

49

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

"DIAGNOSTICO DE ROTAVIRUS CAPRINO MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA (PAGE)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA PRESENTA: MARGARITA GUILLEN MORALES

ASESORES: DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA DR. JORGE LUIS TORTORA PEREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

268116 -



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Diagnostico de Rotavirus Caprino Mediante la Técnica de Electroforesis en Poliacrilamida (PAGE)

que presenta La pasante: Marcarita Guillén Morales
con número de cuenta: 9057267-0 para obtener el TITULO de:
Medica Veterinaria Zootecnista

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

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 04 de Noviembre de 1998

PRESIDENTE	<u>M. en C. Raúl Mar Cruz</u>	
VOCAL	<u>Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ Jorge Rico Pérez.</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Fernando Alba Hurtado</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ Raúl Radillo Rodríguez.</u>	

**Parcialmente financiado por el proyecto PAPIME C-II.8 y por la Catedra
Multidisciplinaria "Mecanismos de Patogenicidad Microbiana"**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo lo bonito que me has brindado en la vida.

A mi mamá, porque jamás me has juzgado y siempre me enseñaste a compartir y a sonreír ¡Eres genial!.

A mi padre, porque tu camino de lucha me ha servido de ejemplo

A Ivett, Porque siempre he sentido tu fuerza y el amor que sientes por la vida.

A Aurorita, realmente eres la chispa de mi vida, pequeña traviesa.

A mi tío Joaquín, por ser una persona que siempre me ha brindado su cariño y por ser mi gran amigo

Dr. Jorge Tortora Pérez

Por la gran paciencia que me tuvo.

Dr. Guillermo Valdivia Anda

Porque esta tesis me ha dejado muchos conocimientos, me ha permitido ver nuevos horizontes y a pesar del tiempo siempre tuvo confianza en mí

Dra. Blanca L. Barrón

Por permitirme utilizar las instalaciones del Lab de Virología de la E.N.C.B del I.P.N y por sus enseñanzas en esta técnica junto con todo su equipo de trabajo.

Dra. Susana Mendoza

Por abrirme las puertas del Lab de Virología de Posgrado FESC-1 y por su apoyo y amistad

Q.B.P Linda García

Por darme la oportunidad de trabajar con su equipo, y por el tiempo brindado a este trabajo Lab. Rotavirus, INDRE.

M.V.Z Rodolfo Córdoba y Familia Córdoba

Porque siempre me han brindado su apoyo y verdadera amistad. Su ejemplo profesional ha sido muy importante para mí

Dra. Citlali Hernández

Por su comprensión y amistad.

M.V.Z Alejandra Ayanegui
Por ser una persona que no se limita en
brindar sus conocimientos

M en C. Fernando Alba
Por tenerme confianza y permitirme estrenar
las cámaras de electroforesis.

Dr. Francisco Morales
Por su apoyo y amistad.

A la Unidad de Inv. Multidisciplinaria en
Salud Animal y Lab. Virología FESC-4,
siempre me brindaron un gran compañerismo

A todo el personal de los Laboratorios
VALAR y DIVET.
Porque son un gran equipo, permitiéndome
encontrar nuevas amistades

Al equipo de Bioquímica Veterinaria de la FESC-4
MVZ Jorge Rico, por sus consejos
Sr. Andrés, por su don de apoyo.
MVZ Carmen, Beatriz, I.A Juan Carlos,
por su bonita amistad.

A mis amigas
En todo momento me han acompañado
personas tan especiales como ustedes:
Mónica, Alicia, Diana, Ma.Elena, Carmen y Aidé.

A todos los profesores y personas que me han brindado sus
consejos y apoyo para la elaboración de este trabajo.

El límite del ser no existe cuando uno es capaz de permitir el vuelo.

MGM

ÍNDICE

I.-RESUMEN	1
II.-INTRODUCCION.....	2
a) Epizootiología de las enfermedades entericas	2
b) Características generales de los Rotavirus	4
c) Métodos de diagnóstico	7
d) Bases para el desarrollo de la técnica de PAGE	8
II.-OBJETIVO.....	10
III.-MATERIAL Y METODO.....	11
a) Muestras virales	11
b) Estandarización de la técnica del electroforesis PAGE	11
c) Detección del genoma de Rotavirus en heces de caprinos	14
IV.-RESULTADOS.....	16
V.-DISCUSIÓN.....	21
VI.-CONCLUSIÓN.....	28
VII.-APENDICE.....	29
VIII.-BIBLIOGRAFÍA.....	31

RESUMEN

La técnica de electroforesis en poliacrilamida (PAGE) se ha utilizado en la detección del genoma de Rotavirus en heces para fines de diagnóstico en varias especies animales. Esta metodología debe ser adaptada a las condiciones de trabajo en cada laboratorio por lo que el objetivo del presente trabajo fue el estandarizar la técnica de PAGE para el diagnóstico de Rotavirus en caprinos dentro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Se utilizaron muestras positivas de heces de humano y caprino, así como cultivos virales de la cepa SA-11 de Rotavirus de simio, siguiéndose y modificándose dos técnicas previamente descritas para su aplicación en humanos. Se logró estandarizar la técnica de PAGE para ser utilizada en muestras de heces de cabras, adaptándola a las condiciones de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en la FESC, reduciendo el costo de proceso y demostrando la utilidad de algunos de los reactivos empleados.

Después de estandarizar la técnica se hizo la evaluación, durante tres años, de un hato de cabras en las diversas etapas productivas, trabajándose un total de 191 muestras. Del total de las muestras: el 87 (45.5%) se obtuvieron de cabritos, 40 (20.9%) de cabras jóvenes de remplazo y 64 (33.5%) de cabras adultas las cuales se tomaron entre septiembre de 1994 a marzo de 1995; en tanto que un segundo periodo de muestreo se realizó entre enero y abril de 1997. Del proceso de las muestras mediante PAGE, los resultados mostraron que las 191 muestras resultaron negativas a rotavirus. Tres muestras presentaron un patrón de corrimiento bisegmentado, lo cual sugiere que pudiera tratarse más bien a la presencia de un Picobirnavirus o algún otro material.

INTRODUCCIÓN

a) Epizootiología de las enfermedades entericas.

Las enfermedades infecciosas en animales y en humanos, continúan siendo la mayor causa de muerte y pérdidas económicas a nivel mundial, la investigación en esta área ha sido muy amplia, especialmente para los cuadros de diarrea, que ocupan el primer lugar en frecuencia en países subdesarrollados, seguidos de los problemas respiratorios. En la década de los cincuenta, diferentes investigadores encontraron en los humanos cuadros diarreicos que no eran producidos por bacterias ó parásitos, logrando demostrar la presencia de virus, (García y col., 1986).

Para que un virus produzca infecciones intestinales, se deben conjuntar ciertas propiedades, tales como un mecanismo de transmisión que le asegure sobrevivir en el ambiente hasta ser ingerido, resistencia a la acción de los jugos gástricos en su paso por el estómago y a las sales biliares en el duodeno para así llegar a las células blanco intestinales susceptibles al mismo. (Soler, 1984)

En 1953 Stanley y colaboradores describieron un virus de la Hepatoencefalomielitis (HEV), el cual fue aislado de muestras de heces de niños. Posteriormente un agente, con las mismas características, presentó un efecto citopático muy notorio en cultivo celular de riñón de mono, estableciendo un criterio para relacionarlo con un grupo diferente a los demás enterovirus al cual denominaron ECHO 10; sin embargo no podía ser parte de esta familia, ya que el agente era de mayor tamaño siendo cepas altamente patógenas para ratones recién nacidos, por lo tanto en 1959 Sabin sugirió que los virus ECHO 10 fueran clasificados en un nuevo grupo llamado Reovirus, "virus huérfanos respiratorios entericos". En los años 1960, Adams y Kraft reportaron la presencia de un virus de la diarrea epizootica de ratones neonatos y pocos años después Malherber y col. aislaron, a partir de primates no humanos, un virus al que denominaron SA-11 por las iniciales de "Simian Agent" (Fields y col, 1985). En 1973 Bishop describe el primer Rotavirus humano asociado a diarrea severa en infantes, posteriormente Middleton en 1974, utilizando el microscopio electrónico (ME), reportó la presencia de partículas virales en biopsias de duodeno de niños con diarrea infecciosa aguda (DIA) que median 65 a 75 nm.

En la actualidad existen reportes de que algunos virus pueden ser la causa primaria de diarrea aguda en los recién nacidos, en las diversas especies de animales. Asociados a cuadros diarreicos se han encontrado una gran variedad de entre ellos a los Rotavirus, Coronavirus, Parvovirus, Astrovirus, agentes Norwalk y *Adenovirus* entre otros. (Blood y col., 1984). Como se ha podido notar, los Rotavirus afectan tanto a humanos como animales, se puede decir que afectan a todas las especies y experimentalmente se ha demostrado que los Rotavirus aislados de una especie animal pueden infectar a otras, pero esto no sucede en todos los casos. (Valdespino y col., 1994; Correa, 1980)

Estudios epizooticos realizados en ovinos en Francia e Inglaterra, así como de datos preliminares obtenidos en México, indican que el 29% de las muertes en etapas neonatales son asociadas a cuadros diarreicos, ocurriendo principalmente en el primer mes de vida y al momento del destete, (Tórtora 1986)

Existen pocos reportes de la presencia de Rotavirus en los caprinos, en el cuadro siguiente se resumen los principales.

Año	Autor	Observación
1978	Scott y col	Diagnóstico por M.E. Rotavirus
1979	Durham y col	Rotavirus y Coronavirus en diversas especies, una positiva en cabritos
1988	Ivanoe Italia	Seroprevalencia de Rotavirus en cabras y borregos
1993	Muñoz y col España	Seropositividad al grupo A en cabritos, adultos negativos
1994	Dacosta y col	Aislamiento y caracterización de un Rotavirus caprino
1994	Kaminjolo y col Trinidad	Seguimiento de un brote mediante aglutinación en látex a partir de las heces encuentran el grupo A
1995	Muñoz y col España	Mediante ELISA demuestra el grupo B Utilizan electroforesis

M.E. Microscopía electrónica

ELISA .- Inmuno ensayos ligados a enzimas

Resultados de un estudio realizado por House en 1978, indicaron que cuando el Rotavirus se presentó como único agente etiológico tuvo un promedio de 5% de mortalidad, el coronavirus de un 30%, *Escherichia coli* de 50% y *Salmonella spp* de un 70%, pero si se juntan dos agentes como Rotavirus y *E. coli* la mortalidad se incrementa hasta un 55%. En los casos en donde hay tres agentes involucrados, como Rotavirus coronavirus y *E. coli* la mortalidad tiende a alcanzar hasta un 90 - 95 % y las pérdidas económicas puede alcanzar millones de dólares (House, 1978; Correa, 1980)

La infección por Rotavirus es factible encontrarla tanto en humanos como en animales coexistiendo mediante estudios genéticos y serología se ha encontrado una estrecha relación entre los Rotavirus humanos y de animales (Urasawa y col., 1992, Estes M.K, 1996).

Existen reportes de la detección del antígeno de Rotavirus en secreciones respiratorias de niños con neumonía y se han aislado de la orofaringe de niños con problemas de vías respiratorias altas, antes de iniciar el cuadro diarreico, lo que hace suponer la transmisión por medio de partículas en aerosoles explicando el aumento de esta presentaron en los meses fríos, (Rev.Biomedica Vol.4.,1993), hay otros autores que mencionan que en México los casos de diarrea por Rotavirus se observan durante todo el año con incremento en otoño (Valdespino y col., 1994).

En cuanto a los daños que causa este agente a la producción animal se ha observado que afecta más a largo plazo, como la pérdida de peso y retardo en el crecimiento de los animales, resultado un mayor costo en la producción, en cuanto a la mortalidad se apoya la idea que en animales de estas características se invierte menos si se muere que al estar pagando tratamiento; aunque la mortalidad causada por Rotavirus es muy baja (Kurham y col., 1979)

b) Características generales de los Rotavirus

Los Rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, la cual se caracteriza por virus de un tamaño aproximado a 70- 80 nm, con capacidad de producir efecto citopático (ECP) con inclusiones intracitoplasmáticas en cultivos de tejidos de mono, presentar patogenicidad para ratones recién nacidos pero no en adultos y hemoaglutinación de eritrocitos tipo O humano, tienen ARN de doble hélice. La familia está constituida por 6 géneros: Reovirus, Orbivirus y Rotavirus para vertebrados, Cypovirus para insectos, Phytoreovirus y Fijivirus para plantas. (Fields y col., 1985)***.

Los Rotavirus son viriones desnudos con doble cápside, de forma icosaédrica, su genoma se presenta, dividido en 11 segmentos pequeños de ARN de doble cadena con un peso molecular 12 a 20 x 10⁶ Da. (Porlefield, 1989), se identifican numerándolos del 1 al 11 desde la parte superior del corrimiento electroforético (mayor peso molecular) hacia el inferior (Fields y col 1997).

El término "Rota" proviene del latín que significa rueda, por su apariencia en el M.E.. La partícula viral completa mide 65 a 75 nm de diámetro, está formada de una cápside externa, una cápside interna y un core o centro. Cuando pierde la cápside externa mide 55 a 65 nm, quedando solamente el centro que encierra al genoma viral.

El género de los Rotavirus ha sido clasificado en serogrupos A, B, C, D, F, G y H, subgrupos I y II, dados por la proteína de la cápside, VP6, serotipos P por VP4 y G. Por VP7 y en electroferotipos según patrón corto y largo por el corrimiento electroforético del ARN. (Mohanty y col., 1983; Fields y col., 1985; García, 1986; Porlefield, 1989)

Las proteínas virales son de dos tipos: las estructurales, que se encuentran formando las partículas virales y las no estructurales, que solo se localizan en células infectadas por el Rotavirus. Se sabe que hay seis proteínas estructurales denominadas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 que son las que forman las partículas virales completas, de estas, la VP4 tiene actividad de hemaglutinina, es fraccionada en el intestino por la acción de la tripsina en VP5 y VP8, con lo cual se favorece la infectividad de los virus en la mucosa intestinal; siendo estas últimas las responsables de la unión al enterocito (Soler, 1994; Fields, 1985; García, 1986).

La VP7 es una glicoproteína codificada por los segmentos 7, 8 ó 9 dependiendo de la cepa viral, se encuentra en el exterior del virus y es la proteína más abundante en todos los Rotavirus; además, induce anticuerpos neutralizantes que definen el serotipo de la cepa. El segmento 6 del genoma codifica a la VP6 que es la proteína de la cápside interna la cual mantiene la conformación y organización del core, es altamente antigénica e inmunogénica, por lo cual en ella se basa la identificación por anticuerpos, clasificando al virus en los grupos A,B,C,D,E,F,G y H.

El segmento 1 codifica a la proteína VP1, presenta cierto grado de actividad de ARN polimerasa. El segmento 2 codifica la proteína VP2, esta proteína tiene como función la de reunir al ARN de doble cadena para el ensamble viral, por lo que juega un papel importante en la morfogénesis del virus. La VP3 es codificada por el segmento 3 y es la proteína estructural de menor peso molecular. (García y col., 1996; Soler, 1994)

En cuanto a las proteínas no estructurales se han descrito cinco denominadas NS53, NS35, NS34, NS28 y NS26 según su peso molecular.

En el cuadro No.1 se resumen algunas de las características de las proteínas codificadas en el genoma de los Rotavirus.

Se conocen 7 grupos: A, B, C, D, E, F, G y H de los cuales el A, B y C se encuentran tanto en humanos como en animales, mientras que los grupos D, E, F y G solo se han encontrado en los últimos (Alvarez G.V., 1990; Muñoz y col., 1995; García, 1996; Soler, 1994)

Los Rotavirus del grupo A son los más estudiados y están claramente involucrados en los casos de gastroenteritis infantil. Los del grupo B se han encontrado en casos esporádicos y durante epidemias severas de gastroenteritis en adultos en china. Finalmente los del grupo C se han asociado También con casos esporádicos y brotes de diarrea en niños y animales. (Alvarez G.V., 1990)

CUADRO No.1
GENOMA DE LOS ROTAVIRUS Y SUS PRODUCTOS

SEGMENTO	PROTEÍNA	PESO MOLEC. Y Nº DE AMINOACIDO	MODIFICACIÓN POST- TRADUCCIONAL	% EN EL VIRUS	CARACTERÍSTICAS
1		124,847 (1,088)	--	2.0	Forma el centro del virión
2	VP2	102,847 (880)	Miristilada	15.0	Forma el centro del virión. Unión a ARN
3	VP3	98,120 (835)	--	0.5	Forma el centro del virión
4	VP4	86,782 (776)	Rompimiento en: VP5(529aa) VP8(247aa)	1.5	Localizada en la cápside externa hemaglutinina, antígeno neutralizable Virulencia restricción a multiplicarse en cultivo
5	NS53	58,654 (491)	--	--	Ligeramente bási ca. Probablemen- te participa en replicación
6	VP6	44,816 (397)	Miristilada	51	Se encuentra en la cápside interna. Trimerico. Se requiere para la transcripción. Antígeno no neutralizable de grupo A y de subgrupo
7	NS34	34,600 (315)	--	--	
8	NS35	33,633 (317)	--	--	Posiblemente participa en replicación
9	VP7	37,368	Glicosilada	30	Antígeno neutra- lizable Especificidad de serotipo Localizada en la cápside externa
10	NS20	20,290 (175)	Glicosilada origina NS28	--	Participa en la morfogénesis
11	NS26	21,725 (198)	Fosforilada	--	Rica en serina y treonina. Posiblemente estructural.

(Alvarez G. V, 1990)

Los Rotavirus tipo A se clasifican mediante anticuerpos monoclonales en dos subgrupos llamados I y II. La diferencia entre ambos subgrupos está asociada con la estructura de la proteína VP6 de la cápside interna. (García y col., 1996; Soler, 1994)

Se conocen dos serotipos llamados G y P, que se diferencian entre sí mediante anticuerpos neutralizantes. El serotipo G se denomina con esa letra en referencia a la naturaleza glicoproteica de VP7 que es donde residen los epítomos responsables **, a la fecha se han identificado 14 serotipos G. La VP4 es la otra proteína de cápside externa y aunque es menos abundante que VP7, también induce la producción de anticuerpos neutralizantes. Actualmente se han caracterizado por lo menos 5 serotipos P: P1A, P1B, P2, P3 y P4 denominados así por ser VP4 sensible al rompimiento por proteasas, P1A, P1B, P3 y P4 están asociados con cepas causantes de infecciones sintomáticas y el P2 con infecciones asintomáticas. (García y col., 1996; Soler, 1994)

Los serotipos actualmente se determinan únicamente por bloqueo de la infectividad viral con anticuerpos monoclonales anti-VP7, o por ensayos inmunoenzimáticos directamente en la materia fecal, pero debido a que VP4 también puede inducir anticuerpos neutralizantes habrá que considerarla inclusive determinante de los serotipos. Es inminente la preparación de sueros policlonales para clasificar las cepas en serotipos tomando en cuenta tanto VP4 como VP7. (Alvarez G.V., 1990)

c) Métodos de diagnóstico

La signología en los animales afectados por Rotavirus es muy parecida a la provocada por otros agentes entéricos, por lo tanto no se puede determinar la presencia de estos con el diagnóstico clínico, por lo que es necesario apoyarse en diferentes técnicas de laboratorio para la detección del virus como son:

- 1.- Microscopía electrónica (ME)
- 2.- Inmunomicroscopía electrónica (IME)
- 3.- Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)
- 4.- Aglutinación en látex (AL)
- 5.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- 6.- Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Estos métodos han sido aplicados primordialmente en medicina humana y ocasionalmente en el área veterinaria, fundamentalmente por el alto costo (M.E., IME, PCR) o bien por que al estar basados en reacciones antígeno anticuerpo, detectan sólo algunos de los serogrupos implicados (ELISA, AL).

Las técnicas de electroforesis tienen algunas ventajas como son el no ser influidas por el serogrupo, son rápidas (aproximadamente 2 horas), son sensibles, detectando 10^5 - 10^{13} partículas vírales/ml de heces. (Alvarez M., 1982; Valdespino, 1994; García, 1996), y su especificidad es alta. Sin embargo la técnica es moderadamente costosa y ha sido estandarizada principalmente para su aplicación en medicina humana, en cerdos y en bovinos.

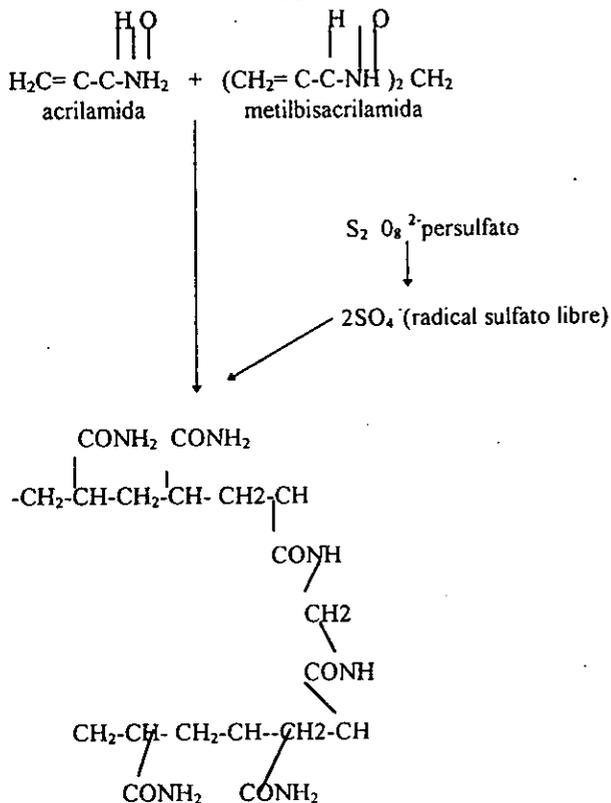
Inicialmente los métodos electroforéticos se desarrollaron en agarosa, pero los geles de poliacrilamida han demostrado sus ventajas prácticas. A pesar de su aplicación en otras especies, en la actualidad no se han estandarizado estos geles para el diagnóstico en los pequeños rumiantes, en particular las cabras, además de que algunos de los reactivos requeridos en la técnica deben ser de alta pureza con el consiguiente aumento en su costo.

d) Bases para el desarrollo de la técnica de PAGE

Desde 1807 el físico Ferdinand F. Reuss, inició el desarrollo de las técnicas de migración de partículas coloidales en un campo eléctrico; siendo este el origen de la electroforesis, sin éste método hubiese sido más complicado separar o purificar las proteínas y ácidos nucleicos (Merril y col., 1987). Durante los años 30's, el bioquímico Tiselius demostró las bondades de esta técnica para la separación de proteínas (Rosas, 1997; Espejo, 1978); posteriormente, la electroforesis se ha utilizado para el corrimiento de otras moléculas cargadas como los ácidos nucleicos, primero el ADN y posteriormente el ARN. Siempre, es necesario contemplar aspectos técnicos particulares importantes como el buffer de corrimiento, con un pH adecuado a las cargas de las moléculas para su separación (Williams B., 1981), el ARN es de carga negativa por lo que se utiliza un pH de 8.5. Así mismo el soporte más adecuado en este caso ha sido la poliacrilamida, Felder en 1986, menciona que es un material muy versátil y útil para el análisis y separación de macromoléculas, además que tienen la ventaja de ser inerte eléctricamente, permitiendo así el más fácil paso de la corriente.

Se mencionarán brevemente algunos puntos importantes a considerar en esta técnica. El soporte es una malla formada por la acrilamida que es un monómero y la N,N metilbisacrilamida como enlazante transversal. Esta polimerización es inducida por los radicales libres que resultan de la descomposición química del persulfato de amonio. Siendo estabilizados los radicales libres por el N,N,N,N tetrametiletildiamino (TEMED). (Rosas Flores, 1997). En la Figura No. 1 se representan estas uniones.

FIGURA No1
FORMA EN QUE SE REALIZA LA REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN DE LA
ACRILAMIDA Y BISACRILAMIDA



La separación sobre geles de acrilamida-bisacrilamida tienen como ventaja que el tamaño del poro puede controlarse en función de la concentración utilizada de acrilamida-bisacrilamida. (Nopal. T., 1984)

Existen geles en condiciones desnaturizantes y en condiciones nativas. Un gel en condiciones desnaturizantes, es aquel en que a la muestra se le agrega un reductor, como el B- mercaptoetanol o ditrotreital (DTT). Tanto los amortiguadores, como la mezcla de la poliacrilamida, contiene el detergente aniónico, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), el cual le confiere una carga negativa suficiente a la macromolécula (Rosas Flores M. M. 1997)

OBJETIVOS

1.- Estandarizar, dentro de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal de la FESC, la técnica de PAGE para la detección del Rotavirus en heces de caprino.

2.- Detectar la presencia del genoma viral característico de Rotavirus, en heces de caprinos provenientes de diferentes etapas productivas en un hato.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

a).-Muestras Virales:

Para la realización del trabajo se utilizaron las siguientes muestras: una muestra de heces positiva a Rotavirus y un extracto de heces positiva a Rotavirus ambas obtenidas a partir de dos personas diferentes y proporcionadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). Así mismo se empleó una muestra de heces de caprino positiva a Rotavirus, obtenida del hato del Rancho Cuatro Milpas UNAM Donada por Ayanegui A. A.

También fue utilizada una cepa de Rotavirus de simio cepa (SA11) ATCC VT- 899, aislada de una muestra de mono (Cercopithecus aethiop.) proporcionada por el Laboratorio de Virología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.(ENCB).

Equipo

- 1.- Microcentrífuga Costar Mod. 10
- 2.- Vortex Costar Mixer.
- 3.- Cámara horizontal para electroforesis Mini Protean - Bio Rad.
- 4.- Fuente de poder 1000 500 100/ 120 v Bio- Rad.
- 5.- Platina caliente

b) Estandarización de la técnica de electroforesis en PAGE.

Se utilizaron las muestras de heces provenientes de humano y de cabra a las cuales previamente se les confirmó la presencia de Rotavirus, la cepa del virus SA-11 y cinco muestras de heces provenientes de los caprinos en estudio.

Para la extracción del genoma viral mediante SDS, B-mercaptoetanol y EDTA (Sol de lisis) y con Fenol saturado, se realizaron las siguientes modificaciones.

Experimento 1.- se emplearon las soluciones de lisis preparadas de acuerdo a ENCB (Sol de lisis 1) y al INDRE (Sol. de lisis 2) (ver apéndice).

Experimento 2.- El fenol saturado se preparó con tres marcas de fenol : Monterrey, JTBaker y Merck ; preparándolos y utilizándolos de acuerdo a la técnica de la ENCB.

Experimento 3 .- Se utilizó fenol de la marca Merck y se varió el pH durante el proceso de saturación a 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0 y el resto del proceso se hizo de acuerdo a la técnica empleada en ENCB.

Experimento 4.- Durante este ensayo se modificaron las concentraciones de la solución de lisis , del fenol saturado y de la solución de fenol-cloroformo; para lo cual se empleó la solución de lisis N°2 , el fenol (Merck) a pH de 7.0 , la sol. de fenol cloroformo (ver apéndice) y se siguió el procedimiento descrito por la ENCB, de acuerdo al Cuadro N° 2.

Experimento 5.- Se utilizaron de Sol. de lisis N°1, 200 ul de Fenol (Merck , pH=7.0) y 200 ul de cloroformo (JT Baker)

TABLA No. 2
DIVERSAS CANTIDADES DE REACTIVOS APLICADOS A LA MUESTRA
POSITIVA DE HECES PROVENIENTE DE UN HUMANO

TRATAMIENTO	SOL. DE LISIS N°1 (µl)	FENOL (µl)	CLOROFORMO- FENOL (µl)
1	50	100	NA
2	50	NA	100 - 100
3	400	100	NA
4	400	NA	100 -100
5*	INDRE	INDRE	INDRE
6	200	200	NA
7	400	200	NA
8	50	NA	200 - 200
9	100	NA	200 -- 200

*Consistió en una muestra de materia fecal positiva a Rotavirus proveniente de humano, previamente extraída bajo las condiciones del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE).

NA.- No se aplicó

Detección del genoma viral a partir de las muestras de caprinos.

Todo el trabajo fue realizado en el Laboratorio Multidisciplinario de Salud Animal, FES-Cuautitlán. A cada una de la muestras obtenidas se les sometió a extracción del ARN viral, se utilizó una combinación de las técnicas descritas en el manual del Laboratorio de Virología de la Escuela de Ciencias Biológicas del I.P.N, y del manual de Diagnóstico y Tipificación de Rotavirus del Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos INDRE, con algunas modificaciones de la manera siguiente:

- 1.- En tubos Eppendorf se colocaron 0.2ml de cada una de las muestras de excremento
- 2.- Después se agregaron 200 µl de la solución de Lisis (SDS 6%, EDTA 36mM y B-mercaptoetanol 0.6%)
- 3.- Se agitó vigorosamente en el Vortex durante 60 seg.
- 4.- Posteriormente se adicionaron 200 µl de fenol saturado y se agitaron en el Vortex durante 60 seg.
- 5.- Se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitaron durante 60 seg.
- 6.- Se centrifugó por espacio de 10 minutos a 10,000 r.p.m. para separar la fase acuosa de la fase orgánica. El paso anterior se repitió con la finalidad de limpiar la fase acuosa lo mejor posible.
- 7.- Se separó la fase acuosa y se conservó a -20°C hasta su corrimiento electroforético.

Posteriormente se realizó propiamente la electroforesis de las muestras en gel de Poliacrilamida (PAGE), utilizando el virus SA11:

Preparación del gel espaciador de poliacrilamida al 10%:

- 1.- En un vaso de precipitado de 20 ml se agregaron 2.0 ml de agua desionizada
- 2.- Se adicionaron 0.87 ml de regulador tris al 1.5 M a pH 8.8
- 3.- Se agregaron 0.59 ml de solución de acrilamida y bis-acrilamida y se homogeneizó.
- 4.- En seguida se agregaron 60 µl de persulfato de amonio.
- 5.- Por último se le agregaron 15 µl de TEMED y se depositó la mezcla entre los vidrios del equipo de electroforesis previamente armados y sellados, hasta la polimerización de la acrilamida

Preparación del gel concentrador de poliacrilamidas al 5%:

- 1.- En un vaso de precipitado de 20 ml se agregaron 2.16 ml de agua desionizada.
- 2.- Se colocaron 0.83 ml de regulador tris al 0.5M a pH 6.6
- 3.- Se adicionaron 0.66 ml de solución de acrilamida y bis-acrilamida.
- 4.- Se homogeneizó la mezcla
- 5.- Se le agregaron 50µl de persulfato de amonio.
- 6.- Finalmente se adicionaron 6.7 µl de solución de TEMED y se colocaron encima del gel espaciador, el cual previamente se polimerizó.

Preparación de las muestras y condiciones de corrimiento:

- 1.- Se colocó el gel en el equipo de electroforesis, se llenó la cámara con regulador del corrimiento Tris- glicina.
- 2.- Se tomó de cada muestra 50 µl de la fase acuosa donde se puede esperar la presencia del ARN viral y se adicionaron 20 µl de la mezcla glicerol-azul de bromofenol
- 3.- Se colocaron 20 µl de la mezcla anterior en cada uno de los pozos del gel.
- 4.- La electroforesis se corrió a 20 miliamperes a corriente constante y voltaje abierto, hasta que las muestras llegaron al gel espaciador (aproximadamente 20 minutos).
- 5.- Se aumento la corriente a 40 miliamperes y se dejó hasta que saliera el colorante del gel.
- 6.- Se desconectó la corriente eléctrica y se retiró el gel de los vidrios para su tinción y revelado.

Revelado del gel con nitrato de plata

- 1.- Los geles se colocaron en una caja de Petri de 20 cm. de diámetro con solución fijadora (etanol y ácido acético) durante 30 minutos
- 2.- Se decantó la solución.
- 3.- Se adicionó solución de nitrato de plata 0.011M y se dejó en agitación durante 30 minutos.
- 4.- Se lavaron los geles dos veces con agua desionizada (2 min. c/u)
- 5.- Se agregó la solución reveladora (hidróxido de sodio 3% en formaldehído al 0.5%) hasta que se observó la presencia de las bandas .
- 6.- Se eliminó la solución anterior y se le agregó ácido acético al 1 % para detener la reacción.
- 7.- Finalmente los geles se observaron a contra luz, para valorar la presencia de bandas.

Factores importantes para la estandarización de PAGE

La marca del reactivo que mostró eficiencia en la preparación del Fenol saturado, fue MERCK bufferado a pH 7, fue necesario dejarlo en agitación de 40- 72 hrs continuas en platina, pues ésta hace una buena homogeneización del Fenol con la solución Buffer. La solución de lisis se trabajó conforme a la técnica del INDRE, antes mencionada. Estrictamente se trabajó con guantes para evitar posibles contaminaciones y presencia de ribonucleasas, y desinfectando el área donde se trabajaba con el Fenol al 10%. Los vidrios de la cámara de electroforesis se limpiaron con alcohol al 96% , igual los separadores y el peine.

El buffer tris- glicina para el corrimiento de los geles se preparó a un pH. 8.6

El corrimiento se realizó con una corriente constante, de 900 V., 20 mA, 250 W y los demás factores se mantuvieron constantes, tardando aproximadamente 30-45 minutos

c) Detección del genoma de Rotavirus en heces de caprino

Lugar y fechas del muestreo

El estudio se realizó en las instalaciones de la FES-C, con el haro de cabras , el cual comprende tres grupos de producción: cabritos menores de 7 meses, los machos destinados a la venta y las hembras que se seleccionan para recría (hembras jóvenes o de remplazo) y la última cabras adultas en producción de leche y recría. Este muestreo abarcó dos etapa: del 22 de septiembre de 1994 al 17 de marzo de 1995, y otra del 30 de enero de 1997 al 12 de abril de 1997, las muestras se colectaron para el caso de cabritos cada semana, las de adultas y jóvenes de remplazo, mensualmente

Distribución de los animales por etapas productivas.

- 87 muestras de heces de cabritos con edades desde el nacimiento hasta los 7 meses.
- 40 muestras de cabras jóvenes de remplazo de 7- 15 meses
- 64 muestras de cabras adultas de mas de 15 meses

- 191 muestras en total.

Toma de muestras

Las muestra de heces fueron tomadas en forma directa del recto de los animales o del suelo de las instalaciones en las que se encontraban alojados cuando defecaban en el momento. Fueron introducidas en bolsas de polietileno y marcadas con el número de identificación de los animales. Estas muestras se diluyeron 1:10 en una solución de cloruro de calcio al 1.5 mM o en solución salina fisiológica y se mantuvieron en congelación hasta su utilización. El rebaño constaba de 45 animales, 24 adultas, 10 jóvenes de remplazo y 11 cabritos. Al momento de la toma de muestras los animales no presentaban cuadro sugestivo de enfermedad.

En los cabritos las muestras se recolectaron en forma semanal, no importando si se repetían los animales en cada toma, ya que lo importante era la etapa productiva como criterio de evaluación, recolectando aproximadamente 2 a 3 muestras por semana

En jóvenes de remplazo y adultas el muestreo era mensual, tomando en cuenta la etapa productiva, no el animal, y aproximadamente se colectaron 5 a 11 muestras por mes. Como control positivo se utilizó una muestra de cabrito la cual fue evaluada en un trabajo paralelo al presente.

Condiciones del PAGE para las muestras de caprinos

- 1.- Para lograr la extracción de las muestras de caprino, se colocaron en un tubo Eppendorf cuatro gotas ó 500 μ l de materia fecal, añadiendo 200 μ l de la sol. de lisis (INDRE)
- 2.- Se agitó vigorosamente por 1 minuto en el Vortex.
- 3.- Se agregaron 200 μ l de fenol saturado (Merck) pH 7.0 y nuevamente se agito en el Vortex durante 1 minuto.
- 4.- Se separó la fase acuosa de la orgánica con una pipeta Pasteur y a éste se le agregaron 200 μ l de cloroformo, agitando en el Vortex por un minuto.
- 5.- A 50 μ l fase acuosa se le agregaron 20 μ l de de Azul de Bromofenol, de esta mezcla se agregaron 20 μ l por pozo en el gel de Poliacrilamida.
- 6.- El gel concentrador se preparó al 5% y el separador al 10 %
- 7.- El primer gel se corrió a 20 mA a voltaje constante durante 15 minutos y posteriormente se paso a 40 mA durante 30- 45 minutos hasta la salida del colorante
- 8.- Los geles fueron fijados con Ac. acético-etanol, se revelaron mediante $AgNO_3$, se introdujeron en un secador de geles y finalmente se fotografiaron con película Kodalith de alto contraste.

RESULTADOS

Estandarización de la extracción del ARN viral y de la técnica de electroforesis.

Experimento 1.- Después del corrimiento electroforético se obtuvieron los resultados mostrados en el cuadro N° 3

**CUADRO No 3
COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LAS DOS
SOLUCIONES DE LISIS USADAS EN LA EXTRACCIÓN**

SOLUCIÓN	CONDICIONES	RESULTADOS*
Solución N° 1 ENCB	SDS, EDTA B-mercaptoetanol	Se observan dos bandas muy tenues
Solución N° 2 INDRE	Trisma base, EDTA, SDS, NaCl	Se observan 10 bandas compatibles con Rotavirus

* Resultados obtenidos al analizar el gel, posteriormente al corrimiento
Se utilizaron las muestras y extractos de humano

Experimento N° 2.

Cuando se emplearon fenoles de diversas marcas como soluciones de extracción y los extractos se corrieron, obtuvimos los siguientes resultados.

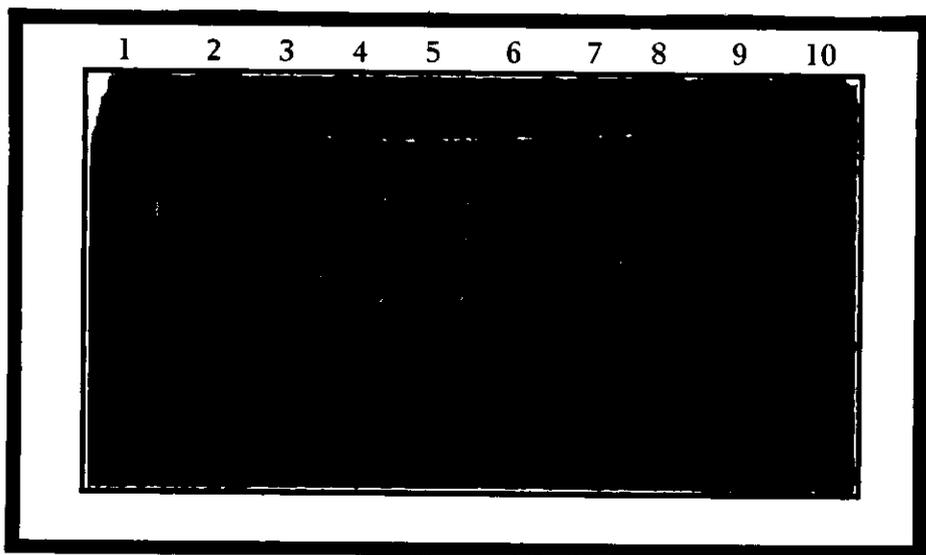
MARCA:	Merck	Monterrey	J.T.Baker
RESULTADOS:	*positivo	negativo	negativo

* positivo a la visualización de bandas compatibles con Rotavirus.

Experimento N° 3.

Se realizó la preparación de diferentes pH para la solución fenólica, desde pH 4 hasta pH 9, se encontró que el pH adecuado para la extracción del ARN viral y óptima separación de las bandas fue con un valor de 7.0. Los resultados se muestran en la fotografía del gel revelado con Nitrato de plata (Figura 1).

FIGURA N°2
FOTOGRAFÍA DEL GEL DE CORRIMIENTO UTILIZANDO DIVERSOS pH DEL FENOL



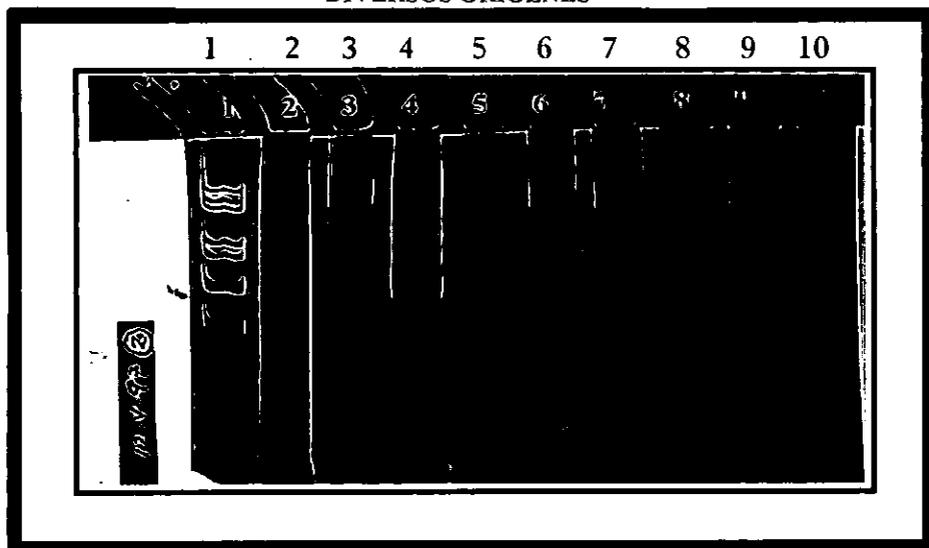
carril 1.- pH= 4.0
carril 2.- pH= 5.0
carril 3.- pH= 6.0
carril 4.- Control +
carril 5.- Extracto INDRE

carril 6.- pH= 9.0
carril 7.- sin muestra
carril 8.- pH= 7.0
carril 9.- pH= 8.0
carril 10.-Control +

Experimento N° 4 Y 5

En el Cuadro No.4 se indican los tratamientos que se le realizaron a las muestras aplicando diferentes concentraciones de las soluciones de lisis, fenol y cloroformo. El único que presentó bandas compatibles con Rotavirus fue el tratamiento número seis (Cuadro N° 4), tanto al trabajar con muestras provenientes de humano como con la muestra de cabrito positiva (Figura N° 3).

FIGURA No.3
CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE MUESTRAS OBTENIDAS DE
DIVERSOS ORÍGENES



carril 1.- muestra extraída de humano
carril 4.- muestra extraída de cabrito

CUADRO No.4
TRATAMIENTOS APLICADOS A LAS MUESTRAS DE MATERIA FECAL
POSITIVAS PROVENIENTES DE HUMANOS

TRATAMIENTO	ORIGEN	SOL-LISIS (μ l)	FENOL (μ l)	CLOROFORMO FENOL (μ l)	CLOROFORMO (ul)	RESULTADOS
1	H	50	100	N.A.	100	NEGATIVO
2	H	50	N.A.	100-100	N.A.	NEGATIVO
3	H	400	100	N.A.	100	NEGATIVO
4	H	400	N.A.	100-100	N.A.	NEGATIVO
5	H	CONTROL	CONTROL	CONTROL	N.A.	+++
6	C	200	200	N.A.	200	+++
7	H	400	200	N.A.	N.A.	NEGATIVO
8	H	50	N.A.	200-200	N.A.	NEGATIVO
9	H	100	N.A.	200-200	N.A.	NEGATIVO

+++.- Indica una adecuada visualización de las bandas en el gel

H.- Materia fecal proveniente de humano

C.- Materia fecal proveniente de caprino

Toma de muestra y detección del genoma viral

Una vez estandarizada la técnica de PAGE con las modificaciones anteriormente mencionadas, se procedió a trabajar las 191 muestras de heces de caprinos recolectadas en los dos periodos de muestreo, quedando la distribución de la forma indicada en el Cuadro N° 5

En total se realizaron 220 corrimientos, algunos de los cuales correspondieron a repeticiones en los casos dudosos o erróneos.

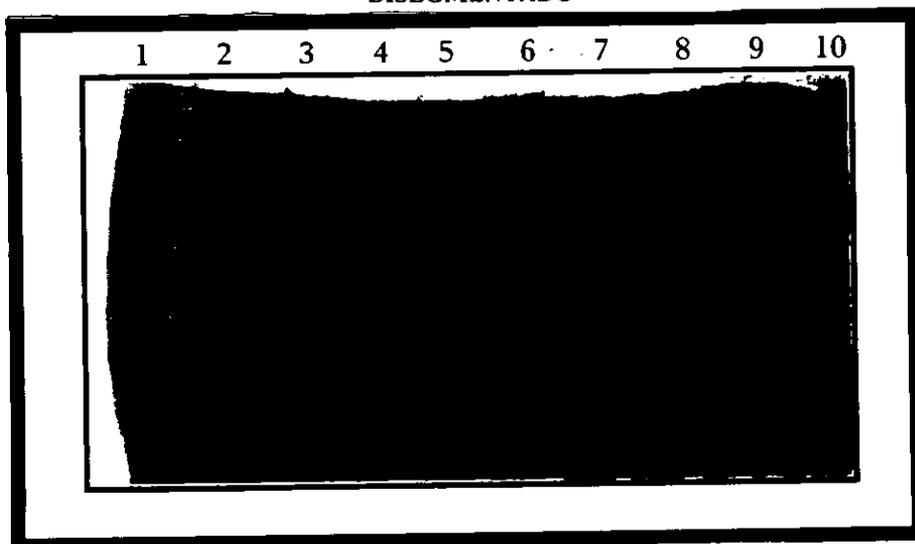
De las 191 muestras problemas corridas para Rotavirus todas fueron negativas, siendo positivo el control en todos los casos, pero se obtuvieron 3 muestras con un patron electroforético de dos bandas, posterior al segundo tratamiento con Cloroformo de estas 3 muestras y un corrimiento electroforético sólo una siguió visualizando esta doble banda en una de las muestras (figura No.4)

CUADRO No 5
DISTRIBUCIÓN DE LOS ANIMALES DEL HATO DE LA FESC.

FECHAS	CABRITOS	REPLAZOS	ADULTAS
Septiembre94	9*	5	5
Octubre 94	9	4	5
Noviembre94	19	4	4
Diciembre 94	15	11	24
Enero95	6	5	5
Febrero95	3	5	5
Marzo95	15	5	5
Enero97	0	1	5
Febrero 97	7	0	3
Marzo97	2	0	4
Abril97	2	0	0
TOTAL	87	40	64

* Se refiere al número de animales muestreados

FIGURA No 4
FOTOGRAFÍA QUE MUESTRA LA POSIBLE PRESENCIA DE UN PATRÓN
BISEGMENTADO



carril 1.- control
carril 5.- ligero bandeo bisegmentado

carril 6.- ligero bandeo bisegmentado
carril 8.- patrón observado bisegmentado

DISCUSIÓN

Durante el presente trabajo se realizó la electroforesis del ARN del Rotavirus, para ello fue necesario primero estandarizar el método de extracción del ARN a partir de un cultivo viral y a partir de muestras de heces previamente probadas.

El proceso de extracción implica el sacar el ARN de la partícula viral y posteriormente separarlo de otros componentes como proteínas, carbohidratos y lípidos con un último paso de liberación de ARN de doble cadena. Para la extracción se debe considerar que el método debe disgregar la partícula viral pero respetar el genoma nuclear, el uso del SDS y el EDTA en combinación ha dado excelentes resultados en virología, sin embargo las cantidades agregadas dependen de la naturaleza del material que acompaña a las partículas virales, por lo que es necesario evaluar la eficiencia del proceso dependiendo de las concentraciones, material usado y personal técnico.

Para la separación se han diseñado diversas técnicas de extracción de material nuclear como la precipitación con alcoholes, la separación en fases de partición y la desnaturalización renaturalización; sin embargo existen ventajas y desventajas en las técnicas. Debido a que la separación por fases de partición utilizando fenol y/o cloroformo ha sido de las más empleadas en el trabajo con Rotavirus, se decidió utilizar este método.

En nuestros experimentos utilizamos dos soluciones de lisis, ambas reportadas bajo protocolos previamente establecidos, uno de ellos el empleado por el laboratorio de virología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y el otro establecido en el laboratorio de Rotavirus del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la SSA

En los resultados del experimento No.1 mostrados en la Cuadro N°3 se aprecian más claramente la presencia de bandas obtenidas con la solución de lisis N° 2, comprobando que las pequeñas variantes que existen con la solución de lisis N° 1 son capaces de modificar los resultados; de tal forma que el mejor efecto pudo ser debido a la ausencia de B-mercaptoetanol o a las menores cantidades de SDS y EDTA empleadas en la preparación de la Sol. N° 2. Durante el presente experimento no fue posible deducir a cual de los reactivos se debía el comportamiento, sin embargo para los fines del trabajo se continuó utilizando la Sol. de lisis N° 2.

La separación de los ácidos nucleicos en base a sus coeficientes de solubilidad empleando dos fases : una orgánica y una inorgánica , ha permitido la extracción adecuada con poca pérdida de material y bajos grados de destrucción del ARN, siendo necesario conocer tanto las características químicas del ARN como del reactivo encargado para su extracción, entre estos el fenol, se plantea que en este proceso ocurre una reacción típica ácido-base en donde la estructura de ARN tiene funciones básicas (NH), por lo cual puede actuar como una base que interacciona con un ácido como el fenol, dando origen a dos cargas de sentidos opuestos, los cuales hacen que ésta molécula de ARN sea soluble en agua y se puedan extraer fácilmente las dos cadenas, una con carga negativa y la otra con carga positiva; siendo ésta la posible causa para eliminar todo el ARN de una sola cadena y no interfiera con la extracción de ARN de doble banda.

Este paso elimina la posibilidad de encontrar ARN de una banda en las heces. Para lograr el efecto anterior se han descrito métodos que utilizan reactivos de un grado de pureza alto, en este trabajo se probaron diversos grados de pureza del fenol, así como la oxidación del mismo en variadas condiciones, los resultados observados en el Experimento No.2 indican que el fenol ultrapuro fue adecuado, sin embargo el fenol de la marca Merck fue casi tan adecuado como el ultrapuro, el comportamiento contrastó con lo observado para los fenoles de la marca Monterrey, el cual fue altamente oxidable (a pesar de agregarle 8-hidroxiquinoleína) y destruyó las muestras y con el de la marca JTBaker que no permitió la extracción de las muestras. Estos resultados tuvieron el efecto de abatir los costos de realización de la prueba al permitir utilizar fenol de tipo más económico.

Otro punto importante para la estandarización de este paso de la técnica, fue el experimento No. 3, pues el pH del fenol es muy importante para lograr una adecuada extracción, nuestros resultados indicaron que a un pH de 8.0 es factible extraer, pero las bandas se observan barridas y a pH de 7.0 se presentó una buena separación y compactación de las bandas (Figura N°2).

El método, combinando previamente el fenol y el cloroformo, antes de usarlo para la extracción del ARN, que han utilizado anteriormente varios autores (Gallimore C.I, 1995;) no fue útil en este trabajo puesto que no se logró la extracción (Cuadro N° 4), es factible que la causa haya sido el tipo de fenol utilizado, la marca de reactivos o el método con que se preparó la mezcla fenol/ cloroformo.

La cantidad de los diversos reactivos que se le agregaron a las muestras de heces, planteado en los experimentos 4 y 5, con los resultados mostrados en la tabla N° 4, indicaron que la concentración adecuada fue de 200µl de cada reactivo, igual como se utiliza en el INDRE, esto puede relacionarse con las condiciones propias de trabajo en cada laboratorio.

En todos los experimentos analizados anteriormente, siempre se incluyó un testigo previamente extraído en el laboratorio del INDRE, para asegurar que el proceso de corrimiento fuera el adecuado.

A pesar de que los geles de agarosa fueron los primeros en utilizarse para la electroforesis de ácidos nucleicos, también se han manejado los de poliacrilamida que presentan un mejor efecto de tamiz molecular, algunas desventajas observadas en los geles de agarosa es que no se puede conocer exactamente el tamaño del poro a pesar que se preparen a una concentración dada, la capacidad de separación es influida por el tampón o buffer que se utiliza para su preparación y los geles se deben manejar a una temperatura que no ocasione que se derrita, teniendo que controlar la temperatura durante el corrimiento (Holme y col., 1987).

Algunas de las ventajas que se han encontrando en la utilización de los geles de poliacrilamida son: (Carretero y col., 1981).

- Se pueden preparar con una gran variedad de tamaño de poros
- Se utiliza una gama amplia de tampones.
- Proporciona una separación rápida.

Durante el presente trabajo, la presencia de oxígeno no modificó el proceso de polimerización pues a pesar de que no se les realizó el vacío que se les debería de hacer, según Bryan y col. 1981, los geles gelificaron sin ningún problema.

El método empleado durante este trabajo tomó en promedio 6 horas para cada 20 muestras, similar a lo señalado por Giordano y col., 1991. al compararla con la técnica originalmente usada para extraer y realizar la electroforesis del ARN (descrita por Daudson y col., 1975). Anteriormente Espejo, en 1978, tomó estos datos para tratar de adecuarla para su uso en los hospitales, los resultados de la electroforesis podían obtenerse en 24 horas con un tiempo total de trabajo de 6 horas de un técnico, para trabajar de 6 a 10 muestras (Espejo y col., 1978). varios investigadores al notar el tiempo invertido trataron de reducirlo, como Chudzio y col., 1989, que lograron reducir el proceso a 9 horas, siguiendo Giordano y col., 1991 el cual montó dos técnicas diferentes donde la primera tomaba 6.5 horas y la segunda tan solo 5.5 horas; se considera importante la reducción del tiempo pues hay resultados que se necesitan con urgencia, para poder brindar un buen diagnóstico y solución de los problemas. Las muestras fueron tratadas con una solución de alta densidad como lo es el glicerol, mismo que ayuda evitar que se salgan la muestras de los depósitos en los geles hacia la superficie, sin embargo existen algunos inconvenientes en utilizar glicerol como por ejemplo si se le agrega menos de lo indicado éstas tenderán a ir hacia la superficie o si se le agrega mayor cantidad, las bandas presentaran corrimientos difusos sin apreciar bien la separación de cada una de estas.

En el proceso de corrimiento, las muestras son incoloras por lo tanto se requirió trabajar con un frente de corrimiento como el azul de bromofenol, el cual por sus características químicas, migra más rápido que las muestras dando la oportunidad de monitorearlas durante la electroforesis (Copper T.G., 1977)

Durante este trabajo fue indispensable contar con agentes reductores como el SDS y el B-mercaptoetanol ya que como se sabe estos incrementan la carga negativa de los ácidos nucleicos (Rosas F. M.M., 1997).

El lograr una buena separación de las bandas depende de las cargas iónicas y del peso molecular de las moléculas en estudio, en este caso de ARN viral. (Colme y col., 1987). Los ácidos nucleicos en solución tienen, en general, carga negativa debido a que los grupos fosfatos están ionizados; por lo tanto migran hacia el electrodo positivo. Los ácidos nucleicos están compuestos por largas cadenas y tienen casi idéntica relación carga-masa. En los geles las moléculas se mueven por los poros a una velocidad que es inversamente proporcional a la longitud de sus cadenas, ésta es lo que determina la separación, (Darnell y col., 1993).

Lo anteriormente expuesto quiere decir que entre más ligeras, migrarán más lejos y las de peso molecular mayor tenderán a correr menos. En este trabajo se realizó la separación de las moléculas de ARN unidimensionalmente ya que se mueven en una sola dirección. Una vez que se tienen el tamiz donde se corre la electroforesis es importante la forma como se manejen las muestras. Para obtener el patrón de 11 bandas característico de Rotavirus ('rotafóresis') es importante considerar la forma como se prepara el fenol o la cantidad que se le coloque a la muestra, pues esto puede producir migraciones aberrantes

Los Rotavirus se encuentran formados de 11 moléculas de ARN de distintos tamaños, es posible obtener 9 bandas en lugar de 11 porque 3 de los segmentos son de tamaño igual o muy semejante quedando prácticamente en la misma posición después del corrimiento (Espejo y col., 1978). En cuanto a la presentación del patrón electroforético de Rotavirus se divide en cuatro bloques, el bloque uno presenta cuatro segmentos, el bloque

En cuanto a la presentación del patrón electroforético de Rotavirus se divide en cuatro bloques, el bloque uno presenta cuatro segmentos, el bloque dos tiene dos segmentos, el bloque tres se muestran tres segmentos y el bloque cuatro presentan dos segmentos. (Gracia y col, 1996).

En el presente trabajo se observó un efecto por la variación del pH en el buffer de corrimiento ya que cuando el valor era menor de 8.0, las bandas corrían desalineadas (Figura N°2), es importante no perder de vista el fenómeno de la electro-ósmosis, causada por partículas contaminantes ocurriendo principalmente cuando no se trabaja con materiales estériles o sin agua desionizada. Este fenómeno puede explicar los geles en los que se observó un corrimiento de las bandas desalineado.

El procedimiento del revelado con nitrato de plata también es importante, pues aunque se hayan manejado bien los demás factores, este puede ocasionar que las bandas no se noten o se oscurezca totalmente el gel; el reactivo que se utilizó en este trabajo fue nitrato de plata al 0.011M igual que lo realizado por Hubbell en 1979 para poder visualizar los ácidos nucleicos presentes en el núcleo de cualquier célula; siendo dicha tinción altamente sensible para los fragmentos de ADN y ARN (Merrill y col., 1987)

La intención de estandarizar la técnica de electroforesis en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal, FES-Cuautitlán, fue para poder tener un método que pudiera brindar apoyo para futuras aplicaciones en la investigación y la docencia.

En un trabajo anteriormente realizado, mediante electroforesis y aislamiento viral, se encontraron Rotavirus en tres animales de 30 muestreados del hato de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Ortiz V., 1996).

Durham y col., 1979 reportaron las especies de animales en las que es más frecuente encontrar la presencia de Rotavirus, siendo las vacas y cerdos los más afectados y los caballos, cabras, ovejas y perros solo esporádicamente. Pocos autores han estudiado los Rotavirus en cabras (Da Costa y col. 1994); uno de los primeros fue Scott 1978 quien lo diagnosticó por medio de la microscopía electrónica, siguiéndolo Iovane 1988, quien detectó la presencia de anticuerpos en cabras. Durham en 1979 buscó la posible asociación de Rotavirus con Coronavirus en los animales domésticos, siguiendo Muñoz y col. en 1993 encontrando Rotavirus en una infección natural en un rebaño, siendo solamente los cabritos afectados.

Debido a que los Rotavirus afectan principalmente a animales jóvenes (Tortora 1996, y Muñoz 1993, Muñoz 1995), el muestreo durante el presente trabajo se realizó con un mayor número de heces de cabritos. Así mismo, Kaminjolo y col 1994 quienes realizaron un estudio comparativo en varias especies incluyendo cabras para saber como se presentaba el virus de acuerdo al tipo de explotación y cuadro clínico de los animales, mencionan que las cabras eran la especie menos trabajada, encontrando solamente una muestra positiva que fue hallada en explotaciones semintensivas.

En el presente estudio, el sondeo que se realizó fue a todo el rebaño (aleatorio), no se tomó en cuenta si presentaban cuadro diarreico o estaban aparentemente sanos, basándose en trabajos previos en donde se ha demostrado que el virus puede eliminarse tanto de animales con cuadro diarreico como sin él (Kaminjolo, 1994, Ciatti, 1989, Gallimore, 1995)

Los resultados obtenidos en el estudio son congruente con los trabajos ya mencionados, pues a pesar que los animales de la FES-Cuautitlán están en una explotación semintensiva no se logró evidenciar al Rotavirus en este rebaño. Eso no indica que estén libres de este agente, se puede considerar que durante los periodos de muestreo no se detectó el virus utilizando la electroforesis lo que puede deberse a que su sensibilidad de detección es de 10^5 - 10^{13} partículas virales/ml de heces.(Gracia y col., 1996).

Sin embargo considerando que la transmisión del virus es por vía fecal - oral, y que se eliminan más de 10^8 partículas virales por gramo, en caso de existir animales falsos negativos, éstos no serían un problema grave (García y col., 1996).

En el desarrollo del trabajo, el muestreo abarcó gran parte del año, tomándose en las estaciones donde se reporta una mayor eliminación del virus como son en otoño e invierno; aún así no se lograron obtener resultados positivos.

En un pequeño porcentaje de las muestras estudiadas en este trabajo se detectó un patrón electroforético bisegmentado. Cabe mencionar que en otro trabajo realizado por Pereira y col., 1994 al estar determinando Rotavirus y adenovirus también se encontró este patrón pero en humanos, los autores lo consideraron como un nuevo grupo de virus pequeños, compuestos de ARN de cadena doble. A estos microorganismos se les ha dado el nombre de Picobirnavirus (PBVs), mencionando que también se han encontrado en otras especies de vertebrados; aclarando que su asociación con los procesos patológicos en el ser humano no se ha establecido, aunque Gatti y Col., 1989 lo han ligado con diarrea en cerdos. En el caso del presente trabajo solo se obtuvo el patrón de bandas bisegmentadas en 3 (1.57%) de las muestras problema y no se presentaron en los controles. Aunque después de repetir la extracción sólo una siguió presentando un bandeo bisegmentado nítido

Aunque en este trabajo no se logró demostrar la presencia de Rotavirus, la electroforesis también puede utilizarse para evaluar la presencia de otros virus en heces, como Adenovirus, Picobirnavirus y Coronavirus (Espejo y col., 1978; Pereira y col., 1984).

En el presente trabajo se realizó la modificación de los factores que intervienen en la extracción y corrimiento los resultados indicaron que hay variación en la eficiencia de la detección. Gallimore y col. en 1995, utilizaron el sistema de Liammli, donde no trabajaban con el SDS; utilizando la extracción fenol-cloroformo y electroforesis en PAGE, posteriormente modificaron la extracción utilizando GUSCN/silica mejorando con esto la sensibilidad, en un 12% de las muestras estudiadas dieron positivo a PBVs. Espejo y col., 1978 también consignan la presencia de bandas superiores al patrón electroforético y las cuales no tienen origen viral, él las encontró tanto en sus muestras negativas como en sus controles. Una vez que purificó sus aislamientos estas tendieron a desaparecer

Para poder demostrar que los patrones de bandeo encontrados corresponden realmente a la presencia del PBVs sería necesario haber sometido estas mismas muestras a un análisis por microscopía electrónica, lo cual escapó al objetivo de este trabajo.

Es importante mencionar que se realizó una tesis en 1996 por el MVZ Virgilio Irac Ortiz, en la cual se tomaron muestras del hato de cabras de la FES-Cuautitlán, en dicho trabajo se encontraron tres muestras positivas de 30 estudiadas en periodos de lactancia, la identificación que presentaban las muestras era una numeración 6, 25 y 30, al buscarlos en el hato de cabras no se localizaron, pues salieron a la venta; por lo cual no fue posible tener un seguimiento de estos animales.

Se puede considerar que la causa que modifica los diferentes resultados en estos dos trabajos, es que el hato presenta mucho movimiento de animales (salen a la venta) además que la tesis antes mencionada no manejan época del año en el cual fue muestreado el rebaño y forma como lo realizaron presentando parámetros muy abiertos, por lo tanto no se utilizaron las mismas condiciones.

Observando el patrón que tuvieron las 3 muestras positivas en el trabajo antes mencionado, comparándolas con dos muestras positivas obtenidas en Hidalgo, se aprecia un patrón muy similar, tanto en distancia final recorrida como en la separación del bandeo. Se ha reportado que los Rotavirus presentan rearrreglos genéticos y es difícil, que aún siendo obtenidas las muestras del mismo animal, que siempre presenten el mismo patrón lo que indica que ellas presentarán variaciones ligeras en los corrimientos, siendo el más frecuente el segmento 11, el cual puede formar estructuras encadenadas que migran menos en los geles (Alvarez G, 1990).

Durante el desarrollo del presente trabajo no nos apoyamos en otra prueba de diagnóstico, ya que se quería estandarizar la electroforesis, además hay varios estudios que se basan en esta misma técnica para el diagnóstico de Rotavirus (Puertos S.M y col., 1996). Si bien se pueden emplear otro tipo de pruebas para la identificación del virus como lo es la microscopía electrónica (ME), ELISA, fijación de complemento (FC) y PCR. En el caso de microscopía electrónica sus costos son muy altos sin poderla por el momento montar en este laboratorio para el diagnóstico de rutina aunque es la más eficiente para el diagnóstico de Rotavirus. (Alvarez y col., 1982; Giordano y col., 1991).

Alvarez y col., 1982 mencionan que la prueba de fijación de complemento no dio resultados concordantes con la ME, a pesar que se usaron en la prueba mezclas de sueros de conejos que habían sido inoculados con Rotavirus humano, y en su trabajo consideró a la prueba de ELISA muy útil, ya que presentó una alta sensibilidad, asegurando que la materia fecal contiene Rotavirus cuando el color desarrollado en el inmunoensayo alcanza valores de absorbancia equivalentes a tres a cuatro cruces y se sospecha cuando los valores son de una a dos; por nuestra parte consideramos que la prueba de ELISA en humanos si puede ser una de las mejores, pero en animales se presenta un alta variabilidad antigénica del Rotavirus en las diferentes cepas de humanos y animales, dándonos resultados falsos negativos principalmente, siendo adecuada a nivel de rebaño para sondeo, pero una sola muestra se debe interpretar con precaución (Scott y col., 1988).

La reacción en cadena de Polimerasa, es una de las técnicas más confiables, ya que se realiza la amplificación del material genético, utilizando oligonucleótidos específicos de grupos A, B y C (García y col., 1996), pero no se puede realizar en cualquier laboratorio por sus costos altos, así mismo las pruebas de detección basadas en la unión inmunológica al virus (ELISA, ID, IF) permiten obtener resultados positivos solo cuando la cepa de Rotavirus pertenece al mismo grupo serológico.

Da Costa y Col 1994 encontraron Rotavirus del serotipo A y B en un rebaño de cabras; en 1994 Kamijoño encontró que los animales pueden eliminar virus sin presentar cuadro diarreico y en 1995 Muñoz detectó los serotipos A y B en cabras.

Por los datos recopilados en el presente trabajo sobre la técnica de (PAGE) se apreció las posibles aplicaciones para diagnóstico rutinario en cabras, ovinos y en canideos. El método desarrollado puede ser empleado para estudios epizootiológicos al poder diferenciar los rearrreglos, para estudios de patogénia al ser utilizada como una técnica para detectar virus en diversos tejidos o bien para elucidar el papel zoonotico que juegan los Rotavirus.

CONCLUSIONES

Se logró la estandarización de la técnica de electroforesis para ARN viral (Rotaforesis) dentro del Laboratorio de Investigación Multidisciplinario de Salud Animal, FES-Cuautitlan con las siguientes condiciones:

- a) Usando la Solución de lisis N° 2
- b) Empleando sólo fenol a pH de 7.0, preparado bajo el método de la ENCB
- c) El fenol Q.P. de la marca Merck fue satisfactorio
- d) Agregando 200 ul de todos los reactivos y muestra.

La técnica desarrollada se puede emplear para el diagnóstico de Rotavirus caprino, así como para otros estudios epizootiologicos, zoonoticos y de diagnóstico.

El hato de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán no presentó evidencias de Rotavirus durante los meses de Septiembre de 1994 a Marzo de 1995 y retomando en Enero del 1997 hasta Abril del mismo año por lo que no se pudo apreciar el movimiento del Rotavirus caprino en el hato.

Se detectó un patron de doble banda de alto peso molecular en el porcentaje de las muestras, atribuible a Picobirnavirus.

APÉNDICE :

SOLUCIONES:

- 1.- Solución salina fisiológica

Cloruro de sodio	MERCK	0.9g
Agua destilada cbp		100 ml
- 2.- Solución de cloruro de calcio 1.5 mM

Cloruro de calcio	MERCK	0.17 g
Agua destilada cbp		1000 ml
- 3.- Solución de lisis N°1:

SDS 6% ,EDTA 36 mM y Beta- Mercaptoetanol (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas):

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	SIGMA	6.00 g
Etil diamino tetraacetato (EDTA)	MERCK	1.85 g
B- mercaptoetano	BIO-RAD	0.60 g
Agua desionizada cbp		100 ml
- 4.- Solución de lisis N° 2 (INDRE)

Trisma BASE	SIGMA	1.65g
EDTA	MERCK	1.4g
SDS	SIGMA	0.65g
NaCl	SIGMA	2.00g

Disolver en 20 ml de agua bidestilada estéril,
Agregar 0.65 ml de mercaptoetanol.

Agua desionizada		50 ml
------------------	--	-------
- 5.- Fenol destilado saturado + B- mercaptoetanol 2%

Fenol	MERCK	50.0g
8-hidroxiquinoleina	MERCK	2.05 g
B-mercaptoetanol	BIO-RAD	2%
Agua desionizada cbp		20 ml

Saturar con Tris 1M pH 8 v/v, toda la noche en refrigerador; desechar la parte acuosa y adicionar Tris 0.1M pH 8 v/v agitar continuamente hasta tener un pH a 7, agregar 2% de B-mercaptoetanol al Tris 0.1M pH 8
- 6.- Las solución de Fenol se prepararon con los siguientes pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0

Hidróxido de sodio 3N	MERCK	
Ácido clorhidrico 3N	J.T.BAKER	
- 7.- Fenol-cloroformo

Fenol saturado pH 7	MERCK	100µ
Cloroformo	J.T.BAKER	100µ

8.- Regulador Tris 1.5 M pH 8.8 para el gel espaciador		
Trizma base	BIO-RAD	18.16 g
Agua desionizada cbp		100 ml
ajustar el pH 8.8 con HCl 3 N		
9.- Regulador Tris 0.5 M pH 6.6 para el gel concentrador		
Trizma base	BIO-RAD	6.05 g
Agua desionizada cbp		100 ml
ajustar el pH 6.8 con HCl 3N		
10.- Regulador de corrimiento Tris- Glicina		
Trizma base	BIO-RAD	3.00 g
Glicina	SIGMA	18.7 g
Agua desionizada cbp		1000 ml
11.- Acrilamida 30 %, Bis- Acrilamida 0.8%		
Acrilamida	SIGMA	30.0 g
Bis- acrilamida	SIGMA	0.8 g
Agua desionizada cbp		100 ml
12.- Persulfato de amonio 1 %		
Persulfato de amonio	BIO-RAD	0.1 g
Agua desionizada cbp		1 ml
13.- TEMED		
	SIGMA	comercial
14.- Glicero- azul bromofenol		
Tris HCl pH 6.8	BIO-RAD	2.5 ml
Glicerol	SIGMA	5.8 ml
Azul de bromofenol	BIO-RAD	5.0 mg
Agua desionizada cbp.		50.0 ml
15.- Etanol al 10% en ácido acético al 0.5 %		
Ácido acético	MERCK	0.2 ml
Etanol	MERCK	0.5 ml
Agua desionizada cbp		50.0 ml
16.- Nitrato de plata .011M		
Nitrato de plata	J.T.BAKER	0.46 g
Agua desionizada cbp		250 ml
17.- Formaldehido en hidróxido de sodio 3%		
Hidróxido de sodio	MERCK	49.5 ml
Formaldehido	MERCK	0.5 ml

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- **Adams, W.R, and L.M.Krsft.** 1963. Epizootic diarrhea of infant mice: identification ethiological agent. *Science*. 141: 359-360
- 2.- **Alvarez G.V.** Rotavirus: Características e Intentos de Vacunación.-- México D.F,1990-- .p.p 1-83,-- Doctorado(Q.P.B)--.I.P.N. Escuela Nacional de Ciencias Biologicas.
- 3.- **Alvarez, M., J.P Guiscafre, C. Mondragon, M. Morales, J.Ruiz and A. Martinez.** 1982. Comparación de las técnicas de electroforesis del RNA viral. ELISA y fijación de complemento con la microscopia electrónica para demostrar rotavirus. *Arch. Invest. Med. México*. 13: 145.
- 4.- **Anonimo,** Diarrea Infecciosa Aguda *Revista Biomedica*, 1.4 (3): 129-140.
- 5.- **Barron, B.L., M. Cruz López, R. Doval, P.Gaercía, H. Guzman, E. Bayghene, A. Ramirez, N.V. Maya y J. Zavala.** 1989. Rotavirus, p. 109-117 In Pérez Villaseñor (ed) *Manual de Practicas del Laboratorio de Virologia*, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biologicas IPN, Impreso en los talleres Gráficos de la Dirección de Bibliotecas y Publicaciones del I.P.N, México D.F.
- 6.- **Bishop, R.F., G.P. Davidson, I.H. Holmes and B.J. Ruck.** 1973 Virus particle in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*, ii: 1281-1283
- 7.- **Blodd D.C., O. Radositis, J.A Henderson, J.H Arundel, C.C GAY.** *Medicina Veterinaria, Interamericana, México, D.F.* 1988.
- 8.- **Bryan, L.and K.Wilson.** 1981. Técnicas de Electroforesis,Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental, p134-146. 2da edición .Omega, Casanova 220 Barcelona. España.
- 9.- **Carretero, F.D., and C.P. Alio.** 1981. Electroforesis, p 235-259, In. R. Guerrero (ed) *Técnicas de bioquímica y Biología Molecular*, Depto de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Ed.Reverte S.A Barcelona .
- 10.- **Cooper, T.G.** 1977. Electrophoresis, p194-212 In.WILEY J (de).*The Tools of Biochemistry*. University of Pittsburgh, Wiley Interscience New York
- 11.- **Correa, P.,** 1980. Rotavirus bovino, p151-173. *Enfermedades virales de los animales Domesticos, Poligasticos*, 12, 5ta. edición, Paradigmas México D.F.

12. - **Chudzio, T., S. Kasatiya; and N. Irvine.** 1989. Raprol Screening Test for the Diagnosis of Rotavirus Infection, *Journal of Clinical Microbiology* 61:2394-2396.

13. - **Da costa Mendes, V.M., M.C Debeer, G. H Goosend and A.D Steele.** 1994. Isolation and preliminary characterization of caprine rotavirus, *Onderstepoort Vet. J.* 61: 291-294.

14.-**Darnell, J. H., Lodish, and D. Baltimore.** 1993. Manipulando células y virus, p162-199. *Biología Celular y Molecular*, 2 da. ed. Omega S.A Barcelona.

15.- **Durham, P.J.K., B.J Stevenson and B.C Farquharson.** 1979. Rotavirus and Coronavirus associated diarrhoea in domestic animals, *N. Z. Vet. J.* 27: 30-32.

16.- **Espejo, R., P. Romero, E. Calderon, and N.Gonzalez.**1978 Diagnostico de Rotavirus por electroforesis del RNA viral, *Bol. Med. Hosp. Infant.* LXXXV Num. 2: 323-330.

17. -**Estes, Mary K.** 1996, *Advances in Molecular Biology:Impact on Rotavirus Vaccine Development*,*JID*,174(11): S37-S46

18 - **Kapikian, A.Z and R.M Chanock.** 1990. Rotavirus. In B N Fields de. *Virology*. Raven Press, New York. 1353-1404.

19 - **Gallimore, C.I., H. Appleton, D .Lewis., J. Green and D.Brown.**1995. Detection and characterisation of Bisegmentes Double-Stranded RNA virus (Picobirnavirus) in humanos faecals Specimens. *J Med Virol.* 45:135-140 .

20. - **García, H, E. Ramirez, M. Melo, E. Mayen, A. Rodriguez and A.Velasco.** 1996. Manual de Diagnostico y Tipificación de Rotavirus. In A.Escobar Gutiérrez ed.,*Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiologica*. Secretaria de Salud. México D.F.

21.- **Gatti.** 1989. viruses with bisegmentad double-stranded RNA in pig Faeces. *Short Communications, Res Vet Sci.* 47:397-398.,

22 - **Gioprdano, M.O, S.N. Basnec, S. Nates, F.Bennum and A. Depents** 1991 Rapid technique for diagnostic and epidemiological studies of rotavirus infection. *J.Virol.Meths.*35:39-63.

23.- **Holmed, D., and H .Peck,** 1987. .Metodos de Separación, p85-119,*Bioquimica Analitica*,Ed. Acriba S.A. Zaragoza. España.

24. - **House, J.A.,**1978, Economic Impact of Rotavirus and Other Neonatal Disease Agents of Animals, *September (1):*78.

25-Iiovane, G. P., Pagnni, F., O Martone and A. Bonaduce. 1988. Ricerch suilla presenza e difusione di anticorpi per Rotavirus negli ovni e caprini. Act.Med.Vet.(34): 3-9.

26.-Kamijolo, J.S and A. Asesiyun. 1994. Rotavirus infección en calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad , Br.Vet.J. 150:293-299 .

27.-Merril, R.C. 1978. Deteción of Proteins separated by Electrophoresis. Advances in Electrophoresis. p 113-115. In M.J Dunn and B.J Rabola ed. (.1): 113-115 .

28.-Mohanty, S.B and S.K .Dutta. 1983. Virologia Veterinaria, p 25, ditorial Interamericana S.A México D.F .

29.-Muñoz, M., I.Lonza., M.Alvarez and P.Carmenes. 1993. Rotavirus excretion by kids in naturally infected goat herd. Small Ruminant Research 14 :83-89.

30.-Muñoz, M., M. Alvarez and I.Lonza . 1995. An outbreak of diarrhoea associated with atypical rotaviruses in goat kids. Res Vet Sci, 59:180-182.

31.-Ortiz G.V.I. Rotavirus en ovinos y caprinos: detección por electroforesis y aislamiento en cultivos celulares. --Cuautitlan Izcalli, 1996.-- p.p1-34.--Licenciatura (M.V.Z)-- UNAM, FESC Cuautitlan,

32.-Pereira, H.G., A.C Climhares., J. Candeias and R.I Glass. 1994 Gastroenteritis en los Laboratorios Nacionales de Brasil. Bol. of Sanil Panama 116(1): 27-36

33.- Porterfields, J. 1989. Andrews Viruses of Vertebrados, primera edición, de. Baillere Tindall Printed in Great Britain .

34. Puertos, S.M., G.G. Polanco., M. R. Gonzalez., M. Alvarez and F.I. Puerto. 1996 Clasificación de los rotavirus aislados de granjas porcícolas localizadas en el estado de Yucatán, Vet. Méx., 27 (1): 29-32.

35. -Rosas, M. 1997. La electroforesis como método de Diagnostico. BEB 97. .15(2):31-35

36.-. Scott, J., Luddington and M.Lucas. 1978. Rotavirus in Goats. The Vet Rec. Agust 12 (32): p45 .

37.-Scott, R., Snodgrass., P.Molyneaux and G. Winter .1988. Rotavirus diagnostic Kits, The Veterinary Record, March 12: 262-263.

38.- Shozo, U., H. Ayoko., U.Tomoko., T.Koki., W.Fumigo., S.Hiroshi., Y.Sakae., P.Boonyongp., S Jriaporn., T.Supin and Y Yukio. 1992. Antigenic and Genetic Analyses of Humano Rotaviruses in Chinany Mai Thailand. Evodence for a Close Reta ionship between Humano and Animales. J. Infec Dis , 166: 227-34.

39.- **Soler, Claudin C.**1994. Rotavirus. In S.Giono; A.Escobar, J.L Valdespino de. Diagnostico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiologicas Secretaria de Salud, México D.F. 157-165 ..

40 .- **Tortora, J.**1986. Aspectos generales de las diarreas. In P.Piojan y J.Tortora ed., Principales Enfermedades de los Ovinos y Caprinos, México D.F. 57-78,

41.- **Tortora, J.**1986. Diarrea Recien nacidos. .In p.Piojam y J. Tortora ed Principales Enfermedades de los Ovinos y Caprinos,México D.F. p 74-173

42 .-**Valdespino,J.L., I. García., A. Del Rio and A.Salcedo.**1994. Magnitud y Trascendencia de las infecciones gastrointestinales y medidas de intervención. In S.Giono. A. Escobar, J.L Valdespino .Diagnostico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales, Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiologicas Secretaria de Salud, México D.F. 3-27,

43.- **Williams, B.y K. Wison. K.**Cap. Técnicas electrofororetica, Principios y Técnicas de bioquímica Experimental de Omega S.A. Casanova 220, Barcelona españa 105-113