

29
2 Ejempl.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

INTENTO DE AISLAMIENTO DE ROTAVIRUS Y PARAROTAVIRUS A PARTIR DE HECES DE LECHONES DIARREICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
ALBERTO RUIZ MORALES

DIRECTOR: MVZ., M. Sc. PhD. Antonio Morilla González.

1 9 8 4



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.

CONTENIDO

	Pág.
I. Introducción	1
1. Clasificación	2
2. Propiedades fisicoquímicas y relaciones antigénicas.....	2
3. Patogenia	4
4. Signos clínicos y lesiones	5
5. Diagnóstico	6
II. Objetivos	8
III. Material y métodos	9
A. Contrainmunolectroforesis	11
B. Microscopia electrónica	14
C. Rotaforesis	15
IV. Resultados	22
V. Discusión	32
VI. Literatura citada	35

I. INTRODUCCION

Los virus que más frecuentemente están asociados a las diarreas en los cerdos son los Coronavirus de la Gastroenteritis Transmisible de los cerdos (GTC) (21,39) de la Diarrea Epidémica, los Rotavirus (RV) (24,32,34,60) y ultimamente los Pararotavirus (PRV) (4,6,8,52). Existen otros virus menos frecuentes, pero quizá no menos importantes, como son los Astrovirus (6) y los Calicivirus (6,52).

En México actualmente no existen reportes en la literatura sobre brotes de diarrea en cerdos en los que estén involucrados los RV o los PRV. En este trabajo se describe el aislamiento de estos dos virus a partir de heces de lechones con diarrea.

Los RV se han involucrado como causantes de diarrea en diferentes especies animales (3,20,24,28) incluyendo a los humanos (13,22,23,27,29). Los primeros informes sobre el aislamiento de los RV en los cerdos, fueron hechos por Woode y Bridger en 1975 quienes describieron su patogénesis (59). Posteriormente los RV se aislaron en Australia (45), los Estados Unidos (3,32) y el Reino Unido (34); en la actualidad se han detectado en varias partes del mundo. Durante varios años se dificultó el cultivo de estos virus en sistemas "in vitro" (24) pero al adicionar pancreatina o tripsina al medio de cultivo, se favoreció la replicación de estos virus (60). Este hecho vino a acelerar el conocimiento de los RV, tanto en el aspecto molecular como serológico.

En 1982 Bohl y Bridger separadamente, informaron la presencia de virus semejante a RV en contenidos intestinales y heces de cerdos con diarrea, por lo que provisionalmente les denominaron Pararotavirus (PRV) (4) o Rotavirus porcino antigénicamente diferentes (8). Otros autores han detectado PRV en la especie humana (19,42,48), y en aves (35) aunque existe discrepancia en cuanto al nombre con que se refieren. En este trabajo se usará el término (PRV) cuando se refiera a este probable nuevo grupo de virus, pero teniendo

en mente que todavía no se ha decidido sobre su status taxonómico. Los PRV, a diferencia de los RV, no se han podido reproducir en sistemas "in vitro" a pesar de la adición de pancreatina al medio (4); además, debido a que hasta últimas fechas se han empezado a detectar, los conocimientos que se tienen actualmente sobre su importancia epizootiológica es muy limitada.

1. Clasificación

Los RV se han clasificado dentro de la familia Reoviridae, género Rotavirus; en esta misma familia están incluidos además los géneros Reovirus, Orbivirus, Phytoreovirus, Fijivirus y Cypovirus (10,29,55,40). Como anteriormente se mencionó para el caso de los PRV no se ha dado actualmente una decisión oficial sobre un status taxonómico pero pudiera pensarse que por las características que estos virus presentan se lleguen a considerar como un subgrupo del género Rotavirus o como un nuevo género de la familia.

2. Propiedades fisicoquímicas y relaciones antigénicas

Con la importante contribución del microscopio electrónico a los estudios que se han venido realizando sobre los diversos grupos de virus involucrados en las causas de díarrea en diferentes especies animales, se ha optado por nombrarlos de acuerdo a la morfología que estos presentan (24). Por lo que toca a los RV, en 1974, Flewett (25) sugirió el nombre de Rotavirus del latín rota (rueda) a los virus que por tinción negativa presentaban una morfología semejante al de una rueda; otros investigadores se han referido a estos virus como de la Gastroenteritis Infantil (grupo Orbivirus) (36), o como agentes similares a Reovirus (34,41,45). Actualmente existen evidencias de las diferencias tanto moleculares como serológicas entre Rotavirus, Paramotavirus, Reovirus y Orbivirus (4,23,29,46,49,52). Los RV poseen una morfología icosaédrica y se pueden observar al micros

copio electrónico como partículas con una sola cápside (cápside interna), con un diámetro aproximado de 55-60 nm, y tienen una densidad de 1.38 gr/ml en gradientes de cloruro de cesio (49,60). Es más común observar a los RV con cápside doble (cápside externa) con un diámetro promedio de 65-70 nm que poseen una densidad de 1.36 gr/ml en el mismo tipo de gradiente (29,49,60). Se ha demostrado que entre los RV de diferentes especies animales existe un grupo antigénico común asociado a la cápside interna (5,2036,44,52,61). Parece ser que la infectividad de estos virus en cada especie está asociada exclusivamente con las partículas con cápside externa mientras que los virus que sólo poseen la cápside interna probablemente no tienen poder infectante. Trabajos que se han realizado con el RV SA11 de Simio, han demostrado que poseen cinco proteínas estructurales VP1, VP2, VP3, VP6 y VP7 de las cuales VP1, VP2 y VP6 se encuentran en la cápside interna, mientras que las otras dos VP3 y VP7 están en la cápside externa (1,18). Cuando se adiciona tripsina al medio, para simular las condiciones presentes en el intestino delgado, el VP3 se rompe para formar dos productos finales que son VP5 y VP8 respectivamente; parece ser que estos sirven como receptores para unirse y penetrar a las células (18).

En relación a los PRV estos también tienen morfología icosaédrica y se presentan en las dos formas, y con los mismos diámetros que los RV por lo que a nivel de microscopía electrónica son prácticamente indistinguibles (19,52).

En relación a antígenos comunes entre los diferentes aislamientos, parece ser que casi no existen, ya que solo en un caso se ha demostrado reacción cruzada entre dos cepas (4). En todos los aislamientos de PRV se ha observado que no cruzan antigénicamente con los RV de varias especies, ni con Reovirus y Orbivirus

por lo que se ha sugerido que los PRV pertenecen a un grupo diferente, aunque algunos autores lo incluyen como una variedad de RV (4, 6, 8, 35, 42, 48, 52).

Tanto los RV como los PRV poseen un genoma compuesto por 11 segmentos de ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) (4, 8, 12, 16, 19, 35, 42, 49, 56) que puede ser extraído con fenol saturado, dodecil sulfato de sodio o con 2 mercaptoetanol. Cuando se hace la electroforesis del ARNdc en gel de poliacrilamida, los segmentos migran en forma característica por lo que es fácil de distinguir entre los RV y los PRV (4, 8, 19, 23, 35, 48). Los RV son resistentes a los ácidos y álcalis en un rango de pH 3-9, así como a temperatura de 56°C durante 15 minutos y por lo menos de 7 a 8 meses a 18-20°C. Se inactivan con etanol al 70% e hipoclorito al 1% (60).

3. Patogenicia

Desde el punto de vista anatomofisiológico, la mucosa del intestino delgado está conformada por las vellosidades y las criptas que están cubiertas por células epiteliales que intervienen en el proceso digestivo del intestino. En la región distal de las vellosidades se encuentran células encargadas de la absorción de los nutrientes, mientras que en las criptas las células secretan fluidos provenientes de la sangre hacia el lumen intestinal. Normalmente la absorción por parte de las células distales es semejante a la secreción de las criptas; a esto se debe en gran parte que las heces presenten consistencia normal.

Los RV y los PRV atacan a las células epiteliales de las vellosidades y dependiendo de su patogenicidad pueden provocar diferentes grados de descamación celular, atrofia y disminución de la absorción de líquidos y nutrientes (3, 4, 38, 41, 45, 51). Al encontrarse estas sustancias en la luz del intestino acarrear por efecto osmótico

fluidos y electrolitos del animal lo que se manifestará clínicamente por diarrea y la consecuente deshidratación (4,24,58,60). Entre mayor sea la descamación celular, mayor será la probabilidad de que el animal muera.

4. Signos clínicos y lesiones

La propogación de los RV y PRV entre los animales es por vía fecal-oral.

Los lechones infectados de manera natural y lechones infectados experimentalmente muestran signos clínicos similares dentro de las primeras 16 a 24 horas de la infección (3,4,7,33); generalmente hay depresión, desgano al movimiento y vómito ocasional inmediatamente después de la alimentación (4,24,60). El color y la consistencia de las heces varía de amarillo a verdoso y puede ser acuosa, semisólida o pastosa dependiendo en gran parte de la dieta. La mortalidad de los animales es variable según la patogenicidad del virus; cuando ocurre, generalmente es entre los 2 y 4 días después de que ha empezado la diarrea y es debida a la deshidratación severa y al síndrome de mala absorción que impide que los animales se nutran (60).

A la necropsia los intestinos aparecen con las paredes delgadas, transparentes y pueden contener más fluido del usual. En cortes histológicos hay acortamiento de las vellosidades que van desde el duodeno al íleon de acuerdo a la severidad de la infección (4,11,38,41,51). En ciertas áreas, las lesiones pueden estar limitadas a la pérdida de unas pocas células en el extremo de la vellosidad acompañada por infiltración de células polimorfonucleares (4,38). Las infecciones en el cerdo provocadas por RV, PRV y coronavirus de la Gastroenteritis Transmisible en su forma enzoótica pueden ser confundidas clínicamente sin embargo, la duración de la diarrea, la deshidratación y las pérdidas por muerte son más elevadas cuando el

agente responsable es el coronavirus.

5. Diagnóstico

En los problemas de diarrea es indispensable el conocimiento de los agentes etiológicos involucrados, pues de otra manera no se podrá realizar un tratamiento y control adecuado. Se ha observado que un mismo microorganismo puede causar diferentes grados de intensidad de la diarrea; esto obviamente depende de varios factores tales como la edad del animal, el estado inmunológico específico, la patogenicidad del agente, la dosis, etc.

Es indispensable conocer primeramente algunos datos que pueden ser importantes, tales como la historia del brote y los signos clínicos, para posteriormente recurrir a las técnicas de diagnóstico disponibles. El diagnóstico de los RV y PRV se puede llevar a cabo de manera más exacta si los exámenes se realizan de preferencia en las primeras 24 horas del inicio de las diarreas, ya sea a partir de heces recolectadas del animal infectado o de improntas de mucosa intestinal o fragmentos de intestino delgado congelados que se seccionan con un crióstato, y se tinen con anticuerpos fluorescentes (4, 11, 38, 41, 44, 52); los virus en las heces pueden detectarse por medio del microscopio electrónico pero no se puede diferenciar entre RV y PRV (4, 6, 8, 49, 52). También se puede detectar el ARNdc del virus por extracción con fenol saturado o por cromatografía y posterior electroforesis en gel de poliacrilamida (4, 8, 12, 14, 19, 26, 42, 47, 57); otras pruebas de diagnóstico han sido la contra_{in}munoelectroforesis (5, 20, 29, 36) y las pruebas inmunoenzimáticas como ELISA, entre otras (19, 20, 29). Para poder diferenciar a los RV de los PRV se pueden utilizar técnicas serológicas, inmunoenzimáticas o la electroforesis del ARNdc viral, pero la micros

copia electrónica no es recomendable por las razones expuestas anteriormente.

II. OBJETIVOS

a. Determinar la presencia de Rotavirus y Pararotavirus en heces de lechones diarreicos por medio de diferentes técnicas de diagnóstico como son la contrainmuno-electroforesis, la microscopía electrónica y la electroforesis del ácido ribonucléico viral.

b. Determinar si los virus aislados causan enfermedad en lechones susceptibles.

III. MATERIAL Y METODOS

Muestras de heces.- Se recolectaron un total de 172 muestras de heces de lechones diarréicos de entre 2 y 4 semanas de edad sospechosos de estar infectados por RV o por PRV de las cuales 58 fueron tomadas al azar en diferentes granjas del país (Grupo 1) y 114 se obtuvieron de un brote de diarreas ocurrido en Texcoco, Edo. de México (Grupo 2). Las muestras se recolectaron en frascos de vidrio de boca ancha y algunas en bolsas de nylon; estas se mantuvieron a -20°C hasta aue se analizaron por contraínmunoelectroforesis (CIE), microscopía electrónica (ME) y electroforesis del ARNdc viral o Rotafóresis (RF).

Animales.- Para el aislamiento y pases de los virus se utilizaron un total de 21 lechones de 1 día de nacidos, de los cuales 16 fueron privados de ingerir calostro y 5 se dejaron calostrar. Los animales se mantuvieron en condiciones asépticas en cajas de aislamiento y fueron alimentados con leche maternizada (Nestrum) con Nitrofuracín (NFZ-Soluble concentrado; Labs. Norwich pharacal CO. de México), a razón de 1.5 gr/lit 3 veces al día.

Tratamiento de las muestras

Purificación de los virus para la prueba de CIE.- A 2-3 ml de heces se les adicionó un volumen igual de solución salina fisiológica (SSF) se agitó durante 2 minutos en un vortex y se agregó un volumen de 5 ml de Freón TF (Lab. Unión Carbide), la solución fue nuevamente agitada durante 15 minutos y se centrifugó a $1200 \times g$ a 4°C durante 60 minutos. La fase acuosa fue extraída y a cada ml se le agregó 0.19 ml de Polietilenglicol 6000 (PEG) (Lab. Sigma) al 50%. Nuevamente se agitó la mezcla en un vortex durante 2 minutos y se incubó a 4°C durante toda la noche; se centri

fugó a 33000 x g a 4°C durante 75 minutos y el precipitado obtenido fue resuspendido en 0.3 ml de SSF; esto fue usado como antígeno viral (12).

Purificación de los virus para la prueba de ME.- Se utilizaron dos técnicas :

a. Purificación con baja y alta velocidad.- Se tomaron 2 ml de la muestra de heces y se adicionó un volumen igual de SSF; después de 2 minutos de agitación en un vortex se sometió a sonicación a 20,000 ciclos/seg durante 10 minutos; posteriormente se centrifugó a 33,000 x g a 4°C durante 75 minutos, una vez concluida la centrifugación el sedimento se desechó y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 80000 x g a 4°C durante 75 minutos; el sedimento obtenido se suspendió en 0.3 ml de agua bidestilada quedando listo para ser teñido con ácido fosfotungstico.

b. Purificación con una variante de la técnica de baja y alta velocidad.- Se tomaron 2 ml de heces y se adicionó un volumen igual de SSF; después de 2 minutos de agitación en un vortex se sometió a sonicación a 20,000 ciclos/seg durante 10 minutos, posteriormente se agregó 5 ml de Freón TF y se agitó vigorosamente durante 15 minutos; se centrifugó a 33,000 x g a 4°C durante 75 minutos, la fase acuosa se extrajo y se agregó 0.19 ml de PEG al 50% por cada ml de fase acuosa obtenida; se incubó a 4°C durante toda la noche y se centrifugó a 80,000 x g a 4°C durante 75 minutos; el sedimento obtenido se suspendió en 0.3 ml de agua bidestilada quedando listo para ser teñido con ácido fosfotungstico.

Extracción del ARNdc viral para la prueba de RF.- Se tomó 1 ml de la muestra de heces, se agregó 1 ml de SSF y se sometió a agitación durante 2 minutos. A partir de esta solución se tomó una alícuota de 0.2 ml y se le adicionaron 0.2 ml de una solución conteniendo dodecil sulfato de sodio (DSS) al 6%, 2-mercaptoetanol al

0.6% y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 36mM (12,26); posteriormente se agregaron 0.2 ml de fenol saturado y se agitó durante 2 minutos; inmediatamente después se agregaron 0.2 ml de cloroformo y se agitó nuevamente. Una vez concluida la agitación, se sometió a centrifugación a 1,200 x g a 4°C durante 15 minutos para separar la fase acuosa que contiene el ARNdc viral.

Descripción de las 3 técnicas usadas en el diagnóstico.

A. Contrainmunolectroforesis (CIE)

Fundamento.- Se basa en que al mezclar el antígeno viral con una solución amortiguadora de pH 8.6, este se carga negativamente y tenga afinidad por el ánodo. Esta misma solución amortiguadora se usará para preparar una fase sólida alcalina de agarosa sobre la cual el antígeno se someterá a un cierto voltaje frente a un anticuerpo específico. En estas condiciones las gammaglobulinas prácticamente no están cargadas por lo cual solo serán arrastradas por la fuerza electroosmótica de la fase sólida hacia el cátodo, para formar en su encuentro con el antígeno una banda de precipitación (30).

Material utilizado:

- Aparato completo para electroforesis (Horizontal)
- Portaobjetos limpios y desengrasados
- Agarosa
- Azida de sodio 0.5%
- Sol. amortiguadora de Barbituratos 0.1M pH 8.6, fuerza iónica 0.05 (Labs. Sigma)
- Suero hiperinmune anti-rotavirus bovino*

* obtenido de terneras gnotobióticas en la U. de Nebraska, U.S.A. y proporcionado amablemente por el Dr. Alfonso Torres-Medina.

- Antígeno viral problema
- Control positivo: antígeno viral de rotavirus bovino *
- Control negativo, SSF

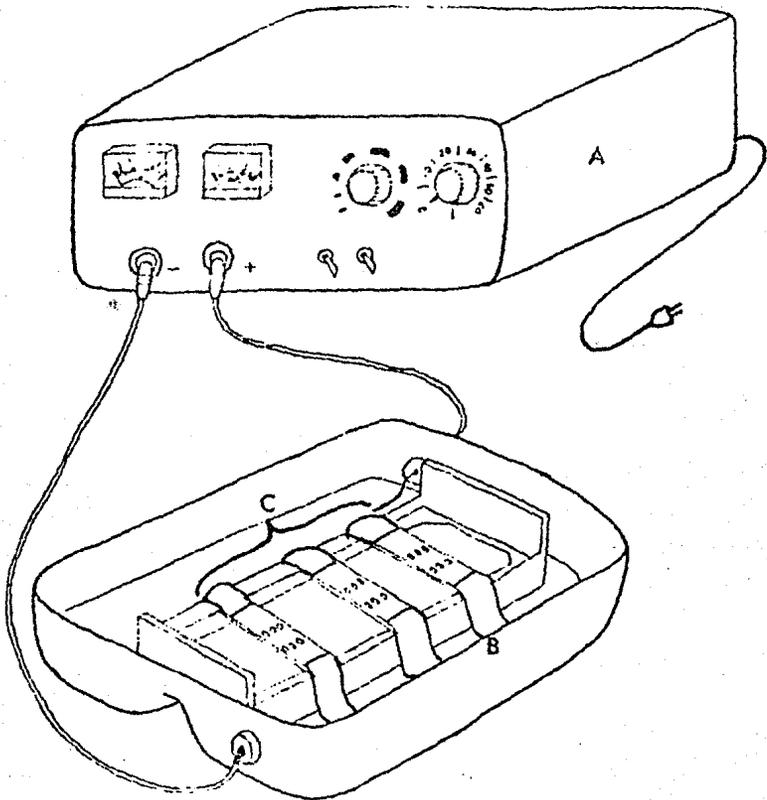
Procedimiento

1. Preparar una solución al 1% de agarosa disuelta en un solvente formado por una parte de agua destilada y otra de solución amortiguadora, favoreciendo la disolución de la agarosa por calentamiento (2,36).
2. Verter cuidadosamente y con una pipeta solución de agarosa sobre el portaobjeto, procurando que este último quede cubierto completamente; dejar gelificar a temperatura ambiente (2).
3. Sobre la agarosa hacer perforaciones circulares de aproximadamente 2 mm de diámetro por pares dejando una separación de 5 mm entre cada perforación (2,36).
4. Verter suficiente solución amortiguadora al compartimiento de cada polo en la cámara para electroforesis, cuidando que los polos queden sumergidos, posteriormente sobre el separador de los compartimientos colocar horizontalmente y en serie los portaobjetos preparados.
5. Cerrar el circuito con cintas de papel filtro humedecidas con solución amortiguadora (como se muestra en la figura 1) y conectar los polos a la fuente de poder.
6. Prender la fuente de poder y ajustar la corriente a 6 - 8 mAmp por cada portaobjetos durante 15 minutos con el fin de homogenizar el sistema y apagarlo (2).
7. Diluir 1:2 los antígenos virales con la solución amortiguadora y depositar separa-

* obtenido de terneras gnotobióticas en la U. de Nebraska, U.S.A. y proporcionada amablemente por el Dr. Alfonso Torres-Medina.

Figura 1

Representación esquemática del aparato utilizado para la contraímmunoelectroforesis



A fuente de poder

B cámara de electroforesis

C laminillas con agarosa

damente una pequeña alícuota en diferentes perforaciones cercanas al cátodo (-); anotando su respectiva posición, mientras que el antisuero deberá ser depositado en los polos opuestos cercanos al ánodo (+) (20,36).

8. Aplicar nuevamente la misma intensidad de corriente que en el punto 6 pero ahora durante 60-90 minutos.

9. La lectura se hace en cámara de fondo oscuro.

B. Microscopía electrónica (ME)

Dentro de las técnicas para observar partículas virales al ME están la de sombreado con tetraóxido de osmio, la tinción positiva con acetato de uranilo y la más común, la tinción negativa con ácido fosfotungstico (37,43).

Tinción negativa con ácido fosfotungstico

Fundamento.- Se basa en la utilización de sales pesadas como el ácido fosfotungstico o el fosfotungstato de sodio, que tienen la capacidad de penetrar en los espacios de la estructura conformacional del virus provocando una imagen oscura al ser irradiados por una fuente de electrones.

Materiales utilizados

- Microscopio electrónico Phillips ME 300
- Acido fosfotungstico al 2%, pH 7
- Formvar al 2.5% en dicloroetileno
- Rejillas de cobre
- Nebulizador
- Virus semipurificado
- Cajas de Petri

- Pinzas
- Papel filtro
- Portaobjetos limpios y desengrasados
- Cubeta de vidrio de boca ancha

Procedimiento

1. Sumergir un portaobjetos limpio y desengrasado en la solución de formvar al 2,5% durante 10 segundos y sacarlo.
2. Ponerlo en posición vertical y dejarlo secar.
3. Raspar los bordes del portaobjeto con el fin de despegar las orillas de película de formvar.
4. Llenar la cubeta con agua destilada de preferencia fría hasta el ras e ir sumergiendo suavemente el portaobjetos con la película de formvar impregnada; se observa que la película queda sobre la superficie del agua.
5. Con las pinzas especiales depositar sobre ella las rejillas de cobre; rápidamente se adhieren a esta película.
6. Con un pedazo de parafilm recuperar la película completa y se deja secar.
7. Recolectar las rejillas y ponerlas sobre papel filtro, fijo.
8. A partir del purificado viral preparar una dilución 1:2 con el ácido fosfotungstico y depositar esta solución en un nebulizador.
9. Con el nebulizador se realizan atomizaciones sobre las rejillas de cobre.
10. Se deja secar en caja de Petri cerrada y posteriormente se observan al ME.

C. Rotaforesis (RF)

Esta es una técnica relativamente nueva, posee una gran sensibilidad y es de

gran valor para el diagnóstico de los RV y PRV.

Fundamento.- Está basada en someter a electroforesis el extracto purificado de ARNdc viral que está compuesto de 11 segmentos de diferente peso molecular que dan un patrón de migración electroforética característico.

Material utilizado

- Aparato completo para electroforesis (Vertical)
- Centrífuga
- 2 vidrios lisos de 12 x 16 cm limpios y desengrasados
- 2 separadores de plástico de 2 x 12 cm
- 1 peine de plástico de 20 postes de 2 x 12 cm
- recipiente de vidrio
- guantes para cirugía
- fenol saturado
- Cloroformo
- Mezcla glicerol-bromofenol
- Sol. de poliacrilamida al 30% (acrilamida-bisacrilamida)
- TEMED (N,N,N', N' - tetrametiletilendiamina)
- Persulfato de amonio al 10%
- dodecil sulfato de sodio (DSS) al 10%
- Tris (hidroximetil-aminometano)
- Sol. Tris amortiguadora, 1.5M pH 8.8
- Sol. Tris amortiguadora 0.25M pH 6.8
- glicina

- metanol
- ácido acético
- nitrato de plata 20 mM
- NaOH 5M
- Formaldehído
- Extracto de ARNdc viral problema
- control positivo, extracto de ARNdc viral de Rotavirus SA11 de simio*
- contro negativo, fenol saturado

Procedimiento

1. En una superficie plana engrasar moderadamente los 2 separadores y depositarlos a lo ancho de los extremos de uno de los vidrios. Posteriormente a manera de emparedado depositar sobre estos, el otro vidrio procurando que formen un espacio entre ellos y sus extremos coincidan perfectamente; colocarlos sobre la cámara para electroforesis como lo indica la figura 2 y cerciorarse que no existan fugas.

2. En un matraz Erlenmeyer de 125 ml preparar una mezcla de la siguiente manera:

7.5 ml de sol. Tris amortiguadora, 1.5M pH 8.8

12.2 ml de agua destilada

10.0 ml de solución de poliacrilamida al 30%

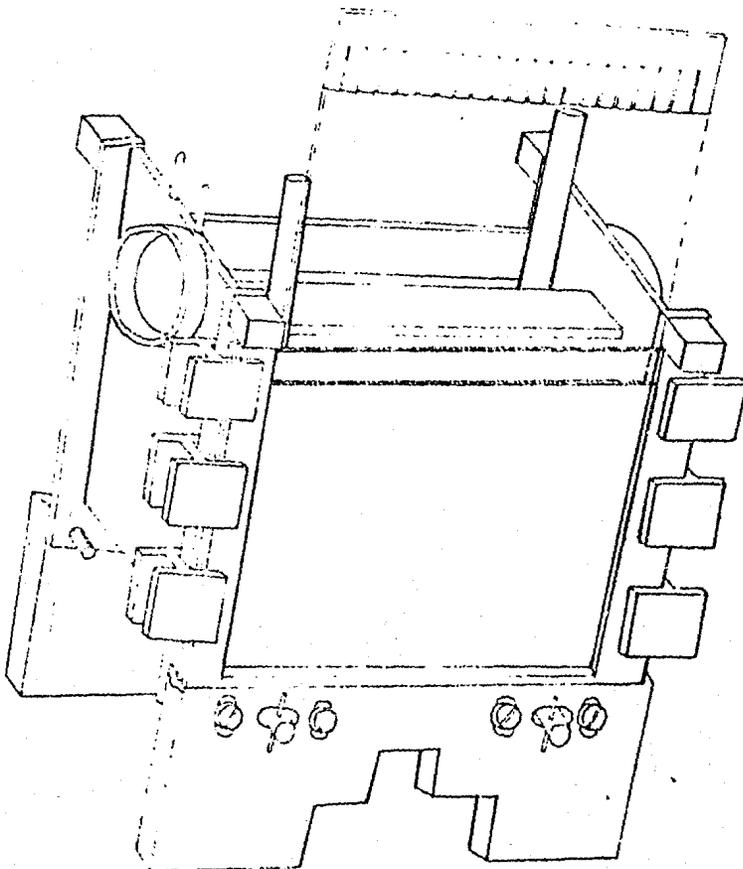
300.0 ul de Persulfato de Amonio al 10%

15.0 ul de TEMED

con una pipeta depositar esta mezcla hasta llenar aproximadamente 3/4 partes del

* Mantenido en la línea celular MA-104 y proporcionado amablemente por el Dr. Romilio Espejo Torres.

Figura 2
Esquema de la cámara y posición de los vidrios para la elaboración del gel



espacio entre los vidrios y dejar polimerizar a temperatura ambiente .

3. Una vez polimerizado, preparar otra mezcla de la siguiente manera:

7.5 ml de sol. Tris amortiguadora, 0.25M pH 6.8

19.2 ml de agua destilada

3.0 ml de solución de poliacrilamida al 30%

300.0 ul de DSS al 10%

300.0 ul de persulfato de amonio al 10%

15.0 ul de TEMED

y depositarla con una pipeta hasta llenar el espacio sobrante; inmediatamente después insertar sobre este espacio el peine y dejar polimerizar.

4. Se extrae con cuidado el peine quedando así 20 espacios (carriles) libres donde se depositarán las muestras.

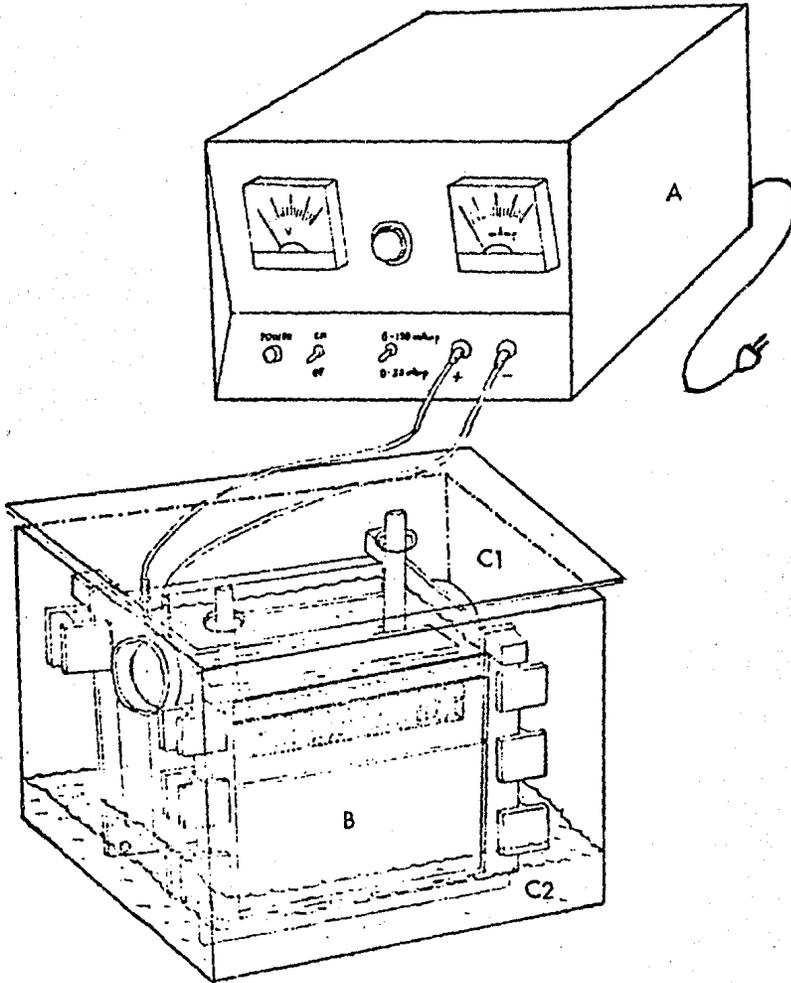
5. Mezclar en un tubo de vidrio 50 ul del extracto de ARNdc viral problema con 10 ul de la solución glicerol-bromofenol (12). Depositar esta mezcla en uno de los carriles del gel, anotando la posición correspondiente. Esto mismo se hace para las muestras que se quieran analizar y se deja un carril libre para depositar una muestra positiva como control.

6. Una vez colocadas las muestras en el gel se quitan las bases de la cámara de tal forma que el extremo inferior del gel quede expuesto a la solución amortiguadora. Posteriormente se introduce al estuche de la cámara como se observa en la figura 3.

7. Se prepara una solución amortiguadora Tris-Glicina-DSS (31) y cuidadosamente se adiciona al interior del estuche de la cámara procurando que el nivel de esta solución haga contacto con la parte inferior del gel (y por lo tanto con el ánodo integrado a la

Figura 3

Montaje del aparato utilizado para la rotación



A fuente de poder

B gel de poliacrilamida

C solución amortiguadora

1 catodo

2 anodo

cámara); posteriormente es llenado el compartimiento que se encuentra en la parte superior de la cámara donde estarán depositadas las muestras (y por lo tanto con el cátodo integrado a la cámara), de tal forma que los polos han quedado cubiertos por la solución amortiguadora pero conectados a través del gel.

8. Se conectan los polos a la fuente de poder, se ajusta la corriente a 20 mA (35V) y se mantiene hasta que el colorante haya migrado a lo largo del gel, hacia el ánodo, y salga.

9. Se apaga la fuente de poder y se saca la cámara del estuche, los vidrios son separados cuidadosamente (usando guantes de cirugía para no manchar de grasa el gel de lo contrario afectará la tinción) y el gel es depositado en un recipiente de vidrio conteniendo etanol, ácido acético y agua destilada (26). Después de media hora esta solución se retira y se adiciona nitrato de plata 20 mM (9,26) y después de media hora esta es retirada.

10. Se agrega suficiente agua destilada al gel para lavar el exceso de nitrato de plata y los segmentos son resueltos; con una solución reveladora (9,12,26,57). Una vez que aparezcan los segmentos la reacción se detiene con ácido acético (9).

IV. RESULTADOS

Las pruebas de diagnóstico se empezaron a hacer con las 58 muestras de heces del Grupo 1; utilizándose primeramente la CIE. Cuando se había analizado un total de 48 muestras de heces se tenían ya 4 muestras (codificadas de acuerdo a la lista de control, con los números: 1 originaria del Edo. de Sonora; 21, originaria del Edo. de Sinaloa. 23, originaria del Edo. de Sonora y 35, originaria del Edo. de Michoacán respectivamente) que había presentado reacción positiva ante los anticuerpos utilizados en la prueba. Por lo que se decidió observarlas al ME. Al realizar los exámenes por ME se observó que tanto en la muestra 1 como en la 23 habían partículas virales; y que predominaban partículas con cápside externa, mientras que en las muestras 21 y 35 no se observó ningún tipo de partícula viral. Para corroborar estos resultados, las 4 muestras fueron tratadas para ser analizadas por RF. Con esta prueba nuevamente se obtuvieron resultados positivos, tanto en la muestra 1 como en la 23, no así en el caso de muestras 21 y 35. Los patrones de migración electroforética de las muestras 1 y 23 fueron diferentes entre ellos mismos y sólo uno (muestra 1) fue característico de RV de acuerdo al patrón formado por el RV SA11 de simio utilizado como control y la literatura existente (12,14,23,24,26,28,29,47,57); mientras que el otro correspondía al de un PRV de acuerdo a la literatura (4,8,19,23,35,42,48). Estos resultados sugirieron que que la CIE estaba dando resultados falsos positivos por lo que no era muy conveniente seguir utilizándola. Debido a la ventaja de poder diferenciar a los RV de los PRV por medio del patrón de migración electroforética las 10 muestras de heces restantes fueron analizadas exclusivamente por RF entre las cuales se logró detectar en la muestra 56 la presencia de RV (muestra originaria de Lagos de Moreno, Jal.).

Respecto a las 114 muestras de heces del grupo 2 provenientes de Texcoco, Edo. de México todas fueron analizadas por RF y algunas por ME. En este grupo se obtuvieron 51 muestras positivas a RV y 2 a PRV lo que corresponde a un 44.73% y 1.75% respectivamente. Hasta aquí se había logrado detectar, de las 172 muestras la presencia de RV en 3 diferentes granjas y la de PRV en 2. Con fines de manejo en el laboratorio se codificaron de la siguiente manera:

Grupo 1

Muestra 1: Rotavirus Sonora-1

Muestra 56: Rotavirus Jalisco-1

Muestra 23: Pararrotavirus Sonora-23

Grupo 2

Rotavirus-Texcoco 1

Pararrotavirus Texcoco-2

Pararrotavirus Texcoco-110

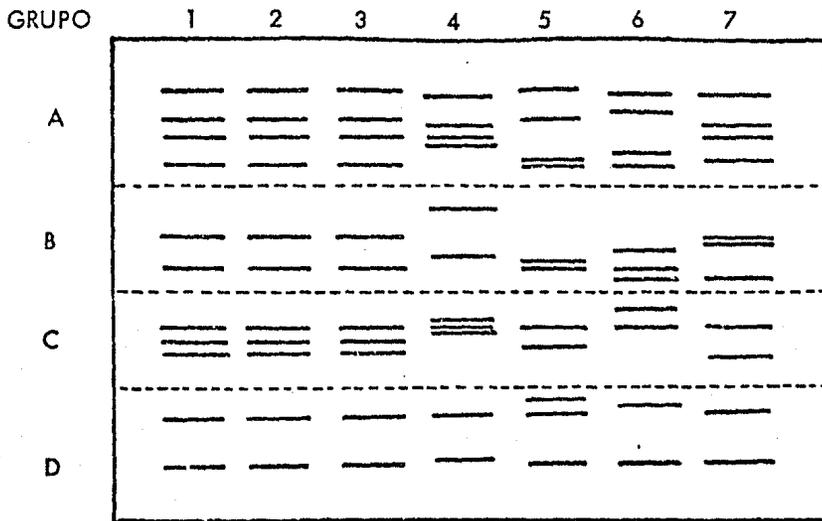
Cabe mencionar que las tres cepas de RV presentaron el mismo patrón de migración electroforética, mientras que en las cepas de PRV el patrón fue diferente entre ellos mismos. Esto se representa en la figura 4.

A partir de esta variedad de aislamientos se seleccionaron arbitrariamente a los RV Sonora-1 y PRV Sonora-23 (cuyas morfologías y patrones de migración electroforética se muestran en las figuras 5, 6 y 7) para probar la patogenicidad de estos virus en lechones susceptibles.

Resultados obtenidos con los RV Sonora-1.- Con la muestra de heces original se realizó una serie de 3 pases en un total de 8 lechones privados de calostro, utilizan-

Figura 4

Representación esquemática de los patrones electroforéticos de diferentes aislamientos de virus en heces de lechones diarréuticos



CARRIL	ROTAVIRUS	CARRIL	PARARROTAVIRUS
1	Cepa Sonora - 1	5	Cepa Sonora - 23
2	Cepa Jalisco - 1	6	Cepa Texcoco -110
3	Cepa Texcoco - 1	7	Cepa Texcoco - 2
4	SA - 11 (origen simio)		

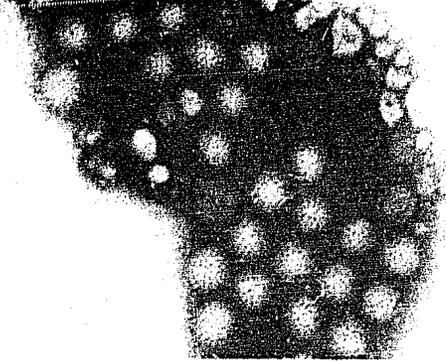


Figura 5. Rotavirus, partículas con doble capsida, en algunas se aprecia la penetración de colorante al genoma.

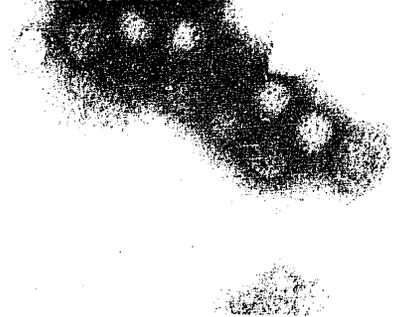


Figura 6. Pararotavirus, partículas con las mismas características morfológicas del rotavirus.

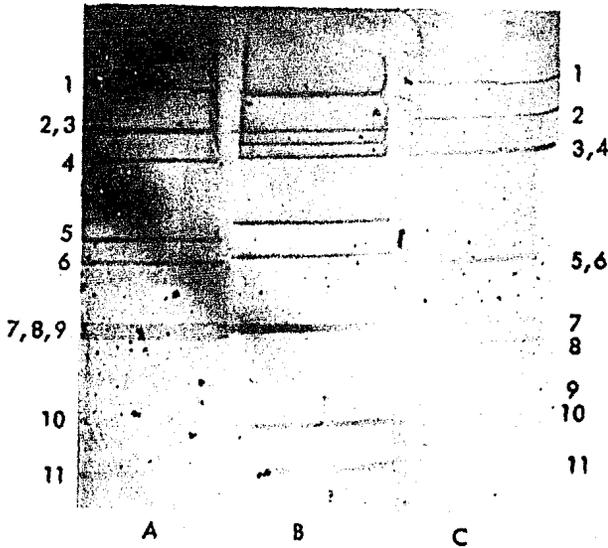


Fig 7. Migraciones electroforéticas de los extractos de ARNda-del RV Sonora-1(A), RV SA11(B) y PRV Sonora-23 (C) respectivamente.

do como inóculo en cada pase 5 ml de una dilución 1:5 de heces en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) administrados por vía oral. Es necesario mencionar que el Dr. Romilio Espejo aisló el RV Sonora-1 en cultivos celulares utilizando la línea MA-104 con adición de tripsina, pero no el PRV Sonora-23.

Se probó la patogenicidad del virus aislado en cultivos celulares utilizando 3 lechones privados de calostro para inocularles por la misma vía, a uno, 9 ml del sexto pase del virus en células MA-104 y a los 2 restantes, 1.5 ml del noveno pase. En todos los pases se anotó el período de incubación del virus, los signos clínicos que presentaron los animales. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en el cuadro 1. Además se midió el grado de excreción de virus (con base en la intensidad que presentaron las bandas en el gel) de acuerdo al tiempo después de la inoculación (Figura 8).

Resultados obtenidos con el PRV, Sonora-23.- A partir de la muestra original se realizó una serie de 2 pases en un total de 3 lechones privados de calostro, anotando en cada pase el período de incubación del virus, los signos clínicos y resultados obtenidos al examinar las heces recolectadas en cada pase por ME y RF. Estos resultados se muestran en el cuadro 2. Con este mismo virus se realizó un tercer pase utilizando 2 lechones privados de calostro y 5 lechones calostrados; se anotó el período de incubación, los signos clínicos y se midió el grado de excreción de virus en las heces.

Los resultados se muestran en el cuadro 3 y la figura 9.

Cuadro 1

Resultado de la inoculación de rotavirus, Sonora-1 mantenida en lechones y en cultivos celulares, a cerdos a 1 día de edad privados de calostro.

Inóculo	Pasos	No. de lechones	Período de In- cubación (hrs.)	Signos clínicos			Microscopía electrónica	Rota- foresis
				Vómito	Diarrea	Muerte		
Heces (a)	Primero	2	18 hrs	2/2	2/2	0/2	ND	ND
	Segundo	4	17 - 18 hrs	3/4	4/4	0/4	+	+
	Tercero	2	17 - 18 hrs	2/2	2/2	1/2	+	+
Cultivo Celular (b)	Sexto	1	17 - 18 hrs	1/1	1/1	0/1	ND	+
	Noveno	2	17 - 18 hrs	2/2	2/2	1/2	ND	+

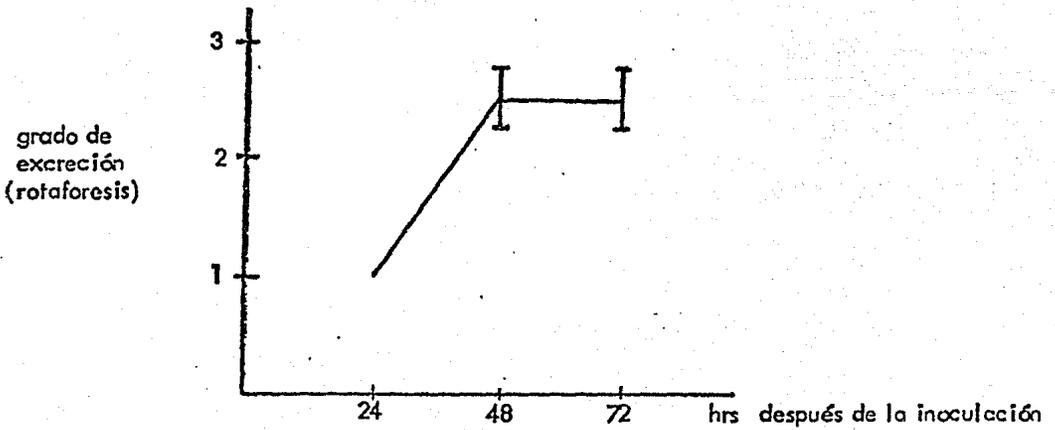
(a) El virus se ha mantenido en lechones no castrados

(b) El virus se ha adaptado a células MA-104

ND = No determinado.

Figura 8

Cinética de la excreción de virus en heces de lechones de 1 día de edad inoculados con Rotavirus Sonora-1



Cuadro 2

Resultados del primero y segundo paso del pararrotavirus porcino Sonora-23 dado en lechones de un día de nacidos privados de calostro.

Pases (a)	No. de lechones	Período de incubación (hrs)	Signos clínicos (b)		Microscopía electrónica	Rotaforesis (c)
			Vómito	Diarrea		
Primero	2	14-18	2/2	2/2	+	+
Segundo	1	18	1/1	1/1	+	+

a) Cada animal fue inoculado con 5 ml de heces diluidas en SSAF (1:5) por vía oral

b) Los animales continuaron con estos signos clínicos hasta las 48 horas después de la inoculación en que se sacrificaron.

c) En todas las muestras de heces el patrón electroforético fué idéntico.

Cuadro 3

Resultados del tercer pase del pararrotavirus porcino Sonora-23 hechas en lechones de un día de nacidos privados o no de calostro.

Lechones	Número	Período de incubación(hrs)	Signos clínicos			Excreción de Virus ^(a)
			Vómito	Diarrea	Muerte	
Sin calostro	2	14-17	1/2	2/2	2/2 ^(b)	2/2
Calostrados	5	17-47	NH	5/5 ^(c)	NH	5/5

a) Se determinó por rotatorésis

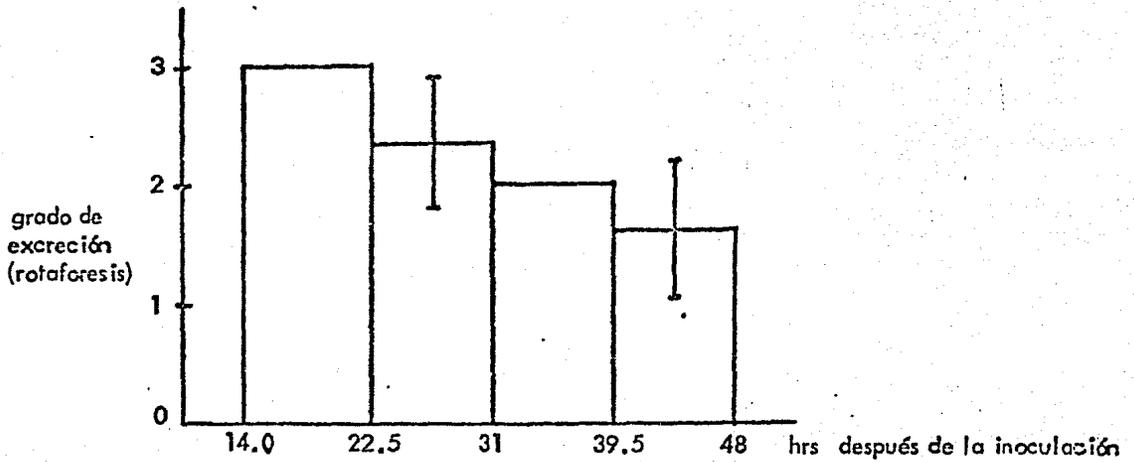
b) La muerte ocurrió a las 33 horas de inoculados

c) Los animales tuvieron diarrea por aproximadamente 24 horas y se recuperaron

NH) No hubo

Figura 9

Cinética de la excreción de virus en heces de lechones de 1 día de edad inoculados con Pararotavirus Sonora-23



V. DISCUSION

El diagnóstico de las enfermedades diarreicas en los cerdos lactantes juegan un papel muy importante debido a que en ellas pueden haber una participación simultánea de varios agentes etiológicos. Algunos de los criterios que se tomaron para considerar las 172 muestras de heces analizadas en este trabajo como sospechosas de contener RV o PRV fueron la edad de los animales enfermos, los signos clínicos que estos presentaban y la alta morbilidad y baja patogenicidad para los animales en la granja.

Como el objetivo de este trabajo era detectar la presencia tanto de RV como de PRV y aislarlos, se utilizaron las 3 técnicas de diagnóstico anteriormente descritas. La técnica de CIE ha sido utilizada para la detección del antígeno viral teniendo la ventaja de poder utilizar un suero hiperinmune anti-rotavirus de cualquier especie ya que cruzan antigénicamente. Según la clasificación de diferentes técnicas para la detección de RV descrita por Kapikian y colaboradores (29) la CIE es considerada como una prueba sensible. Es probable que los resultados falsos positivos obtenidos con esta prueba podrían deberse a que el antígeno viral no estaba realmente purificado o que el antisuero utilizado es poco específico. Respecto a la ME y la RF aunque las 2 presentan una sensibilidad muy semejante según Kapikian y colaboradores, en este trabajo se vió que la RF ofreció mucho más ventajas, algunas de ellas fueron: la no utilización de un aparato considerablemente costoso, no es necesario la utilización de un anticuerpo además de que se pudo diferenciar fácilmente RV de PRV en la misma prueba. En relación al patrón de migración de los 11 segmentos de ARNdc del RV, este puede diferir ligeramente entre otro de la misma especie (14, 15, 16, 17, 27), y hay diferencias más marcadas entre los virus aislados de diferentes es-

pecies (23,27,28,47). Esto se puede observar en los 4 primeros carriles de la figura 4 si se comparan los patrones de RV con el RV SA 11 de simio; sin embargo, se conserva la distribución de los 4 grupos de segmentos representados como A, B, C y D respectivamente lo que los hace característicos. En el caso de los patrones de PRV mostrados en los carriles 5, 6 y 7 respectivamente se observa que existe una gran diferencia en el promedio de la migración de los 11 segmentos tanto entre ellos mismos como del RV SA11 de simio y los diferentes aislados de RV. Esta es una característica de los PRV (4,8). Los segmentos se pueden analizar por grupos; por ejemplo, en el caso del patrón mostrado en el carril 5 el grupo C está conformado únicamente por 2 segmentos, mientras que el grupo D por 3; en el caso del patrón mostrado en el carril 6, el grupo B está formado por 3 segmentos y el C por 2, esto mismo ocurrió con el patrón del carril 7. Es necesario mencionar que no se realizaron pruebas serológicas para comprobar si los 3 virus de PRV cruzan antigénicamente.

Por lo que respecta a la patogenicidad de los RV y PRV se observó que tanto en el caso de animales inoculados con heces y con el RV adaptado en células MA-104, el período de incubación fue el mismo en todos los países. Los signos clínicos fueron idénticos en todos los animales inoculados con RV y PRV siendo semejantes a los que se observan en el campo. A partir de estos resultados puede pensarse que tanto el virus en heces así como el virus adaptado en cultivo celular conservan su patogenicidad, (cuadro 1, 2 y 3). En relación a la patogenicidad del PRV hubo una diferencia importante entre los lechones sin calostrear y calostrados. En los primeros, la enfermedad fue más severa observándose vómito y diarrea mientras que en los animales calostrados presentaron diarrea ligera durante un período de 24 horas y se recuperaron;

esto podría atribuirse a una posible protección por parte del calostro, como se ha sugerido (7,50,53,54,62). El grado de excreción de los virus en las heces se midió por RF y se encontró que dentro del rango comprendido entre las 24 y las 72 horas después de la inoculación es posible detener la presencia de virus en las heces (Figura 8 y 9).

De manera general, los resultados obtenidos muestran que en un brote de diarrea de lechones puede participar tanto RV como PRV y esto se vió en el caso de las muestras del grupo 2. El bajo porcentaje de aislamiento de PRV ha sido reportado también en otros países pero se desconoce el papel que juegan dentro del síndrome diarreico. Es importante considerar la participación de los PRV ya que actualmente se utilizan vacunas comerciales contra RV y como no cruzan antigénicamente, es posible que los brotes de diarrea continuen a pesar de la vacunación (7,39,50).

VI. LITERATURA CITADA

1. ARIAS C.F., S. LOPEZ. y R.T. ESPEJO. 1982. Gene protein products of SA11 simian genome. *J. Virol.* 41: 42-50.
2. BAUTISTA G.C.R., MORILLA G.A. *Inmunología veterinaria manual de laboratorio*, Eds. Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C.
3. BOHLE E.H., E.M. KOLER., L.J. SAIF., R.F. CROSS., A.G. AGNES, y K. W. THEIL. 1978. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 458-463.
4. BOHLE E.H., L.J. SAIF., K.W. THEIL., A. G. AGNES. y R.F. CROSS. 1982. Porcine pararotavirus: Detection, differentiation from rotavirus and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 15: 312-319.
5. BOHAC J. y J.B. DERBYSHIRE. 1975. The demonstration of transmissible gastroenteritis viral antigens by immunoelectrophoresis and counterimmunoelectrophoresis. *Can. J. Microbiol.* 21: 750-753.
6. BRIDGER J.C. 1980. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhea. *Vet. Rec.* 107: 532-533.
7. BRIDGER J.C. y J.F. BROWM. 1981. Development of immunity to porcine in piglets protected from disease by bovine colostrum. *Infec. Immun.* 31: 906-910.
8. BRIDGER J.C. , I.N. CLERKE. , y M.A. McCRAE. 1982. Characterization of antigenically distinct porcine rotavirus. *Infec. Immun.* 35: 1058-1062.

9. BEIDLER J.L., P.R. HILLARD. y R.L. RILL, 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* 126: 374-380.
10. DERBYSHIRE J.B. y G.N. WOODE. 1978. Classification of rotaviruses: Report from the World Health Organization Comparative Virology Program. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 519-521.
11. DEBOUCK P. y M. PENSAERT. 1979. Experimental infection of pigs with belgian isolates of the porcine rotavirus. *Zbl. Vet. Med.* 26: 517-526.
12. ESPEJO R.T., P. ROMERO., E. CALDERON. y N. GONZALEZ. 1978. Diagnóstico de Rotavirus por electroforesis del ARN viral. *Bol. Med. Hosp. infantil.* 35: 323-331.
13. ESPEJO R.T., E. CALDERON., N. GONZALEZ., A. SALOMON., A. MARTUSCHELLI. y P. ROMERO. 1978. Rotavirus gastroenteritis hospitalized infants and young children in Mexico City. *Rev. Lat. Americ. Microbiol.* 20: 239-246.
14. ESPEJO R.T., E. CALDERON., N. GONZALEZ., A. MARTUSCHELLI. y P. ROMERO. 1979. Presence of two distincts types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in México City. *Rev. Lat. Americ. Microbiol.* 20: 239-246.
15. ESPEJO R.T., L.F. AVENDAÑO., O. MUNÑOZ., P. ROMERO., J.G. ETERNOD, S. LOPEZ., J. MONCAYA. 1980. Comparison of human rotaviruses isolated in Mexico City and in Santiago, Chile by electrophoretic migration of their double-stranded ribonucleic acid genome segments. *Infect. Immun.* 30: 342-348.

16. ESPEJO R.T., O. MUÑOZ., F. SERAFIN, y P. ROMERO. 1980. Shift in the prevalent human rotavirus detected by ribonucleic acid segment differences. *Infect. Immun.* 27: 351-354.
17. ESPEJO R.T., E. MARTINEZ., S. LOPEZ. y O. MUÑOZ. 1980. Different polypeptide composition of two human rotavirus types *Infect. Immun.* 28: 351-354.
18. ESPEJO. R.T., S. LOPEZ y C. ARIAS. 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37: 156-160.
19. ESPEJO R.T., F. PUERTO., C. SOLER., N. GONZALEZ. 1984. Characterization of a human pararotavirus. *Infect. Immun.* 44: 112-116.
20. EKERN L.J., I.A. SCHIPPER y K.J. McMAHON. 1981. Neonatal bovine enteritis: Detection of rotavirus by counterimmunoelectrophoresis and enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Comp. Med.* 45: 135-139.
21. ESTRADA C.A., C.E. ENRIQUEZ. 1983. Diagnóstico simplificado de las diarreas infecciosas más comunes en lechones. *Vet. Mex.* 14: 93-102.
22. ECHEVERRIA P., N.P. BLACKLOW., G.G. CUKOR., S. VIBULBANDHITIGIS., S. CHANGCHANALIT., y P. BONTHAL. 1983. Rotavirus as a cause of severe gastroenteritis in adults. *J. Clin. Microbiol.* 18: 663-667.
23. ESTES M.K., D.Y. GRAHAM., D.H. DIMITROV. 1984. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.* 29: 1-22.
24. FLEWETT T.H. y G.N. WOODE. 1978. The rotaviruses. *Arch. Virol.* 57: 1-53.
25. FLEWETT T.H., A.S. BRYDAN., H. DAVIES., G.N. WOODE., J.C. BRIDGER y J.M. DERNICK. 1974. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and new born calves. *Lancet* 2:61-63.

26. HERRING A.J., N.F. INGLIS., C.K. OJH., D.R. SNODGRASS. y J.D. MENZIES. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrilamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16: 473-477.
27. HASEGAWA A., S.MATSUNO., S.INOUYE., R.KONO., Y. TSURUKUBO., A. MUKOYAMA. y Y. SAITO. 1982. Isolation of human rotaviruses in primary cultures of monkey kidney cells. *J. Clin. Microbiol.* 16: 387-390.
28. HOSHINO Y., R.G. WYATT., H.B. GREENBER., A.R. ALIKA., J.FLORES. y A.Z. KAPIKIAN. 1983. Isolation and characterization of na equine rotavirus. - *J. Clin. Microbiol.* 18: 585-591.
29. KAPIKIAN A.Z., H.B. GREENBER., A.R. KALIKA., R.G. WYATT., A.W. KIM., C.D. BRANDT., W.J. RODRIGUEZ., J.FLORES., N.SINGH., R.H. PARROLT. y R.M. CHANOCK. 1981. New development in viral gastroenteritis in acute enteric infection of children. In: *New prospects for treatment and preventions*. T. Home., J. Holmgren., M.H. MERSON., y R. MOLLBY. Eds. 1981. Elsevier North Holland Biomedical Press.
30. KOCHWA S. 1976. Immunoelectrophoresis. In: *Manual of Clinical Immunology*, Edited by N.R. Rose and H. Friedman, American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp 17-35.
31. LAEMMLI U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Natura (London)* 227: 680-685.
32. LECCE J.G., M.W. KING. y R. MOCK. 1976. Reovirus-like agent associated with fatal diarrhea in neonatal pigs. *Infec. Immun.* 14: 816-825.

33. LECCE J.G., D.A. CLARKE., R.K. BALSBAUGH. y D.N. COLLIER. 1983. Effect of dietary regimen on rotavirus-Escherichia coli weaning diarrhea of piglets. *J. Clin. Microbiol.* 17: 689-695.
34. McNULTY M.S., G.R. PEARSON., J.B. McFERRAN., D.S. COLLINS., y G. M. ALAN. 1976. A reovirus-like agent (rotavirus) associated with diarrhea in neonatal pigs. *Vet. Microbiol.* 1: 55-63.
35. McNULTY M. S., G.M. ALLAN., D.TOOD., McFERRAN., y R.M. McCRAKEN. 1981. Isolation from chickens of a rotavirus lacking the rotavirus group antigen. *J. Gen. Virol.* 55: 405-413.
36. MIDDLETON P.J., M.PETRIC., C.MHEWITT., M.T. SZYMENSKY., y J.S. TAM. 1976. Counter-immunoelectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbi group) antigen and antibody. *J. Clin. Pathol.* 29: 191-197.
37. MERCER. H., M.S.C. BIRBECK. 1979 *Manual de Microscopía electrónica para biólogos*. 2a. Ed. H. Blume ediciones España.
38. McADARAGH J.P., M.E. GERGELAND. R.C. MEYER. M.W. JOHN SHOY., I.J. STOTZ., D.A. BENFIELD., R.HAMMER. 1980. Pathogenesis of rotaviral enteritis in gnotobiotic pigs: A microscopy study. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1572-1581.
39. MYERS L.L. y D.R. SNODGRASS. 1982. Colostral and milk antibody titers in cows vaccinated with a modified live-rotavirus-coronavirus vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 486-488.
40. MATTHEWS R.E.F. 1982. *Clasificación y nomenclatura de los virus de vertebr-*

dos. Interviology, Volumen 17 Nos. 1-3.

41. MEBUS C.A., y L.E. NEWMAN. 1977. Scanning Electron Light, and immunofluorescent microscopy of intestine of gnotobiotic calf infected with reovirus-like agent. Am. J. Vet. Res. 38: 553-558.
42. NICOLAS J.C., J.COHEN., B.FORTIER., M.H. LAURENCO., y F. BRICOUT. 1983. Isolation of an human pararotavirus. Virol. 124: 181-184.
43. NUNN R.E. 1976. Microscopía electrónica. Ed. El Manual Moderno S. A.
44. PALMER D.G., J.F.L. PUOLENZ., R.P. WEILENMANN. 1982. Demonstration of rotavirus antigen in trypsin-digested parafin tissue sections by immunofluorescence. Am. J. Vet. Res. 43: 1089-1091.
45. RODGER S.M., J.A. CRAVEN., y J.WILLIAMS. 1975. Detection of reovirus-like particles in intestinal contents of piglets with diarrhea. Aust. Vet. J. 51: 536
46. RODGER S.M., R.D. SCHNAGL., y I.H. HOLMES. 1975. Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin. J. Virol. 16: 1229-1235.
47. RODGER S.M., I.H. HOLMES., y M.J. STUDDERT. 1980. Characteristics of the genomes of equine rotaviruses. Vet. Microbiol. 5: 243-248.
48. RODGER S.M., R.F. BISHOP., y I.H. HOLMES. 1982. Detection of rotavirus-like agent associated with diarrhea in a infant. J. Clin. Microbiol. 16: 724-726.
49. SCHERRER R., J. COHEN. 1978. Structure des rotavirus. Ann. Med. Vet. 122: 323-335.
50. SNODGRASS D.R., K.J. FATHEY., P.W. WELIS., I.CAMPBELL., y A. WHITE-LAW. 1980. Passive immunity in calf rotavirus infections: Maternal vaccination

- increases and prolongs immunoglobulin G 1 antibody secretion in milk. *Infect. Immun.* 28: 344-349.
51. SAIF L.J., E.H. BOHL., E.M. KOHLER., J.H. HUGHES. 1977. Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus an rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am. J. Vet. Res.* 38: 13-20.
52. SAIF L.J., E.H. BOHL., K.W. THELL., R.F. CROSS., y J.A. HOUSE. 1980. Rotavirus-like, calicivirus-like and 23nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.* 12: 105-111.
53. SAIF L.J., D.R. REDMEN., K.L. SMITH., y K.W. THEIL. 1983. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows. *Infect. Immun.* 41: 1118-1131.
54. SAIF L.J., K.L. SMITH., B.J. LANDMEIER., E.H. BOHL., K.W. THEIL., y D. A. TODHUNTER. 1984. Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. *Am. J. Vet. Res.* 45: 49-58.
55. TAXONOMY OF VIRUSES. 1978. The fourth international congress for virology. Edited by R.E.F. Martews.
56. THULESS M.E. 1979. Rotavirus polypeptides. *J. Gen. Virol.* 44: 187-197.
57. THEIL K.W., C.M. McCLOSKEY., L.J. SAIF, D.R. REDMEN., E.H. BOHL., D.D. HANCOCK., E.M. KOHLER., y P.D. MOORHEAD. 1981. Rapid, simple method of preparing rotaviral double stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 14: 273-280.
58. WESTE. S., W.R. TODD., H.S. MASON y J.T. VAN BRUGGEN. 1969. *Bioanál mica médica*, 4a Ed. Interamericana, México, p. 534.

59. WOODE G.N. y J.C. BRIDGER. 1975. Viral enteritis of calves. *Vet. Rec.* 96: 85-88.
60. WOODE G.N. y E.H. BOHL. 1981. Porcine rotavirus infection. In: *Diseases of swine*. Ed. A.D. Leman., R.D. Glock., W. L. Mengeling., R.H.C. Penny., E. Scholl y B. Straw. 5a. Ed. The Iowa state University Press, Ames, Iowa U. s.a. pp. 310-322.
61. WYATT R.G., A.Z. KAPIKIAN., y C.A. MEBUS. 1983. Induction of cross-reactive serum neutralizing antibody to human rotavirus in calves after in utero administration of bovine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 18: 505-508.
62. ZISSIS G., LAMBERT., P. MARBELANT., D. MARISSENS., M. LOBMANN., P. CHARLIER., A. DE LEM., y N. ZYGRAICH. 1983. Protection studies in colostrum-deprived piglets of a bovine rotavirus vaccine candidate using human rotavirus strains for challenge. *J. Infec. Dis.* 148: 1061-1068.