

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA.

UNAN LEON.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA.



**TESIS: PARA OPTAR AL TITULO DE
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA**

**PREVALENCIA Y ELECTROFEROTIPOS DE ROTAVIRUS BOVINO GRUPO
A EN TERNEROS CON DIARREA EN EL PERIODO DE FEBRERO –
NOVIEMBRE DEL 2008 EN FINCAS GANADERAS DE LOS MUNICIPIOS
DE LEÓN Y CHINANDEGA.**

AUTORES:

OMAR ANTONIO BUCARDO RIVERA

ENRIQUE ULISES CORRALES GÁMEZ

TUTOR:

Msc. JOSE LUIS BONILLA, MDV.

CO-TUTOR

PhD. FELIX ESPINOZA CACERES

ASESOR

Lic. BRENDA MORA SANCHEZ

LEON. JUNIO 2009

**PREVALENCIA Y ELECTROFEROTIPOS DE ROTAVIRUS BOVINO GRUPO
A EN TERNEROS CON DIARREA EN EL PERIODO DE FEBRERO –
NOVIEMBRE DEL 2008 EN FINCAS GANADERAS DE LOS MUNICIPIOS
DE LEÓN Y CHINANDEGA.**

**OMAR ANTONIO BUCARDO RIVERA
ENRIQUE ULISES CORRALES GÁMEZ**

**TESIS: PARA OPTAR AL TITULO DE
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA**

AGRADECIMIENTO.

Agradezco a YAHVE por haberme concedido sabiduría, paciencia y perseverancia todo este tiempo para terminar mis estudios universitarios.

A mis padres Ulises Enrique Corrales Gámez y Leonor Isabel Gámez Gámez por su ayuda incondicional, anegable y por su apoyo en todo el transcurso de mis estudios.

A todos los maestros que a lo largo de cinco años compartieron conmigo sus valiosos conocimientos.

Al Msc. José Luis Bonilla Espinoza, por haber confiado en mí para realizar esta tesis, la cual ha enriquecido en gran manera mis conocimientos.

Al Dr. Félix Espinoza por los conocimientos brindados y por poner a nuestra disposición todos los servicios de laboratorio del Campus Médico, sin los cuales no se hubiese podido realizar esta investigación.

A la Lic. Brenda Mora Sánchez quien nos asesoró para la correcta realización de esta tesis.

Al Lic. Fred Anthony Altamirano Alemán quien nos ayudo en la realización de los laboratorios (Diagnostico de IDEIA Rotavirus).

Y de manera especial agradezco a mi compañero de clases, de tesis y amigo Omar Antonio Bucardo Rivera, por contribuir de manera significativa en todo el transcurso y desarrollo de este trabajo investigativo.

Enrique Ulises Corrales Gámez

DEDICATORIA.

Dedico esta tesis a Dios mi Padre y Creador quien me ha dado la vida, la sabiduría, el conocimiento, que puso en mi, tanto el querer como el hacer, a mis padres Ulises Enrique Corrales Gámez y Leonor Isabel Gámez Gámez quienes me ayudan en todos los aspectos posibles de la vida y a mi tía Ada Gámez Gámez, quien es fuente de inspiración y ejemplo de perseverancia para mi.

Enrique Ulises Corrales Gámez

AGRADECIMIENTO

A DIOS por haberme concedido la vida, para poder culminar mis estudios universitarios y sabiduría para concluir esta tesis.

A mis padres FIDENCIO BUCARDO SALGADO Y ROSA HILDA RIVERA BUCARDO por inculcarme muchos valores como el amor al trabajo y sobre todo la honestidad.

A mi hermano FILEMON BUCARDO RIVERA por ayudarme económica y anímicamente a terminar mis estudios y sobre todo por el ejemplo a seguir en el mundo del conocimiento.

A la persona que día a día me alentaba con sus buenos consejos y me animaba a seguir luchando por mis sueños y por darme su amor IVETTE MARGARITA PEREZ.

A mi tía Bernarda Nohemí Bucardo por darme siempre esperanza y animarme con su buen semblante por su alegría y cariño hacia mí.

A el Dr. FELIX ESPINOSA por todo su tiempo, sus conocimientos y aportes económicos que nos brindo para realizar esta tesis.

A Dr. JOSE LUIS BONILLA por tutorarnos esta tesis dándonos su amistad y confianza.

A Lic. BRENDA MORA, Lic. PATRICIA, Lic. SOLEDAD por apoyarnos en asesoría y en realizar las pruebas de laboratorio.

OMAR ANTONDO BUCARDO RIVERA

DEDICATORIA

A DIOS por darme discernimiento y vida para culminar mis estudios.

A mis padres por estar siempre dispuestos a apoyarme en necesidades y por dame su amor siempre.

A mi novia IMARG IVETTE MARGARITA por dame su amor incondicional y por estar presente en todos mis logros.

A mi compañero de tesis Enrique Ulises Corrales Gámez por soportar mis críticas y aportar mucho en esta tesis sobre todo su

A los profesores quienes aportaron un granito de arena para construir día a día mis conocimientos, los que me durarán toda la vida.

OMAR ANTONDO BUCARDO RIVERA

El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.
(Albert Einstein 1879-1955)

Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.
(Isaac Newton 1642-1727)

El principio de la sabiduría es el temor a Jehová. (Salomón 970 AC-931 AC. Rey de Israel).

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
1 AGRADECIMIENTOS	
2 DEDICATORIAS	
3 INDICE	
4 RESUMEN.....	1
5 INTRODUCCIÓN.....	2
6 ANTECEDENTES.....	4
7 PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
8 JUSTIFICACIÓN.....	8
9 OBJETIVOS.....	9
<i>9.1 Objetivo General.....</i>	<i>9</i>
<i>9.2 Objetivos Específicos.....</i>	<i>9</i>
10 MARCO TEORICO.....	10
<i>10.1 Rotavirus.....</i>	<i>10</i>
<i>Generalidades.....</i>	<i>10</i>
<i>10.2 Proteínas Estructurales.....</i>	<i>11</i>
<i>10.3 Proteínas no Estructurales.....</i>	<i>12</i>
<i>10.4 Epidemiología Molecular.....</i>	<i>13</i>
<i>10.5 Patogenia.....</i>	<i>13</i>
<i>10.6 Diagnostico.....</i>	<i>15</i>
<i>10.7 Tratamiento.....</i>	<i>16</i>
<i>10.8 Inmunidad Pasiva y Respuesta Inmune frente a Rotavirus...</i>	<i>16</i>
<i>10.9 Prevención y Control.....</i>	<i>17</i>
11 MATERIAL Y METODOS.....	20
<i>11.1 Diseño Metodológico/Tipo de estudio.....</i>	<i>20</i>
<i>11.2 Área de estudio.....</i>	<i>20</i>
<i>11.3 Población y tamaño de muestra.....</i>	<i>20</i>
<i>11.4 Selección y Recolección de la muestra.....</i>	<i>21</i>

11.5 Técnica ELISA.....	22
11.6 Determinación del grupo A de Rotavirus mediante ELISA.....	22
11.7 Materiales.....	23
11.8 Protocolo para la extracción del ARN viral.....	23
11.9 Técnica ELECTROFORESIS.....	24
11.10 Electroforesis del ARN de rotavirus en gel de poliacrilamida	24
11.11 Preparación de los geles.....	24
11.12 Tinción y revelado.....	25
11.13 Reactivos y equipos.....	26
12 RESULTADOS/GRAFICOS.....	27
12.1 Fig. 1 Prevalencia de Rotavirus bovino.....	27
12.2 Fig. 2 Distribución de edades en muestras positivas al virus..	28
12.3 Fig.3 Razas bovinas con mayor porcentaje positivo rotavirus.	29
12.4 Fig. 4 Síntomas de los terneros positivos a Rotavirus.....	29
12.5 Fig. 5 Color de heces positivas a Rotavirus.....	30
12.6 Fig. 6 Consistencia de heces positivas a Rotavirus.....	30
12.7 Fig. 7 Patrones de migración del Rotavirus por Electroforesis.....	31
13 DISCUSIÓN.....	32
14 CONCLUSIONES.....	34
15 RECOMENDACIONES.....	35
16 BIBLIOGRAFIA.....	36
17 ANEXOS.....	41
17.1 Imagen 1. Estructura Del Rotavirus.....	42
17.2 Imagen 2. Placa con micropocillos usados en ELISA.....	43
17.3 Fotos de equipos empleados en la Electroforesis.....	44
18 Ficha utilizada en la recolección de datos.....	45

4. RESUMEN

Once muestras fecales de terneros con diarrea neonatal, positivas a Rotavirus Grupo A por inmunocromatografía ELISA directo y analizadas en gel de poliacrilamida PAGE las muestras fueron recolectadas en 25 fincas lecheras localizadas en los municipios de León y Chinandega. A esas 11 muestras positivas a Rotavirus Bovino Grupo A se les extrajo el ARN viral para poder analizarla a través de la técnica de electroforesis no se les realizó esta técnica a todas las muestras en su totalidad solo a 3 muestras porque estas muestras eran las que tenían suficiente material genético ARN para realizarle la Electroforesis de las 3 muestras 2 muestras presentaron bandas similares quiere decir que es una infección por un solo tipo de Rotavirus, en cambio una de las muestras presentó el patrón 4,2,3,2 pero con bandas extras diferente a las 2 muestras que tenían bandas iguales posiblemente a una infección mixta de dos tipos de Rotavirus Bovino. Esta investigación reporta por primera vez en Nicaragua la prevalencia de Rotavirus Bovino.

Palabras Claves: ROTAVIRUS, ELISA, ELECTROFORESIS, PREVALENCIA.

5. INTRODUCCION

Las infecciones entéricas son una de las principales causas de enfermedad y muerte en la mayoría de las especies animales durante las primeras semanas de vida. Las causas de tales infecciones son generalmente multifactoriales y pueden estar asociadas a factores ambientales, nutricionales e infecciosos. Los agentes infecciosos relacionados a enfermedades entéricas pueden dividirse en virales, bacterianos y parasitarios. Los virus que producen gastroenteritis incluyen: rotavirus, coronavirus, enterovirus, parvovirus, adenovirus y astrovirus.

Rotavirus

Los rotavirus (del lat. *rota*: rueda) tienen una apariencia característica parecido a una rueda, cuando es visualizado mediante microscopio electrónico, (Parreño V. 2006). Los rotavirus son virus no envueltos (desnudos), están compuestos por una triple cápside proteica. El genoma esta compuesto de 11 segmentos de ARN de doble-hebra, donde cada segmento codifica una proteína, de las cuales seis son estructurales y cinco no estructurales (<http://Mundoganadero>, 2006)

Son virus ARN bicatenario segmentado, pertenecientes a la familia Reoviridae. Se han identificado siete grupos, (A, B, C, D, E, F, G) tres de los cuales (Grupo A, B y C) infectan a los humanos. El grupo A es el más común y el que está más asociado a los procesos diarreicos en animales jóvenes. Los rotavirus grupo A se clasifican en base a la antigenicidad de dos proteínas de superficie VP7 y VP4, denominados genotipos G y P. Se encuentran muy frecuentemente distribuidos en los bovinos, y prácticamente el 100% son seropositivos. Estos virus son sumamente resistentes a las condiciones ambientales, habiéndose descrito periodos de supervivencia de hasta 6 meses fuera de su hospedador. La vía de contagio es fecal-oral, relacionándose su transmisión con la falta de higiene y el hacinamiento (Fernández F., et al., 2000).

La enfermedad se relaciona con mayor frecuencia con los recién nacidos, pudiendo causar importantes pérdidas económicas a los productores. Si se logra infectar desde las primeras 24 horas de nacidos podría mantenerse hasta los seis meses de edad, incluso en algunas vacas adultas. El virus presenta predilección por el epitelio cilíndrico de las microvellosidades intestinales provocando atrofia de las mismas con la consecuente diarrea. La gravedad clínica de la infección depende de factores predisponentes como la edad, la virulencia del virus, el estado nutricional, la inmunidad conferida por la madre y puede exacerbarse el proceso por microorganismos oportunistas presentes en el tracto intestinal del individuo (Ernest L. et al., año).

El rotavirus bovino fue identificado y caracterizado como agente causal de diarrea por primera vez por Mebus y col en 1964, actualmente se considera el principal agente patógeno productor de diarreas en terneros menores de tres semanas de vida. (<http://publicacionesderotaenbovinos>, 2007).

6. ANTECEDENTES

Estudios realizados en la última década respecto de la microbiología de las diarreas neonatales en terneros, en establecimientos de cría, en diferentes países indican la participación simultánea de varios agentes y se registra en algunos casos, un elevado porcentaje de infecciones mixtas. Rotavirus bovino (RVB) grupo A se encuentra siempre presente en los hatos afectados y en general, es el principal agente causal, seguido por Coronavirus, *Cryptosporidium*, y *E. coli* entre otros. Asimismo, la disposición de nueva tecnología ha permitido detectar la participación de agentes poco estudiados hasta el momento como Bredavirus bovino que fue encontrado en el 36.4% y el 14% de los casos de diarrea estudiados en dos relevamientos realizados en Canadá y Costa Rica, respectivamente.(<http://publicacionesderotaenbovinos>, 2007).

El sistema de vigilancia de rotavirus humano en El Salvador, Honduras y en Guatemala es deficiente sobre todo en las zonas fronterizas, tomando en cuenta que el rotavirus es el principal causante de diarreas en neonatos y que su incidencia es alta, como se reporta recientemente en El Salvador y Guatemala, donde han muerto al menos 36 personas, en su mayoría niños. El Salvador registró 53 mil casos según informes de los Ministerio de Salud de. Las autoridades salvadoreñas de Salud han confirmado la muerte de 16 niños desde enero

del 2005. Según reportes del Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud de Nicaragua en el año 2006, se reportaron un total de 28 mil casos de asociado a rotavirus, de los cuales 16 fallecieron. (<http://elnuevodiario>, Melvin Martínez, 2006).

En Centro América hay reportes sobre un estudio realizado en Costa Rica por el Dr. José Luís Bonilla , donde colectó un total de 200 muestras de terneros menores de 1 mes en 17 fincas, encontrando: 38 animales positivos a rotavirus grupo A y siendo los genotipos mas comunes **G8 P(11)** **G6P(11)**, **G8P(7)**, **G10P(1)**, **G10P(6)**.. (Bonilla José Luis., et al., 2007).

En todo el mundo se ha reportado la circulación de rotavirus bovino grupo B y C en

Japón y Estados Unidos principalmente, donde el grupo B a sido detectado en terneros esporádicamente y el rotavirus grupo C fue aislado a partir de un caso de diarrea en bovino adultos en Japón. Dentro de los rotavirus grupo A que circulan en bovinos se han reportado G-tipos, G1, G2, G3, G6, G8, G10, G11 (<http://publicacionesderotaenbovinos>, 2007) y de los serotipos grupos P Presentando así 6 serotipos, P[3]- P[6], P[8]- P[11], P[14] y P[19]. Y las siguientes P-G combinaciones, P [8] G1; P [8] G3; P [8] G4; P [8] G9; P [4] G2, algunas cepas regionales importantes se han reportado; G5 en Brasil (20%), G8 en Malawi (80%) y G9 en Australia (20%) (<http://paho>,2006).

Estudios en Argentina durante un periodo de 8 años indican que las diarreas por rotavirus representa una de las principales afecciones en neonatos, alcanzando una prevalencia de 26% (875 animales) en hatos de cría y de 74 % en sistemas estabulados con amplia circulación de G6 (32.6 %) serotipo que resultó predominante seguido por G10 con un 15.4% que fue el serotipo prevalente en las crías. En combinaciones G y P estudios recientes indican P (5) G6 es la cepa prevalente, seguida de P (1) G6 y P (11) G10 y existen combinaciones poco comunes como P (11) G6, P (5) G10 (Falcone et al. 1999).

Entre enero y marzo de 1985 se recolectaron 63 muestras de terneros, de 1 a 6 meses de edad, pertenecientes a cinco predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. El estudio se realizó mediante microscopía electrónica y ELISA, detectando 15 muestras positivas rotavirus a través de la técnica de ELISA, 11 de ellas correspondían a 53 terneros con diarrea o con antecedentes de haberla tenido. En 122 muestras recolectadas entre terneros y vacas se detectaron 9 casos positivos a rotavirus por la técnica de ELISA, 6 de ellos en terneros y 3 en vacas de 3 años. Cuatro de los terneros positivos presentaban diarrea durante el muestreo, y tenían una edad entre 12 y 39 días (Berríos et al., 1987).

En la zona sur de Chile, Reinhardt et al. (1986) estudiaron 231 muestras fecales, 146 de terneros y 85 de lechones, obtenidas entre Diciembre de 1984 y septiembre de 1985. Estos autores utilizaron microscopía electrónica y el método de ELISA DIRECTO, encontrando 24 terneros positivos (16%) y 10 lechones positivos (12%), determinándose, además, que la mayoría de los animales positivos tenían entre 10 y 30 días de edad. Además de los estudios realizados en bovinos, porcinos y equinos, se han realizado estudios sobre rotavirus en conejos, ovinos y pequeños rumiantes. En conejos, de un total de 104 muestras fecales de conejo angora de tres criadores comerciales de la Región Metropolitana de Chile, se obtuvieron dos casos positivos por ELISA, (Berríos et al., 1987).

7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la prevalencia de Rotavirus Bovino grupo A en el periodo de Febrero a Noviembre del 2008 presentes en los municipios de León y Chinandega?

8. JUSTIFICACIÓN

Siendo rotavirus una de las principales causas de gastroenteritis severa en terneros jóvenes y causante de pérdidas económicas para los productores, se desconocen la y prevalencia distribución de rotavirus en terneros, por lo que es de mucho interés realizar un estudio sobre la ecología del virus y lograr establecer las cepas de mayor prevalencia que circula en nuestro medio. Ya que es un agente infeccioso que aqueja a muchas fincas de nuestro país con diarreas en los primeros días de vida de los animales domésticos, principalmente en terneros que forman parte importante de nuestra economía. Algunas investigaciones recientes demuestran la existencia de relación interespecie en cepas de rotavirus humano y animal, donde cepas de rotavirus en niños han incorporado genes de virus proveniente de animales, como rotavirus porcino y bovino; por lo que es otra razón más por estudiar dicho agente y dirigir el estudio en poblaciones rurales del departamento de León con el fin de evaluar a futuro esta posibilidad. Por lo que se pretende determinar la prevalectía de rotavirus en nuestra localidad para desarrollar medidas de control y profilaxis en las fincas de estudio. Porque hasta el momento no hay datos en Nicaragua sobre Rotavirus en terneros. -

9. OBJETIVOS

9.1. Objetivo General:

- Determinar la prevalencia y electroferotipos de Rotavirus bovinos Grupo A en el periodo Febrero - Noviembre del año 2008 en los municipios de León y Chinandega, Nicaragua.

9.2. Objetivos Específicos:

- Conocer la prevalencia de rotavirus en los animales afectados.
- Identificar rotavirus del grupo A en muestras de heces de bovinos con diarrea, en fincas de los municipios de León y Chinandega, utilizando las Técnicas de ELISA directo y Electroforesis.
- Establecer los electroferotipos de ARN de rotavirus en bovinos en el municipio de León y Chinandega, Nicaragua.
- Determinar las razas, edades, síntomas y el color de heces encontrados en mayor proporción en los terneros muestreados.

10. MARCO TEÓRICO

Rotavirus Bovino

10.1. Generalidades

Los rotavirus conforman un género dentro de la familia *Reoviridae*. Los viriones miden aproximadamente 75 nanómetros de diámetro, carecen de envoltura lipídica (virus desnudos), y están compuestos de una triple cápside proteica, de simetría icosaédrica, que a su vez contiene una ARN polimerasa y el genoma viral (Viviana Parreño, 2008).

Las partículas de rotavirus son altamente resistentes a la inactivación físico-química, permanecen estables dentro de un rango de pH de 3 a 9, no se disuelven en solventes lipídicos (fluorocarbonos, éter, cloroformo, etc.) y conservan su infecciosidad durante meses en ambientes húmedos, temperaturas entre los 4 y 20°C y en presencia de iones Ca^{+2} que estabilizan la cápside externa. El virus sólo puede ser inactivado por compuestos fenólicos, sales de amonio cuaternario, formalina al 0,5% y betapropiolactona (BEI) al 10%. El etanol 95% es el desinfectante más efectivo. (Parashar et al., 1998; Murphy et al., 1999; Polanco et al., 2004).

El genoma viral está compuesto por 11 segmentos de ARN doble cadena, cada uno codifica una proteína viral, de las cuales, seis son estructurales (VP) denominadas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 y cinco no estructurales (NSP) producidas únicamente en el proceso de replicación de las células infectadas, se denominan NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5. NSP6 (Susana López et al., 2001).

Los rotavirus se clasifican en grupos, según la variación de un antígeno común presente en la proteína VP6. Este antígeno, es el principalmente detectado por técnicas inmunológicas como ELISA e inmunofluorescencia y es compartido por todos los rotavirus integrantes de un mismo grupo, independientemente de la especie de origen. Hasta el momento se han descrito 7 grupos diferentes (A, B,

C, D, E, F, y G) (Parashar et al., 1998; Murphy et al., 1999; Polanco et al., 2004), de los cuales, los grupos A, B y C han sido detectados en bovinos, el grupo A es el más común y el más esparcido, causando el 90% de las infecciones. Los rotavirus Grupo A se clasifican mediante un sistema binario, según la variación genética y antigénica de ambas proteínas superficiales, las variantes de VP7 se denominan G-tipos (glicoproteína), y las de VP4, P-tipos (proteasa sensible). Hasta el momento se han reportado 14 G-tipos, y al menos 20 P-tipos de rotavirus grupo A circulantes en humanos y animales. (Parashar et al., 1998; Ramachandran et al., 1998; Murphy et al., 1999; Chang et al., 1999; Linhares and Bresee, 2000; Polanco et al., 2004).

10.2. Proteínas Estructurales.

La VP1, esta enzima actúa como transcriptasa viral, está situada en el núcleo del virus. En una célula infectada produce los transcritos de ARNm para sintetizar las proteínas víricas y duplica el genoma para producir nuevas partículas víricas. (Susana López et al., 2001).

La VP2 forma parte de la capa más interna del virión y va unida al genoma de ARN. Esta proteína posee capacidad de unión al ARN, por lo que actúa como proteína de empaquetamiento. La VP3 también forma parte de la capa interna del virión y es un enzima llamado guanidiltransferasa. Esta enzima produce la caperuza en 5' del ARN (*capping enzyme*), durante la modificación postranscripcional del ARN mensajero. Esta caperuza estabiliza el extremo 5' del mensajero e impide que sea atacado por nucleasas, enzimas que degradan ácidos nucleicos. (Susana López et al., 2001).

La VP4 está situada en la parte externa del virión y forma una protuberancia, que es capaz de unirse a los receptores celulares de la célula para entrar en su interior, presenta actividad de hemaglutinina. Durante la infección esta proteína (VP4) es cortada por proteínas proteolíticas presentes en el tracto gastrointestinal (pancreatina, tripsina) de modo que se generan dos péptidos estructurales VP5 y VP8, antes de que la partícula vírica sea infecciosa. La estructura de VP4

determina la virulencia del virus y es denominada genotipo P debido a una proteasa sensible. La VP6 es la proteína principal de la cápside. Es altamente antigénica y puede usarse para determinar el grupo del rotavirus. Se usa en los ensayos clínicos para determinar la existencia de infección por rotavirus A. La VP7 es una glicoproteína que forma parte de la capa externa del virión. Aparte de sus funciones estructurales, determina el tipo G de la cadena, y junto con VP4, está implicada en la respuesta inmunitaria del virus. (Patton J. T. et al., 1999).

10.3. Proteínas no Estructurales.

Las proteínas no estructurales del rotavirus, NSP1 a NSP6, son codificadas por los segmentos 5, 7, 8, 10 y 11, respectivamente. Como su nombre lo indican estas proteínas no forman parte de la estructura del virión. Son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de 9 proteínas celulares y virales, con la replicación del genoma, con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula, aunque aún no se define completamente el papel de cada una de ellas en estas funciones. (Carlos F. Arias et al., 2001).

NSP1 es transcrita por el gen 5 y es una proteína no estructural de unión a ARN. NSP2 es una proteína de unión a ARN, que se acumula en inclusiones citoplasmáticas (viroplasma) y es necesaria en la replicación del genoma. NSP3 está unida a ARNm en las células infectadas y es la responsable de la finalización de la síntesis proteica celular. (Piron M. P. et al., 1998). NSP4 es una enterotoxina viral que induce diarrea y fue la primera enterotoxina viral que se descubrió. NSP5 está codificada por el segmento 11 del genoma vírico del rotavirus A, y en las células infectadas se acumula en el viroplasma. NSP6 es una proteína de unión a ácido nucleico es codificada por el gen 11, en un marco abierto de lectura desfasado. (Patton J. T. et al., 1999).

El ARN genómico de los rotavirus puede ser fácilmente extraído de las partículas virales presentes en la materia fecal, analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y visualizado por tinción argéntica. El patrón de migración de los segmentos se denomina *electroferotipo*. Esta técnica constituye una

herramienta diagnóstica de rápida identificación del virus, dado que los rotavirus son los únicos agentes virales conocidos de 11 segmentos de ARN que afectan a los mamíferos, y es una herramienta complementaria de su clasificación en grupos, dado que en general, cada grupo presenta una distribución de bandas característica. (Murphy et al., 1995).

10.4. Epidemiología Molecular.

Rotavirus bovino Grupo A. fue identificado, caracterizado y confirmado como agente causal de diarreas en terneros, por primera vez, por Mebus y col. en 1969. Actualmente se le considera el principal agente patógeno productor de diarreas en terneros menores de tres semanas de vida en todo el mundo. Respecto de los otros grupos, se ha reportado la circulación de rotavirus grupo B y C en bovinos de Japón y Estados Unidos. Rotavirus grupo B ha sido detectado en terneros y esporádicamente asociado con diarrea neonatal pero se encuentra especialmente involucrado en brotes de diarrea epizootica en ganado adulto. Rotavirus grupo C, fue aislado a partir de un caso de diarrea en bovinos adultos en Japón. . (Mebus y col. 1969).

10.5. Patogenia.

La infección por rotavirus se produce en los individuos jóvenes de las diferentes especies animales y se encuentra asociada con diarrea acuosa no enterocolítica y lesiones intestinales. El Rotavirus bovino genera diarrea en terneros menores de 3 semanas de vida, y la edad de máxima susceptibilidad se registra entre los 2 y 19 días de edad. La transmisión se produce principalmente por la vía fecal-oral y los animales infectados eliminan grandes cantidades de virus (10^{10} partículas virales por gramo de heces). (Reinhardt et al., 1986; Fernando F. Guerrero, 2006).

Los rotavirus infectan selectivamente los enterocitos maduros localizados en la porción apical de las microvellosidades intestinales. Los enterocitos son invadidos por el virus, que se replica rápidamente y provoca la lisis celular y la atrofia de la microvellosidad. Los cambios en la mucosa pueden ser leves o graves. En casos

leves, las lesiones se presentan formando parches en el epitelio e incluyen acortamiento de las vellosidades y una leve infiltración de la lámina propia con células mononucleares. En casos graves, se produce un total acortamiento de las vellosidades, una marcada infiltración de células y factores inflamatorios, y daño severo del epitelio que incluye degeneración, vacuolización, necrosis y descamación de las células infectadas. (Reinhardt et al., 1986).

En un estudio comparativo donde se infectaron experimentalmente terneros gnotobióticos de 1 o 10 días de edad, se observó que la replicación viral se extiende uniformemente a lo largo de todo el intestino delgado afectando principalmente entre el 40% y 65% del extremo proximal, en los terneros más jóvenes; mientras que los terneros mayores presentaron la infección en parches que afectó la zona media y distal. Un hallazgo importante fue que en ambos grupos de terneros se detectó la presencia de enterocitos infectados por RV en el ciego y el colon, indicando que la infección puede extenderse al intestino grueso, al menos en esta especie. (Reinhardt et al., 1986).

A medida que progresa la infección, las células infectadas son reemplazadas por células cuboidales inmaduras y secretorias de la cripta, incapaces de cumplir con las funciones normales de digestión y absorción, por lo que disminuye el transporte de glucosa asociado al sodio, se registran niveles anormalmente bajos de maltosa, sacarosa y lactosa, los que vuelven a la normalidad luego de 4 a 8 semanas post-infección. La mayoría de los individuos con gastroenteritis aguda por rotavirus padecen mala absorción de lactosa e intolerancia. La lactosa de la leche no digerida favorece el desarrollo bacteriano y ejerce un efecto osmótico que contribuye al desarrollo de la diarrea. Esta serie de hechos provocan la pérdida de electrolitos y fluidos, que ocasionalmente llevan a la deshidratación severa y muerte. (Reinhardt et al., 1986) (Liprandi et al. 1991; Teodoroff et al., 2005; Martella et al., 2005). Los mecanismos propuestos en el desarrollo de diarrea por rotavirus incluyen: mala absorción, como resultado de la disfunción y destrucción de los enterocitos; efecto enterotóxico causado por la proteína viral NSP4 y activación del sistema neuro-entérico. Investigaciones recientes indican que la proteína NSP4,

péptido glicosilado de transmembrana que participa en la morfogénesis viral, induce diarrea en ratones lactantes al ser administrado por vía intraperitoneal o intraduodenal. La NSP4 actuaría en los estadios tempranos de la infección viral promoviendo la movilización de Ca^{+2} hacia el interior de los enterocitos infectados con la consiguiente secreción de fluidos que provoca la alteración del balance hídrico y electrolítico. También se postula que la infección por rotavirus produce la activación de terminales nerviosas en la pared intestinal generando un aumento del peristaltismo y de la secreción de agua fomentando la diarrea acuosa. (Fernando F. Guerrero, 2006).

10.6. Diagnostico.

El diagnóstico de la enfermedad se establece con los síntomas del enfermo y un examen de laboratorio que permita identificar al rotavirus en la materia fecal. La prueba más utilizada es el estudio de inmunoensayo enzimático, (ELISA) además de otras pruebas rápidas para detectar el rotavirus grupo A. Numerosas técnicas se han desarrollado para el diagnóstico de rotavirus, siendo las más usuales las siguientes: Microscopía Electrónica (ME) (Bishop *et al.* 1974), y Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE) (Espejo *et al.* 1977). En la microscopía electrónica (ME), la tinción negativa es la más utilizada, tanto así que se ha empleado como método estándar para evaluar otros métodos en la detección de rotavirus (Knisley *et al.* 1986). La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se fundamenta en la separación electroforética de los segmentos del ARN del virión, el cual fue introducido por Espejo *et al.* (1977).

Los inmunoensayos enzimáticos (ELISA), son altamente sensibles y se han utilizado con mucho éxito como alternativa en el diagnóstico de infección por rotavirus (Yolken *et al.* 1977), pero la adquisición de los “Kits” son de elevado costo en el comercio como para ensayos de rutina. (Sonia Y. Nusetti, *et al.*, 2001). Parashar *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1999; Polanco *et al.*, 2004; Sonia Y. *et al.*, 2001).

El diagnóstico de las infecciones por rotavirus se hace habitualmente detectando la existencia de antígeno vírico en muestras de heces, con frecuencia la proteína

VP6. El aislamiento en cultivo es difícil y carece de interés diagnóstico. Los métodos inmunológicos detectan solamente rotavirus del grupo A, ya que por el momento no existen métodos comercializados para detectar rotavirus de grupos B y C. Otros métodos alternativos rápidos son: la aglutinación con látex y la inmunocromatografía. Los métodos moleculares detectan la presencia de RNA vírico, poniendo de manifiesto segmentos de RNA bicatenario mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), o bien amplificando por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el DNA previamente sintetizado por reacción de transcripción inversa (RT-PCR). Estos métodos requieren la extracción previa del ácido nucleico vírico y la eliminación de inhibidores que pueden interferir en la reacción de RT-PCR. Por otro lado, tienen la ventaja de que permiten caracterizar los diferentes aislados, bien por el patrón electroforético del RNA vírico (*electroforetipo*) o bien determinando el genotipo G y P por PCR semi-anidada, disponiendo de los cebadores adecuados. Estas técnicas han abierto la posibilidad de estudiar la evolución y la variabilidad de los rotavirus en diferentes regiones geográficas y a lo largo del tiempo. (; Murphy et al., 1999; Linhares and Bresee, 2000).

10.7. Tratamiento.

Como en otras infecciones virales, no existe un tratamiento específico para las infecciones por rotavirus en bovinos. En general se recomienda suspender la ingesta de leche durante 24-48 hs, situación que sólo es practicable en terneros alimentados artificialmente. Según el grado de deshidratación se recomienda la administración de fluidos y electrolitos por vía oral en caso de diarrea leve; o parenteral en las diarreas severas. La aplicación de terapias de rehidratación oral ha resultado efectiva en el tratamiento de la enfermedad, probablemente por el correcto funcionamiento del transporte de glucosa asociado al sodio en zonas no infectadas del epitelio. Un amplio espectro de antibióticos puede ser administrado por vía oral o sistémica para tratar una posible infección bacteriana secundaria que podría desencadenar una septicemia en caso de lesiones severas del epitelio intestinal. (Viviana Parreño, 2008).

10.8. Inmunidad Pasiva y Respuesta Inmune frente a Rotavirus

Dado el carácter local de la infección por rotavirus, en bovinos al igual que en otras especies, se postula que la protección está principalmente asociada con la presencia de anticuerpos en el lumen intestinal. En hatos contaminados, los terneros entran en contacto con el virus al momento de nacer, y desarrollan diarrea por rotavirus dentro de los primeros días de vida, por ende, los niveles de anticuerpos pasivos, fundamentalmente IgG1 e Ig A, adquiridos a través de la ingestión de calostro y leche presentes en el intestino, resultan esenciales en la protección y determinan la severidad del cuadro clínico. (Besser y col, 1988).

Se han observado en terneros descalostrados la existencia de una correlación directa entre la protección frente a la infección por rotavirus y los niveles de anticuerpos pasivos presentes en la luz intestinal, especialmente de tipo IgG1, administrados oralmente, leche suplementada con calostro hiperinmune. (Besser y col, 1988) Adicionalmente se postulan que altos niveles de anticuerpos pasivos en suero de terneros también podrían cumplir un rol complementario en la protección frente a la infección por rotavirus debido a una transferencia de IgG1 desde el suero a la luz intestinal. En un estudio realizado en campo en terneros de cría, también se observó una correlación inversamente proporcional entre el título de anticuerpos neutralizantes específicos contra rotavirus en suero adquiridos pasivamente y el desarrollo de diarrea por rotavirus. (Saif y col. 1983).

La adquisición de altos niveles de anticuerpos en suero, vía calostro, y su transferencia hacia el lumen intestinal resulta un mecanismo de protección crítico, principalmente en los terneros criados en sistemas artificiales, en donde la leche materna es generalmente reemplazada por sustitutos lácteos carentes de anticuerpos. Por otro lado, si bien ambas fuentes de anticuerpos (calostro y leche) presentan propiedades protectoras, estos juegan un papel muy importante en la modulación negativa de la respuesta activa del animal frente a la infección, especialmente a nivel de la mucosa infectada. (Viviana Parreño, 2008).

10.9. Prevención y Control

Teniendo en cuenta el impacto económico que genera esta enfermedad a nivel productivo, se han aplicado medidas de prevención y control basadas en dos estrategias de inmunización. La utilización de vacunas inactivadas destinadas a potenciar la inmunidad pasiva a través de la inmunización de las madres en el último tercio de gestación, la implementación de programas de vacunación ha demostrado una disminución progresiva de la morbilidad en hatos endémicamente infectados, el grado de eficacia de esta estrategia es variable, influyendo entre otros factores, la vía de inmunización, la dosis, la concentración de antígeno, el tipo de adyuvante y el proceso de inactivación, así como también, la implementación de adecuadas prácticas de manejo. (Viviana Parreño, 2008).

En la actualidad se dispone en nuestro medio de varias vacunas comerciales para la prevención las diarreas neonatales en terneros que presentan grados de eficacia variables. Estos inmunógenos contienen suspensiones de rotavirus inactivado por métodos químicos, correspondientes a los serotipos prevalentes P [5] G6; P [1] G6 y P [11] G10, emulsionados en adyuvantes oleosos y en general en forma de formulaciones polivalentes, acompañados de otros patógenos intestinales como *E. coli* y Coronavirus. (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

Dado que rotavirus es considerado el principal agente causal de diarreas neonatales no sólo en animales, sino también en humanos, numerosos grupos de investigación, dedican sus esfuerzos al desarrollo de nuevas estrategias de inmunización. Entre ellas se ha probado inicialmente en roedores (ratones y/o conejos) el uso de vacunas a ADN o vacunas de subunidades utilizando los genes o las diferentes proteínas virales (VP6, VP7, VP4 y NSP4) obtenidas por expresión en sistemas recombinantes y plantas transgénicas. (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

Adicionalmente, dada las características estructurales de este virus se ha logrado la producción de partículas virales sintéticas o "*virus like particles*." (VLP) (Viviana Parreño, 2008).

De todas estas estrategias, en bovinos solo se ha probado el uso de vacunas de subunidades con la proteína VP8 y VLP homólogas y heterólogas. La inmunización de vacas gestantes por vía intramuscular con 2 dosis de vacuna oleosa formulada con la proteína VP8 recombinante de rotavirus obtenida por expresión en *E coli*, generó un incremento del título de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus en calostro, similar al observado en vacas inmunizadas con una vacuna de virus completo inactivado. Por otra parte, la administración intramuscular e intramamaria de vacunas formuladas con VLP construidas a partir de baculovirus recombinantes que expresan las proteínas virales de una cepa de rotavirus de simio (cepa heteróloga) o cepas de rotavirus bovinos resultaron altamente inmunogénicas, e indujeron mayores niveles de anticuerpos en suero, calostro y leche que una vacuna inactivada. Adicionalmente, terneros alimentados con leche suplementada con 1% de calostro de vacas vacunadas con VLP heterólogas fueron totalmente protegidos frente al desarrollo de diarrea luego del desafío oral con rotavirus. (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

Un mejor conocimiento del desarrollo de la respuesta inmune frente a la infección por rotavirus en terneros, especialmente a nivel de mucosas y su modulación mediada por los anticuerpos pasivos, resulta muy importante para optimizar el desarrollo de nuevas estrategias de inmunización aplicadas al control y prevención de la rotaviriosis bovina. (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

11. MATERIAL Y METODO

Diseño Metodológico

11.1. Tipo de estudio

Es un estudio descriptivo de corte transversal, se pretende evidenciar la presencia o ausencia de rotavirus en bovinos con problemas de diarrea desde el primer mes al cuarto mes de vida como máximo.

11.2. Área de estudio

Se colectaron un total de 150 muestras fecales de terneros con diarrea, recolectadas en 25 fincas de producción lechera ubicadas en las localidades de los municipios León y Chinandega.

(León: comarca el changue, El Sauce, Carretera León Poneloya, Carretera León Isapa,)

(Chinandega: Villanueva)

En las fincas de estas localidades se encontraron los terneros que presentaban los síntomas que nosotros buscábamos por esa razón seleccionamos estas la fincas.

11.3. Población y tamaño de muestra

El universo de las muestras fueron 3,833 terneros, según ultimo censo del (MAGFOR) las muestras fueron recolectadas en fincas ganaderas del occidente de Nicaragua en los municipios de León y Chinandega respectivamente.

La población de estudio, fueron todos los terneros de uno a cuatro meses de edad con diarrea de etiología desconocida. El tamaño de muestra se calculó utilizando el programa (winepiscope 2.0), estimando porcentaje, con una población de 3,833 animales menores de 1 año, con una prevalencia esperada de 50%, un error aceptado de 5% y un nivel de confianza del 95%, obteniendo un tamaño de muestra de 350 pero por razones de costo el estudio se limito a 150 muestras. Con un error exacto de 7.84 %

11.4. Selección y Recolección de la Muestra

La selección de las muestras fue por conveniencia

Los factores de inclusión fueron todos los terneros de 1 a 4 meses que presentaron diarrea y otros signos como pérdida de peso, pelo erizado, deshidratación, sin importar la finca o su localidad.

Y los factores de exclusión son todos los terneros mayores de 4 meses de edad que no presentaron diarrea y otros signos clínicos como pérdida de peso, pelo erizado, deshidratación en el periodo de recolección de muestra.

La muestra se extrajo directamente del recto del animal, utilizando guantes de látex como medida de protección y se depositó en frascos de plásticos debidamente etiquetados con el número de la muestra y fecha de recolección, posteriormente se colocaron en termos con refrigerantes y/o hielo para ser transportados al centro de análisis (Laboratorio de la Escuela de Medicina Veterinaria (Campus Agropecuario) y Campus Médico de la UNAN-LEON).

Los datos se obtuvieron llenando fichas (Ver ejemplo en Anexos) que nos proveyeron la información necesaria para facilitar la obtención de resultados.

Limitaciones fueron no poder muestrear 350 terneros por razones de costo solo pudimos muestrear 150 terneros, otra limitante fue no haber realizado PCR a las muestras positivas.

Ventajas es el primer estudio realizado en Nicaragua sobre Rotavirus Bovino

11.5 Técnica de ELISA

La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa

(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay/*Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas*). Como todo ensayo inmunoenzimático, la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos.

11.6. Determinación del grupo A de Rotavirus mediante ELISA Directo

ELISA (IDEIA ROTAVIRUS): Procedimiento operativo. (Procesamiento de la Muestra).

Se pueden conservar muestras de heces suspendidas y/o en diluyente de kit (IDEIA) de Rotavirus a temperatura de 2-8 C°, 8 días antes de efectuar el ensayo.

En 1 ml de diluyente en un recipiente correctamente etiquetado agregamos 0.1 g de heces solidas o liquidas (del tamaño de un guisante) y mezclamos bien, luego los ponemos en el vortex para mezclar bien, después centrifugamos a 3,500 rpm para obtener el sobrenadante ya que el virus flota con facilidad, esto lo practicamos durante 30 segundos por lo menos, de aquí extraemos 100 µl para depositarlos en los micropocillos.

Agregamos dos gotas o 100 µl del control positivo al primer micropocillo (A1) el control negativo al segundo (B1). Los micropocillos contienen anticuerpos contra rotavirus que al hacer contacto con el virus presente en las muestras reaccionara, luego se agrega a cada micropocillo 100 µl de la muestra diluida, después se adiciona a cada micropocillo 100 µl más de conjugado y se pone a incubar durante 60 minutos a una temperatura de 20 a 30 C°. Pasado este tiempo se procede a lavar, para el lavado se mezclan 24ml de agua destilada con 1ml de la solución de lavado, después se agregan 350 µl de la solución de lavado diluida a cada pocillo, esto se repite 5 veces con un intervalo de 1 minuto entre lavada, después se adicionan 2 gotas de sustrato a cada pocillo y se dejan a 10 minutos a una temperatura de 20 a 30 C°, seguimos y agregamos 2 gotas de solución stop para que pare la reacción y esto se deja durante 15 minutos, luego se pasa la placa con los micropocillos al lector de Elisa quien nos dará los resultados finales, si hay o no hay rotavirus. Aparte de esto podemos ver si hay o no hay rotavirus por la

coloración que adquieren las muestras en los micropocillos, si adquieren color amarillo es positivo a la prueba, pero si el color es azul marino quiere decir que no hay rotavirus.

11.7. Materiales

Micropipetas de 1 ml, 10-100 µl.

Puntas para las micropipetas.

Etanol 100%.

Gradillas.

Tubos eppendorf 1.5 ml.

Vortex.

Probeta de 100 ml.

Agua destilada.

Control (+) y (-).

Conjugado.

Sustrato.

Solución stop.

Lector de Elisa.

Impresora.

Termo con refrigerantes y/o hielo

Tubos recolectores y Guantes.

11.8. Protocolo para la Extracción del ARN viral

Se colocan 560 µl de buffer AVL en un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml. Se Añade 140 µl de la muestra y vortex por 15 segundos. Se Incuba a temperatura ambiente (15-25 °C) por 10 min. Se centrifuga brevemente (micro spin). Se Añaden 560 µl de etanol (96-100%) a la muestra y vortex, se lleva al micro spin. Se colocan 630 µl de la mezcla anterior en una columna QIA amp en un tubo de 2 ml, se cierra la tapa y se centrifuga (8000 rpm) por un minuto. Se coloca la columna en un nuevo tubo de 2 ml y se descarta el anterior. Se abre la columna y se aplica nuevamente 630 µl de la solución y se repitió el paso anterior. Se abre la

columna y se agrega 500 µl de Buffer AW1, se cierra la tapa y se centrifuga nuevamente (8000 rpm) por 1 minuto. Se coloca la columna en un nuevo tubo colector. Se abre la columna y se agrega 500 µl de Buffer AW2, cierra la tapa y se centrifuga nuevamente (14000 rpm) por 3 minutos. Se coloca la columna en un nuevo tubo colector y se centrifuga por 1 minuto. Se coloca la columna en un tubo eppendorf 1.5 ml y se agrega 60 µl buffer AVE, se cierra la tapa y se incuba a RT por un minuto, se centrifuga nuevamente (8000 rpm). Se guarda el ARN viral a -20°C.

11.9. Técnica ELECTROFORESIS

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas (Proteínas y/o Ácidos Nucleicos) según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

11.10. Electroforesis del ARN de Rotavirus en gel de Poliacrilamida (PAGE)

Este método se realizó únicamente a aquellas muestras bovinas que resultaron positivas en el ensayo de ELISA, para rotavirus grupo A.

11.11 Preparación de los geles

Gel Separador: En un tubo de 10 mL se mezcla 1.86 mL de Acrilamida al 40%, se añade 1.00 mL de Bis Acrilamida al 2 %, se agrega 1.25 mL de 8 XLA, se deposita 4.90 mL de Agua destilada, 90.00µL AMPS al 10 % y 10.00µL de TEMED.

Se Llena la cámara hasta 2 cm. del borde y se cubre con agua destilada o butanol (Película fina). Se Deja polimerizar por 35 min. Secar el gel separador con papel filtro.

Gel espaciador: En un tubo de 10 mL se mezcla 0.42 mL Acrilamida al 40 %, 0.23 mL de Bis Acrilamida al 2 %, 0.48 mL de 8XLB, 2.53 mL de Agua destilada, 40.0 µL AMPS al 10%, 6.00 µL de TEMED.

Se Vierte la mezcla sobre el gel separador hasta el borde, se introdujo el peine y deja polimerizar durante 40 min. Una vez lograda la polimerización del gel espaciador, el peine se retira y se procede a la colocación de las muestras y sample buffer en una relación (20 μ L de muestra / 10 μ L sample buffer).

El corrido se realiza 100 volts por 15 min. y luego a 160 por 90 min. La corriente generalmente puede disminuir de 50- 55 mA a 30- 35 mA.

11.12. Tinción y Revelado

El gel se fija en 100 mL de solución de fijado (Etanol 35% Ácido acético 10%) se agita por 20 min. Luego se agrega 200 ml de solución oxidante y se deja 3 min. (Solución oxidante: Bio Rad Cat No. 161-0444, mezclar 10 ml en 90 ml de agua destilada). Se Enjuaga 6 veces con agua destilada durante 2 min. Se agrega 100 ml de solución de Silver Láctate 0.175 % y se agita por 15 min. Se lava 3 veces con agua destilada, se Reemplaza con solución de revelado, una vez que aparecen las bandas, reemplazar con solución de revelado fresca por 5 min. Reemplazar con solución de stopping (ácido acético al 5%). El gel se coloca sobre un papel filtro húmedo y se procede al secado al vacío (Temp. 80°C 1:45 h).

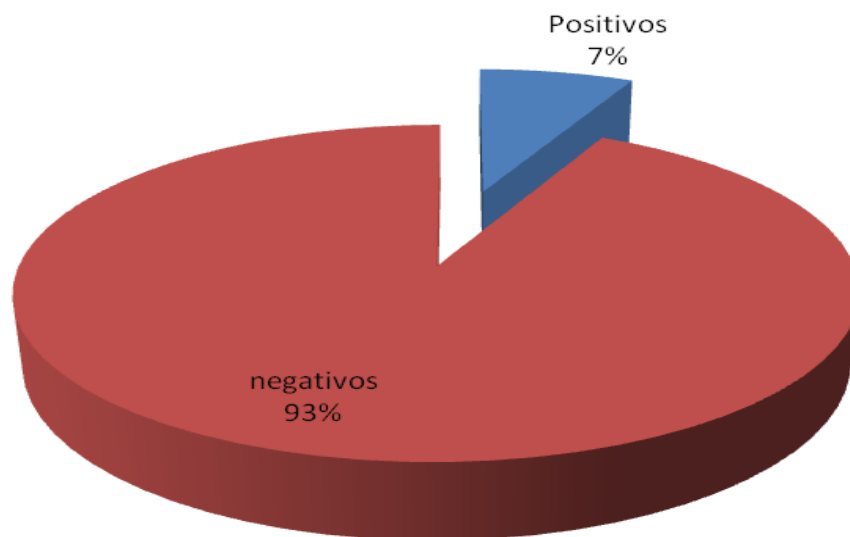
11.13. REACTIVOS Y EQUIPOS

1-	Ácido Clorhídrico, HCl 36-38 %	Baker Analyzed
2-	Tetra Metil Etilendiamina, TEMED	Bio-Rad.
3-	Persulfato de Amonio, AMPS	Bio-Rad.
4-	Glicerina	Baker Analyzed
5-	Silver Láctate	Bio-Rad.
6-	Formaldehído	Merck
7-	Etanol	Merck
8-	Cloruro de sodio, NaCl	Merck
9-	Glicina	Merck
10-	Hidróxido de sodio, NaOH	Akzo Nobel
11-	SDS	Gibco -BRL
12-	TRIS Base	Merck
13-	BIS Acrilamida	Merck
14-	Acrilamida	Gibco-BRL
15-	Ácido acético glacial	Fisher Scientific
16-	Fenol	Merck
17-	Cámaras de Electroforesis	Bio – Rad.
18-	Fuente de Poder	Bio – Rad.

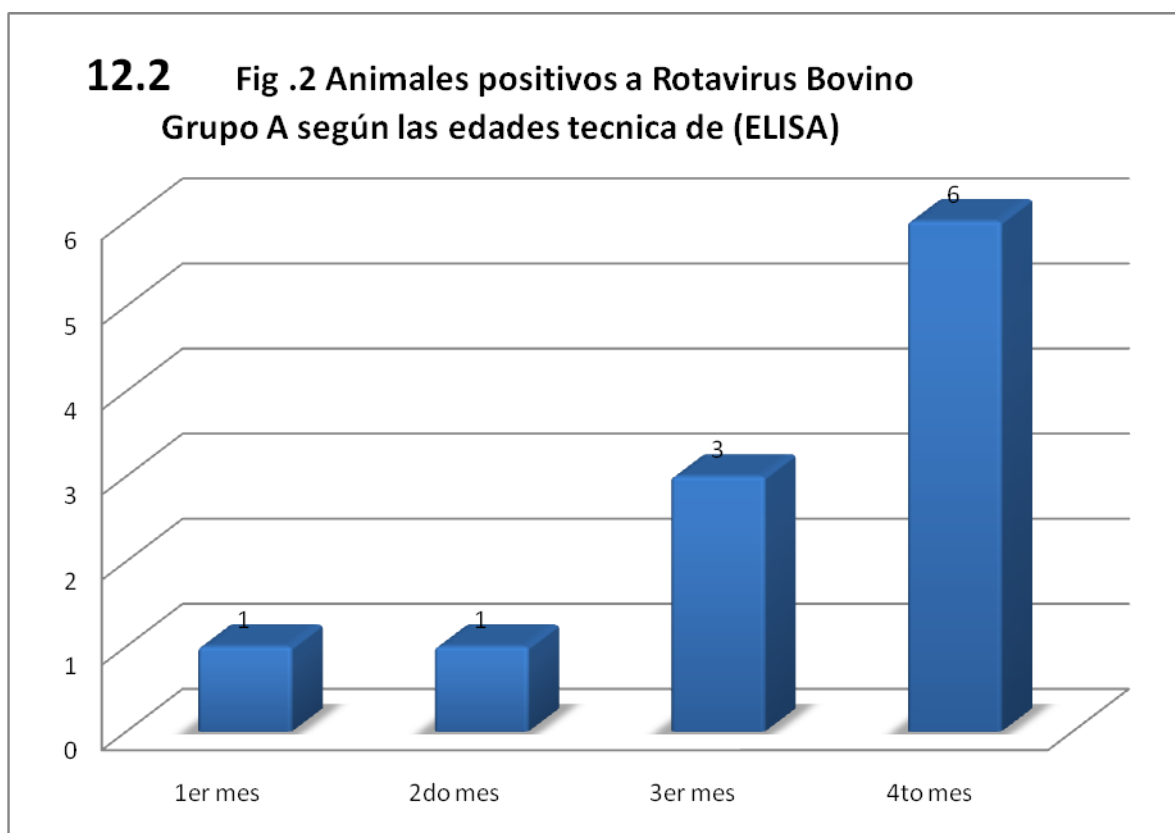
12. Resultados/Gráficos

En el presente estudio se recolectaron un total de 150 muestras fecales de terneros menores de 4 meses de edad de diferentes fincas de los departamentos de León y Chinandega, del total de muestras recolectadas se identificaron 11 muestras positivas dando como resultado una prevalencia del 7% a rotavirus bovino.)

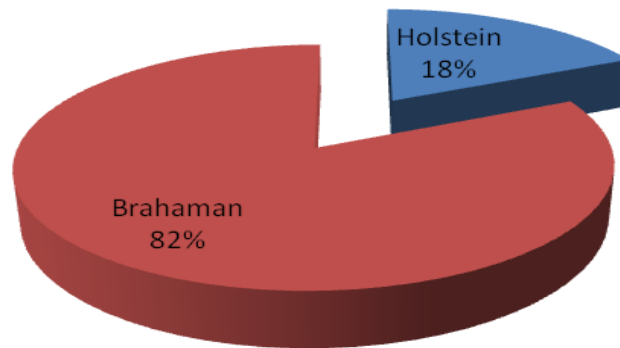
12.1 Fig.1 Prevalencia de rotavirus bovino en los municipios de Leon y chinandega en el año 2008



Los siguientes graficos muestran que entre las edades positivas a rotavirus bovino predominante fueron terneros de cuatro meses de edad y de raza Brahman.

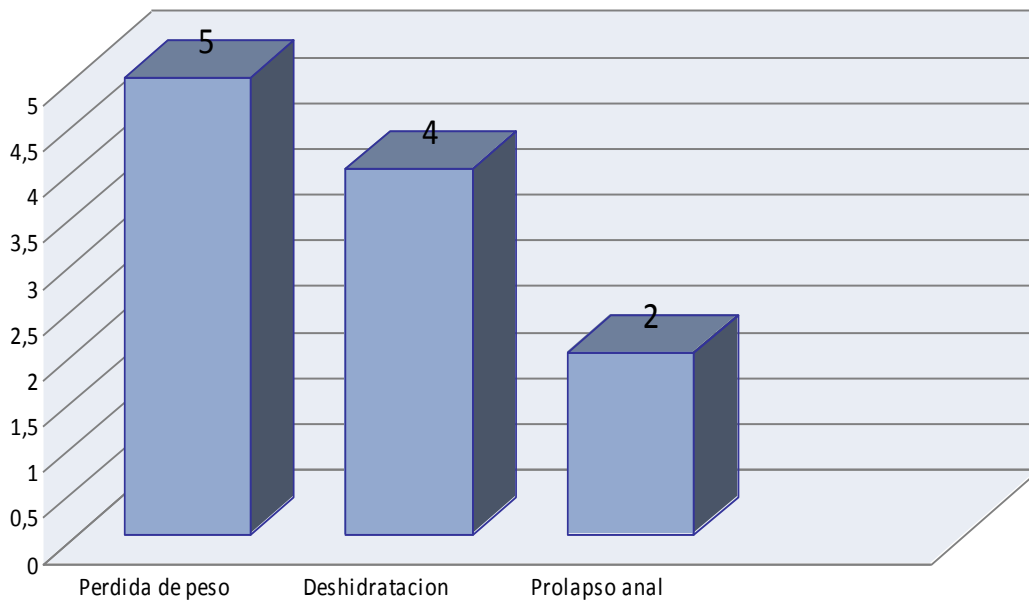


12.3 g.3 Raza con mayor porcentaje de animales positivos a rotavirus en el municipio de Leon y chinandega

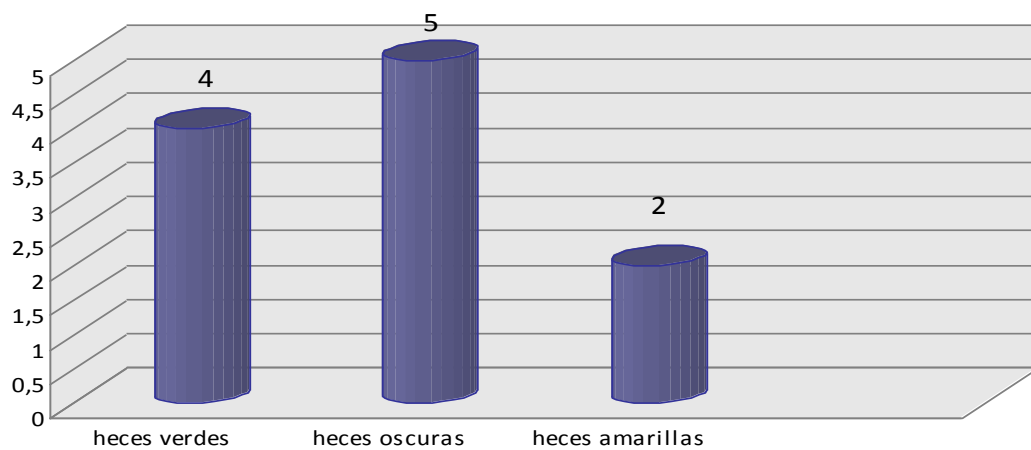


Estos gráficos reflejan los síntomas encontrados en la población en estudio y el color de heces predominante en las muestras positivas

12.4 g. 4 Síntomas mas frecuentes en muestras positivas de Terneros de los municipios de Leon y Chinadega

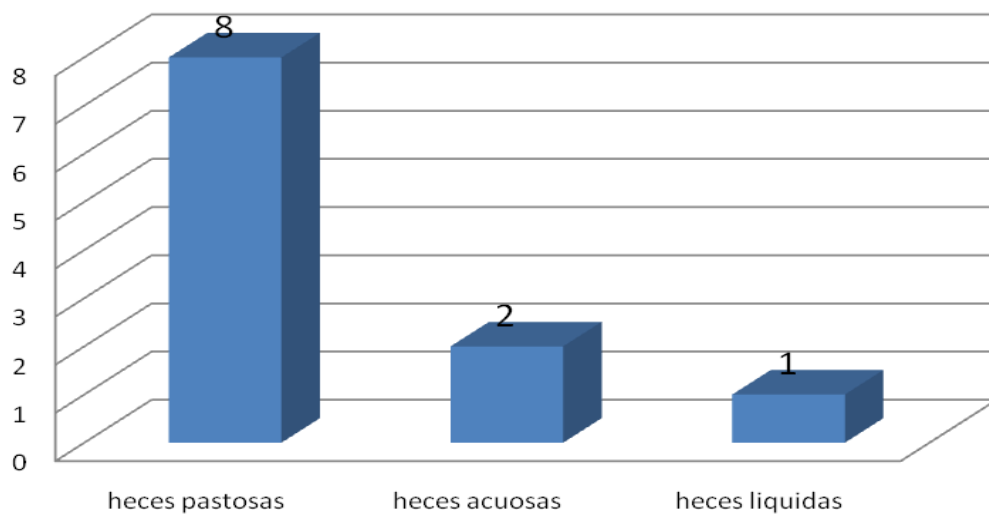


12.5 Fig.5 Distribucion de color de heces mas comunes positivas a Rotavirus Grupo A

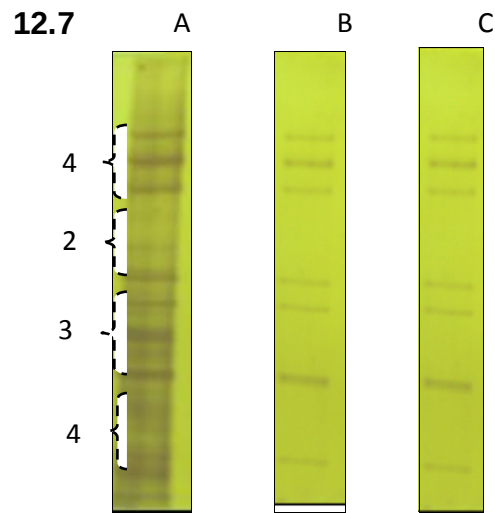


Este grafico demuestra cual fue la consistencia de mayor presentacion en las heces de las muestras positivas.

12.6 Fig.6 Distribucion de consistencia de heces mas comunes en muestras positivas a rotavirus grupo A



De las 11 muestras positivas solo a tres se les realizó electroforesis en gel de poliacrilamida porque las muestras positiva no tenían suficiente material genético ARN, por esa razón solo a 3 muestras se les realizo electroforesis donde se observa que en la figura B Y C dos patrones similares y en A se observa un patrón diferente, la presencia de bandas extras lo que indica una doble infección por diferentes rotavirus.



13. DISCUSIÓN

Durante un periodo de 10 meses (Febrero – Noviembre 2008) se colectaron un total de 150 muestras fecales de terneros con diarrea, recolectadas en 25 fincas de producción lechera ubicadas en los municipios León y Chinandega.

En base a los resultados obtenidos en la **Fig.1** se determinó un **7% de prevalencia**, equivalente a 11 muestras positivas a Rotavirus Grupo A en terneros, en un estudio reciente realizado en Costa Rica por el Msc. José Luís Bonilla Espinoza se encontraron 38 muestras positivas a rotavirus lo cual difiere con los valores encontrados en nuestro estudio, esto debido a las condiciones climáticas que difieren, al manejo fitosanitario y a las condiciones de hacinamiento.

Según los resultados mostrados en la **Fig.2** encontramos que los terneros mas afectados fueron entre los 3 y 4 meses de edad con un porcentaje de 75%, nuestros resultados si coinciden con la mayoría de los trabajos publicados donde se a demostrado que el virus afecta a terneros de 1 a 6 meses de edad y también animales adultos (Berrios et al., 1987).

En otro estudio realizado durante 8 años en Argentina, un 26% (875 animales), en hatos de cría y 74% en animales estabulados tuvieron resultados diferentes al nuestro hecho debido al tiempo que duro el estudio, numero de animales muestreados y por las condiciones ambientales en que estos animales vivían.

Con referencia a la raza en la **Fig.3** observamos que hubo un predominio de la raza BRAHAMAN (82%) de positividad frente a rotavirus debido a que en estas fincas predomina esta raza con respecto a otras.

En la **Fig. 4** según los síntomas presentes en muestras positivas los que más encontramos fueron; Pérdida de Peso y diarreas, esto no difiere a otros a estudios realizados ya que estos síntomas son característicos de una afección por rotavirus (Berrios et al., 1987).

Los resultados en la **Fig.5** según la distribución de color de las heces el más frecuente fue heces oscuras, en las muestras positivas el color de las heces indica cierta relación con la presencia del virus, aunque no se puede ignorar este signo.

En la **Fig. 6** la consistencia de las heces que mas se presentó fueron heces pastosas, este resultado es diferente a otros estudios realizados en Latinoamérica, donde demuestran que los terneros con presencia de heces diarreicas presentaron mayor carga vírica. (Berrios et al., 1987).

De las 11 muestras positivas solo a tres se les realizó electroforesis en gel de poliacrilamida, donde se observa que en la figura B Y C dos patrones similares y en A se observa un patrón diferente, la presencia de bandas extras lo que indica una doble infección por diferentes rotavirus.

Las infecciones entéricas son una de las principales causas de enfermedad y muerte en la mayoría de las especies animales durante los primeros meses de vida, siendo el Rotavirus una de las principales etiologías de esta afección, viene a ser un importante ente que debe ser controlado, para evitar cuantiosas pérdidas económicas y posibles infestaciones a humanos.

14. CONCLUSIONES

Después de haber realizado todos los estudios pertinentes y técnicas laboratoriales adecuadas llegamos a las siguientes conclusiones:

- Concluimos que hay presencia de Rotavirus Bovino en Nicaragua nuestros resultados demuestran eso ya que encontramos. Por medio de la técnica de ELISA una positividad del **7%** a **Rotavirus** Bovino grupo A quiere decir que hay presencia del rotavirus en Nicaragua específicamente en occidente.
- Esperábamos encontrar presencia de rotavirus en terneros ,con mayor numero en terneros menores de 2 meses, los animales positivos a Rotavirus que encontramos estaban entre las edades de 3 a 4 meses debido aunque el mayor numero de animales muestreados estaban entre estas edades y no en edades menores de 2 meses aunque se encontraron animales positivos a Rotavirus Bovino.
- En la población de animales estudiada según la raza, se encontró que los animales positivos a rotavirus grupo A la raza más afectada fue la **brahmán** esto es porque en esta región de Nicaragua se encuentra una mayor población de esta raza por las condiciones climáticas o por los fines productivos que tenga la fincas porque es muy resistente a las condiciones medio ambientales de la región.
- El síntoma mas frecuente encontrado en los animales positivos a rotavirus fue pérdida de peso.
- De los animales positivos a rotavirus, la coloración predominante en las heces fueron heces oscuras y verdes.
- La consistencia de las heces que más se encontró en animales positivos a rotavirus fueron heces pastosas.

- La técnica PAGE de rotavirus no proporcionó patrones de migración debido a la baja carga de virus en las muestras.

15. RECOMENDACIONES

- Promover en las fincas de producción lechera el mejoramiento de las condiciones sanitarias, manejo, hacinamiento y establecimiento de infraestructura, haciendo uso de Buenas Practicas Pecuarias.
- Estudiar a profundidad todas las etiologías que causan diarrea en los terneros.
- Realizar la genotipificación del virus con Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a las muestras positivas, esto como una continuación del presente estudio.
- Incrementar el área de estudio, si es posible abarcar el territorio Nicaragüense.
- Implementar estudios de investigación con una población mayor, que de a conocer la epidemiología de la infección por rotavirus en el país.
- Realizar estudios donde se recolecten muestras de animales sintomáticos y asintomáticos.
- Divulgar los resultados de este estudio entre el personal encargado y/o dueños de fincas.

16. BIBLIOGRAFIA.

1. Bonilla Espinoza José Luis, Octubre del 2007, Detección y Genotipificación de Rotavirus Bovino y Porcino en Costa Rica Heredia.
2. Definición de rotavirus. Enciclopedia Libre www.wikipediadefiniciondelrota.mht. . Viernes 18 de Abril, 2008.
3. Diarreas Víricas en el Ganado Bovino, Mundo Veterinario, Núm. 188, 01 de Mayo del 2006, homepage <http://www.mundoganadero.com/eumedia_es - Diarreas víricas en ganado bovino.mht> Jueves 10 de Febrero del 2008.
4. El Nuevo Diario, Melvin Martínez, Nueva Amenaza de Rotavirus, Managua Nicaragua, Miércoles 29 de Marzo de 2006- Edición 9204 [http://www.elnuevodiariomanagua_nicaragua_nuevaamenaza de rotavirus.mht](http://www.elnuevodiariomanagua_nicaragua_nuevaamenaza_de_rotavirus.mht) Miércoles 6 de Febrero de 2008.
5. Ernest L. Biberstein y Yuan Chung Zee, (1990). In: Reoviridae, Tratado de Microbiología veterinaria, Edición, Editorial Acriba S.A. pág. 618.
6. Falcone E., Tarantino M., L. Di Trani, Cordioli P., Lavazza A., y Tollis M, 1999. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 37:3879-3882
7. Fariñas Guerrero Fernando. Instituto Andaluz de Patología y Microbiología (IAMA) Mundo Veterinario. Núm. 188, 01 de mayo de 2006. Diarreas víricas en ganado bovino. <http://www.eumedia.es>
8. Fernández Fernando, et al, 2000. Caracterización Molecular de Rotavirus, homepage <http://www.salvador.edu.ar/vrid/di/r_proy00/00ve07.htm> Martes, 19 de febrero 2008.

9. Genstch, J.R., R. I.Glass, P.Woods, V.Gouvea, M.Gorziglia, J. Flores, B.K.Das, and M.K.Bhan, 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1365–1373.
10. Gouvea V., Santos N., and Timenetsky M., 1994. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5): 1338-1340.
11. Javier Buesa Gómez, Pilar López-Andújar y Jesús Rodríguez Díaz. Diagnostico de las Infecciones Víricas Gastrointestinales. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario, Universidad de Valencia.
<http://www.diagnosticodeenfermedadesviricascgastrointestinales.htm>.
Miércoles 6 de Agosto, 2008.
12. Linhares A., and Bresee J., 2000. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Panamerican Journal Public Health*, 8(5): 305-331.
13. Liprandi F., Rodríguez I., Piña C., Larralde G., and Gorziglia M., 1991. VP4 monotype specificities among porcine rotavirus strains of the same VP4 serotype. *Journal of Virology*, 65(3): 1658-1661.
14. Martella Vito, Pratelli Annamaria, Greco Grazia, Tempesta María, Ferrari Maura, Losio Marina Nadia, y Buonavoglia Canio, 2001. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8:129-132.
15. Monitoreo de los serotipos de Rotavirus en la Región, Simposio Sobre regional de Nuevas Vacunas: Neumococo y Rotavirus, San José, Costa Rica, 20-21 de Agosto. <http://www.paho.org/spanish/ad/fch/im/18-Bispo_SerotiposRotavirus.pdf> jueves 21 de febrero de 2008.

16. Murphy, F. A., Gibbs, E. P., Horzinek, M. C., and Studdert, M. J., 1999. *Reoviridae*. In: Veterinary virology, 3a. ed., ACADEMIC PRESS, USA. p. 391-404.
17. Nguyen T., Yuan L., Azevedo M., Jeong K., Gonzalez A., Josef C., Lovgren-Bengtsson K., Morein B., Lewis P., and Saif L., 2005. Low titer maternal antibodies can both enhance and suppress B cell responses to a combined live attenuated human rotavirus and VLP-ISCOM vaccine. *Vaccine*, 24: 2302-2316.
18. Nguyen T., Yuan L., Azevedo M., Jeong K., Gonzalez A., Josef C., Lovgren-Bengtsson K., Morein B., Lewis P., and Saif L., 2006. High titers of circulating maternal antibodies suppress effector and memory B-cell responses induced by an attenuated rotavirus priming and rotavirus-Like particle-immunostimulating complex boosting vaccine regimen, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(4): 475-485.
19. Parashar U., Bresee J., Gentsch J., and Glass R., 1998. Rotavirus, Centers for disease control and prevention, Atlanta, Georgia, USA, 4(4): 561-570.
20. Parreño V. Complejo Diarreico Neonatal Bovino, Terneros, Enfermedades Infecciosas. Instituto de Virología, CICVyA, INTA CASTELAR, <<http://www.publicacionesderotaenbovinos.mht>> Martes, 1 de julio de 2008.
21. Patton, J. T., and D. Chen 1999. RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *J Virol*. 73:1382-1391.
22. Piron, M., P. Vende, J. Cohen, and D. Poncet 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly (A) binding protein from eIF4F. *Embo J*. 17:5811-5821.

23. Polanco G., González M., Manzano L., Cámara J., and Puerto M., 2004. Rotavirus in asymptomatic animals: Detection and antigenic classification. Archives Medicine Veterinary, 36(1): 65-70.
24. Ramachandran M., Gentsch J.R., Parashar U.D., Jin S., Woods P.A., Holmes J.L., Kirkwood C.D., Bishop R.F., Greenberg H.B., Urasawa S., Gerna G., Coulson B.S., Taniguchi K., Bresee J.S., Glass R.I., and the national rotavirus strain surveillance system collaborating laboratories, 1998. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. Journal of Clinical Microbiology, 36:3223-3229.
25. Reinhardt, G., Riedemann, T., Polette, M., Aguilar, M., Niedda, M., 1986. Diarrhoea neonatal. Infection in bovine and porcine by rotavirus. Archieved of Medicine Veterinary, 18, 23–27.
26. Rotavirus en Animales Domésticos de Chile, Monografías de Medicina Veterinaria, Vol. 12, N°1, Julio 1990, <<http://www.rotavirusenchile.htm/monografiasenmedicinaveterinario.com>> Miércoles 6 de febrero 2008.
27. Salud y Enfermedades, Diagnostico y tratamiento. Educación Médica Continua. S.A. de C.V. / Redacción esmas. Agosto 6, 2008. <http://www.esmas.com/salud/enfermedades/infecciosas/376289.html>
28. Sonia y. Nusetti p.1, Antonio J. Maldonado N. y Jesús W. Comparación de tres métodos diagnósticos para la detección de rotavirus en heces. Bastardo G. Universidad de oriente, Venezuela.vol. 13. N° 1:38-41. (2001).
29. Susana López y Carlos F. Árias. Departamento de Genética y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología UNAM. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.
30. Teodoroff T., Tsunemitsu H., Okamoto K., Katsuda K., Kohmoto M., Kawashima K., Nakagomi T., and Nakagomi O, 2005. Predominance of porcine rotavirus G9 in japanese piglets with diarrhea: close relationship of

their VP7 genes with those of recent human G9 strains. Journal of Clinical Microbiology, 43(3): 1377-1384.

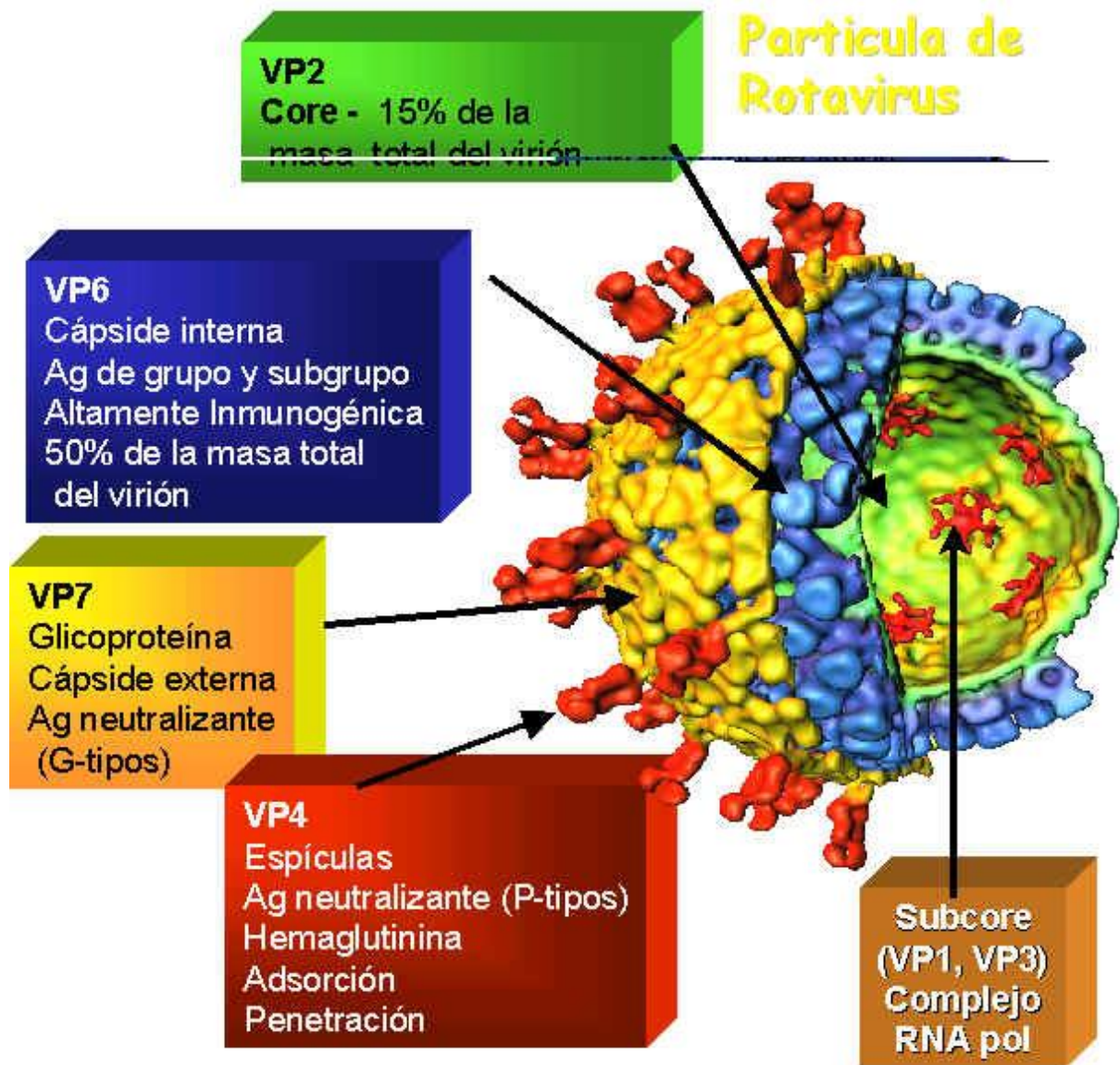
31. Universidad de Valencia.

<http://www.diagnosticodeenfermedadesviricascastrointestinales.htm>.

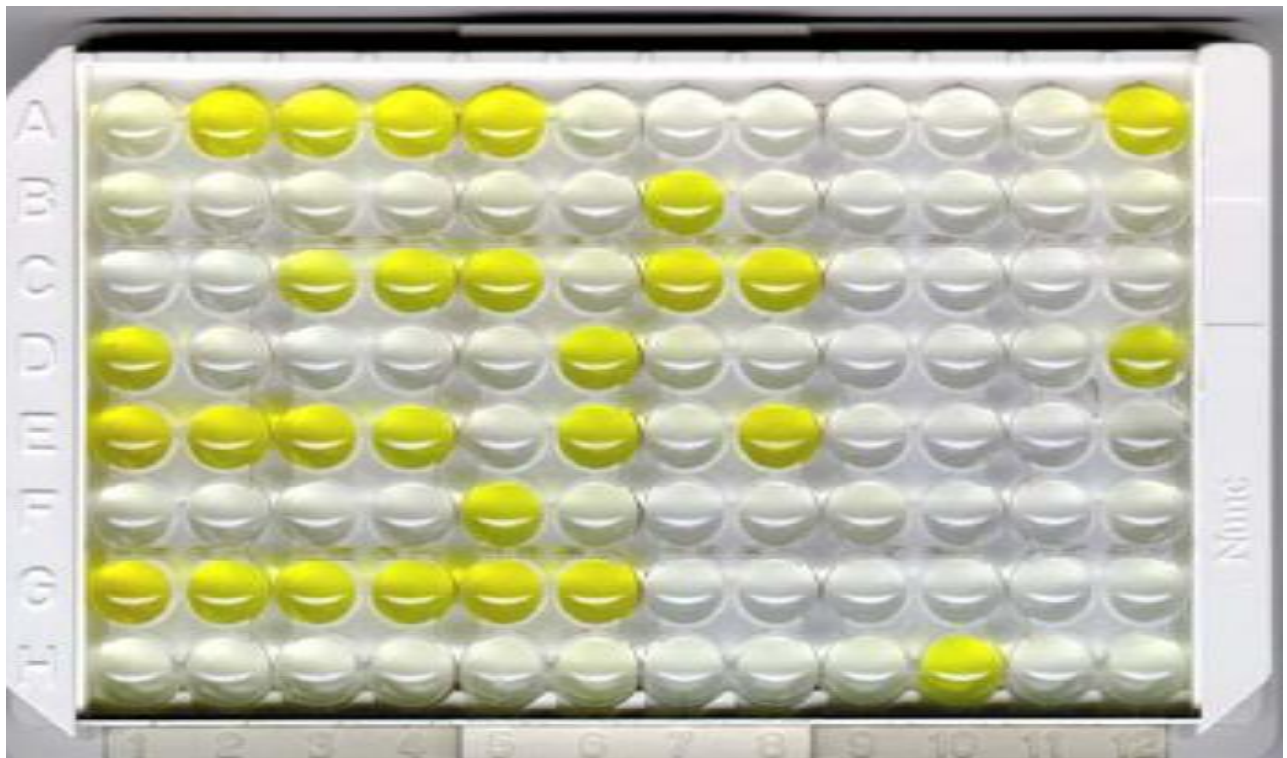
Miércoles 6 de Agosto, 2008.

17. ANEXOS

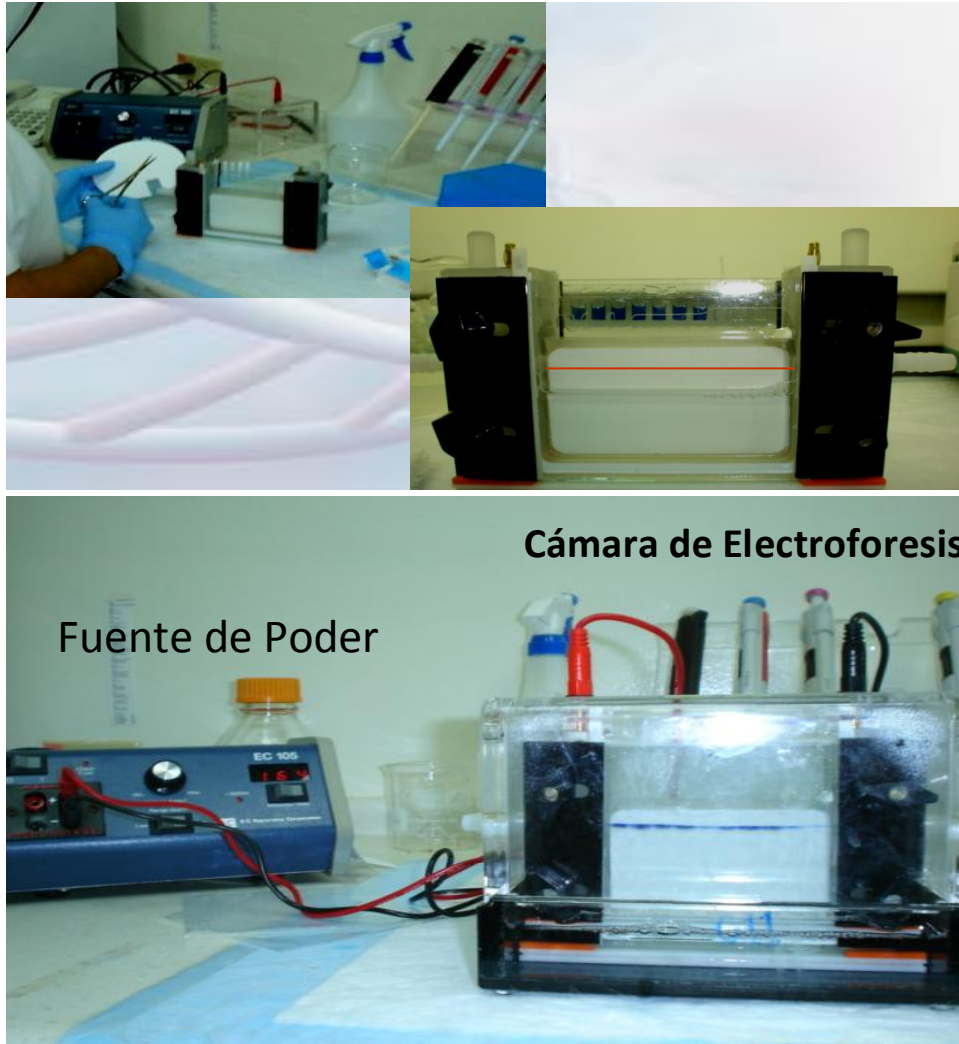
17.1. Imagen 1. Estructura del Rotavirus



17.2. Imagen 2. Placa con micropocillos usados en ELISA



17.3. Fotos de equipos usados en la Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)



18. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
Facultad de Ciencias Médicas
Escuela de Veterinaria

Estudio Molecular de los Rotavirus Aislados en Bovinos y Porcinos de Granjas del Municipio de León, Nicaragua

DATOS GENERALES

Número de Identificación

--	--	--	--

Fecha:

--	--	--

Finca

--

Propietario

--

Dirección:

--

Municipio

--

DATOS GENERALES DEL ANIMAL

Especie animal

--

Edad

--

Raza

--

Historial de la Enfermedad

--

RESULTADOS DE LABORATORIO

Resultado ELISA

Resultados PAGE

Coccidios

Positivo

--

Largo

--

Positivo

--

Negativo

--

Corto

--

Negativo

--

Fecha

--

Fecha

--

Fecha

--

Genotipos

Genotipo G ()

Genotipo P ()

Ninguno ()

Fecha

--

Nombre del estudiante

--