



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

DIAGNOSTICO DE ROTAVIRUS CANINO MEDIANTE LA TECNICA DE  
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:  
SONY GIOVANNA MIRANDA STEVENS

ASESOR: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A la Universidad Nacional Autónoma  
de México

A mi asesor Dr. Guillermo Valdivia Anda  
y a mis sinodales  
por su valiosa colaboración.

A mis profesores.

En especial a la Dra. Alejandra Ayanegui  
por sus invaluable aportaciones a este trabajo  
y la gran disposición que siempre tiene de ayudar a los demás

A mi madre:

Sonia Stevens

El ser mas importante en mi vida,  
gracias por todo tu apoyo,  
te quiero mucho mami.

A Naty:

Por ser la mejor hermana  
que uno pueda tener,  
a ti también te quiero.

A Silvia, Alberto, Else, Ruth,  
Diana, Melissa, Diego y Sabina  
Gracias por todo su apoyo.

A Zeus, Xuxa, Lorenza, Pelusa, Asrael, Sorullo, Morris, Pircha, Canela, Kika,  
Murdock, Misha, Tamara, Yodi y mis "ratas"  
Gracias por todo su cariño y formar o haber formado parte de mi vida.

A Lulú por ser la mejor amiga que uno pueda tener en este mundo.

A Tania (Konaneko) y Alfredo por su invaluable ayuda.

A Viviana, Ricardo, Claudia E., Claudia A., Felix, Blanca M.C.  
Por todos esos momentos que pasamos juntos en la universidad.

A Gerónimo por tu apoyo, cariño y paciencia.

**Gracias Dios, por todo lo que me has dado... y lo que no.**

## INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. ANTECEDENTES.....	3
2.2. GENERALIDADES.....	6
2.2.1. ETIOLOGÍA.....	6
2.2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	9
2.2.3. PATOGENIA.....	9
2.2.4. SIGNOS CLÍNICOS.....	10
2.2.5. TRATAMIENTO.....	10
2.2.6 DIAGNÓSTICO.....	10
3. OBJETIVO.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5. RESULTADOS.....	18
6. DISCUSIÓN.....	20
7. CONCLUSIONES.....	24
8. BIBLIOGRAFÍA.....	25
9. ANEXO.....	29

## 1. RESUMEN

El diagnóstico de las enteritis por Rotavirus mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se basa en la identificación del genoma viral a partir de heces. Esta técnica es llamada Rotaforesis y consiste en la extracción del ARN viral, su corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida y la tinción con nitrato de plata para la observación de los 11 segmentos de RNA, característicos del genoma de los rotavirus.

En el presente trabajo se utilizó la técnica de PAGE la cual fue adaptada para su uso bajo las condiciones de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, basándose en el trabajo previamente realizado por Ayanegui (2002). Se procedió a detectar la presencia del genoma viral característico de Rotavirus en 110 muestras de heces de caninos (60 muestras de heces diarreicas y 50 muestras de heces normales) todos los animales utilizados fueron menores de un año de edad y provenientes del Distrito Federal y el Estado de México.

Se utilizaron muestras de heces de caprino previamente evaluadas como positivas las cuales sirvieron como controles.

Después del procesamiento de las muestras mediante rotaforesis, los resultados mostraron que las 110 muestras fueron negativas a rotavirus.



## 2. INTRODUCCIÓN

Los rotavirus son patógenos entéricos que afectan muchas especies animales entre ellos los bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, caninos, felinos, gallináceas y al hombre; y representan una de las causas más importantes de diarrea aguda en animales neonatos y niños (McNulty *et al.*, 1978; Kapikian *et al.*, 2001; Blood, 1996).

Son considerados los agentes etiológicos más importantes de la gastroenteritis aguda con deshidratación en niños menores de tres años de edad en todo el mundo. En países desarrollados es la principal causa de morbilidad diarreaica (20,000 hospitalizaciones por año) en la población infantil. Sin embargo, en países en desarrollo además de presentar una alta morbilidad (18 millones de casos) se presenta una importante mortalidad (870,000 defunciones por año) en ese mismo grupo de edad (García, 2005).

Desde finales de la década de 1970, se ha reconocido a la enteritis viral como una de las causas más comunes de diarrea infecciosa en perros menores de seis meses de edad. Se han relacionado como patógenos primarios al parvovirus tipo 1 y 2, el coronavirus canino y el rotavirus; y también se han aislado o identificado en las heces de perros con diarrea: astrovirus, herpesvirus, enterovirus, calicivirus, virus parainfluenza y partículas parecidas a virus pero de los cuales no se conoce con certeza su patogenicidad (Greene, 2006).

El rotavirus es considerado de importancia menor como etiología de la gastroenteritis canina pero se le debería tomar en cuenta como una posible causa de diarrea en los neonatos (Ettinger *et al.*, 2007).

## 2.1 ANTECEDENTES

El primer rotavirus reconocido como agente causal de diarreas fue el virus de la diarrea epizootica del ratón recién nacido, conocida como EDIM (Epizootic diarrhea of infant mice) y descrita por Kraft en 1957; utilizando microscopía electrónica describieron la presencia de una partícula viral de 70nm de diámetro en los cortes de intestino de ratones afectados.

Mebus *et al.*, en 1969 lograron demostrar la presencia de una partícula viral de 70nm, 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).

El rotavirus responsable de la gastroenteritis infantil fue descubierto en 1973 por Bishop, quien demostró la presencia de numerosas partículas virales, mediante microscopía electrónica, en biopsias de duodeno de niños con gastroenteritis aguda. En Melbourne, Australia, Kapikian en 1974 describe una gran similitud morfológica y relaciones antigénicas entre el rotavirus humano y los virus EDIM y NCDV (Kapikian *et al.*, 2001; Berríos *et al.*, 1990; Martella *et al.*, 2009).

En México, Espejo *et al.*, en 1979 detectaron por primera vez a los rotavirus como causa de gastroenteritis infantil (García, 2005).

La gastroenteritis viral canina adquirió enorme importancia con la aparición del parvovirus canino en 1978 como una virosis nueva. El coronavirus canino se había descrito en 1971, pero no se le vinculó con enfermedad natural hasta casi el mismo momento en que se descubrió el parvovirus canino. El moquillo y el virus de la

hepatitis infecciosa también causan diarrea y vómito en algunos perros pero en su curso típico se observan otras manifestaciones de enfermedad (Ettinger *et al.*, 2007).

Las infecciones por rotavirus canino han existido probablemente desde hace muchos años. Los reportes de rotavirus canino detectado por microscopía electrónica, aislamiento viral o por serología han resultado como consecuencia de la investigación del parvovirus canino (Hammond *et al.*, 1983; Marshall *et al.*, 1984; Appel, 1987).

El rotavirus canino se demostró como causa de diarrea en cachorros recién nacidos pero no se le asoció con enteropatía natural en cachorros menores de un año o perros adultos (Ettinger *et al.*, 2007).

Existen pocos reportes de la presencia de rotavirus en los caninos; en el siguiente cuadro se resumen los principales.

Cuadro 1. Referencias bibliográficas de Rotavirus en caninos.

<b>AUTOR</b>	<b>TECNICAS</b>	<b>REFERENCIA</b>	<b>TITULO</b>
McNulty M <i>et al.</i>	IFI	1978, Vet. Rec.	Antibody to rotavirus in dogs and cats.
Eugster A <i>et al.</i>	ME	1979, Vet. Med. Sm. Anim. Clinic	Rotaviruses in diarrheic feces of a dog.
McNulty M <i>et al.</i>	ME	1980, Vet. Rec.	Viruses and diarrhoea in dogs.
England J, Poston R.	ME , aislamiento viral	1980, Am. J. Vet. Res.	Electron microscopic identification and subsequent isolation of a rotavirus from a dog with fatal neonatal diarrhea.

Fulton R <i>et al.</i>	ME, IFI, cultivo celular, aislamiento viral.	1981, Am. J. Vet. Res.	Isolation of a rotavirus from a newborn dog with diarrhea.
Jonson <i>et al.</i>	ME	1986, Vet. Pathol.	A scanning and transmission electron microscopic study of rotavirus – induced intestinal lesions in neonatal gnotobiotic dogs.
García L.	PAGE	2000, AMMVEPE	Detección de rotavirus en heces diarreicas hemorrágicas de caninos.
Martella V <i>et al.</i>	PCR	2001, Virus Research.	Nucleotide sequence variation of the VP7 gene of two G3-type rotaviruses isolated from dogs.
Martella V <i>et al.</i>	PCR	2001, J. Virol Methods	Isolation and genetic characterization of two G3P5A[3] canine rotavirus strains in Italy.
Gabbayl Y <i>et al.</i>	ELISA, ME	2003, Braz. J. Microbiol	Detection of rotavirus in dogs with diarrhea in Brazil.

\* IFI (Inmunofluorescencia indirecta), ME (Microscopía electrónica), PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida), PCR (Reacción en cadena de polimerasa), ELISA (Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas).

## 2.2 GENERALIDADES

### 2.2.1 ETIOLOGIA

Los rotavirus (*rota* = rueda) son virus ARN que pertenecen a la familia Reoviridae, presentan dos cápsides concéntricas (cápside externa y cápside interna) y un "core" o centro (Figura 1). El ARN está segmentado en 11 porciones de doble cadena (Figura 2). La familia contiene nueve géneros: Orthoreovirus, Orbivirus, Rotavirus, Coltivirus, Aquareovirus, Phytoreovirus, Fijivirus, Cypovirus y tres géneros más de Reovirus de plantas. Los primeros tres géneros contiene patógenos importantes para los animales en general, mientras que el resto son patógenos de plantas, peces e invertebrados (Quinn *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 1983; Fenner *et al.*, 1992; García, 2005 ).

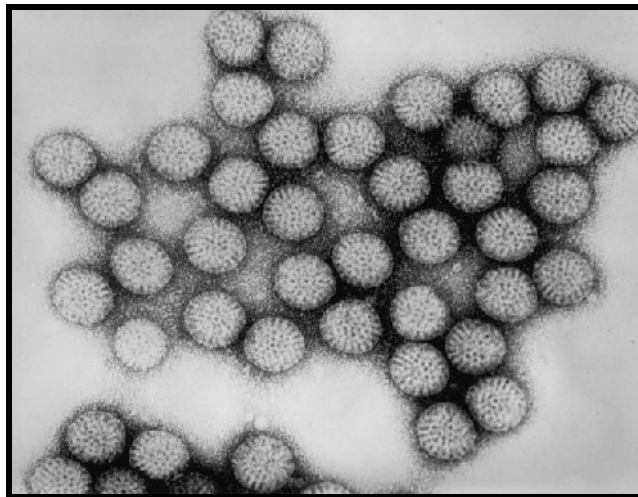


Figura 1. Imagen de rotavirus obtenida por microscopía electrónica (el contorno circular de la cápside externa brinda el aspecto de una rueda).  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rotavirus\\_TEM\\_B82-0337\\_lores.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rotavirus_TEM_B82-0337_lores.jpg)

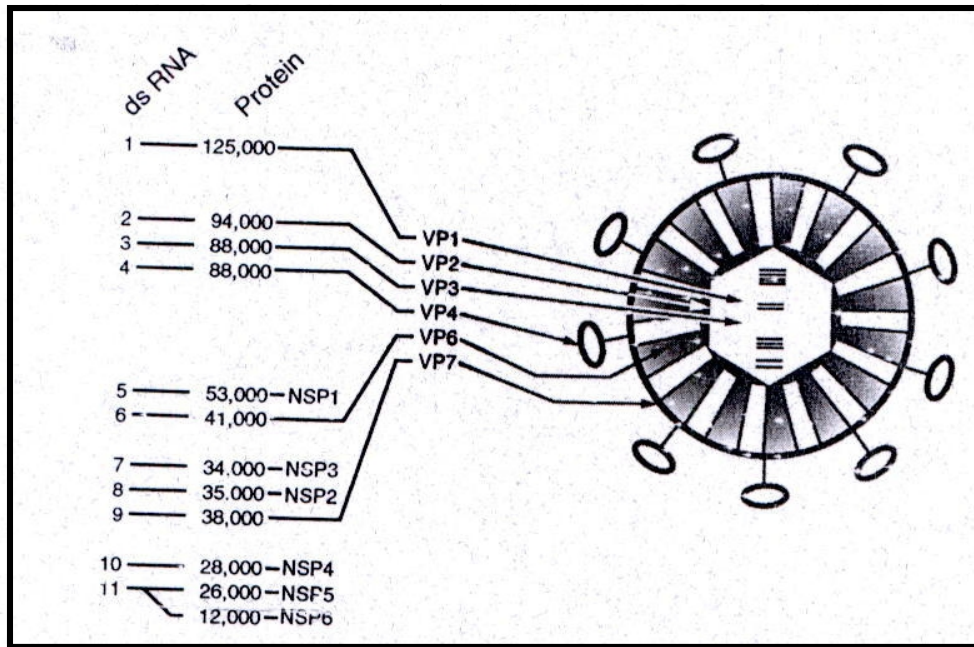


Figura 2. Segmentación ARN, proteínas virales y su peso molecular

(Kapikian *et al.*, 2001).

Son virus desnudos por lo cual toleran la extracción por fluorocarbono, éter o cloroformo; resisten un pH desde 3 hasta 9. El diámetro total de la partícula madura es de 70-75 nm (750 Å). Es inactivado por: fenol, formalina, cloro, betapropilactona y etanol al 95% (Estes ,2001).

El genero de los rotavirus ha sido clasificado en serogrupos llamados A, B, C, D, E, F y G; y los subgrupos I y II, dados por la proteína de la cápside VP6; serotipos P por VP4 y G por VP7 (Figura 3); y en electroferotipos según patrón corto y largo por el corrimiento electroforético de ARN (García *et al.*, 1996).

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 (Estes, 2001).

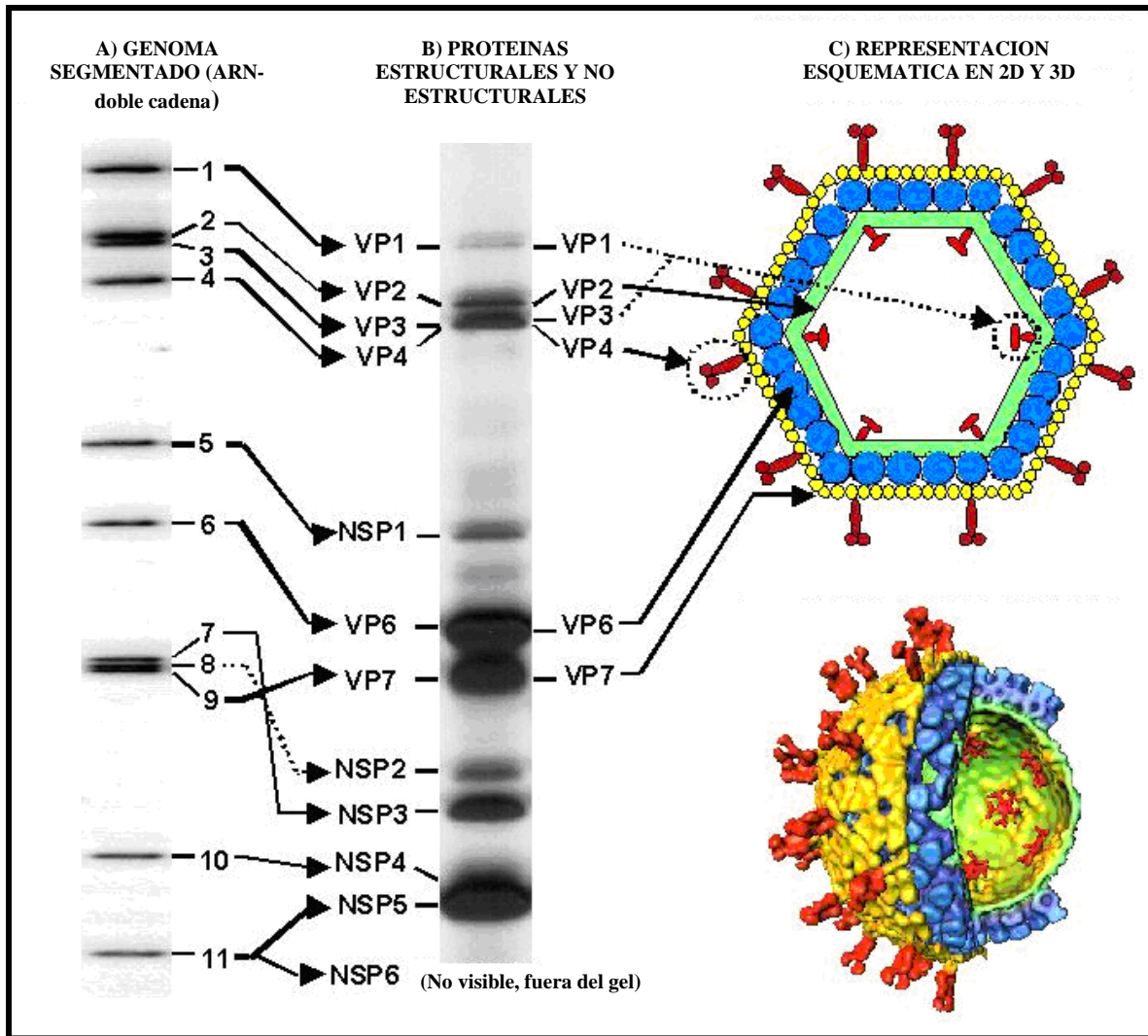


Figura 3. Presentación y distribución de proteínas virales de Rotavirus: A) Genoma segmentado en PAGE (electroferotipo); B) Proteínas virales estructurales y no estructurales (Western blot); C) Esquema virion en 2D y reconstrucción en 3D.

[www.reoviridae.org/dsRNA\\_virus\\_proteins/rotavirus%20figure.htm](http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm)

### 2.2.2. EPIDEMIOLOGIA

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 *et al.*, 2001).

Los rotavirus presentan una ruta de transmisión oro-fecal y una infección local en la mucosa intestinal. Están bien adaptados para sobrevivir fuera del huésped y pasar a través del tubo gastrointestinal superior (Greene ,2006).

### 2.2.3. PATOGENIA

La infección por rotavirus en perros como en otras especies, parece estar restringida al epitelio del intestino delgado. Después de la ingestión los virus resistentes al ácido salen del estómago e infectan las células epiteliales más maduras en las puntas lumbales de las vellosidades del intestino delgado y originan atrofia de leve a moderada de las mismas. Las células infectadas se tornan tumefactas, se degeneran y descaman hacia la luz intestinal, en donde liberan gran número de viriones que se tornan en fuentes de infección para segmentos intestinales inferiores y para otros animales. La necrosis de células infectadas por rotavirus es más notable 18 a 48 horas después de la infección oral. Las células necróticas se reemplazan con rapidez por epitelio de la cripta inmadura. Los signos clínicos resultan principalmente de la atrofia de las vellosidades, que conduce a mala absorción y diarrea osmótica (Appel ,1987; Greene, 2006).



#### 2.2.4. SIGNOS CLÍNICOS

Se presenta vómito y/o diarrea, ésta última de 24 a 48 horas postinfección, con duración promedio 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 o heces ligeramente pastosas. También existe deshidratación, letargia y los cachorros suelen permanecer afebriles.

En algunos casos el cuadro clínico puede llevar al hospedero a la muerte por deshidratación. Los signos clínicos no suelen ser tan graves como los causados por otros virus entéricos caninos (Parvovirus canino tipo 2 y Coronavirus canino). Es posible que el rotavirus canino contribuya a la enfermedad entérica en infecciones virales mixtas (Kapikian *et al.*, 2001; Greene, 2006).

#### 2.2.5 TRATAMIENTO

La principal herramienta de tratamiento para la enteritis rotaviral es la administración de fluidos, con reposición parenteral de líquidos y electrolitos. La mayoría de los animales se recuperan sin inconvenientes (Kapikian *et al.*, 2001; Anderson, 1999).

#### 2.2.6 DIAGNÓSTICO

La signología en los animales afectados por rotavirus es muy parecida a la provocada por otros agentes entéricos por lo tanto, no se puede determinar la presencia de rotavirus con el diagnóstico clínico por lo que es necesario apoyarse en diferentes técnicas de laboratorio para la detección del virus, como son: microscopía electrónica (ME), ELISA, aglutinación en látex (AL), reacción en cadena de polimerasa (PCR), seroneutralización (SN) y electroforesis en gel de poliacríamida (PAGE). Estos métodos han sido aplicados primordialmente en medicina humana y

ocasionalmente en el área de veterinaria, fundamentalmente por el alto costo de las pruebas como ME y PCR, o bien por que al estar basados en reacciones antígeno anticuerpo como ELISA, que tan solo detectan algunos de los serogrupos en particular el tipo A (Guillen, 1998).

La técnica de PAGE se conoce como ROTAFORESIS y 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 podrá detectar la migración de los 11 segmentos del ARN viral. Esta técnica presenta varias ventajas como son: el no ser influida por las variaciones de serogrupo y serotipo, es una técnica rápida (aproximadamente 2 horas) , detecta desde  $10^5$  partículas por gramo de heces, es una técnica alternativa para la identificación de electroferotipos y rearrreglos genéticos de las cepas de campo en estudios epidemiológicos ofreciendo una buena alternativa para la identificación del ARN del rotavirus en muestras de heces por su alta sensibilidad (94%) y especificidad (98%), además de ser sencilla y tener un bajo costo; todas éstas son cualidades que permiten utilizarla para el diagnóstico de la diarrea por rotavirus (Herring *et al.*, 1982; Araya *et al.*, 1985; García *et al.*, 1996; García, 2005).

### 3. OBJETIVO.

Investigar la presencia del genoma viral característico de Rotavirus por medio de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en heces de caninos menores de un año de edad con diarrea y sin diarrea, provenientes del Distrito Federal y el Estado de México.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### A. MUESTRAS VIRALES.

Para realizar el presente trabajo se emplearon seis muestras de heces de caprino, todas estas positivas a rotavirus y previamente identificadas por la técnica de rotaforesis, las cuales fueron donadas por la Dra. Alejandra Ayanegui de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y que sirvieron como control durante el experimento.

### B. EQUIPO.

- Microcentrifuga Costar Mod. 10.
- Vortex Costar Mixer.
- Cámara vertical para electroforesis Mini Protean-Bio Rad.
- Fuente de poder Bio Rad.
- Platina térmica.

### C. TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).

Se utilizó la técnica de electroforesis del ARN en el gel de poliacrilamida (PAGE) de acuerdo a la técnica del manual de diagnóstico y tipificación de rotavirus del INDRE (García *et al.*, 1996). La cual se aplicó en primera instancia a las muestras de heces provenientes de cabra para confirmar la presencia de rotavirus y posteriormente usar los extractos como control durante el corrimiento de los extractos obtenidos de las 110 muestras de canino.

#### D. COLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE HECES.

Un total de 110 muestras de heces de caninos fueron colectadas (60 muestras de heces diarreicas y 50 muestras de heces normales), provenientes de animales menores de un año de edad, las cuales fueron obtenidas de diversos lugares (consultorios veterinarios, laboratorios y refugios para animales) del Distrito Federal y el Estado de México.

La recolección de las muestras se realizó con la ayuda de hisopos y tubos de ensayo estériles y bolsas de polietileno, en forma directa del recto de los animales o del suelo en el momento que defecaban. Las muestras fueron etiquetadas con los datos correspondientes al animal y permanecieron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### E. DETECCIÓN DEL ARN VIRAL A PARTIR DE LAS MUESTRAS DE CANINOS.

Todo el trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la FES- Cuautitlán, ubicada en el campo IV, L-503 de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Se utilizó la técnica de electroforesis del ARN en el gel de poliacrilamida (PAGE) de acuerdo a la técnica del manual de diagnóstico y tipificación de rotavirus del INDRE (García *et al.*, 1996), como a continuación se describe:

➤ **EXTRACCION DE ARN VIRAL**

- a) Se colocaron 2g de heces sólidas en 300µl de solución salina fisiológica y se mezclaron en el vortex. Se centrifugaron de 3000-5000rpm (15min).
- b) Se separó el sobrenadante y se guardó a -20°C en un tubo hasta ser utilizado. Se colocaron 300µl de la muestra líquida en un tubo Eppendorf directamente de las heces diarreicas o el sobrenadante del paso anterior y se añadieron 300µl de la solución "A" [LISIS] (ver anexo); se colocaron en el vortex hasta obtener una solución lechosa homogénea.
- c) En el tubo Eppendorf se agregaron 300µl de la solución "B" [FENOL SATURADO] (ver anexo) y se mezclaron en el vortex.
- d) Se agregaron en el tubo Eppendorf anterior 300µl de la solución "C" [CLOROFORMO] (ver anexo) y se mezclaron en el vortex.
- e) Se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min.
- f) Una vez divididas la fase acuosa (superficie) de fase fenólica (fondo), teniendo cuidado de no mezclarlas, se separó con micropipeta la fase acuosa y se colocó en otro tubo Eppendorf en donde se localizaría el ARN viral de estar presente el virus en la muestra original. Éste extracto se mantuvo a -4°C hasta ser utilizado.

➤ **GEL DE POLIACRILAMIDA, CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO (PAGE)**

- a) Se lavaron los dos vidrios con extrán y se secaron perfectamente. Se colocaron los separadores de teflón entre los vidrios.
- b) Se colocaron los vidrios con separadores en el soporte de la cámara de electroforesis.
- c) Se llenó la cámara con la suspensión de Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0.8% y se colocó el peine separador para formar pozos antes de la solidificación de la suspensión.
- d) Se esperó a que polimerizara.
- e) Se retiró el peine separador para formar pozos.
- f) Se secaron cada uno de los pozos con pequeños cortes de papel filtro.
- g) Se tomaron 20  $\mu$ l del extracto de ARN viral y se mezclaron con 20  $\mu$ l de glicerol - azul de bromofenol (marcador de corrimiento).
- h) Se colocó esta mezcla en un pozo, sin contaminar los pozos anexos.
- i) En el primer pozo del gel (PAGE) se colocó una muestra de extracto viral positivo de rotavirus que funcionó como control positivo.
- j) Una vez colocadas todas las muestras en el gel (PAGE), éste se colocó dentro de la cámara de electroforesis en una solución "D" (ver anexo), cubriendo los geles.
- k) Se conectó la cámara a la fuente de poder a 55 volts corriente constante, durante 20 min. permitiendo que las muestras sean introducidas al gel; la cámara de electroforesis permaneció en una bandeja con refrigerante periféricos para mantener baja la temperatura del buffer de corrimiento. Se cambió el voltaje a 110 volts / 75 miliampers y se dejó correr por dos horas.

➤ **FIJACION Y TINCION DE GEL**

- a) Se retiró el gel de los vidrios y se hizo un corte pequeño en el extremo inferior del primer carril.
- b) Para la fijación del ARN viral en el gel, se colocó el gel en la solución "E" (ver anexo) durante 30 min (se diluyó 5ml de la solución "E" 10X en 50 ml de agua destilada).
- c) Se retiró la solución anterior y se adicionó la solución "F" (ver anexo) durante 30 min.
- d) Se retiró la solución "F".
- e) Se lavó rápidamente dos veces con agua destilada.
- f) Se retiró el agua.
- g) Se colocaron 50ml de la solución "G" (ver anexo); hasta lograr visualizar el corrimiento electroforético característico de 11 bandas de la muestra control positivo.
- h) Se retiró la solución anterior y se paro la reacción con una solución "H" de ácido acético glacial al 1% (ver anexo).
- i) Se mantuvo el gel en la solución anterior para su conservación.



## 5. RESULTADOS.

Una vez montada la técnica de PAGE, se procedió a trabajar con las 110 muestras de heces diarreicas y no diarreicas todas estas obtenidas de cachorros menores de un año de edad.

Cuadro 2. Distribución de muestras de heces por raza, sexo y condición diarreica.

Raza	Sexo			
	Machos		Hembras	
	Con diarrea	Sin diarrea	Con diarrea	Sin diarrea
Poodle	9	8	6	5
Schnauzer	5	2	3	4
Dachshund	2	1	1	1
Malinois	1	0	0	0
Rottweiler	3	5	3	2
Cocker	1	1	2	0
Boxer	0	0	1	0
Pastor alemán	4	1	3	0
Bullterrier	0	0	2	0
Mestizo	8	11	6	9
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>29</b>	<b>27</b>	<b>21</b>

De las 110 muestras problema corridas para rotavirus todas fueron negativas, siendo positivo el control en todos los casos.

En la figura 4 se aprecia el corrimiento de 3 muestras de heces de caprino positivas a rotavirus (carril V – IX) donadas por Ayanegui, A., las cuales posteriormente se utilizaron como controles a lo largo del experimento.

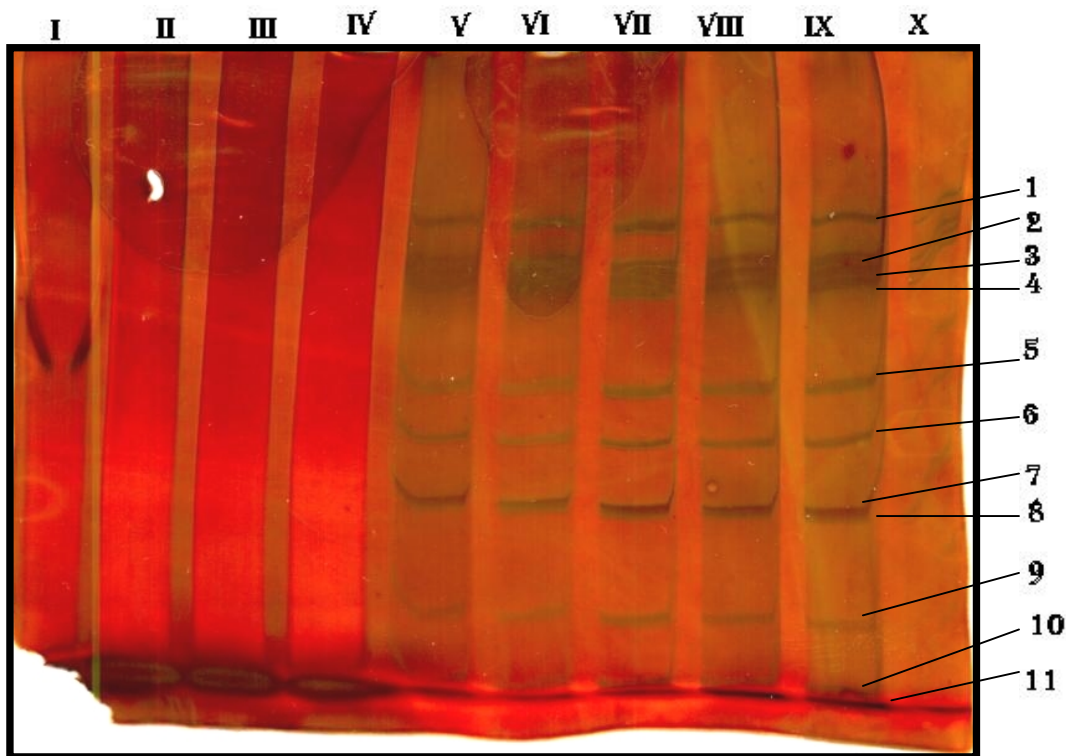


Figura 4. Corrimiento electroforético de extractos de ARN viral de muestras de heces de caprino obtenidos mediante la técnica de rotaforesis en gel de poliacrilamida al 5% y teñidos con nitrato de plata.

1)carril I-IV y X se encuentran vacíos; 2)carriles V, VIII y IX corresponden a la muestra de heces de caprino positiva a rotavirus con número de identificación 9VII; 3)carril VI corresponde a la muestra de heces de caprino positiva a rotavirus con número de identificación 6VII; 4)carril VII corresponde a la muestra de heces de caprino positiva a rotavirus con número de identificación 6VIII; 5)del lado derecho del gel se señalan las once bandas características del genoma viral.

## 6. DISCUSION.

Los rotavirus se consideran como una de las causas más comunes de diarrea infecciosa aguda, tanto en humanos como en animales jóvenes; en los caninos estos fueron aislados de las heces de cachorros con diarrea autolimitante, así como de cachorros con enteritis fatal (Eugster *et al.*, 1979; England *et al.*, 1980; Dagenais *et al.*, 1981; Fulton *et al.*, 1981) y se demostró la presencia de anticuerpos antirotavirales en los perros (Macnulty *et al.*, 1978; Dagenais *et al.*, 1981). La inoculación experimental de cachorros neonatos gnotobióticos con rotavirus canino produjo diarrea y atrofia vellosa leve a moderada (Jonson, 1983); sin embargo este agente por sí solo no ha demostrado ser un enteropatógeno de gran importancia clínica en el perro o el gato.

Perros infectados experimentalmente con rotavirus humano no manifestaron diarrea sin embargo presentaron anticuerpos contra rotavirus y partículas virales fueron visualizadas por Inmunomicroscopía electrónica en sus heces (Tzipori, 1978). Estos estudios indican que los perros pueden ser infectados con rotavirus de diferentes especies y que su transmisión puede ocurrir por contacto directo. Estos hallazgos también indican que los perros pueden tener un papel importante en la transmisión y diseminación de los rotavirus entre humanos y otras especies (Gabbayl *et al.*, 2003).

Específicamente, en el caso de los animales domésticos, se acepta que las infecciones entéricas constituyen una de las principales causas de morbilidad durante las primeras semanas de vida. Las pérdidas económicas que se producen en las especies productoras son debidas a la falta de peso y retraso del crecimiento, y a una no bien determinada tasa de mortalidad. Los altos costos que

implicaban su tratamiento y control se ilustran claramente por el hecho de que en los Estados Unidos de Norteamérica se perdían en 1978 alrededor de 250 millones de dólares al año, y en Francia en 1975, más de 500 millones de francos (Berrios, 1990).

Los rotavirus suelen ser específicos de huésped, sin embargo no es posible diferenciar con facilidad las diversas cepas y tampoco eliminar la posibilidad de infección en el hombre. Las infecciones rotavirales en personas suelen ocurrir en lactantes pequeños y niños menores de cuatro años. La sanidad e higiene deficientes, como existe en países en desarrollo aumentan la prevalencia de la infección (Greene, 2006).

Existen diversos factores predisponentes de gran importancia para el origen de esta enfermedad y su gravedad en los animales; entre ellos se incluye la dieta, privación de calostro, medidas de manejo, estado sanitario, temperatura ambiental y humedad, estado inmunitario y estrés (Berrios, 1990).

Se ha reportado, sin poderse demostrar, que los rotavirus de animales pueden infectar al hombre, lo que hace suponer una posible transmisión interespecies (Polanco *et al.*, 1997). Se han realizado numerosos estudios en los cuales se caracterizan cepas aisladas de humanos, encontrándose una alta homología con cepas de animales, pero sin poderse demostrar la transmisión natural de rotavirus interespecie, a pesar de la presencia de los factores de riesgo (Kapikian *et al.*, 2001; Polanco *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos por Polanco y colaboradores sugieren que los animales domésticos asintomáticos podrían actuar como reservorio de la infección por rotavirus, manteniendo la circulación de este virus entre los brotes anuales. Para poder confirmar esto es necesario realizar estudios epidemiológicos y

moleculares de las cepas provenientes de animales y de humanos durante todo el transcurso del año de manera que se puedan establecer las homologías y la dinámica de transmisión (Polanco *et al.*, 2004).

En nuestro país la detección de rotavirus en perros ha sido poco estudiada. En un trabajo realizado por García (2000) mediante la técnica de electroforesis este autor encontró en una población de 50 perros menores de un año de edad, que 17 de los 50 caninos con cuadro clínico de diarrea dieron positivo a rotavirus (15 de estos presentaban a su vez diarrea de tipo hemorrágica); no obstante el autor sugiere que con este hallazgo no es suficiente para establecer que estos virus ocasionaron el cuadro hemorrágico y al parecer se encuentran actuando como cofactores para el desarrollo de este trastorno o sólo se trata de un hallazgo incidental.

En el presente trabajo no se encontraron indicios de rotavirus. Uno de los factores que pudo haber intervenido en el resultado de esta investigación fue el hecho de que el muestreo se haya realizado indistintamente a lo largo de los años 2001-2002 sin tener un mayor énfasis en la época de invierno, que son los meses en que se reporta que se manifiesta comúnmente la enfermedad. Aunado ha esto el rango de edad de los animales muestreados no corresponde a lo manejado en la mayor parte de los reportes en caninos donde se hace mención de animales neonatos (England *et al.*, 1980; Fulton *et al.*, 1981; Marshall *et al.*, 1984), por lo que si se hubiera concentrado el muestreo en este rango de edad probablemente hubiera aumentando la frecuencia del virus, puesto que se maneja que es una enfermedad que se caracteriza principalmente por atacar a la población más joven. En segundo término aunque rotavirus se ha demostrado en diversas poblaciones de carnívoros, Martella *et al.*, 2009, en una revisión sistemática de

rotavirus como posible zoonosis indica que la prevalencia de los mismos es baja en los carnívoros en comparación con los reportes realizados en otras especies, por lo cual una muestra de 110 animales que incluye individuos de diversas edades puede no ser suficiente para detectar al virus en población abierta.

## 7. CONCLUSIONES.

La presencia del genoma viral característico de rotavirus no fue encontrado en las 110 muestras de heces de caninos menores de un año de edad (60 muestras de heces diarreicas y 50 muestras de heces normales), las cuales fueron colectadas en consultorios veterinarios, laboratorios y refugios para animales provenientes del Distrito Federal y el Estado de México, y fueron procesadas mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se sugiere la realización de posteriores estudios teniendo énfasis en la edad de los animales (que sean menores de 3 meses) puesto que es uno de los factores determinantes que manejan la mayoría de los estudios realizados en donde sí se encontró la presencia del virus, aunado a que también tiene que ver el estado inmune del animal, el medio ambiente en donde se desarrolle y su estado nutricional para la presentación de la enfermedad.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Anderson, N., 1999. Gastroenterología veterinaria. 2<sup>a</sup> ed., Ed. Intermédica, Buenos Aires, Argentina.
- 2) Araya, M., Spencer, E., Brunser, O., Espinoza, J., Sandino, A., 1985. Estudio comparativo de dos métodos en el diagnóstico de rotavirus en lactantes con diarrea aguda y asintomáticos. Rev. Chil.Pediatr. 56(6): 441-444.
- 3) Appel, M., 1987. Virus infections of carnivores (virus infections of vertebrates, vol 1). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 4) Ayanegui, A., 2001. Modelo de infección y papel de la respuesta inmune pasiva (materna) en caprinos infectados por rotavirus (tesis de maestría). Cuautitlán, México; Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- 5) Berríos, P., Celedón, M., 1990. Monografías de medicina veterinaria (Rotavirus en animales domésticos de Chile), vol. 12, N° 1, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- 6) Blood, D., Radostits, O., 1992. Medicina veterinaria, 7<sup>a</sup> ed., Interamericana – McGraw Hill, México.
- 7) Dagenais, L., Schwers, A., Pastoret, P., Chappuis, G., 1981. Propagation of bovine rotavirus by dogs. Vet. Rec., 109: 187.
- 8) England, J.J., Poston, R.P., 1980. Electron microscopic identification and subsequent isolation of a rotavirus from a dog with fatal neonatal diarrhea. Am J Vet Res 41: 782 – 783.
- 9) Estes, M., 2001. Rotaviruses and their replication. In Fields Virology 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A..



- 10) Ettinger, S., Feldman, E., 2007. Tratado de medicina interna veterinaria, 6ª ed., vol. 2, Elsevier, España.
- 11) Eugster, A., Sidwa, T., 1979. Rotaviruses in diarrheic feces of a dog. VMSAC 74: 817-819.
- 12) Fenner, F., Bachmann, P., Gibbs, P., *et al.*, 1992. Virología veterinaria. Acribia, España.
- 13) Fulton, R. W., Johnson, C.A., Pearson, N.J., Woode, G.N., 1981. Isolation of a rotavirus from newborn dog with diarrhea. Am. J. Vet. Res. 42: 841 – 843.
- 14) Gabbayl, Y., Homemll, V., Munfordll,V., Alvesl, A., Mascarenhasl, J., Linharesl, A., Raczill, M., 2003. Detection of rotavirus in dogs with diarrhea in Brazil. Braz. J. Microbiol. 34: 77-80.
- 15) Greene, C., 2006. Infectious diseases of the dog and cat, 3<sup>th</sup> ed., Elsevier Inc., U.S.A..
- 16) García, H., 2005. Virus causantes de enfermedades prevalentes, emergentes y re-emergentes en México, Facultad de Medicina UNAM.
- 17) García, H., Ramírez, E., Melo, M., Mayen, E., Rodríguez, A., y Velasco, A., 1996. Manual de diagnóstico y tipificación de rotavirus, En Escobar, G. A., Instituto Nacional De Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Secretaria de Salud, México D.F..
- 18) García, L., 2000. Detección de rotavirus en heces diarreicas hemorrágicas de caninos. Rev AMMVEPE, 11(6): 169 – 174.
- 19) Guillén, M., 1998. Diagnóstico de rotavirus caprino mediante la técnica de electroforesis en poliacrilamida (PAGE) (tesis de licenciatura). Cuautitlán,

México; Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

- 20) Hammond, M., Timoney, P., 1983. An electron microscopic study of viruses associated with canine gastroenteritis. *Cornell Vet* 73:82-97.
- 21) Herring, A., Inglis, N., Ojeh, C., Snodgrass, D., Menzies, J., 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver – stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16(3):473-477.
- 22) Johnson, C., Fulton, R., et al., 1983. Inoculation of neonatal gnotobiotic dogs with a canine rotavirus. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1682-1686.
- 23) Johnson, C., Snider, T., Henk, W., Fulton, R., 1986. A scanning and transmission electron microscopic study of rotavirus – induced intestinal lesions in neonatal gnotobiotic dogs. *Vet. Pathol.* 23:443-453.
- 24) Kapikian, A., Hoshino, Y., Chanock, R., 2001. Rotaviruses. In *Fields Virology* 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A..
- 25) Marshall, J., Healey, D., Studdert, M., Scott, P., Kennett, M., Ward, B., Gust, I., 1984. Viruses and virus – like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 61:33-38.
- 26) Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., 2009. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.028 .
- 27) Martella, V., Pratelli, A., Elia, G., Decaro, N., Tempesta, M., Buonavoglia C., 2001. Isolation and genetic characterization of two G3P5A (3) canine rotavirus in Italy. *Journal of Virological Methods* 96: 43-49.

- 28) Martella, V., Pratelli, A., Greco, G., Gentile, M., Fiorente, P., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2001. Nucleotide sequence variation of the VP7 gene of two G3-type rotaviruses isolated from dogs. *Virus Research* 74: 17-25.
- 29) McNulty, M.S., *et al*, 1980. Viruses and diarrhoea in dogs. *Vet Rec* 106: 350 – 351.
- 30) McNulty, M.S., Allan, G.M., Thompson, D.J., *et al.*, 1978. Antibody to rotavirus in dogs and cats. *Vet Rec* 102: 534 – 535.
- 31) Mohanty, S., 1988. *Virología veterinaria*. Interamericana, México.
- 32) Polanco, G., Baeza, M., Cámara, J., Puerto, M., González, M., Puerto, F., 1997. Transmisión natural de rotavirus entre humanos y animales. *Rev biomed* 8: 9-13.
- 33) Polanco, G., González, M., Manzano, L., Puerto, M., 2004. Rotavirus en animales asintomáticos: detección y clasificación antigénica. *Arch. Med. Vet.* 36: 65-70.
- 34) Prats, A., 2004. *Neonatología y Pediatría canina y felina*. 1<sup>a</sup> Inter- Médica, Buenos Aires, Argentina.
- 35) Quinn, P., Markery, B., 2003. *Elementos de microbiología veterinaria*. Acribia, España.
- 36) Tzipori, S., Makin, T., 1978. Propagation of human rotavirus in young dogs. *Vet. Microbiol.* 3: 55-63.

## ANEXO

### ➤ EXTRACCION DE ARN VIRAL

#### ❖ Solución "A" (lisis) 5X

- Disolver en 20ml de agua bidestilada.

Trisma base	BIO-RAD	1.64g
EDTA (Etil diamino tetraacetato)	J.T. Baker	1.40g
SDS (Duodecil sulfato de sodio)	BIO-RAD	0.65g
NaCl	J.T. Baker	2.0g

- Agregar 0.65ml de Mercaptoetanol (BIO-RAD).
- Aforar con 50ml de agua bidestilada.

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

- Disolver en 100ml de Tris base 1 molar con ph de 8.1.

Fenol	J.T. Baker	120g
8- Hidroxiquinoleina	MERCK	0.12g

- Mantener en agitación por 24hrs.
- Dejar separar la fase fenólica de la fase acuosa y cambiar el Tris por un nuevo Tris base 1 molar ph 7 (100 ml).
- Mantener en agitación por 24hrs.

- Nuevamente dejar separar la fase fenólica de la fase acuosa y cambiar el Tris por un nuevo Tris base 1 molar ph 7 (100ml).
- Agitar durante 24 hrs. Y realizar esta serie de cambios hasta obtener en la fase acuosa un ph entre 7.0 – 7.2 .

❖ Solución “C”

Cloroformo (J.T. Baker).

➤ **GEL DE POLIACRILAMIDA, CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO (PAGE)**

❖ Suspensión de acrilamida 30%, Bis- acrilamida 0.8%

Acrilamida	SIGMA	30g
Bis- acrilamida	SIGMA	0.8g
Agua desionizada cbp		100ml

❖ Persulfato de amonio al 2%.

Persulfato de amonio	SIGMA	0.2g
Agua desionizada cbp		10ml

❖ TEMED (BIO-RAD).

❖ TRIS abajo (Regulador Tris 0.5M pH 6.8)

Trizma base	BIO-RAD	6.05g
Agua desionizada cbp		100ml

\*Se ajusto el pH a 6.8 con HCl 3N.

❖ Glicerol- Azul de Bromofenol (marcador de corrimiento)

Tris HCl pH 6.8	JT.Baker	2.5ml
Glicerol	BIO-RAD	5.8ml
Azul de Bromofenol		5.0mg
Agua desionizada cbp		50ml

❖ Solución “D”(Buffer de glicina de corrimiento)

Trizma base	BIO-RAD	3.0g
Glicina	BIO-RAD	18.7g
Agua desionizada cbp		1000ml

“Preparación del gel de poliacrilamida”

Reactivos	Gel (PAGE) al 5%
Sol. Acrilamida- bisacrilamida	1.32ml
Buffer Tris abajo	2ml
Agua destilada	4.6ml
Persulfato de amonio al 2%	0.5ml
TEMED	10 $\mu$

➤ **FIJACION Y TINCION DE GEL**

❖ Solución “E” 10X (Solución fijadora).

Ácido acético	J.T.Baker	3ml
Etanol	MERCK	287ml

❖ Solución "F" (Tinción).

Nitrato de plata	SIGMA	0.46g
Agua desionizada cbp		250ml

❖ Solución "G" (Reveladora).

Hidróxido de sodio (NaOH) al 3% [1.5g cbp 50ml]	J.T.Baker	50ml
Formaldehído al 37%	J.T.Baker	0.4ml

❖ Solución "H" (Paro)

Ácido acético glacial 1%

Ácido acético glacial	J.T.Baker	0.5ml
Agua destilada		50ml