

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO
DE DR. EN CIENCIAS VETERINARIAS.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ROTAVIRUS EN
MATERIAL PROVENIENTE DE BOVINOS, PORCINOS, AVES Y HUMANOS.

POSTULANTE: MED. VET. RODOLFO BELLINZONI.

DIRECTOR: PROFESOR DR. JOSE LA TORRE.

LUGAR DE TRABAJO: CENTRO DE VIROLOGIA ANIMAL.

(C.O.N.I.C.E.T.)

SERRANO 661. CAPITAL FEDERAL.

LA PLATA 1988.

.TOMO I

A mis padres y hermanos.

MINISTERIO DE EDUCACION Y JUSTICIA DE LA NACION
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.

PRESIDENTE:	DR. L.A. PLASTINO.
VICE PRESIDENTE:	ING. O.A IGLESIAS.
SECRETARIO GENERAL:	ING. C.M. RASTELLI.
SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:	LIC. J.C. BARANDIARAN.
PROSECRETARIO GENERAL:	MED. G.P. CASTELLARI.
SECRETARIO DE ASUNTOS JURIDICOS-LEGALES:	DRA. T.E. BENGARDINI.
SECRETARIO DE EXTENSION CULTURAL Y DIFUSION:	PROF. S.S. KNIGHT.
GUARDASELLOS:	ING. AGR. A. RINGUELET.

CUARTO Año

ZOOTECNIA ESP. I PARTE Prof. tit. int.	Dr. E. Marotta
ZOOTECNIA ESP. II PARTE Prof. tit. int.	Dr. B. Rodriguez
ZOOTECNIA ESP. III PARTE Prof. tit. emérito.	Dr. R. Perotti
ENFERMEDADES INFECCIOSAS Prof. adj. int.	Dr. E. Fernandez
PATOLOGIA QUIRURGICA Y PODOLOGIA Prof. tit. int.	Dr. F. Boccia
PATOLOGIA DE AVES Y PILIFEROS Prof. tit.	Dr. N. Menéndez

QUINTO Año

TECNOLOGIA Y SANIDAD DE ALIMENTOS Prof. adj. int.	Dra. E. Ramirez
HIGIENE EPIDEMIOLOGICA Y S.PUB Prof. tit.	Dr. E. Gimeno
INMUNOLOGIA GRAL. Y APLICADA Prof. tit.	Dr. E. Prenipede
REPRODUCCION ANIMAL Prof. tit. int	Dr. J. Ostrowski
CLINICA DE PEQUEÑOS ANIMALES Prof. tit. int	Dra. L. Pracca
CLINICA DE GRANDES ANIMALES Prof. tit. int.	Dr. G. Gallo

CARRERA DEL DOCTORADO EN BACTERIOLOGIA CLINICA E INDUSTRIAL

PARASITOLOGIA COMPARADA Prof tit adj. a c/c.	Dra. R. Feldman
MICOLOGIA MEDICA E INDUSTRIAL Prof. adj a c/c	Dr. E. Reinoso
BIOESTADISTICA Prof. tit	Dra. A. Jensen
ANIMALES DE LABORATORIO Prof adj. a c/c	Dra. C. Carbone

MICROBIOLOGIA ESPECIAL Prof. adj. int. a c/c	Dra. M. Tobia
INMUNOLOGIA I PARTE Prof. tit. int.	Dr. E. Pennipede
INMUNOLOGIA II PARTE Prof. adj. a c/c	Dr. C. Gomez
GENETICA MICROBIANA Jefe de T.P. int. a c/c.	Dra. M. Lojo
FISICA Y QUIMICA APLICADA Prof. tit. int	Dr. J. Carroza
ANALISIS CLINICOS I Prof. tit. int.	Dr. N. Argeri
ANALISIS CLINICOS II Prof. tit	Dr. N. Argeri
SALUD PUBLICA Prof. adj. int a c/c	Dr. F. Maliandi
VIROLOGIA garay Prof. adj. int. a c/c.	Dra. M. Etcheverri-
MICROBIOLOGIA APLICADA Prof. adj. a c/c.	Dra. M. Tobia

INDICE

Capítulo I. Introducción.	1
1.1. Prólogo	1
1.2.1 Objetivos generales	3
1.2.2 Objetivos particulares	3
Capítulo II. Revisión bibliográfica.	
2.1 Historia de los rotavirus como productores de diarrea.	5
2.2 Clasificación taxonómica de los rotavirus.	7
2.3 Caracterización de los rotavirus.	8
2.3.1 Estructura del virión.	8
2.3.1.1 Morfología.	8
2.3.1.2 Morfogénesis.	9
2.3.2 Características fisicoquímicas.	11
2.3.2.1 Estabilidad e inactivación.	12
2.3.3 El genoma de los rotavirus.	12
2.3.3.1 Electroferotipos del genoma viral.	15
2.3.3.1.1 Electroferotipos del genoma de rotavirus antigénicamente diferentes al grupo A.	17
2.3.3.1.2 Rotavirus pertenecientes al grupo A con perfil electroforético atípico de su genoma.	19
2.3.3.1.3 Estudio de los electroferotipos genómicos; su aplicación.	20
2.3.3.2 Electroforesis de oligonucleótidos de los distintos segmentos del genoma y utilización de sondas moleculares en pruebas de hibridización.	21
2.3.4 Polipéptidos virales.	23
2.3.4.1 Polipéptidos estructurales.	25
2.3.4.1.1 Polipéptidos de las partículas con cápside simple.	26
2.3.4.1.2 Polipéptidos de la cápside externa.	27
2.3.4.1.3 Polipéptidos estructurales y actividad enzimática del virión.	28
2.3.4.1.4 Propiedades antigénicas de los polipéptidos estructurales.	28
2.3.4.1.4.1 Clasificación antigénica de los rotavirus: grupos antigénicos.	30
2.3.4.1.4.2 Subgrupos.	31
2.3.4.1.4.3 Serotipos.	32
2.3.4.2 Polipéptidos no estructurales.	33
2.4 Métodos de diagnóstico.	34
2.5 Cultivos celulares.	36
2.6 Características clínicas de la infección por rotavirus.	39
2.6.1 La infección en el hombre.	39
2.6.2 La infección en bovinos.	40
2.6.3 La infección en otras especies.	41
2.7 Patogénesis de la infección por rotavirus.	41
2.8 Aspectos epidemiológicos de las infecciones	

producidas por rotavirus.	44
2.8.1 Epidemiología de los rotavirus humanos.	46
2.8.2 Epidemiología de los rotavirus bovinos.	48
2.8.2.1 Variantes serotípicas de los rotavirus bovinos.	51
2.8.3 Epidemiología de los rotavirus porcinos.	51
2.8.3.1 Variantes serotípicas de los rotavirus porcinos.	52
2.9 Prevención, control y tratamiento de las diarreas a rotavirus.	53
2.9.1 Prevención y control.	53
2.9.1.1 Vacunas en humanos.	55
2.9.1.2 Vacunación en bovinos.	55
2.9.1.3 Vacunación en cerdos.	57
2.9.2 Tratamiento.	58
2.10 Modelos experimentales. para el estudio de los rotavirus.	58
Capítulo III. Materiales y métodos.	60
3.1 Obtención de muestras.	60
3.1.1 Bovinos de Argentina.	60
3.1.2 Cerdos de Argentina.	60
3.1.3 Cerdos de Brasil.	61
3.1.4 Humanos de Argentina.	61
3.1.5 Aves de Argentina.	61
3.2 Conservación de muestras.	61
3.3 Detección de rotavirus en materia fecal.	62
3.3.1 Prueba de ELISA.	62
3.3.1.1 Preparación de sueros hiperinmunes.	62
3.3.1.1.1 Obtención de antígeno viral purificado.	62
3.3.1.1.2 Hiperinmunización de cobayos y cabras.	63
3.3.1.1.3 Desarrollo de la prueba de ELISA.	63
3.3.2 Electroforesis del ARN viral en geles de poliacrilamida (PAGE).	64
3.3.2.1 Determinación de la sensibilidad del PAGE.	65
3.3.3 Microscopía electrónica (ME).	65
3.4 Cultivos celulares.	66
3.4.1 Prueba de inmunoperoxidasa para medir infectividad de inóculos provenientes directamente de materia fecal.	66
3.4.1.1 Preparación del inóculo a partir de materia fecal.	66
3.4.1.2 Infección en microplacas.	67
3.4.1.3 Detección de antígeno viral en monocapa a través de la reacción de inmunoperoxidasa.	67
3.4.1.4 Propagación de las distintas cepas aisladas.	67
3.4.1.5 Titulación de las cepas de rotavirus adaptadas a cultivos celulares.	68
3.4.1.6 Titulación de cepas que no producían efecto citopático.	69
3.5 Virus (cepas patrones utilizadas en diferentes experimentos).	69
3.6 Obtención de los sueros hiperinmunes contra	

los serotipos 1 y 2 de rotavirus bovinos.	70
3.7 Prueba de neutralización viral para determinar serotipos.	71
3.8 Clonado de cepas de rotavirus porcinos.	72
3.8.1 Clonado de cepas del grupo A con electroferotipo atípico.	72
3.8.2 Clonado de cepas del grupo A con electroferotipo normal.	72
3.9 Perfil electroforético de proteínas de viriones purificados de materia fecal.	73
3.10 Perfil electroforético de proteínas virales marcadas con metionina ³⁵ S en cultivos celulares.	73
3.11 Preparación de cortes histológicos para observación al microscopio óptico.	74
3.12 Inoculaciones experimentales.	74
3.12.1 Inoculación de terneros con una cepa de rotavirus bovino grupo A aislado en Argentina.	74
3.12.2 Infección experimental con un rotavirus porcino atípico detectado en Brasil.	75
3.12.3 Infección experimental con rotavirus porcino (grupo A) que mostró un perfil genómico atípico.	76
3.12.3.1 Estudios histopatológicos y ultraestructurales en intestino de cerdos infectados experimentalmente con un rotavirus grupo A con perfil genómico atípico	77
3.12.4 Inoculación experimental de lechones con una cepa de rotavirus grupo A, con perfil genómico clásico, aislada en Tandil, Argentina.	77

Capítulo IV. Resultados.

4.1 Rotavirus en bovinos.	81
4.1.1 Determinación de la presencia de rotavirus en bovinos de la provincia de Buenos Aires, Argentina.	81
4.1.2 Estudio de la variabilidad genómica y antigénica.	82
4.1.2.1 Prueba de electroforesis en geles de poliacrilamida del ARN viral: determinación de la sensibilidad de la prueba y análisis de los electroferotipos observados.	82
4.1.3 Estudio del comportamiento en cultivos celulares.	83
4.1.3.1 Prueba de inmunoperoxidasa en monocapa infectada (IPA) y adaptación de distintas cepas a cultivo celular	83.
4.1.4 Estudio de serotipos actuantes.	85
4.1.5 Estudio de proteínas de viriones purificados.	86
4.1.6 Estudio de la patogenicidad de algunas cepas	

de rotavirus aisladas en la provincia de Buenos Aires, Argentina.	87
4.2 Rotavirus en cerdos de Brasil y Argentina.	90
4.2.1 Detección de rotavirus en lechones con diarrea en San Pablo, Brasil.	90
4.2.1.1 Infección experimental en lechones con rotavirus atípicos aislados en Brasil.	92
4.2.2 Detección de rotavirus en criaderos de cerdos del SE de la provincia de Buenos Aires, Argentina.	93
4.2.2.1 Estudio longitudinal en un criadero de cerdos de B. Juárez, B. Aires.	93
4.2.3 Estudio de la presencia de rotavirus en un criadero de la ciudad de Tandil, Bs. Aires.	95
4.2.4 Adaptación de rotavirus porcinos a cultivos celulares (células MA-104).	95
4.2.4.1 Determinación de la infectividad por medio de la prueba de IPA	96.
4.2.4.2 Infección de células MA-104 con rotavirus porcinos aislados en B. Juárez,, B. Aires.	96
4.2.4.3 Infección de células MA-104 con rotavirus porcinos aislados en Tandil, B. Aires.	97
4.2.5 Infección experimental en lechones con una cepa de rotavirus porcino, grupo antigénico A, con perfil genómico atípico en el PAGE.	98
4.2.5.1 Infección experimental en lechones con una cepa de rotavirus grupo A con perfil genómico normal.	100
* 4.2.6 Estudio de las proteínas estructurales de rotavirus porcinos que poseían un rearreglo genómico en el segmento 11 de su genoma; comparación con cepas bovinas y porcinas normales.	101
4.3 Hallazgo de rotavirus grupo A y atípicos en niños de Argentina.	102
4.4 Rotavirus aislados en pollo de la República Argentina.	102
Capítulo V. Discusión.	
5.1 Estudio del rotavirus como agente causal de diarreas neonatales en bovinos de la provincia de Buenos Aires (Argentina).	103
5.1.1 Presencia de rotavirus en rodeos de cría de la provincia de Buenos Aires.	103
5.1.2 Análisis de la variabilidad genómica de los rotavirus aislados en bovinos.	104
5.1.3 Análisis de la variabilidad antigénica de los rotavirus bovinos.	106
5.1.4 Características biológicas de las diferentes cepas de rotavirus bovinos.	107
5.2 Estudio del rotavirus como agente causal de diarreas en cerdos de Argentina y Brasil.	108
5.2.1 Relevamiento de la incidencia de rotavirus en cerdos de San Pablo (Brasil): variabilidad	

genómica y antigénica de las cepas aisladas	108
5.2.2 Relevamiento de la incidencia de rotavirus en cerdos del SE de la provincia de Buenos Aires, Argentina.	109
5.2.3 Adaptación a cultivos celulares de cepas de rotavirus porcinos.	112
5.2.4 Análisis comparativo de la inoculación experimental de cerdos con rotavirus aislados en Argentina y Brasil.	113
5.3 Búsqueda de rotavirus en aves y humanos de Argentina.	114
5.4 Análisis comparativo de las cepas aisladas de distintas especies.	115

Capítulo VI. Conclusiones.

6.1 Los rotavirus como agentes etiológicos de diarreas en terneros.	119
6.2 Los rotavirus como agentes etiológicos de diarreas en lechones de Brasil y Argentina.	120
6.3 Los rotavirus en aves y humanos de Argentina.	122
6.4 Comparación entre los rotavirus aislados de diferentes especies.	122
6.5 Consideraciones finales.	123

Resumen.

Summary.

Agradecimientos.

Bibliografía.

Art. 11 La Facultad no se hace solidaria de las opiniones vertidas en una tesis.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 PROLOGO

En la mayoría de las especies de mamíferos y aves la diarrea neonatal es una enfermedad compleja, ocasionada por varios agentes infecciosos que pueden actuar solos o combinados. Estos agentes pueden ser virus tales como rotavirus, coronavirus, calicivirus, astrovirus, parvovirus, etc.; bacterias por ejemplo: E. coli enteropatógena, Salmonella, Campilobacter y protozoarios como los Criptosporidios. (Bal-dacci et al. 1979, Kurstak et al. 1981, Sandford and Josephson 1982, Snodgrass et al. 1982(B), Cukor et al. 1984).

La importancia de los virus en la producción de diarrea, se empezó a tener en cuenta recién en los últimos años; en particular desde que Mebus en 1969 describiera por primera vez un agente viral similar a los reovirus como responsable de diarrea en terneros (Mebus et al. 1969).

Posteriormente, Bishop et al. en 1973 describieron el mismo agente en infantes humanos.

Actualmente, los rotavirus son descriptos como uno de los agentes etiológicos de mayor importancia en las diarreas de diferentes especies de mamíferos y aves (Holmes I

1979, Dagenais et al. 1980, Snodgrass et al. 1982(B), Estes et al. 1983, Cukor et al. 1984, McNulty et al. 1984, Utrera et al. 1984, Theil et al. 1986). Es pbr eso que son numerosos los grupos que están desarrollando vacunas con estos agentes para prevenir diarreas (Zissis et al. 1983, Midthun et al. 1985, Crouch et al. 1985).

Las pérdidas que ocasionan las diarreas neonatales en explotaciones de animales domésticos son importantes.. Las pérdidas no son sólo producto de la mortalidad que puede llegar hasta el 30% sino que, a esto se deben agregar los costos por servicios veterinarios, alteraciones en el normal manejo de los animales y el atraso en el desarrollo de éstos.

En países en desarrollo la gastroenteritis infantil junto con los problemas respiratorios son la principal causa de mortalidad precoz. En los países desarrollados la mortalidad es baja y el principal problema son los enormes costos derivados de los tratamientos; en EEUU. se calcula que sólo los gastos anuales de hospitalización llegan a 27 millones de dólares (Gurwith et al. 1981).

Con algunas cepas de rotavirus se ha podido demostrar "in vitro" que producen infecciones interespecies (Middleton et al. 1975, Mebus et al. 1976, Castrucci 1984). Esto indica la importancia que tienen los estudios comparativos que se realicen entre los rotavirus animales y humanos. Si bien aún no se ha podido demostrar fehacientemente el pasaje de rotavirus de animales al hombre o viceversa, existe una

sospecha creciente de que esto pueda suceder en forma espontánea, y no sería difícil que en un futuro no muy lejano se considere a las infecciones por rotavirus como una zoonosis.

Los estudios genómicos efectuados muestran que estos virus poseen la característica de producir infecciones con dos o más cepas combinadas (Sabara et al. 1982(B)) y de poder intercambiar entre ellas material genómico produciendo recombinantes con nuevas características en su comportamiento biológico (Greenberg et al. 1982, Gombold et al. 1986). Esta particularidad la poseen otros virus como el de la influenza (Pelese 1977).

1.2.1.- Objetivos Generales.

- A. Detección de rotavirus en materia fecal de terneros, cerdos, aves y humanos.
- B. Análisis del comportamiento biológico de los rotavirus aislados.
- C. Análisis bioquímico y serológico de la heterogeneidad de los rotavirus aislados.

1.2.2.- Objetivos particulares.

Estudio de rotavirus bovinos:

- Detección de rotavirus en terneros con y sin diarrea de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

- Estudio de la variabilidad genómica.
- Estudio de la variabilidad antigénica.
- Estudio del comportamiento en cultivos celulares.
- Estudio de la patogenicidad.

Estudio de rotavirus porcinos:

- Estudio de rotavirus en cerdos de San Pablo, Brasil, y del S.E. de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.
- Estudio de la variabilidad genómica.
- Estudio de la variabilidad antigénica.
- Estudio del comportamiento en cultivos celulares.
- Estudio comparativo de la patogenicidad de algunas cepas de rotavirus aisladas en Brasil y Argentina.

Búsqueda de rotavirus en aves y humanos de Argentina:

- Estudio de la variabilidad genómica.
- Estudio de la variabilidad antigénica.

Análisis comparativo de las cepas aisladas de distintas especies.

CAPITULO II

Revisión bibliográfica.

2.1 HISTORIA DE LOS ROTAVIRUS COMO AGENTES PRODUCTORES DE DIARREAS.

Los ratones fueron los primeros animales en los que se detectaron problemas de diarrea neonatal por rotavirus. La diarrea aguda en los ratones lactantes es citada por varios autores en Estados Unidos desde antes de 1944. Estos episodios fueron adjudicados a agentes bacterianos (Flewett and Woode 1978). Kraft en 1957, es el primero que le asigna la responsabilidad a un agente viral y es el primero que describe algunas características de los rotavirus, al cual, si bien lo ve parecido a los reovirus, lo diferencia antigénicamente de estos. A dicho virus lo denomina "Epizootic diarrhea infant mice virus", (EDIM).

En 1958 se aísla el virus denominado SA11 en mono vervet, (Malherbe et al 1967) el cual fué adaptado a cultivos celulares.

Un virus similar al SA11 también se detectó en cultivos de células de riñón de mono vervet recibiendo la denominación de virus "O". Este virus fué aislado de residuos provenientes del lavado de intestinos de animales faenados en el matadero municipal de Johannesburgo,

en 1974 describen el mismo hallazgo en Inglaterra y Canadá respectivamente.

Es a partir del hallazgo en humanos, donde cobra fuerza el estudio de los rotavirus y, desde esos tiempos hasta ahora, existen numerosas publicaciones que registran infecciones de rotavirus en casi todas las especies de mamíferos [Rodger et al. 1975(A), Mc Nulty et al. 1976 (A y B), Flewett et al. 1975, Bryden et al. 1976, Tzipori et al. 1976(A y B)] y también en aves (Mc Nulty et al. 1978).

A través de técnicas de inmuno-detección se describió un antígeno común para estos virus; pero a partir de 1980 (Saif et al. 1980) se han descrito en cerdos, humanos, bovinos, ovinos y aves, virus indiferenciables por ME de los descritos por Mebus y Bishop (Mebus et al. 1969, Bishop et al. 1973), pero que carecen del antígeno común de éstos, no pudiendo ser detectados por técnicas serológicas (Pedley et al. 1983).

Esto ha creado una gran expectativa en los distintos laboratorios que investigan estos virus, ya que su conocimiento es fundamental en las estrategias profilácticas.

2.2 Clasificación taxonómica de los rotavirus.

El género rotavirus fue establecido en 1978 por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus, en el Cuarto Congreso Internacional de Virología realizado en Hague,

Holanda. Este género fue colocado en la familia Reoviridae, (Derbyshire and Woode 1978 y Estes et al. 1983). Esta clasificación fue dada para los rotavirus conocidos hasta ese momento y se refiere a un grupo de virus que mantienen relación antigénica y que causan enteritis en mamíferos jóvenes y aves. La cepa patrón determinada fue la cepa bovina "N.C.D.V." (Kurstak et al. 1981). Aun no está claro la ubicación taxonómica de los rotavirus atípicos, indiferenciables por ME de los ya descritos, pero que no poseen relación antigénica con éstos. Pedley et al. (1983) sugieren clasificarlos en grupos, denominando grupo A a los clasificados en 1978 y llamarlos grupo B, C, etc. a los distintos grupos de rotavirus atípicos que se van describiendo y que entre ellos poseen relación antigénica.

2.3 Caracterización de los rotavirus.

2.3.1 Estructura del Virión.

2.3.1.1 Morfología:

El nombre "rotavirus" fue elidido por su semejanza a una rueda, en las tinciones negativas observadas al ME.

El virión está compuesto por una parte central denominada "Core" y dos láminas o cubiertas proteicas que la cubren, una interna rugosa y otra externa lisa. Al observar al ME partículas congeladas en seco, se puede ver que la cubierta externa está perforada por numerosos orificios, por donde hacen protuberancia estructuras que en forma de rayos proyecta la cubierta interna.

Estos virus carecen de envoltura lipídica.

Al ME son claramente distinguibles de los reovirus ya que estos últimos poseen una cubierta externa rugosa y más espesa que permite diferenciarla de la delgada y lisa cubierta externa de los rotavirus.

Los viriones que se observan al ME por tinción negativa pueden presentar su estructura completa, midiendo unos 65 a 70 nm de diámetro o puede faltarles la cubierta externa, apareciendo con su superficie rugosa y midiendo de 55 a 60 nm de diámetro. En algunas circunstancias como por ejemplo por acción de agentes caotrópicos como el tiocianato de sodio o el cloruro de calcio 2M pierden ambas cubiertas y el "Core" o nucleocápside queda "desnudo", midiendo unos 40-45 nm (Estes et al. 1985).

Las partículas completas y las que poseen una cubierta simple pueden separarse por su densidad en gradientes de cloruro de cesio. Los viriones completos poseen una densidad de 1,36 g/ml y los viriones con cubierta simple poseen una densidad de 1,36 g/ml (Kurstak et al. 1981).

2.3.1.2 Morfogénesis.

Varios tipos de partículas se han observado al ME, en cortes de células infectadas "in vitro" o de tejidos intestinales de animales infectados (Holmes et al. 1975, Bryden et al. 1977, Chasey et al. 1977, Cevenini et al. 1983).

Petrie et al. (1981) describen una partícula con envoltura lipídica que aparece en los cultivos celulares infectados con el virus SA11 y las diferencia de las partículas completas con doble cubierta, recuperadas en gradientes de ClCs. Petrie describió cuatro tipos de partículas de rotavirus en cultivos celulares: 1. un tipo de partícula "desnuda", observada dentro de lisosomas celulares, denominada partícula subviral; 2. una partícula con envoltura lipídica que aparece en forma transitoria dentro del retículo endoplásmico; 3. partículas completas con doble cubierta que representan el virión maduro liberado y 4. las partículas incompletas "simple cubierta" que son producto de ruptura de las completas.

Este esquema fue propuesto para el virus SA11 y concuerda con los estudios realizados en rotavirus humanos (Holmes et al. 1975).

Estas observaciones permitieron establecer la siguiente teoría de replicación de los rotavirus: el virus penetra a la célula por endocitosis y es secuestrado por lisosomas, estos "desnudan" al virión apareciendo la partícula subviral de 50 nm de diámetro. A partir de esta partícula subviral se liberan los ARN mensajeros, sintetizándose las proteínas y ARN virales; el ARN es empaquetado en partículas proteicas de 50 nm de espesor que formarán el "Core" del virión. El resto de las proteínas virales se ensamblan alrededor del "Core" y las partículas luego migran a través de las membranas del retículo endoplásmico, adquiriendo una

envoltura lipídica. Los viriones luego se acumulan en las cisternas del retículo endoplásmico y al moverse en su interior pierden dicha envoltura (Petrie et al. 1981). Estudios ultraestructurales inmunocitoquímicos efectuados por Petrie et al. (1981) indican que los polipéptidos virales (V.P.) 2 y 6 son sintetizados en el citoplasma y concentrados en forma de inclusiones. La glicoproteína de la cubierta externa (VP7) es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y se incorpora al virión, cuando este penetra por gemación en las cisternas del retículo endoplásmico. La función de la envoltura lipídica, que se pierde dentro de las cisternas aún no se conoce pero se sabe que una glicoproteína viral no estructural de 28 Kilodaltons (KDa) de PM (NS28), tiene influencia en ese proceso (Sabara et al. 1982 (A), Petrie et al. 1983).

Las partículas víricas se liberan al medio produciendo lisis celular (Cukor et al. 1984).

2.3.2 Características fisicoquímicas.

La primera caracterización fisicoquímica se realizó con virus purificado a partir de heces.

Todos los rotavirus provenientes de mamíferos poseen propiedades fisicoquímicas similares. Las partículas con doble cubierta tienen una densidad en ClCs de 1,36 g/ml, y las partículas con una sola cubierta 1,38 g/ml; (Petric et al. 1975, Kapikian et al. 1976).

Las partículas completas tienen un coeficiente de sedimentación de 500-530 S (Petric et al. 1975), y las partículas que carecen de cubierta externa poseen un coeficiente de 380-400 S (Estes et al. 1983). El "Core" o nucleocápside posee una densidad de flotación en ClCs de 1,44 g/ml, y un coeficiente de sedimentación de 280 S (Estes et al. 1983).

2.3.2.1 Estabilidad e inactivación.

Los rotavirus son muy estables, el virus SA11 es resistente a pH 3,5, además de conservar la infectividad luego de ser tratado con éter, cloroformo, genetrón, sonicación, congelación y descongelación (Estes et al. 1983), sin embargo por encima de pH 10 y a partir de determinadas concentraciones (5 mM) de agentes como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) el ácido etilenglicobis nn', tetracético (EGTA) y el cloruro de calcio 2M hacen perder infectividad al virión (Estes et al. 1983). El calentamiento a 50°C con cloruro de magnesio 2M también afecta la viabilidad viral, pero tratando los viriones a la misma temperatura con sulfato de magnesio 2M no produce alteraciones (Estes et al. 1983).

El calcio juega un rol importante en mantener íntegra la partícula vírica, niveles de 0,15 a 2,5 mM de cloruro de calcio hacen más estable los viriones (Shirley et al. 1981).

La infectividad viral es aumentada tratando el virus con enzimas proteolíticas de páncreas, tripsina o elastasa y ese

tratamiento es requerido para realizar cultivos celulares (Estes et al. 1981(B), Estes et al. 1983).

Los agentes caotrópicos como el tiocianato de sodio y altas concentraciones (mayores de 1M) de cloruro de calcio, remueven la cubierta interna, quedando libres los "Cores"(Estes et al. 1983).

Snodgrass y Herring (1977) citan al formol, lisol y soluciones yodadas como útiles para inactivar el virus. Las soluciones de hipoclorito actúan eficazmente sobre virus purificados pero no en virus de heces o en cultivos celulares, esto indica que los fenómenos de agregación viral o adsorción a sólidos, son importantes en la sobrevivencia de los rotavirus en el medio ambiente (Estes et al. 1983).

2.3.3 El Genoma de los Rotavirus.

El genoma de los rotavirus está compuesto por 11 segmentos de ARN doble cadena (dc) que pueden ser separados por electroforesis en geles de poliacrilamida. El peso molecular de los distintos segmentos varía desde aproximadamente 230 kilodaltons (KDa) para el más liviano (segmento 11) hasta 2000 para el más pesado (segmento 1). El peso molecular total del genoma es de aproximadamente $11-12 \times 10^6$ Daltons (Da) (Kurstak et al. 1981).

Cada uno de los 11 segmentos de ARN de los rotavirus, codifica para una sola proteína. Aunque recientemente se ha sugerido que el segmento 9 del virus SA11 puede ser bicistrónico (Chan W.K. et al. 1986).

El virus SA11 es el más extensamente estudiado; en la Tabla 1 se pueden observar sus distintos segmentos de ARN con la correspondiente proteína que codifican (Estes et al. 1985).

Algunos productos genómicos primarios sufren modificaciones post traduccionales, tales como la glicosilación, agregado de oligosacáridos y clivaje proteolítico (Estes et al. 1985).

Aún no hay total consenso en determinar si los productos proteicos de los segmentos 3, 10 y 11 son estructurales o no estructurales. En la asignación de códigos al genoma de los rotavirus del grupo A, la mayoría de los autores coincide, con la excepción de las inversiones que a menudo ocurren con los segmentos 7, 8 y 9 y entre el segmento 10 y 11 (Dyall-Smith and Holmes 1981, Estes et al. 1985), Tabla 1.

El conocimiento de la codificación de cada segmento es muy importante, debido a la posibilidad de que ciertas cepas incorporen caracteres genómicos de dos cepas parentales produciendo recombinantes; clonando estas cepas recombinantes Offit y otros recientemente demostraron el rol del segmento genómico 4 de las cepas SA11 y NCDV en el poder de infectividad (Offit et al. 1986(A)). La cepa SA11 posee notable virulencia en ratones, no así la cepa NCDV, que sí adquiere virulencia cuando por recombinación incorpora el segmento 4 del virus SA11 [Offit et al. 1986(A)]. El mismo autor demuestra algo similar respecto a las características seroneutralizantes de las cepas mencionadas, los virus SA11

Tabla 1. Asignación de la codificación genética de las proteínas virales del rotavirus SA11 (Cukor et al .,1984-Estes et al.,1985).

SEGMENTO GENOMICO	POLIPEPTIDO	LOCALIZACION EN LA CUBIERTA VIRAL	FUNCION
1	VP1	Interna	-
2	VP2 VP3*VP4*	Interna	-
3	?	?	-
4	VP3 VP5*VP8*	Externa	Hemaglutinacion, aumento de la infectividad por acción de proteasas, neutralización y virulencia.
5	NS53	No estructural	-
6	VP6	Interna	Antígeno de subgrupo y grupo.
7	NS34	No estructural	-
8	NS35	No estructural	ARN replicación
9	VP7	Glicoproteína externa	Antígeno neutralizante mas importante
10	NS29	Glicoproteína no estructural	Actúa en la morfogénesis viral
11	VP9	Externa ?	-

* Productos del clivaje proteico_

y NCDV son serotipos diferentes, pero recombinantes que poseen el segmento 4 de una y el 7 de la otra, adquieren un título neutralizante similar para ambas cápsulas parentales [Offit et al. 1986 (B)].

2.3.3.1 Electroferotipos del genoma viral.

Se denomina electroferotipo al patrón migratorio que poseen los segmentos de ARNdc del genoma al ser separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida.

El ARN puede ser extraído directamente de la materia fecal o de fluido de cultivos celulares, utilizando fenol cloroformo y precipitándolo con etanol (en materiales y métodos se explica la técnica). La visualización del ARN doble cadena se efectúa usualmente por medio de tinción con bromuro de etidio o nitrato de plata (Estes et al. 1984). Las bases moleculares de la movilidad electroforética de los segmentos de ARN doble cadena de los reovirus no es conocida (Estes et al. 1984).

El ADN , el ARN de cadena simple y las proteínas, poseen una correlación directa entre su peso molecular y la migración en geles de poliacrilamida, no obstante ARNs de doble cadena con movilidad similar puede ser marcadamente diferentes en sus pesos moleculares, y ARNs con movilidad diferente pueden poseer el mismo peso molecular (Clarke, I.N. and Mc Crae M. 1981). Las estructuras secundarias influenciarían la movilidad de ARN , pero se necesitan más conocimientos para decidir si segmentos con migración

parecida poseen realmente alguna semejanza (Estes et al. 1984).

Está demostrado que con sólo los electroferotipos no se pueden determinar serotipos, ya que, virus con electroferotipos idénticos poseen distintos serotipos (Beards 1980).

Lourenco et al.(1981) propuso un esquema para clasificar los electroferotipos. En este esquema, agrupó los 11 segmentos en 4 grupos, los cuatro primeros segmentos forman el grupo 1, los segmentos 5 y 6 el grupo 2, los segmentos 7, 8 y 9 el grupo 3 y el 10 y el 11 forman el grupo 4. De esa manera el patrón electroforético del genoma se define como un patrón 4, 2, 3, 2. Existe un alto índice de variación individual en la migración electroforética de los diferentes segmentos pero conservando el agrupamiento 4, 2, 3, 2.

Algunos rotavirus humanos presentan una alteración en la migración de los segmentos 10 y 11 (Estes et la. 1983), estos virus presentan su segmento 11 con una migración elctroforética similar a la del segmento 10 del resto, este perfil electroforético se denomina patrón "corto" y al normal patrón "largo" (Estes et al. 1983). Estudios de hibridización molecular han demostrado que esto se debe a un cambio en la migración del segmento 11, el cual migra más lentamente que el segmento 10 quedando en el orden de la corrida como segmento no.10. Hasta ahora se ha visto que todos los rotavirus humanos con este patrón pertenecen al

subgrupo antigénico 1, (Kalika et al. 1981, Rodger et al. 1981).

Recientemente Hasegawa et al. (1984) describieron un patrón electroforético del genoma de un rotavirus aislado en humanos de Indonesia. El mismo muestra también un patrón corto, pero en este caso el segmento 10 migra muy cerca del 9, por lo que los autores lo denominan "super corto". Matsuno et al. (1985) serotipificaron este virus, encontrando que el mismo pertenece a un nuevo serotipo, diferente de los cuatro serotipos humanos descubiertos hasta ese momento.

2.3.3.1.1 Electroferotipos del genoma de rotavirus antigénicamente diferentes al grupo A.

Saif et al. (1980) aislaron rotavirus no diferenciables del resto al ME. Sin embargo estos virus no fueron detectables por las pruebas serológicas corrientemente usadas para diagnóstico. La razón de esto radica en que estos nuevos virus no poseían el antígeno común de la cápside interna descrito para las cepas del virus conocidas hasta ese momento. A partir de este hallazgo fueron descritos virus similares en cerdos, humanos, bovinos, ovinos y aves. Estos virus son denominados "Rota-like", pararotavirus o rotavirus atípicos (Bohl et al. 1984, Dimitrov et al. 1983, Espejo et al. 1984, Mc Nulty et al. 1981, Nicolas et al. 1983, Pereira et al. 1983, Theil et al. 1986). En todos los casos estos virus mostraron patrones electroforéticos de su ARN genómico que diferían del esquema

establecido por Lourenco et al. (1981). Pedley et al. (1983), caracterizaron molecularmente cepas de rotavirus que carecían del antígeno común, y observaron que no sólo existían diferencias significativas en el electroferotipo de los segmentos de ARN, sino que además detectaron importantes diferencias al analizar el ARN por medio del estudio de los oligonucleótidos ribonucleasa T1 resistentes de cada segmento de ARN.dc.

Pedley agrupó estas cepas de acuerdo a la forma en que se agrupan los segmentos de ARN en las corridas electroforéticas y estableció tres grupos diferentes; el grupo A (rotavirus típico) que responde al esquema de Lourenco (4.2.3.2), el B que presenta un patrón tipo 4,2,2,3, y el C con un patrón 4,3,2,2; además demostró que los virus de cada grupo compartían entre sí un antígeno común, como en el caso de los virus del grupo A. Recientemente Pedley definió dos nuevos grupos de rotavirus (Pedley et al. 1986) uno aislado de pollos que denominó grupo D, con un perfil genómico en las electroforesis del tipo 5,2,2,2, y un grupo E aislado de cerdos con un perfil algo similar al del grupo B pero con los segmentos del grupo 3 mucho más separados.

En el caso de los rotavirus aviares la situación aparece aún más compleja; McNulty et al. (1984) describieron un rotavirus aviar que comparte el antígeno de grupo con el grupo A de mamíferos, y además describió 3 nuevos grupos de rotavirus aviares, que son claramente diferenciables por

electroforesis de su genoma y además como en el caso de los rotavirus de mamíferos, cada grupo comparte un antígeno común. Asimismo Mc Nulty et al. (1984) describieron para las aves, 4 serogrupos que se correspondían con 4 electroferotipos similares entre sí. Todd y Mc Nulty (1986) describieron un 5to. serogrupo aislado de pavos.

2.3.3.1.2 Rotavirus pertenecientes al grupo A con perfil electroforético atípico de su genoma.

Recientes hallazgos de Pedley et al. (1984), Dolan et al. (1985) y Basselaer et al. (1986). describieron rotavirus que antigénicamente pertenecían al grupo A, pero algunos de sus segmentos de ARN mostrasen una migración atípica en las corridas electroforéticas. Estos virus presentaban cambios en la velocidad de migración electroforética en algún determinado segmento del ARN. Estos autores denominaron al fenómeno rearreglo genómico. Los dos primeros casos fueron descritos en niños con inmunodeficiencia congénita, uno describe un rearreglo del segmento 11. Pedley et al. (1984), y el otro muestra la alteración en el segmento 8 [Dolan et al. (1985)].

Un hallazgo similar fue descrito también en niños inmunológicamente competentes (Basselaer et al. 1986).

Dolan et al. (1985) lograron replicar en cultivo celular a este virus y el rearreglo genómico se mantiene. El virus descrito por Pedley et al. mostró dificultades para adaptarse a cultivos celulares, pero Allen et al. (1985)

lograron producir una cepa recombinante entre ésta y una cepa bovina adaptada a células MA104; la cepa recombinante se replicó in-vitro y en su genoma portaba los rearrreglos genómicos de la cepa humana.

Hundley et al. (1985) lograron obtener in-vitro un rearrreglo genómico, replicando a alta multiplicidad, una cepa de rotavirus bovino grupo A con perfil genómico normal. La adaptación de estos virus a cultivos celulares, y la reproducción experimental del fenómeno de rearrreglo, permitirá conocer mejor algunos mecanismos biológicos de estos virus, desconocidos hasta el momento.

2.3.3.1.3 Estudio de los electroferotipos genómicos; su aplicación.

La corrida electroforética del ARN viral en geles de poliacrilamida y su posterior visualización es útil como un método diagnóstico, de alta especificidad y con una sensibilidad muy similar a la prueba de ELISA (Selb et al. 1985), con la ventaja que detecta virus antigénicamente diferentes, no detectables por las pruebas serológicas corrientes.

Estas técnicas permiten caracterizar al virus con precisión y seguir distintos brotes de la enfermedad (Estes et al. 1984), aportando importantes datos epidemiológicos, por ejemplo en la detección de infecciones simultáneas con más de una cepa [Sabara et al. 1982(B)]. Permite además efectuar en forma rápida una clasificación de los diferentes

aislamientos dentro de los grupos conocidos [Pedley et al. 1983, Snodgrass et al. 1984(A)]. En el proceso de adaptación a cultivos celulares, los electroferotipos sirven para detectar posibles contaminaciones con otras cepas. Mediante esta técnica, en ciertas condiciones, es posible también detectar en cepas recombinantes el origen de sus segmentos genómicos (Gombold and Ramig 1986).

Los estudios electroforéticos del genoma viral son un buen complemento para los estudios epidemiológicos de la variabilidad viral (Estes et al. 1983).

2.3.3.2 Electroforesis de oligonucleótidos de los distintos segmentos del genoma y utilización de sondas moleculares en pruebas de hibridización.

Además del estudio de electroferotipos, existen otros métodos de estudio genómicos más precisos, aunque de mayor complejidad.

Una forma de estudiar el genoma de los rotavirus es analizar los oligonucleótidos T1 ribonucleasa resistentes de cada segmento de ARNdc separados previamente por electroforesis.

Estos análisis pueden ser mono o bidimensionales (Walker et al. 1980, Pedley et al. 1983).

Actualmente es posible obtener sondas moleculares radiactivas a partir de genes clonados, las que detectan homologías en pruebas de hibridización, esto puede reemplazar la compleja labor de estudiar los

oligonucleótidos por corridas electroforéticas bidimensionales (Estes et al. 1984).

Estas sondas moleculares pueden obtenerse por marcación de I^{125} de ARNsc provenientes de ARNdc desnaturalizado o por marcación con P^{32} de ARNsc sintetizado in-vitro (Flores et al. 1983, Flores et al. 1986). También se utilizan sondas de ADN copia marcadas con ^{32}P (Dimitrov et al. 1985).

Estas sondas son habitualmente utilizadas en experimentos de hibridización con ARNdc desnaturalizado extraído de la muestra viral y fijado a membranas de nitrocelulosa. Con el desarrollo de estas técnicas se podría discriminar entre subgrupo y serotipos (Dimitrov et al. 1985); además puede permitir un estudio profundo en la diversidad genómica de los rotavirus aislados en diferentes especies, lo que puede dar pautas más precisas de la evolución de sus genomas y en consecuencia, de la relación interespecie que poseen las distintas cepas (Flores et al. 1986).

También hay quienes proponen estas técnicas para diagnóstico. Sondas de ADN copias de distintos genes combinados pueden detectar 0,135 ng de ARNdc purificado (Dimitrov et al. 1985). Otros autores como Lin et al. (1985) utilizando estas sondas, detectan concentraciones de 20 a 50 ng/ml de ARN genómico en la muestra de materia fecal.

2.3.4 Polipéptidos virales.

Existen dos tipos de polipéptidos virales los que forman parte del virión, denominados polipéptidos estructurales y aquellos polipéptidos que intervienen en los procesos de morfogénesis pero luego no forman parte del virión, polipéptidos no estructurales. En la tabla 1 se muestran los diferentes polipéptidos que codifican cada segmento además de determinar la localización de los polipéptidos estructurales en el virión.

2.3.4.1 Polipéptidos estructurales.

La composición proteica de las partículas de rotavirus fue examinada por primera vez en 1975 (Rodger et al. 1975(B), Newman et al. 1975).

Existen numerosos estudios que dan datos confusos respecto del número de polipéptidos (5-10) (Estes et al. 1983). Estos autores piensan que la discrepancia se origina más en las metodologías empleadas que en las diferencias en la composición polipeptídica de las distintas cepas.

No existe aún una nomenclatura determinada pero Rodger et al. [1975(B)] han propuesto denominar a los polipéptidos estructurales como "proteínas virales" (VP). En los primeros estudios efectuados se utilizaban viriones que habían sufrido acción enzimática ya sea en el intestino del individuo infectado o en los cultivos celulares. Estos resultados luego se compararon con estudios de polipéptidos obtenidos por traducción "in-vitro" en un sistema de reticulocitos lisados de conejo, programado con ARN

mensajero de rotavirus. Estes et al. [1981(A)] determinan la existencia de seis polipéptidos estructurales para el rotavirus simio SA11. Tres de la cápside interna VP1, VP2 y VP6 con un PM de 125KDa, 94KDa y 41KDa respectivamente, y tres de la cápside externa VP3, VP7 y VP9 siendo 88KDa, 38KDa y 27KDa sus PM respectivos. La proteína VP7 sufre un cambio post-traducciona l glicosilándose y las VP2 y VP3 sufren clivajes proteolíticos. VP2 da origen a VP3* y VP4*, y VP3 da origen a VP5* y VP8*. Para su mejor identificación a los productos de clivaje proteolítico se los identifica con un asterisco (*) (Estes et al. 1983).

En el caso de la proteína VP9 aún no está definido si sufre o no un proceso post-traducciona l, incluso algunos autores no la observan en la cápside externa (Estes et al. 1985).

Se han efectuado algunos estudios tendientes a definir la localización de los péptidos en las cápsides virales (Novo and Esparza 1981), estos investigadores utilizando iodina ción en partículas de rotavirus bovino, muestran que VP2 es la proteína más expuesta en las partículas de simple cápside. Estes et al.(1983) proponen en cambio que VP6 estaría más expuesta en este tipo de partículas que la VP2.

Comparaciones detalladas de polipéptidos virales sintetizados en células infectadas y polipéptidos sintetizados "in vitro" por transcripción del ARN viral han demostrado las modificaciones post-traduccionales (glicosilación y/o clivaje proteico) de los productos

primarios de genes (Mason et al. 1980, Arias et al 1982, Sabara et al. 1984).

2.3.4.1.1 Polipéptidos de las partículas con cápside simple.

Dos polipéptidos -VP2 y VP6- son los que en mayor cantidad aparecen en la composición de los viriones, esto se aplica a todas las cepas analizadas. Estas 2 proteínas ocuparían el 80% del total de la masa de las partículas víricas completas y el 99% de las partículas con cápside simple [Estes et al. 1981(A)].

El "Core"viral estaría compuesto por polipéptidos de alto peso molecular que se encuentran en poca cantidad más VP1 y VP2. No se ha establecido aún si los polipéptidos de alto PM del "Core" serían producto del tercer segmento de ARNdc al que no se le ha podido asignar un producto peptídico o serían consecuencia del clivaje de VP2 (Estes et al. 1983).

2.3.4.1.2 Polipéptidos de la cápside externa.

Los polipéptidos de la cápside externa poseen un interés particular debido al rol que jugarían en la infectividad, virulencia y la producción de anticuerpos neutralizantes.

La cápside externa como se indicó posee 3 polipéptidos VP3, VP7 y probablemente VP9; VP3 posee un PM de 88 KDa y se cliva en dos productos proteicos de 60 y 28 KDa, por este motivo algunos autores en un principio le asignaron 5 polipéptidos a la cápside externa (Espejo et al. 1985). El

clivaje de esta proteína por acción de la tripsina aumenta el poder de infectividad de las partículas en cultivos celulares [Almeida and Hall 1978, Estes et al. 1981(A)].

Estes et al. (1983) describen que ciertas cepas del virus SA11 estudiadas poseen 2 glicoproteínas sugiriendo que dicho fenómeno responde a una mutación genómica.

Wai-Kit Chan et al. (1986) encuentran que el segmento 9 del virus SA11 posee dos sitios en donde se puede iniciar la transcripción del ARNm y que según donde ésta se inicie se puede generar un tipo u otro del producto primario con un PM de 37 KDa, y 35,3 KDa. De esa manera se generan dos glicoproteínas diferentes, actuando el segmento 9 en forma bisistronica. Aún no está determinado si éstas glicoproteínas son funcionalmente diferentes.

Los rotavirus son los únicos virus sin envoltura lipoproteica que poseen una glicoproteína estructural principal. Este hecho está relacionado a la similitud que hay en su morfogénesis con respecto a los virus que poseen envolturas lipoproteicas (Ericson, B.L. et al 1982.). No hay aún pruebas definitivas de la relación de VP9 con un producto genómico primario; Ericson et al (1982) sugieren que el polipéptido VP9 de PM 27 KDa es derivado de un producto de 26 KDa, no conociéndose aún la manera en que se produce la modificación. Otros investigadores especulan con la posibilidad de que este polipéptido sea glicosilado (Dyall-Smith et al. 1981).

Estos datos acerca de los polipéptidos estructurales, son en su mayoría obtenidos con las cepas de rotavirus SA11 y con rotavirus bovinos. Aún no está bien determinado si todas las cepas tendrían composición similar. Algunos autores han encontrado por ejemplo que la cepa bovina "United Kingdom" (UK), posee 10 polipéptidos estructurales (Mc Crae and Mc Corquodale, 1982).

Está determinado que los pesos moleculares de los distintos polipéptidos varían en virus provenientes de distintas especies e incluso entre cepas (Espejo et al. 1980). Esto puede explicar la discrepancia entre los diferentes resultados publicados.

2.3.4.1.3 Proteínas estructurales y actividad enzimática del virión.

La responsabilidad de los polipéptidos en las actividades enzimáticas descubiertas en las partículas víricas aún no ha sido clarificada. Las actividades enzimáticas que se han detectado en el virión son : ARN polimerasa, poli A polimerasa, guanil transferasa, metil transferasa, y nucleótido hidrolasa (Estes et al. 1985).

2.3.4.1.4 Propiedades antigénicas de los polipéptidos estructurales.

Los rotavirus poseen por lo menos cuatro antígenos relevantes:

- a) Antígeno de grupo asociado a las partículas de una densidad de 1,38 g/ml en C1Cs (cápside simple).
- b) Antígeno de subgrupo, involucra epitopes que serían parte del antígeno de grupo.
- c) Antígeno específico de neutralización.
- d) Hemaglutinina.

El antígeno de grupo se encuentra localizado en la proteína viral VP6 que forma parte de la cápside interna; esta proteína también posee los epitopes para el antígeno de subgrupo (Estes et al. 1985).

El antígeno específico de neutralización está localizado en la glicoproteína VP7, aunque también se ha demostrado que VP3 posee epitopes de neutralización [Offit et al. 1986(B) y Offit et al. 1986 (C)]. Incluso algunos autores dan indicios de que VP6 puede inducir también la producción de algún tipo de anticuerpo neutralizante al igual que VP9 (Estes et al. 1985).

La glicoproteína VP7 ha sido muy estudiada por ser bien conocido su rol en la determinación de los serotipos, y su conocimiento ha aportado importantes datos para el desarrollo de vacunas. Matsuno et al. (1983) y Sabara et al. (1985) (A), han utilizado esta proteína purificada como inmunógeno y han demostrado que la misma induce la producción de anticuerpos neutralizantes en animales de experimentación. Sabara estudió un péptido derivado de VP7 con un PM de 14.000 Da, y demostró que, la respuesta generadora de anticuerpos neutralizantes es independiente de

la glicosilación. Este trabajo mostró que es indispensable mantener intactos los puentes disulfúricos y que las secuencias de aminoácidos de zonas respónsables de la producción de anticuerpos neutralizantes están altamente conservadas en diferentes cepas de virus. [Sabara et al. 1985(A), Sabara et al. 1985(B)]. Otros autores como Glass et al. (1985), han estudiado las sesuenciass de aminoácidos de esta proteína en las regiones hidrofílicas variables, especialmente los residuos de aminoácidos 83 y 102, sugiriendo que en este lugar se encontrarían los epitopes que determinan los serotipos. Este autor compara cepas humanas, bovinas y simias encontrando que poseen un grado de homología en sus aminoácidos del 75 al 86%. Gunn et al.(1986) también estudiaron en forma comparativa las secuencias de aminoácidos de VP7 en distintas cepas pertenecientes a diferentes serotipos, encontrando regiones extensamente conservadas, con algunas variaciones en los dominios hidrofílicos, de donde estudiaron 6 péptidos. Los mismos mostraron no poseer la propiedad de inducir la aparición de anticuerpos neutralizantes.

Más estudios son necesarios aún para esclarecer bien los principios moleculares de las propiedades biológicas y antigénicas de esta proteína.

2.3.4.1.4.1 Clasificación antigénica de los rotavirus:

Grupos antigénicos.

En un principio se pensó que todos los rotavirus poseían un antígeno común en su cápside interna, el epitope responsable de esta característica está en la VP6, por eso es posible detectarlo con facilidad a través de distintas técnicas serológicas (Kurstak et al. 1981, Estes et al. 1983, Estes et al. 1985).

En 1980 Saif et al., describieron un rotavirus no detectable con las técnicas serológicas corrientemente usadas. Sin embargo al ser observado por ME este virus no era diferenciable de los rotavirus conocidos hasta el momento. Posteriormente distintos investigadores hacen hallazgos similares en distintas especies de mamíferos como humanos (Rodger et al. 1982, Dimitrov et al. 1983, Espejo et al.. 1984, Nicolas et al. 1983, Tao et al. 1983), cerdos [Bridger 1980, Bridger et al. 1982, Chasey and Davis 1984, Theil et al. 1985(A)], bovinos (Chasey and Davis 1986) y corderos (Chasey and Banks 1984). Mc Nulty et al. (1981) describen estos virus en aves y posteriormente se registran varios hallazgos más en pollos y pavos (Mc Nulty et al. 1984, Todd and Mc Nulty 1986, Theil et al. 1986).

Estos virus fueron denominados rotavirus atípicos, "rota-like" o "pararotavirus". Los mismos fueron estudiados genómica y antigénicamente por Pedley et al. (1983) y se estableció la existencia de "grupos" de rotavirus que compartían antígenos en común, denominándose grupo A al conocido en primera instancia y más extensamente difundido.

Existen hoy 5 grupos de rotavirus denominados A, B, C, D, y E (Pedley et al. 1986).

Mc Nulty et al. (1984) intentaron también agrupar los rotavirus atípicos aislados en pavos y pollos, describiendo cuatro "serogrupos", 1, 2, 3 y 4, siendo el 1 y el 2 los descriptos como A y D por Pedley et al (1986). Todd y Mc Nulty (1986) sugirieron la existencia de un nuevo "serogrupo", el 5, aislado de pavos.

Se necesitan estudios más completos que comparen los distintos grupos de distintas especies para efectuar una clasificación definitiva. Estos virus atípicos muestran hasta ahora serias dificultades en adaptarse a cultivos celulares, lo que ha retrasado el avance en su caracterización.

Recientemente Jashés et al. (1986) han realizado transcripción "in vitro" de un rotavirus atípico humano y han establecido algunas diferencias en este mecanismo con los rotavirus del grupo A.

2.3.4.1.4.2 Subgrupos:

Dentro del grupo A de rotavirus, se han encontrado dos subgrupos denominados 1 y 2. Ambos se discriminan con pruebas serológicas como la de ELISA, utilizando anticuerpos contra los determinantes antigénicos de subgrupo localizados en VP6 (Thouless et al. 1982). Es interesante destacar que los rotavirus humanos, pueden clasificarse en subgrupos, utilizando la técnica de "PAGE" con su ARN genómico, los

pertenecientes al subgrupo 1 muestran patrón denominado "corto" y los del subgrupo 2 el patrón "largo". (Thouless et al. 1982).

Greenberg et al. (1983) desarrollaron una técnica más sensible para detectar subgrupos utilizando anticuerpos monoclonales.

La clasificación en subgrupos, puede dar datos epidemiológicos de importancia, y su utilidad es aún mayor si se relaciona esta clasificación con otras características antigénicas y genómicas de las distintas cepas (Greenberg et al. 1983). Por ejemplo, en la utilización de vacunas recombinantes (cepa bovina con humana), en donde se recombina un serotipo 1 con un subgrupo 1, es fácil detectar en la naturaleza cepas vacunales y diferenciarlas de las cepas humanas salvajes, ya que estas últimas es muy difícil que muestren esta combinación (Thouless et al. 1982).

2.3.4.1.4.3 Serotipos.

El serotipo de los rotavirus está determinado fundamentalmente por la glicoproteína VP7 y en menor grado la VP3 [Estes et al. 1983, Estes et al. 1985, Offit et al. 1986(B)]. Algunos autores sugieren que pueden tener influencia también la VP6 y VP9 (Estes et al. 1983).

La única prueba utilizada actualmente para serotipificar es la neutralización, [Gaul et al. 1982, Woode et al. 1983, Ojeh et al. 1984, Dea et al. 1986(A), Dea et al. 1986(B)].

Estes et al. (1985), describieron 9 serotipos para todas las especies (tabla 2); distintos trabajos de serotipificación efectuados posteriormente, sugieren que son más los serotipos existentes (Woode et al. 1983, Ojeh et al. 1984, Snodgrass et al. 1984(B), Dea et al. 1986(A), Dea et al. 1986(B), Matsuno et al. 1985).

Solamente los rotavirus grupo A han podido clasificarse en serotipos. Los rotavirus pertenecientes a otros grupos aún no han podido adaptarse a cultivos celulares, lo que ha impedido efectuar las pruebas clásicas de neutralización.

2.3.4.2 Polipéptidos no estructurales.

Cuando se estudian los polipéptidos virales en cultivos celulares, se puede observar que algunos de ellos forman parte de las partículas víricas y otros nunca aparecen en el virión. A los polipéptidos no hallados en los viriones se los denomina no estructurales "NS" (Estes et al. 1983). Estes et al. (1985) describen 4 polipéptidos no estructurales para el virus SA11, siendo uno de ellos una glicoproteína. A estos se los denominó NS53, NS34, NS35, y NS29 (el número indica el PM del polipéptido), y son productos de los segmentos genómicos 5, 7, 8, y 10 respectivamente.

A los polipéptidos NS53 y NS34 aún no se les ha asignado una función específica. La proteína NS35 aparentemente influiría en la replicación del ARN viral (Estes et al. 1985). La glicoproteína NS29 es la más

Tabla 2. Distintos serotipos de rotavirus (1)

Serotipo	especie donde se aisló	cepas
1	Humanos	Wa, Ku, K8, DB
2	Humanos	D5-1, 52, KUN, Hn-126, 390
3	Humanos	M , P, YO, 14, 15, Mcm2, Mo, ITO, Namoto
	Animales: Simio	MMU18006, Sa11
	Canino	Cu-1
	Equino	H2
4	Humanos	St. Thomas 4, Hochi, Hosokawa
	Animales: Porcino	Gottfried, SB-1, SB-2
5	Animales: Porcino	OSU, EE, A580
	Equino	H-1
6	Animales: Bovino	NCDV, UK, B641, B720, B14, II-2
7	Animales: Bovino	B223
8	Animales: Pavos	Ty1, Ty3
9	Animales: Pollos	ch-1

Estas técnicas de ME son costosas y es muy engorroso realizar relevamientos en gran escala aunque son útiles en los estudios de caracterización.

La inmunofluorescencia (IF) fue descrita por Middleton et al. (1974). Mebus et al. en 1969 describieron un método de inmunofluorescencia en extendidos de materia fecal, esta técnica es menos costosa que la ME pero presenta al igual que ésta dificultades para procesar gran cantidad de muestras.

Con el mismo fundamento que la IF algunos autores han usado la técnica de inmunoperoxidasa IPA (Gerna et al. 1984).

Estas técnicas se han empleado para serotipificar cepas no adaptadas a crecer "in vitro", basándose en el principio de neutralización de focos fluorescentes o unidades IPA positivas, utilizando como inóculo suspensiones de MF (Woode et al. 1983, Gerna et al. 1984).

Existen muchas técnicas que ya han caído en desuso, tales como la contrainmunolectroforesis (CIEP), fijación de complemento (CF), radioinmunoensayo (RIA), hemaglutinación (HA), e inhibición de la hemaglutinación (HAI) (Kurstak et al. 1981).

La prueba de ELISA es una de las más utilizadas. Se puede emplear un método directo y uno indirecto, siendo altamente sensible (Rubinstein and Miller 1982, Reynolds et al. 1984), aunque no es muy específica (Benfield et al. 1984). La especificidad se mejora utilizando anticuerpos

monoclonales (Beards et al. 1984). Este método permite efectuar relevamientos de gran cantidad de muestras. Actualmente se están poniendo a punto técnicas de ELISA para los rotavirus no pertenecientes al grupo A ya que por ahora estos no pueden ser detectados (Nakata et al. 1986).

Grom and Bernard (1985), describieron un método combinado de ELISA y neutralización al que denominaron "VELCIA".

En estos momentos, ya están siendo utilizadas las técnicas de aglutinación en látex, las que aparentemente poseen sensibilidad similar al ELISA y mayor especificidad, siendo mucho más simple su empleo (Doern et al. 1986). Este por ser un método de detección serológica al igual que el ELISA, está limitado a detectar sólo los rotavirus grupo A. Es por eso que es de gran utilidad asociar a estas técnicas la electroforesis del genoma viral, a la que ya se ha hecho referencia al hablar del genoma de los rotavirus.

El empleo de sondas moleculares genómicas está adquiriendo desarrollo en los últimos tiempos.

El cultivo celular sería la técnica más sensible de diagnóstico por su poder amplificador, pero esto con los rotavirus tiene aplicación limitada debido a que muchas cepas poseen dificultad de crecer "in vitro" (Estes et al. 1983).

2.5 Cultivos celulares.

Las dos primeras cepas cultivadas "in vitro" fueron las denominadas virus SA11 y el agente 0 (Malherbe and

Strickland-Cholmey 1967). El rotavirus bovino hallado por Mebus en 1969 fue cultivado por él en células de riñón de ternero en el año 1971 [Mebus et al. 1971(A)]. Hasta 1981 sólo se habían podido cultivar un limitado número de cepas, las que en su mayoría eran de origen bovino y porcino (Estes et al. 1983). Mc Nulty en 1979 logró replicar una cepa aviar (Mc Nulty et al. 1981).

Cuando se descubrieron los efectos de la tripsina y enzimas pancreáticas sobre la infectividad de los viriones en cultivos celulares, se lograron adaptar numerosas cepas provenientes de varias especies (Estes et al. 1983).

Para las cepas que mostraron mayor dificultad para multiplicarse "in vitro" fue útil el empleo de cultivos en rollos (Estes et al. 1983).

Los efectos de la tripsina sobre los viriones, aumentando la infectividad en cultivos celulares, fueron descritos por varios autores (Almeida and Hall 1978, Clark et al. 1981, López et al. 1985). El mecanismo se basaría en el clivaje de la proteína de la cápside externa VP3. La línea de células fetales de riñón de mono rhesus (MA-104) es la que ha mostrado mayor eficiencia para replicar la mayoría de las cepas de rotavirus conocidas (Estes et al. 1983).

Algunos autores sugieren que para lograr una adaptación más eficaz puede ser útil hacer los primeros pasajes en líneas primarias, y luego pasarlos a líneas continuas (Ward et al. 1984).

Ensayos cuantitativos de formación de placas han sido efectuados con rotavirus bovinos, humanos, porcinos, y simios (Matsuno et al. 1977, Smith et al. 1979, Estes and Graham 1980, Urasawa et al. 1982) .

Para la formación de placas todos los rotavirus, con la excepción de la cepa UK (Faulkner-Valle et al. 1982), requieren la presencia de pancreatina o tripsina en la capa de agar. El DEAE-dextran aumenta el tamaño de las placas cuando se lo agrega al agar (Estes et al. 1983).

Algunos autores han encontrado que el agar inhibe la formación de placas, aconsejando la utilización de agar purificado (Urasawa et al. 1982).

Debido a que el ensayo de plaqueo no es aplicable para todas las cepas de rotavirus, la infectividad viral se ha medido empleando el ensayo de focos fluorescentes (Banatvala et al. 1975, Woode et al. 1983, Ojeh et al. 1984) o empleando la técnica de inmunoperoxidasa (Gerna et al. 1984). En estas pruebas se puede mejorar la sensibilidad centrifugando el inóculo sobre la monocapa a baja velocidad (Bryden et al. 1977).

Ensayos de inhibición de focos fluorescentes o de focos inmunoperoxidasa positivos han sido empleados para serotipificar distintas cepas (Beards et al. 1980, Woode et al. 1983, Ojeh et al. 1984, Gerna et al. 1984). Este método es útil también para estudiar infecciones en condiciones experimentales en caso que el virus se replique en forma

limitada o no produzca efecto citopático (Estes et al. 1983).

Con los rotavirus no pertenecientes al grupo A aislados de mamíferos, hasta ahora se han efectuado numerosos intentos de adaptación a cultivos celulares pero han sido infructuosos. Algunos autores han logrado infectar células MA-104 con éstos, pero no han logrado realizar pasajes sucesivos con éxito (Theill and Saif 1985, Chasey and Banks 1986).

Mc Nulty et al. (1981) lograron cultivar y mantener en los pasajes sucesivos un rotavirus atípico de origen aviar, las células utilizadas fueron células de hígado de embrión de pollo.

2.6 Características clínicas de la infección por rotavirus.

La infección por rotavirus en niños de corta edad, así como también en animales jóvenes puede presentar un cuadro subclínico o clínico. En este último caso, puede haber diferentes grados de severidad, incluso puede producir la muerte (Kurstak et al. 1981). Hay también evidencia de infección en humanos adultos con cuadros severos de gastroenteritis (Thao et al. 1984). Algunos autores también indican que bovinos adultos pueden presentar infecciones subclínicas y jugar un rol epidemiológico importante (Woode et al. 1978). Los síntomas predominantes para cualquier especie son anorexia, depresión, diarrea y deshidratación (Acha and Szyfres 1980).

2.6.1 La infección en el hombre.

En el niño, la infección por rotavirus algunas veces produce sólo enfermedad leve o subclínica. Algunos niños presentan vómitos post-prandiales posiblemente debido a regurgitación. La diarrea se desarrolla después de un tiempo variable, y aparece con heces acuosas de color verde o amarillento, libres de sangre o mucus. A menudo el cuadro va acompañado con fiebre, la que puede llegar a 40°C si la deshidratación es severa. En algunos casos severos puede aparecer hipernatremia. Con los tratamientos comunes, la enfermedad no sufre complicaciones. La diarrea dura entre 5 y 8 días, raramente menos de 2 ó más de 15 días (Kurstak et al. 1981).

En China se han descrito recientemente cuadros de gastroenteritis severa en adultos, producidas por un rotavirus atípico (Tao et al. 1984, Wang et al. 1985).

2.6.2 La infección en bovinos.

El curso de la infección natural por rotavirus en el campo, se caracteriza por aparición súbita de diarrea en un número elevado de terneros. El período de incubación varía de 24 a 48 horas. Los signos clínicos más comunes son: depresión, anorexia, salivación y diarrea acuosa de color amarillento. Habitualmente la diarrea dura 1 ó 2 días, pero cuando hay complicación bacteriana secundaria puede durar 3 a 5 días. En animales libres de gérmenes la diarrea por rotavirus se limita a un período de 6 a 10 horas, con una

recuperación total a las 24 horas post-infección. La recuperación en brotes naturales de diarrea depende de los agentes virales o bacterianos que se hayan asociado a la infección y del grado de deshidratación. Existen brotes con alto índice de mortalidad cuando se asocian a la infección viral E. coli enteropatógenas.

No se encuentran lesiones de importancia en los animales , que han sufrido diarrea por rotavirus, sólo se ha observado el contenido intestinal aumentado y muy líquido (Torres-Medina et al. 1985).

2.6.3 La infección en otras especies.

En otras especies, aparte de las aquí descritas, el cuadro clínico de la infección por rotavirus no varía mayormente (Kurstak et al. 1981).

Si bien existe un cuadro clínico descrito para las infecciones ocurridas en mamíferos, aún no está bien definido el mismo para las aves, (Saif et al. 1985, Theil et al. 1985(B)).

2.7 Patogénesis de la infección por rotavirus.

La patogénesis de la infección por rotavirus es más o menos similar para las distintas especies afectadas (Mebus et al. 1971(B), Theil et al. 1978, Imagawa et al. 1984, Torres-Medina et al. 1985). La especie más estudiada ha sido la bovina y es en la que se va basar la descripción.

La forma más común de entrada del virus al huésped, es la ingestión de material contaminado. Las enzimas proteolíticas del tracto digestivo juegan un rol importante en la patogénesis de la infección al activar la infectividad del virus por medio de mecanismos que aún no han sido totalmente esclarecidos; se cita a VP3 como una de las proteínas virales que estaría implicada en estos mecanismos [Offit et al. 1986(A)].

En primera instancia el rotavirus infecta a las células del epitelio del intestino delgado anterior (enterocitos). Las células que recubren el ápice de las vellosidades del intestino delgado anterior son las que primero son afectadas. Esto va seguido por una progresión de la infección hacia las partes media y posterior del intestino delgado. En los primeros momentos de la infección, puede observarse en el citoplasma de las células epiteliales de las vellosidades, gran cantidad de antígeno viral. Esto coincide con el desencadenamiento de la diarrea. La infección viral altera la función celular, a pesar de que en primer instancia la lámina epitelial se mantiene. Dentro de un período corto las células infectadas se descaman hacia el lumen intestinal y las células exfoliadas cargadas de antígeno viral pueden observarse en la MF. Siguiendo al proceso de exfoliación celular, la vellosidad se atrofia y es recubierta por células inmaduras con una morfología que puede ir de cúbica a escamosa. Estas células provienen de las criptas, las cuales no son afectadas por el virus.

El reemplazo de las células infectadas por células inmaduras ocurre en unas 4 horas. Las células inmaduras son refractarias a las funciones de digestión y absorción, provocando la continuidad de la diarrea. La infección es limitada al intestino delgado, aunque hay algunas referencias de descamación de células del abomaso e intestino grueso.

Al examinar tejidos intestinales extraídos de terneros infectados, se reveló replicación de rotavirus, en las cisternas del retículo endoplásmico de células epiteliales maduras de las vellosidades y en macrófagos de la lámina propia. Partículas víricas libres en el contenido intestinal aparecen aproximadamente a las 30 horas post-infección. El número disminuye rápidamente después del inicio de la diarrea y continúa en bajos niveles hasta los 5-6 días posteriores.

La fisiopatología de la diarrea por rotavirus y las serias alteraciones en los fluidos corporales y electrolitos y que se desarrollan secundariamente son complejas.

La infección de las células epiteliales altera su metabolismo y en consecuencia, sus funciones se ven alteradas; estas células actúan no sólo en mecanismos de absorción y digestión de alimentos, sino que también cumplen funciones como barrera inmunitaria a través de la secreción de productos tales como lisozima y lactoferrina.

En el intestino delgado del animal normal, las células de las criptas cumplen funciones secretorias y las

epiteliales de las vellosidades llevan a cabo la absorción. Cuando estas últimas se alteran las criptas continúan su función, produciendo un desbalance hídrico con acumulación de fluido en el lumen intestinal. Las células inmaduras de las vellosidades poseen bajos niveles de disacaridasas que hacen insuficiente la normal absorción de glucosa y galactosa. Esta digestión inadecuada produce acumulación de lactosa y carbohidratos digeribles que sirven de medio para la multiplicación de bacterias, la que exacerba la diarrea. También puede ocurrir hipermotilidad intestinal.

Estos cambios provocan deshidratación, hemoconcentración, acidosis con hiperkalemia secundaria, y en casos severos, colapso (Torres-Medina et al. 1985). Muchas veces se producen infecciones con agentes múltiples y estas interacciones provocan casos más severos que modifican la patogenia aquí descrita (Tzipori et al. 1983, Hess et al. 1984, Torres-Medina et al. 1985).

2.8 Aspectos epidemiológicos de las infecciones producidas por rotavirus.

En casi todo el mundo los rotavirus son la mayor causa de diarrea en niños y animales jóvenes (Kurstak et al. 1981).

Las especies en las que más estudios epidemiológicos se han efectuado son la humana y la bovina (Woode 1978, Snodgrass et al. 1982(B), Estes et al. 1983); existen algunos estudios en cerdos (Utrera et al. 1984), y

actualmente también se han comunicado algunas investigaciones efectuadas en aves (Andral et al. 1985, Todd and Mc Nulty 1986).

Algunas cepas de rotavirus podrían infectar a más de una especie. Experimentalmente se ha logrado infectar animales con rotavirus aislados de otra especie diferente (Middleton et al.1975, Mebus et al.1976, Torres-Medina et al.1976, Castrucci et al. 1984). El éxito logrado con las infecciones experimentales hace razonable pensar que esto puede producirse también espontáneamente en la naturaleza. Castrucci et al.(1984) proponen una hipótesis, en la que sostienen que puede haber determinadas cepas de rotavirus con características biológicas tales, que les permita producir infecciones a más de una especie. Algunos autores han estudiado las características antigénicas y biológicas de determinadas cepas y han sugerido que determinadas cepas de rotavirus aisladas en una determinada especie puede provenir originariamente de otra especie diferente (Bridger and Brown 1984, Flores et al. 1986). Infecciones interespecie demostradas "in-vitro" indican la posibilidad de que algunas especies podrían actuar como fuente de virus patógenos para otras, tal como el caso descrito por Schwers et al. (1983) en perros, donde muestra que estos pueden infectarse con rotavirus bovinos y humanos.

Un estudio recientemente efectuado en Panamá no pudo demostrar que las infecciones enzoóticas de rotavirus

bovinos sean fuente de infección para las personas encargadas del manejo y sus familias (Ryder et al. 1986).

Los rotavirus no pertenecientes al grupo A también han despertado sumo interés en lo que hace a su estudio epidemiológico; y es también posible que produzcan infecciones entre distintas especies. Se ha descrito un rotavirus atípico aislado en ratas que luego causó gastroenteritis en personas que mantuvieron contacto con los animales (Graham and Estes 1985). Guang et al. (1985), sugieren la posibilidad de que un rotavirus atípico que ocasionó un severo brote de gastroenteritis en humanos adultos de China, sea un rotavirus grupo B que inicialmente había infectado cerdos.

2.8.1 Epidemiología de los rotavirus humanos.

El virus se transmite de persona a persona vía fecal-oral.

La infección por rotavirus es la causa más importante de hospitalización de niños en países desarrollados. En los países en desarrollo, es la causa más importante de diarrea en niños junto con la *Escherichia coli* enterotoxigénica (Estes et al. 1983).

Los rotavirus han sido descritos como agentes productores de gastroenteritis infantil en la Argentina (Muchnik et al. 1981).

La edad de mayor susceptibilidad a la infección está entre los 6 a 24 meses de vida (Cukor et al. 1984). Los

neonatos pueden infectarse, pero en general la enfermedad no se manifiesta clínicamente (Bishop, R.F. et al. 1983). No obstante, en un estudio efectuado en Inglaterra se describe una infección por rotavirus en neonatos con severos síntomas gastroenteríticos (Dearlove et al. 1983). Los adultos pueden infectarse, y la infección puede manifestarse clínicamente. Se han descrito síntomas severos en pacientes geriátricos y en jóvenes adultos aparentemente normales (Cukor et al. 1984). En China, se han descrito dos brotes severos de diarreas en adultos provocados por un rotavirus atípico (Tao et al. 1984).

Los niveles de mortalidad dependen exclusivamente de la rapidez con que se realice el tratamiento adecuado. La mortalidad por diarreas en niños es alta en los países subdesarrollados. Aproximadamente mueren el 5% de los que enferman (Estes et al. 1983).

La mayoría de los estudios realizados por períodos anuales han mostrado una marcada variación estacional, con aislamientos de hasta un 90% en los meses fríos y una disminución de hasta un 20% en los meses cálidos (Birch et al. 1977, Konno et al. 1977). Aún no se ha podido explicar totalmente de que manera las variaciones estacionales afectan la infección por rotavirus (Cukor et al. 1984).

La viabilidad de los rotavirus en las poblaciones no sólo se mantiene mediante su continuo pasar de individuo a individuo, sino que también tiene la propiedad de ser muy resistente en el medio ambiente, siendo estable a la acción

de varios desinfectantes, como lisol, hipoclorito de sodio y formol. Puede mantener su infectividad durante aproximadamente un año en lugares contaminados. (Kurstak et al. 1981).

2.8.2 Epidemiología de los rotavirus bovinos.

La diarrea neonatal del ternero es un síndrome de etiología compleja. Han sido descriptos numerosos patógenos asociados a la enfermedad (Bulgin et al. 1982, Moon et al. 1978, Woode 1982). Existen sólo unas pocas comunicaciones de estudios epidemiológicos efectuados sobre la incidencia de rotavirus bovinos. Estos estudios, pertenecen a países desarrollados (Sndograss et al. 1982 (B)). No se han efectuado aún estudios epidemiológicos de la infección por rotavirus en países en desarrollo, a pesar de que en muchos de ellos las explotaciones ganaderas son de mucha importancia económica, como es el caso de algunos países de Latinoamérica, entre ellos la Argentina.

En todos los lugares donde se han efectuado relevamientos de agentes etiológicos de diarreas en animales jóvenes, aparecen los rotavirus entre los más importantes (Woode and Bridger, 1975, Mebus 1977, de Leeuw et al. 1980(B), Mc Nulty 1980).

En Gran Bretaña e Irlanda del Norte, se aisló rotavirus en el 80% de los brotes de diarrea y en el 66% de las muestras de MF (Woode 1978).

Snodgrass et al. [1982(B)] realizaron un relevamiento de agentes enteropatógenos en terneros de Escocia y Norte de Inglaterra, encontrando rotavirus en el 53% de los terneros con diarrea.

En un relevamiento efectuado en establecimientos lecheros de Holanda se encontró rotavirus en todos los establecimientos y en el 54% de los terneros estudiados (Moerman et al. 1982). En Bélgica son responsables de más del 30% de los casos de diarreas que se presentan (Dagenais et al. 1980).

En Argentina sólo existen unas pocas comunicaciones de hallazgos de rotavirus en bovinos (Odeon 1980, Zoratti de Verona et al. 1980).

La forma en que aparece el problema varía, según el sistema de manejo al que estén sometidos los terneros. En terneros criados artificialmente el brote aparece en forma explosiva y la enfermedad ataca a los terneros que tienen entre 3 y 14 días de vida y que están en contacto entre sí. Cuando los terneros se encuentran en rodeos a campo, el brote ocurre usualmente cuando el grupo de terneros de más edad posee de 4 a 6 semanas de vida. La mayoría de los terneros aparecen con diarrea dentro de la semana en que se inició la enfermedad en el rodeo y los terneros recién nacidos que enferman pueden morir (Woode 1978). La morbilidad puede alcanzar 80-90% o más. Este índice puede estar influido por el poder patogénico del virus, y el estado general del rodeo. Los problemas son mayores cuando los

terneros no tienen una buena provisión de anticuerpos maternos en el calostro y la leche. Es por eso que los terneros de vaquillonas suelen ser más susceptibles, ya que en la primera parición la cantidad y calidad del calostro y de la leche no son óptimas. (Woode 1978, Mc Nulty 1980). Mantener poblaciones numerosas de terneros numerosas en forma hacinada, aumenta la probabilidad de contagio, además de producir stress en los animales y alterar la respuesta inmunológica. Los factores climáticos tales como frío, lluvia y viento también actúan aumentando la susceptibilidad de los terneros a sufrir infecciones entéricas por virus (Acres and Radostitis 1980).

La mortalidad es muy variable, oscilando entre el 1% y el 30% (Flewett and Woode 1978).

Es frecuente encontrar infecciones subclínicas (Woode and Bridger 1975, Kurstak et al. 1981). Las causas de estas pueden ser: baja dosis de virus infectivo, presencia de anticuerpos provenientes de la madre en la luz intestinal y por último, infecciones con cepas de rotavirus con menor poder patógeno (Dea et al. 1985).

Respecto a la forma en que los rotavirus se mantienen en las poblaciones bovinas, se discuten dos aspectos. Por un lado está demostrado que son altamente resistentes en el medio ambiente y mantienen su poder infectivo durante largos periodos (Woode 1978, Kurstak et al. 1981), pero por otro lado algunos autores tratan de darle mayor importancia al rol que juegan los bovinos adultos infectados (Woode and

Bridger 1975, Woode 1978). Este aspecto es desechado por Dagenais et al. (1980) quienes no encuentran que los bovinos adultos posean infecciones de importancia por rotavirus y de esta manera transmitan el virus a los terneros.

Un dato epidemiológico importante es que en los rodeos que sufren brotes de diarrea, generalmente aparecen problemas respiratorios posteriormente (Mc Nulty 1980).

2.8.2.1 Variantes serotípicas de los rotavirus bovinos.

No existen muchos estudios importantes sobre las variantes serotípicas en los rotavirus bovinos, pero investigaciones efectuadas en Japón (Murakami et al. 1983), Estados Unidos (Woode et al. 1983), y en el Reino Unido (Ojeh et al. 1984), han arrojado datos similares.

En todos estos lugares se halló un serotipo predominante, que corresponde al serotipo de la cepa Lincoln (NCDV) de EEUUA., serotipo que Woode et al. (1983) denominan serotipo bovino 1 y Estes et al. (1985) serotipo No. 6. De las cepas serotificadas en diferentes lugares el 90% han pertenecido al serotipo bovino 1, existirían 2 o mas serotipos en el porcentaje restante. Estos serotipos hallados con mucho menor frecuencia no han sido aún comparados con los de otros países, para poder comprobar si hay similitud como ocurre con el serotipo bovino 1.

2.8.3 Epidemiología de los rotavirus porcinos.

Existen numerosos casos de infección de rotavirus asociada a diarreas en lechones (Mc Nulty et al. 1976(B), Bohl et al. 1978, Utrera et al. 1984). No obstante son pocos los estudios epidemiológicos efectuados (Utrera et al. 1984, Ferrari, M. and Gualandi, G.L. 1986).

Utrera et al. (1984) realizaron un estudio epidemiológico en un país tropical (Venezuela), encontrando que la frecuencia de infecciones a rotavirus disminuyó durante la estación lluviosa. El porcentaje de establecimientos infectados con rotavirus fue alto, 82%. En lechones con diarrea de hasta 6 semanas de vida, el porcentaje de infección por rotavirus detectado fue del 21,3%, siendo los más susceptibles los animales de 3-4 semanas de vida. En lechones destetados de 6 a 7 semanas de vida que presentaban diarrea, se encontró rotavirus en el 10,7% de los casos.

En cerdos, se han descrito infecciones por rotavirus atípicos pertenecientes a los grupos B y C [Saif et al. 1980, Bridger et al. 1982, Chasey and Davis 1984, Theil et al. 1985(A)]. Bohl et al. (1982) describen la patogénesis de uno de éstos virus, la cual es similar a la descrita para los rotavirus grupo A.

Chasey and Davies (1984) encuentran en un relevamiento realizado en Inglaterra y Gales que los rotavirus atípicos representan el 5% de las infecciones por rotavirus en lechones.

2.8.3.1 Variaciones serotípicas de los rotavirus porcinos.

Bohl et al. (1984) describen dos serotipos, denominando a uno serotipo porcino 1, cuya cepa prototipo es la Ohio State University (OSU). Este serotipo es denominado serotipo 5 por Estes et al. (1985) y está relacionado con el serotipo de la cepa equina H-1. El otro serotipo es el denominado serotipo 2 porcino cuya cepa prototipo es la Gottfried (G); Estes et al. (1985) la clasifican como perteneciente al serotipo No. 4 junto a las cepas humanas St Thomas, Hochi y Hosokawa.

Dea et al. [1986(B)] encontraron en Canadá un rotavirus pertenecientes al serotipo 1 y además describieron otros dos serotipos.

No existen hasta el momento, estudios de serotipos de rotavirus porcinos con un número significativo de cepas que permitan sacar mejores conclusiones respecto a la variabilidad antigénica que presentan.

2.9 Prevención, control y tratamiento de las diarreas a rotavirus.

2.9.1 Prevención y Control.

Acres and Radostits (1980), describen 5 principios aplicables a la prevención de brotes de diarrea en terneros. Los mismos son útiles para tener en cuenta en todas las especies afectadas por los rotavirus.

Estos principios son:

- 1) Eliminar la fuente de infección del medio ambiente.
- 2) Eliminar el individuo susceptible del medio contaminado.
- 3 Aumentar la resistencia no-específica del individuo susceptible.
- 4) Aumentar la inmunidad específica del individuo susceptible.
- 5) Reducir el stress.

1) Es imposible poder eliminar a los agentes causantes de diarrea del medio ambiente. Los rotavirus son sumamente resistentes en el medio ambiente, y se eliminan en altísimas concentraciones en la MF de los individuos afectados (10^{11} partículas/g MF). Se deben tomar todas las medidas de higiene posibles y emplear sustancias desinfectantes potentes como por ejemplo formol 10%. Por otro lado, también hay que tener en cuenta que siempre hay en las poblaciones individuos portadores que mantienen latente la posibilidad de producir brotes de diarrea. Las personas que tratan animales diarreicos deben ser muy cuidadosas, ya que muchas veces ellos se pueden transformar en fuente de infección.

2) Se debe evitar que los grupos de animales susceptibles permanezcan en áreas contaminadas, tratando de cambiarlos de lugar. Se deben evitar los ambientes muy húmedos donde el agua puede actuar como vehículo de la infección.

En la cría de bovinos, no es aconsejable mantener vacas y vaquillonas juntas en épocas de parición. Se deben extremar los cuidados en los lotes de vaquillonas, porque éstas tienden a presentar mayores problemas en la crianza de

sus terneros. Esto es válido también para cerdas madres primerizas.

Se debe evitar criar animales susceptibles en lugares donde hay antecedentes de diarrea y evitar mantener juntos grandes grupos de animales.

3) Terneros y lechones adquieren cierta resistencia inespecífica a través de la ingesta de calostro (exceptuadas las inmunoglobulinas calostrales). Es necesario que el ternero ingiera unos 50 ml de calostro/Kg de peso en sus primeras 12 horas de vida, y eso depende de la cantidad de calostro que produzca su madre.

4) La inmunidad específica del individuo susceptible se logra aumentar mediante la utilización de vacunas, las cuales pueden utilizarse para obtener inmunidad pasiva vacunando a la madre (protección a través de inmunoglobulinas calostrales), o activa por inmunización del huésped susceptible.

2.9.1.1 Vacunas en humanos.

En éste área ultimamente se ha desarrollado una actividad notable. Se están ensayando vacunas para utilizar en niños con cepas atenuadas logradas a través de la combinación de cepas bovinas con humanas (Midthum et al. 1985). Otros grupos están trabajando con cepas bovinas que serían atenuadas para humanos (Delem et al. 1984). También hay quienes están estudiando rotavirus de origen simio para

utilizarlos como vacuna atenuada en niños (Kapikian et al. 1985).

2.9.1.2 Vacunación en bovinos.

La primera vacuna utilizada para inmunizar terneros fue la desarrollada por Laboratorios Norden (Scourvax II); la misma está constituida por una cepa de rotavirus bovino atenuada. En un principio se mostró que esta vacuna reducía la incidencia de diarreas (Mebus et al. 1972, Twiehaus et al. 1975), pero posteriormente en pruebas de campo no dio resultado [Newman et al. 1973, de Leeuw et al. 1980(A)]. Las objeciones para el uso de esta vacuna son que existe la posibilidad que la cepa atenuada pueda revertir la virulencia y además que la barrera calostrual impida la replicación del virus vacunal en los terneros vacunados (Crouch et al. 1985). Un segundo intento se efectuó vacunando a las madres con esta cepa atenuada (Calf Guard, Laboratorio Norden) esta vacuna tampoco dio resultado (Crouch et al. 1985).

La finalidad que se persigue al vacunar a la madre es aumentar el título de anticuerpos neutralizantes en calostro y leche, para que el ternero tenga durante el período de susceptibilidad, suficiente cantidad de anticuerpos en la luz intestinal. Se ha demostrado que para evitar la infección por rotavirus son fundamentales los anticuerpos presentes en el lumen intestinal, y no los anticuerpos séricos (Kurstak et al. 1981, Crouch et al. 1985). Se eligió la inmunización materna, como vía más apropiada para seguir probando inmunógenos, y mediante la utilización de

adyuvantes se logró obtener buen nivel de anticuerpos en calostro y leche (Crouch 1985).

Es así como desde los primeros experimentos efectuados con vacunas adyuvadas e inactivadas con formol, se obtuvieron casi siempre resultados alentadores (Wells et al. 1978, Crouch 1985).

Crouch (1985), cita en una revisión que los adyuvantes que mejores resultados dan, son los oleosos.

Recientemente, laboratorios Coopers de Inglaterra han desarrollado y patentado una vacuna contra rotavirus y E. coli K99 (Rotavac-K99) (Animal Pharm July 4th, 1986).

La misma es indicada para ser utilizada como inmunógeno materno. En general la mayoría de los ensayos que demuestran desarrollo de inmunidad materna, se basan en sistemas de vacunación, en dos tiempos, 60 y 30 días preparto, para que de esa manera el ternero esté protegido durante el período de mayor susceptibilidad (Crouch, 1985).

En sistemas de crianza artificial de terneros, también se efectuaron algunas investigaciones [Snodgrass et al. 1972(A)]. Saif et al. (1983), sugieren que suplementando calostro de vacas previamente inmunizadas en forma intramamaria, en el 1% de la alimentación diaria se puede proteger a los terneros de la infección clínica por rotavirus.

En nuestro país no existen aún vacunas disponibles, por lo tanto la prevención debe basarse sólo en el correcto manejo de los animales.

2.9.1.3 Vacunas en cerdos.

Existen ensayos de vacunaciones en cerdo efectuadas con otros virus entéricos diferentes de los rotavirus (Bohol et al. 1972, Saif and Bohol 1979). En esta especie, es aparentemente más difícil lograr buenos resultados con vacunaciones parenterales, ya que a diferencia de lo que ocurre en bovinos las IgG no juegan un rol importante en calostro y leche. En cerdos la IgA sería la más importante y como es sabido ésta se segrega localmente (Saif and Bohol 1979).

Es probable que para esta especie haya que pensar en vacunaciones combinadas (oral/parenteral), tal como se propone para el caso de las colibacilosis (Chidlow and Porter 1979).

2.9.2 Tratamiento.

Como el síndrome diarreico es comunmente de etiología compleja, no es práctico definir un tratamiento contra un agente etiológico definido. Bywater (1982) describe en un diagrama, las causas de la diarrea y su tratamiento (figura 1).

En nuestro medio, lo que más comunmente se emplea son los antibióticos y, en algunas oportunidades, se efectúa la rehidratación del animal, ya sea por vía parenteral o vía oral.

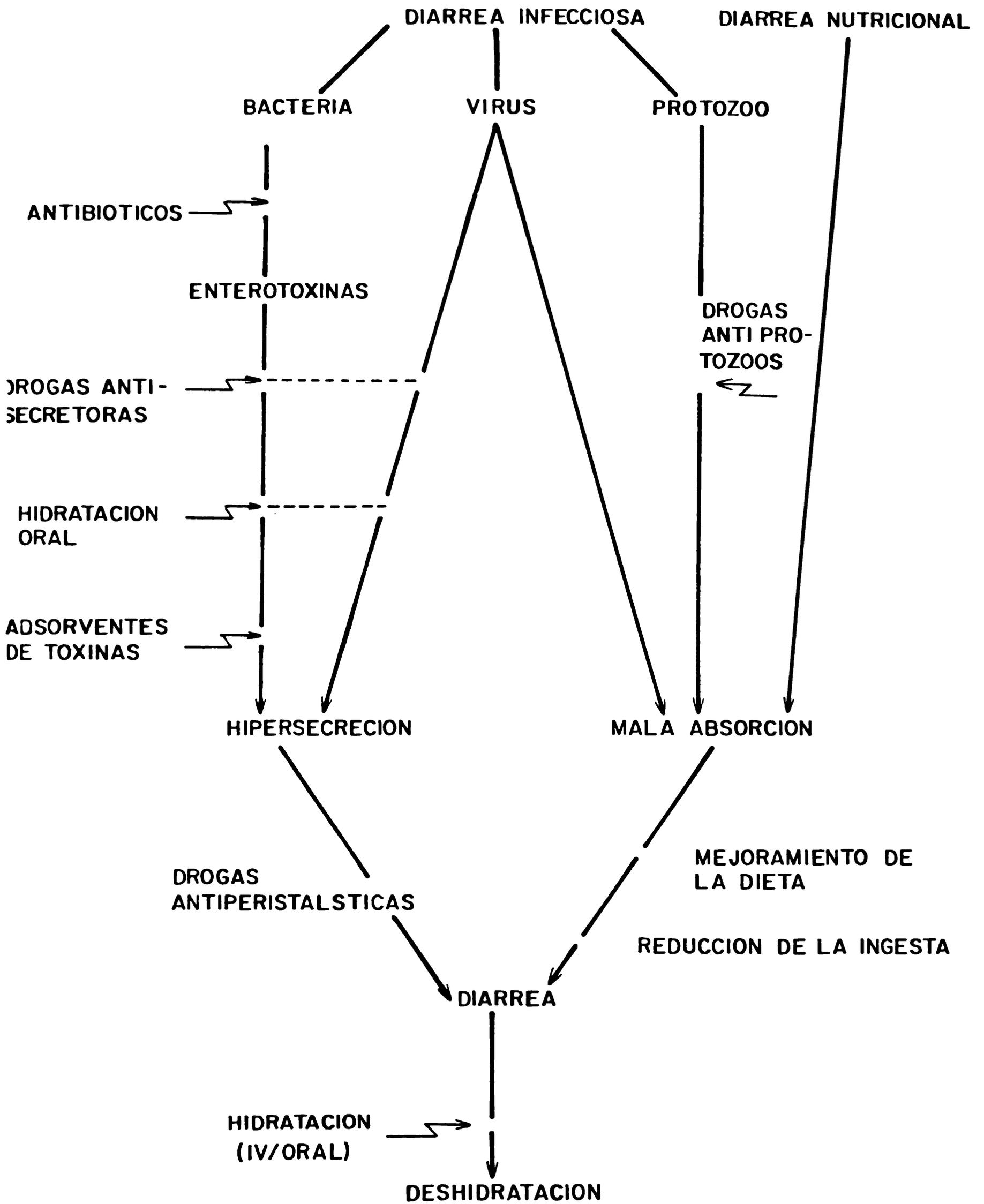


FIGURA I

Causas de diarrea y su tratamiento (Bywater 1982).

2.10 Modelos experimentales para el estudio de los rotavirus.

Existen una serie de aspectos a estudiar en los rotavirus que requieren de modelos experimentales adecuados.

La cinética de la replicación vírica, su relación con la respuesta inmune, desarrollo y resolución de la enfermedad, fueron estudiados por Eydelloth et al. (1984) en un modelo murino.

Offit et al. (1984) propusieron al ratón para estudiar infecciones con cepas heterólogas debido a que los trabajos con bovinos y porcinos gnotobióticos son complejos y costosos. Además estos mismos autores sugirieron que los anticuerpos contra rotavirus murino no afectan de ninguna manera el poder infectivo de rotavirus provenientes de otras especies. (Offit et al. 1983). Offit and Clark (1985), demostraron que en ratones, los anticuerpos gastrointestinales adquiridos pasivamente protegían de la infección.

Kalter et al. (1983) propusieron al mandril, como modelo para trabajar con rotavirus humanos.

CAPITULO 3

3. Materiales y métodos.

3.1 Obtención de muestras.

3.1.1 Bovinos de Argentina.

Las muestras de materia fecal fueron tomadas del recto de 217 terneros de 3 a 40 días de edad, con o sin diarrea, durante la época de parición (julio a octubre de 1984 y 1985). El número de muestras obtenidas de cada establecimiento varió de 2 a 22. También se obtuvo materia fecal de 35 vacas que no presentaban síntomas de diarrea, las cuales estaban en rodeos en los que se habían producido brotes de diarrea en terneros.

Se tomaron muestras en 18 establecimientos de cría y en un tambo ubicados en la provincia de Buenos Aires (partidos de Las Flores, Pila, Rauch, Ayacucho, Balcarce, Azul, Tandil, B. Juárez, Cnel. Suárez y Puán).

3.1.2 Cerdos de Argentina.

Se obtuvo materia fecal proveniente de recto en 85 lechones de 1 a 30 días de vida con y sin diarrea. Estos animales pertenecían a dos criaderos de cerdos, uno ubicado en Benito Juárez y otro en Tandil, provincia de Buenos Aires. Ambas explotaciones eran de carácter intensivo. La primera

estaba constituida por 60 madres y la segunda por 160. Las mismas presentaban periódicamente brotes de diarrea.

El establecimiento de Benito Juárez fue estudiado en Septiembre, Octubre, Noviembre y Diciembre de 1985 y en Julio de 1986. En Tandil se tomaron muestras dos veces con un espacio de 15 días durante Julio de 1986.

3.1.3 Cerdos de Brasil.

Se colectaron 502 muestras fecales de lechones con y sin diarrea, de 1 a 56 días de vida, de 19 establecimientos ubicados en 8 municipios del estado de San Pablo (Pirassununga, Leme, Jundai, Vinhedo, Tiete, Braganca Paulista, y Sao José dos Campos). Los sistemas de producción que poseen estos establecimientos son de tipo intensivo. Esas muestras fueron obtenidas en Enero de 1985 y, durante Agosto de 1985, se obtuvieron 68 muestras de tres establecimientos, en los cuales se habian aislado rotavirus atípicos en Enero.

3.1.4 Humanos de Argentina.

Se recogieron 22 muestras de materia fecal de niños con diarrea de 6 a 24 meses de edad, pertenecientes a los partidos de Tandil y Lobería, provincia de Buenos Aires, y a Resistencia, provincia del Chaco.

3.1.5 Aves de Argentina.

Se obtuvieron 36 muestras de contenido intestinal de pollitas de 7 a 10 días de vida en un criadero de pollas poderosas ubicado en Marcos Paz, provincia de Buenos Aires. Se registraba un índice de diarrea del 15% en la población en el momento del muestreo.

3.2 Conservación de las muestras.

Todas las muestras fueron transportadas en conservadoras refrigeradas y posteriormente almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

3.3 Detección de rotavirus en materia fecal.

La detección de rotavirus se efectuó mediante técnicas de enzimoinmunoensayo (ELISA), electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y microscopía electrónica (ME).

3.3.1 Prueba de ELISA.

Se empleó la prueba de ELISA indirecta y en la misma se usaron dos fuentes de reactivos.

Por un lado se efectuaron pruebas de diagnóstico con reactivos cedidos gentilmente por el Dr. H.G. Pereyra, del Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, empleando los muestreos indicadosa metodología por él (Pereyra et al. 1985). Por otra parte se obtuvieron inmunosueros en nuestro laboratorio con el objeto de utilizar reactivos propios.

3.3.1.1 Preparación de sueros hiperinmunes.

Para la obtención de sueros hiperinmunes se inyectó antígeno purificado.

3.3.1.1.1 Obtención de antígeno viral purificado.

Se partió de 50 g. de materia fecal de terneros infectados con rotavirus grupo A. Se resuspendió al 20% en una solución tampón TNMC (Tris-ClH 10mM, ph8,2, ClNa 150mM, Cl₂Mg 1 mM y Cl₂Ca 10 mM) (Espejo et al. 1984). La suspensión resultante se homogeneizó y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se mezcló con un volumen igual de cloroformo y luego se agitó a 4°C hasta obtener una emulsión (aproximadamente 15 minutos). La fase clorofórmica se separó por centrifugado a 4000 rpm 15 minutos a 4°C. La fase acuosa resultante se sembró sobre un colchón de 1 ml de sacarosa 45% y se centrifugó a 45000 rpm 2 horas y 30 minutos en rotor 50 ti (Beckmann) a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 0,5 ml de solución TNMC y se sembró sobre un gradiente de ClCs de densidad 1,32 a 1,40 g/ml, el cual se centrifugó durante 18 horas a 45000 rpm en rotor SW 50 (Beckmann). Se colectaron los gradientes y cada fracción fue leída en espectrofotómetro a 260 nm para cuantificar el material purificado. El ClCs se eliminó por diálisis y el material resultante se conservó a -20°C.

3.3.1.1.2 Hiperinmunización de cobayos y cabras.

Los animales fueron inoculados con emulsión compuesta por partes iguales de antígeno y adyuvante de Freund in-

completo . Cada dosis total fue de 10 ug de virus purificado. La inyección fue IM y se repitió 3 veces con un espacio de 7 días cada una, luego de 7 días de la última inyección, se sangraron los animales por punción cardíaca.

Para cabras, se empleó la misma técnica, pero empleando 100 ug de virus purificado por cada inoculación. En este caso los animales fueron sangrados mediante punción venosa.

3.3.1.1.3 Desarrollo de la prueba de ELISA.

La prueba de ELISA se realizó siguiendo la técnica descrita por Pereyra et al. (1985). Se utilizaron microplacas de 96 pocillos marca "NUNC" catálogo N° 167008, y los principales reactivos empleados fueron los siguientes:

Suero de captura: suero hiperinmune de Cabra anti rotavirus dilución 1/10000.

Suero detector: suero hiperinmune de cobayo anti rotavirus dilución 1/5000.

Conjugado** : anti gamma globulina de cobayo obtenida en conejo (Sigma Catálogo N° A7289).

Sustrato: ortofenilendiamina (Sigma Cat. P1526).

Las lecturas se efectuaron en un lector Labsystem Inc. Chemetron, Argentina. La Figura 2 muestra una microplaca de 96 pocillos en la que se efectuó la reacción de ELISA aquí descripta.

3.3.2 Electroforesis del ARN viral en geles de poliacrilamida (PAGE).

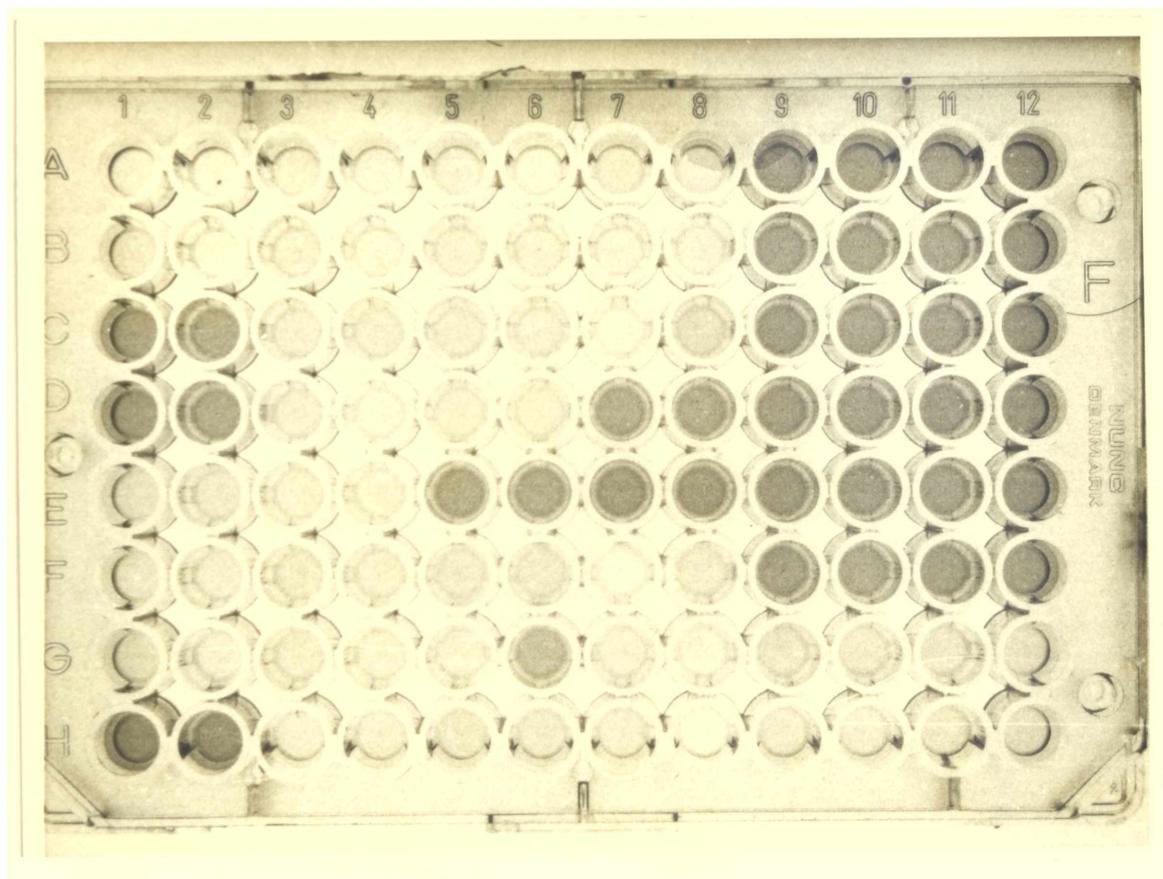


Figura 2: Reacción de enzima inmunoensayo (ELISA) utilizada para detectar la presencia de rotavirus en muestra de materia fecal. Los pocillos oscuros indican la reacción positiva.

Suspensiones de materia fecal diluídas aproximadamente al 10 ó 20% en buffer Tris-ClH 0,010 M, pH 7,5 fueron clarificadas por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos. El sobrenadante de cada muestra se almacenó en alícuotas de 5 ml a $-20\frac{1}{2}$ C.

Para purificar el ARN se tomaron 100 ul de cada clarificado y se les agregó un volumen idéntico de una solución de "extracción" compuesta por ClLi 1M; ácido etilen diamino-tetracético (EDTA) 0,02 M y dodecil sulfato de sodio (SDS) 2%. La mezcla de extracción se incubó 10 minutos a 50°C y luego se agregaron 400 ul de una mezcla de partes iguales de fenol-cloroformo; la suspensión se agitó fuertemente, e incubó a 50°C durante 10 minutos. Al fin de la incubación se separó la fase clorofórmica centrifugando 15 minutos a 5000 g. A la fase acuosa se le adicionaron dos volúmenes y medio de alcohol etílico absoluto. La muestra fue almacenada durante toda la noche a -20°C . Para obtener el precipitado de ARN se centrifugó a 5000 g, 15 minutos, se descartó el alcohol y el precipitado se secó a 37°C durante 30 minutos. Para efectuar la siembra del ARN, el mismo se resuspendió en 10 ul de buffer de muestra de Laemmli(1970). El ARN fue sembrado sobre un gel de poliacrilamida al 10% el cual se hizo de acuerdo con la Técnica de Laemmli (1970).

La electroforesis se efectuó durante 16 horas a 15 miliampers (mA) (constantes) y la visualización del ARN se llevó a cabo siguiendo el método de tinción con plata de Herring et al (1982).

3.3.2.1 Determinación de la sensibilidad del PAGE.

Se extrajo ARN de una muestra de materia fecal que contenía rotavirus siguiendo la técnica ya descrita. Al ARN extraído se le realizó una purificación adicional por cromatografía en una columna de celulosa (Whatman CF11).

La masa de ARN se determinó por densidad óptica a 260 nm, y se prepararon alícuotas conteniendo diferentes cantidades de ARN viral; las muestras conteniendo las diferentes diluciones de ARN se sembraron en un gel de poliacrilamida al 10%. La corrida electroforética se efectuó según las condiciones descritas más arriba y el ARN se detectó tiñendo el gel con nitrato de plata según Herring et al. (1982).

3.3.3 Microscopía electrónica (ME).

La técnica empleada para observar viriones purificados o clarificados de materia fecal fue la indicada por Muchnik et al. (1981), empleándose como contraste acetato uranilo al 1%. Para la observación de virus en cortes de vellosidades intestinales, se utilizó la técnica de Petrie et al. (1981). El microscopio utilizado fue un JEOL Mod. JEM 100 C.

3.4 Cultivos celulares.

La propagación de la diferentes cepas de rotavirus, como así también las pruebas de inmunoperoxidasa (IPA), titulación de la infectividad y ensayos de neutralización, se efectuaron sobre cultivos de una línea estable de células de

riñón fetal de mono rhesus, denominada MA104. Las mismas fueron multiplicadas en medio mínimo de EAGLE (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Para propagar virus se prepararon monocapas en botellas de vidrio tipo roler conteniendo aproximadamente 10^6 células por botella; para la prueba de IPA, titulación y neutralización se usaron microplacas de plástico (NUNC) de 96 pocillos conteniendo 3×10^5 células por pocillo.

3.4.1 Prueba de inmunoperoxidasa para medir infectividad de inóculos provenientes directamente de materia fecal.

Se realizó esta prueba con la finalidad de seleccionar las muestras con las que se intentarían las adaptaciones a cultivo celular.

3.4.1.1 Preparación del inóculo a partir de la materia fecal.

Se suspendió materia fecal al 10-20% en medio MEM, regulando el pH con bicarbonato y agregando a las mismas 0,5 u de penicilina y 0,5 ug de estreptomycinina por cada 2 ml de suspensión. La muestra se clarificó dos veces a 3500 g durante 20 minutos. El último clarificado se recogió en forma estéril quedando listo para el intento de infección.

3.4.1.2 Infección en microplacas.

El inóculo fue tratado con 20ug/ml de tripsina a 37°C durante 30 minutos. Luego se inoculó una microplaca de 96

pocillos en la que habían sido multiplicadas células MA104. Cada muestra fue sembrada por cuadruplicado y cada pocillo recibió 100ul de inóculo. La muestra se absorbió 1 hora a 37°C. Luego se lavó la placa 2 veces con MEM para agregar en cada pocillo 200 ul MEM con suero fetal bovino con 2 ïg/ml de tripsina más 0,2U de penicilina con 0,2 ugr de estreptomina por ml. La placa se incubó durante 20 hs a 37°C.

3.4.1.3 Detección de antígeno viral en monocapa através de la reacción de inmunoperoxidasa.

A las 20 hs post-infección se descartó el medio de mantenimiento y se fijó la monocapa con acetona al 80%.

La prueba de IPA se realizó según Gerna et al. (1984), Empleando un suero hiperinmune anti-rotavirus obtenido en cobayo, diluido 1/100; un conjugado comercial (Sigma) compuesto por suero de conejo anti-gamma globulina de cobayo marcado con peroxidasa diluido 1/400 y como substrato diaminobencidina Sigma 1 mg/ml con 0,7 ul de agua oxigenada 30 volúmenes. Las células infectadas fueron detectadas por visualización al microscopio electrónico considerando a cada una de ellas como una unidad IPA positiva.

3.4.1.4 Propagación de las distintas cepas aisladas.

Para intentar la adaptación a cultivos celulares se eligieron aquellas muestras que mostraron más de 5 unidades IPA positivas por campo 100x.

Se partió del mismo inóculo preparado para la prueba de IPA; el mismo se diluyó 1/10 en MEM (100 ul de inóculo más

900 ul de MEM), e incubó durante 30 minutos a 37°C con 20 ug/ml de tripsina. La muestra se sembró luego en una botella tipo roler con células MA-104, previamente lavados con MEM sin suero fetal. El inóculo se adsorbió 1 hora a 37°C, la monocapa se lavó con MEM y se agregó como medio de mantenimiento MEM con buffer HEPES 40mM, pH 7,6, 2 ug/ml de tripsina, 0,2 U/ml de penicilina y 0,2 ug/ml de estreptomicina.

Los cultivos se incubaron a 37°C hasta la observación de efecto citopático (ECP) o hasta las 72 hs post-infección si no aparecían alteraciones en la monocapa. Luego los cultivos fueron conservados a -20°C y para sucesivos pasajes fueron congelados y descongelados 3 veces para luego sembrar 1 ml del mismo, procediendo de idéntica manera que con el inóculo inicial.

La presencia de virus en cada pasaje se determinó por la prueba de PAGE.

3.4.1.5 Titulación de las cepas de rotavirus adaptadas a cultivos celulares.

Se efectuaron diluciones progresivas del inóculo de 10 en 10, partiendo de 10^{-1} hasta llegar a 10^{-7} . Cada dilución fue tratada con 20 ug/ml de tripsina durante 30 minutos a 37°C y luego se sembraron 100 ul de cada dilución por cuadruplicado en microplacas de 96 pocillos con células MA-104. Las monocapas se incubaron con las diferentes diluciones durante 1 hora a 37°C, al final de la incubación las monocapas

se lavaron con MEM y se agregó a las mismas el mismo medio de mantenimiento.

Las placas se incubaron a 37°C durante 5-7 días en una atmósfera de CO₂ 5% y 95% de humedad relativa. Una vez finalizada la incubación se descartó el medio de mantenimiento y las monocapas se fijaron y colorearon durante 15 minutos con una solución compuesta por 1% de cristal violeta, 5% de formol y 10% de alcohol. La dilución más alta que dió ECP en el 50% de los pocillos infectados se estableció como la dosis infectiva 50% (DICC 50%).

3.4.1.6 Titulación de cepas que no producían efecto citopático

Aquellas cepas que no produjeron efecto citopático fueron sembradas siguiendo una técnica idéntica a la descrita en la titulación de cepas adaptadas, pero fijando las placas a las 20 hs post-infección con acetona al 80%. La presencia de células infectadas se determinó mediante la prueba de IPA (Gerna et al. 1984).

El título se determinó empleando el mismo cálculo que para las cepas productoras de efecto citopático tomando en este caso como positivos a los pocillos que por lo menos mostraban una célula IPA positiva.

3.5. Virus: (cepas patrones utilizadas en diferentes experimentos).

Las cepas Nebraska calf diarrhea (NCDV serotipo 1 bovino y prototipo del género) y la cepa B223 (serotipo 2 bovino de EEUU.) fueron gentilmente cedidas por el Dr. G. Woode de Iowa State University, EEUU. Las cepas UK (serotipo 1 bovino aislado en Inglaterra) y la B678 (serotipo 2 bovino de Inglaterra) fueron gentilmente cedidas por el Dr. D. Snodgrass del Moredun Institute, Escocia.

La cepa porcina Ohio State University (OSU, serotipo 1 porcino) fue gentilmente donado por el Dr. K. Theil del Ohio State University U.S.A. y la cepa SA11 Simia por el Dr. H. Pereyra del Instituto Oswaldo Cruz de Brasil. Estos virus fueron cultivados siguiendo la técnica de acuerdo a Sato K. et al. (1981).

3.6 Obtención de sueros hiperinmunes contra los serotipos 1 y 2 de rotavirus bovinos.

A partir de 100 ml de medio de cultivo proveniente de infecciones realizadas con las cepas UK y B223 se purificó antígeno viral, siguiendo la misma técnica que en la purificación de viriones a partir de materia fecal. Se obtuvieron aproximadamente 100 ug de antígeno de cada uno de los virus referidos.

El método de inmunización fue el mismo que el descrito en 3.3.1.1.2.

Los dos sueros hiperinmunes obtenidos alcanzaron un título neutralizante contra la cepa homóloga de 1/10000 para

la cepa UK y 1/3000 para la cepa B223. Los títulos cruzados entre ellos fueron inferiores a 1/100 para cada uno.

También se dispuso para las pruebas de serotipificación, de un suero hiperinmune contra la cepa UK, gentilmente cedida por el Dr. Snodgrass del Moredun Institute, Escocia. El título del mismo fue 1/20000 contra la cepa homóloga y menor a 1/100 contra la cepa B223 serotipo 2 de EEUU. y la cepa B678 serotipo 2 de Inglaterra.

3.7 Prueba de neutralización viral para determinar serotipos.

Se emplearon en esta prueba monocapas de células MA-104 multiplicadas en microplacas de 96 pocillos (NUNC No. catálogo 167008).

Cada cepa fue incubada durante 30 minutos con 20 ugr/ml de tripsina a 37°C.

Igual volumen de la suspensión viral y cada una de las diluciones de los sueros hiperinmunes antiserotipo 1 (cepa UK) y antiserotipo 2 de U.S.A. (cepa B223), fueron mezcladas e incubadas a 37°C durante 2 horas. Las diluciones de los sueros fueron 1/40, 1/100, 1/200, 1/1000, 1/10000, 1/20000, 1/40000, y 1/100000. Después de la incubación 100 μ l de mezcla de las distintas diluciones se sembraron por cuadruplicado. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C y las monocapas se lavaron con MEM, para finalmente agregar medio de mantenimiento sin suero fetal. Las placas se mantuvieron a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa

durante 5-7 días, luego fueron fijadas y coloreadas tal como se detalló en 3.4.1.5.

El título de cada cepa se expresó como la inversa de la dilución máxima del suero en la que por lo menos 2 de los 4 pocillos mostraban inhibición del efecto citopático.

Para clasificar los serotipos se compararon los títulos neutralizantes que mostraron las diferentes cepas contra el suero hiperinmune anti rotavirus cepa UK (serotipo 1 bovino) y contra el suero anti B223 (serotipo 2 bovino de U.S.A.). Se tomó como parámetro, diferencias de 20 veces o más en los títulos para considerar a una cepa, un serotipo diferente (Woode et al. 1983).

3.8 Clonado de cepas de rotavirus porcinos.

3.8.1 Clonado de cepas del grupo A con electroferotipos atípicos.

Para determinar si estas cepas poseían por sí mismas capacidad infectiva "in vitro" en cultivos celulares e "in vivo" en animales, se purificaron clonándolos 3 veces por el método de dilución terminal (Woode et al. 1983).

Debido al hecho que, a altas diluciones no producían efecto citopático visible, se realizó una modificación al método descrito originalmente por Woode et al. que consistió en determinar por el método de IPA las diluciones máximas que contenían viriones infectivos (dilución terminal).

3.8.2. Clonado de cepas del grupo A con electroferotipos normales.

Dos cepas adaptadas a cultivo celular que poseían electroferotipo normal fueron clonadas 3 veces mediante pasajes por dilución terminal, detectando la replicación viral mediante la observación del ECP. Este procedimiento se realizó con el pasaje número cinco de las cepas mencionadas y también resultó útil para medir los títulos infectivos correspondientes.

3.9 Perfil elctroforético de proteínas de viriones purificados de materia fecal.

Se utilizaron 20 ug de viriones purificados en gradientes de ClCs los que fueron tratados a 100°C durante 5 minutos con cuatro volúmenes de buffer de Laemmly (Laemmly 1970). Posteriormente las muestras fueron sembradas en un gel de poliacrilamida 12,5% y corridas a 20 mA durante 6 horas. Las proteínas virales fueron visualizadas por tinción con Coomasie Brilliant Blue R250, en 50% de metanol, 10% de ácido acético y posterior decoloración con ácido acético-metanol-agua (10-10-80).

3.10 Perfil electroforético de proteínas marcadas con Metionina S³⁵ en cultivos celulares.

Las cepas elegidas para esta prueba se inocularon en células MA-104 en microplacas de 24 pocillos. A las seis horas post infección se retiró el medio de cultivo y se agregó a

cada pocillo un volumen igual del mismo medio, sin metionina y conteniendo 100 uCi/ml de metionina S^{35} (aproximadamente 100.000 cuentas por muestra). Después de una hora se descartó el medio y se lisó la monocapa con 100 ul de buffer de Laemmli (Laemmli 1970).; el material lisado fue tratado a $100^{\circ}C$ durante dos minutos y sembrado en un gel de poliacrilamida al 10%. Posteriormente a la corrida electroforética se efectuó la autorradiografía del gel con el objeto de detectar los diferentes polipéptidos.

3.11 Preparación de cortes histológicos para observación al microscopio óptico.

Inmediatamente después de sacrificar al animal, muestras de intestino fueron fijadas en formol al 10%. Las piezas, luego de fijadas, fueron deshidratadas con alcohol, embebidas con xilol, incluidas en parafina, y cortadas a 5-7 micrones de espesor. Finalmente el tejido fue teñido con hematoxilina y eosina.

3.12 INOCULACIONES EXPERIMENTALES.

3.12.1 Inoculación de terneros con una cepa de rotavirus bovino grupo antigénico A, aislado en Argentina.

Animales:

Se utilizaron 7 terneros de 7 días de vida, raza Holando Argentino. Los terneros habían permanecido los 2 primeros días de vida al pie de las madres, luego fueron separados de

ellas, colocándolos en estacas y alimentándolos dos veces al día con sustituto lácteo (Cargill). Cinco terneros fueron inoculados y 2 quedaron como controles.

Inóculo:

Se empleó como inóculo una cepa de virus aislada en el partido de Pila, multiplicada en células MA-104, pasaje No.8. La misma pertenecía al serotipo bovino 1 descrito en U.S.A. e Inglaterra.

Dosis y vía:

Cada ternero se inoculó con 5×10^6 DICC 50% vía oral, en el momento previo a la administración diaria del sustituto lácteo. A los 2 controles se les administró 5 ml de MEM estéril vía oral en el mismo momento que los otros.

La observación de los animales duró 15 días. Se puso especial énfasis en la observación de signos de anorexia y en las características de la materia fecal, principalmente color, cantidad y consistencia. Se tomaron muestras de materia fecal diariamente.

Detección de virus en las heces:

Las heces recolectadas diariamente fueron procesadas mediante la técnica de PAGE (3.3.2).

3.12.2 Infección experimental con un rotavirus porcino atípico (no perteneciente al grupo antigénico A) detectados en Brasil.

Animales: 11 lechones de 10 días de vida, raza Durock Jersey, que habían permanecido 4 días con su madre, fueron separados al quinto día colocándolos en un box

calefaccionado y alimentados con leche de vaca. De los animales disponibles, 8 se inocularon y 3 quedaron como controles.

Inóculo: Se empleó una suspensión al 20% en TNMC de materia fecal que contenía el rotavirus atípico. La muestra fue centrifugada a 3000 g durante 20 minutos y luego filtrada en filtros 0,25u. Como control se efectuó una prueba de ELISA para descartar la presencia de rotavirus grupo A.

Dosis y vía: Se inoculó cada lechón con 1 ml del inóculo vía nasal/oral.

Los tres controles recibieron 1 ml vía nasal/oral de la solución tampón TNMC.

La observación de los animales duró 20 días. Se puso especial énfasis en los signos de anorexia y características de la materia fecal, principalmente color, cantidad y consistencia. Se recogieron muestras de materia fecal diariamente.

Detección de virus en las heces: Las heces recolectadas diariamente fueron analizadas por PAGE y por ELISA.

3.12.3 Infección experimental con un rotavirus (grupo antigénico A) con perfil genómico atípico.

Animales: Se utilizaron 8 lechones con las mismas características que las detalladas en la inoculación experimental descrita en 3.12.2.

Inóculo: Se empleó una cepa aislada en Benito Juárez con perfil genómico atípico adaptada a crecer en células MA-104 y clonada 3 veces con la técnica descrita en el punto 3.8.

Dosis y vía: Se inocularon 5 lechones con $10^{4,5}$ DICC 50% cada uno, vía nasal/oral. A los 3 controles se les administró a cada uno 1 ml de MEM estéril por vía nasal/oral.

Las observaciones efectuadas fueron las ya descritas en la infección experimental anterior (3.12.2).

La detección de virus en la materia fecal se efectuó mediante las técnicas de PAGE y ELISA.

3.12.3.1 Estudios histopatológicos y ultraestructurales en intestino de cerdos infectados experimentalmente con rotavirus grupo antigénico A con perfil genómico atípico.

Se emplearon 3 lechones con las características ya enunciadas más arriba. Se empleó el mismo inóculo que en la experiencia descrita en 3.12.3 y los animales fueron sacrificados a las 24, 48, y 72 horas post inoculación. Se tomaron muestras de distintos segmentos de intestino delgado y grueso, los que fueron fijados en formol al 10% para análisis histopatológico y en glutaraldehído 3% para análisis ultraestructurales en ME.

3.12.4 Inoculación experimental de lechones con una cepa de rotavirus grupo antigénico A, con perfil genómico clásico aislada en Tandil, Argentina.

Animales: 13 lechones con características similares a las inoculaciones experimentales descritas anteriormente.

Inóculo: Se utilizó una cepa de rotavirus porcino aislada en Tandil, pasaje quinto en células MA-104.

Se inocularon 10 lechones y 3 quedaron como controles. Las características de los animales, modo de inoculación y observaciones fueron idénticas a las detalladas en 3.12.3.