

11661



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**MODELO DE INFECCION Y PAPEL DE LA  
RESPUESTA INMUNE PASIVA (MATERNA)  
EN CAPRINOS INFECTADOS POR  
ROTAVIRUS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN MICROBIOLOGIA**

**P R E S E N T A:**

**MARIA ALEJANDRA AYANEGUI ALCERRECA**

**ASESORES**

**DR. JORGE LUIS TORTORA PEREZ**

**M EN C GUILLERMO VALDIVIA ANDA**



**CUAUTITLAN IZCALLI**

**2002**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIA.**

A la vida misma y a la conjunción que permite su existencia; materia y energía, en el tiempo y el espacio, a esa esencia existente sin explicación entre todas ellas. Algunos la llamamos Dios, otras existencias, vida, alma, espíritu o coincidencia.

A mi familia ya que sin ellos simplemente no sería quien soy, gracias: Ma, Pa, Pau, Luis, Sonia y Natalia.

A mis perros, ya que el cariño recibido de ellos en mi infancia (Spading y Pirata) marcaron mi camino profesional y la fascinación que me genera cualquier aspecto de la vida como tal (Hershey, Cobi, Linda, Cristina, Jesús Demetrio y Gabriela).

A los mejores amigos que la vida me ha permitido, en esto de las afortunadas coincidencias: Adriana, Ale Verduzco, Ana Laura, Angélica, Daniel, Francisco, Horacio, mi muy querido Dr. Jorge, Lili, Manuel y Mauricio. En orden alfabético ya que no quiero problemas con los antes citados y bueno conociéndome comprenderán tenía que poner a mis amados canes antes (ni hablar, verdad negro), gracias por ser quienes en mi vida.

A la vida de mis cabras y mis borregos.

## AGRADECIMIENTOS.

Algunas de las peores posiciones que un ser humano puede tomar en esta vida es la de ser mal agradecido, por lo que a riesgo de que esto se semeje a los créditos al final de una larga película debo hacerlo; por lo que agradezco con toda honestidad.

A mi familia incluyendo amigos y canes, por la paciencia, apoyo, opiniones, pero sobre todo por el soporte a lo largo de este trabajo y todos los eventos de mi vida.

A mis Maestros, personas que no solo se preocuparon por informar, sino se involucraron en la mi formación profesional y académica. Dr. Jorge, Memo, René y un tutor que tuve que siempre decía que su posición era como de tutor de papel, pero estoy convencida de que no es así, Dr. Juan Antonio.

A Suemi, Dr. Shimada, Héctor, Mine, Rafa, Remy, Lety y Rodrigo, gracias por su apoyo sin ustedes no creo hubiera logrado recorrer este último tramo del camino. P.D. Son la gente más profesional que he conocido, excelentes amigos, el trabajar y aprender de usted ha sido una gran oportunidad.

A todos los que conforman UMISA, Laboratorio de Virología, FES-C, C-IV, MVZ, por la oportunidad de trabajar como parte de su equipo. A los cuatro fantásticos, Hugo, Marco, Víctor, Lulú y Danny.

A todo el personal de DIVET y VALAR, en especial A Chayo, por todo su apoyo técnico decisivo para terminar esta investigación. Incluyendo al Dueño.

Al Dr. Pablo Correa quien con su interés, su conocer sobre la virología y las ciencias de la salud, siempre me ayudado con sus oportunas opiniones a concluir felizmente el presente trabajo.

A mi Facultad (FES-C) y a mi Universidad (UNAM) y los que la han conformado en "La Máxima Casa de Estudios" a lo largo de siglos ya de historia.

A los Drs. Everardo González, Javier Flores y Francisco Trigo por su apoyo constante.

A Todos mis Profesores.

A él muy respetable jurado por su ayuda, valiosas opiniones y disposición para el presente trabajo y mi persona; Dr. Juan Antonio, Dr. Trigo, Dr. Correa, Dr. Jorge y Dr. Marco Vega. (Conciente estoy de la premura con que los hice revisar el texto).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN.

Los rotavirus patógenos entéricos, que afectan a una gran diversidad de especies; son la etiología más importante en diarreas agudas en neonatos, retraso del crecimiento asociados a atrofia de vellosidades intestinales. Existen 14 reportes sobre rotavirus en caprinos, a mayoría de esto no ha logrado establecer la importancia de la infección en caprinos. Los objetivos del estudio; el aislar y replicar una cepa de rotavirus de origen caprino; establecer la infección por rotavirus en el modelo caprino; determinar la participación de la inmunidad pasiva materna en el desarrollo, establecimiento y secuelas de la infección por rotavirus en caprinos domésticos; establecer la infección experimental en ovinos con un aislamiento de caprinos. 230 muestras (heces); 5 positivas, por rotaforesis, (patrón Grupo A), a partir de estas se generó un abasto viral *in vitro*. Se inocularon 26 caprinos y 5 ovinos. La infección se estableció en 8/26 caprinos, en ovinos fue negativa. La prevalencia de rotavirus (30.7%), (26.92% Alpina, 3.85% Toggenburg), (23.08% hembras). Los animales provenían 10 de raza definida (Hato positivo rotavirus) y 21 de raza y criollo (Hato sin circulación viral). ELISA indirecta y Virusneutralización, con una media del título de IgG sérica homóloga al aislamiento de 0.623 unidades de absorbancia, comparada con 0.134 de los animales provenientes del hato libre, resultados similares en virusneutralización. Los títulos apoyan la observación de circulación viral en uno de los hatos. No hubo relación entre el título serológico y la infección. Los animales de raza demostraron ser más susceptibles, no relacionados con la serología. Criollos caprinos, no infectaron o seroconvirtieron y fueron inoculados dos veces. Los resultados apuntan al concepto de multifactorialidad de la rotavirus, donde coinciden, factores de virulencia y patogenicidad del virus, medio ambiente y los propios del individuo definidos por el genética, estado fisiológico del hospedador susceptible a rotavirus.

Palabras clave: Rotavirus, Rotaforesis, Virusneutralización, ELISA indirecta, Caprinos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABSTRACT.

Rotavirus are the main etiologic agents of serious diarrheal disease in infants and young children, villous atrophy, slow growth rate, are concomitant to the rotavirus infections. There are 14 reports on rotavirus infection in goats, little had been accomplished in the understanding of this infection in this species. The goals of the present study were; to isolate and replicate *in vitro*, a caprine rotavirus wild strain; to establish an infection with the wild strain in conventional, domestic goats; to make some observations on the role that passive immunity (maternal), plays in the infection by rotavirus; establishment an infection in lambs with the caprine wild strain. 230 feces samples were collected, 5 of them were positive to rotavirus by PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) (Group A characteristics). 3 out of the 5 caprine wild strain positive samples, were used, was obtain to infect 26 goats and 5 lambs. 8 /26 goats were infected and any of the inoculated lambs developed the disease. The infection rate was 8 out of 26 (30.77%) (26.92% Alpine, 3.85% Toggenburg) (23.08% females). The animals origin was 10 Alpine and Toggenburg came from a herd with rotavirus circulation (original isolate) and 21 Alpine, Toggenburg, mix breed and lambs came from herds without rotavirus circulation. The mean of IgG serological titers from the animals of the herd with virus circulation was 0.623 absorbance units in contrast 0.134 to the herds without viral circulation obtained in the indirect ELISA and Virus neutralization assay. These data supports the observation of the virus status within the groups. There was no direct relationship between serological titers and infection. Pure breed animals were more susceptible to the infection and there was not relation with their immune condition against the wild strain. Mix breed animals were resistant to infection and did not raise antibodies in serum after the infection, even after being re-challenged. The data from the present study supports the idea the multifactor variants involved in the rotavirus infection and its relationship with viral virulence, environmental factors and the genetic and physiologic condition as age, sex, breed, that make the individual susceptible to infection.

Key words: Rotavirus, PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis), indirect ELISA, Virus neutralization, Goat.

## ÍNDICE GENERAL.

	Página.
1.- Introducción.	1
2.- Revisión de literatura.	3
2.1.- Antecedentes.	3
2.2.- Biología del virus.	5
2.2.1.- Genoma.	7
2.2.2.- Proteínas virales.	8
2.2.2.1.- Proteínas estructurales.	8
2.2.2.1.1.- Cápside externa.	9
2.2.2.1.2.- Cápside interna.	10
2.2.2.1.3.- Core o Nucleocápside.	10
2.2.3.- Proteínas no estructurales.	10
2.3.- Clasificación viral.	12
2.3.1.- Electroferotipo.	14
2.4.- Sistema genético.	15
2.5.- Ciclo viral.	18
2.6.- Epidemiología.	21
2.7.- Patogénesis y patógena.	23
2.7.1.- Manifestaciones clínicas.	25
2.7.2.- Lesiones macroscópicas.	26
2.7.3.- Lesiones microscópicas.	26
2.8.- Tratamiento.	26
2.9.- Inmunología.	27
2.9.1.- Inmunología a rotavirus.	27
2.9.2.- Consideraciones sobre inmunología en rumiantes.	30
2.10.- Métodos diagnósticos.	31
2.10.1.- Microscopía electrónica.	31
2.10.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.	32
2.10.3.- Seroneutralización.	32
2.10.4.- Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA) Indirecta.	32
2.10.5.- Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA) Sándwich.	33
2.10.6.- Aglutinación en Látex.	34
2.10.7.- RT-PCR. Reacción en cadena de la Polimerasa.	34
2.11.- Justificación.	35
2.12.- Hipótesis.	37
2.13.- Objetivos.	37
3.- Material y Métodos.	38
3.1.- Aislamiento de Rotavirus caprino.	38
3.1.1.- Colección de muestras.	38
3.1.1.1.- Características generales de los rebaños evaluados.	38
3.1.2.- Evaluación de la muestra.	39
3.1.2.1.- Toma y conservación de muestra de heces.	39
3.1.2.2.- Rotaforesis.	39

3.1.3. - Aislamiento viral.	40
3.2. - Patógena de rotavirus en un modelo animal caprino.	40
3.2.1. - Abasto viral.	40
3.2.2. - Preparación del inóculo.	41
3.2.3. - Selección de animales.	41
3.2.4. - Alojamiento.	44
3.2.5. - Manejo experimental.	44
3.2.5.1. - Recepción.	44
3.2.5.2. - Adaptación.	44
3.2.5.3. - Administración del inóculo.	45
3.2.5.4. - Pruebas de patología clínica.	45
3.2.5.5. - Rotaforesis.	46
3.2.5.6. - Necropsia.	46
3.2.5.7. - Histopatología.	48
3.3. - Evaluación de la participación de la inmunidad pasiva materna.	48
3.3.1. - Selección de grupos experimentales.	48
3.3.2. - Virus neutralización.	48
3.3.3. - ELISA Indirecta.	49
3.4. - Análisis estadístico.	49
4. - Resultados y discusión.	50
4.1. - Resultados experimento I: Aislamiento viral, abasto vira y caracterización.	50
4.1.1. - Muestras de campo.	50
4.1.2. - Aislamiento y abasto de rotavirus.	52
4.1.3. - Caracterización por Electroferotipo.	53
4.1.4. - Discusión de resultados 4.1.	53
4.2. - Resultados experimento II: Modelo de infección animal en caprinos	56
4.2.1. - Respuesta de caprinos de diferentes orígenes y condiciones al desafío con una aislamiento de rotavirus.	56
4.2.2. - Temperatura.	57
4.2.3. - Pruebas clínicas (Biometría hemática, albúmina y globulina).	59
4.2.4. - Análisis estadístico. efecto de origen, grupo, raza, sexo y edad sobre la presentación de rotavirrosis en caprinos inoculados con la cepa de aislamiento.	65
4.2.4.1. - Frecuencia y $\chi^2$ utilizando Rotaforesis en relación a la variable origen del animal.	66
4.2.4.2. - Frecuencia y $\chi^2$ utilizando Rotaforesis en relación a la variable grupo del animal.	67
4.2.4.3. - Frecuencia y $\chi^2$ utilizando Rotaforesis en relación a la variable raza del animal.	68
4.2.4.4. - Frecuencia y $\chi^2$ utilizando Rotaforesis en relación a la variable sexo del animal.	69
4.2.4.5. - Frecuencia y $\chi^2$ utilizando Rotaforesis en relación a la variable edad del animal.	70
4.2.5. - Lesiones microscópicas.	72
4.2.6. Discusión de resultados 4.2.	75

	Página.
4.3.- Resultados experimento III: Respuesta inmune en caprinos y ovinos previos y post desafío con la cepa de asilamiento ( ELISA Y Seroneutralización).	80
4.3.1.- Resultados ELISA ..	80
4.3.2.- Resultados Virusneutralización.	83
4.3.3.- Discusión de resultados 4.3.	85
4.4.- Resultados experimento IV: Infección de ovinos inoculados con una cepa de rotavirus aislada de caprinos.	88
4.4.1.- Respuesta de ovinos al desafío con un aislamiento de rotavirus.	89
4.4.2.-Temperatura.	89
4.4.3.- Discusión de resultados 4.4.	90
5.- Conclusiones.	92
6.- Apéndice I Medios, soluciones y técnicas.	93
6.1.- Soluciones generales.	93
6.2.-Extracción de ARN Viral.	93
6.3.- Gel de poliacrilamida.	94
6.4.- Fijación y tinción del gel.	96
6.5.- Asilamiento viral.	96
6.6.- Cultivo celular.	97
6.7.- Propagación viral.	98
6.8.- Titulación viral.	98
6.9.- Pretratamiento de heces para desafío en caprinos.	99
6.10.- Virusneutralización.	99
6.11.- ELISA Indirecta.	103
6.12.- Histopatología.	104
7.- Apéndice II materiales.	103
7.1.- Extracción de ARN viral y electroforesis.	103
7.2.- Aislamiento Viral.	104
7.3.- Cultivo celular y ensayos Titulación, Virus neutralización.	104
7.4.- Titulación Viral.	104
7.5.- Virus neutralización.	104
7.6.- ELISA Indirecta.	104
7.7.- Necropsias / Histopatología.	105
8.- Bibliografía.	106

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página.
2.1.- Segmentación ARN, proteínas virales, esquema del virión y virus.	5
2.2.- Estructura de Rotavirus y Distribución esquemática de sus proteínas estructurales.	6
2.3.- Cápside Externa.	8
2.4.- Posible reacomodo e intercambio genético en coinfecciones por rotavirus.	17
2.5.- Ciclo viral de rotavirus.	18
4.1.- Fotografía corrimiento electroforético de las muestras de heces de caprinos.	50
4.2.- Fotografía, monitoreo por rotaforesis de los pases de cultivo celular.	51
4.3.- Fotografía comparación de cultivo celular MA-104 sin infectar y efecto citopático en cultivo postinfección.	52
4.4. Fotografías Comparación de distribución de bandas virus grupo A de rotavirus.	53
4.5.- Fotografía excreción viral en rotaforesis No9.	60
4.6.- Fotografía excreción viral en rotaforesis No8.	60
4.7.- Fotografía excreción viral en rotaforesis No6.	61
4.8.- Fotografía excreción viral en rotaforesis No27.	61
4.9.- Fotografía excreción viral en rotaforesis No26.	62
4.10.- Fotografía excreción viral en rotaforesis No30.	62
4.11.- Fotografía excreción viral en rotaforesis No21 y 25.	63
4.12.- Fotografía aislamiento viral post eutanasia.	63
4.13.- Fotografía aislamiento viral post eutanasia.	64
4.14.- Gráfica de distribución de frecuencias de rotaforesis, dependiendo del origen del animal.	66
4.15.- Gráfica de distribución de frecuencias de rotaforesis, dependiendo del grupo del animal.	67
4.16.- Gráfica de distribución de frecuencias de rotaforesis, dependiendo de la raza del animal.	68
4.17.- Gráfica de distribución de frecuencias de rotaforesis, dependiendo del sexo del animal.	69
4.18.- Gráfica de distribución de frecuencias de rotaforesis, dependiendo de la edad del animal.	70
4.19.- Gráfica ELISA indirecta previo desafío.	73
4.20.- Lesiones histopatológicas.	74
4.21.- Lesiones histopatológicas.	74
4.22.- Lesiones histopatológicas.	76
4.23.- Lesiones histopatológicas.	76
4.24.- Gráfica ELISA indirecta previo desafío.	80
4.25.- Gráfica ELISA indirecta postdesafío.	81
4.26.- Gráfica Virusneutralización previo desafío.	83
4.26.- Gráfica Virusneutralización postdesafío.	83

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## ÍNDICE DE CUADROS.

	Pagina.
2.1.- Proteínas virales composición y función.	8
2.2.- Criterios de clasificación viral en rotavirus, agrupación comparativa.	15
2.3.- Referencias bibliográficas de rotavirus en caprinos.	36
3.1.-Características de los animales grupo I	41
3.2.-Características de los animales grupo II	42
3.3.-Características de los animales grupo III	43
3.4.-Características de los animales grupo IV	43
3.5.- Descripción de manejo y alimentación durante la fase experimental.	44
3.6.-Resumen los procedimientos de la observación clínica, descripción y frecuencia.	45
3.7.-Cronología de sacrificio por eutanasia para grupo I de experimentación.	46
3.8.-Cronología de sacrificio por eutanasia para grupo II de experimentación.	47
3.9.-Cronología de sacrificio por eutanasia para grupo III de experimentación.	47
3.10.-Cronología de sacrificio por eutanasia para grupo IV de experimentación.	48
4.1.- Resultados de la detección de rotavirus en muestras de campo.	50
4.2.- Observación de signos clínicos por grupo a partir de la inoculación con rotavirus grupos I y II.	56
4.3.- Observación de signos clínicos por grupo a partir de la inoculación con rotavirus grupo III.	57
4.4.- Medias de temperatura por animal grupos I, II y III.	58
4.5.- Distribución en grupos y edad de Rotaforesis / Asilamiento viral / Cuadro clínico, positivos y negativos.	59
4.6.- Frecuencias Rotaforesis / Aislamiento Viral/ Diarrea.	65
4.7.- Frecuencias de resultados en rotaforesis con base al origen de los animales.	66
4.8.- Frecuencias de resultados en rotaforesis con base al grupo de los animales.	67
4.9.- Frecuencias de resultados en rotaforesis con base a la raza de los animales.	68
4.10.- Frecuencias de resultados en rotaforesis con base al sexo de los animales.	69
4.11.- Frecuencias de resultados en rotaforesis con base a la edad de los animales	70
4.12.- Relación de variables dependientes e independientes en la susceptibilidad de los animales al desafío con la cepa de rotavirus aislado de caprinos.	71
4.13.- Distribución de lesiones histopatológicas.	72
4.14.-ANOVA multifactorial (Análisis de varianza) ELISA previo desafío.	82
4.15.-ANOVA multifactorial (Análisis de varianza) ELISA post desafío.	82
4.16.-ANOVA multifactorial (Análisis de varianza) Virusneutralización previo desafío.	84
4.17.-ANOVA multifactorial (Análisis de varianza) Seroneutralización post desafío.	84
4.18.- Observación de signos clínicos por grupo a partir de la inoculación con rotavirus grupo IV.	89
4.19.- Medias de temperatura por animal grupo IV.	89

## 1.- INTRODUCCIÓN.

Los rotavirus son patógenos entéricos que afectan muchas especies animales incluyendo al hombre; representan una de las causas más importantes de diarrea aguda en animales en neonatos y niños. Fueron aislados por primera vez de cuadros diarreicos de becerros por Mebus en 1969 (Mebus *et al.*, 1973). Actualmente han sido identificados en bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, caninos, felinos y gallináceas. Estudios realizados en diferentes partes del mundo indican que el 50% de los casos de diarrea en niños que requieren hospitalización en niños se asocian a rotavirus y se estima que causan entre 500,000 a 1,000,000 de muertes al año (Mebus *et al.*, 1973; Chanock, 1978; Bridger y Oldham, 1987; Prem y Young, 1993; Bishop, 1993).

Los rotavirus son agentes etiológicos involucrados en gastroenteritis viral con manifestaciones clínicas y subclínicas en los animales y el hombre, solos o acompañados de otros patógenos. Se reportan como la etiología más importante en cuadros clínicos de diarreas agudas, retraso en el crecimiento asociado a la atrofia de vellosidades intestinales y muerte en animales jóvenes y determinan pérdidas de hasta miles de millones de dólares en la industria ganadera mundial. Son una merma económica la cual, en términos generales, los productores no contemplan como significativa, ya que afecta a los animales neonatos o muy jóvenes y asumen como normal la pérdida de algunos animales en esta etapa. Por lo que es importante desarrollar medidas de control y prevención para las enfermedades asociadas a rotavirus en todas las especies (Chanock, 1978; Bridger y Oldham 1987; Lee, Meeusen y Brandon 1992). Los rotavirus presentan un amplio rango de especies susceptibles, son evidencias de este fenómeno las infecciones heterólogas entre aislamientos en humanos con infecciones experimentales en animales o la protección conferida por vacunas con cepas de origen animal (Bishop, 1993, Gouvea y Brantly, 1995; Bruke y Desselberger 1996).

Actualmente existen alrededor de 14 informes relacionados con rotavirus en caprinos en el ámbito mundial, los cuales abarcan desde observaciones por microscopía electrónica, pruebas serológicas, aglutinación, electroforesis, PCR, hibridación y de aislamiento viral (Cuadro 2.3). Si la información existente es comparada en cantidad y profundidad con la generada desde los años setenta, tanto para la biología básica del virus, como para su patología y epidemiología como agente infeccioso en humanos y algunas especies domésticas (ovinos, bovinos, porcinos, aves) la información en caprinos es escasa.

De los trabajos iniciales publicados sobre la infección por rotavirus en caprinos, en los últimos años han aparecido datos sobre la prevalencia serológica, así como de casos clínicos en cabritos en los que se han reportado cuadros diarreicos asociados a rotavirus; llegando a su diferenciación serológica como rotavirus grupo A y B. El primer informe de rotavirus en esta especie fue hecho por Scott *et al.*, (1978) y desde entonces han aparecido comunicaciones en Chile, Hungría, Trinidad y Tobago, Italia, Sudáfrica, España, Francia y Japón, en este último país se ha encontrado una seroprevalencia del 60 % Takahashi *et al.*, (1979) en Japón y del 25.7% Iovane *et al.*, (1988) en Italia. En México se detectó la presencia de rotavirus en el hato caprino del rancho Cuatro Milpas de Facultad de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), el cual fue diagnosticado con base en el cuadro clínico característico de diarrea aguda acuosa, en cabritos de 6 y 8 semanas de edad; y posteriormente, fue confirmado al observar el patrón electroforético característico de estos virus (Ayanegui *et al.*, 1997).

Muñoz *et al.*, (1994), reportaron un brote clínico en cabritos, señalando, además de la baja mortalidad, que los animales desarrollaron un cuadro clínico que duró de 4 a 6 días con una recuperación del ritmo de crecimiento en 20 días. Estos hechos señalan la importancia que puede tener para la producción caprina, la prevalencia de esta enfermedad; el mayor impacto en la producción de carne de cabrito por la merma económica que esta representa. Por otro lado los datos serológicos hasta el momento conocidos marcan un indicio para intentar esclarecer el papel que esta jugando esta infección, su impacto en la especie caprina y ante otras especies (Takahashi *et al.*, 1979; Iovane *et al.*, 1988). Los aspectos de epidemiología y patogenicidad en esta especie, a pesar de ser un tema ampliamente investigado en otros rumiantes domésticos como los bovinos y ovinos, prácticamente no se ha trabajado en los caprinos (Scott *et al.*, 1978; Muñoz *et al.*, 1994; DaCosta *et al.*, 1994 a y b). Por lo cual se consideró importante tratar de determinar la presencia y papel que desempeñan inmunidad pasiva contra los rotavirus en el ganado caprino.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.- REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1.-Antecedentes.

Los rotavirus fueron reconocidos por microscopía electrónica en 1973 por Bishop logrando asociar al agente viral con los cuadros de diarrea aguda en niños y animales jóvenes. A pesar de que las técnicas de cultivos celulares y cultivos de tejidos comenzaron a ser manejadas en forma rutinaria desde los años cincuenta y sesenta, no es sino hasta 1972 que se logra desarrollar la metodología de manejo y estudio de virus entéricos, los cuales se consideraban agentes fastidiosos, por su difícil manejo *in vitro*. Con el descubrimiento del agente Norwalk por Kapikian y un año más tarde de los Rotavirus, por Bishop, por observación en microscopía electrónica y el desarrollo de las técnicas que permitieron un manejo adecuado de estos agentes etiológicos en el laboratorio. Son virus ubicuos, que afectan tanto a mamíferos como aves, parecen ser específicos de especie, pero en forma experimental se han demostrado infecciones cruzadas y se considera que esto puede estar ocurriendo en la naturaleza, siendo los animales un reservorio significativo para las infecciones en el ser humano o interespecies (Bishop, 1993; Muñoz *et al.*, 1994; Kapikian *et al.*, 1996<sup>a</sup>)

Evidencias de la posible infección entre diferentes especies son los aislamientos de virus bovinos y humanos en la India, con proteínas VP7 muy similares entre sí, que sugieren que este fenómeno es factible. Estudios sobre la diversidad y variabilidad genética de los rotavirus señalan intercambios de material genético entre cepas aisladas de humanos y de animales; señalando la importancia de lograr establecer un mejor modelo de investigación entre las diversas especies animales y el hombre, ya que a pesar de existir evidencias genéticas como las antes mencionadas aún no se ha logrado demostrar como se da este intercambio de ARN (Estes, 1996 b; Palombo, 1999).

A pesar de que el reconocimiento oficial de estos virus se dio hasta 1973, ya existían evidencias de su participación en el cuadro diarreico de algunos animales desde 1963 por Adams y Kraft utilizando microscopía electrónica, describieron la presencia de una partícula viral de 70 nm de diámetro, en los cortes de intestino de ratones afectados por la Diarrea Epizootica Infantil del Ratón (EDIM). Malharbe *et al.* (1963) describen una partícula viral que llaman Agente Simio 11 (SA-11), obtenido este último de un hisopo rectal de un mono Vervet (*Cercopithecus aethiops*) y la partícula viral O ("Offal") aislada en células de riñón de mono, a partir de la mezcla del lavado intestinal combinado de ovino y bovino. Mebus *et al.* (1969) lograron demostrar la presencia de una partícula viral de 70 nm, la cual fue utilizada en la inoculación de becerros, reproduciendo el cuadro de diarrea en conjunto con la observación microscópica, denominando a la enfermedad (NCDV) Diarrea de los Becerros de Nebraska. En 1972, Fernelius *et al.* replicaron el NCDV en cultivos primarios fetales de bovino; lo mismo que los agentes simio O y murino, descubriendo que aunque su morfología es similar a la de los Reovirus, no son reconocidos antigénicamente como tales. Mientras que entre sí cruzaban con los ahora descritos como rotavirus, aislados por Bishop a partir de cuadros de diarrea aguda en infantes (Kapikian y Chanock 1996)

La mayoría de los animales experimentan la infección por rotavirus en una u otra etapa de su vida, siendo evidencia de esto el alto porcentaje de animales seropositivos que

han sido encontrados en diferentes estudios. La facilidad con la que se presenta la infección se debe en parte a la excreción del virus en altas concentraciones, tanto por animales enfermos, como por animales asintomáticos, los cuales son responsables de la diseminación del virus, estableciéndose infecciones enzoóticas. Aunado a esto el virus es altamente resistente a las condiciones ambientales, lo cual favorece su difusión. Los cuadros diarreicos víricos, asociados a estos virus se manifiestan en general en las cercanías del invierno y al comienzo de la primavera, en un patrón similar al de la influenza, aunque hay evidencias de su circulación en todas las estaciones (Matson, 1998).

Los individuos de todas las edades pueden ser infectados por los rotavirus y es una causa común de diarreas en las primeras semanas de vida en la mayor parte de los animales y hasta los 2 años en el humano (Muñoz *et al.*, 1994).

La inmunización ha sido la estrategia de control más buscada para muchas de las enfermedades virales. A pesar de que en el ámbito mundial se ha hecho un gran énfasis en el desarrollo de vacunas vivas para el control de los rotavirus, tanto en el hombre como en los animales domésticos, los resultados han sido variables; debido a que la naturaleza segmentada del genoma que permite rearrreglos genómicos y errores puntuales, en la lectura del ARN durante la replicación, reacomodos genéticos durante infecciones mixtas, que es la característica más distintiva de la genética de los rotavirus (Prem y Young 1993; Raming, 1997). Esta situación puede explicar la variabilidad antigénica de los distintos grupos (A a G) y serotipos. Por ejemplo: en el grupo A de rotavirus, se han a su vez identificado serotipos basados en la composición de las dos proteínas estructurales de superficie VP4 y VP7. Actualmente también se han reconocido estos dentro de los grupos B y C, aunado a la presencia de rotavirus virulentos y avirulentos que existen en el ambiente, siendo posiblemente estas diferencias, la base para lograr estrategias de control adecuado contra estos virus (Prem y Young 1993; García *et al.*, 1996).

La inducción de la inmunidad sistémica se complica aún más debido a que los anticuerpos circulantes no son protectores. Anticuerpos de preferencia IgA e IgG1 en rumiantes, deberían estar presentes en la superficie las vellosidades del epitelio gastrointestinal para lograr protección (Perm y Young, 1993).

Mediante las investigaciones se han tratado de entender el papel que juega la inmunidad lactogénica, en la protección contra estas infecciones; relacionando la presentación de casos clínicos asociados a las gastroenteritis producidas por rotavirus, con la cantidad de anticuerpos presentes en el calostro, leche, mucosa intestinal, niveles de anticuerpos séricos específicos en las madres y en las crías, y la cantidad y calidad del calostro ingerido por éstas mismas en diferentes especies animales. Mediante la vacunación o la exposición natural de las madres a la infección, se intenta incrementar la protección calostrual, a niveles suficientes para que los animales logren sobrepasar el periodo más crítico para la infección por rotavirus; el cual depende de la especie animal involucrada, y puede presentarse desde las primeras semanas de vida, hasta niños de dos a tres años (Wells *et al.*, 1978; Snodgrass y Wells, 1978; Bridger y Oldham, 1987; Vesikari, 1993; Prem y Young, 1993).

## 2.2-Biología del virus.

La infección por rotavirus es común en la mayoría de las especies de animales domésticas y el hombre tanto en su presentación clínica como subclínica. La severidad y cuadro clínico dependen de factores como a cepa viral, la dosis infectante, factores ambientales, la presencia de otros patógenos y la inmunidad contra las variantes virales (Prem y Young, 1993).

### ROTAVIRUS (*Rota* del latín rueda):

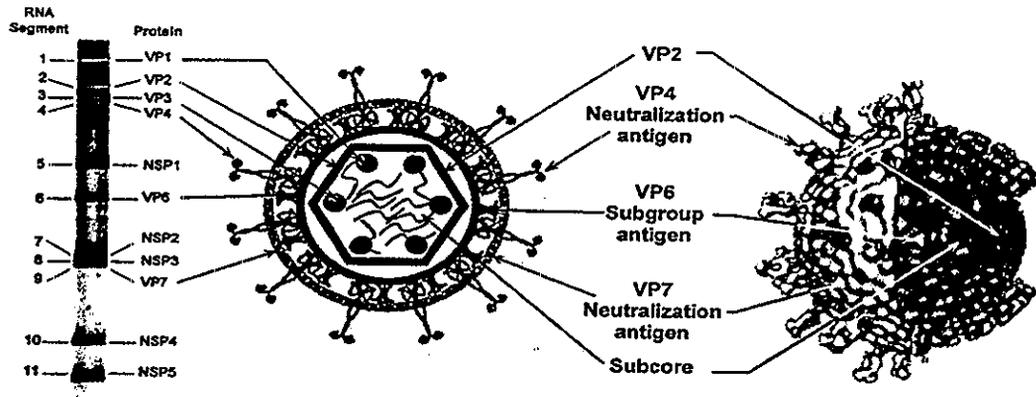


Figura 2.1 Segmentación ARN, proteínas virales, esquema del virión y virus (Gracia *et al.*, 1996).

- Son virus ARN.
- Familia *Reoviridae*. El término Reovirus (virus huérfanos respiratorios y entéricos), se propuso originalmente para un grupo de virus aislados básicamente de los tractos respiratorio e intestinal y que en su momento no se asociaron con ninguna enfermedad. El genoma consiste de 10 a 12 segmentos lineales de doble cadena de ARN y la familia contiene nueve géneros: *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Phytoreovirus*, *Fijivirus*, *Cypovirus* y tres géneros más de *Reovirus* de plantas. Los primeros cuatro géneros contienen patógenos importantes para los animales en general, mientras que el resto son patógenos de plantas, peces e invertebrados. (Quinn *et al.*, 1994). Presentan varias cápsides, en forma de capas; una ARNpolimerasa dependiente de su asociación con el virión y un ciclo viral citoplasmático (Estes, 1996 a)
- ARN segmentado en 11 porciones de doble cadena.
- Son desnudos por lo cual toleran la extracción por fluorocarbono, éter, cloformo; resiste un pH desde 3 hasta 9.
- Icosahédrico con una triangulación T=13.
- El diámetro total en partícula madura es de 70-75 nm (750 °Å).
- Densidad boyante en CsCl de 1.36g/cm<sup>3</sup>.
- Sedimentación en Sacarosa de 520 a 530 S.
- Virus prototipo (SA-11). (Grupo A).
- Su cultivo *in vitro* se ve facilitado por la acción de proteasas (tripsina).

- Forma cuerpos de inclusión intracitoplásmicos.
- Su ciclo es lítico.
- Es inactivado por: fenol, formalina, cloro, betapropilactona, etanol al 95% (Estes, 1996 a).

El virión es de simetría icosaédrica, la cual está constituido por tres capas de cápsides unidas en forma concéntrica alrededor de los once segmentos de doble cadena de ARN viral que conforman el genoma (Raming, 1997; Desselberger y Gray 2000). La cápside externa con una triangulación T=13, está compuesta por 260 trímeros de la glicoproteína VP7 y 60 dímeros de la proteína VP4 en forma de espículas, esta última en contacto tanto con la proteína VP7 en la cápside externa como con la VP6 en la cápside interna. La VP7 es la proteína estructural más abundante de la cápside externa. En tanto la proteína VP4, forma 60 espinas o espículas en esta misma distribución geométrica, tiene propiedades de una hemaglutinina, al ser modificada y generar un reacomodo en su estructura sin fragmentarse completamente, por efecto de la tripsina para dar origen a las proteínas VP5 y VP8 (Estes, 1996 a; Venkataram *et al.*, 1988; Desselberger y Gray, 2000).

La cápside interna o capa intermedia está formada por 260 trímeros de la proteína VP6, los cuales se distribuyen en una triangulación T=13, intercalándose 132 canales acuosos de tres tipos diferentes. Esta es la proteína más abundante y constituye el 51% de la estructura del virión. Los grupos de rotavirus se encuentran determinados por la estructura de la proteína VP6 y todos los virus dentro de cada uno de los serogrupos, comparten antígenos en común, no importando su origen (Venkataram *et al.*, 1988; Estes 1996 a; Desselberger y Gray, 2000).

La Nucleocápside o "core" está constituida por la proteína VP2, tiene un diámetro de 37nm. Su distribución geométrica está asociada a los canales acuosos, se encuentra en contacto tanto con el genoma viral como con la cápside interna, la nucleocápside, compuesta en su mayoría por VP2 con una triangulación T=1, contiene a las proteínas VP1, VP3 y el ARN de doble banda (Patton *et al.*, 1996; Estes ,1996 a; Desselberger y Gray, 2000).

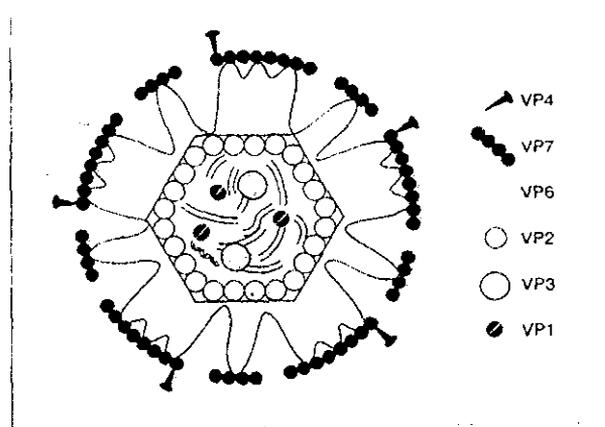


Figura 2.2. Estructura de rotavirus y distribución esquemática de sus proteínas estructurales. Dodet, Heseltine y Saliou, (1997).

### 2.2.1.-Genoma

El virus tiene un ARN de doble cadena dividido en 11 segmentos, contenidos en la nucleocápside, los segmentos de ARN viral varían en tamaño desde 667 a 3302 pares de bases el ARN viral desnudo no es infeccioso, ya que este es dependiente de su propia ARNpolimerasa dependiente de ARN, la cual transcribe cada segmento del ARN en forma individual a su correspondiente ARN mensajero (Estes, 1996 a). Cada segmento contiene un solo marco abierto de lectura, con una secuencia de lectura relativamente corta y una región altamente conservada, no codificable en cada una de sus terminaciones 5' y 3' (Raming, 1997).

Los rotavirus son los únicos virus ARN, de los mamíferos o de las aves, que presentan 11 segmentos de ARN en su genoma, lo cual permite su identificación y clasificación basada en la migración de estos fragmentos naturales en un campo electroforético. La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) del ARN de rotavirus se conoce como ROTAFORESIS y permite el reconocimiento del ARN de rotavirus a partir de la extracción del genoma viral. Al término del procedimiento se puede detectar la migración de los 11 segmentos del ARN viral en un patrón de migración específico, el cual facilita la identificación del mismo y ayuda a su agrupamiento (Cuadro 2.1). Sin embargo, dado que los rotavirus pueden manifestar una serie de variaciones en su genoma por distintos mecanismos, como los rearrreglos, intercambio de material genético en coinfecciones y mutaciones puntuales, estos patrones, si bien pueden ser utilizados para detectar la presencia del virus y son una herramienta de clasificación, no deben ser la única forma de clasificar a las cepas virales (García *et al.*, 1996; Estes, 1996 a).

Cada segmento de ARN viral comienza con una guanina, seguida de una secuencia corta conservada en los extremos 5' y 3', la cual es una lectura sin sentido, con un marco único de lectura abierto (ORF del inglés Open Reading Frame); en forma general este codifica una proteína y termina en el extremo 3' donde se encuentra una cisteína. Estas secuencias sin sentido se encuentran altamente conservadas dentro de los virus de la familia *Reoviridae* y en otras familias como *Arenaviridae*, *Bunyaviridae* y *Orthomyxoviride*; con excepción tal vez de los segmentos 9 y 11, en general se consideran monocistrónicos, con un alto contenido de A+T (58% al 67%), calculado en genes clonados de ADN (Estes, 1996a; Raming, 1997).

Cada banda de ARN viral en su porción positiva es una copia complementaria del ARNm del que se deriva ella. Los rotavirus codifican 6 proteínas estructurales y 5 no estructurales y cuatro de ellas poseen una actividad de unión al ARN. El estudio de los genes del virus prototipo SA-11 ha permitido identificar la codificación de cada proteína viral; sin embargo, no todas los aislados virales presentan todos los segmentos de ARN con la misma codificación, la proteína VP7 puede estar codificada en los segmentos 7, 8 ó 9.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2.1. Composición y función de las proteínas virales (Basado el SA-11).

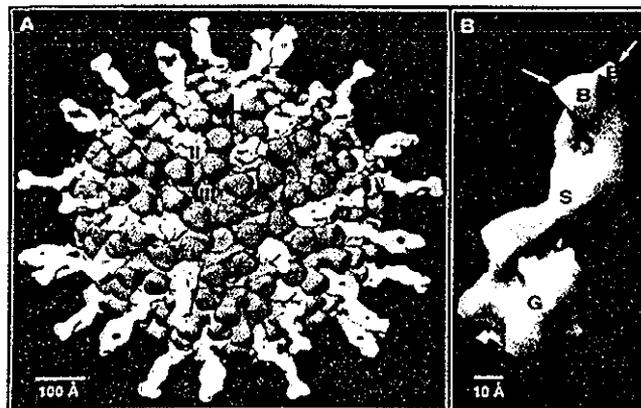
SEGMENTO	PARES DE BASES	G + C %	AMINOÁCIDOS	PROTEÍNAS QUE CODIFICA
1	3,302	34.6	1,088	VP1, ARNpolimerasa
2	2,687	32.9	881	VP2, morfogénesis viral, fijación de ARNl.
3	2,591	28.9	835	VP3, guaniltransferasa.
4	2,362	34.7	776	VP4, hemaglutinina/ receptor celular, antígeno neutralizante, fusión celular
5	1,581	33.9	491	NSP1 unión específica al ARNm
6	1,356	38.6	397	VP6, cápside interna, interactúan VP4, VP7 y VP2
7	1,104	33.5	315(312,306)	NSP3, unión específica de ARNm 3', en la replicación.
8	1,059	35.5	317	NSP2, unión no específica de ARN
9	1,062	35.9	326(297)	VP7, glicoproteína cápside externa, fusión a membrana celular, antígeno neutralizante
10	751	40.2	175	NSP4, glicoproteína, integrina en RER para la morfogénesis viral, enterotoxina
11	667	38.6	198(92)	NSP5/6 unión de ARN ¿?

(Adaptado de: Prem y Young 1993; Estes, 1996a; Raming, 1997; Kapikian y Chanock, 1996; Desselberg y Gray, 2000).

## 2.2.2.-Proteínas virales.

### 2.2.2.1.- Proteínas Estructurales.

Los rotavirus codifican seis proteínas estructurales, quienes conforman las cápsides externa, interna y la nucleocápside o core del virión.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 2.3. A) Representación de la cápside externa de un rotavirus, distribución y estructura tridimensional de la proteínas VP7 (gris) y VP4 en forma de espículas (blanco). Los números II y III señalan la ubicación de los canales de calcio correspondientes a cada tipo respectivamente. B) Proteína VP4 G, porción VP, B porción VP5; S región susceptible a la tripsina (Estes, 1996a).

### 2.2.2.1.1.-Cápside Externa:

VP7, es una glicoproteína unida en su porción amino terminal a oligosacáridos ricos en manosa, se han determinado tres posibles sitios de glicosilación. Su peso molecular es de 38 KDa, es codificada en los segmentos 7, 8 ó 9 dependiendo de la cepa viral y se encuentra en la cápside externa como proteína la más abundante de la misma en el virión maduro, donde representa el 30%. Esta proteína responsable de la unión final del virus a la célula hospedera y presenta epítopes inductores de anticuerpos neutralizantes los cuales definen el serotipo de la cada cepa. El proceso de glicosilación se da en su tránsito e inserción a la membrana del retículo endoplasmático rugoso; donde la proteína es a su vez modificada para generar la forma madura de la misma; en su síntesis original contiene 326 aminoácidos y en su forma madura 276. (Estes, 1996 a; Kapikian y Chanock, 1996a)

La secuenciación de nucleótidos ha permitido determinar seis regiones altamente conservadas y divergentes entre los diferentes serotipos y dentro de estos, tres de éstas secuenciaciones se asocian a la producción de anticuerpos neutralizantes (Prem y Young, 1993; Estes, 1996a; Kapikian y Chanock, 1996a; Weclawicz *et al.*, 1998). Se ha demostrado que las cadenas laterales de carbohidratos no son requeridas para el proceso de infección, ya que una cepa mutante de SA-11, no glicosilada es capaz de mantener su patogenicidad. Sin embargo, la presencia y los cambios en esta unión a carbohidratos se encuentran altamente relacionados con la inducción de anticuerpos neutralizantes y las modificaciones en la misma pueden alterar el perfil de neutralización (Kapikian y Chanock, 1996a).

VP4, está codificada en el segmento 4, tiene un peso molecular de 88 KDa, cada virión presenta 120 unidades diméricas, se encuentra en la cápside externa, formando 60 espículas con una punta roma; donde constituye el 1.5% de la superficie del virión maduro. Es una hematoaglutinina; la cual esta involucrada en la unión a la célula blanco y su penetración a la misma. La proteína VP4 es susceptible a la acción de proteasas como la tripsina, en los residuos conservados de arginina 231 y 241 al 247; el efecto de misma es una modificación de su estructura la cual sin ser propiamente fracturada o separada por efecto de la tripsina, sufre una ramificación, dando origen a dos subunidades conocidas como VP5 (un segmento de 529 aminoácidos) que presenta tres de los mayores epítopes neutralizantes del virión y es el sitio receptor viral una vez dividida, VP8 (fragmento de 247 aminoácidos) que representa aproximadamente 1/3 de la proteína VP4 en el virión maduro en el proceso de infección. Las modificaciones sufridas en esta proteína por la acción de la proteasa, determina la forma llamada activa o infectante del virus donde sin estos cambios no se logra el establecimiento del virus *in vitro*, siendo esta una proteína determinante de virulencia *in vivo* e *in vitro* (Prem y Young, 1993; Estes, 1996), tiene funciones esenciales dentro del ciclo viral, como son unión al receptor celular, penetración celular, por lo que las características biológicas de esta proteína son importantes en la determinación del rango de hospederos susceptibles, virulencia e inducción de la inmunidad (Arias *et al.*, 1996).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.2.2.1.2.-Cápside Interna.

**VP6**, está codificada en el segmento 6 del genoma y es la más abundante de la cápside interna y del virión en general, su peso molecular es de 44 KDa, se encuentran 780 unidades de la misma por virión, que en forma espontánea forman trímeros hidrofóbicos estables. Son estructuras altamente inmunogénicas y antigénicas, las cuales pueden ser disgregadas por cambios del pH y logran una cápside completa con una triangulación T=13. Tiene un papel muy importante en la estructura de la partícula viral, ya que es el eje de la conformación y organización de la nucleocápside y la cápside externa, que se encuentra relacionada con las proteínas VP2, VP4 y VP7, respectivamente. Por sus características antigénicas e inmunogénicas los anticuerpos que induce son los más utilizados para el diagnóstico inmunológico y la clasificación de grupo, dentro de los rotavirus (Prem y Young, 1993; Estes, 1996a;).

### 2.2.2.1.3.-"Core" o Nucleocápside.

**VP1**, está codificada en el segmento 1, tiene un peso molecular de 125 KDa y presenta cierto grado de homología con algunas ARNpolimerasas virales, lo cual sugiere que VP1 puede ser la ARNpolimerasa (Estes, 1996 a).

**VP2**, codificada en el segmento 2, su peso molecular es de 94 Kda y forma la estructura principal de la nucleocápside, se presentan 120 moléculas por virión y la forma madura de esta proteína es fraccionada. Tiene como función reclutar el ARN de doble cadena para el ensamblaje viral, por lo que juega un papel importante en la morfogénesis del virus. Es sensible a la temperatura, *in vitro* a temperaturas no adecuadas, no ensambla los segmentos 1 y 3 del ARN. Recientemente se ha demostrado su papel en la replicación del ARNm, para la síntesis de las proteínas del "core". Lo cual le sugiere funciones tanto en la transcripción, como replicación, aunque no se ha logrado determinar que dominios son los responsables de cada una de estas funciones enzimáticas (Prem y Young 1993; Estes, 1996a).

**VP3**, codificada en el segmento 3, es la proteína estructural de menor peso molecular con 88 KDa, su función se ha definido como una guaniltransferasa, se encuentra involucrada en la replicación exógena de ARNm (Estes, 1996a).

### 2.2.3.-No estructurales.

**NSP1**, es el producto del segmento 5, tiene un peso molecular de 53 KDa, su presencia ha sido demostrada en células infectadas pero no en el virión y su función principal se encuentra en la unión al ARNm. (García *et al.*, 1996; Estes, 1996a).

**NSP2**, es el producto del segmento 8, su peso molecular es de 35 KDa, se cree tiene una función de unión no específica al ARN (García *et al.*, 1996; Estes, 1996a).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

NSP3, es el producto del segmento 3, su peso molecular es 34 KDa, su función es la unión específica del ARNm en su extremo 3' esta proteína parece unirse con los ARNm que carecen de la secuencia poli A en su extremo 3', estabilizando al fragmento en su transporte para ser traducida. (García *et al* , 1996;Estes, 1996a)

NSP4, es el producto del segmento 10 y es una glicoproteína transmembranal; su peso molecular aproximado es de 28 KDa. En ella se han reconocido diversas actividades biológicas. Los rotavirus tienen una morfogénesis particular; en el armado, el virión gema dentro del retículo endoplasmático rugoso y obtiene en forma transitoria una membrana lipídica. Este proceso es mediado por la proteína NSP4, que funciona como un receptor intracelular anclado en la membrana, como una integrina. El péptido sintético de 21 aminoácidos, correspondiente a los residuos 114-135, es donde reside el efecto tóxico de la proteína, tanto en el modelo de ratón, como en el de cerdo, para los rotavirus del grupo A. Contiene los epítomos para el reconocimiento de la proteína VP4. En el tránsito y maduración del virión en el retículo endoplasmático rugoso. Conforme madura el virión la membrana transitoria se pierde por un mecanismo aún no bien descrito. Sin embargo, se ha postulado la participación de esta proteína estructural en los mismos y otra serie de efectos biológicos, asociados a la patogenia del virus (García *et al*., 1996; Weclawicz *et al* , 1998; Lundgren *et al*., 2000; Huang *et al* , 2001).

El armado de las estructuras virales de los rotavirus es un mecanismo dependiente de la presencia de  $Ca^{2+}$ , la proteína NSP4 se ha detectado en una gran variedad de alteraciones, en las células infectadas, asociadas a su capacidad para incrementar el  $Ca^{2+}$  intracelular (García *et al* , 1996; Weclawicz *et al*., 1998; Lundgren *et al*., 2000; Huang *et al*., 2001).

NSP4 juega un papel fundamental en el proceso de la muerte de las células infectadas, los estudios más recientes demuestran como la proteína NSP4 o el péptido sintético del aminoácido 113 al 135, tienen el efecto de aumentar el flujo de calcio dentro de la célula en cultivos tanto de líneas celulares de insectos como de mamíferos. El efecto citotóxico se ha vinculado con la activación de la Fosfolipasa-C y producción de inositol trifosfato; con efecto lítico sobre las estructuras de membrana de la célula, facilitando la liberación de los viriones del retículo endoplasmático. Rotavirus es dependiente de calcio para su maduración y armado final de las proteínas estructurales en tres capas concéntricas, lo que de alguna forma explica el incrementar el flujo de calcio intracelular (Prem y Young, 1993; Estes, 1996a; Weclawicz *et al*.,1998; Tian *et al*.,2000; Huang *et al*., 2001).

Ball *et al*.,(1996) reconocen a la proteína NSP4 como la primera enterotoxina viral, con la inducción de episodios diarreicos en ratones lactantes en un patrón dependiente de dosis y edad; su efecto como toxina parece estar asociado con el incremento en los niveles de calcio intracelular. Durante las últimas dos décadas se ha demostrado que tanto la secreción de fluidos, como los electrolitos en especial  $Cl^-$ , al lumen intestinal, puede ser inducido tanto por el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular en las células infectadas, como por la activación del sistema nervioso local en las paredes entéricas (Ball *et al*., 1996; Huang *et al*., 2001).

Lundgren *et al.*, (2000) en varios modelos de infección *in vitro* sobre segmentos intestinales trabajaron con una serie de bloqueadores de los canales de sodio y de calcio y del receptor de nicotina en presencia de la proteína NSP4, observando una reducción en la secreción intraluminal y demostraron que más de 2/3 partes del estímulo sináptico de secreción, se pueden asociar al efecto del sistema nervioso local. Sin embargo, en el cuadro completo de secreción se debe considerar además, la participación del proceso de inflamación; en el cual hay un aumento de líquido por cambios en la permeabilidad, acompañados de los factores de la inflamación, que tienen un efecto en el sistema nervioso en forma local. Se han propuesto otros mecanismos como la infección directa de las dendritas locales; ya que rotavirus se ha logrado replicar en tejido nervioso primario. Se ha sugerido que la NSP4 actúa como una enterotoxina viral, que incrementa los niveles de calcio intracelular facilitando la liberación de péptidos o aminas de las células endocrinas de la mucosa entérica, con efecto sobre dendritas locales que disparan la respuesta secretora (Cunliffe, 1997; Lundgren, 2000).

Estudios publicados por Lee *et al.*, (2000), muestran como, a diferencia de otras estructuras genéticas de los rotavirus, el gen 10 está altamente conservado en cepas aisladas, con diversos serotipos G y P, permitiendo hacer el análisis de su secuenciación y establecer las relaciones filogenéticas de las diferentes cepas virales.

NSP5, es el producto de la síntesis del segmento 11, su peso molecular es de 26 KDa, es una proteína glicosilada y fosfatada; su función parece ser la unión del ARN (Prem y Young, 1993 ; Estes, 1996 a; García *et al.* , 1996)

### **2.3.-Clasificación de Rotavirus.**

Los rotavirus se clasifican serológicamente bajo un esquema de múltiples grupos (**Serogrupos**) y con la existencia de **serotipos** dentro de cada grupo. Los grupos de rotavirus están constituidos por virus que comparten una serie de antígenos en común, la mayoría de estos se expresan en las proteínas de tipo estructural y probablemente también en las no estructurales. Los cuales pueden ser identificados por pruebas como la inmunofluorescencia, anticuerpos monoclonales, ELISA (ensayo absorción inmunoenzimático) y de inmunomicroscopía electrónica (Prem y Young, 1993; Estes, 1996a; García *et al.*, 1996).

Los rotavirus se encuentran clasificados en 7 serogrupos, utilizando a la proteína VP6 de la cápside interna para este reconocimiento, denominados de la letra A a la G. Los grupos A, B y C se han encontrado tanto en animales como en el hombre. En tanto los grupos D, E, F y G únicamente se han documentado en animales. La capacidad de recombinación genética se presenta dentro de los mismos grupos virales en una coinfección; no así si los virus pertenecen a distintos grupos (Estes, 1996a).

El grupo A de los rotavirus es el mejor estudiado, siendo el virus prototipo el virus de simio SA-11; representa a los rotavirus de mayor importancia para el humano y animales jóvenes. En este grupo de rotavirus se han realizado básicamente los estudios de

El grupo A de los rotavirus es el mejor estudiado, siendo el virus prototipo el virus de simio SA-11; representa a los rotavirus de mayor importancia para el humano y animales jóvenes. En este grupo de rotavirus se han realizado básicamente los estudios de caracterización, existiendo poca información proporcionalmente de los otros grupos. Los cuales, independientemente de ser menos frecuentes, son virus fastidiosos para su cultivo lo cual no ha favorecido su estudio. Los rotavirus del grupo A en humanos, a su vez se han subclasificado en los subgrupos I y II, en función del reconocimiento, por anticuerpos monoclonales, de la proteína VP6 (Estes, 1996a; García, 1996).

Cada grupo a su vez se puede subdividir en serotipos. Se conocen dos familias, los llamados G(VP7) y los P(VP4) determinadas por la estructura antigénica de esas proteínas, las cuales son las de mayor importancia inmunológica y se distinguen entre sí al utilizar anticuerpos monoclonales o policlonales neutralizantes. Los serotipos G se denominan con esa letra en referencia a la naturaleza glicoprotéica de la VP7, que es el antígeno de neutralización más abundante y que junto con la VP4, funciona como receptor viral. A la fecha se han definido 14 serotipos para el grupo A, tanto para virus de origen animal como humano y se denominan G1,G2,G3.....G14 (Prem y Young,1993; Estes, 1996a; García *et al.*, 1996).

Los serotipos P, están determinados por la seroneutralización dirigida a los **epítomos** de la proteína VP4. Actualmente se han caracterizado por lo menos 5 serotipos P, denominados P1, P2, P3, P4 y P5. Por diferencias genotípicas en secuenciación génica, se han detectado hasta 19 serotipos P en el grupo A de rotavirus, lo cual complica el uso de esta última proteína en la caracterización de los aislamientos virales. Para el resto de los grupos de rotavirus apenas comienzan a estudiarse estas subdivisiones. Pero son el mejor ejemplo de la gran diversidad y variabilidad que existe en los rotavirus y de alguna forma esto explica su elusivo comportamiento epidemiológico (Prem y Young, 1993; Estes,1996a).

Mediante un gran número de trabajos epidemiológicos sobre el análisis y secuenciación del ARN de los rotavirus, se han logrado reunir una importante cantidad de evidencia sobre la diversidad genética de las muestras virales y sobre las relaciones filogenéticas de los aislamientos. La comparación preliminar en la secuenciación de aminoácidos de la proteína VP7, indica un alto grado de conservación; arriba del 91% dentro de los virus del mismo serotipo. En tanto la variación intratípica se estima entre el 71 y el 86%. Derivado de estos estudios se ha logrado establecer que el serotipo de mayor distribución a nivel mundial en el grupo A de humanos corresponden a la clase G1; en tanto que existen otros serotipos de menor rango geográfico y mayor parentesco genético, como son los serotipos G2 o G3, los que básicamente circulan en Asia y Australia, contribuyendo a explicar por que las vacunas desarrolladas hasta el momento han presentado un respuesta variable a nivel mundial (Palombo, 1999).

Los estudios sobre la variabilidad genética de la proteína VP4 son escasos y mientras los aislamientos australianos han demostrado una gran estabilidad a lo largo de 17 años, los estadounidenses muestran una gran variación en tan solo dos años (Palombo, 1999).

*et al.*, 1996; Tian *et al.*, 2000). Estos estudios han demostrado que a pesar de la alta diversidad genética presente en los rotavirus, esta proteína no estructural parece estar altamente conservada dentro de los rotavirus y hasta el momento solo se han logrado demostrar tres grandes subgrupos dentro de los rotavirus del grupo A. El subgrupo I se caracteriza por presentar una tirosina en la posición 131, en tanto en los subgrupos II y III se encuentra una histidina, la cual parece estar presente en la cepas más virulentas (Pager, 2000; Cunliffe *et al.*, 1997; Tian, 2000).

Los subgrupos formados con base en la secuencia de aminoácidos en la NSP4, incluyen rotavirus de diversos subgrupos de VP6, serotipos G y P, tanto de origen animal como humano; siendo una herramienta a desarrollar con mayor profundidad, debido a la dificultad demostrada en tratar de analizar y agrupar a los rotavirus. Sin embargo, dado que estos estudios aún no se realizan en otros grupos de rotavirus, cabe la posibilidad de nuevamente enfrentarse con su gran diversidad genética. (Tian *et al.*, 2000)

### **2.3.1.-Electroferotipo.**

La clasificación de los rotavirus también se puede basar en variantes, con base en la migración electroforética del ARN viral. Para la electroferotipificación se emplean patrones de migración del extracto de ARN viral en geles de poliacrilamida. Estos patrones demuestran que existen dos electroferotipos: el “patrón largo” y el “patrón corto”. La diferencia se establece con base a los pesos moleculares de los segmentos 10 y 11 de ARN. Los patrones cortos poseen un peso molecular mayor que los de patrón largo, por lo que su migración es menor. Durante el brote, o sea la aparición clínica de la rotavirus, se puede hacer un seguimiento epidemiológico, de acuerdo con las diferencias detectadas en el electroferotipo (García *et al.*, 1996).

Finalmente es posible caracterizar la distribución por grupos de las 11 bandas de ARN, las cuales tienden a agruparse en cuatro regiones, denominadas de la I al IV. Lo que permite un acercamiento en la determinación del posible grupo viral. Los rotavirus de origen mamífero, en el primer sector, siempre presentan 4 bandas, en tanto que los de origen aviar presentan 5 bandas. El resto de las agrupaciones o racimos varían en su distribución dependiendo del grupo al que pertenezcan (Cuadro 2.2)( Prem y Young, 1993). Estos acomodos son de utilidad para observar la diversidad genética del los rotavirus, es una herramienta epidemiológica importante, pero no debe ser el único elemento para la clasificación de estos virus (García *et al.*, 1996).

Cuadro 2.2. Criterios de clasificación viral de rotavirus, agrupación comparativa.

Cepa de referencia	Grupo VP6	Serotipo P VP4	Serotipo G VP7	Electroferotipo ( Distribución de bandas). Por grupo, especie animal
	A			4:2:3:2, humanos, primates, porcinos, caprinos, ovinos, bovinos, equinos, caninos, felinos, ratón, conejos y aves.
KU Wa	A	P1A P1A	G1,G3, G4,G9.	humano
DS-1 S2	A	P1B P1B	G2 G12	humano.
1076 St3	A	P2 P2	G1 G4	humano.
NCDV UK B641	A	P1 P5 P5	G6 G6 G6	bovino.
H1 H2 L338	A	P7 No determinado	G5 G3 G13	equino
OSU, Gottfried ISU-6	A	P7 P6 P7	G5 G4 G9	porcino.
Canino	A	No determinado	G3	canino.
Ty-1	A	No determinado	G7	pavo
Ch 2	A	No determinado	G7	gallina.
	B			5:1:3:2 aves. 4:2:2:3 porcinos, bovinos, caprinos, ovinos, humano, rata.
	C			4:3:2:2 porcinos, bovinos, humano, mustélidos (hurones).
	D			5:2:2:2 aves.
	E			4:2:2:3 porcinos.
	F			5:2:2:2 aves.
	G			4:2:2:3 aves.

(Perm y Young, 1993; Raming, 1997; García *et al*, 1996; Estes, 1996a)

## 2.4.-SISTEMA GENÉTICO.

Los rotavirus se caracterizan por una enorme variación genética, que se manifiesta en variabilidad de electroferotipos y serotipos, donde aún dentro de un mismo brote, se logran aislar virus con electroferotipos y serotipos diferentes (Raming, 1997).

Se han propuesto tres mecanismos principales para explicar esta diversidad genética. En primer lugar la mutación, los rotavirus como todos los virus ARN se

consideran altamente susceptibles a un alto porcentaje, de mutaciones, debido principalmente a su alto ritmo de replicación, lo cual favorece los errores en la lectura durante la replicación del ARN viral. Utilizando ARN de rotavirus de porcino ha determinado para el segmento 11, un ritmo de mutación por nucleótido de  $<5 \times 10^{-5}$ , esto sugiere que el margen de mutación entre el ARN original y los genomas hijos o subsecuentes puede ser de por lo menos un nucleótido (Raming, 1997). Este fenómeno de acuerdo con la teoría de Domingo y Holland, (1994) aplicada al concepto de *quasi especies* de Eigen en la evolución viral (citados por Gouvea y Brantly, 1995) sugiere que los virus ARN con una ARNpolimerasa dependiente de ARN, no presentan la capacidad de en la lectura de material genético durante la replicación viral, que si posee en contraste, edición o corrección una ADN polimerasa, lo que conlleva a una alta frecuencia de mutaciones. Como consecuencia los virus; ARN, forman grupos extremadamente heterólogos de poblaciones relacionadas entre sí (*quasi especie*) que se forman a través de un proceso de selección o adaptación de las mismas. La selección es dirigida también por la necesidad de adaptación al hospedero y al ambiente cuando los virus se encuentran circulando entre grandes poblaciones (Gouvea y Brantly, 1995).

En segundo término se encuentra el intercambio genético o entrecruzamiento al azar de ARN, en casos de coinfección ocurre en infecciones mixtas en un mismo individuo, donde cada una de las cepas originales puede contribuir o aportar material genético a una nueva generación de virus, el resultado es un rápido cambio entre las variantes resultantes y las cepas que les dieron origen, con el potencial de generar nuevos perfiles antigénicos y rangos de hospederos susceptibles (Gouvea y Brantly, 1995). La mejor herramienta hasta el momento para evidenciar este fenómeno, es la comparación de la movilidad en los electroferotipos entre las cepas de origen y las cepas secundarias. Sin embargo, se requiere de otras técnicas como la hibridación para apoyar la evidencia electroferotípica (Ver Figura 2.4) (Raming, 1997).

Los dos mecanismos antes mencionados se manifiestan con cambios en las estructuras protéicas y favorecen la aparición de nuevos tipos antigénicos. Estos cambios o mutaciones claramente pueden conferir una ventaja selectiva en la virulencia del agente infeccioso, lo mismo que generar cepas de menor virulencia. Finalmente la capacidad de rearrreglo de diversos sectores del genoma de un mismo rotavirus, tiene el potencial de contribuir a la aparición de nuevos genes y funciones en los rotavirus (Raming, 1997).

Combinaciones no usuales de las proteínas VP4 y VP7, que se encuentran comúnmente en rotavirus de animales o humanos, han sido encontradas en brotes emergentes en humanos y se considera una evidencia importante para apoyar las observaciones de infecciones interespecies. Los genes VP7 y VP4 presentan una segregación independiente uno del otro, lo cual sugiere que el proceso de intercambio genético entre los rotavirus de animales y el hombre contribuye a la diversidad de las cepas circulantes en humanos (Palombo, 1999).

Finalmente, el reacomodo genético que se observa en la replicación *in vitro* e *in vivo*, en diversos aislamientos virales, dentro de la misma cepa, indica que estos rearrreglos se pueden presentar en forma segregada en cada uno de los genes; contribuyendo en la

modificación de la expresión fenotípica y genotípica de las cepas virales, con cambios más grandes que una mutación puntual (Gouvea y Brantly, 1995).

Las poblaciones mixtas de rotavirus y su continua alteración y propagación entre las diferentes especies animales y el hombre, son la base para explicar el polimorfismo genético de este género viral y podrían ser la ruta más importante en la evolución de los rotavirus. Esta hipótesis explicaría las inconsistencias observadas en la eficiencia de los modelos vacunales diseñados hasta el momento en contra de los rotavirus (Gouvea y Brantly, 1995).

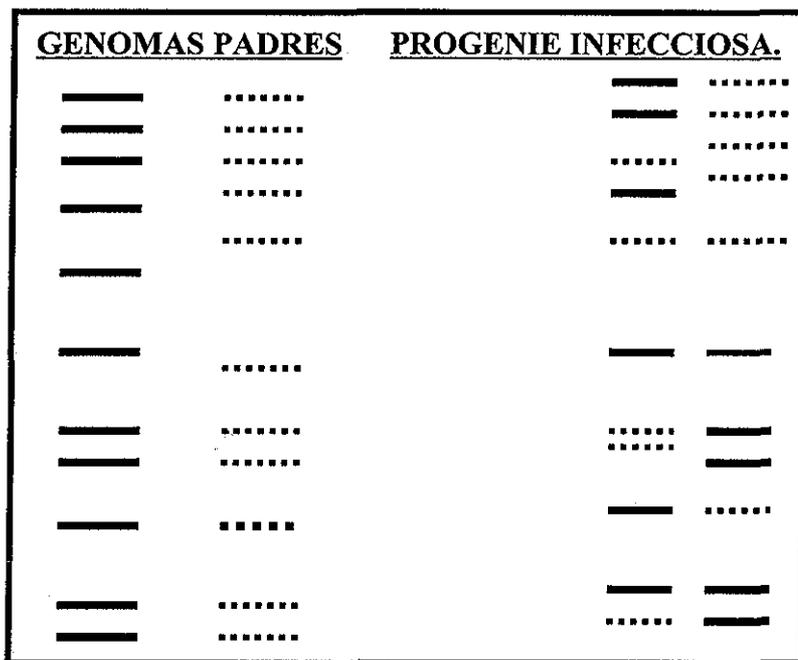


Figura 2.4. Posible reacomodo e intercambio genético en coinfecciones por rotavirus. Raming, (1997).

## 2.5.-Ciclo Viral.

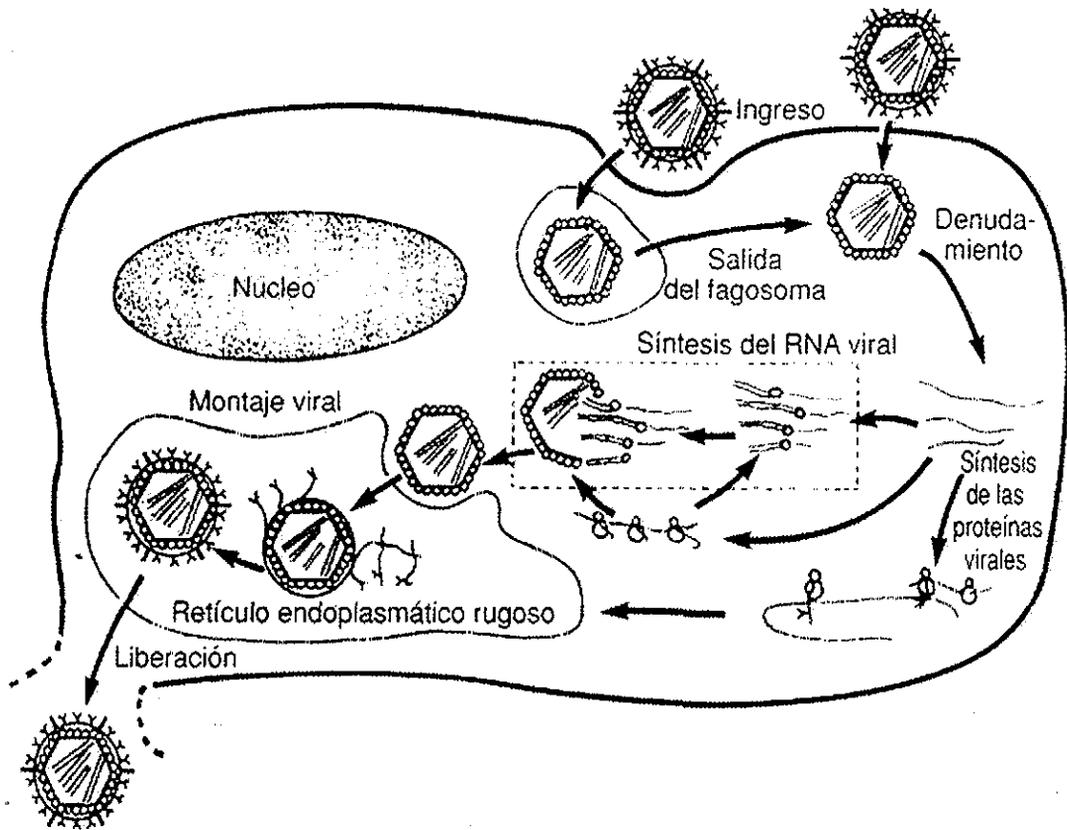


Figura 2.5 Ciclo viral de rotavirus Meissner (1994).

La replicación de los rotavirus ha sido estudiada principalmente en cultivos celulares continuos de células derivadas de riñón de mono, como las MA-104 (riñón fetal de mono Rhesus). En estos cultivos la replicación viral es rápida, las primeras partículas virales obtenidas en los cultivos a 33 °C, se pueden detectar entre 10 y 18 hrs posinoculación. Muchos de los detalles de la misma no se han logrado reconocer directamente en los rotavirus y se infieren del ciclo de los reovirus. El tropismo de los rotavirus, en una infección natural es por los enterocitos diferenciados o maduros del intestino delgado, no se han hecho estudios del ciclo viral en líneas celulares derivadas de los mismos. Sin embargo, por los trabajos publicados con microscopía electrónica, del intestino de animales infectados el ciclo puede ser muy similar al desarrollado en los cultivos de líneas celulares (Estes, 1996a).

El ciclo viral se divide en varias etapas: adsorción, penetración, denudación, replicación citoplasmática, armado de partículas virales y finalmente la lisis celular y liberación de los viriones.

El inicio de ciclo viral depende del tratamiento o acción proteolítica de enzimas digestivas como la tripsina *in vitro*, esta acción fracciona y modifica a la proteína VP4 en tres posibles posiciones en diferentes cepas virales, con residuos conservados de arginina, 231, 241 y 247 de la proteína VP4 del rotavirus SA-11 de simio, modificando su estructura sin fraccionarla completamente en los polipéptidos VP5 y VP8, esta acción favorece el reconocimiento inicial del sitio receptor en la célula blanco, sin ser la única proteína que participe en este proceso, en segundo lugar al modificarse la estructura de la proteína se desestabilizan las cápside externa e interna favoreciendo el proceso de desnudación viral. (Scott *et al.*, 1981; Arias *et al.*, 1996; Este, 1996a;). Este proceso parece desarrollarse también en el lumen intestinal por la acción de las enzimas pancreáticas, como antesala a la infección del enterocito (Ruiz *et al.*, 1997).

El siguiente paso en el proceso de la infección es la interacción de una o más de las proteínas con uno ó más receptores celulares en la membrana plasmática de la célula hospedera, sin embargo la identidad del receptor celular específico no se ha determinado, y en el proceso se han implicado tanto a la proteína VP4 como a la VP7. La interacción inicial con el sitio receptor parece estar asociada a la fracción VP8 y se ha demostrado para una serie importante de aislamientos, en especial de origen animal, que estaría vinculada con estructuras asociadas a ácido siálico. Sin embargo, la mayoría de los aislamientos en humanos parecen ser ácido siálico independientes y muchas cepas de origen animal aún mantienen la capacidad de infectar las células tratadas con neuroaminidasas, esto sugiere que la dependencia de ácido siálico, esta más asociada al serotipo P que al origen del aislamiento (Méndez *et al.*, 1996; Ciarlet y Estes, 1999).

La mayoría de los rotavirus aislados de animales se unen a receptores celulares con alto contenido de ácido siálico. Estudios con el virus SA-11, en cultivos de MA-104, han dado como resultado más de 13,000 unidades receptor. Lo anterior fue demostrado por Bastardo y Holmes en 1980, tratando a diferentes cultivos celulares con neuroaminidasa o colocando los aislamientos virales en contacto con compuestos ricos en fetuina y mucina, con lo que se reducía la infección viral *in vitro*. Evidencias más recientes indican que existe más de un receptor, se han identificado estructuras de tipo glicoconjugados como gangliósidos, glicolípidos neutros o glicoproteínas, sin embargo, aún cuando las células son tratadas con neuroaminidasa el virus logra establecer la infección. Esta unión se encuentra mediada por otros epítomos diferentes de VP8 específico para ácido siálico, se ha observado que la unión con ácido siálico puede ser suprimida y la proteína VP4 puede interaccionar con un segundo receptor siendo esta una unión mucho más específica que la primera (Estes, 1996a; Méndez *et al.*, 1996; Cuadras *et al.*, 1997). La entrada viral vía adsorción a ácido siálico parece claramente depender del tipo P de la cepa, en tanto las cepas ácido siálico independientes parecen lograr el reconocimiento del sitio receptor por la interacción de la VP7 y la VP4, Méndez *et al.*, (1996 y 1998) reportan cambios en la estructura antigénica de la VP4, dependiendo de su interacción con diferentes VP7.

El mecanismo de entrada de los rotavirus a la membrana celular es aún un gran debate, la mayoría de los estudios indican la penetración directa a través de la membrana en la fase lipídica de la misma, con la marca momentánea en la membrana del espacio de

entrada, esto demostrado por fluorescencia en liposomas en pH neutro, seguida de cambios en la permeabilidad de la membrana en cultivo celular, esta sería la forma más viable. Sin embargo, no se descarta la activación de la endocitosis vía receptor celular, pero parece que esta ruta conlleva a una infección no productiva asociada a los cambios de pH en el proceso de formación de la vesícula endocítica (Ruiz *et al.*, 1997; Cuadras *et al.*, 1997).

La penetración de la partícula viral tarda entre 60 y 90 minutos a partir de la adsorción de la misma, se encuentra dentro de la célula se activa la transcriptasa viral y se inicia la síntesis de ARNm en el citoplasma celular. Se ha sugerido que al penetrar el virión a la célula, el medio bajo en  $\text{Ca}^{2+}$  facilita la denudación ya que el armado de la cápside y liberación de ARN viral es dependiente de calcio, aún no se ha determinado si la pérdida de la capa externa se presenta en el paso transmembranal o una vez que se encuentra dentro de la célula (Estes, 1996a; Cuadras *et al.*, 1997). Reportan que las proteínas VP4 y VP7 se mantienen enclavadas en la membrana, en tanto Ludert *et al.* (1996) describen la denudación intracelular asociada a un medio bajo en calcio y a la activación de la transcripción

El fenómeno de cambios de permeabilidad se ha observado en diferentes virus como poliovirus, reovirus, adenovirus, influenza, estomatitis vesicular, Semliki Forest, Sendai y vaccinia, una vez que penetra el virus se inducen cambios en la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo la entrada de macromoléculas como algunas toxinas, este fenómeno no muy bien entendido parece presentarse sin importar cual sea la ruta de entrada del virus (Cuadras *et al.*, 1997).

Pequeñas cantidades de VP1 y VP3 se mantienen dentro de la nucleocápside original con las 11 dobles bandas de ARN. El siguiente paso es la transcripción, que se encuentra mediada por una ARNpolimerasa dependiente de ARN (VP1) y requiere tanto de la presencia de ATP, como de un sistema celular funcional ya que en temperaturas debajo de  $4^{\circ}\text{C}$  o en ausencia de ATP no hay replicación viral. La transcripción es asimétrica y cada una de las transcripciones, comienza en la región 5' conservada no codificable, continua sobre el marco de lectura abierto (ORF), para terminar en su correspondiente región 3', dando como resultado un duplicado complementario de la banda positiva en forma de ARNm. Estos ARNm funcionan como moldes tanto para la traducción a proteínas, como para la replicación genómica. Durante la infección por rotavirus los procesos de síntesis de las bandas de sentido negativo, de los ARNm y del empaquetamiento de los ARN de doble cadena, son eventos simultáneos (Patton *et al.*, 1996). Estudios donde se generan las condiciones para la replicación genómica *in vitro* en sistemas libres de células, se reporta que el 20% del ARN se mantiene en doble cadena y el 80% como bandas sencillas (Raming, 1997; Estes, 1996a).

Estos sistemas de replicación libre de células, indican que el complejo de replicación esta constituido por VP1 y VP2, pequeñas cantidades de VP6 y un alto porcentaje de proteínas no estructurales NSP3 y en menor proporción NSP1, NSP2 y NSP5 cuyas funciones se han vinculado a favorecer la unión del ARN. Se ha propuesto un modelo hipotético, donde en forma secuencial se agregan las proteínas VP2 y VP6 como una precápside mediada por la proteína VP1, VP3 y las proteínas no estructurales 1,2,3 y 5. Sin embargo, la imposibilidad de separar totalmente a estos elementos, no ha permitido

establecer si todas estas proteínas son indispensables para la replicación o coexisten con la transcripción simultáneamente. Gallegos y Patton, (1989), reportan la presencia de proteínas no estructurales asociadas a diversas zonas del citoesqueleto además del viroplasma, lo cual sugiere que están involucradas en facilitar el movimiento de las nacientes partículas virales (Gallegos y Patton, 1989; Estes, 1996a). Las proteínas VP7 y NSP4, son sintetizadas en ribosomas asociados a retículo, en tanto el resto de ellas se sintetizan en ribosomas libres (Estes, 1996a).

Los datos publicados por Gallegos y Patton, (1989), indican que las partículas VP2 y VP6 de la nucleocápside comienzan a agregarse en forma consecutiva formando una precápside y esta se presentan simultáneamente con la replicación.

Los rotavirus se ensamblan en el viroplasma citoplasmático, gemando al interior del retículo endoplásmico rugoso, guiados por las proteínas NSP4 enclavadas en la membrana como integrinas, donde las partículas virales se encuentran transitoriamente envueltas. La envoltura se pierde en el tránsito al interior del retículo y es finalmente reemplazada por la cápside externa de los viriones maduros. La proteína VP4 en combinación con el reconocimiento de la NSP4 aparentemente guía este proceso. El armado final de la precápside formada por VP2 Y VP6, parece no ser dependiente de calcio, ya que en medios restringidos de calcio se logran ensamblar viriones de doble cápside, en tanto el agregado final de la cápside externa con VP7 y VP4 solo se presenta en medios ricos en calcio (Estes, 1996a).

Finalmente la liberación viral, se asocia a citolisis donde se vuelve a dar un papel relevante a la NSP4, con el incremento intracelular de calcio, la activación de fosfolipasa-C, la consecuente desestabilización de las membranas celulares y la liberación de los viriones maduros (Estes, 1996a).

## **2.6.-EPIDEMIOLOGÍA.**

Los rotavirus se han destacado por ser los agentes etiológicos virales más frecuentes en la gastroenteritis aguda de neonatos y niños menores de dos años en todo el mundo y se consideran ubicuos. Han sido aislados de niños tanto en países desarrollados como en los del tercer mundo, con morbilidades similares, sin embargo la mortalidad en los primeros es menor (Kapikian, 1996a). Dentro de las especies domésticas estos han sido aislados en becerros, corderos, lechones, cabritos, potros, cachorros de canino y felino y aves (Blood, 1986).

En humanos se ha demostrado una morbilidad similar en países desarrollados como en no desarrollados, considerando a los rotavirus como un virus democrático, que presenta perfiles de distribución similares en animales y en el hombre, sin embargo la sobrevivencia en los primeros es mayor, debido a sistemas de atención hospitalaria tempranos en humanos y a sistemas de manejo, en la explotación animal, de mejor calidad nutricional y menores complicaciones con patógenos secundarios. En Medicina Veterinaria el comportamiento similar debe considerar que el equivalente a los tratamientos hospitalarios para niños esta restringido básicamente a especies como equinos, caninos, felinos o animales de zoológico y no es la generalidad de la producción animal.

similar debe considerar que el equivalente a los tratamientos hospitalarios para niños esta restringido básicamente a especies como equinos, caninos, felinos o animales de zoológico y no es la generalidad de la producción animal.

Los rotavirus presentan una ruta de transmisión oro-fecal. Son altamente resistentes a la inactivación por medios físicos. Un gran número de partículas virales se libera durante los cuadros de infección y una dosis muy baja es suficiente para asegurar la transmisión y establecimiento de la infección. Aunando a esto, la contaminación de fuentes de agua y alimentos por el virus, su persistencia en las instalaciones y el hecho de que tanto animales como humanos infectados con diversas cepas, pueden ser fuentes de infección entre unos y otros; asegura la amplia difusión de la enfermedad (Desselberger y Gray, 2000).

Los rotavirus presentan un amplio rango de hospederos susceptibles y algunas cepas muestran evidencias de pocas restricciones en las infecciones interespecies, como se ha demostrado experimentalmente con infecciones heterólogas, con el uso de vacunas preparadas con virus de origen animal en la inmunización de niños o con la replicación de aislamientos humanos en otras especies animales (Gouvea y Brantly, 1995).

La infección por rotavirus ha demostrado estar restringida por la edad, los cuadros clínicos más severos se presentan en animales jóvenes; en el humano el rango más crítico es de 1 a 6 años de vida; en bovinos y equinos la mayor incidencia se presenta en los primeros 10 días de vida; para los ovinos se reportan casos desde poco menos de 3 semanas de vida a los tres meses; en lechones de las primeras dos semanas a las 4 y 8 semanas de vida; en caprinos los datos publicados evidencian cuadros clínicos desde los 6 días de nacidos, 20 días, hasta 12 y 16 semanas; en caninos y felinos se reporta alrededor de las seis semanas de vida (Blood, Henderson y Radostits 1986; Prem y Young, 1993; August, 1993; Ciarlet *et al.*, 1998b). La prevalencia de la infección por rotavirus en infantes neonatos no ha sido examinada sistemáticamente, pero existe un alto índice de infecciones asintomáticas circulando en los cuneros de los hospitales a nivel mundial. Existen reportes de cuadros clínicos en niños mayores de esta edad y en adultos, lo mismo que en bovinos y ovinos, asociados en general a cepas atípicas, presentes en regiones geográficas bien delimitadas de Asia, como en el caso de infecciones con cepas atípicas del Grupo B en adultos humanos asociado al contacto con rumiantes o del Grupo C en adultos y niños preadolescentes en contacto con cerdos (Kapikian y Chanock, 1996a).

El modelo de infección en el conejo ha permitido demostrar la susceptibilidad en individuos mayores, los animales son infectados con rotavirus arriba del año de edad y esto induce lesiones típicas de la enfermedad en los animales. El modelo murino presenta evidencias similares, sin embargo en esta especie aunque el adulto puede infectarse no desarrolla el cuadro clínico o sus lesiones. Los trabajos reportados por Ward y Saif (Dessaelberger y Gray, 2000) utilizando a cerdos gnotobióticos como modelo de infección demuestran la susceptibilidad de estos animales a cepas de origen humano hasta las seis semanas de edad. Kodituwakku, (1990) monitorea la excreción intermitente de rotavirus por vacas gestantes sin manifestación clínica y brotes endémicos en becerros a lo largo de 7 meses. Estos datos indican una circulación constante del virus en las poblaciones que actúan como fuente o reservorio del virus y aseguran su difusión a nivel mundial. Una seropositividad del 90% en adultos humanos, bovinos y ovinos, apoya aún más el constante

En términos generales parece existir una asociación entre el subgrupo de rotavirus, su patrón de distribución en el electroferotipo y el serotipo de la cepa, con la especie susceptible. Los avances en biología molecular permiten evidenciar la transmisión de los rotavirus entre diversas especies animales incluyendo al hombre, al facilitar la identificación de los aislamientos de acuerdo a las características que permiten ubicarlos dentro de los sistemas de clasificación de los rotavirus. Un ejemplo de lo anterior son rotavirus de los serotipos G5, G10 o P<sub>HCR3</sub>, subgrupo I (VP6 del grupo A), del electroferotipo largo, característicos de aislamientos en animales que han sido detectados cada vez con más frecuencia en humanos. Algunas de estas cepas virales originales de animales, muestran evidencias de recombinaciones con cepas de humanos, como resultado de una transmisión interespecies (Gouvea y Brantly, 1995).

La estacionalidad es una característica importante de estas infecciones virales y antes que los rotavirus fueran indetificados, se conocían a estos episodios infecciosos como "gastroenteritis invernal y vómito invernal". De un total de 34 estudios de estacionalidad en diferentes partes del mundo se observó que en las zonas de clima templado los brotes clínicos se presentan en las temporadas de otoño-invierno, mientras que en las regiones tropicales esta estacionalidad es menos marcada, con circulación viral todo el año (García *et al.*, 1996; Parashar *et al.*, 1998). En Norte América se observa el inicio de brotes por rotavirus en humanos en los meses de octubre a noviembre en México, para seguir de diciembre a febrero en los Estados Unidos y finalizar en el inicio de la primavera en Canadá, la razón de esta distribución es desconocida, pero se repite en forma cíclica (Meissner, 1994; Kapikian *et al.*, 1996b; García *et al.*, 1996). En los Estados Unidos se registra también un movimiento oeste-este, detectándose los primeros brotes anualmente en el sur oeste del país para terminar en el noreste en los meses de marzo abril (Kapikian y Chanock, 1996a; Parashar *et al.*, 1998).

## 2.7.-PATOGÉNESIS Y PATOLOGÍA.

La capacidad de los rotavirus para causar enfermedad (diarrea) es la mejor definición de su patogenicidad, su virulencia describe la intensidad o la magnitud con que el virus o una cepa viral causa enfermedad, cuando es comparado con otro rotavirus o cepa. La virulencia y la patogenicidad dependen de un gran número de factores del hospedero y el virus, en el hospedero la presencia de receptores celulares para el virus, edad, estado inmunológico, nutricional y genotipo. Los factores virales incluyen dosis infectante, capacidad de diseminación entre hospederos, tropismo celular o la capacidad de diseminarse entre poblaciones específicas de células y la capacidad de causar la enfermedad (Burke y Desselberger, 1996).

La patogenicidad de los rotavirus no depende de un gen en especial, sino que esto parece estar relacionada con las posibles variantes de cada uno de ellos, en las diversas cepas, en relación con su hospedero. Dicho de otra forma, los 11 genes del rotavirus pueden ser el determinante de patogenicidad en cada cepa u hospedero en particular (Burke y Desselberger, 1996; Meissner, 1994).

La forma endémica de rotavirus es causada por la transmisión entre individuos, los rotavirus pueden ser excretados en heces a niveles de  $10^9$  a  $10^{12}$  partículas infecciosas/ml de materia fecal y son suficientes diez partículas para establecer la infección cuando todos los factores de patogenicidad virales y los del hospedero están presentes (Kapikian y Chanock, 1996a; Estes, 1996a).

Los rotavirus soportan el tránsito gástrico con sus condiciones enzimáticas y de pH y llegan al lumen duodenal, se ven expuestos al efecto de proteasas como la tripsina y pancreatina, las cuales fraccionan y modifican la estructura a la proteína VP4, modificando su estructura, sin fraccionarla en las porciones VP5 y VP8. La porción VP8 funciona como receptor viral, el cual va a establecer la interacción inicial virus-célula. La capacidad de hemaglutinación de esta proteína indica, en un gran número de aislamientos, en especial de cepas de origen animal, que el receptor celular es una proteína de membrana con ácido siálico o glicoconjugado y las células blanco por parte del hospedero, son enterocitos maduros ubicados de la mitad a la cresta de la vellosidad intestinal (Kapikian y Chanock, 1996).

Una vez fijada la partícula viral en este reconocimiento inicial, la VP7 parece establecer un contacto sitio receptor más específico, que no se ha logrado demostrar claramente, donde se involucran estructuras como gangliósidos, glicolípidos o glicoproteínas. El rotavirión inicia la penetración al enterocito, en particular en yeyuno, ayudado por el efecto desnudante de la modificación estructural en la proteína VP4, en íntima relación con VP7 y VP6, penetra a la célula blanco como un virión de dos cápsides, ya sea por penetración directa o endocitosis. Se establece en las cercanías del retículo endoplasmático rugoso, donde inicia la replicación y traducción de proteínas virales, con periodo de incubación de 24 a 48hrs promedio (Kapikian y Chanock, 1996a; Estes, 1996a).

El virus también ha sido encontrado en células caliciformes, células endócrinas epiteliales y macrófagos de la lámina propia. Las células infectadas presentan cisternas alargadas en el retículo endoplasmático y microvellosidades cortas (García *et al.*, 1996).

El inicio del ciclo viral y la síntesis de sus productos establecen el cuadro clínico y patológico de esta enfermedad. Por un lado el metabolismo celular es desviado a la replicación viral y no al mantenimiento de la integridad de la misma; la aparición de la proteína NSP4 en la célula determina varios efectos simultáneos:

- a) Aumenta los niveles de calcio intracelular funcionando como una enterotoxina y estimula la traducción de la señal para secreción de cloro intracelular dependiente de AMPc, favoreciendo la salida de cloro al lumen intestinal, seguida de salida de agua, sodio y potasio para compensar al cloro e inicia la diarrea (Cunliffe *et al.*, 1997; Pager, Alexander y Duncan 2000).
- b) El aumento de calcio intracelular se ha relacionado con la activación de Fosfolipasa C y con desestabilización de las membranas celulares que favorece la liberación de los viriones maduros. La destrucción de enterocitos maduros reducen la capacidad de absorción intestinal, aumentando el contenido del lumen. La activación de Fosfolipasa C también activa la respuesta inflamatoria local contribuyendo a la pérdida de líquido (Estes, 1996a).

reducen la capacidad de absorción intestinal, aumentando el contenido del lumen. La activación de Fosfolipasa C también activa la respuesta inflamatoria local contribuyendo a la pérdida de líquido (Estes, 1996a).

- c) La destrucción de enterocitos maduros tiene varias consecuencias como la hiperplasia de las criptas intestinales, reposición del epitelio intestinal con células inmaduras, que carecen de disacaridasas (maltasa, sucrasa y lactasa), por lo cual los individuos infectados no tiene la capacidad de utilizar estos azúcares, importantes en lactantes, quedando los mismos además a disposición de la flora bacteriana local y funcionando ellos y sus productos de fermentación como solutos con un poder osmótico importante en el lumen, lo cual favorecerá aún más la salida de líquido (Kapikian y Chanock, 1996a; Giono, Escobar y Valdespino, 1993).
- d) Se ha reportado un efecto de la NSP4 sobre el sistema nervioso local con la activación de la diarrea, náusea y vómito (en monogástricos). Mediante la utilización de bloqueadores de canales de calcio, sodio y nicotina en secciones de intestino, se ha logrado demostrar como en presencia de esta proteína se puede activar o inhibir la salida de líquido al lumen intestinal no infectado. En este estudio Lungren *et al.* (2000) proponen que el aumento de calcio intracelular en el enterocito, libera aminos y/o péptidos que tienen la capacidad de estimular dendritas en las terminaciones nerviosas libres debajo de la capa epitelial, activando tanto a células endocrinas como reflejo del sistema nervioso local.

Las células epiteliales muertas son sustituidas por células inmaduras de las criptas dando como resultado diarreas típicas de los rotavirus, mala absorción, por la disfunción celular sumada a una disminución del área total de absorción por la atrofia de la vellosidad, estos cambios se observan en zonas intercaladas con mucosa normal. Se observa una hiperplasia compensatoria en las criptas y su consecuente hipersecreción. Se han postulado algunos cambios en la microcirculación local, asociados a isquemia y a los subsecuentes cambios estructurales en la vellosidad intestinal en reparación (Burke, 1996).

La signología de la enfermedad va a estar directamente relacionada con la edad del individuo y el grado de lesión, en un espectro que varía desde la infección asintomática a diarrea leve, hasta la diarrea severa con deshidratación desde parcial hasta letal, asociada a los cambios ya descritos en el intestino (Giono, Esobar y Valdespino 1993; García *et al.*, 1996; Ciarlet *et al.*, 1998a). Las lesiones pueden instalarse en un periodo de 24 a 48 hrs una vez iniciada la infección, las vellosidades intestinales pueden recuperarse en el lapso de 7 días, sin embargo suelen requerirse 10 a 21 días para recuperar el ritmo de crecimiento de los animales afectados (Blood, Henderson y Radostits 1986; Muñoz *et al.*, 1995).

### **2.7.1.-Manifestaciones Clínicas:**

La signología depende de al edad del individuo infectado y la severidad del cuadro clínico, pudiendo resumirse en:

- Vómito ( monogástricos) a las 24 a 36 hrs post infección que cede a las 48 ó 72hrs.

- Se considera afebril o tan solo se presenta una febrícula.
  - Diarrea 24 a 48 hrs post infección, su duración promedio es de 3 a 5 días y la severidad de la misma depende de la edad del animal y del cuadro clínico, es una diarrea amarillenta, totalmente líquida, hasta heces ligeramente pastosas.
  - Deshidratación, letargia e irritabilidad, que dependerán de la severidad del cuadro clínico.
  - El cuadro diarreico, por mala absorción e intolerancia a la lactosa y otros azúcares, puede prolongarse hasta 20 días.
  - El cuadro clínico puede llevar al hospedero a la muerte por deshidratación.
  - En individuos inmunosuprimidos o inmunocomprometidos el cuadro clínico puede volverse crónico.
- (Kapikian, 1996a).

### **2.7.2.-Lesiones Macroscópicas.**

A la necropsia además de los signos de deshidratación, se observa distensión del intestino delgado, con contenido acuoso amarillento. Sin embargo, pueden no observarse cambios macroscópicos mayores y esto dependerá de la severidad del cuadro clínico (Trigo, 1998).

### **2.7.3.- Lesiones Microscópicas.**

Se caracterizan por necrosis apical de la vellosidades intestinales, seguida de acortamiento y atrofia de las mismas, hipertrofia compensatoria de células de las criptas intestinales, desprendimiento de la lámina basal en las vellosidades infectadas, infiltración de células mononucleares en la lámina propia. A nivel celular la microscopía, permite observar distensión de las cisternas del retículo endoplasmático e hinchazón de las mitocondrias (Giono, Escobar y Valdespino 1993). Las lesiones se presentan en zonas intercaladas con tejido normal, afectando principalmente yeyuno en segundo término al ileon y en menor proporción al duodeno (Ciarlet *et al.*, 1998a; García *et al.*, 1996).

### **2.8.-Tratamiento.**

La principal herramienta de tratamiento para la gastroenteritis por rotavirus es la terapia de flúidos, con reposición paraenteral de líquidos y electrolitos. En la terapéutica a infantes se ha observado una rehidratación satisfactoria con diversos sueros orales, con soluciones de electrolito de sucrosa y glucosa. Soluciones similares basadas en harinas de arroz y de maíz se han suministrado a infantes afectados con rotavirus. Se favorece la lactancia materna, a pesar de continuar con los cuadros de diarrea y vómito, la idea es lograr mantener un equilibrio entre los líquidos perdidos y el aporte diario de los mismos (Kapikian y Chanock, 1996a).

En el caso del humano se ha demostrado que es importante no suspender la lactancia materna, ya que se observó que los en los niños donde continuaba el amamantamiento, la duración del cuadro clínico y severidad del mismo era menor,

comparado con los casos en que se suspendía. En un inicio se considero que este efecto se debía a la presencia de anticuerpos neutralizantes en la leche materna. Sin embargo, cuando se intentó alimentar a niños con cuadro clínicos por rotavirus con leche de vacas inmunizadas, el resultado no fue igual. Por un lado la leche bovina es rica en lactosa y en el momento del cuadro clínico por rotavirus no es posible disponer de la misma, favoreciendo aún más el cuadro de diarrea con la presencia de solutos a disposición de la flora normal y que intestino no puede aprovechar o absorber, con poder osmótico en el lumen intestinal. En la leche materna de humanos se ha detectado la presencia de una glicoproteína de 46 kDa, con oligosacáridos en su porción N-terminal llamada lactadherina, que es producida por las células epiteliales la glándula mamaria durante la lactancia, la cual no es modificada en el proceso digestión del infante y tiene la capacidad de unirse a las proteínas de la cápsida externa, bloqueando los receptores virales de las regiones ricas en ácido siálico. La lactadherina purificada, en experimentos *in vitro*, reduce la infección en cultivos celulares, funcionando como una competencia homóloga del receptor celular del hospedero. Evidencias como la de esta glicoproteína, sugieren la participación de grupos similares de carbohidratos en los tratamientos con soluciones de electrolitos y harinas de arroz y maíz. En un principio se postuló que la base de estos tratamientos era en primera instancia mantener en el lumen intestinal un sustrato para la utilización de la tripsina y reducir el efecto de la misma sobre las partículas virales y en segundo lugar se propuso que el efecto se podía atribuir a sus propiedades astringentes (Newburg y Petresen, 1998).

Para el tratamiento clínico de esta gastroenteritis en primer lugar se debe recuperar y mantener el balance electrolítico y evitar la deshidratación del individuo. La terapia de fluidos se recomienda sea con base en la solución de rehidratación oral y parenteral que la OMS (Organización Mundial para la Salud) ha desarrollado para el cuadro clínico asociado a esta gastroenteritis viral, buscando un rápido balance electrolítico. Las recomendaciones dietarias se han establecido tanto para los animales como para los niños donde se recomienda en forma paralela a la terapia de fluidos continuar con una dieta ligera con base en harinas o leches maternas en humanos no en rumiantes. Finalmente en el tratamiento de la rotavirus es importante un buen diagnóstico y no se recomienda en estos casos el uso de antibiótico, los cuales tienden a agravar los cuadros clínicos, por un lado alteran la flora normal, la cual tarda más en reestablecerse una vez terminado en cuadro clínico y en segundo lugar predispone a la colonización por gérmenes potencialmente patógenos como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Clostridium* y/o *Candida*, favoreciendo las infecciones secundarias del huésped, el incremento de la resistencia bacteriana y de los costos de tratamiento. Estos últimos son argumentos de peso para, tratar de conocer y entender aún más el comportamiento de los rotavirus en las diversas especies susceptibles (Meissner, 1994).

## 2.9.-INMUNOLOGÍA.

### 2.9.1.-INMUNOLOGÍA EN LA ROTAVIROSIS.

A pesar de ser una infección limitada a la superficie de la mucosa intestinal los rotavirus inducen una respuesta local y sistémica, los animales desarrollan una inmunidad activa contra rotavirus después de una infección natural, esta es generalmente específica

importancia contra rotavirus y se correlaciona con la presencia de anticuerpos protectores en sus secreciones. La presencia de anticuerpos neutralizantes es proporcional a la protección, contra la infección por rotavirus; la IgA secretoria es más efectiva en la protección comparada con la participación de IgG e IgM, ya que la primera es más resistente a la degradación proteolítica en el lumen intestinal y es la inmunoglobulina más abundante en las secreciones mucosales de la mayoría de las especies. La mejor inmunidad mucosal es inducida por inmunización oral. Los anticuerpos circulantes no son protectores (Prem y Young, 1993).

Van Pixteren *et al.*, (1998, 1999) demostraron la inducción de anticuerpos neutralizantes de las clases IgA, en la mucosa intestinal dos semanas post infección en corderos gnotobióticos, no calostrados. En este mismo trabajo se observó un incremento en los linfocitos B y en las células presentadoras de antígeno en el tejido linfoide asociado en particular en las placas de Peyer en yeyuno a los 5 días post infección, en tanto los anticuerpos neutralizantes son detectados 7 días después del desafío.

La inmunidad pasiva en los neonatos es adquirida a través del calostro y/o la leche y se conoce como inmunidad lactogénica, es la única forma viable de lograr la protección de los individuos neonatos. Nuevamente es la IgA la inmunoglobulina predominante y eficiente en la leche materna humana. En los rumiantes este lugar lo ocupa la IgG1, la cual aumenta su concentración tras la inmunización de las madres (Prem y Young, 1993).

La inmunidad celular ha demostrado jugar un papel importante en la eliminación del virus, en el modelo del ratón se ha detectado actividad T citotóxica a los 7 días post infección (Prem y Young, 1993). En contraste Franco y Greenberg (1997), demuestran en ratones desnudos, deficientes en células T, que estos logran producir IgA y eliminar la infección por rotavirus, sugieren como explicación la activación de linfocitos B, T independientes asociados a linfocitos B1 en la mucosa y peritoneo, en contraste con la esperada activación de clonas de linfocitos B IgA, vía su interacción con linfocitos T CD4. La actividad citotóxica específica contra rotavirus es restringida al complejo mayor de histocompatibilidad. Los linfocitos T CD8+ han demostrado también tener una participación importante en la eliminación viral, ya que en animales deficientes en este grupo celular la infección por rotavirus se vuelve crónica (Prem y Young, 1993). McNiel *et al.*, (1995) demuestran como animales inmunodeficientes en linfocitos CD8+, pero positivos a la producción de IgA, con infecciones crónicas por rotavirus logran eliminar la infección con la adopción de clonas activas de células T CD8+ contra rotavirus. En tanto animales deficientes en CD8+ e IgA, logran eliminar al virus tras la transferencia de clonas CD8+ positivas a rotavirus, indicando el importante papel de estos linfocitos en la eliminación viral, aunque no indispensable. La actividad de linfocitos T específicos contra rotavirus se ha encontrado tanto en la lámina propia como en los esplenocitos y esto demuestran tener tanto una actividad homotípica, como heterotípica, por lo cual Offit y Dudzik, (1988) postulan que la respuesta heterotípica que se observa en rotavirus, tras infecciones subsecuentes con serotipos diferentes en la primera infección o la protección conferida tras la vacunación con cepas de origen bovino en niños, esta relacionada con la activación de estas clonas de linfocitos T, siendo estos más importantes en establecer la memoria de las respuestas, que en la eliminación de la primoinfección.

Esta circulación de células T y B son evidencia del movimiento constante de estos grupos celulares entre los órganos linfoides, explican la seroconversión o aparición de anticuerpos séricos, después del desafío mucosal y se reportan como un buen indicador de los niveles protectores una vez inducida la respuesta inmune en la mucosa intestinal. Se proponen como indicadores en el desarrollo de las vacunas orales contra rotavirus (Brown *et al.*, 2000). En el modelo murino con ratones  $\beta$ 2-microglobulina negativos, se ha observado que la eliminación del virus del intestino correlaciona con la presencia o aparición de la respuesta específica a IgA (Franco y Greenberg, 1997). Ratones JHD negativos (deficientes de células-B), fueron capaces de eliminar por completo la infección por rotavirus, pero permanecen susceptibles a cualquier reinfección. Esta observación sugiere que los linfocitos B juegan un papel preponderante en el control de la infección por rotavirus (Franco y Greenberg, 1997; Oldham y Bridger, 1992). En las aves se ha demostrado también la participación de células NK en la eliminación viral (Prem y Young, 1993).

Brown y Offit (1998) señalan la participación de macrófagos en el desplazamiento de los rotavirus al tejido linfoide extraintestinal, detectando por inmunofluorescencia proteínas virales 48hrs post inoculación en los macrófagos de la placa de Peyer y posteriormente en los de la lámina propia y el nodo linfático mesentérico, en menor proporción se demuestran proteínas virales en células B y no se detectan en linfocitos T o en células dendríticas. En contraste otros trabajos se señala que las células presentadoras de antígenos los macrófagos, Linfocitos B, células dendríticas son las responsables de iniciar y mantener la respuesta inmune específica al virus. La inducción de la respuesta inmune virus específica, inicia en la Placa de Peyer, sugiriendo una importante participación de los macrófagos en la presentación y activación de la respuesta humoral, sin descartar la activación T dependiente ya citadas. Finalmente este desplazamiento de los rotavirus por los macrófagos del GALT, podría ser la ruta de invasión a tejido renal y sistema nervioso central, raramente reportada en infantes inmunocomprometidos

Utilizando ELISAs convencionales la mayor respuesta esta dirigida principalmente a VP6, pero el resultado en el reconocimiento de esta proteína no se puede correlacionar con el grado de protección en el animal, en el caso de las proteínas VP7 y VP4 si existe una correlación entre anticuerpos neutralizantes y protección. La respuesta inmune específica contra rotavirus es proporcional a la concentración de estas estructuras en el rotavirión y es básicamente homotípica y dirigida a epítopos específicos en ambas proteínas (Prem y Young, 1993).

Van Pinxteren *et al.*, publicaron en 1998 y 1999, dos trabajos sobre vacunación y protección natural a rotavirus utilizando corderos gnotobiontes, demuestran una respuesta inmune importante en los animales desde los seis días de vida, con la aparición de IgA e IgG tanto mucosales como séricas a los 8 días post infección o vacunación, la aparición de IgG fue mas temprana, en tanto IgA demostró una capacidad neutralizante mayor. En las mismas publicaciones los autores exploraron la respuesta mediada por el tejido linfoide, asociado a las diferentes regiones del intestino, através de la amplificación del ARNm de las distintas citocinas involucradas en la coordinación de la respuesta inmune IL-2, IL-4, IL-6, IFN  $\gamma$  y factores de crecimiento celular, detectando la principal respuesta al desafío viral en las placas de Peyer yeyunales a los tres días postinfección, en forma similar a lo

reportado por Bruce *et al.*, (1995) y Van Pijnixteren *et al.*, 1998 y 1999) se sugiere que es aquí donde se está induciendo el cambio en la síntesis de IgM a IgA en una respuesta Th2.

### 2.9.2.-CONSIDERACIONES SOBRE INMUNOLOGÍA EN RUMIANTES.

A diferencia de los lagomorfos, primates y roedores, otros mamíferos no tienen la capacidad de transferir anticuerpos séricos a sus crías durante el desarrollo fetal, los ungulados tienen placentas (epitelio corial) impermeables a inmunoglobulinas (Tizard, 1992; Salmon, 1999). Los ungulados tienen la capacidad de montar una respuesta inmune primaria, aún sin recibir la protección de los anticuerpos maternos, pero dicha respuesta requiere de un periodo importante para establecerse y suele ser más largo que el requerido por algunos patógenos para instalarse, por lo cual la ingestión de calostro rico en inmunoglobulinas y células del sistema inmune, que son translocadas de la glándula mamaria, es esencial para la sobrevivencia de los animales neonatos. Al recibir el calostro el animal presenta un perfil inmunológico similar al adquirido por su madre tras el estímulo normal de su sistema inmune (Salmon, 1999).

Debido a la falta de estimulación previa al sistema inmune del recién nacido, estos son incapaces de montar una respuesta protectora en las mucosas respiratorias y digestiva, rápida y eficiente. La inmunidad lactogénica en roedores y primates se ha asociado en términos generales a la presencia de IgA secretora, específica contra los patógenos más comunes para la mucosas maternas y son transportadas vía la asociación del desarrollo de la glándula mamaria en la gestación y la inmunidad propia de la hembra. En los rumiantes adultos se ha demostrado que predomina la presencia de IgG1 sobre la IgA en la mucosa intestinal y en las secreciones de la glándula mamaria, en tanto en la mucosa respiratoria predomina la IgA (Lee, Meeusen y Brandon, 1992; Salmon, 1999). Estos hallazgos dan indicios de la importancia que puede tener la IgG1 en los rumiantes sin descartar el papel de la IgA (Salmon, 1999).

Existen diferencias significativas en los isotipos predominantes en el calostro del bovino y los porcinos y a pesar de que dichos estudios no se han desarrollado en caprinos, parece válida la hipótesis bajo la cual se deben estar comportando en forma similar en estos últimos (Salmon, 1999). El cambio en el isotipo predominante en la respuesta mucosal se sugiere que depende de la interacción entre células presentadoras de antígeno, linfocitos T y linfocitos B, tanto en la mucosa gastrointestinal como en el desarrollo de la glándula mamaria y factores hormonales involucrados en la misma (Lee, Meeusen y Brandon 1992; Fitzpatrick *et al.*, 1992). La expresión de los diferentes isotipos en la mucosa de los rumiantes es aún un área por investigar, en el modelo murino se reconoce actualmente que la expresión de IgA es mediada básicamente por IL-5 e IL-6, en una respuesta celular dependiente de IFN- $\gamma$ . La IgA mucosal tiene dos orígenes, por un lado están los linfocitos B de las Placas de Peyer y en segundo lugar los linfocitos B1 de la cavidad peritoneal (Husband, Bao y Beagly, 1999). La protección mucosal pasiva en los animales neonatos depende del suplemento continuo de IgA dimérica en los monogástricos e IgG1, pero no IgG2, en los rumiantes. La inmunidad lactogénica humoral, en la mucosa intestinal, es dependiente de la traslocación de IgA e IgG1 de la glándula mamaria a la leche y el calostro y/o de la emigración de linfoblastos IgA de la *lámina propia* intestinal materna a la glándula. La mayor parte de IgG1 es transportada desde suero, aunque existe

intestinal, es dependiente de la traslocación de IgA e IgG1 de la glándula mamaria a la leche y el calostro y/o de la emigración de linfoblastos IgA de la *lámina propia* intestinal materna a la glándula. La mayor parte de IgG1 es transportada desde suero, aunque existe síntesis de IgG1 local durante la lactación (Dréau *et al.*, 1995; Salmon, 1999; Hein y Dudler, 1999).

Después del destete, los neonatos son capaces de montar una respuesta inmune mucosal y los destetes tempranos no parecen intervenir en la capacidad de madurar esta característica (Salmon, 1999). En los rumiantes se ha reportado una comunicación o transporte que no manifiesta la misma eficiencia en el tráfico entre la glándula mamaria y el tejido linfóide asociado a las mucosas (MALT), comparado con los monogástricos. La importancia de esta observación radica en la sospecha de una protección materna menos eficaz en rumiantes, comparada con la conferida por los monogástricos en general. En porcinos se ha demostrado una marcada preferencia de los linfocitos originados en la mucosa intestinal a desplazarse hacia la glándula mamaria, soportando la idea de que la inmunidad materna adquirida por la cría en sus primeros días es un espejo de aquella diversidad de agentes a los cuales se enfrenta la madre. En bovinos y ovinos los estudios realizados hasta el momento señalan deficiencias en esta conexión entre el MALT y la glándula mamaria, donde se ha observado una preferencia de los linfocitos originados en el tracto gastrointestinal por los nodos linfoides periféricos y por el tejido mamario, asumiéndose una protección de menor eficiencia que en monogástricos (Harp, Runnels y Pesch, 1988; Salmon, 1999; Rothkötter, Pabst y Brailey, 1999).

## **2.10.- MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.**

Las manifestaciones clínicas de la gastroenteritis aguda causada por rotavirus no son suficientes para llegar a un diagnóstico etiológico, ya que son semejantes a las presentadas por una infección bacteriana. Por este motivo se requiere de técnicas de diagnóstico de laboratorio diversas para su estudio y diagnóstico.

### **2.10.1.- Microscopía electrónica.**

Se basa en la observación microscópica de partículas virales características por un rayo de electrones generado por un filamento de tungsteno (pistola de electrones), donde la imagen puede ser resuelta en un rango de 100µm a 10 nm con lentes electromagnéticas, que permiten la alineación de los electrones para permitir la observación de las mismas. Detecta al rotavirus en concentraciones de  $10^7$  a  $10^9$  por ml de heces. Es un método rápido y eficiente que tiene la ventaja de permitir la observación simultánea de otros microorganismos. La inmunomicroscopía electrónica es una variante del método anterior, utilizando anticuerpos que provocan la aglutinación de las partículas virales, se puede utilizar para favorecer la observación en bajas concentraciones virales o en el caso de contar con anticuerpos monoclonales como una herramienta de tipificación (García *et al.*, 1996; MacRae y Srivasta, 1998; Presscott, Harley y Klein, 2000).

### **2.10.2.-Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)**

Se conoce como ROTAFORESIS y permite la identificación de ARN del rotavirus en muestras de heces. Consiste en hacer una extracción del ARN viral, colocar una muestra en un gel de poliacrilamida y someterla al paso de corriente. Al término del procedimiento se puede detectar la migración de los 11 segmentos del ARN viral. El patrón de migración es específico, por lo tanto se presentan ligeras variaciones entre muestras analizadas. Esta técnica presenta varias ventajas no son influenciadas por las variaciones de serogrupo y serotipo, es una técnica rápida (2hrs) detecta desde  $10^{-5}$  partículas por gramo de heces (Espejo *et al.*, 1978; Giordano *et al.*, 1991; García *et al.*, 1996).

### **2.10.3.-Seroneutralización.**

Las respuestas inmunes de los animales pueden emplearse para el diagnóstico. Primero con la presencia de anticuerpos específicos se identifica a un antígeno. Segundo al contar con un anticuerpo específico en el suero es posible determinar si un animal ha estado expuesto a un antígeno específico. Es evidente que la presencia de anticuerpos para un microorganismo específico en un determinado suero indica la exposición previa a un epítipo que existe en ese microorganismo. Sin embargo, no proporciona en forma automática una prueba de que en ese momento exista una infección. Este antisuero contiene una muestra heterogénea de anticuerpos de sus diversas clases. La prueba de seroneutralización es una prueba altamente específica para la detección viral, estima la capacidad que tiene el anticuerpo para neutralizar la actividad biológica del virus cuando se mezclan *in vitro*. Estas pruebas se emplean en cultivos celulares o animales en experimentación donde los virus tienen efectos reconocibles sobre el sistema indicador. Es posible evitar que los virus infecten a las células después de que el anticuerpo específico se haya combinado con ellos y después de que haya bloqueado los sitios críticos de fijación. Esta reacción es la base de las pruebas de neutralización que se utilizan para identificar virus desconocidos o para medir la actividad específica antiviral de los anticuerpos. Las pruebas de neutralización son altamente específicas y muy sensibles. Las pruebas de neutralización en cultivos de tejido son especialmente adecuadas en el caso de aquellos virus que inducen efectos citopáticos y que se identifican con facilidad por hemaadsorción, ya que ambas reacciones pueden inhibirse mediante una exposición previa del virus a los anticuerpos (Tizard, 1995; Presscott, Harley y Klein, 2000).

### **2.10.4.-Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA). Indirecta.**

ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) es una prueba de unión primaria entre antígeno y anticuerpo y se puede utilizar tanto para detectar como para cuantificar los anticuerpos como los antígenos. La prueba es una inmunoadsorción indirecta; detecta anticuerpos y no antígenos, se basa en la fijación de antígenos proteicos en placas de poliestireno. Posteriormente se coloca el suero problema en los diversos pozos de las placas, se incuban y da un tiempo para establecer la reacción antígeno-anticuerpo. Seguido de varios lavados donde se retira todos los componentes del suero que logran

fijarse en una unión específica. Se incuba con un segunda anticuerpo, el cual se caracteriza por estar ligado o unido a un complejo enzimático y ser un anticuerpo generado en una especie diferente para cual se esta determinado la presencia de anticuerpos específicos. Finalmente previo otra serie de lavados se coloca en sustrato específico con el cual reaccionará la enzima ligada al anticuerpo secundario, de tal manera que se genera una reacción con color. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de inmunoglobulina específica al antígeno que se encuentre suero que se esta ensayando. La intensidad de la reacción puede ser valorada a simple vista o de preferencia mediante espectrofotometría (Tizard, 1995; Prescott, Harley y Klein, 2000).

#### **2.10.5.-Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas (ELISA). Sandwich.**

La prueba de inmunoadsorción emparedado es un método altamente sensible para la determinación de antígenos. En esta prueba la superficie de poliestireno esta cubierta con anticuerpos específicos contra rotavirus, éstos pueden estar dirigidos a los determinantes antigénicos de Grupo VP6 o Serotipo G (VP7) o P(VP4). Luego se agrega la solución de antígenos como pueden ser sobrenadante de cultivo celular infectado o filtrado de heces, seguido de algunos lavados, se agrega el segundo anticuerpo similar al primero en sus determinantes antigénicos, pero unido a o conjugado a alguna enzima. Esta reacción es revelada con la aplicación del sustrato específico para reaccionar con la enzima ligada. La intensidad de la reacción de color se relaciona directamente con la cantidad de antígeno captado. Esta es la base de muchas de las ELISAs comerciales existentes para detección de rotavirus, sin embargo tiene una gran desventaja dado que estas han sido diseñadas para el diagnóstico rápido hospitalario, están dirigidas a rotavirus del grupo A en especial a rotavirus del grupo humano, por lo que es frecuente encontrar resultados falsos negativos. En contraste las ELISA dirigida a la serotipificación, las cuales no son de uso rutinario en diagnóstico, contienen anticuerpos monoclonales y se usan casi exclusivamente en estudios epidemiológicos o de control de poblaciones vacunadas (Tizard, 1995; García *et al* , 1996; Prescott, Harley y Klein, 2000).

#### **2.10.6.- Aglutinación en Látex.**

Es una prueba cualitativa para la detección directa de antígeno de rotavirus en muestras fecales humanas. Se emplean partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos contra el virus, las cuales son mezcladas con una suspensión fecal diluida y cuando ésta contiene antígeno de rotavirus ocurre una reacción de aglutinación visible. Con este método se permite la determinación de serotipos en 10 minutos. Al igual que en la ELISA emparedado se tiene la desventaja de ser diseñadas en base a los rotavirus aislados en humanos y aún en esta especie no son totalmente confiables debido a la gran diversidad antigénica ya mencionada de estos virus (Sukura *et al.*, 1990; García *et al.*, 1996).

#### **2.10.7.- RT-RCP. Reacción en cadena de la Polimerasa.**

La metodología conocida como RCP, por sus siglas en inglés polymerase chain reaction, permite la rápida amplificación de ADN genómico. Puesto que los rotavirus son virus ARN, es necesario primero convertir el ARN de doble cadena a ADN mediante el uso de la transcriptasa reversa. Su alta sensibilidad puede detectar desde 2 pg de ARN viral

B y C y para los serotipos G y P. Esta prueba se utiliza básicamente en la tipificación de cepas y estudios epidemiológicos, no en el diagnóstico rutinario (García *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1993; Barardi *et al.*, 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.11.-JUSTIFICACIÓN

Se ha observado en forma relativamente constante y sin explicación, un periodo de perdida de peso y episodios diarreicos en el desarrollo del cabrito (Thea, 1995), de las posibles patologías que pudieran estar involucradas; *Eimeria spp*, *E.coli* y algunos virus, dentro de éstos se dirigió el interés a los Rotavirus, que por las características de sus cuadros clínicos podrían asociarse a este fenómeno, encontrándose poca información existente sobre los mismos en el ganado caprino

Debido a las limitantes que representa el estudio de las infecciones en humanos, se han establecido una serie de modelos animales para la comprensión de la patogénesis e inmunidad mucosal en hospedadores naturales para el virus. Los modelos más utilizados han sido el ratón, conejo y cerdos gnotobiontes, donde la mayor parte de los trabajos se han dirigido al comportamiento de las cepas virales que afectan al humano o la especie homóloga del aislamiento viral. En tanto en medicina veterinaria, se ha investigado en porcinos, bovinos y ovinos sin ser éstos estudios tan extensos como los realizados con los modelos desarrollados para la rotaviriosis en humanos (Desselberger y Gray, 2000).

Hasta la fecha no se han publicado estudios sobre la patogenicidad de los rotavirus en caprinos bajo condiciones naturales, la mayoría de los autores no han logrado demostrar una asociación entre excreción viral y el cuadro diarréico, donde pueda ser señalado como agente causal del cuadro clínico sin lugar a dudas (Muñoz *et al* , 1994; Berrios *et al* , 1988). La prevalencia de los rotavirus parece estar incrementándose, desde su primera descripción en los años 70, pero los datos publicados en los estudios muestran diferencias entre las especies. Sin embargo, la distribución y significado de los mismos en los caprinos se desconoce (Muñoz *et al* , 1995). Debido a la alta convivencia que en nuestro país se da entre ovinos y caprinos en rebaños y explotaciones mixtas existe la posibilidad de la infección interespecie.

Los modelos animales han sido utilizados para definir los parámetros de la infección producida por rotavirus, patogénesis, enfermedad, respuesta inmune y eficiencia vacunal, por lo cual en el presente trabajo se buscó establecer un modelo de infección para rotavirus en ganado caprino, cumpliendo con los postulados de Koch y valorar la participación de la inmunidad pasiva y activa en el establecimiento del cuadro infeccioso por rotavirus.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2 3 Referencias bibliográficas de rotavirus en caprinos

Autor	Técnicas	Referencia	Título.
Scott.A.C. <i>et al</i>	Microscopía electrónica	1978, Vet. Rec	Rotavirus in goats
Yvore,P. <i>et al</i>	ELISA comercial.	1984 INRA Publications	Epidemiological survey of diarrhoea in new born kids in the Touraine region de France.
Berrios, E.P <i>et al.</i>	Rotaforesis, Aislamiento viral.	1988 Avances en Ciencias Veterinarias	Detección de rotavirus en caprinos de San José de Maipo, Región Metropolitana de Chile.
Iovane.G. <i>et al</i>	Seroneutralización	1988, Acta Med. Vet.	Ricerche sulla presenza e diffusione de anticorpi per rotavirus negli ovini e caprini dell' Italia Centro-Meridionale.
Legrottaglie,R, <i>et al.</i>	Rotaforesis, Aislamiento viral	1993, Microbiologica	Isolation and identification of rotavirus as aetiological agents of neonatal diarrhoea in kids, Electrophoretical characterization by PAGE.
Da Costa Mendes. <i>et al.</i>	Rotaforesis, Aislamiento viral.	1994, Onderstepoort	Isolation and preliminary characterization of caprine rotavirus.
Muñoz. M., <i>et al.</i>	ELISA sándwich, Aglutinación en látex comercial, Rotaforesis.	1994, Small Ruminant Research.	Rotavirus excretion by kids in a naturally infected goat herd.
Da Costa Mendes <i>et al</i>	Rotaforesis, Aislamiento Viral.	1994, Journal of the South African Veterinary association	Rotavirus in Saanen goats
Kaminjolo.J S	Agglutinación en látex comercial	1994, Birt Vet J.	Rotavirus Infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad.
Muñoz. M <i>et al.</i>	ELISA sándwich, Rotaforesis.	1995, Res Vet. Scis.	An outbreak of diarrhoea associated with atypical rotaviruses in goat kids.
Wang ZhengDang <i>et al.</i>	Rotaforesis, ELISA comercial, Hibridación.	1995, Chinese J Virol	Investigation and identification of atypical rotavirus from animals and humans.
Gueguen, C <i>et al</i>	ELISA comercial, Rotaforesis, PCR.	1996, Veterinary Research.	Caprine and bovine B rotaviruses in western France: group identification by Northern hybridization.
Ayanegui, <i>et al</i>	Rotaforesis, Aislamiento viral	1997, Reunión anual de investigación pecuaria.	Diagnóstico de Rotavirus caprino utilizando la técnica de electroforesis del ARN en geles de poliacrilamida (PAGE).

## **2.12.- HIPÓTESIS**

Los rotavirus son agentes infecciosos ubicuos, con un rango de especies susceptibles amplio, abarcando tanto mamíferos como aves, por lo que es factible la infección tanto con aislamientos virales homólogos, como heterólogos. La Inmunidad pasiva, conferida por el calostro, tiene un efecto protector contra la infección neonatal producida por rotavirus.

## **2.13.-OBJETIVOS**

- 2.13.1 - Aislar y replicar en el laboratorio una cepa de rotavirus de origen caprino.
- 2.13.2.- Establecer la infección por rotavirus en el modelo caprino.
- 2.13.3.- Determinar la participación de la inmunidad pasiva materna en el desarrollo, establecimiento y secuelas de la infección por rotavirus en caprinos domésticos.
- 2.13.4.- Establecer la infección experimental en ovinos con, un aislamiento de rotavirus de caprinos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3.-MATERIAL Y METODOS.**

El presente trabajo requirió de un muestreo de campo previo para la búsqueda del aislamiento viral inicial y posteriormente se desarrollo la fase de laboratorio, misma que fue realizada en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal y en el Laboratorio de Necropsias de Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en el Campo IV, L-503 de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Km 2.5, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Con la finalidad de facilitar el seguimiento del desarrollo experimental, se establecieron por separado diferentes técnicas y ensayos, en el orden que fueron requeridos para, los cuatro experimentos principales que constituyeron el trabajo.

#### **3.1.-Aislamiento de rotavirus caprino.**

##### **3.1.1.- Colección de muestras.**

Un total de 310 muestras de heces fueron colectadas; 230 de caprinos, 39 de ovinos, 35 de bovinos, 4 de humanos y 2 de caninos, en un rango de edad, del nacimiento hasta a las 10 semanas de vida y en algunos casos hembras adultas en al final de gestación o recién paridas. En el caso de las especies diferentes a los caprinos estas fueron tomadas como una medida paralela de observación de circulación viral, dado que en todos los casos estos convivían con la especie caprina.

##### **3.1.1.2.-Características generales de los rebaños evaluados.**

A) Hato caprino y ovino del Centro de Producción Agropecuaria, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Ubicación: Carretera Cuautitlán -Teoloyucan Km 2.5, Cuautitlán Izcalli Estado de México.

Hato caprino, en el que las razas predominantes fueron Alpina y la Toggenburg.

Explotación con presencia de bovinos, ovinos, equinos, conejos, aves de engorda.

Periodo de estudio: de 30 de enero al 22 de mayo de 1997, muestreo semanal.

Se colectaron, 43 muestras de heces de caprinos, 39 muestras de heces de ovinos y 17 muestras de heces de bovino.

B) Hato caprino del rancho Cuatro Milpas, del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Bovina y Caprina, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Hato caprino en el que las razas predominantes fueron Alpina y Toggenburg.

Explotación mixta con presencia de bovinos lecheros y ciervos.

Ubicación: Autopista México- Querétaro, Km 44, Tepozotlán, Estado de México.

Periodo de estudio: de 7 de marzo al 22 de Mayo de 1997 (muestreo semanal).

Se colectaron, 96 muestras de heces de caprino y 9 muestras de heces de bovino.

- C) Hato caprino del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Hato caprino de raza Boer.  
Explotación mixta con presencia de bovinos especializados para la producción de carne.  
Ubicación: Carretera Chalco Mixquic, Chalco, Estado de México.  
Periodo de estudio: de 5 marzo al 16 de abril de 1997 (muestreo semanal).  
Se colectaron 12 muestras de heces de caprino y 9 de heces muestras de bovino
- D) Caprinos adultos, rastro del municipal de Atizapán de Zaragoza, Estado de México.  
Raza: Angora  
Origen: Nuevo León.  
Ubicación: Colonia Centro, Atizapán de Zaragoza, Estado de México.  
Periodo de estudio: de 30 de enero al 22 de mayo de 1997 (Muestreo semanal)  
Se colectaron 29 muestras de heces de caprinos.
- E) Caprinos de diversas explotaciones, adultos y crías dentro de las primeras 10 semanas de vida en los estados de Querétaro, San Luis Potosí, Durango, Nuevo León, Guanajuato.  
Periodo de estudio: en muestreo único  
Se colectaron 54 muestras de heces de caprinos.
- F) 4 muestras de heces de humanos y 2 de caninos.  
Origen: Cuautitlán, Estado de México.

Se muestrearon otras especies que en su momento convivían con los caprinos, para intentar determinar la circulación de rotavirus en las diferentes explotaciones.

### **3.1.2.-Evaluación de la muestra.**

#### **3.1.2.1-Colección y conservación de las muestras de heces.**

El muestreo de heces se realizó en forma directa, tomando una muestra rectal, en una bolsa de plástico, la posteriormente se identificó con el número de animal, edad aproximada, procedencia y fecha del muestreo.

Las muestras se conservaron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el tratamiento de extracción del ARN viral y su corrimiento electroforético.

#### **3.1.2.2.- Rotaforesis.**

Se utilizó una electroforesis del ARN en gel de poliacrilamida (PAGE) de acuerdo a la técnica del manual de diagnóstico y tipificación de Rotavirus del INDRE (García *et al.*, 1996). Se realizó la extracción del ARN viral, la electroforesis y finalmente la tinción con nitrato de plata, buscando la presentación del patrón electroforético característico de 11 bandas, correspondientes al ARN segmentado en forma natural, de los rotavirus (Figura 2.1) (Anexo I).

### 3.1.3.-Aislamiento viral.

Las muestras que fueron positivas en la técnica de rotaforesis fueron seleccionadas para intentar el aislamiento viral. Se adaptó la técnica descrita para aislamiento viral del virus de la poliomielitis humana del INDRE (Giono, Escobar y Valdespino,1994), (Apéndice I).

-Pretratamiento de las heces para la infección de los cultivos celulares, de acuerdo a la técnica descrita por Scott *et al.*, (1981), (Apéndice I).

-Cultivo celular, infección *in vitro* y cosecha viral de acuerdo a la técnica descrita por Urasawa *et al.*, (1981), (Apéndice I).

-Se consideró aislamiento positivo, por observación de efecto citopático característico, con formación de sincitios, agregados en forma de nodos, la formación de una red sobre el monoestrato (semejante a una red de pescador) y finalmente la retracción de estos en los nodos sincitiales y lisis final del cultivo celular (Figura 4.3), (Urasawa *et al.*, 1981).

- Confirmación de la infección *in vitro* por la cepa de rotavirus aislada de los caprinos, por la técnica de rotaforesis previamente descrita comparando el patrón observado en las muestras clínicas originales, con el recuperado del cultivo celular (Rosen *et al.*, 1994)

### 3.2.- Infección por rotavirus en un modelo animal caprino.

#### 3.2.1.- Abasto viral.

Mediante la infección *in vitro* productiva se confirmó que la cepa de rotavirus fue aislada de los caprinos y se corroboró con la técnica de rotaforesis previamente descrita comparando el patrón la distribución de las 11 bandas de rotavirus agrupados (4:2:3:2) entre el sobrenadante de cultivo celular infectado con efecto citopático característico y la muestra de campo inicial positiva (Rosen *et al.*, 1994).

De las muestras positivas en aislamiento viral, confirmadas por rotaforesis se formó el abasto viral para preparar la inoculación de los animales en condiciones controladas. Se utilizaron las técnicas previamente descritas en el 3.1. La pureza del aislamiento viral fue monitoreado mediante la observación y comparación del patrón de migración electroforético desde el aislamiento inicial, hasta logran el abasto viral requerido para el experimento, donde no se observaron variaciones en el mismo. (Figura 4.2).

Para lograr el abasto viral requerido se trabajó con pases consecutivos en cultivos celulares de células MA-104, hasta alcanzar el volumen de 450 ml (Apéndice I). Finalmente el abasto viral fue titulado después de 10 pases *in vitro*, para lo cual se prepararon 2 microplacas de 96 pozos para cultivo celular con células MA-104 inoculadas en diluciones decimales del abasto, siguiendo la técnica de Urasawa *et al.*, (1981). Se incubaron las microplacas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>. Se realizó la lectura buscando como punto de corte el último pozo que presentará efecto citopático, a las 24, sin modificación a

las 48, y 72hrs post infección. Hasta obtener un efecto lítico estandarizado en la dilución de  $10^{-8}$  unidades virales ( Apéndice I).

### 3.2.4.3.-Preparación del inóculo.

De acuerdo a la técnica señalada por Snodgrass y Wells, (1978), la cual consistente en incubar 2hrs a 37°C, 9 ml de sobrenadante de cultivo celular infectado con cepa aislada de caprinos, propagada en monoestrato de células MA-104, titulado a  $10^8$  partículas virales/ ml con 1ml de la solución de tripsina (10µg/ml) Con la finalidad de permitir el fraccionamiento y modificación de la estructura de la proteína VP4 y favorecer así el estado de infección (Apéndice I).

### 3.2.2.- Selección de animales.

#### GRUPO I

El grupo I se formó con diez animales provenientes del hato caprino del Rancho Cuatro Milpas, Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión de Producción Bovina y Caprina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM ubicado en Tepetzotlán, Estado de México Razas Alpina y Toggenburg.

De este rebaño se realizó el aislamiento viral inicial, un año antes del desafío experimental, se consideró que se trata una población expuesta a Rotavirus caprino, demostrado por rotaforesis positiva y aislamiento viral. Las características de los animales empleados se presentan en el cuadro 3.1

**Cuadro 3.1** Parámetros de descripción del estado fisiológico (edad, sexo, raza, peso, identificación), de los animales del Grupo I. Hato con demostrada circulación viral previa por aislamiento viral.

Número	Edad	Sexo	Raza	Peso	Rotavirus en periodo de adaptación
1	9 semanas	Macho	Alpina	12kg	Negativo
4	9 semanas	Macho	Alpina	22kg	Negativo
7	9 semanas	Macho	Alpina	13kg	Negativo
2	8 semanas	Macho	Alpina	13kg	Negativo
3	8 semanas	Hembra	Toggenburg	7kg	Negativo
6	8 semanas	Hembra	Toggenburg	9kg	Negativo
5	7 semanas	Macho	Toggenburg	9kg	Negativo
8	7 semanas	Hembra	Alpina	10kg	Negativo
9	7 semanas	Macho	Alpina	5kg	Negativo
10 control (No inoculado).	7semanas	Macho	Alpina	11kg	Negativo

## GRUPO II

El grupo II se formó con diez animales provenientes del hato caprino del Centro de Producción Agropecuaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, ubicado en el Km 2.5 de la carretera Cuatlitlán–Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli Estado de México. Hato caprino con predominancia de las Alpina y Toggenburg.

En este rebaño caprino no hubo detección de rotavirus por rotaforesis con cuatro años del monitoreo por (Ortiz, 1996; Guillén, 1998) y por los resultados del presente trabajo. El cuadro 3.2. resume las características de los animales empleados.

Cuadro 3.2 Parámetros de descripción del estado fisiológico (edad, sexo, raza, peso, identificación), de los animales del Grupo II. Hato donde no se demostró circulación viral previa

Número	Edad	Sexo	Raza	Peso	Rotaforesis en periodo de adaptación
25	9 semanas	Hembra	Alpina	13kg	Negativo
28	9 semanas	Hembra	Toggenburg	11kg	Negativo
29	9 semanas	Macho	Alpina	15kg	Negativo
30	8 semanas	Hembra	Alpina	13kg	Negativo
27	8 semanas	Hembra	Alpina	10kg	Negativo
26	8 semanas	Macho	Alpina	14kg	Negativo
21	7 semanas	Hembra	Alpina	10kg	Negativo
22	7 semanas	Macho	Toggenburg	10kg	Negativo
23	7 semanas	Macho	Toggenburg	8kg	Negativo
24 control (No inoculado)	8 semanas	Hembra	Alpina	12kg	Negativo

## GRUPO III

El grupo III se formó con seis animales provenientes del hato caprino del Laboratorio de Reproducción ubicado en el Centro de Producción Agropecuaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, ubicado en el Km 2.5 de la carretera Cuatlitlán–Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli Estado de México. Es un hato de ganado caprino criollo de animales originarios de los estados de Zacatecas Y San Luis Potosí. En este rebaño caprino no hubo detección de rotavirus por rotaforesis con cuatro años del monitoreo por (Ortiz, 1996; Guillén, 1998) y por los resultados del presente trabajo. El cuadro 3.3 resume las características de los animales.

Cuadro 3.3. Parámetros de descripción del estado fisiológico (edad, sexo, raza, peso, identificación), de los animales del Grupo III. Hato donde no se demostró circulación viral previa

Número	Edad	Sexo	Raza	Peso	Rotavirus en periodo de adaptación
11	9 semanas	Macho	Criollo	11.5kg	Negativo
12	9 semanas	Macho	Criollo	7.5kg	Negativo
15	7semanas	Macho	Criollo	7.5kg	Negativo
16	7semanas	Macho	Criollo	6.0kg	Negativo
13	4semanas	Macho	Criollo	5.5kg	Negativo
14	4semanas	Macho	Criollo	4.5kg	Negativo

#### GRUPO IV

El grupo IV se formó con cinco animales provenientes del hato ovino del Centro de Producción Agropecuaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, ubicado en el Km 2.5 carretera Cuautitlán-teoloyucan, Cuautitlán Izcalli Estado de México. Hato de ganado ovino Rambouillet y Columbia. En este rebaño ovino no hubo detección de rotavirus por rotavirus con cuatro años del monitoreo por (Ortiz, 1996; Guillén, 1998) y por los resultados del presente trabajo. El cuadro 3.4 resume las características de los animales.

Cuadro 3.4. Parámetros de descripción del estado fisiológico (edad, sexo, raza, peso, identificación), de los animales del Grupo IV. Donde no se demostró circulación viral previa.

Número	Edad	Sexo	Raza	Peso	Rotavirus en periodo de adaptación
1B	8semanas	Macho	Criollo	19kg	Negativo
2B	8 semanas	Macho	Criollo	19kg	Negativo
3B	8semanas	Hembra	Criollo	15kg	Negativo
4B	8 semanas	Hembra	Criollo	15kg	Negativo
5B control (No inoculado)	8semanas	Macho	Criollo	11kg	Negativo

### 3.2.3.- Alojamiento:

En la etapa experimental, los animales fueron alojados en las instalaciones de aislamiento del Laboratorio de Necropsias, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, unidad cerrada, con facilidades de limpieza y desinfección de instalaciones y aislada de la zona de producción animal, de la misma Facultad. Los grupos fueron manejados para el desarrollo experimental en distintas épocas, grupo I (Julio 1999), grupo III ( Enero 2000), Grupo II y IV simultáneamente (Abril 2000).

### 3.2.4.-Manejo experimental:

#### 3.2.4.1.-Recepción.

A la recepción, los animales fueron pesados, se les asignó un número de identificación para el experimento, siguiendo uno consecutivo, el cual se colocó con marcador indeleble en la cara interna de ambas orejas y sobre el dorso. De cada uno se tomó una muestra de sangre con anticoagulante y otra para obtener suero, por exsanguinación yugular, una muestra de heces para realizar la rotaforesis y se realizó el examen clínico general. Se ubicaron los animales en su alojamiento y se les ofreció agua y alimento *at libitum* (Cuadro 3.5).

**Cuadro 3.5.** Descripción del manejo y frecuencia de los mismo, en los animales desde la recepción hasta la finalización de cada uno de los experimentos y características de la alimentación.

MANEJO	FRECUENCIA	DESCRIPCIÓN
ALIMENTACIÓN	Cada 24hrs	Alfalfa achicalada Prepartina de Purina (12% humedad, 15% de proteína, 2% grasa, 12.5% fibra, 8% cenizas, 50.50% E.L.N., 0.95% Calcio, 0.65% Fósforo). "at libitum", siempre se colocó suficiente alimento, de tal forma que los animales en un periodo de 24hrs no se lo terminaban
AGUA	Cada 24hrs	Cambio de agua fresca y limpia, siempre se colocó más agua de la que consumían los animales
PESAJE	A la recepción y Al sacrificio	
TOMA DE MUESTRAS DE HECES	Diariamente de la recepción al sacrificio	La toma se realizó con bolsa de plástico, directamente del recto, seguida de su debida identificación.
TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE/ SUERO	A la recepción y al sacrificio	Obtención de muestra por venopunción yugular, con jeringas desechables estériles nuevas para cada caso y se separo en dos tubos uno para obtención de suero y la otra se conservó con EDTA para hemograma
TEMPERATURA	Cada 24 hrs, de la recepción al sacrificio	Se utilizo termómetro rectal. Siempre antes de iniciar el manejo limpieza y alimentación de animales e instalaciones Y su posterior registro

#### 3.2.4.2.- Adaptación.

El periodo de adaptación en cada uno de los grupos experimentales fue de 5 días, durante los cuales se observó clínicamente a los animales, cada 24 hrs se registró

temperatura rectal, se colectó una muestra de heces para la rotaforesis y se realizaron movimientos de rutina para la limpieza y alimentación.

### 3.2.4.3.-Administración del inóculo.

Se utilizó la técnica descrita por Snodgrass y Wells, (1978) (Apéndice I), para la administración del inóculo a los animales. Empleando una sonda de aplicación intraesofágica (jeringa plástica de 12cc adaptada a un tubo plástico semiflexible de 1 cm de diámetro y de 25 cm de largo sellados en la unión de los mismos) Se depositaron 10ml de la suspensión viral ya activada (por pretratamiento con tripsina 3.1.3 y Apéndice) llegando hasta el rumen de cada animal. Se ofreció  $\frac{1}{4}$  de la ración alimenticia 1 h antes de la inoculación y 6hrs después de a inoculación, el resto de la ración. Los datos de la observación clínica se describen en el Cuadro 3.6.

Los animales control se manejaron con la misma técnica, pero en lugar del inóculo recibieron 10 ml de solución salina fisiológica estéril y se mantuvieron dentro de la misma unidad del laboratorio de necropsias, pero en instalaciones separadas y permanecieron aislados del resto de los animales inoculados.

**Cuadro 3.6.** Resumen de los procedimientos de observación clínica, descripción y frecuencia de los mismo desde la recepción hasta la finalización de los experimentos.

Observaciones.	Descripción.	Frecuencia
Temperatura °C	Rectal.	Cada 24 hrs.
Alteraciones Gastrointestinales.	Forma y consistencia de las heces, como indicador del establecimientos de la infección por rotavirus.	Cada 24 hrs
Alteraciones en vías respiratorias.	Tos, exudado nasal. Dificultad respiratoria. Como indicador de las condiciones de alojamiento.	Cada 24 hrs
Alteraciones de comportamiento	Anorexia, decaimiento, como indicador de estado fisiológico y establecimiento de la infección por rotavirus.	Cada 24 hrs
Presencia de deshidratación.	Grado, por observación clínica, elasticidad cutánea.	Cada 24 hrs

### 3.2.4.4.-Pruebas de patología clínica.

Se colectó una muestra de sangre con y sin anticoagulante (EDTA), por venopunción yugular de cada uno de los animales del experimento a la recepción, en algunos casos durante el experimento y nuevamente de todos los animales a la eutanasia. Cada una de las muestras fue sometida a las siguientes pruebas clínicas:

Hemograma:

Conteo rutinario de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, leucocitos, linfocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y plaquetas.

Bioquímica clínica: proteínas totales, albúmina y globulina.

La finalidad del muestreo fue tener como control de los parámetros clínico sobre el estado fisiológico de los animales, durante el periodo de desafío, dado que la rotavirus es

una infección donde no se reportan cambios dramáticos de estos parámetros, en las pruebas de patología clínica utilizadas de rutina. Considerando que se utilizaron caprinos domésticos convencionales para los experimentos, provenientes de una población normal y no animales gnotobiontes o libres de patógenos específicos, el modelo de infección por rotavirus podría verse alterado por la presencia de otros patógenos.

### 3.2.4.5.- Rotaforesis.

Se colectaron muestras de heces de cada animal desde el día de la recepción hasta el día de la eutanasia. Se sometieron a la técnica de rotaforesis de acuerdo a lo descrito en el inciso 3.1.2.2. como herramienta de monitoreos de excreción viral durante el experimento.

### 3.2.4.6.-Necropsia.

La eutanasia se realizó por insensibilización con choque eléctrico directo y posterior desangrado por corte en el plexo axilar y se realizó la necropsia mediante la técnica rutinaria (Moreno, 1990). Se evaluaron las lesiones macroscópicas, se removió el aparato digestivo y se procedió a la toma de muestras para la histopatología.

Los animales se sacrificaron considerando los grupos, edad y los días postinfección. Lo anterior con el objetivo de colectar para el estudio de histopatología, muestras de tejido de animales en diferentes estadios de infección en los casos de los aquellos positivos a la rotavirus y comparar con los negativos e intentar hacer el seguimiento de l desarrollo de la lesión asociada a rotavirus; De acuerdo con el diagrama de sacrificio, para cada grupo experimental (Cuadros 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10).

## GRUPO I.

Cuadro 3.7. Cronología del sacrificio por eutanasia e identificación y edad de los animales del Grupo I de experimentación.

Edad	Identificación del animal.	Día.									
		0 I	1	2	3 N	4	5	6 N	7	8	9 N
7 semanas	9	**			9						
7 semanas	8	**					8				
7 semanas	5	**								5	
8 semanas	6	**			6						
8 semanas	2	**					2				
8 semanas	3	**									3
9semanas	1	**			1						
9 semanas	7	**					7				
9 semanas	4	**									4
Control	10	--			10						

\*\* Inóculo viral (I); -- Inóculo SSF (Solución Salina Fisiológica); N Necropsia

## GRUPO II

Cuadro 3.8 Cronología del sacrificio por eutanasia e identificación y edad de los animales del Grupo II de experimentación.

Edad	Identificación del animal.	Día.									
		0 I	1	2	3	4	5 N	6	7	8 N	9 N
7 semanas	22	**					22				
7 semanas	21	**					21				
7 semanas	23	**								23	
8 semanas	30	**									30
8 semanas	27	**									27
8 semanas	26	**									26
9semanas	25	**					25				
9 semanas	28	**								28	
9 semanas	29	**								29	
Control (-)	24	--									24

\*\* Inóculo viral (I); -- Inóculo SSF (Solución Salina Fisiológica); N Necropsia

## GRUPO III.

Cuadro 3.9. Cronología del sacrificio por eutanasia e identificación y edad de los animales del Grupo III de experimentación.

Edad	Identificación Del animal.	Día															
		0 I	1	2	3	4	5	6	7	10 días intervalo	18 RI	19	20	21	22	23	24 N
4 semanas	14	**									***		/	/	/	/	/
4 semanas	13	**									***	/	/	/	/	/	/
7 semanas	15	**									***						15
7 semanas	16	**									***						16
9 semanas	12	**									***						12
9 semanas	11	**									***						11

\*\* Inóculo viral (I); \*\*\* Reinoculación (RI) (Segundo desafío); -- Inóculo SSF (Solución Salina Fisiológica); N Necropsia; / Animales que murieron por lesiones traumáticas antes del terminar el periodo experimental, pero no desarrollaron cuadro clínico por rotavirus.

## GRUPO IV

Cuadro 3.10. Cronología del sacrificio por eutanasia e identificación y edad de los animales del Grupo IV de experimentación

Edad	Identificación del animal	Día.									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
8semanas	1B	**					1B				
8semanas	2B	**					2B				
8semanas	3B	**								3B	
8semanas	4B	**								4B	
8semanas	5B Control (-)	--									5B

\*\* Inóculo viral (I); -- Inóculo (Solución Salina Fisiológica); N Necropsia

### 3.2.4.7.- Histopatología.

Durante la necropsia se colectaron muestras de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de nodo linfáticos mesentéricos, hígado, bazo, duodeno (a 30 cm del píloro), yeyuno (a 100cm del corte anterior), ileon (a 30 cm de la válvula ileocecal) y colon (a igual distancia 30 cm de la válvula ileocecal).

Las muestras fueron fijadas en formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina y se hicieron cortes de 6 micrómetros de espesor, posteriormente se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina, según rutina (Desselberger y Gray, 2000).

### 3.3.- Evaluación de la participación de la inmunidad pasiva materna.

#### 3.3.1.- Selección de grupos experimentales.

De acuerdo al origen de los animales, rebaño con y sin circulación de rotavirus, se evaluó la respuesta sérica de los individuos al virus Grupo I: población donde, de acuerdo a las evidencias de circulación viral, se esperaba una población con anticuerpos protectores de origen materno; específicos contra la cepa de inoculación (homóloga); y los grupos II, III y IV, poblaciones donde, de acuerdo a las evidencias de no circulación viral, se esperaba una población sin anticuerpos protectores de origen materno para la cepa de desafío.

#### 3.3.2.- Virus Neutralización.

El ensayo de Virus neutralización se desarrolló modificando la técnica descrita por Ward *et al.*, (1990). Los autores utilizaron para determinar título viral la detección partículas virales en los cultivos infectados, por fluorescencia con anticuerpos marcados contra rotavirus, mientras que en el presente trabajo se utilizó el factor de dilución, un

pozo antes de observar un monoestrato celular sin el efecto citopático, para determinar el título de seroneutralización en cada caso (Apéndice I).

### **3.3.3.-ELISA Indirecta**

Se empleó la técnica adaptada de Ternyinck y Avrameas. (1989), (Apéndice I).

### **3.4.- Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos fueron evaluados con la paquetería estadística Stat Graphics 1994-1999 análisis ANOVA multifactorial,  $\chi^2$ .

#### 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### 4.1. AISLAMIENTO VIRAL, ABASTO VIRAL Y CARACTERIZACIÓN.

###### 4.1.1.-Tamaño de la muestra.

De las 310 muestras de heces colectadas, 5 de la especie caprina resultaron positivas en la rotaforesis, los animales pertenecían al rebaño del Rancho Cuatro milpas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y se encontraban entre las 6 y 8 semanas de vida. Las muestras de ovinos, bovinos, caninos y humanos resultaron negativas (Cuadro 4 1).

Cuadro 4 1. Resultados de la detección de rotavirus en animales, utilizando la técnica de rotaforesis en las heces de caprinos, basándose en la observación del patrón de distribución característico, de las 11 bandas de ARN viral, en geles de poliacrilamida teñidos con plata, utilizando como control positivo el extracto de ARN viral de un brote en humanos.

	MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS NEGATIVAS	TOTAL.
ESPECIE	Número de muestras	Número de muestras	Número de muestras
CAPRINO	5	225	230
OVINO	0	39	39
BOVINO	0	35	35
HUMANO	0	4	4
CANINO	0	2	2
TOTAL	5	301	310

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

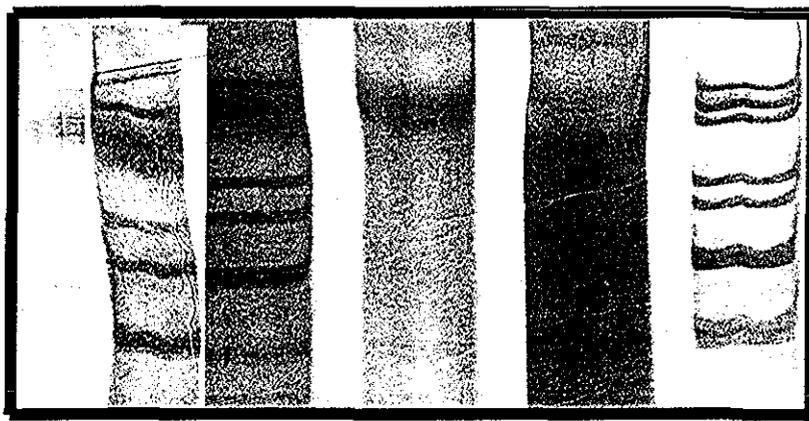


Figura 4.1. Corrimiento electroforético del extracto de ARN viral de muestras de heces de caprinos. Carril No.1 2, 3, rotavirus caprino, 4 y 5 negativos a rotavirus, 6, ARN viral de rotavirus de humano.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.1.2.- Aislamiento y abasto de rotavirus.

Una vez identificadas las cinco muestras positivas, se procedió a intentar el aislamiento viral por separado de cada una de ellas; cada una de las muestras se proceso de acuerdo a la técnica descrita para aislamientos del virus de la poliomeilitis humana (Giono, Espino y Valdespino, 1994) y el pretratamiento con tripsina descrito por Scott *et al.*,(1981) y finalmente se procedió a la propagación en cultivo celular con base a lo publicado por Urasawa *et al.*,(1981). De las cinco muestra, tres lograron adaptarse al cultivo celular, confirmándose por la observación del efecto citopático característico (Figura 4.3) y la observación del corrimiento electroforético característico en gel de poliacrilamida después de tres pases *in vitro* (Figura 4.2)

Después de tres pases *in vitro* de la cepa aislada, se mezclo el sobrenadante de los cultivos celulares infectados, para generar abasto viral de 450 ml requerido para el inóculo de los animales en el modelo de infección en caprinos, en ovinos y los ensayos de ELISA indirecta y Virus neutralización. El sobre nadante de los cultivos infectados fue cosechado durante 10 pases, donde el 90% de la recolección fue guardada en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  generando un abasto común y el 10% se usó previό tratamiento con tripsina para infectar nuevamente cultivos celulares. Al alcanzar el volumen deseado se procedió a titular el abasto viral con un titulo final de  $10^8$  partículas virales/ ml de sobrenadante cosechado. El abasto viral fue monitoreado constantemente con la observación del efecto citopático y pureza de la cepa de aislamiento con rotaforesis (Figuras 4.2 y 4.3)

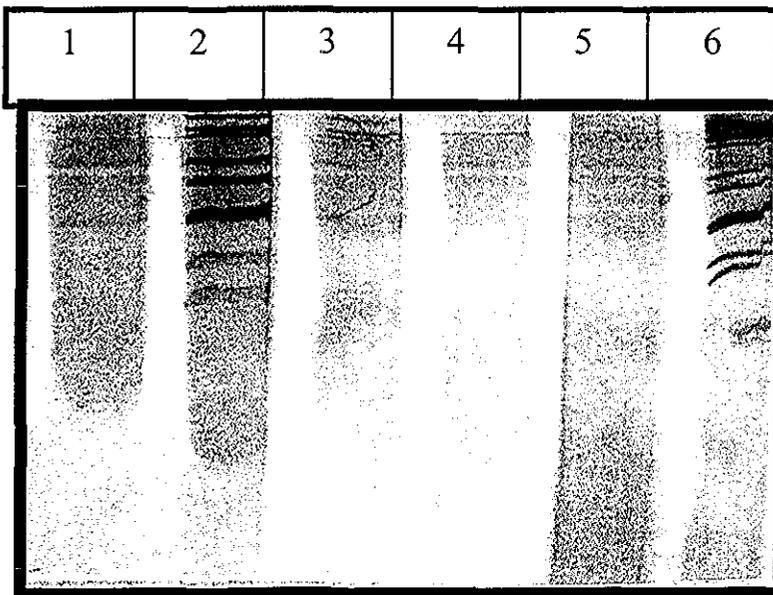


Figura 4.2. Monitoreo por rotaforesis de los pases hechos en cultivos celulares (MA-104), infectados por rotavirus aislado de caprinos. Carriles 1) Aislamientos virales mas de 3 pases 2) 10 pases, 3) 4 pases, 4) y 5) vacíos 6) control rotavirus humano.

Figura 4.3. Efecto citopático A) cultivo celular MA-104 sin infectar y B) efecto citopático en cultivo postinfección (72hrs).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.1.3.- Caracterización del electroferotipo

En las cinco muestras positivas a rotaforesis se observó un patrón electroforético característico de los rotavirus del grupo A con una distribución de bandas 4:2:3:2 y comparada con el ARN control de aislado humano presentó un patrón de corrimiento largo (Figuras 4.1 y 4.3).

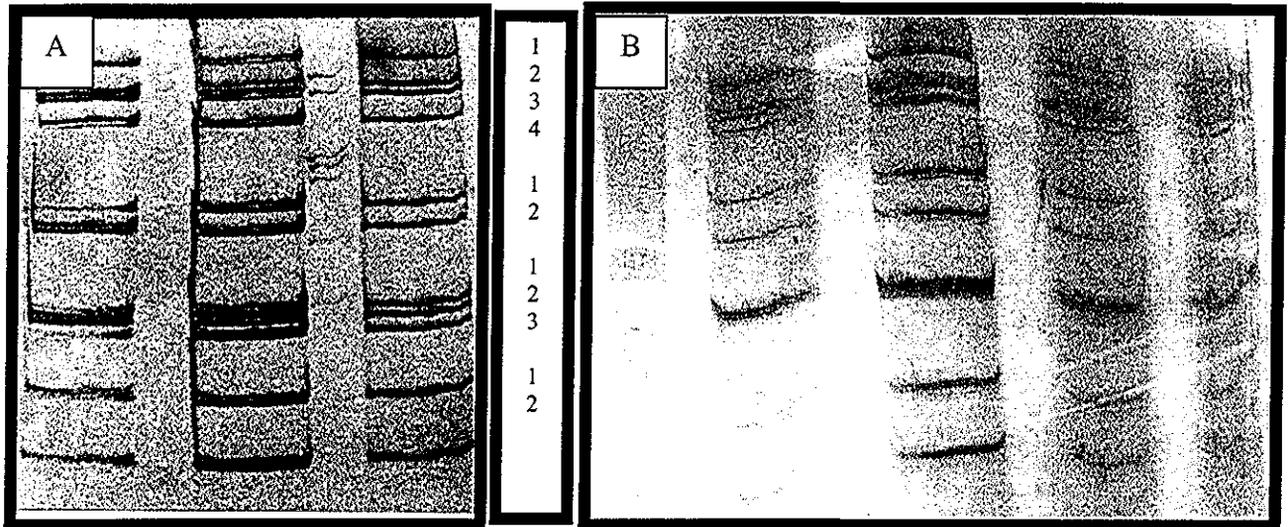


Figura 4.4 Comparación de distribución de bandas producidas por el virus grupo A de rotavirus, A) aislamiento de humanos, B) Aislamiento de caprino.

#### 4.2.-DISCUSIÓN.

Se colectaron 310 muestras, sobre una población abierta de caprinos y algunas especies que convivían en ese momento con los caprinos, en un periodo de 5 meses (enero-mayo), donde se detectó un solo brote clínico por rotavirus, con cinco muestras positivas en caprinos. La recolección de muestras en caprinos se detuvo en 230 muestras, que fue cuando se logró el objetivo de detectar y aislar una cepa de rotavirus, que funcionara para generar el abasto viral requerido como inóculo en el Experimento II.

Los aislamientos positivos se obtuvieron del hato caprino del rancho Cuatro Milpas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en el municipio de Tepetzoltlán Estado de México, México, cuando se presentó un brote de diarrea en cabritos, a las ocho semanas de haberse iniciado la parición. El brote comenzó a finales del mes de abril, 1 semana después de haberse presentado una inundación por lluvias, los animales habrán permanecido en corrales inundados durante dos días. El brote tuvo una duración de 1 semana, el diagnóstico se realizó por rotaforesis y por aislamiento viral, posteriormente no fue posible detectar nuevamente la presencia del virus por ninguno

de los métodos. La enfermedad, con un corto periodo de incubación, afectaba principalmente a los cabritos y la presencia de una diarrea acuosa abundante, afebril, sugería un cuadro clínico por rotavirus. Debido a las condiciones en que se presentó el brote de diarreas y al mal drenaje de las instalaciones, en un inicio se diagnosticó como un cuadro atribuido a *Eimerias*, ya que la explotación presentaba en forma constante altas cargas parasitarias. Sin embargo, no se estableció tratamiento alguno contra coccidiosis y el cuadro clínico cedió en una semana, a pesar de continuar el periodo de lluvias. Sobre la presencia de rotavirus en esta zona se tenían en un brote diarreico en bovinos asociado a *E.coli* verotoxigénica, donde en algunos casos se encontró también la presencia rotavirus (Valdivia *et al* ,2000).

Los rotavirus presentan un patrón de infección estacional, en humanos, bovinos (Disentería de Invierno) y en cerdos se ha observado un aumento en la presentación de casos clínicos durante los meses de invierno (Chang *et al.*, 1999; Bridger, 1994) En los países o zonas de clima tropical se ha observado la presentación viral continua en el año, aumentando en los meses más fríos (Kapikian y Chanock, 1996a; Parashar *et al.*,1998). En Norte América, en un estudio retrospectivo de 5 años, LeBaron *et al.*, (1990) establecieron un patrón de movimiento de los brotes de rotavirus en humanos, donde se observó la aparición de los primeros brotes en México en los meses de octubre-noviembre, para alcanzar el pico de incidencias los que comienzan a descender en febrero-marzo; en tanto que en los Estados Unidos el brote comenzó en los meses de noviembre-diciembre, movilizándose de sur a norte, llegando a Canadá en diciembre-enero. En el mismo estudio se calcula que el periodo de presentación de los cuadros diarreicos por rotavirus en humanos, es de un promedio de tres meses en México, llegando a seis meses en Canadá. Dado que no existen datos similares para las especies domésticas y menos en caprinos, se podría esperar un comportamiento estacional similar para el grupo A de rotavirus al que presenta la infección en humanos. El trabajo antes citado señala que son muchos los factores climáticos, geográficos y propios del virus, los que deben contribuir a este comportamiento característico, de distribución estacional y geográfica de los rotavirus. Se considera la hipótesis de que las temperaturas bajas y la humedad relativa alta, facilitan la transmisión viral, favoreciendo la sobre vivencia del virus en fomites (LeBaron *et al.*, 1988; Puerto *et al.*, 1993).

Contrario a lo esperado, de acuerdo con la bibliografía consultada sobre rotavirus; el brote natural no se detectó en los meses de primavera (abril), época en nuestro país cuando incrementa en forma significativa la temperatura ambiental. Sin embargo, en la literatura se menciona que los brotes de rotavirus comienzan con cambios climáticos importantes, de acuerdo con lo antes señalado, y dependen de muchos factores ambientales, idiosincrásicos y virales. El presente brote se presentó seguido de un cambio climático dramático, con un periodo de calor seco y en pocos días, un temporal con fuertes lluvias, inundaciones y disminución dramática de la temperatura. Aunado al estrés generado por el cambio climático, se agregó el generado al permanecer los animales dos días con sus instalaciones inundadas. El único reporte en caprinos que señala la época de año en que este fue detectado es el de Scott *et al.*, (1978) reportan en primer caso de rotavirus en caprinos en los meses de mayo y junio en Inglaterra sin emitir ninguna opinión acerca de la importancia que la estación del año pudiera tener.

En contraste, en el mismo periodo se encontraba el hato caprino del Centro de Producción Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de acuerdo con el monitoreo por rotaforesis. La explotación se ubica a una distancia de unos 4 Km del hato donde se realizó el aislamiento viral, los animales se vieron sometidos a los mismos cambios climáticos, pero sin la inundación debido a la ubicación de la explotación y la diferente construcción de las instalaciones. A diferencia del primer hato, este había concluido el periodo de parición a finales de febrero, por lo que la cantidad de individuos jóvenes susceptibles era menor y en segundo lugar en el hato, de acuerdo a los datos de los trabajos previos de Guillén (1998) y Ortiz (1996) y los del presente trabajo, no se ha detectado la circulación de rotavirus en los últimos cuatro años. El aislamiento en campo y la presentación del brote clínico de rotavirus en caprinos confirman el concepto de la participación multifactorial para el establecimiento de la infección por rotavirus. Donde juegan un papel importante todos los factores de patogenicidad con que cuentan los rotavirus, así como los factores predisponentes del medio ambiente y del individuo.

Respecto al brote en el Rancho Cuatro Milpas durante el periodo de muestreo se colectaron heces de hembra adultas, sin lograr detectar la presencia del virus. Kodituwakku y Harbour (1990) reportan la excreción constante de rotavirus por vacas gestantes, sin presentar cuadro clínico, en una explotación con problemas recurrentes diarreicos en becerros, considerando a los adultos como portadores sanos del virus y diseminadores del virus. Fu y Hampson, (1989) y García Sánchez *et al.*, (1993), concuerdan con esta observación en la que vacas adultas pueden excretar en forma intermitente bajas cargas virales, suficientes para perpetuar la infección en el hato; infectando a los neonatos, sin ser detectadas por la técnica de rotaforesis. Las hembras, que participarían como factor exponencial, liberando el virus y los neonatos eliminarían una gran carga viral; y una vez infectados, serían estos la fuente de contaminación de aguas y alimentos, y de la infección a los animales susceptibles, perpetuándose así el ciclo (Muñoz *et al.*, 1995). Bridger (1994), en un brote de rotavirus atípico ocurrido en bovinos, señala que probablemente la no detección del virus después de cinco días de haberse iniciado el brote, se debió a la falta de sensibilidad de la técnica de rotaforesis. La técnica empleada parece tener buena sensibilidad cuando se aplica a muestras procedentes de cuadros diarreicos y no parece tener la misma sensibilidad cuando se trabaja en poblaciones abiertas. Tal vez para detectar la circulación viral en animales que no manifiestan cuadro clínico, se deba incrementar el número de muestras por animal, por día o utilizar pruebas de mayor sensibilidad como la de RT-PCR.

El aislamiento viral de caprinos, de acuerdo con el patrón electroforético observado, probablemente pertenece al Grupo A, con una distribución de bandas 4:2:3:2 y al ser comparado con el ARN control de rotavirus aislado de humanos (Figura 4.4) (DaCosta *et al.*, 1994; García *et al.*, 1996; Estes, 1996a; Bruke, 1996; Legrottaglie *et al.*, 1999). El grupo A de rotavirus es el más abundante en la naturaleza, está involucrado en las rotaviriosis de animales neonatos y ha sido descrito por Berrios *et al.*, (1988) en Chile; Muñoz *et al.*, (1994, 1995b, 1996) en España; DaCosta *et al.*, (1994a, 1994b) en Sudáfrica; Gueguen *et al.*, (1996) en Francia y Legrottaglie *et al.*, (1999) en Italia. En el estudio al igual que en los anteriormente citados, la infección por rotavirus en cultivo celular, fue dependiente del pretratamiento con tripsina (Scott *et al.*, 1981; Urasawa *et al.*, 1981; Arias *et al.*, 1996).

Hasta la fecha son pocos los aislamientos virales de caprinos y la mayoría de ellos solo han sido caracterizados parcialmente. De estos, la mayoría se considera que pertenecen al Grupo A de rotavirus. Sin embargo, algunos investigadores han reportado la presencia de rotavirus del grupo B; Muñoz *et al* , (1995b, 1996) y Berrios *et al* , (1988) basados en el patrón electroforético de sus aislamientos y Gueguen *et al* , (1996) utilizando la prueba de Northern Blot, siendo considerado como un grupo emergente en la mayoría de las especies animales. En ovinos se ha observado con mayor frecuencia, que en otras especies, la presencia de rotavirus del Grupo B, Fitzgerald *et al* , (1995), estos aislamientos han demostrado tener una alta relación genética con rotavirus aislados de bovinos, lo suficientemente alta, como para colocar a los aislamientos en ovinos en el genogrupo bovino. Debido a lo anterior se ha considerado que los rotavirus de origen ovino y bovino forman un grupo común y que existe la posibilidad de que sean epidemiológicamente intercambiables entre especies. Fitzgerald, *et al* , (1995) y Pratelli *et al* , (1999) en Italia señalan una gran similitud entre los genotipos rotavirus del Grupo A aislados de ganado bovino y caprino. Evidencias como las anteriores, hacen necesario resaltar la importancia de conocer el comportamiento de las diversas cepas de rotavirus, que pudieran estar interactuando con los caprinos y cual es el lugar epidemiológico de esta especie doméstica ante la posibilidad de movimientos interespecie (Fitzgerald *et al* , 1995)

Durante el presente trabajo a pesar de no contar con las edades de todos los animales muestreados, los casos positivos a rotavirus, por aislamiento y rotaforesis, se encontraban en la población de 6 a 8 semanas de vida, en el momento del brote y a pesar de existir animales recién nacidos en ellos no se logró determinar la presencia del virus. Es una característica bien definida entre los rotavirus la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad, asociada con la edad. En el humano, la edad más susceptible, para ser infectado por cepas patógenas, se encuentra en el rango de los 2 a los 5 años de vida (Estes, (1996a); Kapikian y Chanock., 1996a Parashar et al , (1998).

Saif y Ward. (En Desselberger y Gray, 2000), citan diversos trabajos donde se demarca la susceptibilidad en cerdos gnotobiontes a cepas de rotavirus humanas hasta las seis semanas de vida y en conejos y ratones hasta los primeros quince días de vida. Bridger, (1987); Bridger, *et al* . (1994, 1998a y 1998b) señalan la circulación de cepas de baja patogenicidad en bovinos durante la primera semana de vida, lo mismo en porcinos y de cepas de alta patogenicidad hasta las seis semanas de vida. Las citas anteriores por un lado resaltan la característica restricción de la edad en la susceptibilidad a rotavirus, pero también dan evidencias de que esta depende tanto del hospedador, como de las características genéticas de la cepa infectante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.2.- RESULTADOS EXPERIMENTO II : MODELO DE INFECCIÓN ANIMAL EN CAPRINOS.

A los tres grupos formados con caprinos de diferentes; orígenes, razas y edades se les administró un inóculo viral infectante, con una sonda esofágica, con 10 ml del abasto viral de 450 ml de sobrenadante de cultivos celulares infectados con el aislamiento de rotavirus de caprinos, titulado a  $10^8$  partículas virales/ ml y pretratado con tripsina, para activar la capacidad infectante del aislado de rotavirus, por el fraccionamiento parcial y modificación de la proteína VP4 en VP5 y VP8 (Scott *et al* ., 1981). Todos los animales tuvieron un periodo de adaptación de cinco días en los que no se observó excreción viral alguna. La observación de signos clínicos y constantes fisiológicas comenzó desde el arribo de los animales, hasta el término de cada uno de los experimentos Cuadros 4.2 y 4.3.

Cuadro 4.2 - Observación de signos clínicos (diarrea) para los grupos I y II a partir de la inoculación con rotavirus y detección de virus por rotaforesis, grupo.

	DÍAS	0*°	1 **	2 **	3 **	4 **	5 **	6 **	7 **	8 **	9 **	Rotaforesis.
<b>GRUPO I</b>	Número				N			N			N	
7 semanas	9	*°	-	+	+							+
7 semanas	8	*°	-	-	+	+	+	+				+
7 semanas	5	*°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 semanas	6	*°	-	-	+							+
8semanas	2	*°	-	-	-	-	-	-				-
8 semanas	3	*°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 semanas	1	*°	-	-	-							-
9 semanas	7	*°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 semanas	4	*°	-	-	-	-	-	-				-
Control(-) 7 semanas SSF	10	--°										
<b>GRUPO II</b>							N			N	N	
7 semanas	22	*°	-	-	-	-	-	-				-
7 semanas	21	*°	-	-	-	+	+					+
7 semanas	23	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-
8 semanas	30	*°	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
8 semanas	27	*°	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8 semanas	26	*°	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
9 semanas	25	*°	-	-	-	-	+					+
9 semanas	28	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-
9 semanas	29	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-
Control(-) 8 semanas SSF	24	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-

\*° Indica día de inoculación. (Con sobrenadante de cultivo celular infectado); \*\* Indica días postinoculación; --Inóculo SFF en los animales control 10 ml Solución Salina Fisiológica estéril; - Indica negativo a la presentación de diarrea; + Indica positivo a la presentación de diarrea; N Necropsia.  
Nota: Todos los animales se mantuvieron clínicamente sanos durante el periodo de observación.

Cuadro 4.3.- Observación de signos clínicos (diarrea) para el grupo III a partir de la inoculación con rotavirus y detección de virus por rotaforesis.

GRUPO III	DÍAS	0 *°	1 *	2 *	3 *	4 *	5 *	6 *	7 *	8 *	8 días inter valo	17 °°°	18 *	19 *	20 *	21 *	22 *	23 *	24 *	Rotaforesis	
Edad	Número																			N	
4semanas	14&	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-	*	-	-	-	/	/	/		-
4semanas	13&	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-	*	-	/	/	/	/	/		-
7semanas	15	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-	*	-	-	-	-	-	-		-
7semanas	16	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-	*	-	-	-	-	-	-		-
9semanas	12	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-	*	-	-	-	-	-	-		-
9semanas	11	*°	-	-	-	-	-	-	-	-		-	*	-	-	-	-	-	-		-

\*°Indica día de inoculación (Con sobrenadante de cultivo celular infectado); \* Indica días postinoculación; -  
-Indica negativo a la presentación de diarrea;+ Indica positivo a la presentación de diarrea; / Sin lectura;  
°°°Reinoculación; & Animales que murieron antes de terminar la segunda fase ;N Necropsia.

Nota: Todos los animales se mantuvieron clínicamente sanos durante el periodo de observación.

#### 4.2.2.-Temperatura.

Esta constante fisiológica se utilizó como un monitor del estado general salud de los animales, dado que para los presentes experimentos se utilizaron animales convencionales, provenientes de dos hatos diferentes. En segundo lugar el cuadro clínico de rotavirus se caracteriza por ser afebril. No se observó una diferencia estadística significativa en las temperaturas medias de animales positivos o negativos al establecimiento del cuadro clínico por rotavirus. Temperatura rectal normal en caprinos 39 +/- 0.4°C (Blood, Henderson y Radostits, 1986), (Cuadro 4.4)

Cuadro 4.4. Media de temperatura corporal por animal desde recepción hasta la finalización del cada uno de los experimentos, donde no se detecto una diferencia estadística entre los animales que desarrollaron rotavirus y los negativos a la misma. Los animales que desarrollaron cuadro clínico se mantienen dentro de un rango de temperatura normal.

		Media de Temperatura animales positivos a la Enfermedad. °C.	Media de Temperatura animales negativos a la Enfermedad. °C.
<b>GRUPO I.</b>	<b>Edad .</b>		
9	7 semanas.	38.3	
8	7 semanas.	39.3	
5	7 semanas.		38.6
6	8 semanas.	39.1	
2	8semanas.		**40.66
3	8 semanas.		38.7
1	9 semanas.		39.1
7	9 semanas.		38.6
4	9 semanas.		39.6
10	Control(-) 7 semanas Inóculo SSF.		39.2
<b>GRUPO II.</b>			
22	7 semanas.		39.0
21	7 semanas.	39.1	
23	7 semanas.		39.0
30	8 semanas.	39.0	
27	8 semanas.	39.7	
26	8 semanas.	39.0	
25	9 semanas.	38.9	
28	9 semanas.		39.0
29	9 semanas.		39.2
24	Control(-) 8 semanas Inóculo SSF.		38.7
<b>GRUPO III.</b>			
14	4semanas.		38.7
13	4semanas.		38.6
15	7semanas.		38.9
16	7semanas.		38.8
12	9semanas.		38.8
11	9semanas.		38.5

\*\* Animal con proceso neumónico. No desarrollo cuadro clínico por rotavirus; Control (-), animales inoculados con SSF ( Solución Salina Fisiológica Estéril).

#### 4.2.3.- Pruebas clínicas ( Biometría hemática, albúmina y globulina).

Las pruebas clínicas se utilizaron al igual que la temperatura como un monitor de sobre el estado de salud de los animales. Antes y durante del experimento, en rotavirus no se reportan cambios significativos en estos parámetros. No se observo una diferencia estadística significativa en las temperaturas medias de animales positivos o negativos al establecimiento del cuadro clínico por rotavirus

Cuadro 4 5. Distribución dentro de los grupos y edades de los animales positivos y negativos; en la observación del cuadro clínico (diarrea) y las pruebas de rotaforesis/ aislamiento viral

	Edad. (semanas).	4	4	7	7	8	8	9	9	Rotaforesis/ Aislamiento viral/ Cuadro clínico.	Rotaforesis/ Aislamiento viral/ Cuadro clínico.	Tot
	Rotaforesis/ Aislamiento viral/ Cuadro clínico.	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Total Positivos.	Total Negativos	
<b>Grupo.</b>												
<b>I.</b>				2	1	1	2	0	3	3	6	9
<b>II.</b>				1	2	3	0	1	2	5	4	9
<b>III.</b>		0	2	0	2			0	2	0	6	6
<b>Controles.</b>				0	1	0	1	0	0	0	2	2
Rotaforesis Aislamiento viral/ Cuadro clínico.	<b>Total Positivos</b>	0		3		4		1		8		
Rotaforesis/ Aislamiento viral/ Cuadro clínico.	<b>Total Negativos</b>		2		6		3		7		18	
<b>Total</b>		0	2	3	6	4	4	1	7			26

Pos. (Positivos), Neg. ( Negativos)

La rotaforesis positiva, los aislamientos virales positivos, solo se presentaron en aquellos animales que desarrollaron el cuadro clínico característico con diarrea de pastosa a líquida. El perfil electroforético se mantuvo sin mayor alteración desde el aislamiento original, durante la recuperación para el abasto viral, como en las muestras recuperadas de los animales desafiados con esta cepa viral, con excepción del animal 26 del grupo II quien en las últimas dos extracciones de ARN viral muestra un cambio en el perfil de migración en el gel de poliacrilamida.

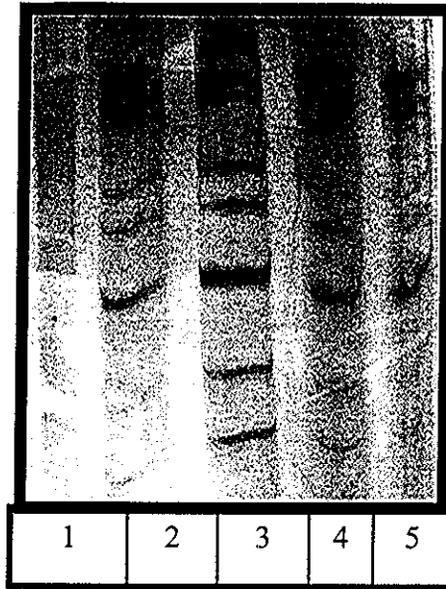
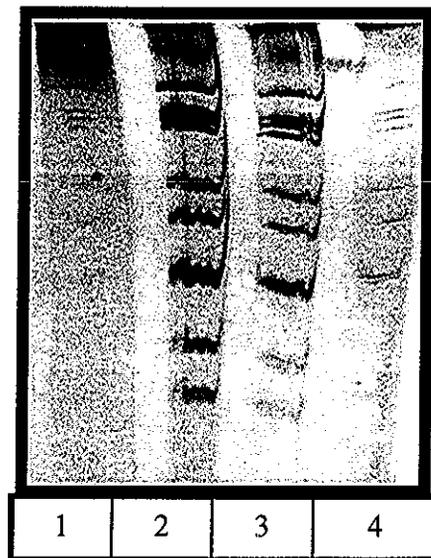


Figura 4.4. Extracto de ARN viral postinfección animal, No9, 7 semanas de edad, Grupo I. Se observa patrón electroforético característico y periodo de excreción viral. Carril 1) Reaslamiento viral post eutanasia, 2) 48hrs post inóculo, 3) 72 hrs post inóculo, 4) 72 hrs post inóculo, 5) Control abasto viral.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 4.5.- Extracto de ARN viral postinfección animal, No 8, 7 semanas, GrupoI. Se observa patrón electroforético característico. y periodo de excreción viral; Carril 1) 48 hrs post inóculo, 2) 72hrs post inóculo, 3) 96hrs post inóculo,4)120hrs post inóculo.

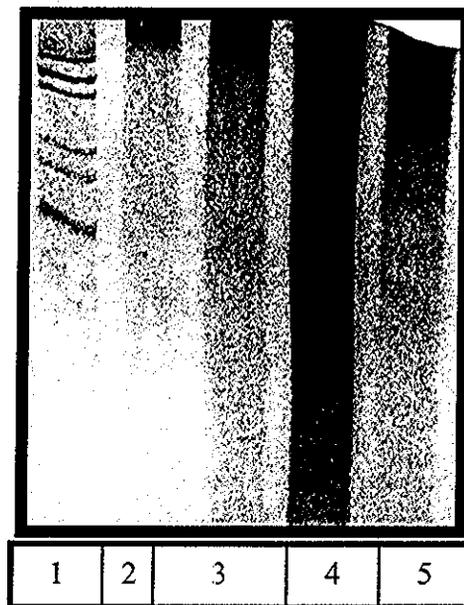
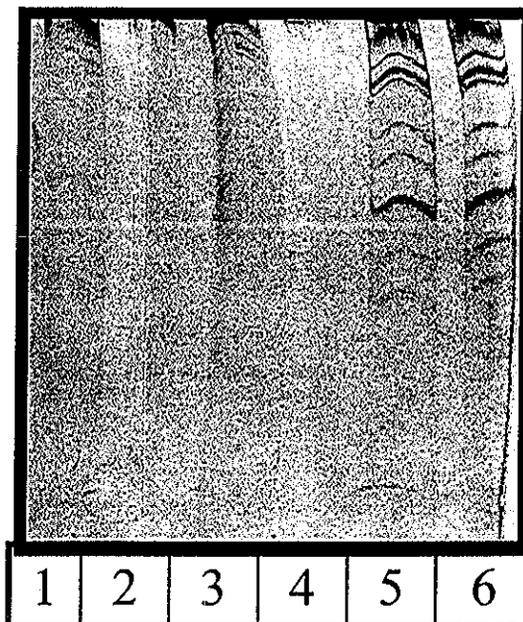


Figura 4.6. Extracto de ARN viral postinfección animal, No6, 8 semanas de edad, Grupo I. Se observa patrón electroforético característico y periodo de excreción viral; Carril 1) Control abasto viral, 2) ,3) y 4) No se detectó rotavirus y 5) 48hrs post inóculo.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 4.7. Extracto de ARN viral postinfección animal, No27, 8 semanas, Grupo II. Se observa patrón electroforético característico y periodo de excreción viral; Carril 1) Control abasto viral, 3) 72hrs post inóculo, 4) 96hrs post inóculo, 5) 120hrs post inóculo, 6) 144hrs post inóculo.

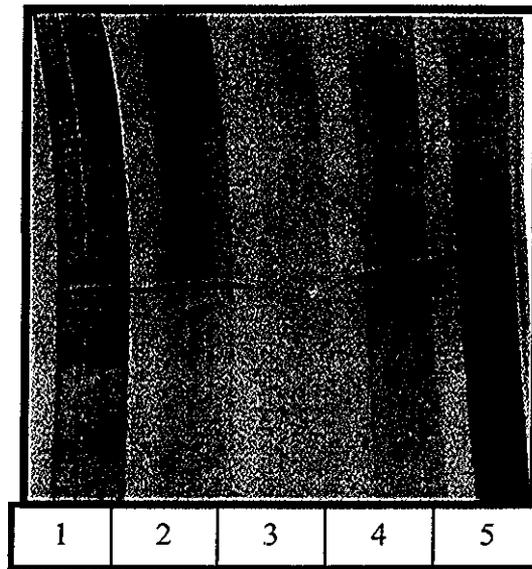


Figura 4.8. Extracto de ARN viral postinfección, animal No26, 8 semanas, Grupo II, Se observa patrón electroforético característico y periodo de excreción viral; Carril 1) 144hrs post inóculo, 2), 3) y 4) Vacíos, 5) Control abasto viral.

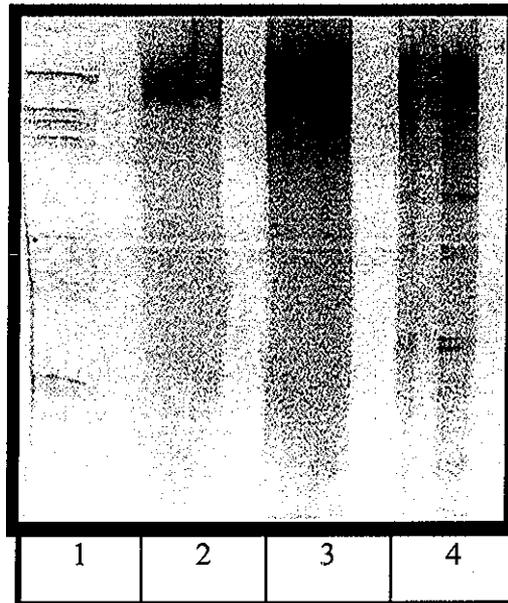


Figura 4.9. Extracto de ARN viral postinfección, animal No30, 8 semanas, Grupo II Se observa patrón electroforético característico y periodo de excreción viral Excreción viral en rotaforesis; Carril 1), Control inóculo, 2) y 3) Vacios, 4) 144hrs post inóculo.

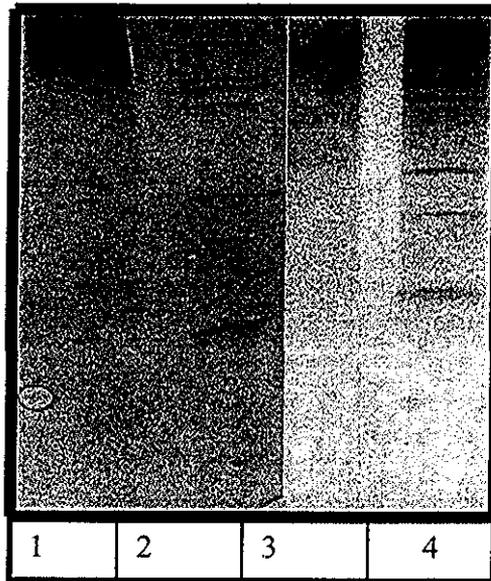


Figura 4.10. Extracto de ARN viral postinfección, se observa patrón electroforético característico y periodo de excreción viral, excreción viral en rotaforesis; Carril 1) Vacío, 2) No21, 7 semanas, Grupo II 96 hrs post inóculo, 3) Vacío 4) No 25, 9 semans de edad, Grupo II, 120 hrs hrs post inóculo.

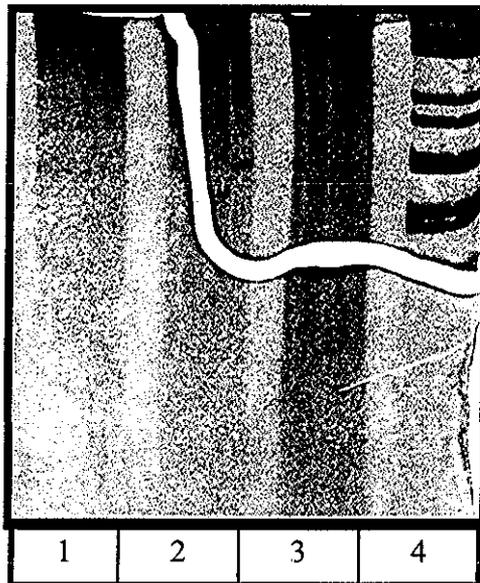


Figura 4.11. Extracto de ARN viral, aslamiento viral post eutanasia Grupo I, se observa patrón electroforético característico; Carril 1) Control abasto. 2) animal No6, 3) animal No8, 4) animal No 9.

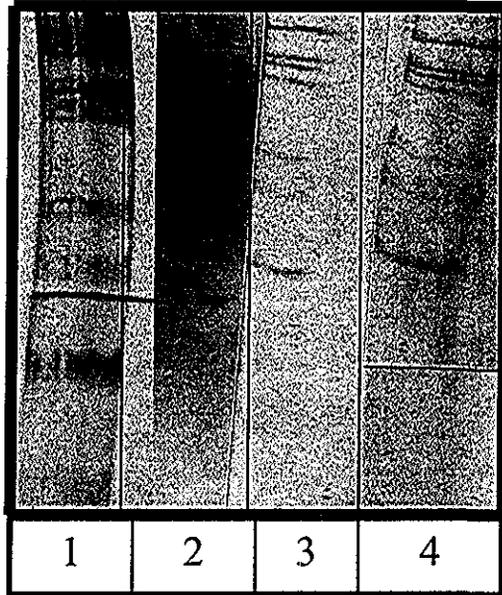


Figura 4.12. Extracto de ARN viral, aslamiento viral post eutanasia Grupo I, se observa patrón electroforético característico; Carril 1) animal No27, 2) animal No26, 3) animal No.21, 4) animal 5 No.30.

Nota: Geles individuales .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.2.4.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL LOS RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II.

El análisis estadístico no paramétrico se realizó con la paquetería STAT Graphics 94-99, se utilizaron cuadros de frecuencias para conocer la distribución de los animales positivos y negativos en la observación de rotaforesis, con respecto a las variables que caracterizaron la selección de los grupos experimentales hato de origen de los animales, grupo, raza, sexo y edad. La prueba de  $\chi^2$  se utilizó para determinar la relación de dependencia o independencia de las variables antes citadas y el estado de rotavirus de los animales utilizando la técnica de rotaforesis como observación,

##### 4.2.4.1.- Distribución de frecuencias en observación clínica, rotaforesis y aislamiento viral.

Cuadro 4.6 - Distribución de frecuencias de resultados positivos y negativos entre la observación del cuadro clínico de rotavirus (diarrea) y los resultados de las técnicas de Rotaforesis (Patrón de corrimiento electroforético característico) y Aislamiento viral (observación del efecto citopático). En los casos positivo y en los negativos se observó un correspondencia del 100% entre los resultados de los mismo.

	Rotaforesis/ Aislamiento viral/ Diarrea Positivo	Rotaforesis/ Aislamiento viral/ Diarrea Negativo	Total
Rotaforesis/ Aislamiento viral/ Diarrea. Positivo	8 (30.77%)	0(0%)	8 (30.77%)
Rotaforesis/ Aislamiento viral/ Diarrea. Negativo	0(0%)	18 (69.23%)	18 (69.23%)
Total	8 (30.77%)	18 (69.23%)	26 (100%)

##### 4.2.4.2-Efecto de origen, grupo, raza, sexo y edad sobre la presentación de rotavirus en los caprinos inoculados con la cepa de aislamiento.

Dado que la correlación en los casos positivos y negativos entre la observación clínica, rotaforesis y aislamiento viral fue de un 100%, se utilizó la variable rotaforesis positiva para hacer las siguientes correlaciones para el análisis de frecuencias y determinar en la prueba de  $\chi^2$ , la dependencia o independencia de esta observación contra las cinco variables que se consideraron de mayor significado en el desarrollo del modelo de infección en caprinos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

4.2.4.2.1 - Análisis y gráfica de distribución de frecuencia y prueba de  $\chi^2$  utilizando la respuesta Rotaforesis en relación a la variable hato de origen del animal.

Cuadro 4.7 Distribución de frecuencias de resultado en rotaforesis con base al origen de los animales.

	Cuatro Milpas Rotaforesis Positivo.	Almaraz Rotaforesis. Negativo.	Total
Rotaforesis Positivo	3(11.54%)	5(19.23%)	8 (30.77%)
Rotaforesis Negativo	7(26.9%)	11(42.31%)	18(69.23%)
Total	10 (38.46%)	16 (61.54%)	26(100%)

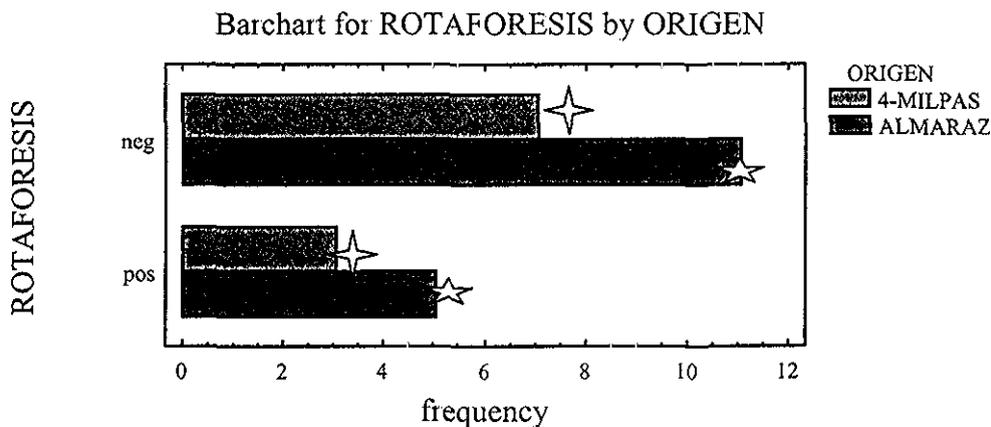


Figura 4.13 -Gráfica Distribución de Frecuencia de Rotaforesis, dependiendo del hato de origen del animal (★4-Milpas: hato con previa circulación viral, ☆Almaraz: hato negativo a la detección de circulación viral).

$\chi^2$	Df	P-Valor
0.00	1	0.9464
0.00	1	1.000 (Corrección de Yates)

$H_0$ = La variable de **ORIGEN** es independiente de la observación de **ROTAFORESIS POSITIVA**, dado que el Valor -  $P > 0.10$ . Se acepta la Hipótesis y se consideran variables independientes ya que se presentaron animales positivos y negativos a rotavirus en ambos hatos de origen.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

4.2.4.2.2.- Análisis y gráfica de distribución de frecuencia y prueba de  $\chi^2$  utilizando la respuesta Rotaforesis en relación variable grupo del animal.

Cuadro 4.8.- Distribución de frecuencias de resultado en rotaforesis con base al grupo de los animales...

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Total
Rotaforesis Positivo	3 (11.54%)	5 (19.23%)	0 (0%)	8 (30.77%)
Rotaforesis Negativo	7(26.9%)	5 (19.23%)	6 (23.68%)	18(69.23%)
Total	10 (38.46%)	10 (38.46%)	6 (23.68%)	26(100%)

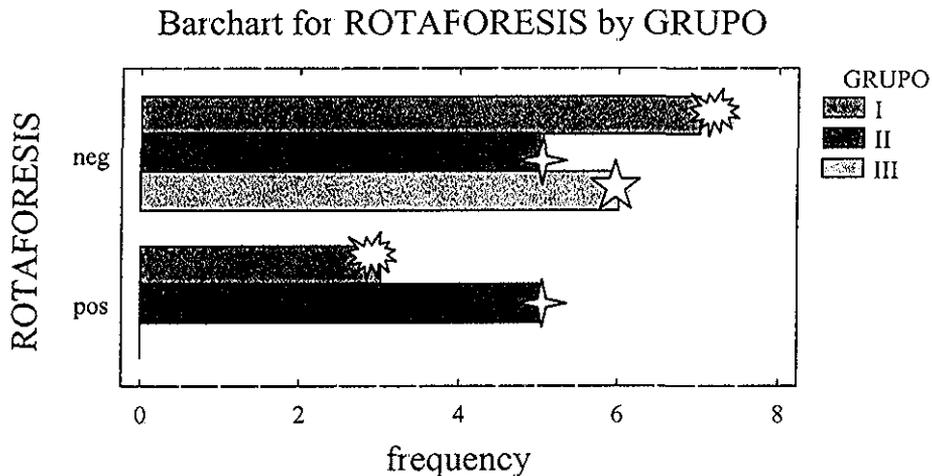


Figura 4.14.-Gráfica Distribución de Frecuencia de Rotaforesis, dependiendo del Grupo del animal; Grupo I (animales de raza Alpina y Toggenburg, provenientes de hato con previa circulación viral), Grupo II (animales de raza Alpina y Toggenburg, provenientes de hato sin detección previa circulación viral), Grupo III (animales Criollos, provenientes de hato sin detección previa circulación viral)...

$\chi^2$	Df	P-Valor
4.441	2	0.1105

$H_0$ = La variable de **GRUPO** es independiente de la observación de **ROTAFORESIS POSITIVA**, dado que el Valor-P es  $\leq$  ó  $> 0.10$ . Se acepta la hipótesis. Se consideran variables independientes ya que se presentaron animales positivos y negativos a rotavirus en dos de tres grupos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

4.2.4.2.3.- Análisis y gráfica de distribución de frecuencia y prueba de  $\chi^2$  utilizando la respuesta Rotaforesis en relación a la variable raza del animal.

Cuadro 49.- Distribución de frecuencias de resultado en rotaforesis con base a la raza de los animales

	Alpina	Criolla Caprina	Toggenburg	Total
Rotaforesis Positivo	7 (26.92%)	0(0%)	1(3.85%)	8 (30.77%)
Rotaforesis Negativo	6(23.08%)	6 (23.08%)	6(23.08%)	18(69.23%)
Total	13(50%)	6 (23.08%)	7(26.92%)	26(100%)

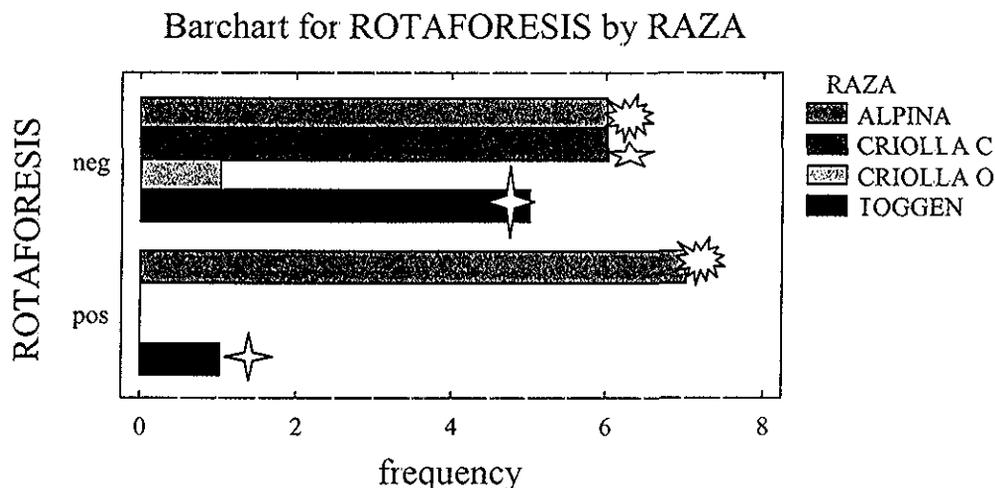


Figura 4.15.- Gráfica Distribución de Frecuencia de Rotaforesis, dependiendo del la Raza del animal.   
 ☆ Alpina (distribuidos tanto en el Grupo I como en II, inoculados una vez),   
 ☆ Toggenburg (distribuidos tanto en el Grupo I como en II, inoculados una vez),   
 ☆ Criolla (animales del Grupo III, inoculados dos veces sin desarrollar rotavirus)

$\chi^2$	Df	P-Valor
5.66	2	0.0591

$H_0$ = La variable de **RAZA** es independiente de la observación de **ROTAFORESIS POSITIVA**, dado que el Valor-P < 0.10. se rechaza la hipótesis, **Son Variables Dependientes**. Se considera variable dependiente ya que de los 8 animales positivos 7 pertenecen a la raza Alpina, 1 a Toggenburg y ninguno a Criolla.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

4.2.4.2.4.- Análisis y gráfica de distribución de frecuencia y prueba de  $\chi^2$  utilizando la respuesta Rotaforesis con relación a la variable sexo del animal.

Cuadro 4 10 - Distribución de frecuencias de resultado en rotaforesis con base al sexo del animal.

	Hembra	Macho	Total
Rotaforesis Positivo	6 (23.08%)	2 (7.69%)	8 (30.77%)
Rotaforesis Negativo	3 (11.54%)	15 (57.69%)	18 (69.23%)
Total	9 (34.62%)	17 (65.38%)	26 (100%)

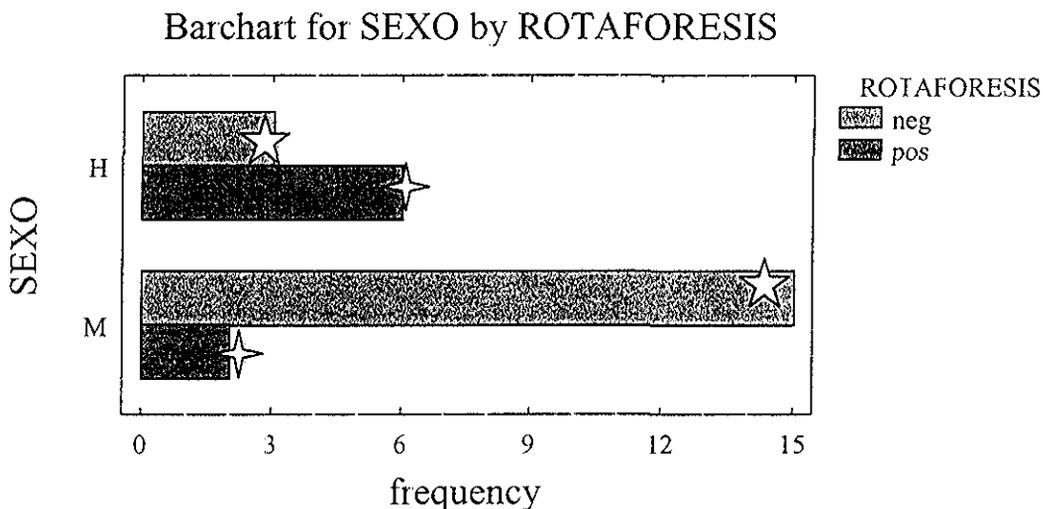


Figura 4.16 -Gráfica Distribución de Frecuencia de Rotaforesis, dependiendo del sexo del animal. Hembras y Machos se encontraban distribuidos en forma aleatoria en los tres grupos. ☆ Positivos, ☆ Negativos.

$\chi^2$	Df	P-Valor
8.33	1	0.0039

$H_0$  = La variable **SEXO** es Independiente de la observación **ROTAFORESIS POSITIVA**, dado que el Valor  $-P < 0.05$  se rechaza la hipótesis **Son variables dependientes**. Se considera variable dependiente ya que de los 8 animales positivos 6 (23.08%) pertenecen a las hembras las cuales representaban el 34.2 % de la población total y 2 (7.69%) a los machos los cuales representaban al 65.38% de la población

4.2.4.2.5.- Análisis y gráfica de distribución de frecuencia y prueba de  $\chi^2$  utilizando la respuesta Rotaforesis con relación a la variable edad del animal.

Cuadro 4.11.- Distribución de frecuencias de resultado en rotaforesis con base a la edad del animal.

	4 Semanas	7 Semanas	8 Semanas	9 Semanas	Total
Rotaforesis Positivo	0(0%)	3 (11.54%)	4(15.48%)	1(3.85%)	8 (30.77%)
Rotaforesis Negativo	2(7.69%)	6(23.08%)	3(11.54%)	7 (26.92%)	18(69.23%)
Total	2(7.69%)	9 (34.62%)	7(26.92%)	8 (30.77%)	26(100%)

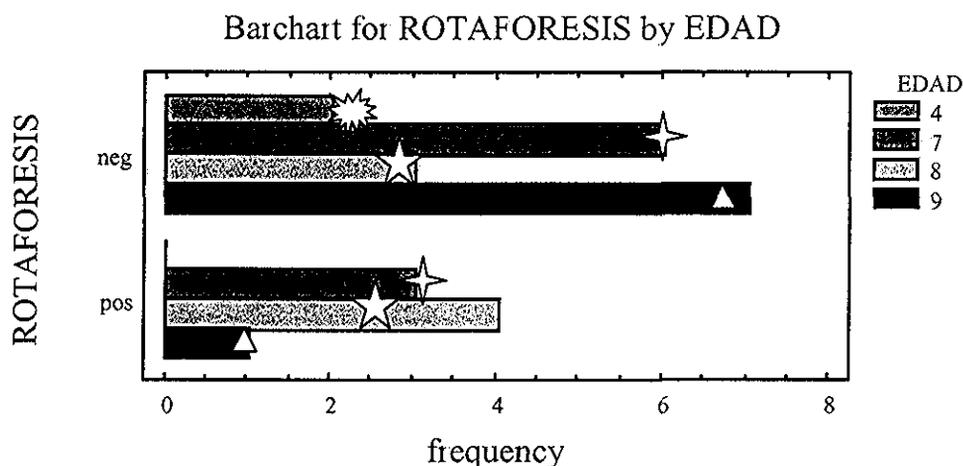


Figura 4.17.-Gráfica Distribución de Frecuencia de Rotaforesis, dependiendo de la edad del animal. Las edades  $\star$  7 y  $\triangle$  9 semanas se presentaron en los tres Grupos, la edad  $\star$  8 semanas en los Grupo I y II y la edad  $\star$  4 semanas únicamente en el Grupo III.

$\chi^2$  4.446      Df 1      P-Valor 0.2163

$H_0$ = La Variable **EDAD** es Independiente de la observación **ROTAFORESIS POSITIVA**, Dado que el P-Valor  $> 0.10$  se acepta la hipótesis son variables independientes. Se considero independiente ya que presentaron rotavirus animales de tres de 4 rangos de edad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 4.12.- Resumen de los resultados la prueba de  $\chi^2$  relacionando las observaciones de rotaforesis positiva correlacionada en un 100% con el cuadro clínico de rotavirus y asilamiento viral, con las variables de mayor importancia en la definición de los grupos experimentales.

Variable.	Dependiente.	Independiente.
Edad.		8 animales positivos al desafío con rotavirus(30.77%), distribuyéndose de la siguiente forma 3(11.54%) en las 7 semanas de vida, 4 (15.38%) en las semanas de vida y 1 (3.85%) a las nueva semanas de vida.
Sexo.	8 animales positivos al desafío con rotavirus(30.77%), distribuyéndose de la siguiente forma 6 hembras (23.08%) y 2 machos (7.69%).	
Raza.	8 animales positivos al desafío con rotavirus(30.77%), distribuyéndose de la siguiente forma 7 de raza Alpina (26.92%) y 1 de raza Toggenburg ( 3.85%).	
Grupo	<b>La distribución de grupo esta determinada por raza.</b>	8 animales positivos al desafío con rotavirus(30.77%), distribuyéndose de la siguiente forma 3 en el grupo I (11.54%) y 5 en el grupo II (19.23%).
Origen.		8 animales positivos al desafío con rotavirus(30.77%), distribuyéndose de la siguiente forma 3 en el grupo proveniente del rancho 4-milpas (11.54%) y 5 del grupo proveniente de Almaráz (19.23%).

#### 4.2.5.- Lesiones microscópicas.

La observación microscópica de las diversas secciones representativas de las principales regiones del intestino por animal. En los cortes de histopatología se buscó la lesión característica de la infección por rotavirus definida con la presencia de atrofia, fusión de las vellosidades intestinales acompañada o no por necrosis y epitelio desprendido en la cresta intestinal.

4.13 - Cuadro, distribución de lesiones histopatológicas

		Órgano.	Duodeno.				Yeyuno.				Ileon.				Colon.				
Grupo.	Edad.	Rotaforesis	A	F	N	Cc	A	F	N	Cc	A	F	N	Cc	A	F	N	Cc	
<b>I</b>	SEMANAS.																		
9	7	Positivo.	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
8	7	Positivo.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	8	Positivo.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
5	7	Negativo.	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
2	8	Negativo.	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
3	8	Negativo.	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
1	9	Negativo.	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
7	9	Negativo.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
4	9	Negativo.	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
10	7	Negativo.	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
CONTROL.																			
<b>II</b>																			
21	7	Positivo.	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
30	8	Positivo.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
27	8	Positivo.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
26	8	Positivo.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
25	9	Positivo.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
22	7	Negativo.	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
23	7	Negativo.	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
28	9	Negativo.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
29	9	Negativo.	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
24	8		+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
CONTROL																			
<b>III</b>																			
14	4	Negativo.	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
13	4	Negativo.	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
15	7	Negativo.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
16	7	Negativo.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
12	9	Negativo.	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
11	9	Negativo.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<b>IV</b>																			
1B	8	Negativo.	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2B	8	Negativo.	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3B	8	Negativo.	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4B	8	Negativo.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
5B	8	Negativo.	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CONTROL																			

Lesiones Histopatológicas; A) atrofia; F) fusión de vellosidades; N) necrosis; Cc) Coccidia; +) positivo; -)negativo; /) sin muestra.

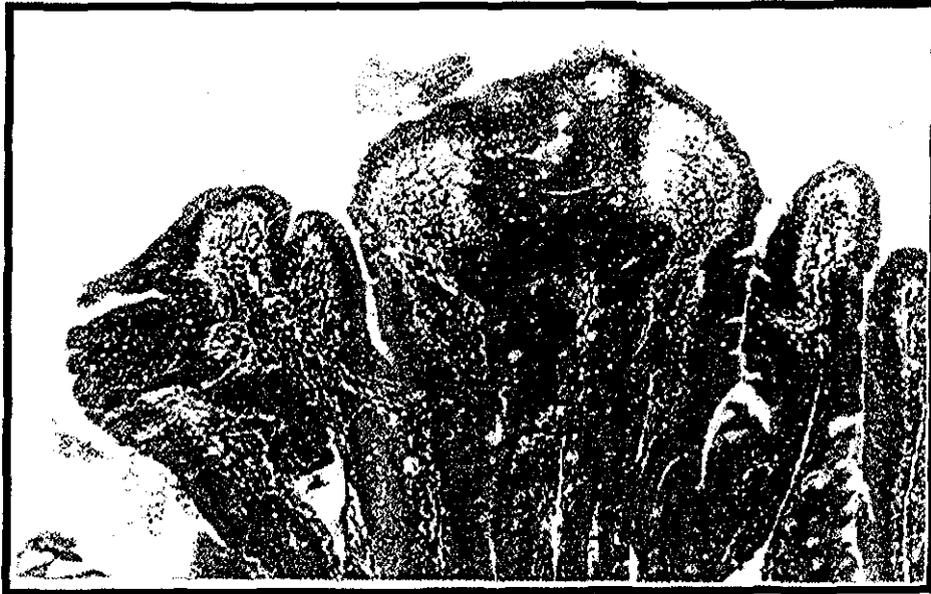


Figura 4.20.- Atrofia de vellosidades intestinales. Yeyuno..Animal No27,positivo a rotavirus, 9 días postinoculación. Tinción H.E., 100x



Figura 4.21.- Fusión de vellosidades Duodeno, Animal 4b, Negativo a rotavirus, Tinción H.E., 100x.



Figura 4.22.- Atrofia, necrosis y denudación de vellosidades. Yeyuno. Animal No 8, 6 días postinóculo. Positivo a rotavirus. Tinción H.E., 100x



Figura 4.23.- Atrofia, necrosis y denudación de vellosidades. Yeyuno. Animal No 26, 9 días post inóculo, positivo a rotavirus. Tinción H.E., 200x.

#### 4.2.6.-DISCUSIÓN.

El experimento uno cubrió el primer objetivo de establecer un modelo de infección por rotavirus en caprinos, con el aislamiento inicial de una cepa viral de campo a partir de un brote natural y su replicación y adaptación a cultivos celulares, para generar un abasto viral de desafío. El experimento II estableció un modelo de infección en caprinos, a partir de un abasto viral de 450 ml de cosecha de sobrenadante de cultivos celulares susceptible a rotavirus (MA-104), con un título de  $10^8$  partículas infectantes/ml, determinado por efecto citopático en diluciones decimales y monitoreado constantemente por rotaforesis (Rosen *et al.*, 1994) El abasto viral se generó en el lapso de 40 días con pases sucesivos en cultivo celular y se decidió detener el proceso, al alcanzar una concentración similar a la reportada por, Bruce, *et al.*, (1995) de concentración de  $10^8$  partículas virales/ml en corderos gnotobiontes, dadas las características similares del modelo animal. Son tan diversos los títulos de partículas virales/ml utilizados, como los modelos animales en los que se emplean y su eficiencia para establecer una infección depende de los factores de patogenicidad con los que cuenta cada cepa en particular y de la susceptibilidad de su hospedero (Bruke y Desselbarger, 1996; Bridger, 1994). Schaller, *et al.*, (1992), reportan títulos infectantes en cerdos gnotobiontes, de menos de 16 días de vida, de  $10^6$  partículas virales/ml del virus prototipo SA-11 y de la cepa Wa de rotavirus humanos. Saif y Ward (en Desselberger y Gray, 2000), reportan una dosis infectante en cerdos en las mismas condiciones del trabajo anterior de  $10^5$  partículas virales /ml. Bridger, *et al.*, (1987 y 1998a) reportan una concentración viral para desafío en cerdos y becerros gnotobiontes de  $10^6$  y  $10^7$  partículas virales/ ml.

El volumen de la dosis infectante utilizó en este trabajo fue de 10 ml por animal. Esta, al igual que la concentración ha sido reportada desde 50 ml por Bridger, (1994) en becerros, hasta 2 y 5 ml en porcinos por Saif y Ward ( en Desselberger y Gray, 2000). Sin embargo. el volumen de 10 ml se seleccionó con base en los trabajos de Snodgrass y Wells, (1978) y de Bruce, *et al.*, (1995), dado que estos se realizaron en ovinos, considerándose el modelo animal más cercano al caprino.

El periodo de incubación, una vez desafiados los animales, fue en promedio de 72hrs, algunos animales iniciaron el cuadro diarréico y la excreción viral positiva (en la prueba de rotaforesis) a las 48hrs, manifestándose las características de una cepa patógena. En los estudios de dos aislamientos de rotavirus porcino en cerdos gnotobiontes, Bridger, Hall y Parsons, (1992); Schaller *et al.*, (1992) se reporta la excreción viral de las cepas patógenas, en un periodo de 24 a 48hrs, en tanto que las cepas clasificadas como apatógenas comenzaron su excreción 1 ó 2 días después. El periodo de excreción viral, detectado por rotaforesis varió en los animales que desarrollaron cuadro clínico diarréico, entre 1 y 5 días. Schaller, *et al.*, (1992) informaron de un promedio de días de excreción viral en presencia de cuadro diarreico, de 3 a 5 días. Hall, *et al.*, (1993) determinan un ritmo de replicación y efecto citopático diferente entre las cepas patógenas y apatógenas de rotavirus bovino. Estas observaciones aunadas a la restricción marcada por la edad, fortalecen la hipótesis de que el ritmo de replicación viral depende de su

patogenicidad; sugiriendo que los rotavirus con capacidad de replicarse rápidamente, rebasan la capacidad del intestino para reponer las células dañadas determinando esto la manifestación de la enfermedad. Evidencias de lo anterior son la presentación de cuadros subclínicos o no detectables (Schaller *et al.*, 1992; Bruke y Desselberger, 1996). La circulación de cepas patógenas en humanos reportadas por Gorziglia *et al.*, (1988), así como cepas de cuneros, en las cuales los virus están circulando constantemente entre los recién nacidos pero rara vez logran establecer el cuadro clínico. Las manifestaciones clínicas hacen más evidente las grandes diferencias o semejanzas que las que éstas puedan expresar a nivel molecular (Bruke y Desselberger, 1996)

La morbilidad, ante el desafío con la cepa aislada de campo a partir de caprinos, utilizada en el experimento II fue de 30.77%, están distribuida dentro de los 26 caprinos inoculados, donde las variables como la edad, sexo, raza, grupo y población de origen, se manifestaron en forma dependiente, o independientes, de la infección por rotavirus.

Grupo I y II : tres y cinco animales de los grupos respectivos desarrollaron signos con un periodo de incubación promedio de 78hrs; presentaron cuadro diarreico, temperaturas normales; éste animal número 9 mostró anorexia, el mismo fue el único que desarrollo un cuadro clínico de deshidratación severa e hipotermia a las 72hrs postinoculación. El resto de los animales de los grupos I y II así como III y IV, no manifestaron sinología alguna.

De los ocho animales que enfermaron, tres se ubicaron en los grupos de animales con un fenotipo racial bien definido; tres a las 7 semanas de vida, cuatro a las 8 semanas y uno a las 9 semanas.

Los animales susceptibles se distribuyeron 3 a las 7 semanas de edad (11.3%); 4 a las 8 semanas de edad (15.38%) y 1 a las 9 semanas de edad (3.85%), los animales de 4 semanas no se infectaron y estos fueron desafiados una segunda ocasión a 6 semanas de vida, sin éxito. La morbilidad más importante se distribuyó entre las 7 y 8 semanas de vida. En el brote de rotavirus, a partir del cual se aisló originalmente la cepa de desafío, los animales afectados clínicamente se encontraban entre las 6 y las ocho semanas de vida. Los reportes sobre el aislamiento viral en caprinos han sido divergentes; DaCosta *et al.*, (1994a,1994b), detecta por aislamiento, rotavirus en animales de 12 a 16 semanas de vida. Scott, *et al.*, (1978) reportan animales enfermos al rededor de las 16 semanas de vida. Kaminjolo y Adesiyun, (1994) diagnóstica con una prueba de látex comercial la presencia de rotavirus en animales diarreicos de más de 12 semanas de vida. En tanto Muñoz, *et al.*, (1994, 1995b,1996) determinan la presencia de virus de 6 al 21 y 45 días de edad. Berrios *et al.*, (1988) animales mayores de un mes de vida, Nagy *et al.*, (1987), reportan una excreción viral entre los 7 y 30 días con una media a los 16 días de vida. La divergencia en estos datos también ha sido reportada para otras especies y apoya, como se ha señalado, el que son factores tanto virales, ambientales como del hospedero, de los cuales depende el establecimiento del cuadro clínico de rotavirus son multivariados y casuísticos en para la mayoría de las ocasiones (Muñoz *et al.*, 1994; Bruke y Desselberger, 1996).

La susceptibilidad manifestada por los animales a la infección por rotavirus en este experimento contrasta con los datos existentes de infecciones reportadas en caprinos. Y

sugiere que al igual que en otras especies, existe una variedad de cepas virales de diversas características, a las cuales están expuestos los caprinos y de las cuales prácticamente se desconoce; siendo esta una temática importante a tratar en la explotación de la especie.

La importancia del sexo de los animales susceptibles resaltó como una observación importante con diferencias significativas dentro de la población, tanto de animales positivo a rotavirus como negativos. Del 30.77% de animales enfermos, el 23.08% (6 animales) fueron hembras y solo dos machos (7.69%), ya que de la población total de 26 caprinos desafiados la proporción de hembras fue de 9 (34.62%) y 17 machos (65.38%); se observó un 66% de morbilidad en el grupo de las hembras distribuida en 7, 8 y 9 semanas de edad comparado con el 11.76% de la población total de machos distribuidos en 4, 7, 8, y 9 semanas de edad, resaltando la variable sexo femenino como factor de susceptibilidad. Kapikian y Chanok, (1996a), mencionan que tanto hembras como machos son susceptibles a sufrir la gastroenteritis por rotavirus; sin embargo, estadísticamente en los humanos es ligeramente mayor la cantidad de casos en hombres que en mujeres. Los datos mencionados, se hacen en referencia a un artículo del año 1979 sobre Epidemiología de enfermedades gastroentéricas infantiles. En la bibliografía revisada es la única cita asociada a esta observación; menciona en forma reiterada a lo largo del presente texto.

La diversidad de factores virales, ambientales y en especial los propios de hospedero, en conjunto son los que permiten el establecimiento de los rotavirus, como son; los receptores celulares adecuados para el virus, la restricción por edad, la especie susceptible a determinadas cepas virales, estado fisiológico en cada hospedero en buena medida, se asociados a los diversos estadios fisiológicos.

El estudio histopatológico realizado reveló la presencia de la lesión característica de rotaviriosis, con atrofia y fusión de las vellosidades intestinales, acompañada o no de necrosis y descamación del epitelio intestinal; se observó tanto en duodeno y yeyuno, como íleon. La lesión se encontró tanto en los animales positivos a la infección como en negativos y su distribución no mostró una diferencia estadística significativa por otra parte todos los animales positivos a la infección postdesafío desarrollaron una lesión apreciable. Las lesiones en los animales control y/o en los animales negativos podrían estar determinadas por la presencia de otros patógenos asociados a esta clase de lesión las en vellosidades intestinales, como fue la presencia en los cuatro grupos, de coccidias en mayor o menor grado, en cada grupo dependiendo de su origen. Y dado que se emplearon animales convencionales, provenientes de hatos en diversas condiciones, la lesión histopatológica no se debe atribuir únicamente desafío viral. La infección por rotavirus frecuentemente se ha reportado como secundaria o paralela a otras patologías asociadas a este fenómeno (Muñoz *et al*, 1996; Valdivia *et al*, 2000).

Bruke y Desselberger, (1996) señalan, dentro de los factores para ser susceptible a rotavirus, la presencia del receptor celular, edad, estado inmune y finalmente la composición genética. Esta última señalada en forma general, pero reflejada en todos los factores que hacen que el individuo sea resistente o no al virus. La variable raza se manifestó como dependiente para el establecimiento de la infección; porque se observó, que 13 animales de raza Alpina 7 enfermaron representado el 26.92% de la morbilidad total; en total enfermó; 1 animal de 6 de la raza Toggenburg (3.85%) y ningún animal

criollo caprino enfermó a pesar de ser inoculados en dos ocasiones con el mismo abasto viral que el resto de los animales. Kapikian y Chanock, (1996a) señalan una mayor incidencia en niños menores de 5 meses hospitalizados de raza negra, si se contrastan con los que no pertenecen la raza negra. Sin embargo, esta tendencia desaparece al llegar al grupo de 8 meses de edad. Se consideró para este caso que el factor socioeconómico era el que facilitaba esta manifestación. Sin embargo en las observaciones del experimento 2, todos los animales de raza definida se encontraban en mejor condición física si se contrastan con los criollos ( Cuadros 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4).

Se han observado brotes en la raza Saanen y en mestizos de Saanen (DaCosta *et al.*, 1994a y 1994b), Saanen y Alpina (Muñoz *et al.*, 1994) las razas Alpina y Toggenburg aislamiento original de presente trabajo (Experimento I) 1997, El resto de las publicaciones no especifica si los animales fueron o no de raza definida. La observación sobre la morbilidad, en este modelo de infección en caprinos, sobre la variable raza y sexo, como dependientes de la susceptibilidad del animal a la infección soporta las observaciones sobre el componente genético del hospedador, en la epidemiología de la enfermedad, de tanta importancia como el estudio de la biología a todos los niveles del virus. Y la falta de bibliografía, no solo en caprinos si no en particular para poder contrastar estas observaciones, resalta el papel que juega el desarrollo de modelos animales, donde se tomen en cuenta tanto los factores de virulencia o, como la patogenicidad del rotavirus, medio ambiente y el hospedador.

Dentro de la definición de los factores virales que juegan un papel importante en el establecimiento de la infección por rotavirus, se encuentran la mayor parte de informes dirigidos al estudio de las proteínas VP4 y VP7, asociadas con los serotipos P y G dentro del Grupo A. Los anticuerpos neutralizantes dirigidos a estas estructuras han de mostrado en forma independiente poseer una actividad inmune protectora (Estes, 1996a). La proteína VP4 fragmentada parcialmente y modificada por proteólisis dependiente de la tripsina en las proteínas VP5 y VP8, requerida para activar la capacidad infectante del virus (Espejo *et al.*, 1978; Estes, 1996a); presenta capacidad aglutinante y los anticuerpos dirigidos a VP4 o a los productos de su proteólisis restringen a la infección *in vitro*. La proteína VP7 se ha involucrado en la interacción secundaria a VP4 con las estructuras celular, pero es la unión de ambas y con las estructuras de superficie celular las que permiten el establecimiento y penetración viral (Ciarlet y Estes, 1999).

El receptor celular específico de los rotavirus no ha sido identificado. En términos generales se acepta que los rotavirus de origen animal requieren de estructuras celulares ricas en ácido siálico para poder establecer la unión virus receptor. En tanto los aislamientos de origen humano parecen ser independientes de éste, las estructuras ricas en ácido siálico y la interacción específica con otras estructuras receptoras en la superficie celular son indispensables para lograr una infección productiva por los rotavirus (Méndez *et al.*, 1996). La expresión de éstas estructuras específicas dependerán entonces de cada hospedador y estas son determinadas como una expresión de la genética y estado fisiológico de cada individuo, independientemente de su estado inmune.

Ciarlet y Estes, (1999) aislaron 14 de rotavirus de humanos, independientes de ácido siálico para, establecer una infección *in vitro*, así como 5 aislamientos de rotavirus de ovinos, bovinos y porcinos; y 10 aislamientos de animales domésticos dependientes de ácido siálico. Los autores concluyen que la dependencia de la cepa viral, por las estructuras de ácido siálico de la célula está más relacionada con el serotipo P que con el origen del aislamiento que de estructuras específicas. Méndez *et al.*, (1996), Ciarlet y Estes, (1999) sugieren que la vía de entrada de los rotavirus a las células, más que depender de la presencia o no de ácido siálico en su interacción inicial, depende de más una interacción con estructuras moleculares que utilizan otros virus. Méndez, *et al.*, (1999) reportan la interacción de las proteínas VP4 y VP7, con por lo menos tres estructuras moleculares, en la superficie celular, mediadas por las proteínas estructurales y esto contribuye con el tropismo selectivo mostrado por los rotavirus. Demuestran cómo los rotavirus se unen inicialmente a componentes de ácido siálico y glicoproteínas, por las dos proteínas estructurales de la cápside externa. Los trabajos antes citados describen una compleja unión entre virus y diversas estructuras celulares, los factores virales que permiten la unión al receptor celular y de están siendo estudiados con profundidad. Sin embargo, los factores que expresa la célula para definir su susceptibilidad ante el virus no han sido abordados ampliamente. La dependencia de sexo, raza y edad y la frecuencia de la presentación de la infección en el presente trabajo sugiere que al establecimiento de una infección productiva no solo depende de los factores de virulencia que expresa cada cepa viral, sino del papel que juega la permisividad de cada individuo, determinada por el fenotipo expresado y condición fisiológica de mismo. Que en este caso fue raza, ya que se observaron donde observamos 7 de los 8 animales enfermos, dentro de la raza Alpina, 1 de 7 en Toggenburg y ninguno en criollos caprinos desafiados en dos ocasiones. Que en contraste con los animales de raza, no seroconvirtieron ante las pruebas de ELISA y virus neutralización y el mismo tipo de respuestas se observó al desafío en ovinos.

**4.3.-EXPERIMENTO III: RESPUESTA INMUNE EN CAPRINOS Y OVINOS PREVIO Y POST DESAFÍO CON CEPA DE AISLAMIENTO ( ELISA Y SERONEUTRALIZACIÓN).**

Buscando determinar la participación de la inmunidad pasiva (materna) en la susceptibilidad de los animales seleccionados para el modelo de infección en caprinos y ovinos; se establecieron los ensayos de ELISA indirecta para IgG caprina y el de virus neutralización, con la finalidad de determinar la participación de los anticuerpos neutralizantes maternos específicos a la cepa homóloga en el establecimiento de la infección. Se utilizaron dos ensayos diferentes para tener una mayor certeza en las observaciones. Ambas pruebas determinan la respuesta humoral sistémica, la cual se considera un reflejo del reconocimiento de antígenos por parte del sistema inmune, del individuo o en este caso de la madre, transmitido a la cría vía calostro. Debido a la corta edad de los animales utilizados en le experimento y a las condiciones de circulación y no circulación viral demostrada en el experimento I en cada uno de los hatos de origen, se considero que la mayor la lectura inicial de anticuerpos en los animales fue de origen materno, no así los detectados postdesafío. Posteriormente esto fuero analizado por una ANOVA multifactorial en la paquetería STAT Graphics 1994-1999.

**4.3.1.1.-Resultados de ELISA previo expresados como la diferencia de absorbancia entre respuesta a antígenos proteicos de sobrenadante de cultivo celular infectado con cepa aislada de rotavirus caprino y sobrenadante de cultivo celular sin infección.**

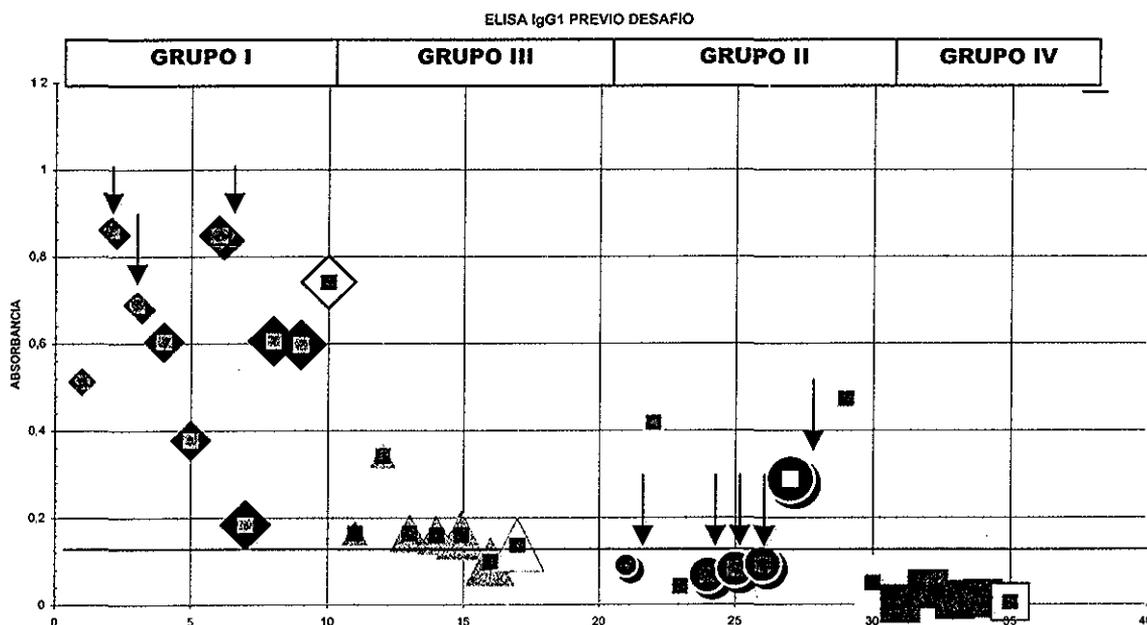


Figura 4.22.- Gráfica de distribución y título de IgG sérica previo desafío en ELISA indirecta; ◆ Grupo I (Hato con circulación viral demostrada), △ Grupo III, ○ Grupo II, □ Grupo IV. Los grupo II, III y IV (proviene de hato sin detección viral en los últimos 4 años). Los datos correspondientes a cada animal están distribuidos por edades siempre de menor a mayor edad, animales positivos a rotavirus. ↓

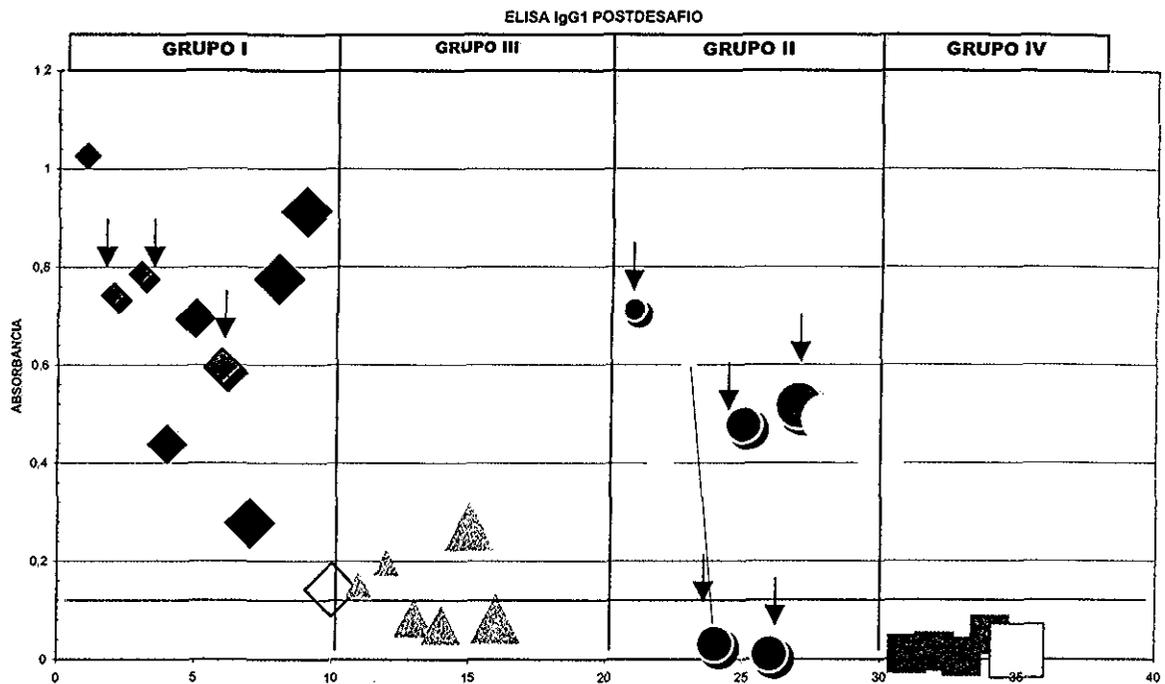


Figura 4.23.-Gráfica de distribución y título de IgG sérica post desafío en ELISA indirecta;  $\diamond$  Grupo I (Hato con circulación viral demostrada),  $\triangle$  Grupo III,  $\circ$  Grupo II,  $\square$  Grupo IV. Los grupos II, III y IV (proviene de hato sin detección viral en los últimos 4 años). Los datos correspondientes a cada animal están distribuidos por edades siempre de menor a mayor edad, animales positivos a rotavirusis. ↓

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**4.3.1.2.- Análisis estadístico de los títulos de IgG sérica en ELISA indirecta previo y post desafío.**

Utilizando la prueba de  $\chi^2$  la única variable que dependiente a la respuesta o observación título ELISA IgG en unidades de absorbancia previo fue el **origen** de los animales.

Cuadro 4.14.- ANOVA Multifactorial (Análisis de varianza) ELISA previo desafío observando las fuentes de variación para determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas diferencia significativas ente ellas.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrados	Razón "F"	Significancia de "F" (P-valor)	Observaciones. P-Valor < 0.05 Hay diferencia significativa
Edad	0.29537	3	0.0984567	2.31	0.1053	
Rotaforesis	0.0461258	1	0.0461258	1.08	0.3097	
Sexo	0.0458362	1	0.0458362	1.08	0.312	
Raza	0.29237	3	0.974567	2.29	0.1079	
<b>Origen</b>	<b>0.451422</b>	<b>1</b>	<b>0.451422</b>	<b>10.61</b>	<b>0.0038</b>	<b>Significativa.</b>
Residual	0.893831	21	0.0425634			
Total Corregido	2.91041	30				

Utilizando la prueba de  $\chi^2$  la única variable dependiente de la respuesta o observación ELISA IgG post desafío es el **origen** de los animales.

Cuadro 4.15.- ANOVA Multifactorial (Análisis de varianza) ELISA postdesafío observando las fuentes de variación para determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas diferencia significativas ente ellas.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrados	Razón "F"	Significancia de "F" (P-valor)	Observaciones. P-Valor < 0.05 Hay diferencia significativa
Edad	0.05822	3	0.0984576	0.73	0.5440	
Rotaforesis	0.0294254	1	0.0461258	1.11	0.3050	
Sexo	0.00259802	1	0.0458362	0.10	0.7578	
Raza	0.00433395	3	0.974567	0.50	0.9829	
<b>Origen</b>	<b>0.817816</b>	<b>1</b>	<b>0.451422</b>	<b>30.72</b>	<b>0.000</b>	<b>Significativa.</b>
Residual	0.55902	21	0.0425634			
Total Corregido	2.24466	30				

**4.3.2.1-Virus neutralización expresado como factor de dilución a un pozo antes de observar efecto citopático lítico en cultivo celular.**

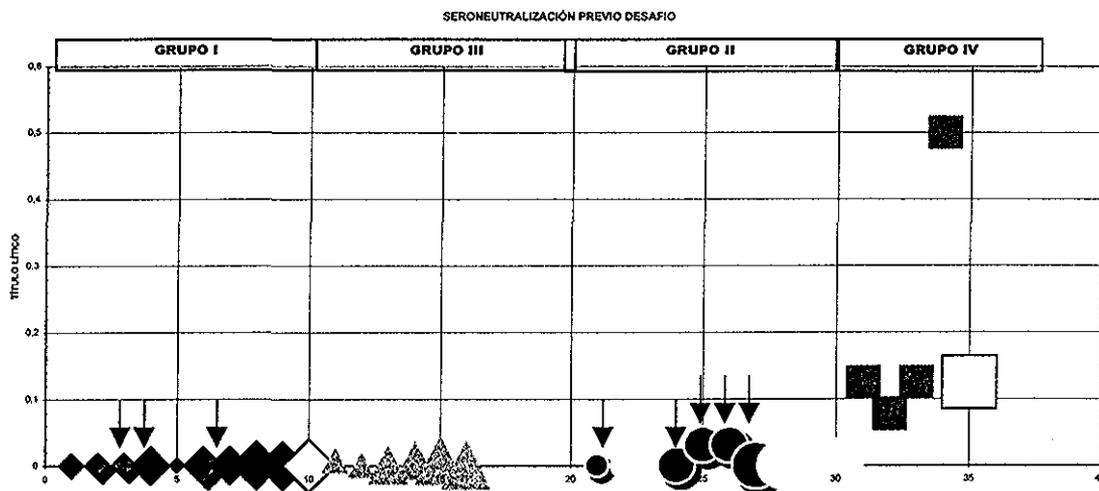


Figura 4.24.- Gráfica de distribución y título de virus neutralización previo desafío.  
 ◆ Grupo I (Hato con circulación viral demostrada), △ Grupo III, ○ Grupo II, □ Grupo IV. Los Grupos II, III y IV (proviene de hato sin detección viral en los últimos 4 años). Los datos correspondientes a cada animal están distribuidos por edades siempre de menor a mayor edad, animales positivos a rotavirusis. ↓

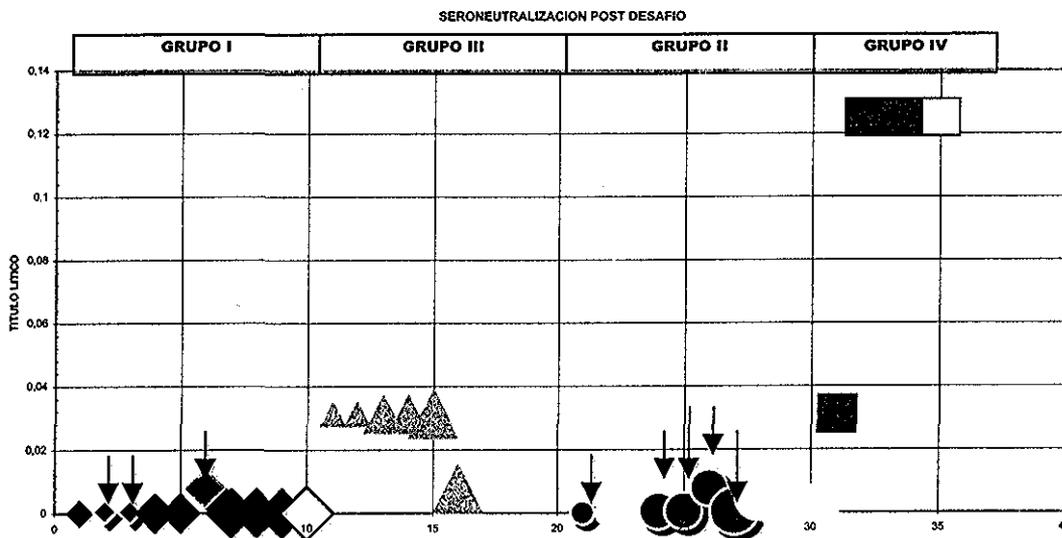


Figura 4.25.- Gráfica de distribución y título de virus neutralización postdesafío.  
 ◆ Grupo I (Hato con circulación viral demostrada), △ Grupo III, ○ Grupo II, □ Grupo IV. Los Grupos II, III y IV (proviene de hato sin detección viral en los últimos 4 años). Los datos correspondientes a cada animal están distribuidos por edades siempre de menor a mayor edad, animales positivos a rotavirusis. ↓

4.3.2.2.- Análisis estadístico de los títulos neutralizante *in vitro* en virus neutralización previo desafío, utilizando la prueba de  $\chi^2$  no demostró dependencia a alguna de las variables.

Cuadro 4.16.- ANOVA Multifactorial (Análisis de varianza) virus neutralización previo desafío observando las fuentes de variación para determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas diferencia significativas ente ellas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrados	Razón "F"	Significancia de "F" (P-valor)	Observaciones. P-Valor < 0.05 Hay diferencia significativa
Edad	0.000449334	3	0.000149778	0.02	0.9960	
Rotaforesis	0.00115472	1	0.00115472	0.15	0.6979	
Sexo	0.00447169	1	0.00447169	0.60	0.4473	
Raza	0.037969	3	0.0126563	1.70	0.1981	
Origen	0.00036742	1	0.000136742	0.02	0.8936	
Residual	0.156587	21				
Total Corregido	0.271489	30				

Utilizando la prueba de  $\chi^2$  la única variable dependiente de la respuesta o observación virus neutralización post desafío de la Raza de los animales, grupos en los que se logró establecer la infección con la cepa de aislamiento.

Cuadro 4.17.- ANOVA Multifactorial (Análisis de varianza) virus neutralización postdesafío observando las fuentes de variación para determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas diferencia significativas ente ellas. Al igual que en la prueba anterior la única diferencia significativa se estableció en raza grupo de animales donde se logro establecer la infección.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Df	Media Cuadrados	Razón "F"	Significancia de "F" (P-valor)	Observaciones. P-Valor < 0.05 Hay diferencia significativa
Edad	0.00324566	3	0.0018169	0.91	0.4540	
Rotaforesis	0.000408428	1	0.000408428	1.34	0.5645	
Sexo	0.00105151	1	0.0010515	0.88	0.3582	
<b>Raza</b>	<b>0.0201055</b>	<b>3</b>	<b>0.00670183</b>	<b>5.63</b>	<b>0.0054</b>	<b>Significativa.</b>
Origen	0.000162591	1	0.000162591	0.14	0.7155	
Residual	0.02502	21	0.0425634			
Total Corregido	0.0895182	30				

#### 4.3.3.-DISCUSIÓN.

En el tercer experimento se intentó establecer el papel que juega la inmunidad lactogénica, en términos de protección contra una infección homóloga por rotavirus, conferida por la presencia de anticuerpos en la mucosa gástrica. Y en segundo término, apoyar la observación sobre la circulación viral y *estatus* inmune contra la cepa de desafío, en las explotaciones y hatos de origen de los animales empleados en cada uno de los grupos del experimento II

Se seleccionaron las pruebas de virusneutralización, y de ELISA indirecta (IgG), utilizando a la cepa de desafío y los sueros de los animales, previo a la exposición viral y post exposición viral. El ensayo de seroneutralización se elijo como una prueba de detección de anticuerpos séricos heterogéneos, donde participan tantos IgG, IgA como IgM en el caso de ser específicos contra la cepa de desafío. ELISA indirecta (IgG) se seleccionó por la relevancia de esta inmuglobulina en la respuesta inmune mucosal y sistémica, en la inmunidad pasiva calostrual atribuida particularmente a su importancia en poligástricos.

Los resultados de Virusneutralización y de ELISA IgG, correspondientes a los dos orígenes de los animales del experimento, demostraron ser estadísticamente significativos, ya que donde el hato Cuatro Milpas presentó títulos séricos de IgG ( de 0.623 unidades de absorbancia con una desviación estándar de 0.279) y título neutralizante de (0.00036 expresado como factor de dilución y una desviación estándar de 0.001), contrastados con el hato FES-C (Almaráz) el cual presentó títulos séricos de IgG (0.134 unidades absorbancia con una desviación estándar de 0.137) y título neutralizante de (0.060 expresado como factor de dilución y una desviación estándar de 0.11).

En la prueba de  $\chi^2$  una  $p < 0.10$  en donde la respuesta correspondiente al título de ELISA IgG, previo y post desafío demostró ser una observación dependiente del origen del animal. En tanto en el ensayo de virus neutralización expresado como el factor de dilución en únicamente resultó dependientes de la raza del animal postdesafío. Apoyando la observación de circulación viral en el primer hato con el aislamiento de la cepa desafío. Se selecciono a los animales del grupo I, en el hato Cuatro Milpas bajo la hipótesis de ser una población de animales con anticuerpos maternos circulantes específicos, ya que estos animales fueron las crías de aquellos expuestos en el brote inicial donde de aisló la cepa de desafío. En tanto la población del hato FES.-C (Almaráz), sin protección lactogénica específica apoyada en los datos de los trabajos de Guillén, (1998), Ortiz (1996) y el inicio del presente trabajo donde utilizando la técnica de rotaforesis no se logra detectar la circulación de rotavirus. En segundo término el análisis estadístico en virus neutralización reafirma la observación de seroconversión en los animales de raza únicamente postdesafío, lo cual apuntala la observación de no infección en los caprinos criollo y ovinos.

La detección de IgG sérica contra VP6 sugiere que hubo exposición ante la infección sin, ser estos anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes más abundantes en general son generados contra VP4 y en segundo término contra VP7. Los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra estas dos proteínas en los ensayos de virusneutralización, reducción de placas en cultivos celulares y ELISA indican inmunidad protectora (Molyneaux, 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La inmunidad contra rotavirus puede ser adquirida en forma pasiva o activa. Ésta puede ser humoral, mediada por células, protectora o no protectora, homotípica, heterotípica mucosal o sistémica o cualquier combinación. La inmunidad mucosal puede ser protectora en contra de la enfermedad, más no de la infección, mientras que la inmunidad sistémica es un reflejo de la exposición al virus, con importante valor diagnóstico. Pero muy probablemente por ser una infección localizada en la mucosa, sin un papel importante en la protección directa a la misma. ( Molyneaux, 1995; Ward *et al.*, 1990).

En los ungulados, la estructura placentaria no permite el paso de las inmunoglobulinas *in utero*, por lo que los estudios en ovinos, bovinos y cerdos han demostrado la capacidad protectora del calostro con anticuerpos específicos contra rotavirus en diversos desafíos (Molyneaux, 1995). Salmon, (1999) señala que la protección mucosal de los mamíferos neonatos depende de un continuo aporte de IgA dimérica materna ( en monogástricos), y de IgG1 (en rumiantes), sin descartar la importancia de la IgAs en estos últimos. La inmunidad lactogénica (humoral) está directamente relacionada con el vínculo entero-mamario, a través de la translocación de IgA e IgG1 o de la migración de linfoblastos IgA, desde el tejido linfoide asociado al intestino a la glándula mamaria de la madre. Sin descartar el papel de la IgA, dimérica, de la IgG1 en los poligástricos predomina en la mucosa intestinal sobre IgA e IgM (Salmon,1999; Fernández *et al.*, 1998). La protección en estos no correlaciona completamente con el título sérico. En neonatos e infantes las IgG y los anticuerpos neutralizantes pueden ser un reflejo de la protección pasiva conferida por la madre, o de la respuesta ante la exposición viral. Molyneaux (1995), Snodgrass y Wells, (1978), Wells *et al.*, (1978), Schaller *et al.*, (1992), Muñoz *et al.*, (1996), señalan que la protección pasiva conferida por anticuerpos generados por ante el desafío con rotavirus patógenos, tiene una clara relación con la detección de los anticuerpos mediante la técnica de virusneutralización y el desenlace, establecimiento y desarrollo de la infección por rotavirus.

En el Experimento II se observó una morbilidad del 30.77%, distribuida básicamente en los grupos de animales de raza bien definida; Grupo I (hato con circulación viral positiva e inmunidad específica a la cepa de desafío) y Grupo II (hato sin circulación de virus positiva sin evidencias una protección inmune específica). A pesar de existir una diferencia estadística significativa entre los títulos de IgG y los anticuerpos neutralizantes, ambos grupos mostraron susceptibilidad a la infección por la cepa de desafío. En el Grupo II, la morbilidad fue de 5 de los 9 animales desafiados, contra 3 de 9 del Grupo I. Estadísticamente no demostró una diferencia significativa, probablemente debido al tamaño reducido de la muestra, pero debido a las evidencias de circulación viral y evidencias inmunológicas, esta diferencia podría estar basada en la protección pasiva lactogénica mientras que los grupos III criollo caprino y IV criollo ovino no enfermaron, a pesar de mostrar títulos bajos tanto en ELISA (IgG) como en al virusneutralización. De acuerdo con los resultados de los experimentos II y III independientemente del papel protector que el estado de inmunidad pudiera tener citado por Snodgrass y Wells, (1978), Wells, *et al.*, (1978); Van Pinxteren, *et al.*, (1998 y 1999), este no fue tan importante como la susceptibilidad mostrada dependiente de raza, sexo y en tercer lugar de la edad, independientemente de las evidencias inmunológicas. En tercer lugar los títulos séricos en

las pruebas de ELISA (IgG) y de virusneutralización al haber correspondencia entre los dos orígenes, grupos, razas, edad o sexo, no mostraron con respecto a sus lecturas originales, cambios estadísticamente significativos; y es de relevante importancia la observación obtenida en los grupos III y IV. Los resultados observados en estos últimos dos grupos fueron: virusneutralización y ELISA previó al desafío en el grupo III, con un factor de dilución de 0.040 (desviación estándar de 0.042) y 0.182 unidades de absorbancia (desviación estándar 0.083) contrastados con las resultados post desafío con un factor de dilución de 0.800 (desviación estándar 0.17) y 0.080 unidades de absorbancia (desviación estándar de 0.170). En el Grupo IV hubo un factor de dilución de 0.159 (desviación estándar de 0.174) y de 0.019 unidades de absorbancia (desviación estándar 0.019); contrastados con las resultados post desafío correspondiente a un factor de dilución de 0.089 (desviación estándar 0.013) de y 0.089 unidades de absorbancia (con una desviación estándar de 0.013). En ninguno de estos últimos grupos existieron diferencias significativas entre las lecturas previas y post desafío; los animales no sero convirtieron, desarrollaron infección clínica o fue detectado el virus en las heces. Es importante hacer notar que el Grupo III fue desafiado dos veces con inóculo viral infeccioso del mismo abasto viral que demostró ser patógeno en los Grupos I y II independientemente de sus títulos en las pruebas serológicas. Bridger, (1994), Schaller, *et al.*, (1992) Lijuan, *et al.*, (1996) indican que el valor de la seroconversión consiste en que aparentemente, se confirma la relación existente entre el título de anticuerpos y la respuesta a la enfermedad. Ciarlet *et al.*, (1998a), mencionan que ante en la infección por virus heterólogo, en el modelo de conejo, que la habilidad del virus para establecer una infección puede ser monitoreada por la habilidad del mismo para inducir una respuesta de anticuerpos intestinales y séricos. Sin embargo, la calidad de la protección que cada cepa viral induce es diferente y no siempre protectora ante otro desafío por el mismo virus. El hecho de que los Grupos III y IV no seroconvirtieron, aunado a la información de las citas anteriores; son evidencias que indican que el virus no logró establecerse. Apoyando aun más las observaciones del experimento II, en donde parecen tener en este modelo de infección una posición más crítica las condiciones fisiológicas y genéticas propias de cada individuo, contando con las estructuras y condiciones apropiadas para el establecimiento del virus, que la protección inmune homóloga detectada, sin descartar su papel protector en algunos de los animales que no enfermaron en el Grupo I.

Por último las diferencias en las respuestas serológicas en ambas pruebas, entre los animales positivos a la infección y los negativos a la misma, no son estadísticamente significativas la contrastar la mayoría de las variables. Éstas tal vez pueden ser atribuidas en el caso de los Grupos I y II, que muestran evidencias de infección y establecimiento del virus, a la duración de cada experimento, ya que esto no rebasaron los 10 días post inoculación y solo una tercera parte de los animales llegó hasta el término de los mismos. Por lo que los títulos los resultados estadísticamente no significativos obtenidos en seroconversión en las dos pruebas pudieran atribuirse a la corta duración del experimento y a que la mayoría de los animales desafiados se encontraban ante una primo infección. Van Pinxteren *et al.*, (1998) En un estudio sobre la respuesta primaria a rotavirus en corderos gnotobiontes de 6 días de nacidos, detectan la presencia de IgA en suero y secreciones nasales específicas a rotavirus, a los 7 días post desafío, y de IgG a los 10 días postdesafío. Presentan evidencias que se dirigen hacia la activación de una respuesta Th2 mediada por la expresión de IL-4, para lograr la eliminación viral, en la Placas de Peyer de yeyunales a los tres días post desafío. Donde se podría estar induciendo el cambio en la

síntesis de IgM a IgA o IgG. Van Pinxteren *et al.*, (1999), nuevamente en corderos gnotobiontes con vacunación oral y desafiados con rotavirus de una semana de edad reporta la presencia de IgA sérica, a los 7 días post vacunación e IgG a los 11 días; y la capacidad de una síntesis rápida de IgG de memoria, a los 4 días postdesafío con rotavirus. Dado que la población utilizada en el experimento presente son animales convencionales, calostrados, y en el caso del Grupo I con evidencias inmunológicas de circulación viral homóloga en el hato. La baja respuesta a la seroconversión puede atribuirse en primer lugar a la duración del experimento, en segundo lugar a cierta inespecificidad de la ELISA indirecta establecida con sobrenadante crudo de cultivos celulares infectados con la cepa de campo VanPinxteren *et al.*, (1998 y 1999) utilizan una ELISA de Sándwich, en la cual fijan primero un anticuerpo de captura conejo antirotavirus, en segundo término el sobrenadante de cultivo celular MA-104 infectado para detectar la unión del anticuerpo específico del suero de cordero y finalmente revelar con un suero antiovino unido a peroxidasa de rábano. Ésta técnica de ELISA de mayor sensibilidad que la ELISA indirecta utilizada en el experimento III. En tercer lugar durante la estandarización de la técnica de ELISA, ésta mostró inicialmente poca repetibilidad en sus lecturas y no se logró estandarizar la prueba hasta que tratar los sueros con rivanol, buscando la precipitación de las Inmunoglobulinas de clase M. Probablemente en los animales del Grupo I los anticuerpos detectados sean de origen materno en la mayoría; de los animales, unos pocos animales de este Grupo sin significado estadístico, sí seroconvierten en ambas pruebas. Debido al corto periodo entre el desafío y la eutanasia de los animales, esta probablemente fue una respuesta de memoria debido a la circulación viral en el hato de origen. En tanto el Grupo II seroconvirtió pero esta parece ser una primo infección, donde parece participar también la IgM y es a la probable participación de estas inmuglobilunas lo que no se logró estandarizar, en el ensayo de ELISA hasta que éstas fueron eliminadas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.4.- EXPERIMENTO IV INFECCIÓN EN OVINOS INOCULADOS CON UNA CEPA DE ROTAVIRUS AISLADA DE CAPRINOS.

4.4.1. El Experimento IV se basó en intentar establecer un modelo de infección en ovinos por la cepa aislada de caprinos. Se inocularon 4 ovinos de 8 semanas de edad y un animal control negativo; con la misma cepa aislada de caprinos, bajo las mismas condiciones experimentales que los Grupos I y II, de los cuales ningún ovino enfermó o mostró evidencias de seroconversión Cuadro 4.18.

Cuadro 4.18.- Cronología de la observación clínica (diarrea), diagnóstico por la prueba de rotaforesis y eutanasia del Grupo IV.

	DIAS	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rotaforesis
		*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
									N		N	
<b>Grupo IV</b>	Número											
8 semanas	1B	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 semanas	2B	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 semanas	3B	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 semanas	4B	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 semanas	5B Inóculo SSF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*Indica día de inoculación; \*\* Indica días postinóculo;- Indica negativo presentación de diarrea;-- Inóculo SFF n los animales control 10 ml Solución Salina Fisiológica estéril; N, Necropsia

Esta constante fisiológica se utilizó como monitor del estado de salud general de los animales, dado que para los presentes experimentos se utilizaron animales convencionales. La temperatura se mantuvo en un rango normal, de acuerdo con la temperatura rectal normal en ovinos 39 °C +/- 0.4°C (Blood, 1996).

Cuadro 4.19.-Media de temperatura rectal por animal desde su recepción hasta el término del experimento

GRUPO IV	Edad	Media de Temperatura animales negativos a la Enfermedad °C.	Media de Temperatura animales positivos a la Enfermedad °C.
1B	8semanas	38.5	
2B	8semanas	38.4	
3B	8semanas	38.6	
4B	8semanas	38.6	
5B Inóculo SSF	-	38.6	

#### 4.4.2.- DISCUSIÓN.

El experimento se planteó sobre la base de la alta convivencia de ambas especies en nuestro país y a la posibilidad de circulación interespecies de algunas cepas de rotavirus. Shen, Bruke y Desselberger, (1993) determinaron la presencia del serotipo G10 definido como característico de los aislamientos de bovinos y ovinos, en cepas aisladas de humanos en China y citan hallazgos similares en la India, sugiriendo la circulación viral interespecie. Fritzgerald *et al.*, (1995) utilizando la serotipificación con monoclonales para determinar los tipo P y G de aislamientos ovinos del Grupo B y el ensayo de hibridación y secuenciación genómica, encuentra una gran semejanza entre los aislamientos de ovinos y bovinos, sugiriendo un intercambio de virus entre ambas especies favorecida por su alta convivencia. Pratelli *et al.*, (1999), utilizando el ensayo de PCR para los serotipos G y P, caracterizaron una serie de aislamientos de caprinos y búfalos, encontraron que la mayoría de ellos fueron similares a los aislamientos de ganado bovino.

El resultado negativo a la infección en los ovinos puede, estar relacionado con factores asociados al hospedero; basados en las evidencias de infección y resistencia a la infección en los tres grupos de caprinos, donde parece jugar un papel más importante, la raza, el sexo, edad, que el estado inmunológico, en la susceptibilidad a la cepa viral. Por otro lado Ciarlet *et al.*, (1998b) indicaron que se han hecho intentos por establecer los factores de virulencia que determinan el rango de hospederos susceptibles; la mayor parte de los esfuerzos han sido dirigido a los genes 4 (VP4) y 5 (NSP1); esto debido a que sus características genéticas y antigénicas permiten agrupar por especie de origen a diversas cepas, sugiriendo tener un papel en la restricción en el rango de hospederos susceptibles.

El desafío no productivo de estos animales también pudiera estar relacionado a la incapacidad de esta cepa en particular, para establecer una infección interespecie. Ciarlet *et al.*, (1998b) señalaron algunas de las evidencias que les ha permitido determinar el uso de los modelos animales como el ratón o el conejo con los rotavirus humanos, sin embargo, no replican eficientemente en ninguno estos, no se observa signos clínicos de la enfermedad, solo cepas aisladas de la especie homóloga a la del desafío, replica eficientemente y se disemina horizontalmente el virus, (no así los aislados de otras especies). Gouvea y Brantly (1995) Los rotavirus en general parecen existir y ser transmitidos constantemente de un hospedero a otro de la misma o de diferente especie. Esta población mixta de rotavirus o *quasi especie* esta sujeta a la selección natural impuesta por el medio ambiente y por el hospedero que infecta, resultando en nuevas y diversas progenies. Esta interacción se propone que es una selección Darwiniana positiva, la cual explica la rápida evolución de estos virus y su diversidad, mostrando un comportamiento semejante al descrito para el virus de la Influenza. Lo antes citado, por una lado apoya la observación de circulación interespecies, demostrada por la replicación de cuadro clínico, con rotavirus humanos en los cerdos y becerros gnotobiontes, o la protección heteróloga conferida por las vacunas con virus de origen bovino y simio en humanos (Desselberger y Gray, 2000; Woode *et al.*, 1978). Por lo que la observación en ovinos pudo haber sido positiva. Sin embargo, también señala una presión de selección sobre las diferentes cepas virales, expresándose como una diversidad genética, por lo cual no se puede esperar que todas las cepas tengan las mismas

características de infectividad y rango de hospederos susceptible. El presente experimento podría ser repetido con un mayor número de animales, subdivididos por edades y tomando en cuenta factores como raza, origen y estado inmunológico, similar a los grupos I, II y III, para descartar completamente la capacidad de virulencia y patogenicidad en ovinos de la cepa aislada de caprinos.

## 5.-CONCLUSIONES

La descripción de un brote natural de rotavirus en caprinos, seguido de su aislamiento, manejo "*in vitro*" y establecimiento del cuadro clínico característico, después de la tinoculación con la cepa aislada y reaislamiento de la misma, cumple con los postulados de Koch; de acuerdo con la presentación clínica en 8 de 26 caprinos desafiados, como agente causal del cuadro clínico. El utilizar un modelo de infección con animales homólogos, con el aislamiento, demostró ser útil para establecer el papel de esta cepa, como agente patógeno y virulento en esta especie doméstica. Las observaciones apesar del reducido grupo de animales desafiados en el presente trabajo, apoyan la observación de la dependencia de múltiples factores, tanto por parte del cada virus en particular, como de su hospedador y la interacción de estos con el medio ambiente. Factores como la raza, edad o aquellos factores que definen el fenotipo y estado fisiológico de los individuos, pueden tener un papel tan importante, como la variación y expresión genética de la virulencia de rotavirus, en cada caso en particular. En el presente trabajo parecieron tener efecto más importante los antes mencionados, que el estado de inmunidad homóloga a la cepa de desafío. La respuesta inmune a rotavirus es compleja, donde están involucrados factores humorales, celulares, mucosales y sistémicos y su correlación con la protección, en especial a nivel de inmunidad pasiva materna, a pesar de que en diversos modelos animales y mediante pruebas vacunales en humanos, se ha demostrado la eficiencia de la misma. Sin embargo, en el presente trabajo ésta no pareció ser suficiente para proteger a los animales desafiados.

Es básica la utilización de los modelos animales para entender el elusivo comportamiento epidemiológico de los rotavirus, ya que los modelo *in vitro* en cultivos celulares como el de la MA-104 permiten la replicación viral, ésta no representa la interacción real del virus y la células susceptibles *in vivo*. Los resultados de trabajos recientes donde se observa la inducción de algunas citocinas en cultivos infectados, lleva a buscar modelos donde la expresión real de estas y su consecuencia en la coordinación de la respuesta inmune puedan ser evaluadas. El modelo de infección en caprinos del presente trabajo demostró ser efectivo; sin embargo, para extraer mayor información del mismo, en un futuro se debe tomar en cuenta tiempos más largos postdesafío para una mejor observación del desarrollo de la patogenia en el animal. Con las mismas consideraciones para la evaluación de la respuesta inmune del animal. La utilización de animales convencionales en el presente modelo animal, a pesar de permitir el desarrollo del desafío aportó a una gran cantidad de variables en las observaciones post desafío. Por lo que se podrían considerar animales gnotobiontes o al menos criados en un ambiente sanitario más controlado desde antes de su nacimiento, o grupos de animales calostrados y no calostrados, con la finalidad de obtener observaciones más controladas. Los rotavirus en general muestran un alto grado de diversidad, con la cocirculación de cepas en humanos y animales. Hasta la fecha se han desarrollado técnicas de serotipificación, identificación viral, diagnósticos y de biología molecular, que, son el prerequisite para un entendimiento epidemiológico detallado de este grupo viral. Sin embargo, se requieren de más estudios en modelos animales, para entender los factores involucrados en la patogenicidad de los rotavirus, su impacto en la producción y salud animal, en general, y en particular de las especies poco estudiadas como en el caso de los caprinos.

## APÉNDICE I

### Medios, Soluciones y Técnicas.

#### Soluciones Generales.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, (1989).

#### Solución salina fisiológica

Cloruro de sodio	MERCK	0.9g
Agua destilada estéril cbp		100ml

#### Hidróxido de Sodio 1N

Hidróxido de Sodio	J.T.Baker	4.0g
Agua destilada cbp		100ml

#### Extracción de ARN Viral

Manual de Rotavirus INDRE (García *et al.*, 1996).

#### Solución "A" (Solución de lisis) 5X.

Disolver en agua bidestilada estéril.		20 ml
Trisma BASE	SIGMA	1.64g
EDTA(Etil diamino tetraacetato)	MERCK	1.40g
SDS (Duodecil Sulfato de Sodio)	SIGMA	0.65g
NaCl	SIGMA	2.0 g

#### Agregar

Mercaptoetanol	Bio-Rad	0.65ml
----------------	---------	--------

#### Aforar

Agua bidestilada estéril a		50 ml
----------------------------	--	-------

#### Solución "B" (Solución saturada de fenol) 1X.

Fenol ultra puro	MERCK	120 g
8-Hidroxiquinoleina	MERCK	0.12g

#### Disolver en

-Tris base 1 molar pH 8.1		100 ml
---------------------------	--	--------

-Mantener en agitación 24 hrs.

-Dejar separar la fase fenólica de la fase acuosa y cambiar el Tris EDTA pH 8.1

-Dos veces más. Con intervalos cada uno de 24hrs y retirar al final la fase acuosa.

-Agregar a la fase fenólica.

-Tris base pH 7.0		100ml
-------------------	--	-------

-Agitar durante 24hrs y cambiar durante esas 24hrs hasta ajustar en La Fase acuosa un pH entre 7.5 y 7.8

#### Solución "C"

Cloroformo	J.T.Baker Comercial	
------------	---------------------	--

- A) Colocar 2g de heces sólidas en 300 µl de sol salina fisiológica y mezclar en el Vortex. Centrifugar 3000 – 5000 rpm (15 min.).
- B) Separar el sobrenadante y guardarlo en un tubo hasta ser utilizado a –20°C.  
Colocar en un tubo Eppendorf 300 µl de la muestra líquida de heces diarreicas o el sobrenadante del paso anterior y añadir 300µl de la solución “A”. colocar en el Vortex hasta obtener una solución lechosa homogénea.
- C) Agregar en el tubo Eppendorf anterior 300 µl de la Solución “B” y mezclar en el Vortex.
- D) Agregar en el tubo Eppendorf anterior 300 µl de la Solución “C” y mezclar en el Vortex.
- E) Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos.
- F) Una vez separadas la fase acuosa (superficie) de la fase fenólica (fondo). Se separa con micropipeta y sin mezclar la fase fenólica y se coloca en otro tubo Eppendorf la fase acuosa donde de localizara el ARN viral de estar presente el virus en la muestra original.  
Mantener a – 4°C hasta ser utilizados.

### Gel de poliácrilamida, Corrimiento electroforético (PAGE).

Manual de Rotavirus INDRE (García *et al.*, 1996).

Suspensión de Acrilamida 30%, Bis Acrilamiada 0.8%.

Acrilamida	SIGMA	30.0g
Bis-acrilamida	SIGMA	0.8g
Agua desionizada cbp		100 ml

Persulfato de amonio al 1%.

Persulfato de amonio	Bio-Rad	0.1g
Agua desionizada cbp.		1.0ml

TEMED

SIGMA Comercial.

Tris abajo( Regulador Tris 0.5 M pH 6.8)

Trizma base	Bio-Rad	6.05g
Agua desionizada cbp		100ml
Ajustar el pH 6.8 con HCl 3 N.		

Glicerol- Azul Bromofenol ( Marcador de Corrimiento)

Tris HCl pH 6.8	Bio-Rad	2.5 ml
Glicerol	SIGMA	5.8 ml
Azul de Bromofenol	Bio-Rad	5.0mg
Agua desionizada cbp.		50.0 ml

Solución “D” (Buffer de glicina de Corrimiento).10x

Tris base	Bio-Rad	12 g
Glicina	Bio-Rad	57.6g

Agua bidestilada estéril cbp

500ml.

Solución "D" (Buffer de glicina de Corrimiento) 1X

Solución "D" (Buffer de glicina de Corrimiento) 10X

25 ml

Agua destilada estéril cbp.

250ml

### 5.1. Cuadro. Preparación de Gel de poliacrilamida.

Reactivos.	gel (PAGE) al 5%	gel (PAGE) al 10 %
Sol acrilamida-bisacrilamida	1.32 ml	2.64 ml
Buffer Tris abajo.	2ml	2ml
Agua destilada estéril	4.6 ml	2.32ml
Persulfato de amonio al 2%	0.5 ml	0.5 ml
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

- A) Lavar los dos vidrios con extrán y secar perfectamente. Colocar los separadores de teflón y el peine entre los vidrios.
- B) Colocar los vidrios con separadores en el soporte de la cámara de electroforesis.
- C) Llenar la cámara con la suspensión de Bis- acrilamida y colocar el peine separador para formar pozos antes de la solidificación de la suspensión de acrilamida.
- D) Esperar a que polimerice.
- E) Retirar el peine separador para formar pozos.
- F) Secar cada uno de los pozos con pequeños cortes de papel filtro.
- G) Tomar del tubo Eppendorf donde se conservo el extracto de ARN viral 100ml.
- H) Mezclarlo con 100 ml de Glicerol-Azul de Bromofenol ( Marcador de corrimiento) en otro tubo Eppendorf
- I) Se coloca 70  $\mu$ l de esta mezcál cada pozo sin contaminar los pozos anexos.
- J) En el primer pozo del gel (PAGE) se coloca una muestra de extracto viral positivo de Rotavirus que funciona como control positivo.
- K) Una vez colocadas todas las muestras del gel (PAGE).
- L) Se coloca el gel (PAGE) dentro de la cámara de electroforesis en una solución "D" 1 x, cubriendo los geles (PAGE).
- M) Se conecta a la cámara a la fuente de alto poder a 55 volts durante 20 minutos permitiendo que las muestras sean introducidas al Gel. Y se mantiene en una bandeja con refrigerantes periféricos para mantener baja la temperatura del buffer de corrimiento. Cambiar el voltaje a 110 volts y dejar correr por 2hrs. Sí el Gel al 5%, 8hrs. Si es un Gel al 10 %.

### Fijación y Tinción del Gel.

Manual de Rotavirus INDRE (García *et al.*, 1996).

Solución (Solución Fijadora) "E" 10 X.

Ácido acético	MERCK	3ml
Etanol	MERCK	287ml

Solución "F" (Tinción) 100X

Nitrato de plata	J.I. Baker	0.916g
Disolver en 5 ml de agua bidestilada estéril.		

Solución "G" (Reveladora)

Formaldehído al 38 %	MERCK	0.4ml
Hidróxido de Sodio ( NaOH) al 3%	MERCK	50ml

Solución "H" (Paro) 1X

Ácido acético glacial 1 %		
Ácido Acético glacial		0.5ml
Agua destilada estéril		50ml

- Retirar el gel de los vidrios y hacer un corte pequeño en el extremo inferior del primer carril.
- Fijación de ARN viral en el gel. Colocar el gel en la solución "E" durante 30 minutos (diluir 5mL de solución "E" 10 X en 50 ml de agua destilada estéril).
- Retirar la solución Anterior y adicionar la Solución "F" durante 30 minutos.
- Retirar la solución "F".
- Lavar 2 veces con agua destilada rápidamente.
- Retirar el agua.
- Colocar 50 ml de la solución "G". Hasta lograr visualizar las el corrimiento electroforético característico de 11 bandas de la muestra control positivo.
- Retirar la solución anterior y parar la reacción con una solución "H" de ácido acético glacial al 1%.
- Mantener al gel en la solución anterior para su conservación.

### Aislamiento viral.

De acuerdo a Urasawa *et al.*, (1981) y Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, (1989).

Solución salina balanceada fría de sales de HANKS 1X

Sales de HANKS	SIGMA	9.518g
Bicarbonato de sodio 7.5%	INVITRO	4.7ml
Agua desionizada estéril cbp		1 lt

Ajustar pH a 7.4 +/- 0.3 con HCl 1N o NaOH 1N

Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm.

Medio Mínimo Esencial (MEM) en sales de Earl 1X.	SIGMA	9.6g
--	-------	------

Agua desionizada estéril cbp		1 lt
Solución de Bicarbonato de sodio 7.5%	INVITRO	Comercial
Suero Fetal Bovino. Inactivado a 56°C/ 30 min	INVITRO	Comercial
Solución Penicilina /Estreptomicina (100,000 UI/100,000µg/ml)		
Penicilina	Lakeside	1,000,000 UI
Estreptomicina	Lakeside	1,000 mg
Agua destilada estéril      cbp		10 ml

Esterilizar por filtración membrana 0.22 µm.  
 Conservar en frasco estéril en congelación a -20 °C hasta su uso.

Solución Buffer de Fosfatos (PBS )"A" 10X.

Cloruro de Sodio (NaCl)	J.T.Baker	80.0g
Cloruro de Potasio (KCl)	J.T. Baker	2.0g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O)	J.T.Baker	11.5g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	J.T Baker	2.0g
Agua destilada cbp		1lt

Solución Verseno al 0.05%

Versenato de sodio (EDTA)	MERCK	1.0g
Solución PBS"A" 10X		200ml
Ajustar pH a 7.6 con NaOH 1N		

Solución de Tripsina/Verseno.

Tripsina 1:250	SIGMA	1ml
Solución Verseno al 0.05%		0.5ml
Solución PBS"A" 10X.		5ml
Agua destilada estéril      cbp		50ml
Ajustar pH con NaOH 1N		7.6
Esterilizar por filtración membrana de 0.22µm		
Mantener en congelación hasta su uso.		

MEM 1X. Medio de Cultivo MEM 1X, sin de suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, ajustada a con la solución bicarbonato de sodio 7% a un pH 7+/- 4 con el indicador de rojo de fenol del medio.

Solución de tripsina 10 µg/ml para activación de la infección viral.

Tripsina porcina 1:250	SIGMA	100µg
Agua destilada estéril cbp		10ml
Ajustar pH		7.6
Esterilizar por filtración en membrana 0.22µm		

Mantener en congelación  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Pretratamiento de heces para aislamiento viral**

De acuerdo con el Manual de Diagnóstico de Infecciones Gastrointestinales del INDRE (Giono, Escobar y Valdespino, 1994).

- A) Preparar en el tubo de centrifuga una suspensión al 20 % de heces en solución de balanceadas de sales de HANKS' 1x. 2 g de heces, cpb. de sol. balanceada 1X de sales de HANKS' a 10mL
- B) Agitar en el Vortex hasta obtener una suspensión homogénea.
- C) Centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$ , 3,000 rpm por 10 minutos.
- D) Decantar en otro tubo de policarbonato de 15mL, estéril el sobrenadante.
- E) Centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$ , 5,000 rpm por 30 minutos.
- F) En un campo estéril en campana de flujo vertical con mechero, tomar con la jeringa e estéril en sobrenadante y filtrar por membrana de  $22\ \mu\text{m}$  a otro tubo de policarbonato estéril. Cerrar y rotular.
- G) Mantener en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  ó  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **Cultivo celular.**

De acuerdo a Urasawa *et al.*, (1981) y Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, (1989).

- A) De una botella de cultivo celular en crecimiento con monoestrato arriba del 80% de su Superficie de Células MA-104. Eliminar el medio de cultivo.
- B) Adicionar 1.5 ml de la solución tripsina verseno y dejar actual 20 seg.
- C) Eliminar la solución Tripsina-Verseno por la cara opuesta al monoestrato celular.
- D) Agregar 1 ml de solución tripsina-verseno, dejar reposar durante 3 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .  
Al observarse la capa celular opaca, retirar la Solución de Tripsina-Verseno por la cara opuesta al cultivo celular. Dar un golpe firme a la caja para desprender a las células del fondo de la botella de cultivo.
- E) Inmediatamente agregar 3 ml de Medio MEM sales de Earl al 10% de Suero fetal bovino, 1% de la solución Penicilina/Estreptomina, ajustado con la solución bicarbonato de sodio 7% a un pH  $7\pm .4$  con el indicador de rojo de fenol del medio.  
Para inactivar a la tripsina residual.
- F) Preparar tres botellas para cultivo celular de 25 cc colocar en cada una de ellas un ml de la suspensión celular de la botella previa.
- G) Adicional 9 ml Medio de Cultivo MEM 1X, 10 % de suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomina, ajustada a con la solución bicarbonato de sodio 7% a un pH  $7\pm .4$  con el indicador de rojo de fenol del medio.
- H) Cerrar las botellas rotular con fecha, número de pase, condiciones de medio, incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  en estufa para cultivo celular. Revisar el crecimiento celular cada 24 hrs.
- I) Subcultivar cada 48 a 72hrs dependiendo de la velocidad de crecimiento del Mono estrato celular.

### **Propagación viral.**

De acuerdo a Urasawa *et al*, (1981) y Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, (1989).

Se utilizaran básicamente los mismos materiales del Cultivo celular.

Botellas de cultivo celular con un monoestrato confluyente al 80% de células MA-104.

Tubos de ensayo de 10 ml con tapa rosca, estériles.

Filtrado del pretratamiento de heces positivas a rotavirus.

- A) Colocar en un tubo de ensayo estéril 1.8 ml del filtrado del pretratamiento de heces positivo a Rotavirus.
- B) Colocar en un tubo de ensayo estéril 1.8 ml del filtrado del pretratamiento de heces negativo a Rotavirus.
- C) Adicionar a cada uno 0.2 ml de la solución de tripsina 10 µg/ml.
- D) Mezclar y dejar incubar a 37°C durante 2hrs.
- E) Dos botellas de cultivo celular de 25 con un monoestrato al 80%, son lavadas 2 veces con Medio MEM en sales de Earl, al 1% de la solución de penicilina/estreptomicina, sin suero fetal bovino a 37°C.
- F) Utilizando una botella para la muestra positiva y otro para la negativa, se adiciona 2 ml de los tubos de ensayo antes mencionados.
- G) Agregar 2 ml de Medio MEM en sales de Earl, al 1% de la solución de penicilina/estreptomicina, sin suero fetal bovino a 37°C. Incubar a 37°C durante 2hrs. Observar a las dos el monoestrato para asegurarse de no estar contaminado o afectado por la solución de tripsina.
- H) Agregar 3 ml de Medio MEM en sales de Earl, al 1% de la solución de penicilina/estreptomicina, sin suero fetal bovino a 37°C y ajustar con la solución de tripsina a 5µg/ml del volumen final de 7 ml
- I) Incubar durante 24 hrs. a 37°C.
- J) Observar cada 24 hrs. En busca de efecto citopático.
- K) Incubar un máximo de 5 días ajustar cada tercer día con la solución de tripsina a 5 µg/ml.
- L) Al quinto día cosechar.
- M) Congelar y descongelar tres veces la caja de cultivo celular con o sin efecto citopático.
- N) Colectar en un tubo para centrifuga estéril el contenido de las cajas. Centrifugar en centrifuga refrigerada a 10°C a 3,000 rpm/ 15 min.
- Ñ) El sobrenadante colectarlo en un tubo de ensayo estéril. 2ml someterlos al ciclo anterior para continuar el abasto viral. 0.5ml e un tubo Eppendorf par ser utilizado en la Rotaforesis y el resto guardarlo para formar el abasto viral( 450ml).

### **Titulación viral.**

Adaptado de Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, (1989).

- A) Colocar en un tubo de ensayo estéril 1.8 ml del filtrado del pretratamiento de heces positivo a Rotavirus.
- B) Colocar en un tubo de ensayo estéril 1.8 ml del filtrado del pretratamiento de heces negativo a Rotavirus.
- C) Adicionar a cada uno 0.2 ml de la solución de tripsina 10 µg/ml.
- D) Mezclar y dejar incubar a 37°C durante 2hrs.

- E) Vaciar el medio de cultivo MEM 1X., con suero fetal bovino al 10%, de las microplacas de cultivo celular. Lavar dos veces con MEM 1X sin suero fetal bovino. Los pozos de la microplaca.
- F) Colocar en esterilidad cambiando en cada tratamiento la punta de la pipeta, los 150  $\mu$ l contenidos en las diluciones previamente establecidas en su pozo correspondiente a manera de repetición fiel de la ubicación de cada dilución en la microplaca correspondiente al cultivo celular. Utilizar el pozo A1, sin virus y el pozo A2 con virus sin suero como controles de la morfología celular en infección y sin la misma.
- G) Incubar a 37°C, hacer observaciones buscando el punto de corte en la presentación del efecto citopático, a las 24, 48, y 72hrs post infección. Hasta obtener un efecto lítico una dilución de  $10^{-8}$  unidades virales.
- H) Monitorear abasto viral por rotaforesis. (Rosen, 1994).

### Pretratamiento de heces para desafío en caprinos.

Adaptado de Snodgrass y Wells, (1978).

Abasto viral, sobrenadante de cultivo celular infectado rotavirus caprino.

Suspensión infectante de rotavirus activada.

Abasto viral con $10^8$ /ml partículas infectantes de rotavirus caprino	9ml
Solución de tripsina 10 $\mu$ g/ml.	1ml
Incubar 2 hrs a 37°C.	

### Seroneutralización.

Adaptado de Ward *et al.*, (1990).

MEM 1X. Medio de Cultivo MEM 1X, sin de suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, ajustada a con la solución bicarbonato de sodio 7% a un pH 7+/- .4 con el indicador de rojo de fenol del medio.

Sueros problema, descomplementarizados a 56°C/ 30 min y filtrados por membrana de 0.22 $\mu$ m .

Abasto viral, sobrenadante de cultivo celular infectado con una titulación de 10<sup>8</sup>/ml partículas de rotavirus caprino

MEM 1X. Medio de Cultivo MEM 1X, sin de suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, ajustada a con la solución bicarbonato de sodio 7% a un pH 7+/- .4 con el indicador de rojo de fenol del medio.

Sueros problema, descomplementarizados a 56°C/ 30 min y filtrados por membrana de 0.22 $\mu$ m .

Abasto viral, sobrenadante de cultivo celular infectado con una titulación de 10<sup>8</sup>/ml partículas de rotavirus caprino.

- A) Colocar en cada pozo una microplaca sin cultivo celular 25µl del abasto viral ya incubado con tripsina por dos horas para activar la infección viral.
- B) En el primer pozo de cada columna colocar 25µl de suero problema descomplementarizado, mezclar y hacer diluciones dobles hasta terminar la columna. Incubar durante 1hr a 37°C.
- C) Vaciar el medio de cultivo MEM 1X, con suero fetal bovino al 10%, de las microplacas de cultivo celular. Lavar dos veces con MEM 1X sin suero fetal bovino los pozos de la microplaca.
- D) Colocar en esterilidad cambiando en cada tratamiento la punta de la pipeta, los 50 µl contenidos en las diluciones previamente establecidas en su pozo correspondiente a manera de repetición fiel de la ubicación de cada dilución en la microplaca correspondiente al cultivo celular. Utilizar el pozo A1, sin virus y el pozo A2 con virus sin suero como controles de la morfología celular en infección y sin la misma.
- E) Incubar a 37°C, durante 2 hrs hacer observaciones buscando el punto de corte en la presentación.
- F) Completar a 100 ml de medio MEM 1x sin suero fetal bovino por placa del efecto citopático, a las 24, 48, y 72hrs post infección. Registrar lectura.

#### ELISA indirecta.

Adaptado de Ternyinc y Avrameas, (1989)

#### Solución Buffer de Fosfatos (PBS) "A" 1X.

Cloruro de Sodio (NaCl)	J.T.Baker	8.0g
Cloruro de Potasio (KCl)	J.T.Baker	0.2g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O)	J.T.Baker	2.9g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	J.T.Baker	0.2g
Agua destilada cbp		1 lt

#### Solución lavado, Buffer de fosfatos PBS "A" 1X/ Tween 20 (0.05%)

Solución de PBS 1X		500ml
Tween 20	SIGMA	250µl

#### Solución de Carbonatos.

Carbonato de sodio	J.T.Baker	1.59g
Bicarbonato de sodio	J.T.Baker	2.93g
Agua destilada estéril cbp		1lt

#### Solución de Bloqueo Gelatina 1%

Gelatina grado biología molecular Bio-Rad		0.1gr
PBS 1X a 50°C (para permitir la fusión de la gelatina)		10ml

### Solución reguladora de Citratos

Ácido cítrico 0.1M		24.3ml
Ácido cítrico	J. T. Baker	2.10g
Agua destilada cbp		100ml
Fosfato Dibásico 0.2M		25.7ml
Fosfatodibásico de sodio	J. T. Baker	5.36g
Agua destilada cbp		100ml

### Solución Desarrolladora de color

Solución reguladora de citratos		10ml
OPD	Bio-Rad	5mg
Peróxido de hidrógeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SIGMA	10µl

### Solución de Paro

Ácido ortofosfórico	MERCK	0.6ml
Agua destilada cbp		10ml

### Antígeno viral pretratado.

Dilución rotavirus Abasto viral 10<sup>8</sup>/ml pretratado con tripsina. Congelar y descongelar 4 veces en tanque de nitrógeno.  
Dilución 10<sup>-4</sup> en PBS 1 X.

### Antígeno viral sin pretratamiento.

Dilución rotavirus Abasto viral 10<sup>8</sup>/ml pretratado con tripsina. Congelar y descongelar 4 veces en tanque de nitrógeno.  
Dilución 10<sup>-4</sup> en PBS 1 X.

### Antígeno Control de cultivo celular no infectado.

Dilución del sobrenadante de cultivo celular tratado en forma similar a la cosechade abasto viral (ver Aislamiento viral). Congelar y descongelar 4 veces en tanque de nitrógeno.  
Dilución 10<sup>-4</sup> en PBS 1 X.

Conjugado conejo antiFc de IgG caprina peroxidada Marca SIGMA, Lote 96h4846.  
diluido 1:5,000.

Pastilla liofilizada de antiFc de IgG	SIGMA	
Agua desionizada estéril		0.5ml

Alicuotar en viales de 10 µl

Diluir 1:5000

Alicuota

2µl

Agua destilada estéril

10ml

Conservar en congelación - 70°C hasta su uso.

Sueros Problema diluidos 10<sup>-40</sup> sin tratamiento con rivanol.

Sueros problema. Diluidos el solución PBS estéril 1X. 10<sup>-40</sup>.

Congelar a -20°C hasta su uso.

Sueros Problema diluidos 10<sup>-40</sup> tratados con ribanol.

Sueros problema

500µl

Suspensión de ribanol al %

500µl

Incubar 30 min a temperatura ambiente.

Centrifugar 5 min a 10,000 rpm

Diluir en PBS 1X. Estéril a 10<sup>-40</sup> de la muestra original de suero.

Congelar a -20°C hasta su uso

A) Sensibilizar placas. Colocar en placa de Elisa 100 µl de antígeno con 100 µl de solución de Carbonatos. Cubrir con una plástica y dejar incubar a 4°C/ 24hrs

B) Distribución el la placa de ELISA.

V-T: rotavirus Abasto viral 10<sup>8</sup> /ml pretratado con tripsina, diluido 10<sup>-4</sup>

V-ST: rotavirus Abasto viral 10<sup>8</sup> /ml sin pretratamiento con tripsina, diluido 10<sup>-4</sup>

CC: Antígeno Control de cultivo celular no infectado.

Control : Indica que elemento del protocolo descrito no se debe incluir en el mismo.

Cuadro 5.2. Distribución de muestras (sueros problema) y antígenos y controles negativos en placa de 96 pozos para ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<b>CONTROL</b>											
A	SIN/VIRUS TRATADO	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-T
B	SIN VIRUS SIN TRATAR	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-S	V-S
C	SIN CULTIVO CELULAR	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	CC	CC
D	SIN BLOQUEO	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-T
E	SIN CONJUGADO	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-S	V-S
F	SIN OPD	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	CC	CC
G	SUERO NEGATIVO	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	
H	SUERO POSITIVO	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-T	V-ST	CC	V-S	CC

C) Lavar llenando cada pozo :

Retirar el contenido de los pozos.

Solución PBS-Tween 0.05% , dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.

Solución PBS, dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.

D) Secar los pozos .

- E) Bloqueo. Colocar en cada pozo 150 µl de solución de Gelatina al 1% a temperatura ambiente y 150 µl de solución de carbonatos. Incubar 4°C/ 24hrs.
- F) Lavar llenando cada pozo:  
Retirar el contenido de los pozos.  
Solución PBS-Tween 0.05% , dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Solución PBS 1X, dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Agua destilada, dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Secar los pozos y refrigerara hasta su uso.
- G) Colocar 100µl de cada suero diluido 10-40 Tratado con rivanol y sin tratar con rivanol para los pozos V-T, V-ST, CC, para cada suero con los dos diferentes tratamientos.  
Incubar 1 hr a 37°C en cámara húmeda.
- H) Lavar llenando cada pozo:  
Retirar el contenido de los pozos.  
Solución PBS-Tween 0.05% , dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Solución PBS 1X, dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Agua destilada, dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Retirar el contenido de los pozos.
- I) Colocar 100 µl del conjugado peroxidado, incubar 45min/ 37°C en cámara húmeda.  
Lavar llenando cada pozo:  
Retirar el contenido de los pozos.  
Solución PBS-Tween 0.05% , dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Solución PBS 1X, dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Agua destilada, dos lavados con intervalos de reposo de 5 minutos.  
Retirar el contenido de los pozos.
- J) Colocar 100µl de solución desarrolladora de color en cada pozo. Incubar durante 15 min en obscuridad.
- K) Agregar a cada pozo 100 ml de solución de paro.
- L) Colocar la placa en el lector de ELISA.  
Iniciar el Software Ascent scan programada  
600 rpm de agitación.  
Lectura a 492 nm de longitud de onda.  
Imprimir lectura.

### Histopatología.

De acuerdo a Desselberger y Gray, (2000).

Solución de formalina amortiguada al 10%

Formaldehido 37-40%	MERCK	100ml
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HP <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O)	J.T.Baker	6.5g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	J.T.Baker	4.0g
Agua destilada.		900ml

## BIBLIOGRAFÍA.

Arias CF, Romero P, Alvarez V & López S. 1996. Trypsin Activation Pathway of Rotavirus Infectivity. *J. Virol.*;70:9: 5832-5839.

Ayanegui AMA, Tórtora PJJ, Valdivia AG, Martínez RHA y Alba HF. 1997. Diagnóstico de rotavirus en caprino por PAGE. Reunión anual, INIFAP-UNAM, Veracruz.:pp.

August JR. 1993. Consultas en Medicina Interna Felina. Argentina. Editorial Intermédica S.A.I.C.I., pp213.

Ball JM, Tian P, ZengCQ, Morris AP & Estes MK. 1996. Age dependente diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 272:101-104.

Barardi CRM, Emslie KR, Vesey G & Williams KL. 1998. Development of rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. *VIRMET.* 74:31-38

Berrios EP, Nuñez SF, Zeledón VMO, Fiegehen CP y Santibáñez ZMC. 1988. Detección de rotavirus en caprinos de San José de Maipo, Región Metropolitana de Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias* 3:98-101.

Bishop RF. 1993. Development of candidate rotavirus vaccine. *Vaccine.* 11(2):247-254.

Blood DC, Henderson JA & Radostits OM. 1986. *Medicina Veterinaria* 6ta.ed. México, Nueva Editorial Interamericana S.A.de C.V 24, 324.

Bridger JC & Oldham G. 1987. A virulent Rotavirus Infections Protect Calves from Disease with and without Inducing High Levels of Neutralizing Antibody. *J.Gen.Virol.*68:2311-2317.

Bridger JC, Hall GA & Parsons KR. 1992. A study of the basis of virulence variation of bovine rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 33: 169-174.

Bridger JC. 1994; A definition of bovine rotavirus virulence. *J.Gen. Virol.* 75:2807-2812.

a)Bridger JC, Tauscher GI & Desselberger U. 1998. Viral Determinants of Rotavirus Pathogenicity in Pigs: Evidence That The Fourth gene of Porcine rotavirus confers in Homologus Host. *J.Virol.* 77(8):6929-6931.

b)Bridger JC, Dhaliwal W, Adamson MJV & Howard CR. 1998. Determinants of Rotavirus Host Range- A Heterologus Bovine NSPI Gene Does Not Affect Replication Kinetics in the Pig. *Virology.* 245: 47-52.

Brown KA & Offit PA. 1998. Rotavirus-specific proteins are detected in murine macrophages in both intestinal and extraintestinal lymphoid tissues. *Microbial Pathogenesis* 24:327-331.

Brown KA, Kriss JA, Moser Ca, Wenner WJ & Offit PA. 2000. Circulating Rotavirus-Specific Antibody-Secreting Cells (ASCs) Predict the Presence of Rotavirus-Specific ASCs in the Human Small Intestinal "*lamina propria*". J.Infect.Dis., 182 : 1039-1043.

Browning GF, Chalmers RM, Sale CSH, Fitzgerald Ta & Snodgrass DR. 1991. Homotypic and heterotypic serum and milk antibody to rotavirus in normal, infected and vaccinated horses. Vet. Microbiol. 27:231-244.

Bruce MG, Campbell C, van Pinxteren L & Snodgrass DR. 1995. Intestinal Cellular Immunity after Primary Rotavirus Infection. J.Comp.Path. 113:155-164.

Bruke B & Desselberger U. 1996. Rotavirus Pathogenicity. Virology 218: 299-305.

a) Ciarlet M, Gilger MA, Barone C, McArthur M, Estes MK & Conner ME. 1998. Development of Intestinal Histopathological Lesion, Is Age Restricted in Rabbits. Virology. Rotavirus Disease, but Not Infection and 251: 343-360.

b) Ciarlet M, Estes MK, Barone C, Raming RF & Conner ME. 1998. Analysis of Host range Restriction Determinants in Rabbit Model: Comparison Of Homologous and Heterologous Rotavirus Infections. J.Virol. 72(3): 2341-2351.

Ciarlet M & Estes MK. 1999. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on cell surface for efficient infectivity. Journal of General Virology 80:943-948.

Cuadras MA, Arias CF & López S. 1997. Rotaviruses Induce an Early Membrane Permeabilization of MA104 Cells and Do Not Require a Low Ca<sup>2+</sup> Concentration to Initiate their Replication Cycle. J.Virol. 71:12:9065-9074.

Cunliffe NA, Woods PA, Leite JPG, Das BK, Ramachandram M, Bhan MJ, Hart CA, Glass RI & Gentsch. 1997. Sequence Analysis of NSP4 Gene of Human Rotavirus allows Classification in Two Main Genetic Groups. J.Med.Virol. 53:41-50.

Cunningham CP, Cahill RNP, Washington EA, Holder JE, Twohig JP & Kimpton WG. 1999. Regulation of T cell homeostasis during fetal and early postnatal life. Vet.Immunol.Immunopathol. 72:175-181.

Chang KO, Nielsen P R., Ward L A & Saif LJ. 1999. Dual Infection of Gnotobiotic Claves with Bovine Strains of Group A and Porcine-Like Group C Rotaviruses Influences Pathogenesis of the group C Rotavirus. J.Virol. 73(11):9284-9293.

a) DaCosta Mendes, V.M., M.C. Deber, Goosend GH & Steele AD. 1994. Isolation and Preliminary Characterization of caprine rotavirus. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 61:291-294.

b) DaCosta Mendes VM, De Beer MC, Goosen GH, Theron J, Els H. & Steele AD. 1994. Rotavirus in Saanen goats. *Journal of the South African Veterinary Association* 65:132-133. Abstrac.

Desselberger, U. & Gray J. 2000 *Rotaviruses, Methods and Protocols*, Humana Press, USA,

Dréau D, Lalles JP, Salmon H & Toullec R. 1995. IgM, IgA, IgG1 and IgG2 specific responses in blood and gut secretion of calves fed soyabean products. *Vet. Immunol. immunopathol.* 47:57-67.

Dodet B, Heseltine E & Saliou P. 1997. Rotaviruses in human and Veterinary medicine. *Trends Microbiol.* 5(5):176-178.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología. Manual de Prácticas del Laboratorio de Virología México (DF): Instituto Politécnico Nacional. 1989

Espejo R, Romero P, Calderón E y González N. 1978. Diagnóstico de rotavirus por electroforesis del RNA viral. *XXV(2)*, 323-330.

a) Estes MK. 1996. Rotaviruses and Their Replication. In B.N.Fields 3<sup>rd</sup> ed. *Virology*, Raven Publisher, Philadelphia, 1625-1655.

b) Estes MK. 1996. Advances in Molecular Biology: Impact on Rotavirus Vaccine Development, *J.Infect. Dis.*, 174 (11): S37-S46.

Fernández FM, Conner ME, Hodgins DC, Parwani PR, Nielsen, Crawford SE, Estes MK & Saif LJ. 1998. Passive Immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrums supplements from cows immunized with recombinant Sa11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine* 16 (5): 507-516.

Fitzpatrick JL, Cripps PJ, Hill AW, Bland PW & Stokes CR. 1992. MHC class II expression in the bovine mammary gland. *Vet Immunol. Immunopathol.* 32:13-23.

Fitzgerald TA, Muñoz M, Wood AR & Snodgrass DR. 1995. Serological and genomic Characterisation of group A rotaviruses from lambs. *Arch. Virol.* 140:1541-1548.

Franco MA & Greenberg HB. 1997. Immunity to Rotavirus in T Cell Deficient Mice. *Virology*, 238:169-179.

Fu FZ & Hampson DJ. 1989. Natural transmission of group A rotavirus within a pig population. *Res. Vet. Sci.* 46: 312-317.

Galss I, Lang DR, Ivanoff BN & Compans RW. 1996. Introduction: Rotavirus-from basic Research to a Vaccine. *J.Infect. Dis.*, 174 (11): S1-S11.

- Gallegos CO & Patton JT. 1989. Characterization of rotavirus Replication Intermediates: A model for the Assembly of Single-Shelled Particles. *Virology* 172:616-627.
- García HE, Ramírez E, Melo M, Mayen E, Rodríguez A y Velasco A. 1996. Manual de Diagnóstico y Tipificación de Rotavirus, In Escobar, G.A. México (D.F): Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Secretaría de Salud...
- García-Sánchez J, Corral C, Halaihel NG, Simón MC, Alonso JL, Múzquiz JL, Ortega C & Girones O. 1993. Survey of rotavirus within a dairy herd: comparison between polyacrylamide gel electrophoresis and two commercial kits. *Vet. Microbiol.* 34:321-332
- Giono CS, Escobar GA y Valdespino GJL. 1994. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México (D.F): Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Secretaría de Salud, 157-168.
- Giordano MO, Basnec SN, Nates F, Bennun F & Depetris AR. 1991. Rapid techniques for diagnostic and epidemiological studies of rotavirus infection. *VIRMET.* 9:59-63.
- Gouvea V & Brantly M. 1995. Is rotavirus a population of reassortants?. *Trend. Microbiol* 3:4: 159-162
- Grozoglia M, Kapikiam AZ, Flores J, Midth K, Hoshino Y & Green KY. 1988, Development of a rotavirus vaccine against rotavirus by a Jennerian and modified Jennerian approach. *Adv. Exp. Med, Biol.* 257:67-69.
- Guegen C, Maga A, McCrae M & Bataillon G. 1996. Caprine and Bovine B rotaviruses in western France: group identification by Northern hybridization. *Vet. Res.* 27(2) 171-176. Abstrac.
- Guillén M M. 1998. Diagnóstico de Rotavirus caprino mediante la técnica de electroforesis en poliacrilamida (PAGE) (tesis de licenciatura). Cuautitlán (Estado de México) México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán,
- Hall B, Odelia b, Uribe F, Sidoti J, Rosa K & Cravioto A. 1993. Rotavirus- Inhibitory Activity in serial milk samples from Mexican women and rotavirus infection in their childres during their frist year. *J. Clin. Microbiol.* 31(3):593-597.
- Harp JA, Runnels PL & Pesch BA. 1988. Lymphocyte Recirculation in Cattle: Patters of Localization by Mammary and Mesenteric Lymph Node Lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20:31-39
- Hein WR & Dudler L. 1999. Diversification of Sheep immunoglobulins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72:17-20
- Howard CJ, Brooke GP, Wrling D, Scopp P, Hope JC, Parsons KR & Collins RA. 1999. Dendric cells in cattle: Phenotype and function. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72:119-124.

Huang H, Schroeder F, Zeng C, Estes MK, Schoer JK & Ball JM. 2001. Membrane Interactions of a Novel Viral Enterotoxin: Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NSP4. *Biochemistry*. PAGE EST:11 2 A-K.

Husband AJ, Bao S & Beagley KW. 1999. Analysis of the mucosal microenvironment: factors determining successful responses to mucosal vaccines. *Vet Immunol Immunopathol*. 72: 135-142.

Iovane G, Pagnini P, Martone F & Bonaduce A. 1988. Ricerche sulla presenza e diffusione di anticorpi per rotavirus negli ovini e caprini dell'Italia Centro-Meridionale. *Acta Med Vet*. 34:3-9.

Kaminjolo JS & Adesiyun AA. 1994. Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. *Br vet. J.* 150:293-299.

a) Kapikian AZ & Chanock RM. 1996. Rotaviruses. In B.N. Fields 3<sup>rd</sup> ed. *Virology*, Raven Publisher Philadelphia. 1657-1688.

b) Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM & Pérez-Schaell I. 1996. Efficacy of Quadrivalent Rhesus Rotavirus- Based Human Rotavirus Vaccine Aimed at Preventing Severe Rotavirus Diarrhoea in Infants and Young Children. *J Infect Dis.*, 174 (11): S65-S71.

Kodituwakku SN & Harbour DA. 1990. Persistent excretion of rotavirus by pregnant cows. *Vet Rec*. 126:547-549.

Kojima K, Taniguchi K, Kawagishi-Kobayashi M, Matsuno S & Urasawa S. 2000. Rearrangement generated in double genes, NSP1 and NSP4, of viable progenies from a human rotavirus strain. *Virus Res*. 67:163-171.

LeBaron CW, Lew J, Glass RI, Weber JM & Ruiz-Palacios GM. 1990. Annual Rotavirus Epidemic Patterns in North America. *JAMA*. 264(8): 983-988.

Lee CS, Meeusen E & Brandon MR. 1992. Local immunity in the mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol*. 32: 1-11.

Lee C, Wang Y, Kao C-L, Lee C-Y & Chen H-N. 2000. Nsp4 Gene Analysis of Rotaviruses Recovered from Infected Children with and without Diarrhea. *J Clin Microbiol*. 38(12):4471-477.

Legrottaglie R, Volpe A, Rizzi V & Agimi P. 1993. Isolation and identification of rotaviruses as aetiological agents of neonatal diarrhoea in kids. Electrophoretical characterization by PAGE. *New Microbiol*. 16(3) 227-235.

Lijuan Y, Ward LA, Rosen BI, To TL & Saif LJ. 1996. Systemic Intestinal Antibody-Secreting Cell Responses and Correlates of Protective Immunity to Human Rotavirus in a Gnotobiotic Pig Model of Disease. *J Virol*. 70(5):3075-3083.

- Ludert JE, Feng N, Yu JH, Broome RL, Hoshino Y & Greenberg HB. 1996. Genetic Mapping Indicates that VP4 Is the Rotavirus Cell Attachment protein In Vitro and In Vivo. *J.Virol.* 70:1: 487-493.
- Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I & Svensson L. 2000. Role of the Enteric Nervous System in the Fluid and Electrolyte Secretion of Rotavirus Diarrhoea. *Science* 287:491-495.
- MacRea J & Srivasta M. 1998. Detection of viruses by electron microscopy: an efficient approach. *VIRMET.* 72(105-108).
- Matson DO. 1998. Virologic Properties of rotavirus. <http://rotavirus.com/virologic-prop-of-rotavir.html>. 9/10/1-7.
- McNeal MM, Barone KS, Rae MN & Ward RL. 1995. Effector Functions of Antibody and CD8+ Cells in resolution of Rotavirus Infections and protection against reinfection in Mice. *Virology* 214:387-397
- Mebus CA, White RG, Bass EP & Twiehaus MJ. 1973. Immunity to neonatal calf diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc.* 163:880-883
- Meissner C. 1994. Rotavirus y otros agentes virales que causan gastroenteritis. En *Microbiología Mecanismos de las Enfermedades Infecciosas*, Schaechter M, Medoff G, Eisentein BI, Guerra H editores, 2ª ed, México. Editorial Panamericana.
- Mendez E, Arias CF & López S. 1996. Interactions between the Two Surface Proteins of Rotavirus May Alter the Receptor-Binding Specificity of the Virus. *J.Virol.* 70:2: 1218-1222.
- Mendez E, López S, Cuadras MA, Romero P & Arias CF. 1999. Entry of Rotaviruses is a Multistep Process. *Virology.* 263:450-459.
- Muñoz M, Lanza I, Álvarez M & Cármenes P. 1994. Rotavirus excretion by kids in a naturally infected goat herd. *Small Ruminant Research* 14:83-89.
- a) Muñoz M, Lanza I, Álvarez M & Cármenes P. 1995. Prevalence of neutralizing antibodies to 9 rotavirus strains representing 7 G-serotypes in sheep sera. *Vet. Microbiol.* 45:354-361.
- b) Muñoz M, Álvarez M, Lanza I & Cármenes P. 1995. An outbreak of diarrhoea associated with atypical rotaviruses in goat kids. *Res. Vet. Sci.* 59:180-182.
- Muñoz M, Alvarez M, Lanza I & Cármenes P. 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *EPIDEMOL:INFECT.* 177:203-211. Abstrac.

- Molyneaux PJ., 1995. Human Immunity to Rotavirus. *J.Med.Microbiol.* 43: 397-404.
- Moreno CB, 1990 Manual de Técnicas de Necropsias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México,.
- Nagy B, Palfi V, Nagy H & Merrenyi L . 1987. Infectious gastrointestinal disease in goats, *Proceedings of the Ivth International Conferences on Goats. Brasil*, 373-388.
- Newburg DS & Petersen JA. 1998. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 351 (9110):1160-1165.
- Offit P & Dudzik KI. 1988. Rotavirus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Cross-React with Target Cells Infected with Different Rotavirus Serotypes. *J.Virol.* 62(1):127-131.
- Oldham G & Bridger JC. 1992. The effect of dexamethasone-induced immunosuppression on the development of faecal antibody and recovery from resistance to rotavirus infection. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 32:77-92.
- Ortiz. GVI. 1996. Rotavirus en ovinos y caprinos: detección por electroforesis y asilamiento en cultivos celulares (tesis de licenciatura). Cuautitlán (Estado de México) México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán,
- Pager CT, Alexander JJ & Duncan SA. 2000. South African G4P[6] Asymptomatic and Symptomatic Neonatal Rotavirus Strains Differ in Their NSP4, VP8\*, and VP7 Genes. *J.Med. Virol.* 62:208-216.
- Palombo EA. 1999. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on success of candidate vaccine. *FEMS Microbiology Letters* 181:1-8.
- Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR & Glass RI. 1998. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases.* 4(4):561-570.
- Patton JT, Wentz M, Xiaobo J & Raming RF. 1996. *cis*-Acting Signals That Promote Genome Replication in Rotavirus mRNA. *J.Virol.* 70:6:3961-3971.
- Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN & Glass RI. 1994. Vigilancia de los virus de la gastroenteritis en los laboratorios nacionales del Brasil. *Bol Of Sanit Panam.* 116(1) 27-36.
- Pratelli A, Martella V, Tempesta M & Buonavoglia C. 1999. Characterization by polymerase Chain reaction of ruminant rotaviruses isolated in Italy. *New Microbiol.* 22(2):105-109.
- Prem SP & Young SL. 1993. Immunogens of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 37:299-317.
- Prescott LM, Harley JP & Klein DA. 1999. *Microbiología* 4ta ed. España: McGraw-Hill Interamericana,

Puerto FI, Puerto-Solis MR, Polanco-Marín GG, Gonzalez-Losa MR & Peniche-Rodríguez RH. 1993, Shift in the prevalence of long and short electrophoretic patterns of rotaviruses isolated from faecal samples of children in Mérida Yucatan, Mexico. *Rev Biomed*, 4(3):117-121.

Raming RF. 1997. Genetics of the rotaviruses. *Annu Rev Microbiol*. 51: 225-255

Ruiz CM, Abad MJ, Charpiliene A, Cohen J & Michelangeli F. 1997. Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *Journal of General Virology* 78:2883-2893.

Rosen BI, Parwani AV, Lopez S, Flores J & Saif LJ. 1994. Serotypic Differentiation of Rotaviruses in Field Samples from Diarrheic Pigs by using Nucleic Acid Probes Specific for Porcine VP4 and Human Porcine VP7 Genes. *J Clin Microbiol*. 32(2):311-317.

Rothkotter HJ, Pabst R & Bailey M. 1999. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa—entry, transit and emigration of lymphoid cell and influence of antigen. *Vet. Immunol Immunopathol*. 72:157-156.

Sakura A & Neuvonen E. 1990. Latex Test for rapid Diagnosis in Calves. *Acta vet. scand*. 31:1-4.

Salmon H. 1999. The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 72:143-155.

Schaller JP, Saif LJ, Cordle CT, Cander, Jr. E & Winship TR. 1992. Prevention of Human Rotavirus- Induced Diarrhea in Gnotobiotic Piglets using Bovine Antibody. *J Infect Dis*. 165(4): 623-630.

Scott AC, Luddington J & Lucas M Gilbert FR. 1978. Rotavirus in goats. *Vet. Rec.* 12 :275.

Scott MC, Roth JR, Clark ML, Barnett BB & Spendlove RS. 1981. Trypsin Enhancement of Rotavirus Infectivity: Mechanism of Enhancement. *J Virol*. 39:3:816-822.

Shen S, Burke B & Desselberger U. 1993. Nucleotide Sequences of the VP4 and VP7 Genes of a Chinese Lamb Rotavirus: Evidence for a New P Type in a G10 Type Virus. *Virology*. 197:497-500.

Snodgrass DR & Wells PW. 1978. Passive Immunity in Rotaviral Infections. *JAVMA* 173(5):565-569.

Suzuki Y, Sanekata T, Sato M, Tajima K, Matsuda Y & Nakagomi O. Relative Frequencies of G (VP7) and P (VP4) Serotypes Determined by Polymerase Chain Reaction Assay among Japanese Bovine Rotaviruses Isolated in Cell Culture. J.Clin. Microbiol. 1993;11: 3046-3049.

Takahasaki E, Innaba Y, satoK, Kugorogi H, Akashi H, Satoda K & Omori T. 1979. Antibody to rotavirus in various animal species. Nat. Inst. Anim. Health. Quart. 19:72-73, Abstrac.

Ternyinc T. & Avrameas S. 1989 Técnicas Inmunoenzimáticas. Ed Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V., México. 32-42

Thea P. 1994. Efecto de los niveles de aporte lacteo sobre el crecimiento de los cabritos y del desarrollo de su tracto digestivo (tesis de maestría). Cuautitlán (Estado de México) México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán,

Tian P, Ottaiano A, Reilly PA, Udem S & Zamb T. 2000. The authentic sequence of rotavirus SA11 nonstructural protein NSP4. Virus Res. 66: 117-122.

Tizard I. 1995. Inmunología Veterinaria 4ta ed. México (DF)., Interamericana. McGraw-Hill,

Trigo TFJ. 1998. Patología Sistémica Veterinaria. México., McGraw-Hill Interamericana.

Urasawa T, Urasawa S & Taniguchi K. 1981. Sequential Passages of Human Rotavirus in MA-104 Cells. Microbiol. Immunol. 25 (10): 1025-1035.

Valdivia AG, rosales RC, Soriano BDM, Alba HF, Montaraz CJA y Tórtora P. 2000. Interacción de cepa verocitotóxicas de *Escherichia coli* y rotavirus en un brote de diarrea en becerros. Vet. Mex. 31(4):293-300.

Van Pinxteren LAH, Bruce MG, Campbell I, Clarke CJ & Snodgrass DR. 1998. Characterization of the primary local and systemic immune response in gnotobiotic lambs against rotavirus infección. Vet. Immunol. Immunopathol. 64:349-365.

Van Pinxteren LAH, Bruce MG, Campbell I, Wood A, Clarke CJ, Bellman A, Morein B & Snodgrass DR. 1999. Effect of oral rotavirus/iscom vaccines on immune responses in gnotobiotic lambs. Vet Immunol. Immunopathol. 71:53-67.

Venkataram Prasad BV, Wang GJ, Clerx JPM & Wah Chiu. 1988. Three-dimensional Structure of Rotavirus. J. Mol. Biol. 199:269-275.

Vesiraki T. 1988. Clinical Trial of live oral rotavirus vaccines: The Finnish experiences. Vaccine; 11(2):255-261.

Verdier Klingenberg K de & Svensson L. 1998. Group A Rotavirus as a Cause of Neonatal Calf Enteritis in Sweden. *Acta vet. Scand.* 39:195-199.

Ward RL, Knowlton DR, Greenberg HB, Schiff GM & Bershtein DI. 1990. Serum Neutralizing Antibody to VP4 and VP7 Proteins in Infants following Vaccination with WC3 Bovine Rotavirus. *J. Virol.* 64:6: 2687-2691.

Weclawicz K, Svensson L & Kristensson K. 1998. Targeting of endoplasmic reticulum-associated proteins to axons and dendrites in rotavirus-infected neurons. *Brain Research Bulletin* 46:4:353-360.

Wells PW, Snodgrass DR, Herring JA & Dawson McL A. 1978. Antibody titers to lamb rotavirus in colostrums and milk of vaccinated ewes. *Vet. Rec.* 103:46-48.

Wolf JL, Cukor G, Blacklow NR, Dambrauskas R, & Trier JS. 1981. Susceptibility of Mice to Rotavirus Infection: Effects of Age and Administration of Corticosteroids. *J. Infect. Dis.* 33 (2): 565-574.

Woode G, Bew ME & Dennis MJ. 1978. Studies on cross protection induced in calves by rotavirus of calves, children and foals. *Vet. Rec.* 103: 32-34.

ZhengDang W, WenLu S, Jiasi H, Fuping Z & MingJun L. 1995. Investigation and Identification of atypical rotavirus from animals and humans. *Chinese Journal of Virology.* 11(4): 336-341. Abstrac.