

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR y FILOGENÉTICA DE ROTAVIRUS., EN CONEJOS DE LA ZONA SUR ORIENTE DEL ESTADO DE MÉXICO

Virginia G. García Rubio¹, Linda G. Bautista Gómez^{2*}, Camilo Romero Núñez³ y Emmanuel Reynoso Utrera⁴

¹ vggarcia@uaemex.mx Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca, Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

² lgbautista@uaemex.mx, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca,

³ cromeron@uaemex.mx, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca

⁴ mvzmanolo77@gmail.com, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Amecameca

Resumen. En otros países, *Rotavirus* es considerado la principal etiología de gastroenteritis aguda en conejos. En México, en las unidades de producción cunícola los cuadros entéricos repercuten en alta mortalidad y fuertes pérdidas económicas. La proteína VP6 de la capa intermedia de la cápside del virus, es utilizada para clasificar antigénicamente el *Rotavirus* en grupos (A-H). Utilizando la técnica de Reverso Transcriptasa-Reacción en Cadena de la Polimerasa, se probaron 19 muestras de intestino de conejos sanos y con cuadro clínico entérico, provenientes de la región suroriente del Estado de México, De las muestras probada el 31.5% (6), amplificaron un fragmento de 380pb utilizando los primers específicos para el fragmento VP6. Es el primer reporte de detección molecular de Rotavirus en conejos en México.

Palabras Clave: Rotavirus, Conejos, RT-PCR

Abstract. In other countries, *Rotavirus* is considered the main etiology of acute gastroenteritis in Rabbits. In Mexico, in rabbit meat production, enteric disease has a great importance for its economic impact. VP6 protein of the intermediate layer of the virus capsid, is used to classify Rotavirus groups antigenically (A-H). Using reverse transcription-polymerase chain reaction technique 19 gut samples from healthy rabbits and with enteric disease, from the southeastern region of the State of Mexico, were tested. Of the samples tested, 31.5% (6) healthy and with enteric disease, amplified a fragment of 380pb using primers specific for the VP6 fragment. It is the first report of molecular detection of rotavirus in rabbits in Mexico.

Keys words: Rotavirus, Rabbits,, RT-PCR

I Introducción

Rotavirus es reconocido como el agente etiológico de gastroenteritis más importante tanto en niños como en animales neonatos en todo el mundo, con una morbilidad y mortalidad de gran impacto social y económico (Dodet *et al.*, 1997; Estes *et al.*, 2001; Matthijnssens *et al.*, 2008).

El género *Rotavirus* está clasificado dentro de la familia *Reoviridae*, subfamilia *Sedoreovirinae* (Nakagomi y Nakagomi, 2002). El genoma del virus está compuesto por 11 segmentos de doble cadena de RNA, seis de ellos codifican para seis proteínas estructurales (VP1-VP4, VP6 y VP7) y cinco para seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6). El genoma está protegido por una cápside constituida por tres capas (Martella *et al.*, 2005). La capa intermedia está conformada en su totalidad por la proteína VP6, esta proteína permite la clasificación antigénica de rotavirus en siete grupos (A-G), aunque Matthijnssens *et al.*, 2012, han añadido el grupo H.

En conejos se ha identificado el grupo A de Rotavirus, las cepas que pertenecen a este grupo, se clasifican en subgrupos (SG), mediante la amplificación de la región que codifica para sus determinantes antigénicos, ubicada dentro del fragmento VP6. Los

posibles subgrupos son: SG I, SG II, SG I y II y, ni SG I ni II. Hasta el momento, las cepas aisladas de conejo corresponden a VP6 SG I (Iturriza *et al.*, 2002), con excepción de la cepa japonesa R-2, que posee especificidad antigénica VP6 SG II (Martella *et al.*, 2003).

Rotavirus presenta un polimorfismo grande, su enorme variabilidad genética se refleja en el complicado sistema de clasificación de los mismos. Existen variantes de electroferotipos, serogrupos y serotipos; aún en un mismo brote pueden aislarse virus con electroferotipos y serotipos diferentes (Ayanegui y Tórtora, 2005; Bányai, *et al.*, 2009 y Matthijnssens *et al.*, 2011). La diversidad genética puede explicarse debido a la estructura de su genoma, que consta de una cadena de RNA dividida en once segmentos, esto le da una amplia ventaja evolutiva para persistir en el ambiente, generando diferencias antigénicas y serotipos, así como nuevos rangos de hospederos susceptibles. Esta variabilidad genética la consiguen los rotavirus a través de tres diferentes mecanismos, el primero es la recombinación genética, en la que sucede un intercambio genético o entrecruzamiento al azar cuando hay infecciones mixtas o coinfección por dos cepas diferentes en una misma célula (interespecies), dando como resultado una progenie genéticamente diferente a las cepas que le dieron origen;

un segundo mecanismo es el reacomodo, reordenamiento o re-arreglo genético que se observa en la replicación “*in vitro*” e “*in vivo*”, en diversos aislamientos virales dentro del genoma de la misma cepa, lo que indica que estos nuevos acomodos se generan de forma separada en cada uno de los genes (intraespecie) (Polombo, 2002; De Leener, *et al.*, 2004; Ayanegui y Tórtora, 2005 y Bányai, *et al.*, 2009). En los rotavirus, el re-arreglo del genoma se produce casi exclusivamente en los segmentos que codifican para las proteínas no estructurales y se origina por los mecanismos de duplicaciones de la secuencia y deleciones parciales o inserciones de nucleótidos sin plantilla (Bányai, *et al.*, 2009). Ambos mecanismos, la recombinación y el re-arreglo contribuyen a la modificación de la expresión genotípica y fenotípica de forma mayor en las cepas virales resultantes. Finalmente el tercer mecanismo es la mutación puntual, como todos los virus RNA debido a su alta tasa de replicación y a los errores que produce la RNA polimerasa viral. Los genomas de RNA tienen una tasa de mutaciones aproximadamente un millón de veces mayor que la del DNA de doble hélice, debido a la incapacidad de la RNA polimerasa de corregir errores en la replicación viral (Carter *et al.*, 2004; De

Leener, *et al.*, 2004; Ayanegui y Tótor, 2005 y Bányai, *et al.*, 2009).

Como parásitos intracelulares obligados, los virus dependen de la maquinaria y energía de la célula para traducir sus proteínas y elaborar los elementos para la replicación de su genoma (López y Arias, 2012). Una vez que rotavirus alcanza la luz duodenal, se exponen al efecto de proteasas como la tripsina y la pancreatina, las cuales fraccionan de forma parcial la proteína VP4, quedando dos polipéptidos de menor peso molecular sin separarse, llamados Vp5 y VP8 (Rojas *et al.*, 2008). Estas proteínas son las que se fijan a los receptores en las puntas de las vellosidades (parte media y superior) del epitelio del intestino delgado; VP5 reconoce estructuras relacionadas con el ácido siálico y VP8 interactúa con balsas lipídicas, que son microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos y con algunas integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y la proteína hsc70), logrando así la unión virus-célula (Anayegui y Tótor, 2005). Se ha propuesto que la vía de internalización se realiza a través de dos formas: la primera por endocitosis dependiente de balsas lipídicas y la segunda por internalización directa. Poco después de entrar en la célula, el virus pierde las dos proteínas de la superficie exterior, VP4 y VP7 (cápside externa),

produciendo una partícula de doble capa (DLP), activándose la transcripción dependiente de la RNA polimerasa viral (Rojas *et al.*, 2008).

Las infecciones experimentales en conejos dejan ver que las infecciones puras por rotavirus son restringidas al periodo neonatal de aproximadamente 2 semanas. Sin embargo en la naturaleza y en la producción cunícola, rotavirus tiene un papel importante en la inducción de la enfermedad, ya sea por ejercer actividad patogénica directa o por activar los efectos de otros patógenos. Es muy probable que las enteropatías en conejos tengan una etiología multifactorial con mecanismos sinérgicos que aumenten la patogenicidad de varios microorganismos (Martella, *et al.*, 2005; Lavazza, *et al.*, 2008); rotavirus puede ser la causa primaria de las enfermedades entéricas en conejos postdestete, y también puede estar involucrado como agente etiológico de brotes entéricos severos en asociación con otros patógenos (Lavazza, *et al.*, 2008).

Para que la infección por rotavirus se establezca en un hospedero y se desarrolle la enfermedad, requiere de factores asociados al hospedero, al virus y al ambiente. El virus invade células de absorción de las vellosidades intestinales, produciendo diarrea; la severidad de la infección depende de la resistencia

genética, la presencia de receptores afines, la edad, el estado inmunitario, nutricional y de la presencia de patógenos secundarios (Dwight and Chung, 1999). Los adultos pueden llegar a estar persistentemente infectados (Polanco, *et al.*, 2004; Ayanegui y Tórtora, 2005). La facilidad con la que la infección se presenta se debe en parte a la excreción del virus en altas concentraciones por los animales enfermos, así como por los animales asintomáticos, además a la gran resistencia del virus a las condiciones ambientales, lo que favorece su difusión y su presencia de forma enzoótica (Dwight y Chung, 1999; Ayanegi y Tórtora, 2005). La dosis infectante, la capacidad de diseminación entre los hospederos, el tropismo celular o capacidad para diseminarse entre las poblaciones celulares específicas y la patogenicidad, son factores asociados al virus para producir la enfermedad (Ayanegui y Tórtora, 2005). En lo que se refiere al ambiente, la contaminación es un factor primordial, espacios con gran cantidad de materia orgánica son sitios propicios para proteger a un virus que no posee envoltura, además de ser sumamente resistente a las condiciones ambientales, favoreciendo que éste permanezca infectivo durante meses (Lavazza *et al.*, 2008).

En las granjas cunícolas las enfermedades entéricas tienen un impacto importante ocasionado por la mortalidad, detrimento en la ganancia de peso de los animales afectados y a las severas pérdidas económicas (Lavazza *et al.*, 2008), se han reportado rotavirus asociados con enfermedad diarreica en conejos de Italia, Japón, Estados Unidos, Hungría y China (Iturriza Gómara *et al.*, 2002, Martella *et al.*, 2003). En Italia la presencia de anticuerpos contra *Rotavirus* es común en conejos después de 4 meses de edad, sugiriendo que la infección de por este virus es endémica en la producción cunícola comercial (Martella *et al.*, 2005). A nivel mundial hay pocas investigaciones de cepas de Rotavirus Lapino detectadas y analizadas (Martella *et al.*, 2003). En México, desde el inicio de la década de los setentas, la actividad cunícola ha sido fuertemente impulsada. El Estado de México es la principal entidad productora de carne de conejo (SAGARPA, Vega y Maya, 2012). En México la presencia de *Rotavirus* en los cuadros entéricos en conejos no ha sido demostrada. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Rotavirus*, en conejos con cuadros entéricos mediante la amplificación de los genes VP6 por RT-PCR.

II Material y método.

Se utilizaron un total de 19 conejos, 13 sanos y 6 con cuadro entérico, procedentes de diferentes unidades de producción cunícola de la zona sur oriente del Estado de México. A estos animales se les practicó la necropsia en el Anfiteatro de la Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Centro Universitario UAEM Amecameca y se colectaron muestras de intestino delgado. Las muestras se identificaron, registraron y mantuvieron en congelación hasta su análisis en el Laboratorio de Biotecnología de la misma Institución.

Se realizó la extracción de RNA de las muestras de intestino mediante el Gene JET Viral DNA and RNA Purification Kit de Thermo Scientific®. Con el RNA obtenido se efectuó la RT-PCR de dos pasos, usando el Kit ImPro-II Reverse Transcription System de Promega®, siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µl, constituida por de buffer Green 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 10mM de dNTP's, 10pM de cada primer, 1U de Taq polimerasa y 50ng de cDNA de cada muestra a probar. Los primers utilizados fueron los reportados por Iturrzia Gómora *et al.*, 2002, VP6F 5'GACGGcGCAACTACATGGT3' y VP6 R

5'GTCCAATTCATTCCTGGTTGG3'. Se buscaron las condiciones para estandarizar el programa de PCR, para amplificar un fragmento de 380pb que codifica la proteína estructural de la capa externa de la cápside, denominado VP6, con un tamaño total de 1356pb. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio.

Como control positivo de la prueba se utilizó la vacuna oral pentavalente de virus vivos reordenados de uso humano, RotaTeq MSD®, que contiene cinco virus recombinantes, de la cepa de origen bovino WC3, que tienen VP6 perteneciente al SG1, y las proteínas VP4 y Vp7 de las cepas de rotavirus humanos (Matthijnsens *et al.*, 2010). Esta investigación fue aprobada por el Comité de Bioética del Centro Universitario de la Universidad Autónoma del Estado de México.

III Resultados

De las 19 muestras de intestino de conejo procesadas, seis de ellas amplificaron un fragmento de 380pb con los primers utilizados, lo que representa un 31.5%, Figura 1. Las muestras que amplificaron fueron de conejos sanos y enfermos, Tabla 1. Los

conejos enfermos presentaban anorexia, depresión, deshidratación, diarrea, distensión abdominal y muerte. Al realizar la necropsia se encontró que los animales presentaban impactación cecal, dilatación intestinal, contenido intestinal que variaba desde líquido hasta mucoide. Las condiciones óptimas encontradas para realizar la segunda parte de la RT-PCR fueron 96°C para la desnaturalización, 61°C para la alineación y 72°C para la extensión; con una concentración de 3 mM de MgCl₂. El fragmento de 380pb amplificó con la vacuna utilizada como control positivo.

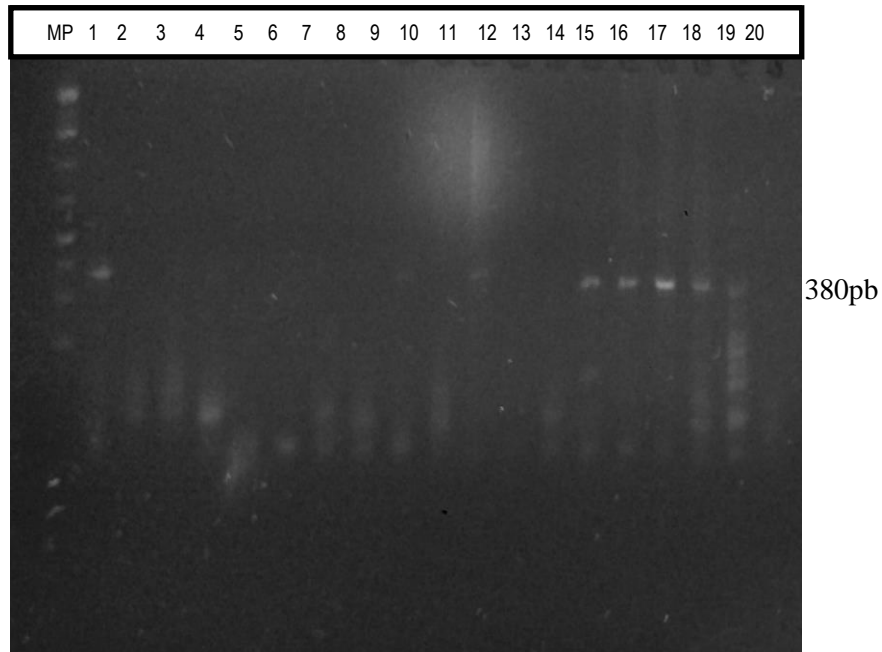


Figura 1. Gel de agarosa al 3 %, muestra la amplificación de 380 pb del gen VP6 de *Rotavirus*. MP marcador de peso molecular de 1 Kb; Pozo 1 control positivo de Rotavirus; pozos 2-19 muestras de intestino de conejo de la región sur oriente del Estado de México; pozo 20 control negativo.

Tabla 1. Detección de VP6 en conejos sanos y con cuadro entérico.

Conejos	Número de conejos	Detección de VP6	Porcentaje
Sanos	13	2	10.5
Con cuadro clínico entérico	6	4	21.0
Total	19	6	31.5

IV Discusión

En este estudio se determinó la presencia de un fragmento de la proteína VP6 de rotavirus, a partir de muestras de conejos sanos y con cuadro entérico de la zona sur oriente del Estado de México, encontrándose presente en el 31.5% de las muestras, lo que indica

su participación en los cuadros entéricos en estos procesos patológicos. Los resultados son muy parecidos a los reportados en Canadá, utilizando microscopía electrónica y ELISA directa, donde han detectado la presencia de *Rotavirus* en 35.4% y son menores que los detectados mediante la técnica de Anticuerpos Fluorescentes, en 60% de los conejos probados por Percy *et al.*, 1993 y mayores a los que detectaron en Italia, país con una fuerte producción cunícola y en donde se ha demostrado que la presencia de rotavirus en conejos es endémica, desde un 16.4% hasta un 23%, en conejos postdestete (Lavazza, *et al.*, 2008).

Rotavirus ha sido reportado en varios países utilizando técnicas moleculares en diferentes especies, en México se ha reportado en especies domésticas, que no incluyen al conejo, utilizando para su detección pruebas serológicas (Polanco *et al.*, 2004). Este hecho es importante, una vez determinada la presencia del virus, pueden establecerse medidas de control y prevención específicas. Aunque Rotavirus produce un cuadro entérico de mediana patogenicidad, ha sido propuesto que puede sensibilizar la mucosa intestinal y predisponer a que otros agentes patógenos presentes ejerzan su mecanismo de patogenicidad, realicen sinergia y produzcan

cuadros clínicos de mayor gravedad (Martella *et al.*, 2003 y Lavazza *et al.*, 2008).

V Conclusiones

Rotavirus grupo A, que puede clasificarse como SG I, está presente en conejos domésticos sanos y con cuadro entérico, de la zona sur oriente del Estado de México. Es el primer reporte de la presencia de rotavirus en conejos de México. El hecho de que rotavirus esté circulando en las unidades de producción cunícola, permite suponer su rol como factor predisponente para la presentación de estos cuadros entéricos, al sensibilizar el epitelio del tracto intestinal, mecanismo innato de defensa, permitiendo que otros agentes realicen sinergia, aumentando la gravedad y mortalidad producida por estos cuadros así como las pérdidas económicas.

VI Trabajos futuros

Se pretende continuar con el tamizaje de muestras de conejos sanos y con cuadro entérico, de diferentes municipios de la región

sur oriente del Estado de México. De importancia es caracterizar molecularmente a estas cepas y analizar su diversidad genética, lo anterior permitirá determinar una o más cepas de rotavirus que pueda ser utilizada en estrategias de prevención específicos para el conejo mediante vacunación, con la finalidad de disminuir la presentación y virulencia de estos cuadros entéricos en las unidades de producción cunícola de la zona sur oriente del Estado de México.

VII Referencias

AYANEGUI, M.A. y Tórtora J.L. 2005. Epidemiología, prevención y control de la infección por rotavirus en los animales domésticos, en *Enfermedades de importancia económica en producción animal*. 1ª Edición, Editorial McGraw Hill, México, Capítulo 7; 89-105.

BÁNYAI, Krisztián, Matthijssens, Jelle, Szücs, György, Forgách, Petra, Erdélyi, Károly, Ranst, Marc van, Lorusso, Eleonora, Decaro, Nicola, Elia, Gabriella, Martella, Vito. 2009. Frequent rearrangement may explain the structural heterogeneity in the 11th genome segment of lapine rotaviruses. *Acta Vet Hung. Short communication.*, 57(3):453-61. doi: 10.1556/AVet.57.2009.3.11.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635717> [Consultado el 3 de septiembre de 2014].

DE LEENER, Karolien, Rahman, Mustafizur, Matthijnssens, Jelle, Van Hoovels, Lieve, Goegebuer, Truus, Van der Donck, Ingrid, Van Ranst, Marc. 2004. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology* 325, 11- 17.

DODET, B. Heseltine, Catherin, Saliou, Mary. 1997. Los rotavirus en la medicina humana y veterinaria. *Revista de Filología Francesa e Investigación/Salud*. Volumen 7, N° 3, 195-199

DWIGHT, C, Chung, Y. 1999. *Veterinary Microbiology*. Blackwell Science. USA.

ESTES, Mary. 200. Rotaviruses and their replication. In: *Fields virology*, (Edit. Knipe D M., Howley P M., Griffin D E., Lamb R A., Martin M A., Roizman B., Strais S E), 4th ed., Lipincott Williams & Wilikins, Philadelphia , pp 1747 – 1785.

ITURRIZA GÓMARA, Miren. Wong, Cecilia, Blome, Sandra, Desselberger, Ulrich, Gray, Jim. 2002. Molecular Characterization pf VP6 Genes Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *Journal of Virology*, 6596-6601.

LAVAZZA, A, Cerioli, M, Martella, V, Tittarelli C, Grilli C, Vibrio, R, Buonavoglia, C. 2008. Rotavirus in diarrheic rabbits: prevalence and characterization of strains in Italian farms. *In 9th World Rabbit Congress*. Verona Italia, Pathology and Hygiene.

LÓPEZ, Susana, Arias, Carlos. 2012. Rotavirus-host cell interactions: an arms race. *Current Opinion in Virology*, Volume 2, Issue 4, August, Pages 389–398.

GUO, Dongchun, Liu, Jiansen, Lu, Yan, Sun, Yan, Yuan, Sun, Yuan, Dongwei, Qian, Jiang, Lin, Huan, Li, Changwen Si, Qu, Liandong. 2012. Full genomic analysis of rabbit rotavirus G3 P[14] strain N5 in China: Identification of a novel VP6 genotype. *Infection, Genetics and Evolution*, 12; 1567- 1576.

MARTELLA Vito, Ciarlet Max, Camarda, Antonio, Pratelli, Annamaria, Tempesta, María, Greco, Grazia, Cavalli Alessandra, Elia, Gabriela, Decaro, Nicola, Terio, Vito, Bozzo Giancarlo, Camero, Michele, Buonavoglia, Canio. 2003. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4, genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology*, 314, 358-370..

MARTELLA Vito, Ciarlet, Max, Lavazza, A., Camarda, Antonio, Lorusso, E, Terio, Vito, Ricci, D, Cariola, F, Gentile, M, Cavalli, A,

Camero, Michelle, Decaro, Nicola, Buonavoglia, Canio. 2005. Lapine rotaviruses of the genotype P[22] are widespread in Italian rabbitries. *Veterinary Microbiology*, 117-124

MATTHIJNSSENS, Jelle, Ciarlet, Max, Rahman, Mustafizur, Attoui, Houssam, Banyai, Kristián, Estes, Mary, Gentsch, Jon, Itzuriza-Gomara, Miren, Kirkwood, Carl, Martella, Vito, Mertens, Peter, Nakagomi, Osamu, Patton, John, Ruggeri, Franco, Saif, Linda, Santos, Norma, Steyer, Andrej, Taniguchi, Koki, Desselberger, Ulrich and Van Ranst, Marc. 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 153(8); 1621-1629.

MATTHIJNSSENS, Jelle, Ciarlet, Max, McDonald, Sarah, Attoui, Houssam, Banyai, Krisztián, Brister, Rodney, Buesa, Javier, Esona, Mthew, Estes, Mary, Gentsch, Jon, Itzuriza-Gomara, Miren, Johne, Reimar, Kirkwood, Carl, Martella, Vito, Mertens, Peter, Nakagomi, Osamu, Parreño, Viviana, Rahman, Mustafizar, Ruggeri, Franco, Saif, Linda, Santos, Norma, Steyer, Andrej, Taniguchi, Koki, Patton, John, Desselberger, Ulrich, Van Ranst, Marc. 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 156, 8); 1397-1413.

MATTHIJNSSENS, Jelle, Joelsson, Daniel, Warakomski, Donald, Zhou, Tingyi, Mathis, Pamela, van Mannen, Marc-Henri, Ranheim, Tood, Ciarlet, Max. 2010. Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq®. *Virology*, 403, 111-127.

NAKAGOMI, O, Nakagomi, T. 2002. Genomic relationships among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA-RNA hybridization assays. *Veterinary Science*. 73, 207-214.

PALOMBO, E. A. 2002. Genetic Analysis of Group A Rotaviruses; Evidence for Interspecies Transmission of Rotavirus Genes. *Virus genes*, 24:1, 11-20.

PAP, Hajnalka, László, Brigitta, Jakab, Ferenc, Ganesh, Balasubramanian, De Grazia, Simona, Matthijnssens, Jelle, Ciarlet Max, Martella, Vito, Bányai, Krisztián. 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Veterinary Microbiology*, 165, 190-199.

PERCY, Dean, Muckle, Ann, Hampson, Robert, Brash Marina. 1993. The enteritis complex in domestic rabbits: A field study. *Can Vet J*; 34: 095-102.

POLANCO, Gerardo, González, María, Manzano, Luis, Cámara, José. 2004. Rotavirus en animales asintomáticos; Detección y clasificación antigénica. Archivos de Medicina Veterinaria XXXVI, N° 1.

SAGARPA. Comité Nacional Sistema Producto Cunicola. En *Informe de Rendición de Cuentas de la Administración Pública Federal 2006 – 2012*. Comités Sistema Producto. Memoria Documental. <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>. [4 de septiembre de 214].

VEGA, Gloria, Maya, José. 2012. Caracterización de los sistemas de producción cunicola de la zona Sur-Oriente del estado de México. Tesis de Licenciatura. Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México.

VIII Agradecimientos

Se agradece al CONACYT el apoyo con la beca de posgrado, para la realización de este proyecto, asimismo al financiamiento proporcionado mediante el PRODEP con el proyecto “Desarrollo de Pruebas Moleculares para el Diagnóstico de Agentes Patógenos que afectan a la Cunicultura”(PROME/103.5/13/6535) y al de la

UAEM, con el proyecto “Identificación Molecular y Filogenética de Rotavirus presentes en Conejos de la Región Sur Oriente del Estado de México” (3577/2013CHT).