



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

49
29

Rotavirus en ovinos y caprinos:
detección por electroforesis y aislamiento en cultivos celulares.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA

VIRGILIO IRACORTIZ GONZALEZ

ASESORES: DRA. BLANCA LILIA BARRON ROMERO
QBP HUGO GUZMAN CUERVO
QBP GUILLERMO VALDIVIA ANDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZADA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN U. N. A. M.
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR FACULTAD DE ESTUDIOS
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'Ni Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:
"Rotavirus en ovinos y caprinos: detección por electroforesis y aislamiento en cultivos celulares".

que presenta el pasante: Virgilio Irac Ortiz González
con número de cuentas: 7960710-0 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 31 de Octubre de 1995

PRESIDENTE	<u>M.C. Raúl Mar Cruz</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Guillermo Valdivia Anda</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Blanca Moreno Cardenti</u>	

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional de la Ciudad de México, bajo la dirección de la Dra. Blanca Lilia Barrón Romero, QBP Hugo Guzmán Cuervo y el QBP Guillermo Valdivia Anda.

**AGRADECEMOS A LAS SIGUIENTES
INSTITUCIONES SU VALIOSA COLABORACION
PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO DE TESIS:**

-LIQUID CARBONIC de México, S.A. de C.V. por el donativo del bióxido de carbono empleado en el desarrollo de este trabajo.

-CONACYT por el apoyo al proyecto 3071-M que permitió la adquisición del equipo utilizado para la conservación de células y cepas virales.

-ENCB-IPN por el donativo de nitrógeno líquido para la conservación de células y cepas virales.

A mis asesores por su ayuda y orientación en la realización de este trabajo de tesis.

**Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Blanca Lilia Barrón Romero
por su gran apoyo brindado.**

**A todo el personal del
Laboratorio de Virología de la E.N.C.B.,
y a todas las personas que de alguna manera
u otra contribuyeron en la realización de esta tesis
y que sería interminable de mencionar a una por una
(además de que no quisiera omitir a alguna de ellas),
vaya para ellas mi más sincero y caluroso agradecimiento.**

A mis padres

**Sigfrido Ortiz Martinez (q.d.e.p.)
Gloria Gonzalez Vda. de Ortiz
a él por la gran enseñanza legada
a ella por su comprensión y bondad, mil gracias.**

**A mis hermanos
con amor y respeto.**

A Silvia por su amor y comprensión que me ha dado.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVO	10
METAS	11
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	23
DISCUSION	27
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	32

RESUMEN.

La diarrea es un signo de enfermedad muy importante para los humanos así como para los animales, cuya causa es multietiológica. Los rotavirus son una de las causas más importantes de las diarreas infecciosas severas en niños menores de dos años, así como en los animales jóvenes.

También están involucrados en la producción de infecciones subclínicas en humanos y animales adultos, los efectos que producen estas infecciones asintomáticas a corto, medio y largo plazo se desconocen. Se ha venido observando que las enfermedades de tipo gastrointestinal causan pérdidas económicas considerables, no tanto por la mortalidad que se presenta en la población animal, sino por la alta morbilidad que tiene, ya que esto implica la aplicación de programas de sanidad tales como; medicación, cuidados intensivos, así como de vacunación, desparasitación y alimentación. Entre otras condiciones de manejo, lo más importante es el tiempo de recuperación de los animales enfermos para llevarlos hasta el peso ideal para su sacrificio y consumo.

Inicialmente, el estudio detallado del ciclo de infección viral de los rotavirus humanos se desarrolló muy lentamente debido a la dificultad para propagarlos "in vitro". El éxito en la propagación de estos virus resultó de la identificación de una línea celular permisiva para ellos denominada MA-104 (células de riñón de mono rhesus) así como la utilización de tripsina, la cual favorece la replicación viral, presumiblemente esta última circunstancia ocurre en el lumen intestinal durante la infección natural.

Este trabajo tuvo como finalidad poner de manifiesto la presencia del rotavirus en muestras de materia fecal de ovinos y caprinos.

Para llevar a cabo este trabajo, se hizo la detección directa del ácido nucleico viral a partir de las muestras de materia fecal, mediante la observación de los patrones electroforéticos característicos que se obtienen en geles de poliacrilamida.

Las muestras de materia fecal de ovinos y caprinos provinieron de Dolores Estado de Guanajuato, Cuautitlán de Romero Rubio Estado de México y Apasco Estado de Hidalgo. Se colectaron un total de 100 muestras, 22 de las cuales eran diarreicas y provienen de Cuautitlán e Hidalgo. A todas las muestras se les adicionó cloruro de calcio a una concentración final de 1.5 mM. Se les hizo la extracción del RNA viral y el corrimiento electroforético para determi-

nar el electroferotipo, así como la inoculación en cultivos celulares. Las muestras que dieron efecto citopático sugestivo de rotavirus fueron también analizadas por electroforesis.

De las 100 muestras que se analizaron directamente por electroforesis cinco mostraron electroferotipo característico de rotavirus. Después de la inoculación en cultivos de células MA-104 cuatro muestras produjeron efecto citopático (ECP) sugestivo de rotavirus y al analizarlas por electroforesis esas cuatro muestras presentaron el electroferotipo de rotavirus. Demostrando así una correlación entre el resultado de la electroforesis directa de la muestra fecal y el aislamiento en cultivos de células MA-104. De esta manera se logró poner de manifiesto la existencia del rotavirus en la materia fecal de los ovinos y caprinos.

INTRODUCCION.

ASPECTOS HISTORICOS DE LA ENFERMEDAD.

La gastroenteritis por rotavirus es una enfermedad relativamente nueva, con una distribución mundial. Se le ha identificado en E.U.A., Holanda, Francia, Inglaterra, Alemania, Rusia y Japón (3,12,18).

Al agente etiológico se le dió el nombre de rotavirus, porque al observarlo al microscopio electrónico se encontró que tiene una forma que asemejaba a las ruedas de una carreta; del latín rota, rueda (12,18). Recientemente se aisló el rotavirus en países latinoamericanos como; Argentina, Chile, y México (5,11,12,28).

El virus de la diarrea de las terneras de Nebraska (NCDV) fue el primero que se aisló en 1971. El primer aislamiento de rotavirus en ovinos se realizó en Escocia en 1976 (Snodgrass y col., 1976). Posteriormente se reportó la presencia de rotavirus en ovinos en Irlanda del Norte, Japón, Francia, Inglaterra, Gales y Africa. En Chile los rotavirus fueron aislados por primera vez en 1987, por Ramirez y col., a partir de heces de ovinos con diarrea (3,9,12,13,23).

TAXONOMIA DEL VIRUS.

Inicialmente se les describió como a los reovirus (reo-like) según Flewett and Wood. Poco después se propuso que los de origen humano y de ternera fueran incluidos en la familia Reoviridae, como un orbivirus, o como miembros de un grupo separado, proponiéndose el nombre de rotavirus o duovirus (8,9,12,18) Tabla 1.

Tabla 1	
Taxonomía de Rotavirus	
Familia	Reoviridae
Géneros	Rotavirus; virus de la diarrea aguda de los recién nacidos Reovirus; reovirus humano Orbivirus; virus de la lengua azul y de la fiebre por garrapatas de Colorado

Tomado de Melnick, J.L., Prog. Med. Virol. 28: 208, 1982

CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DEL VIRUS.

Son virus icosaédricos, desnudos, que presentan una doble cápside de proteínas y un genoma segmentado de RNA de doble cadena (dsRNA) (3,4,18,21). Los rotavirus miden de 56 a 70 nm, 65 nm en promedio. Tienen un nucleocápside hexagonal. Existen cinco tipos morfológicos pero los que tienen doble cápside son los infectantes. El virus se multiplica y madura en el citoplasma, por lo que las células pueden presentar inclusiones eosinofílicas.

Las partículas virales usualmente se encuentran en vesículas del retículo endoplásmico (12,15,18,21). Contienen RNA formado por once segmentos de doble banda, las partículas completas contienen 9 componentes polipeptídicos con pesos moleculares que varían entre 14,000 y 117,000 (12,17,18,21,24,28,29).

Resisten el éter, cloroformo, fluorocarbón, y a los solventes de lípidos, son estables a pH de 3. En las heces se llegan a detectar títulos virales de 10^7 viriones. Sobreviven 9 meses a temperatura ambiente en la materia fecal y durante una hora a 60°C (12,18,21).

La inmunoelectromicroscopía y la electroforesis en geles de poliacrilamida del dsRNA viral han sido los métodos primarios de identificación de la infección por rotavirus. Los rotavirus fueron aislados de muestras de materia fecal obtenida de ganado con diarrea. Los virus fueron adaptados y propagados en cultivos de células MA-104 en presencia de 0.5 µg de tripsina por mililitro (5,15,22,24,28).

En los ovinos el rotavirus se detectó por el método de ELISA y se aisló en células MA-104, a partir de materia fecal en Chile, (1988) (11).

La cápside exterior, tiene una superficie plana y contiene dos antígenos que participan en la neutralización VP7 y VP4. La cápside interior, tiene una superficie rugosa y contiene las proteínas esenciales (VP1,VP2) y la principal proteína estructural VP6 (4,10,14). En función de las proteínas VP6 y VP7 se han clasificado a los rotavirus de la manera indicada en la Tabla 2.

Se ha demostrado que el ensamble de la doble cápside del rotavirus puede ser un proceso dependiente del calcio y de un pH alcalino (pH de 8 y 50mM de CaCl₂) (25). Los rotavirus presentan la propiedad de hemaglutinación (HA), la cual está asociada a la proteína VP4. Los rotavirus de simio y bovino hemaglutinan con eritrocitos frescos de varios animales y esta reacción no es afectada por la activación con tripsina. Los rotavirus ovinos aglutinan eritrocitos de pollo,

Tabla 2
Clasificación de Rotavirus

Clasificación		Humano	Animal
Grupos (determinados por VP6)	A	+++*	+++
	B	++	++
	C	+	++
	D	-	+
	E	-	+
Subgrupos (determinados por VP6 solo para Gpo.A)	I	+	+++
	II	+++	+
	I+II	-	+
	no I, no II	-	+
Serotipos G (determinados por VP7, solo para Gpo. A)	1	++ WA,D,M37**	+ C60(po)***
	2	++ DS1, S2	+ C135(po)
	3	+ P	++ SA11(si) RRV(si)
	4	+ ST3, VA70	+ Gottf.(po)
	5	-	+ OSU(po)
	6	-	++ UK, RF, NCDV(todos,bo)
	7	-	+ Ch2(p)
	8	+ B37, 69M	-
	9	+ W161, K8	-
	10	+	+ B223, 61A(bo)
	11	-	+ YM(po)
	12	+ L26	-
	13	-	+ L338(eq)
	14	-	+ FI23(eq)

* = +++ muy frecuente, ++ frecuente, + raro, - no determinado
 ** = Ejemplos de cepas
 *** po = porcino, si = simio, bo = bovino, p = pollo, eq = equino
 U. Desselberger, Medical Virology, Vol. 3:15-21 (1993)

cobayo, conejo, humano (grupo O) y ovino; no aglutinan eritrocitos de bovino, equino, porcino, y caprino. El mayor título hemaglutinante se obtiene en valores de pH entre 6.5 y 8.5; y éste no varía al incubarse la reacción a 4°C o 37°C según Makabe y col., 1985 (6,24). La mucina y las glicoproteínas pueden inhibir la replicación viral (32).

CARACTERISTICAS DE LA ENFERMEDAD.

OCURRENCIA Y TRANSMISION.

Los rotavirus son de los principales agentes etiológicos no bacterianos que causan gastroenteritis en la mayoría de las especies animales jóvenes, incluyendo al hombre. Es una enfermedad de distribución mundial, infecciosa de tipo recurrente cuya patogénesis se circunscribe al tracto digestivo y se manifiesta con el signo de diarrea (3,4,5,7,12,16,17,18,21,24,26,28).

Experimentalmente se ha demostrado que los rotavirus aislados de algunas especies animales pueden infectar a otras, es frecuente la transmisión interespecie, pero esto no sucede en todos los casos (7,12). La transmisión ocurre por contacto directo con animales enfermos vía oro-fecal o a través del personal o de utensilios contaminados, con las heces diarreicas, ya que se excretan grandes cantidades de virus (12,18,21,31).

La diseminación es muy rápida. Los animales adultos pueden infectarse y no manifestar síntomas quedando como portadores y fuente de infección para los animales jóvenes. La excreción de rotavirus puede ser desde las 12 horas después de que el virus entró y durante la etapa de diarrea, e incluso varios días después de la desaparición de la misma (3,4,9,12,18,21).

Experimentalmente el período de incubación varía entre 13 a 72 horas. Generalmente aparecen signos en las primeras 96 horas de vida; en ocasiones la diarrea se puede presentar dentro de las primeras 12 horas después del nacimiento (12). Cuando la enfermedad es introducida por primera vez al hato puede afectar a los animales de todas las edades (12,18,34).

MORBILIDAD Y MORTALIDAD.

Comúnmente la mortalidad es del 5% o menos, dependiendo de los factores ambientales, gérmenes de asociación y otros (12). La infección por rotavirus está caracterizada por accesos repentinos de diarrea líquida, con alta morbilidad, pero baja mortalidad si se mantiene al animal hidratado (3,7,9).

La mortalidad puede ser hasta del 90-100%, en los animales recién nacidos (2,12,19).

Segun House, J.A. 1978, cuando la infección por rotavirus es única la mortalidad es baja; pero al asociarse con *E. coli*, *Coronavirus*, *Salmonella* o *Cryptosporidium*, puede llegar a ser hasta del 95%.

PATOGENESIS.

La infección se circunscribe al tracto digestivo, la transmisión usualmente es por vía oral, parece ser que se infecta primero la porción proximal del intestino delgado, y de ahí progresa rápido y distalmente. Las células epiteliales de las vellosidades intestinales migran hacia la periferia del vello y se desprenden. Estas células son reemplazadas por células escamosas y cuboidales que contienen muy pocos viriones, si no es que ninguno (12,31).

La diarrea se inicia cuando las vellosidades alteradas de la porción proximal del intestino se cubren con epitelio cuboidal escamoso, por lo que muy probablemente la diarrea resulta de la acumulación de la leche parcialmente digerida y de fluidos digestivos en el tubo intestinal. La pobre absorción es probablemente ocasionada por la atrofia de las vellosidades. Si el reemplazo de las células no ocurre rápidamente, la situación será más propicia para que las bacterias invadan la pared intestinal y lleguen al torrente circulatorio. Microscópicamente se observa acortamiento de las vellosidades del intestino delgado (2,3,12,19).

SIGNOS CLINICOS.

En la primera etapa se observa diarrea líquida amarillenta o café-verdosa en ocasiones puede ser poco sanginolenta o mucoide y puede durar de 2 a 7 días (3,9,12).

En la segunda etapa se observa pelo hirsuto, ojos hundidos, piel seca y arrugada, diarrea profusa y acuosa, los animales dan la apariencia de que están aletargados y hay depresión, región perianal sucia, tialismo, comen lentamente, pierden el apetito, hay deshidratación, acidosis y posteriormente los animales toman la posición decúbito lateral, puede haber hipoglucemia y disfunción cardíaca; la temperatura les sube a más de 40°C y en esta etapa los animales pueden morir, principalmente por deshidratación y pérdida de electrolitos en combinación con infecciones bacterianas secundarias.

Al perder del 5 al 8% de su peso, habra depresión, al perder más del 15% de su peso generalmente mueren. Algunas veces se recuperan, sobre todo cuando tienen títulos elevados de inmunoglobulinas, y en los animales que se recuperan se observa retraso en su crecimiento (3,9,12).

INMUNIDAD.

Esta enfermedad suele presentarse con frecuencia en: 1) animales nacidos de madres muy jóvenes con bajos niveles de inmunidad, 2) cuando no maman calostro rápidamente después de nacer, 3) cuando nacen en un medio ambiente muy contaminado, o 4) cuando están bajo estrés o mal manejo (12).

Los exámenes de distribución de diferentes anticuerpos en la leche y el calostro revelaron IgG como el tipo de anticuerpos más predominantes, seguidos de la IgM e IgA (17,20).

DIAGNOSTICO

El diagnóstico está basado en los signos clínicos y en las alteraciones anatómo-patológicas. Indistintamente se requiere de un diagnóstico diferencial apoyado en el laboratorio clínico, ya que diversos agentes etiológicos pueden producir este síndrome (3,12,21,34).

Las pruebas de apoyo diagnóstico que brinda el laboratorio clínico son; ELISA, fijación de complemento, microscopía electrónica, inmunofluorescencia e inmunoelectroosmoforesis (4,12,16,28).

Otros métodos de diagnóstico incluyen la inmunoelectroforesis, hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, que se basan en la detección de los antígenos de cápside interna (VP6) o de cápside externa (VP7, VP4). Otra prueba es el análisis electroforético del RNA viral (5,12,27,33). Se recomienda por lo menos utilizar dos tipos de pruebas diagnósticas no relacionadas, así como también hacer uso de los cultivos celulares (1,4,5,11,12,15,11,23,27,33).

TRATAMIENTO.

El tratamiento es sintomático, consiste en prevenir la deshidratación, acidosis y toxemia, utilizando fluidos, electrolitos y antibióticos (desde que principia la enfermedad hasta que el animal pueda mamar), por administración oral o parenteral, esto ayudará a prevenir infecciones bacterianas secundarias en

intestino, así como complicaciones en el aparato respiratorio. No se recomienda aplicar corticosteroides, estimulantes ni anticolinérgicos (3,9,12).

Dentro de las medidas de manejo se incluye tener a los animales en lugares secos, con temperatura y ventilación adecuados; se deben de limpiar los corrales periódicamente y usar cama limpia y seca. En ranchos con buen clima, los pastizales abiertos son lo más recomendable (3,12).

CONTROL Y PROFILAXIS.

Es necesario establecer calendarios estrictos de vacunación y en un momento dado de desparasitación, tener un control efectivo de limpieza de las instalaciones, parideros con camas limpias y secas, de ser posible regular la temperatura y la ventilación junto con un manejo adecuado de alimentación. Los recién nacidos deben de recibir calostro de inmediato, o por lo menos durante la primera hora de vida, ésto es especialmente importante en los animales nacidos de madres jóvenes y primerizas, se recomienda el pastizal abierto, de ser posible reemplazar a los animales portadores asintomáticos, ya que representan una posibilidad de infecciones persistentes dentro de la explotación animal, con lo que enfermarían menos los becerros (3,12).

Vacunación. Existe una vacuna viva atenuada (Scourvax-reo) de aplicación oral elaborada en E.U.A. cepa modifica en cultivos celulares en el año de 1973. La utilización de esta vacuna se recomienda con buenas medidas de manejo y debe ser aplicada en las primeras horas de vida. La efectividad de dicha vacuna ha mostrado resultados muy variables. La utilización de una vacuna se recomienda solo cuando se ha demostrado que es necesaria. No es recomendable usar una vacuna viva contra una enfermedad que no ha sido diagnosticada (3,12).

OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo fue buscar la presencia de rotavirus en los ovinos y caprinos a partir de materia fecal.

METAS:

1.- Detectar directamente en la materia fecal la presencia de rotavirus por electroforesis.

2.- Aislar el rotavirus de la materia fecal por inoculación en cultivos celulares.

3.- Identificar el virus producido en cultivos celulares por electroforesis.

MATERIAL Y METODOS:

MATERIAL:

botellas de vidrio para cultivo de células de 40 cm²
frascos de boca ancha para desechos
placas de 6 pozos (Nunclon)
placas de 96 pozos (Nunclon)
tubos eppendorf
matraz Kitazato de 100 ml
micropipetas de 20, 100, 200 y 1000 μ l (GILSON)
cajas de Petri de 20 cm de diámetro
pipetas Pasteur
campana de flujo laminar (Filtración Claymon)
pipeteadores automáticos (Pipet-aid)
microscopio invertido
estufa húmeda con atmósfera parcial de CO₂ a 37°C
autoclave
horno bacteriológico
vortex con adaptador
potenciómetro
bomba de vacío
equipo de electroforesis
congelador de -20°C
congelador de -70°C
congelador de -150°C

MATERIAL BIOLÓGICO:

Muestras fecales.- Se colectaron 100 muestras de materia fecal de ovinos y caprinos, 30 de ellas provenían de la unidad de producción agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; de las cuales el 20% eran diarreas, 30 muestras provenían de Dolores Guanajuato, todas de aspecto normal y las 40 restantes provinieron de Apasco Hidalgo, de éstas el 40% eran diarreas. Las edades de los animales oscilaron desde recién nacidos a cinco meses, y se les consideró como lactantes y los mayores al año de edad se les consideró como adultos.

Línea celular MA-104.- Es una línea diploide de células de riñón fetal de mono rhesus. Proporcionada por el Laboratorio de Virología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Rotavirus de simio (SA-11) ATCC VR-899. Cepa aislada de una muestra de hisopo rectal de mono sano *Cercopithecus aethiops* llamado vervet.

SOLUCIONES

Para la preparación de soluciones se utilizaron reactivos de las marcas SIGMA, (1) J.T. BAKER, (2) MERCK (3).

SOLUCION DE VERSENO AL 0.05%

versenato de sodio EDTA (3)	0.5 g
solución de PBS (A) 10X	100.0 ml
agua destilada aforar a	1000.0 ml
hidroxido de sodio (2) 1N ajustar pH a 7.6	

SOLUCION DE TRIPSINA AL 2.5%

solución A de PBS (10X)	100.0 ml
agua destilada	900.0 ml
tripsina 1:250 (DIFCO)	25.0 g
hidroxido de sodio (2) 1N ajustar pH a	7.8
rojo de fenol al 1% (1)	0.5 ml

SOLUCION DE PBS (A) 10X

cloruro de sodio NaCl (2)	80.0 g
cloruro de potasio KCl (2)	2.0 g
fosfato dibásico de sodio (2) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.5 g
fosfato monobásico de potasio (2) KH_2PO_4	2.0 g
agua destilada aforar a	1000.0 ml

SOLUCION DE PENICILINA-ESTREPTOMICINA (PES) 100,000 UI/ml y 100,000 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente

penicilina G (sal sódica)	1,000,000 UI (SSA)
sulfato de estreptomicina	1.0 g (SSA)
agua destilada	10.0 ml

BICARBONATO DE SODIO AL 4.4%

bicarbonato de sodio (2) NaHCO_3	44.0 g
rojo de fenol al 0.1% (1)	0.5 ml
agua destilada	1000.0 ml
dióxido de carbono sólido (hielo seco) agitar constantemente para ajustar el pH a 7.1-7.3	

SOLUCION DE SDS 6% EDTA 36mM Y β -MERCAPTOETANOL 0.6%

dodecil sulfato de sodio (2) (SDS)	6.0 g
etilen diamino tetraacetato (2) (EDTA)	1.85 g
β -mercaptoetanol (1)	0.6 ml
agua destilada	100.0 ml

REGULADOR TRIS 1.5 M pH 8.8

trizma base (1)	18.16 g
ajustar el pH 8.8 con HCl 3N	
agua destilada cbp	100.0 ml

REGULADOR TRIS 0.5 M pH 6.8

trizma base (1)	6.05 g
ajustar el pH 6.8 con HCl 3N	
agua destilada cbp	100.0 ml

REGULADOR DE CORRIMIENTO TRIS-GLICINA(4X)

trizma base (1)	3.0 g
glicina (3)	18.7 g
agua destilada cbp	250.0 ml

ACRILAMIDA 30%, BIS-ACRILAMIDA 0.8%

acrilamida (1)	30.0 g
bis-acrilamida (1)	0.8 g
agua destilada cbp	100.0 ml

AZUL DE BROMOFENOL AL 0.2% EN GLICEROL AL 50% EN REGULADOR DE CORRIMIENTO.

azul de bromofenol (1)	0.02 g
glicerol al 50% en regulador (3)	10.0 ml

NITRATO DE PLATA 0.011 M

nitrate de plata (1) (AgNO_3)	0.46 g
agua destilada cbp	250.0 ml

CLOROFORMO ALCOHOL ISOAMILICO 25:1

cloroformo (2)	24.0 ml
alcohol isoamilico (2)	1.0 ml

PERSULFATO DE AMONIO AL 10%

persulfato de amonio (2)	0.1 g
agua destilada	1.0 ml

SOLUCION DE TEMED

N,N,N',N', tetrametilendiamina CH N (1)

FENOL DESTILADO SATURADO

fenol (2)	50.0 g
agua destilada	20.0 ml
8-hidroxiquinoleina (2)	2.05 g

saturar con Tris 1M pH 8 V/V (toda la noche en refrigeración) desechar la parte acuosa y adicionar Tris 0.1M V/V agitar hasta tener un pH a 7.6

SOLUCION FIJADORA

etanol al 10% en ácido acético al 0.5% (2)

SOLUCION REDUCTORA

hidróxido de sodio al 0.75 M en formaldehído al 0.1 M (2)

SOLUCION PARA DETENER LA REACCION DEL REVELADO

ácido acético al 1% (2)

MEDIOS DE CULTIVO

Para los cultivos celulares se utilizó Medio Mínimo Esencial (10X) de Eagle (MEM) (In Vitro) y suero fetal de bovino (GIBCO).

MEDIO DE CRECIMIENTO PARA CELULAS MA-104

Medio MEM (1X) con 10% de suero fetal de ternera adicionado de 0.11% de bicarbonato de sodio 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina.

MEDIO DE MANTENIMIENTO PARA LAS DILUCIONES DEL ROTAVIRUS SA-11

Medio MEM (1X) con 0.5 μ g/ml de tripsina adicionado con 0.11% de bicarbonato de sodio 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina.

MEDIO DE MANTENIMIENTO CON TRIPSINA PARA PROPAGACION DEL ROTAVIRUS

Medio MEM (1X) con 10 μ g/ml de tripsina adicionado con 0.11% de bicarbonato de sodio 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina.

METODOS.

PROPAGACION Y SUBCULTIVO CELULAR

Las células MA-104 se propagaron a partir de un criotubo que contenía dichas células y que permanecían congeladas en un tanque con nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C .

Disgregación celular.

- 1.- Se eliminó el medio de la botella con crecimiento celular confluyente por la cara opuesta a la monocapa.
- 2.- Se adicionaron 1.5 ml de solución tripsina-verseno dejando actuar sobre la capa celular por 10 segundos.

3.- Se eliminó la solución de tripsina-verseno por la cara opuesta a la monocapa.

4.- Se repitieron los pasos No. 2 y 3 dejando actuar la tripsina residual por 10 segundos, (la capa celular se tornó opaca, aproximadamente de 5 a 10 min, a 37°C) se observaron las células al microscopio.

5.- Se dieron de 2 a 3 golpes en los costados de la botella de manera que la capa de células se desprendiera de su soporte.

6.- Se agregaron de 3 a 5 ml de medio de crecimiento y se homogeneizó por pipeteo suave.

7.- Se distribuyó la suspensión anterior en dos o más botellas de cultivo, guardando una relación de superficie, con respecto al cultivo original.

8.- Se agregó a cada botella la cantidad de medio de crecimiento necesaria, para conservar la relación fluido-gas, 1:8.

9.- Se homogeneizó y etiquetó cada botella (tipo de células, número de pase y fecha) e incubó en estufa bacteriológica en posición horizontal a 37°C con atmósfera parcial de CO₂.

PROPAGACION DEL ROTAVIRUS SA-11

1.- Se incubó el virus durante una hora a 37°C con una concentración final de 10 µg/ml de tripsina.

2.- Al final del periodo de incubación, se eliminó el medio de las células MA-104 y se lavaron tres veces con medio de mantenimiento (MM).

3.- Se eliminó el medio de mantenimiento y se infectaron las células con 0.1 ml de rotavirus SA-11 (10^{6.6} DICT₅₀/ml)

4.- Se dejó adsorber el virus durante una hora a 37°C en una atmósfera parcial de CO₂ al 5%.

5.- Se adicionó el medio de mantenimiento para rotavirus.

6.- Se incubó a 37°C en atmósfera parcial de CO₂ hasta la aparición del efecto citopático, cuando éste fue del 80 al 90%, se procedió a la cosecha del virus mediante tres ciclos de congelación y descongelación.

7.- Se tomó una muestra para titular el virus y otra para prueba de esterilidad, el resto del volumen se distribuyó en alícuotas de 1 ml en criotubos y se congelaron a -70°C y -196°C para utilizarlo como testigo viral positivo.

TITULACION DEL VIRUS POR EL METODO DE DOSIS INFECTIVA PARA CULTIVOS DE TEJIDO AL 50% (DICT_{50} %)

La cepa del virus SA-11 antes de usarlo como testigo se tituló por el método de Reed y Muench, por lo cual se utilizó la siguiente metodología:

1.- La monocapa celular se disgregó por el método anteriormente descrito. De donde se tomó una alícuota para contar las células en una cámara de Neubauer, se ajustó la suspensión a 200,000 células por mililitro.

2.- Se colocaron 0.1 ml de la suspensión celular en cada uno de los pozos de la microplaca.

3.- Se etiquetó la microplaca (tipo de células, número de pase, fecha), e incubó a 37°C en atmósfera parcial de CO_2 al 5% con una humedad relativa, hasta obtener una monocapa confluyente en cada pozo.

4.- Se trató un mililitro de rotavirus SA-11 con tripsina a una concentración final de $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ incubándolo a 37°C durante una hora.

5.- Al final de la incubación se hicieron diluciones decimales desde 10^{-1} hasta 10^{-6} en medio de mantenimiento con tripsina al $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ para obtener un volumen final de 2 ml por cada dilución.

6.- Se eliminó el medio de la microplaca y se lavó la monocapa con medio de mantenimiento.

7.- Se inocularon ocho pozos con $100\ \mu\text{l}$ de cada dilución, se incluyeron testigos celulares "NEGATIVOS" y testigos virales "POSITIVOS".

8.- Se incubó la microplaca a 37°C en atmósfera parcial de CO_2 al 5%. Se observó diariamente al microscopio y se anotaron los pozos que presentaron ECP hasta que no variaron los resultados.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

- 1.- A las cien muestras de materia fecal colectada se les hizo una dilución al 20% con regulador PBS frío, se agitaron vigorosamente para homogeneizar.
- 2.- Se dejaron sedimentar en baño de hielo, para transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga de 15 ml, se centrifugaron a 2500 rpm por 30 min.
- 3.- A los sobrenadantes se les agregó penicilina 1000 UI/ml, estreptomicina 1000 μ g/ml y micostatín al 0,1% por cada mililitro de muestra.
- 4.- Se dejaron reposar una hora a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 rpm por 20 min.
- 5.- Se separaron los sobrenadantes en tubos eppendorf, para infectar los cultivos celulares, o guardarlos en congelación (-20°C) hasta su uso.

INOCULACION DE LOS CULTIVOS CELULARES

- 1.- Las muestras tratadas recibieron tripsina a una concentración final de 10 μ g/ml y se incubaron una hora a 37°C .
- 2.- Se eliminó el medio de crecimiento de las placas de seis pozos con crecimiento celular confluyente, se lavaron tres veces con medio de mantenimiento y se infectaron con las muestras tratadas con tripsina.
- 3.- Se dejaron adsorber las muestras durante 30 min a 37°C .
- 4.- Se agregaron 3 ml medio de mantenimiento con tripsina a una concentración final de 0,5 μ g/ml por pozo y se incubó a 37°C en atmosfera parcial de CO_2 , se observaron diariamente, hasta la aparición del efecto citopático característico de rotavirus. Se procedió a cosechar el virus de las muestras que dieron el efecto citopático positivo, mediante congelación y descongelación para su posterior titulación y corrimiento electroforético.

EXTRACCION DEL RNA VIRAL PARA ANALISIS ELECTROFORETICO.

- 1.- De cada una de las cien muestras de materia fecal se tomaron 0.5 ml en tubos Eppendorf.

2.- Se agregaron a cada tubo Eppendorf 0.1 ml de solución de SDS al 6%, EDTA 36mM y β -mercaptoetanol al 0.6%.

3.- Se agitaron vigorosamente en el vortex 60 seg.

4.- Se adicionó 0.5 ml de fenol saturado y se agitaron en el vortex 60 seg y se centrifugaron por unos segundos.

5.- Se separó la fase acuosa de la orgánica con una pipeta Pasteur y se les agregó 0.5 ml de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 25:1. Se agitaron en el vortex por unos segundos.

6.- Se centrifugaron para separar la fase acuosa de la fase orgánica. El paso anterior se puede repetir con la finalidad de limpiar la fase acuosa lo mejor posible.

7.- Se guardaron las fases acuosas a -20°C hasta su corrimiento en gel.

PREPARACION DEL GEL SELLADOR.

Para las siguientes metodologías fue necesario usar guantes desechables y hielo.

1.- En un tubo de 13 x 100 o de hemólisis, se colocó 1 ml de agua destilada.

2.- Se agregó 1 ml de solución de Acrilamida-Bisacrilamida.

3.- Se adicionó 15 μ l de solución de TEMED más 80 μ l de persulfato de amonio al 10% y se agitó.

4.- Inmediatamente se selló el montaje del equipo de electroforesis que quedó listo para recibir al gel de poliacrilamida.

PREPARACION DEL GEL ESPACIADOR DE POLIACRILAMIDA AL 10%.

1.- En un matraz Kitasato se agregó 8 ml de agua destilada.

2.- Se adicionó 5 ml de regulador Tris 1.5 M pH 8.8.

3.- Se agregó 3.4 ml de solución de Acrilamida al 30% - Bisacrilamida al 0.8%.

- 4.- Se homogeneizó y eliminó el aire por medio de una bomba de vacío.
- 5.- Se agregaron 70 μ l de persulfato de amonio al 10%.
- 6.- Finalmente se adicionaron 15 μ l de TEMED y se depositó la mezcla entre los vidrios del equipo de electroforesis hasta polimerizar.

PREPARACION DEL GEL CONCENTRADOR DE POLIACRILAMIDA AL 5%

- 1.- En un matraz Kitasato se colocaron 4.66 ml de agua destilada.
- 2.- Se agregaron 2.5 ml de regulador Tris 0.5 M pH 6.8
- 3.- Se adicionaron 1.6 ml de solución de Acrilamida al 30% y Bisacrilamida al 0.8%.
- 4.- Se homogeneizó la mezcla y se eliminó el aire por medio de una bomba de vacío durante 5 min.
- 5.- Se agregaron 50 μ l de persulfato de amonio al 10%.
- 6.- Finalmente se adicionaron 15 μ l de solución de TEMED, y se colocó encima del gel espaciador, el cual previamente había polimerizado.
- 7.- Inmediatamente se colocó el peine para las muestras (antes de que el gel polimerice).

PREPARACION DE LAS MUESTRAS Y CONDICIONES DE CORRIMIENTO.

- 1.- Se colocó el gel en el equipo de electroforesis, se llenaron las cámaras con regulador de corrimiento Tris-glicina.
- 2.- Se tomaron de cada muestra 40 μ l de la fase acuosa que contiene el RNA viral y se les adicionaron 10 μ l de la mezcla glicerol-azul de bromofenol.
- 3.- Se colocaron los 50 μ l de la mezcla anterior en los carriles del gel.

4.- Se conectaron los electrodos y se corrió la electroforesis a 20 mA (corriente constante) y voltaje abierto, hasta que las muestras llegaron al gel espaciador, en aproximadamente unos 15 min.

5.- Se aumentó la corriente a 40 mA y se dejó hasta que saliera el colorante.

6.- Se quitó la corriente eléctrica y se sacó el gel para el revelado.

REVELADO DEL GEL POR TINCION CON NITRATO DE PLATA.

1.- En cajas de petri de 20 cm de diámetro se sumergieron los geles durante 30 min en la solución fijadora (etanol al 20% en ácido acético al 1%).

2.- Se decantó la solución anterior y se lavaron los geles tres veces con agua destilada.

3.- Se adicionó la solución de nitrato de plata 0.011 M y se dejó durante 30 min en agitación, protegiendo de la luz.

4.- Se lavaron los geles tres veces con agua destilada.

5.- Se agregó la solución reductora (hidroxido de sodio 0.75 M en formaldehído al 0.1 N hasta la aparición de bandas del RNA viral.

6.- Se eliminó la solución anterior y se les agregó ácido acético al 1% para detener la reacción.

RESULTADOS.

El título del virus SA-11 utilizado como testigo fue de $10^{6.625}$ DICT₅₀/ml

El origen y las características de las muestras fecales utilizadas en el desarrollo de este trabajo se presentan en la Tabla 3.

No. de Muestras*	Procedencia	Aspecto de la Muestra	
		Diarreica	Normal
30	FES Cuahutitlán	6	24
30	Dolores Hidalgo, Gto.	-	30
40	Apasco, Hgo.	16	32
Total 100		22	78

* de ovinos y caprinos

De las cien muestras procesadas para análisis electroforético cinco de ellas (muestras No. 6, 25, 30, 92, 95) mostraron el patrón electroforético característico de rotavirus, el cual consistió en la presencia de 11 bandas distribuidas en tres grupos en el gel de poliacrilamida, esto se observa en la Figura 1.

Después de inoculadas las cien muestras en cultivos celulares únicamente cuatro de ellas (muestras No. 6, 25, 30 y 95) produjeron el efecto citopático sugestivo de rotavirus, "efecto bandera". De estos lisados celulares se extrajo el RNA viral para ser analizado por electroforesis, y se pudo comprobar una vez más la presencia del rotavirus, con un patrón electroforético similar al observado en la extracción directa de la muestra fecal, esto se muestra en la Figura 2.

De las cinco muestras que fueron positivas por electroforesis directamente de la muestra fecal, sólo cuatro de ellas fueron positivas en cultivos celulares (ver Tablas 4 y 5).

Tabla 4
Detección de Rotavirus en muestras de materia fecal de ovinos y caprinos

Muestra fecal #	Procedencia	Edad	Aspecto de las muestras	Rotavirus	
				electroferotipo*	ECP**
6	FES-C	Lactante	D	+	+
25	FES-C	Lactante	D	+	+
30	FES-C	Adulto	D	+	+
92	Hidalgo	Lactante	D	+	-
95	Hidalgo	Lactante	D	+	+

*Detección de RNA por electroforesis en muestra fecal
 **Detección de Rotavirus por ECP en cultivos de células MA-104 infectadas con muestra fecal
 D = Diarrea; ECP = Efecto Citopático; FES-C = FES-Cuautitlán

Tabla 5
Comparación de resultados:
Detección de Rotavirus por electroforesis y aislamiento

Muestra fecal #	Electroferotipo en la muestra fecal	ECP en cultivos celulares	Electroferotipo en lisados celulares
6	+	+	+
25	+	+	+
30	+	+	+
92	+	-	-
95	+	+	+

DISCUSION.

Se colectaron cien muestras de materia fecal de ovinos y caprinos, 30 de ellas provenían de la unidad de producción pecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. En este lugar se tiene un sistema de explotación de tipo extensivo, en el cual el manejo de los animales se caracteriza por pastoreo diurno de aproximadamente 6 a 8 horas de duración con encierro nocturno, con una densidad de población por animal de 60 cm, agua a libre acceso, con suplementación alimenticia con forraje y algo de alimento balanceado. Las instalaciones son adecuadas en base a las diferentes etapas de desarrollo de los animales.

La finalidad principal en este tipo de explotación es la producción de carne y de algunos derivados como la leche, pero esto, principalmente en cabras. Existen antecedentes de casos de enfermedad de tipo entérico que cursan comúnmente con diarrea, con una morbilidad alta y su mayor incidencia en los meses de lluvia y frío (información obtenida en la misma unidad de producción pecuaria de la Facultad de Medicina Veterinaria). El muestreo en esta explotación fue de tipo dirigido obteniéndose un 20% de muestras diarreicas de este lugar.

De Dolores Hidalgo estado de Guanajuato se colectaron un total de 30 muestras, las cuales eran de características normales (no diarreicas). En este lugar se lleva un sistema de explotación de tipo extensivo con instalaciones muy rústicas (tipo traspatio), se tiene un manejo de pastoreo diurno con encierro nocturno, se desconoce la densidad de población por animal. La finalidad de producción está encaminada al abasto de carne. No se tienen reportes de enfermedades de tipo entérico en la zona. El tipo de muestreo utilizado en este lugar fue de tipo aleatorio.

De Apasco estado de Hidalgo se colectaron 40 muestras bajo un muestreo de tipo dirigido, de las cuales se tuvo un 40% de muestras diarreicas. El sistema de explotación también es de tipo extensivo, con un manejo muy similar al que se lleva en la unidad de producción pecuaria de la Facultad de Veterinaria, la única diferencia es en el tipo de instalaciones, ya que en Apasco son de manufactura rústica. Se tienen reportes de problemas entéricos que cursan con diarrea, además de que existe la asociación con otros germenos principalmente coccidias (Moreno, B. 1995 comunicación personal). Según Sanford (1991), es probable que los rotavirus estén asociados a otros agentes causantes de diarrea ya sean bacterias o parásitos, como la asociación de *Cryptosporidium*-rotavirus.

En las explotaciones con sistema de producción extensiva, la ordeña no es muy importante, por lo que se les permite a las madres amamantar a sus críos todo el tiempo que sea posible, por tal razón no se manejan destetes tempranos, lo que permite que los animales reciban una protección muy importante a través de los anticuerpos que les proporciona la madre y que lo van a defender de muchas infecciones, sobre todo en esas etapas en el cual su sistema inmune no funciona al óptimo. Por otro lado, según Woode (1978) menciona que la habilidad para absorber los anticuerpos calostrales en los recién nacidos se pierde a las 24 horas.

Se consideraron dos grupos de edades: lactantes todos aquellos que van desde un día de nacidos hasta los 8 meses de edad y adultos, todos los mayores de 8 meses de edad. La mayoría de las muestras que fueron colectadas provinieron de ovinos y caprinos jóvenes (lactantes).

En este trabajo se encontró la presencia de rotavirus mediante la técnica de electroforesis en 5 muestras de un total de 22 muestras diarreicas. En 78 muestras no diarreicas no se detectó rotavirus, dato que concuerda con lo reportado por Berrios y col., (1988) quienes establecieron la asociación entre presencia de rotavirus y diarrea, principalmente en los animales jóvenes, lo que apoya el alto riesgo de transmisión y la recurrencia frecuente de la enfermedad y sobre todo con una mayor incidencia en épocas de lluvia y frío. Se tienen reportes con presentación epidémica en los meses fríos del año.

En los países subdesarrollados con climas tropicales o subtropicales se mantiene endémica todo el año (10 a 20% de incidencia) con picos en julio y diciembre, hasta del 50% sobre todo en lactantes.

Según Cohen y col., (1979); Ready y col., (1988) determinaron que el calcio confiere estabilidad a la cápside externa de los rotavirus, lo que permite que éstos permanezcan potencialmente activos por mucho tiempo en la materia fecal. Por tal motivo, después de recolectar las muestras se les adicionó una solución de cloruro de calcio para obtener una concentración final de 1.5 mM, y utilizarlo para intentar el aislamiento del virus en el sistema de células MA-104.

La mayor frecuencia de rotavirus fue encontrada en la unidad de producción pecuaria de ovinos y caprinos de la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán, (3 de 30 muestras) seguida de Apasco estado de Hidalgo (2 de 40 muestras). Todas las muestras de Dolores Hidalgo estado de Guanajuato fueron negativas a la detección de rotavirus.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

El aislamiento en cultivos celulares, así como el análisis electroforético, son métodos adecuados para el estudio y diagnóstico de los rotavirus, a partir de muestras de materia fecal de los ovinos y caprinos. El hacer un diagnóstico oportuno por cualquiera de estos métodos, permite establecer programas estrictos de control y profilaxis, lo que ayudaría a disminuir la incidencia y prevalencia del rotavirus en las explotaciones de producción pecuaria de ovinos y caprinos. Además los rotavirus son considerados como uno de los principales causantes de problemas entéricos con presencia de diarrea en los animales jóvenes (Flewett, T., Woode, G., 1978; McNulty, M., 1978; Flewett and Babiuk, 1984; Kapikian, A. and Chanock, 1990).

El establecer programas estrictos para el manejo de los animales, con instalaciones adecuadas para su explotación, permitiría una reducción de las pérdidas económicas causadas principalmente por las enfermedades de tipo entérico, según Twiehaus (1974); y Hause (1978), que a su vez se reflejaría una disminución en los costos de producción. Esta metodología también puede ser utilizada para fines de investigación y del estudio de algunas características físico-químicas del rotavirus, así como para estudiar su comportamiento biológico durante la propagación en cultivos de las células MA-104 y así de alguna manera elaborar o encontrar una sustancia que tenga propiedades antivirales, ó elaborar una vacuna (Babiuk, et al., 1985; Estes and Cohen, 1989).

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó como testigo el rotavirus SA-11, el cual se propagó en cultivos confluentes de células MA-104 y se tituló por el método de Reed y Muench, obteniéndose un título viral de $10^{6.625}$ DICT₅₀/ml. El utilizar el virus SA-11 como testigo, permitió determinar el efecto citopático (ECP) típico del rotavirus, conocido como "efecto bandera" en las células MA-104, así como el patrón electroforético característico del mismo, según estudios hechos por Malherbe, H. et al., (1967); Ward, R.; Lopez, S., (1985) y poder hacer la comparación con el material de las muestras.

La inoculación de las muestras fecales en cultivos de células MA-104 confluentes fue uno de los métodos utilizados para observar el ECP característico que producen los rotavirus, esto permitió determinar la existencia de los mismos. Se observó que cuatro de cien muestras ($4/100 = 4\%$) produjeron ECP sugestivo del llamado efecto bandera, estas muestras que fueron positivas eran diarreicas y provenían de ovinos y caprinos lactantes. Es importante definir que el efecto bandera, es el desprendimiento de algunas de las células de la monocapa celular, quedando éstas adheridas a acúmulos de células muertas y por encontrarse en un medio líquido, dan la apariencia de moverse como banderas. Las muestras que no presentaron este tipo de efecto citopático se reportaron

como negativas. En algunas de estas muestras se observó la formación de grumos y alargamiento de algunas de las células de la monocapa celular, esto pudo deberse a la toxicidad dada por la misma materia fecal.

A los lisados celulares que dieron ECP característico de rotavirus, se les hizo la extracción del RNA viral, y fue analizado por el método electroforético en geles de poliacrilamida, encontrando el electroferotipo típico del rotavirus, muy similar al observado directamente de la muestra fecal. Al realizar la detección del rotavirus mediante la demostración del genoma viral extraído directamente de cada una de las cien muestras fecales, obtuvimos como resultado que cinco de cien muestras ($5/100 = 5\%$) dieron un patrón electroforético muy similar al de rotavirus SA-11, estas cinco muestras eran diarreicas y provenían de ovinos y caprinos lactantes, sólo una de estas cinco muestras era de un animal adulto el cual falleció.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo podemos decir que se demostró la presencia del rotavirus en cinco de veintidos muestras ($5/22 = 22.7\%$) diarreicas, las cuales provinieron de ovinos y caprinos lactantes, lo que concuerda con lo demostrado por Snodgrass (1976) con una alta incidencia del rotavirus en enfermedades entéricas en los ovinos y caprinos jóvenes. De estas cinco muestras que presentaron el rotavirus, fue posible aislar el virus en cuatro de ellas, por inoculación en cultivos celulares.

Uno de los resultados obtenidos y que es interesante resaltar, es el haber logrado el aislamiento del virus en cultivos celulares, en cuatro de las veintidos muestras diarreicas ($4/22 = 18.1\%$) lo que nos indica que en las heces había virus infeccioso (Berrios y col., 1988), por lo que el riesgo de transmisión puede ser muy alto.

La electroforesis del RNA viral muestra que el genoma segmentado migra en nueve bandas visibles, siendo la banda siete proporcionalmente más intensa en relación a las otras. Estos once segmentos se agrupan en tres grupos de acuerdo a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (Babiuk, y col., 1985; Estes y Cohen, 1989).

CONCLUSIONES:

La presencia del rotavirus se logró evidenciar directamente en la materia fecal de 5 muestras (5/100) de ovinos y caprinos por el análisis del electroferotipo.

El rotavirus se detectó únicamente en muestras diarreicas (5/22).

Por aislamiento en cultivos celulares e identificación del electroferotipo en lisados celulares se demostró la presencia del rotavirus infeccioso en cuatro de las cinco muestras que mostraron rotavirus por extracción directa.

Con los resultados que obtuvimos en nuestro trabajo podemos decir que el mayor éxito de aislamiento de rotavirus fue a partir de muestras diarreicas y que provienen de animales lactantes.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Almeida, J.D., Hall, T., Banatvala, J.E., Totterdell, B.H., Chrytie, I.L.: The effect of Trypsin on the growth of rotavirus. *J. Gen. Virol.*, 40: 213-218, (1978).
- 2.- Arredondo, G.JL., y Calderón, J.E.: *Conceptos Clínicos de Infectología*. 10ma. Ed, (1990).
- 3.- Anderson, V.N.: *Veterinary Gastroenterology*. second edition (1992).
- 4.- Barrón, B.L. y col., *Manual de Prácticas del Laboratorio de Virología*, ENCB 109-131 (1989).
- 5.- Bellinzoni, R.C., Blackhall, J.O., Mattion, N.M., Estes, M.K., Snodgrass, D.R., LaTorre, J.L. and Scodeller, E.A.: Serological Characterization of Bovine Rotaviruses isolated from Dairy and Beef Herds in Argentina, *J. Clin. Microbiol.* 27: 2619-2623, (1989).
- 6.- Bhatnaga, R.N., Mittal, K.R., Padmanaban, V.D., and Jaiswal, T.N.: Heterohaemagglutinin Levels in the sera of apparently Healthy Sheep. *Indian Vet. J.* 66: 1-3 (1989).
- 7.- Blood, D.C., Studdert, V.P.: *Diccionario de Veterinaria*, Interamericana, Mc Graw-Hill, (1994).
- 8.- Balocus, A., Hausler, W.J.Jr., Herrman, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J.: *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth edition ASM. (1994).
- 9.- Blood, D.C., and Radostits, O.M.: *Medicina Veterinaria*. Volumen 1 séptima edición Interamericana Mc. Graw-Hill (1992).
- 10.- Berríos, P.; Celedón, M.O.; Alvarado, M.; Santibáñez, : Rotavirus ovino, Caracterización de la cepa Leyda 1987. *Virología*. Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, casilla 2 correo 15, Santiago, Chile. *Arch. Med. Vet.* XXV, No. 2, (1993).
- 11.- Berrios, P., Leledon, M.O., Ramirez, V.: Ovine Rotavirus; Detection by Means of Elisa and Isolation in MA-104 cells. *Virología*, (Chile) 20: 108-112, (1988).

- 12.- Correa, G.P. *Enfermedades virales de los animales domésticos (poligástricos)* vol. 2 3ra. edición (1980).
- 13.- Deunehy, P.H., Schutzbank, T.E. and Thorne, G.M.: Evaluation of an Automated Immunodiagnostic Assay, VIDAS Rotavirus, for Detection of Rotavirus in fecal Especimens. *J. Clin. Microbiol.* 32: 825-827,(1994).
- 14.- Desselberger, U.: Towards Rotavirus Vaccines. *Medical Virology*, vol. 3: 15-21 (1993).
- 15.- Estes, M.K., and Cohen, J.: Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiol. Rev.* 53: 410-449,(1989).
- 16.- Fenner, F.J. and White, D.O.: *Virología Médica*. La Prensa Médica Mexicana (1978).
- 17.- Fukudome, K., Yoshie, O., + and Konno, T.: Comparison of Human, Simian and Bovine Rotaviruses for Requirement of Sialic Acid in Hemagglutination and cell Adsorption. *Virology* 172, 196-205 (1989).
- 18.- Freeman, B.A.: *Microbiología de Burrows*. 22va. edición. Interamericana Mc. Graw-Hill. (1994).
- 19.- González, S.N., Torales, T. AN., Gómez, B.D.: *Infectología y Clínica Pediátrica*, 4a. edición, Trillas. (1994).
- 20.- Ijaz, M.K. Sabara, M.I. Frenchick, P.J. and Baviuk, L.A.: Effect of different routes of immunization with bovine rotavirus on lactogenic antibody response in mice. *Antiviral Research*, 8: 283-298 (1987).
- 21.- Levinson, E.W., and Jawetz, E.: *Microbiología e Inmunología Evaluación y Repaso*. Manual Moderno. (1992).
- 22.- Mendes, VMD., Debeer, M., Peenze, I., Steele, AD.: Molecular Epidemiology and Subgroup Analysis of Bovine Group-A Rotaviruses Associated With Diarrhea in South African Calves. *J. Clin. Microbiol.* 31: 12 (Dec. 1993).
- 23.- Nishikawa, K., Taniguchi, K., Torres, A., Hoshino, Y., Green, K., Kapikian, A.Z., Chanock, R.M. and Gorziglia, M.: Comparative Analysis of the VP3 Gene of Divergent Strains of the rotaviruses Simian SA-11 and Bovine Nebraska Calf Diarrhea Virus., *J. Virol.* 62: 4022-4026,(1988).

- 24.- Nacagomi, O., Mochizuki, M., Aboudy, Y., Shif, I., Silberstein, I., and Nakagomi, T.: Hemagglutination by a Human Rotavirus Isolate as Evidence for Transmission of Animal Rotaviruses to Humans. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1011-1013, (1992).
- 25.- Ready, F.K., Sabara, M.I.J., + and Babiuk, L.A. +: In Vitro Assembly of the Outer Capsid of Bovine Rotavirus Is Calcium Dependent, *Virology* 167: 269-273 (1988).
- 26.- Snoggrass, D.R.: Enteric Virology. Scientific Report, Noredun Research Institute.
- 27.- Scott, F.M.M. Molyneaux, P. Winter, G.: Rotavirus diagnostic Kits., *Veterinary Record.*, 119: 262 (1988).
- 28.- Tsunemitsu, H. Jiang, B. and Saif, L.J.: Detection of group C Rotavirus Antigens and Antibodies Assays. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2129-2134, (1992).
- 29.- Taniguchi, K. and Urasawa, S.: Diversity in Rotavirus genomes. *Seminars in Virology*, 6, 123-131 (1995).
- 30.- Vonderfecht, S.L., Linsay, D.A., and Eiden, J.J.: Detection of Rat, Porcine and Bovine Group B Rotavirus in Fecal Specimens by Solid-Phase Enzyme Immunoassay, *J. Clin. Microbiol.* 32: 1107-1108, (1994).
- 31.- Wilde, J., Van, R., Pickering, L., Eiden, J. and Yolken, R.: Detection of Rotaviruses in the Day Care Environment by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction., *J. Infect. Dis.* 166: 507-511, (1992).
- 32.- Yolken, R.H., Ojeh, C., Khatri, I.A., Sajjan, U. Forstner, J.F.: Intestinal mucins inhibit rotavirus replications in an oligosaccharide-dependent manner. *J. Infect. Dis.* 169: 5 May. 1994).
- 33.- Zheng, S., Woode, G.N., Melendy, D.R. and Ranig, R.F.: Comparative Studies of the Antigenic Polypeptide Species VP4 VP6 and VP7 of the strains of Bovine Rotavirus., *J. Clin. Microbiol.* 27: 1939-1945, (1989).
- 34.- Zinsser, Microbiology. seventeenth edition. (1980).