum, milk and
feces by enzyme-linked immunosorbent assay. Infect.
Inmun., 41: 833-836 (1981).
- 8.- Chanock, R.M., Wyatt, R.G. and Kapikian, A.Z.: Immuniza-
tion of infants and young children against rotaviral gas-
troenteritis-Prospects and problems. J. Am. vet. med.
Ass., 173: 570-572 (1978).

- 9.- Chidlow, J.W. and Porter, P.: Intestinal defence of the neonatal pig: Interrelationship of gut and mammary function providing surface immunity against colibacillosis. Vet. Rec., 104: 496-500 (1979).
- 10.- Durham, P.J.K., Stevenson, B.J. and Farquharson, B.C.: Rotavirus and coronavirus associated diarrhoea in domestic animals. N.Z. vet. J., 27: 30-32 (1979).
- 11.- Espejo, T.R., Calderón, E., González, N., Salomon, A., Martuscelli, A. and Romero, P.: Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in Mexico City. Rev. Lat-Amer. Microbiol., 20: 239-246 (1978).
- 12.- Estes, M.K.: Identification of rotavirus of different origins by the plaque-reduction test. Am. J. Vet. Res., 41: 151-152 (1980).
- 13.- Estrada, C.A.: Inmunología del tracto gastrointestinal. Porcirama., 8: 5-16 (1983).
- 14.- Estrada, C.A. y Enríquez, E.C.: Diagnóstico simplificado de las diarreas más comunes en lechones. Vet. Méx., 14: 93-102 (1983).
- 15.- Guerra, G.M.X.: Parámetros de producción en el ganado porcino, revisión bibliográfica. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1980.
- 16.- Guevara, M.R.: Inmunidad a Salmonella choleraesuis en lechones protegidos con inmunoglobulinas séricas administradas por vía oral. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1983.

- 17.- Hess, R.G. and Bachmann, P.A.: Distribution of antibodies to rotavirus in serum and lacteal secretions of naturally infected swine and their suckling pigs. Am. J. Vet. Res., 42: 1149-1152 (1981).
- 18.- House, J.A.: Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. J. Am. vet. med. Ass., 173: 573-576 (1978).
- 19.- Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A.: Manual de microbiología médica. 9a. ed. Editorial El manual moderno, México, 1981.
- 20.- Lecce, J.G. and King, M.W.: The calf reo-like virus (rotavirus) vaccine: An ineffective immunization agent for rotaviral diarrhea of piglets. Can. J. comp. Med., 43: 90-93 (1979).
- 21.- Lecce, J.G., King, M.W. and Dorsey, W.E.: Rearing regimen producing piglet diarrhea (rotavirus) and its relevance to acute infantile diarrhea. Science., 199: 776-778 (1978).
- 22.- Middleton, J.P.: Pathogenesis of rotaviral infection. J. Am. vet. med. Ass., 173: 544-546 (1978).
- 23.- Morales, R.A., Martínez, S.A., Martell, D.M., Aguilar, S.A. y Morilla, G.A.; Rotavirus y Pararotavirus como agentes etiológicos de diarrea en lechones lactantes. en Reunión de Investigación Pecuaria en México 1984. INIP. 143.

- 24.- Necoechea, R.R. y Pijoan, A.C.: Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Editores: Ramiro Ramírez Necoechea y Carlos Pijoan Aguadé, México. 1982.
- 25.- Ocampo, C.L. y Sumano, L.H.: Fisiología de la diarrea. Porcirama., 9: 11-13 (1984).
- 26.- Olguín, F. y Garza, R.J.: Inmunidad neonatal suplementaria en cerdos: Aplicación rutinaria en el campo. I Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en cerdos. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. México, D.F. (1977).
- 27.- Porter, P.: Immune system. Diseases of Swine. 5th ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 1981.
- 28.- Porter, P.: Intestinal defence in the young pig-a review of the secretory antibody systems and their possible role in oral immunization. Vet. Rec., 92: 658-664 (1973).
- 29.- Prozesky, L. and Theodoris, A.: Diarrhoea in pigs induced by rotavirus. Onderstepoort J. Vet. Res., 44: 275-278 (1977).
- 30.- Quiroz, P.J.I., Olguín, R.F. y Garza, R.J.: Anticuerpos adquiridos pasivamente en relación con la mortalidad e incremento de peso de lechones. Vet. Méx., VI: 84-91 (1975).
- 31.- Report of the Panel Colloquium on Selected Diarrheal Diseases of the Young. J. Am. vet. med. Ass., 173: 515-518 (1978).

- 32.- Rodger, S.M. and Holmes, I.H.: Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotavirus by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. J. Virol., 30: 839-846 (1979).
- 33.- Ruiz-Gómez, J., Alvarez, M.T., Silva-Acosta, C., Espejo, R., Games, J., Palacios, J. y Juárez, G.: Rotavirus. II Virus relacionado con la gastroenteritis aguda en el niño. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 12: 133-140 (1981).
- 34.- Ruiz-Gómez, J., Espinosa, L.E., Becerril, P., Muños, H. O., Chacón, G.A., Vargas, R. y Gutiérrez, G.: Etiology of hospital-acquired infectious diarrhea. Arch. Invest. Méd. (Méx.), 13: 213-218 (1982).
- 35.- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Dirección General de Economía Agrícola. (1981).
- 36.- Smith, C.C., Aurelian. L., Santoshan, M. and Sack, R.B.: Rotavirus associated traveler's diarrhea: Neutralizing antibody in asymptomatic infections. Infect. Immun., 41: 829-833 (1983).
- 37.- Snodgrass, D.R. and Wells, P.W.: Passive immunity in rotaviral infections. J. Am. vet. med. Ass., 173: 565-568 (1978).
- 38.- Theil, K.W. and Bohl, E.H.: Porcine rotaviral infection of cell culture: Effects of certain enzymes. Am. J. Vet. Res., 41: 140-143 (1980).

- 39.- Theil, K.W., Bohl, E.H., Cross, R.F., Kohler, E.M. and Agnes, A.G.: Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. Am. J. Vet. Res., 39: 213-220 (1978).
- 40.- Theil, K.W., Saif, L.J., Bohl, E.H., Agnes, A.G. and Kohler, E.M.: Concurrent porcine rotaviral and transmissible gastroenteritis viral infections in a three-day-old conventional pig. Am. J. Vet. Res., 40: 719-721 (1979).
- 41.- Tizard, R.I.: Inmunología Veterinaria. Edit. Interamericana, México, 1979.
- 42.- Torres-Medina, A. and Underdahl, N.R.: Scanning electron microscopy of intestine of gnotobiotic piglets infected with porcine rotavirus. Can. J. Comp. Med., 44: 403-411 (1980).
- 43.- Trejo, M.F.: Inmunidad suplementaria en lechones como práctica zootécnica. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 1982.
- 44.- Welliver, R.C. and Ogra, P.L.: Importance of local immunity in enteric infection. J. Am. vet. med. Ass. 173: 560-564 (1978).
- 45.- White, D. and Mims, A.C.: Viral pathogenesis and immunology. Blackwell Scientific Publications, Cambridge, G.B. 1984.

- 46.- Woode, G.N. and Bohl, E.H.: Porcine rotavirus infection.
Diseases of Swine. 5th ed. The Iowa State University
Press, Ames, Iowa, USA. 1981,
- 47.- Woode, G.N. and Crouch, C.F.: Naturally occurring and
experimentally induced rotaviral infections of domes-
tic and laboratory animals. J. Am. vet. med. Ass. 173:
522-526 (1978).

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
BIBLIOTECA - UNAM