

**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 II**

## CAPITULO IV

Resultados.

### 4.1 Rotavirus en bovinos.

#### 4.1.1 Determinación de la presencia de rotavirus en bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Se tomaron muestras en 19 establecimientos ganaderos detectándose rotavirus en 17 de ellos. La tabla 3 muestra la cantidad de animales analizados por establecimiento, el partido al que pertenece cada lugar y las tasas de morbilidad y mortalidad de las poblaciones estudiadas. Puede observarse que los porcentajes de terneros con diarreas fueron siempre altos en los lugares donde se detectó rotavirus (65 a 95%). El índice de mortalidad en los terneros afectados varió de 0 a 11%.

La figura 3 muestra la ubicación geográfica de los rodeos en donde se encontró rotavirus y la distribución de los distintos sistemas de explotación ganadera en la provincia de Buenos Aires.

La tabla 4 muestra la cantidad de terneros con y sin diarrea que fueron positivos a la prueba de detección de rotavirus (ELISA y PAGE). Hubo un 53% de positivos en el grupo diarreico (95 sobre un total de 177) y un 7% aproximadamente en el grupo de animales sin diarrea (3 sobre un total de 40). De 35 vacas, sólo en una pudo detectarse rotavirus en MF. En la tabla 5 se presenta la frecuencia de infección por rotavirus en relación a la edad; la misma

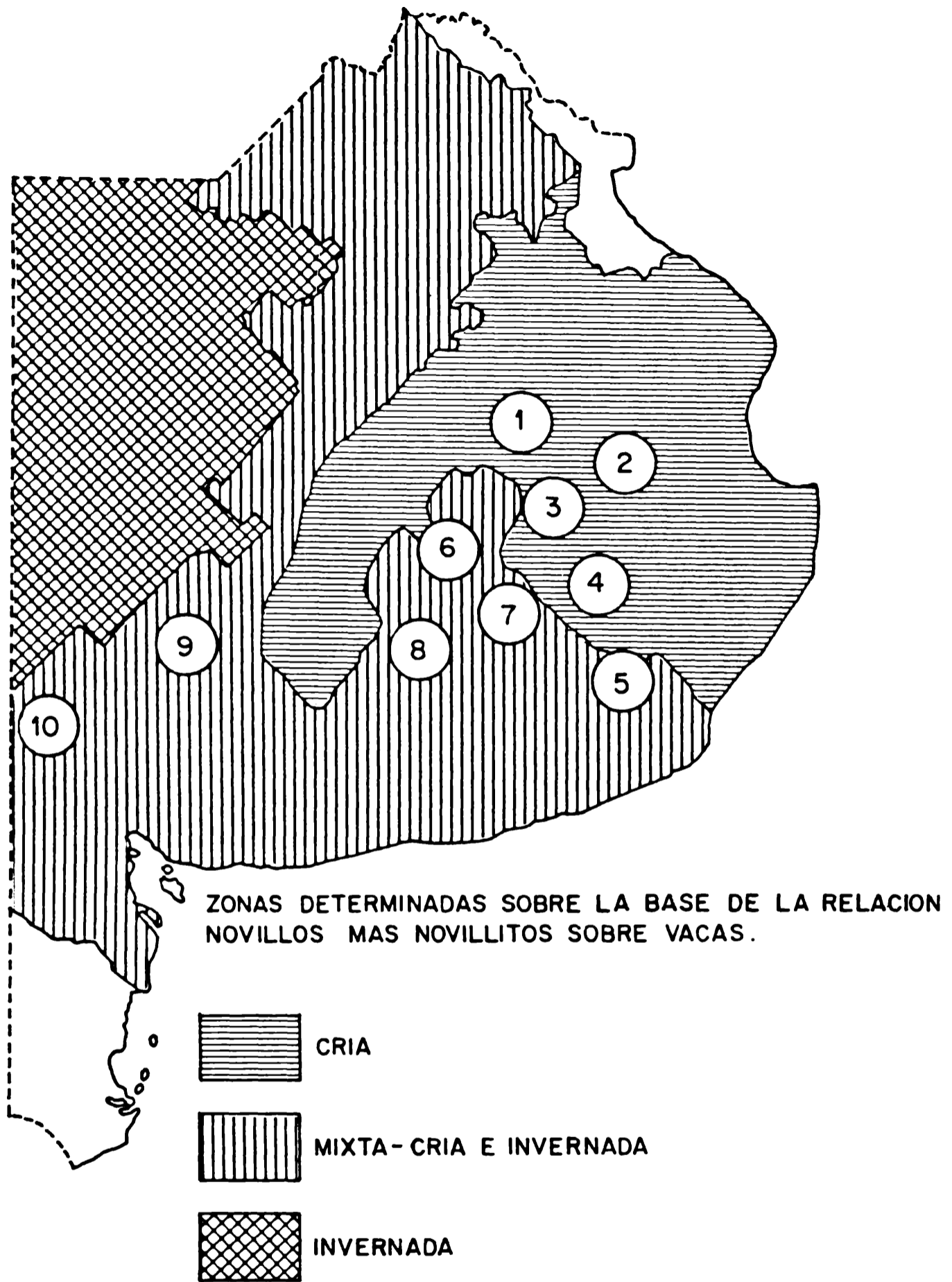
Tabla 3

**RELEVAMIENTO DE LA PRESENCIA DE ROTAVIRUS  
EN RODEOS DE CRIA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES**

ESTABLECIMIENTOS Y PARTIDOS	MUESTRAS (No)	ELISA Y PAGE (+)	TERNEROS C/DIARREA %	MORTALIDAD ASOCIADA A DIARREA %
No1 Ayacucho	23	19	73	-
No2 Ayacucho	23	15	76	-
No3 Balcarce	2	1	D/N	D/N
No4 B.Juarez	5	2	70	11
No5 B.Juarez	10	1	80	3
No6 Las Flores	3	2	90	1
No7 LAS Flores	6	-	40	-
No8 LAS Flores	6	2	80	-
No9 LAS Flores	4	-	2,5	-
No10 Tandil	22	17	80	0,5
No11 Tandil	38	10	65	3
No12 Rauch	9	7	95	3
No13 Azul	5	3	65	5
No14 Azul	13	2	D/N	D/N
No15 Azul	8	2	D/N	D/N
No16 Pila	17	4	70	-
No17 Pila	14	8	95	3
No18 Puan	2	2	D/N	D/N
No19 C.Suarez	7	1	80	-
	217	98		

D/N: Dato no obtenido.

# PROV. DE BUENOS AIRES.



1 LAS FLORES

2 PILA

3 RAUCH

4 AYACUCHO

5 BALCARCE

6 AZUL

7 TANDIL

8 B. JUAREZ

9 CNEL. SUAREZ

10 PUAN

FIGURA 3

Regiones de la provincia de Buenos Aires en donde se detecto rotavirus en MF de terneros con diarrea neonatal.

Tabla 4 Detección de rotavirus en vacas y en terneros con y sin diarrea. Análisis comparativo de los métodos de PAGE y ELISA.

ANIMALES	NUMERO DE MUESTRAS	PAGE+	ELISA+	ELISA+ PAGE-	PAGE+ ELISA-	TOTAL +
TERNEROS C/D(1)	177	91	93	4	2	95
TERNEROS S/D(2)	40	1	3	2	-	3
VACAS	35	-	1	1	-	1

(1)C/D: Con diarrea

(2)S/D: Sin diarrea

Tabla 5. Rotavirus bovinos: frecuencia de infección a distintas edades.

Edad (días)	Número de muestras	Rotavirus: Muestras positivas	% +
3-9	85	31	36
10-19	82	52	63
20-29	26	13	50
30-40	24	2	8

muestra que el grupo etario mayormente afectado fue el de 10 a 29 días de vida.

#### 4.1.2 Estudio de la variabilidad genómica y antigénica.

Mediante la prueba de ELISA pudo observarse que todos los rotavirus detectados pertenecían al grupo antigénico A.

Hubo dos muestras PAGE positivas y ELISA negativas, el patrón electroforético de su ARN fue el típico para el grupo A, por lo que se consideró que todos los rotavirus detectados pertenecieron a este grupo.

##### 4.1.2.1 Prueba de electroforesis en geles de poliacrilamida del ARN viral (PAGE). Determinación de la sensibilidad de la prueba y análisis de los electroferotipos observados.

Debido al hecho de que en este trabajo se usó en forma regular la técnica de PAGE para la caracterización y diagnóstico de los virus, antes de su aplicación, se estudió la sensibilidad de la misma. Como puede observarse en la figura 4, con este método pueden detectarse sin dificultad hasta 12 ng de ARN viral equivalentes a aproximadamente 120 ng de partículas virales. Este rango de sensibilidad es cercano a la sensibilidad del método ELISA.

Todos los electroferotipos observados mostraron un patrón de agrupamiento de segmentos típico del grupo A (4,2,3,2), con variaciones menores en la migración individual de sus distintos segmentos.

La figura 5 (A y B) muestra los 18 electroferotipos observados durante el estudio.

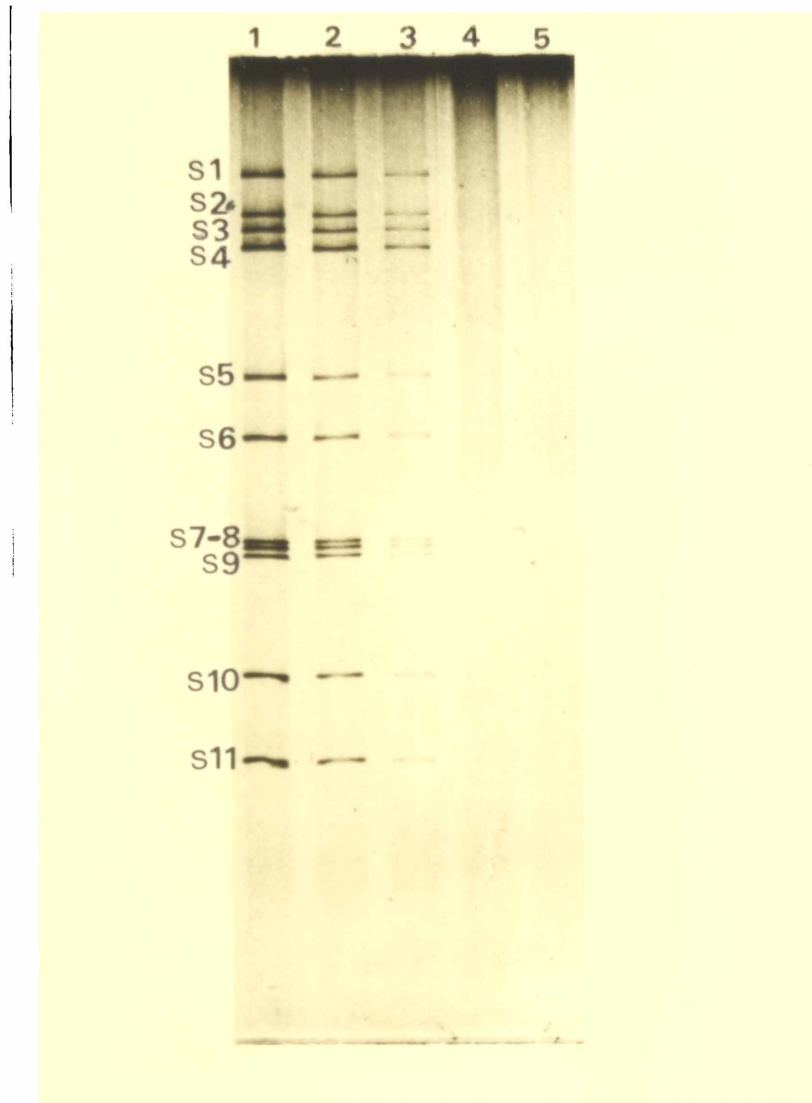


Figura 4: Sensibilidad de la prueba de PAGE.

ARNdc extraído de rotavirus y purificado en una columna de CF11-, las bandas de ARNdc fueron visualizadas utilizando nitrato de plata.

calle 1: 60ng. de ARNdc.  
 calle 2: 30ng. de ARNdc  
 calle 3: 12ng. de ARNdc.  
 calle 4: 6ng. de ARNdc.  
 calle 5: 3ng. de ARNdc.

S: segmento genómico.



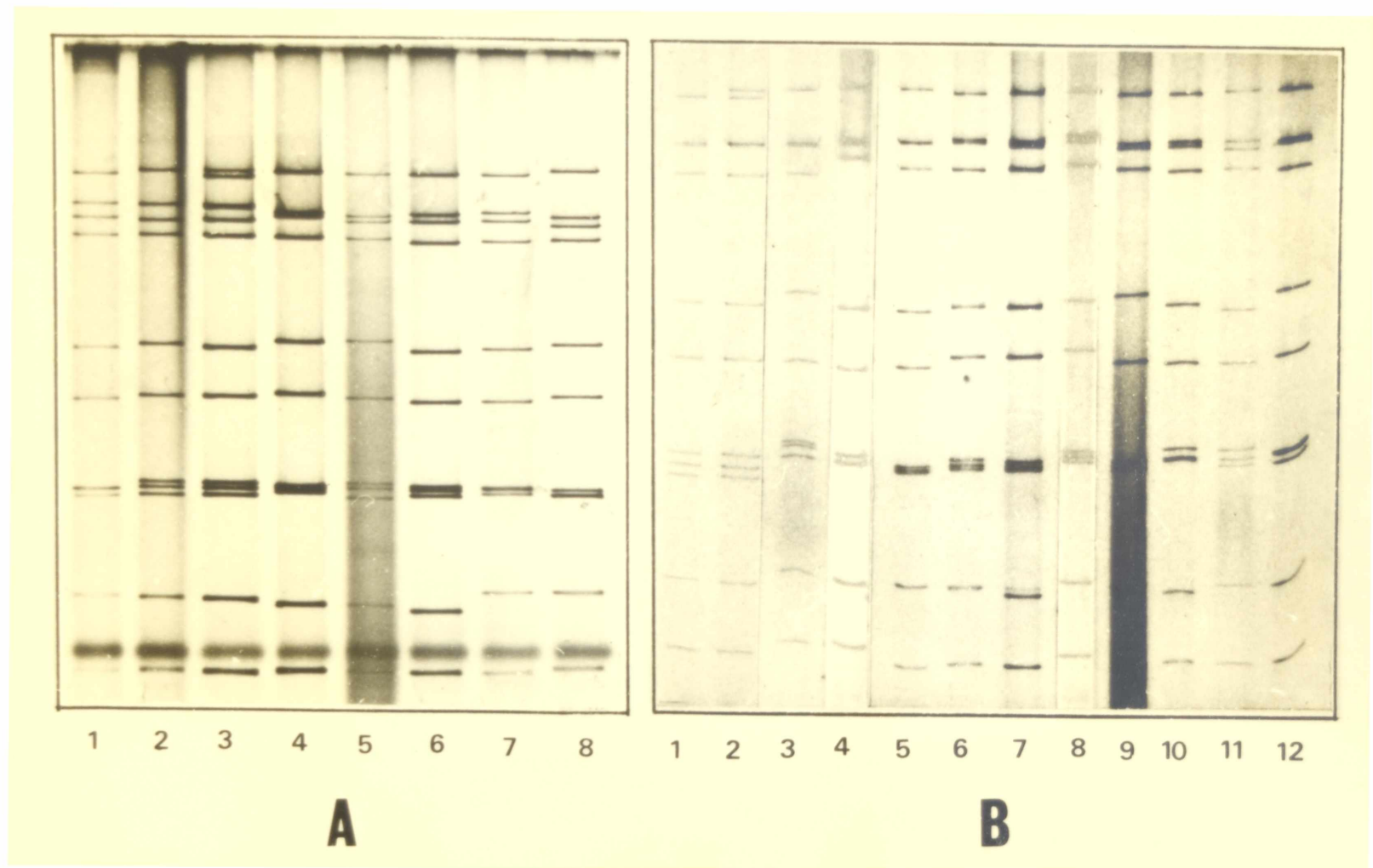


Figura 5: Electroforesis del genoma de rotavirus bovinos detectados en la Pcia. de Bs. Aires (Argentina).

Panel A: muestreo 1984.

Panel B: muestreo 1985.

Panel B: calle 4.patrn electroforético de la cepa UK.

En dos casos se pudo observar el mismo electroferotipo genómico en dos establecimientos diferentes, los cuales se encontraban a más de 200 Km de distancia.

Por otro lado, en tres establecimientos fueron detectados electroferotipos diferentes durante el mismo brote, en 2 de estos casos los electroferotipos se observaron mezclados en la misma muestra fecal, (figura 5 panel A-1984-línea3 y panel B-1985-línea 2). En el resto de los lugares estudiados sólo se detectó un electroferotipo en cada brote.

De los 19 lugares estudiados en 2 se tomó muestras durante 2 años consecutivos. En ambos se detectó en cada año un electroferotipo diferente.

#### 4.1.3 Estudio del comportamiento de los virus en cultivos celulares.

##### 4.1.3.1 Prueba de Inmunoperoxidasa en monocapas celulares infectadas (IPA) y adaptación de distintas cepas a cultivo celular.

Veinticinco muestras fecales fueron positivas a esta prueba como se ve en la Tabla 6. La cantidad de unidades IPA positivas de cada una varió entre 5 y 160 por campo 100x. Estas muestras fueron seleccionadas para intentar su adaptación a cultivo celular. Diez y siete cepas se lograron adaptar a crecer en cultivos de células MA-104, las cuales produjeron entre 12 y 160 unidades IPA(+) en su pasaje inicial.

Tabla 6. Detección de virus infectivo por la prueba de inmunoperoxidasa y adaptación a cultivo celular.

Muestra No.	No. unidades IPA+ x cpoa 10X	Adaptación cultivo celular	Pasaje de adaptación	Título al pasaje No6. DICC 50% x ml
T13	30	+	5to	$10^3$
T14	120	+	4to	$10^{4,6}$
T15	20	+	5to	$10^4$
T18	20	+	4to	$10^{4,7}$
T21	75	+	5to	$10^4$
T34	25	+	5to	$10^3$
T38	45	+	6to	$10^4$
T40	75	+	3ro	$10^{4.7}$
T47	20	+	6to	$10^{4.7}$
T51	15	+	5to	$10^4$
T55	5	-	-	-
T58	20	-	-	-
T66	5	-	-	-
T67	30	+	5to	$10^{5.6}$
T75	10	-	-	-
T82	20	+	4to	$10^{4.8}$
T83	5	-	-	-
T86	100	+	4to	$10^{4.8}$
T87	5	-	-	-
T93	55	+	5to	$10^4$
T96	12	+	5to	$10^{4.6}$
T107	20	+	3ro	$10^{5.7}$
T124	15	-	-	-
T139	7	-	-	-
T149	100	+	3ro	$10^{6.7}$

Las cepas que produjeron entre 5 y 20 unidades positivas por campo 100x (tabla 6) no pudieron ser adaptadas a células MA104 en pasajes sucesivos en células MA104.

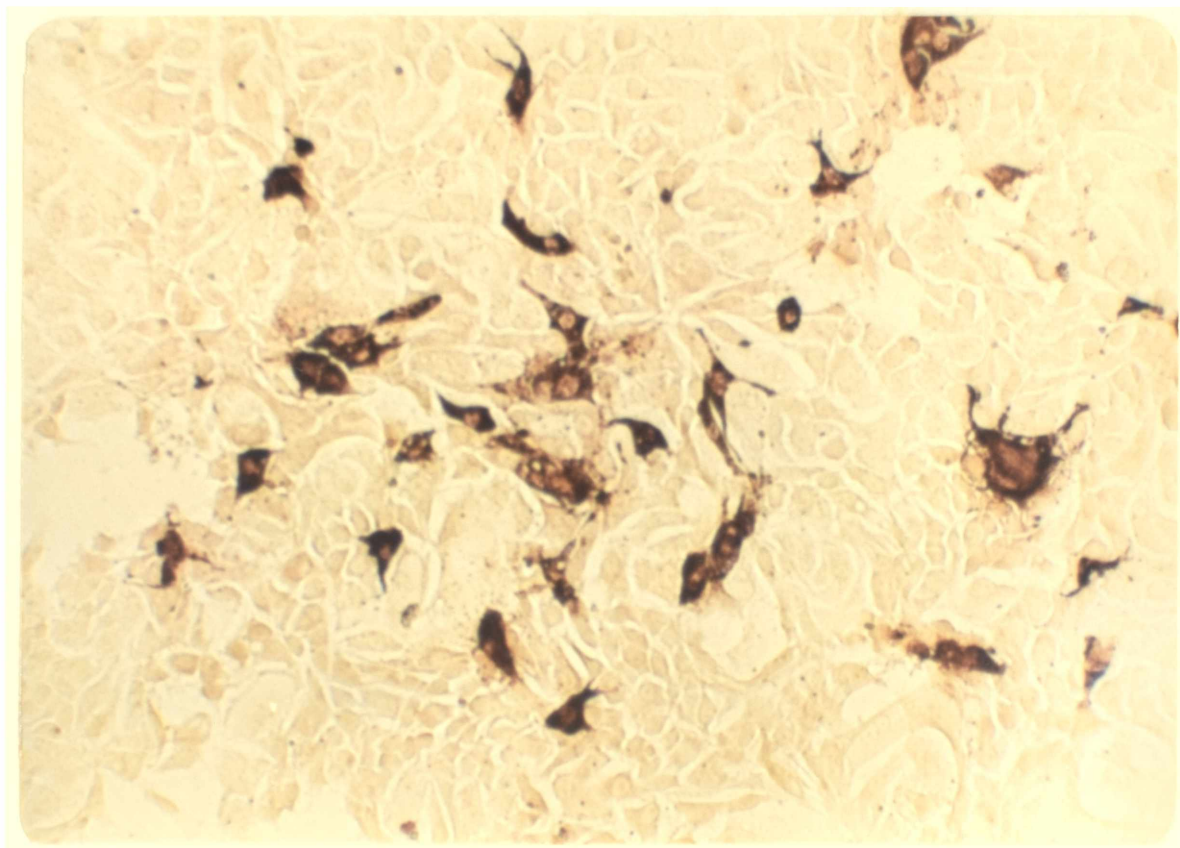
Se consideró adaptada a cada cepa, cuando por lo menos producía una destrucción aproximada del 80% de la monocapa a las 48 horas post-infección.

El efecto citopático en todos los casos se caracterizó por la deformación de las células, aumento de volumen, pérdida de sus contactos y desprendimiento de la monocapa. Cuando se produjo el desprendimiento parcial de la monocapa, se detectaron "focos" de células afectadas, las que al desprenderse, dejaban discontinuidades en la monocapa.

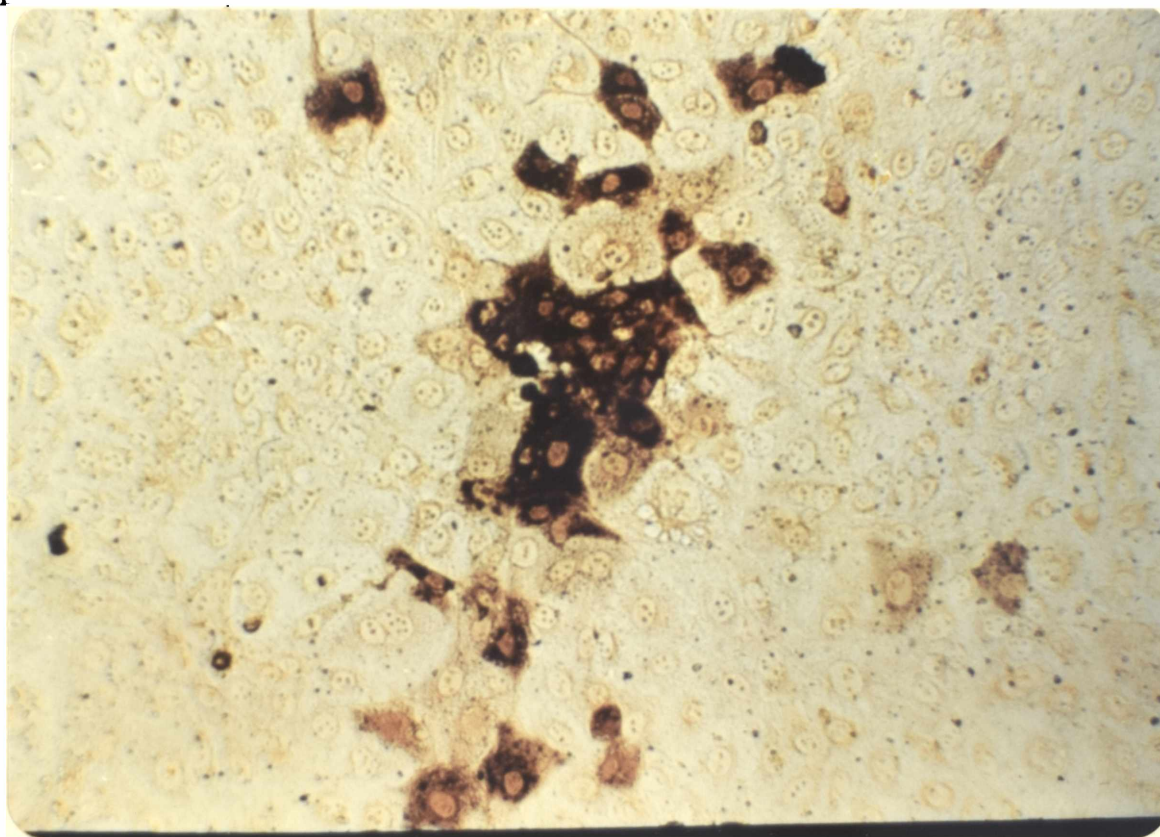
En la figura 6 se puede observar la formación de unidades IPA(+) con una cepa no adaptada (A) y la formación de "focos" IPA(+) con una cepa adaptada (B), mostrando como, en este último caso, el virus pasa rápidamente de célula a célula.

La figura 7 nos muestra el ECP de una cepa adaptada a las 24 hs post-infección. En la figura 7A se puede ver una monocapa normal.

La detección del virus en los pasajes sucesivos por cultivo celular, y la determinación de su identidad genómica se efectuó mediante la técnica de PAGE (figura 8). Esto permitió observar si en cada cepa adaptada se conservó el patrón de migración electroforética de su genoma y, además, permitió detectar fácilmente posibles contaminaciones entre

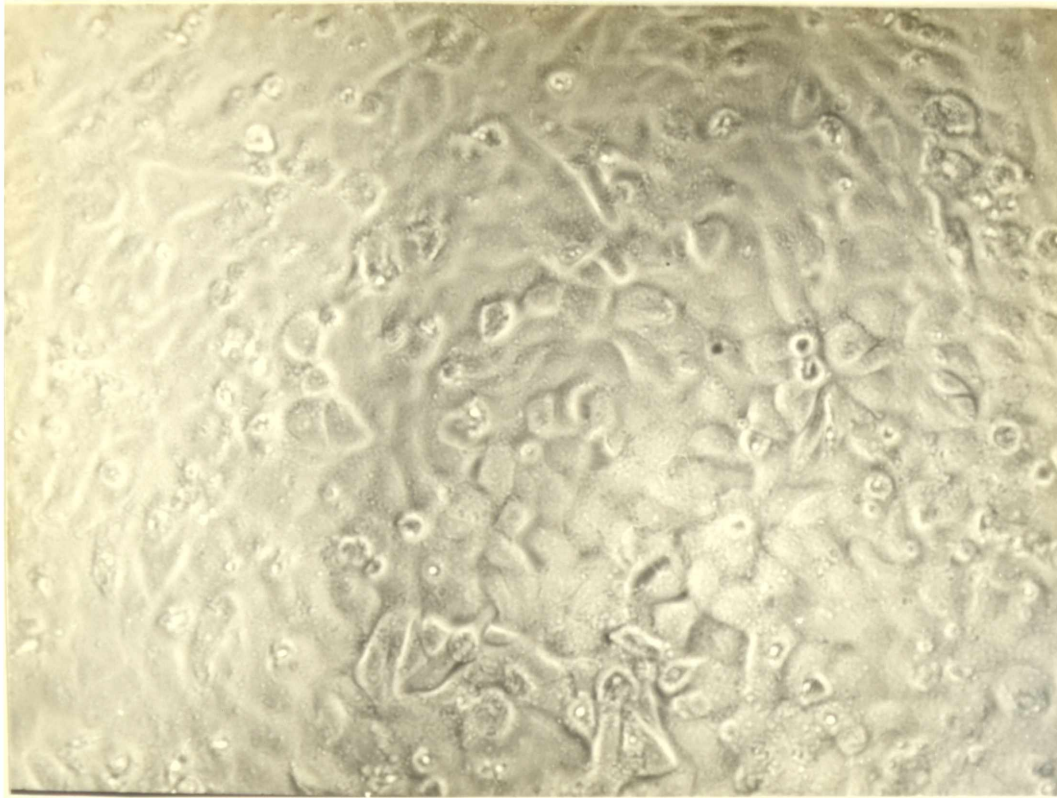


A: Unidades IPA(+) en una monocapa de células MA104; 20hs. post-infección.

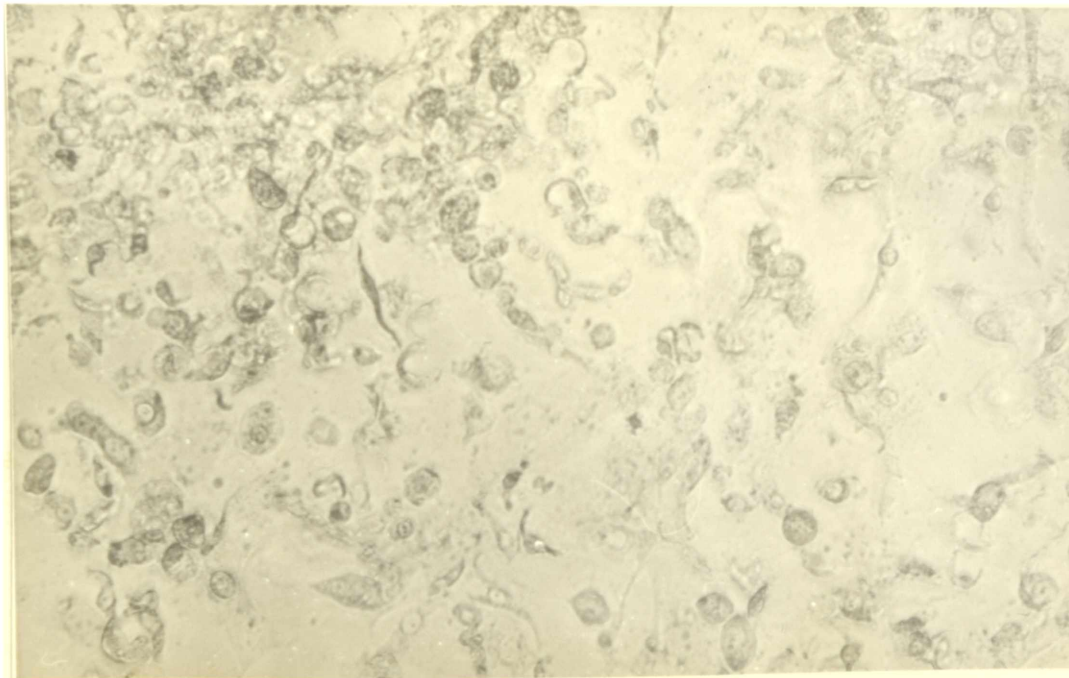


B: Focos IPA(+) en una monocapa de células MA104; 20hs. post-infección.

Figura 6.



A. Monocapa de células MA104 no infectada.



B. Monocapa de células MA104 a las 24 hs. de haber sido infectada con un rotavirus bovino

.

Figura 7.

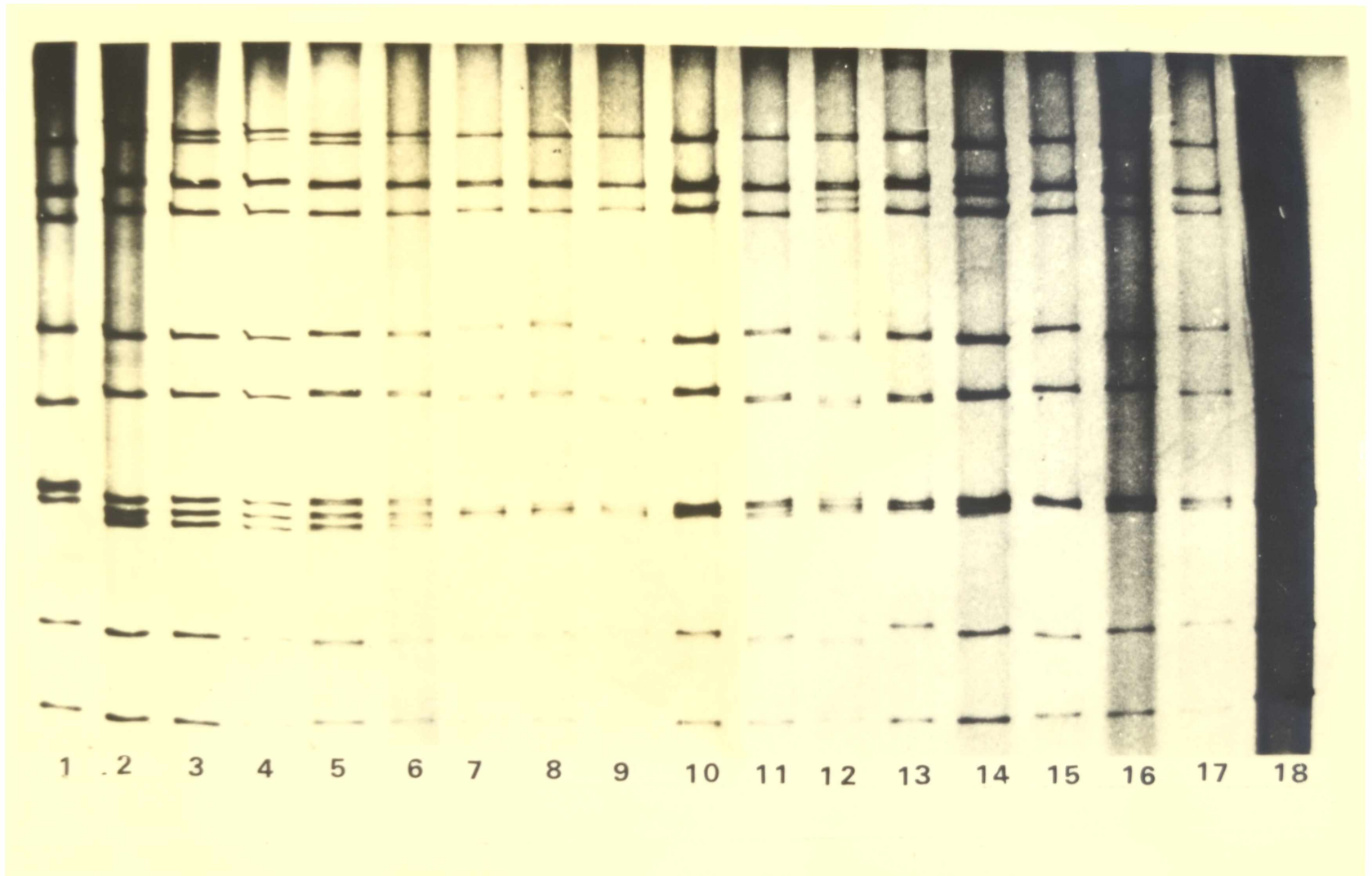


Figura 8: Patrones electroforéticos de cepas de rotavirus bovinos adaptadas a cultivos celulares (células MA104).

calle 18. Cepa UK prototipo, aislada en Inglaterra.

las cepas adaptadas, hecho que ocurrió con una sola muestra (Figura 8 línea 12), la que resultó contaminada con la cepa patrón UK de Inglaterra, la que en ese momento se estaba manejando en el laboratorio. La mayoría de los virus conservaron el patrón electroforético original. Sólo una muestra (T82, figura 8, calle 13) mostró variación en la migración de los segmentos 2 y 3 con respecto al virus original analizado en la figura 5A línea 2. Una cepa que en su electroferotipo original poseía el segmento uno desdoblado (Figura 5B, línea 2), mantuvo el patrón electroforético luego de su adaptación a cultivos celulares (Figura 8 líneas 2). Probablemente estos casos se deban a la presencia en las muestras originales de diferentes subpoblaciones virales.

#### 4.1.4 Estudio de los serotipos actuantes.

La tabla 6 muestra las DICC 50%/ml obtenidas entre el 3<sup>ro</sup> y 6<sup>to</sup> pasaje con las diferentes cepas. El efecto citopático fue fácilmente detectable, ya que al 5to. día post-inoculación en todas las diluciones en que se detectaba ECP, el mismo era de intensidad tal que destruía totalmente la monocapa, no quedando células adheridas al plástico en el pocillo infectado. La figura 9 muestra una microplaca de células MA104 sembrada con distintas diluciones de una cepa de rotavirus bovino. La misma fue fijada y teñida al 5to. día de infectada. Una vez tituladas las diferentes cepas, se serotipificaron según se indica en materiales y métodos.



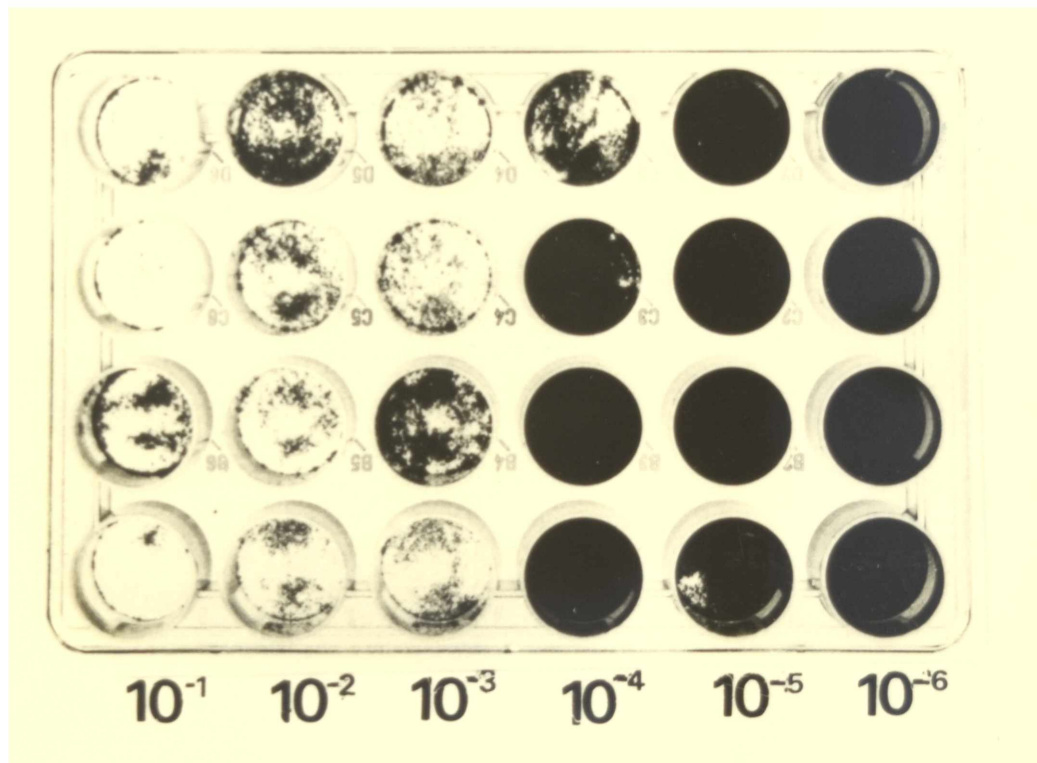


Figura 9: Determinación del título infectivo de una cepa de rotavirus, mediante la inoculación de diluciones progresivas y posterior observación del ECP. (la desaparición de la coloración oscura indica el ECP en cada pocillo). Los números ubicados debajo de cada línea de pocillos, indican las distintas diluciones del inóculo.

La tabla 7 nos muestra los títulos neutralizantes de los sueros hiperinmunes antiserotipo 1 bovino (UK Inglaterra) y anti serotipo 2 de E.E.U.U. cepa B223 del Dr Woode (Woode et al. 1983) contra cada una de las cepas adaptadas a cultivo celular.

#### 4.1.5 Estudio de proteínas de viriones purificados.

Con el objetivo de estudiar la composición polipeptídica de algunos virus mediante el análisis del perfil migratorio en geles de poliacrilamida, se purificaron viriones a partir de materia fecal mediante la técnica descrita en 3.3.1.1.1. La figura 10 muestra estos viriones tal como se observaron al ME.

En la figura 11 se observan los polipéptidos virales de tres cepas de rotavirus bovino en un gel de poliacrilamida 12% teñido con azul de Coomasie según la técnica detallada en 3.9. Se ven claramente las bandas correspondientes a las proteínas virales VP2 (parte interna del virión), VP6 (la proteína que está en mayor cantidad, y que posee el epítipo común para el antígeno del grupo) y VP7 (en la que se encuentran epítipes que determinan el serotipo). Se ven bandas más débiles que corresponden a VP1 y VP3. En las tres cepas aquí mostradas se puede observar que sus proteínas tienen un patrón de migración similar, pese a que las tres cepas poseían un genoma con patrones electroforéticos diferentes. Estos tres aislamientos se efectuaron en 3 lugares distintos (Ayacucho, Rauch y Tandil), cada uno distante del otro en más de 100 Km.

Tabla 7 Serotipos bovinos.

Virus	Títulos. Sueros hiperinmunes *		Serotipos		Otros
	UK (serotipo 1)	B223 (serotipo 2)	1	2	
UK	20.000	200	X		
B223	200	2.000		X	
T67	80.000	200	X		
T149	20.000	200	X		
T47	20.000	200	X		
T86	10.000	200	X		
T18	200	200			X
T107	10.000	200	X		
T40	10.000	200	X		
T96	5.000	200	X		
T82	5.000	100	X		
T51	5.000	200	X		
T21	100	100			X
T15	100	100			X
T14	100	100			X

\*Los títulos están expresados como la inversa de la máxima dilución que logro inhibir un 50% al efecto citopático.

*l*

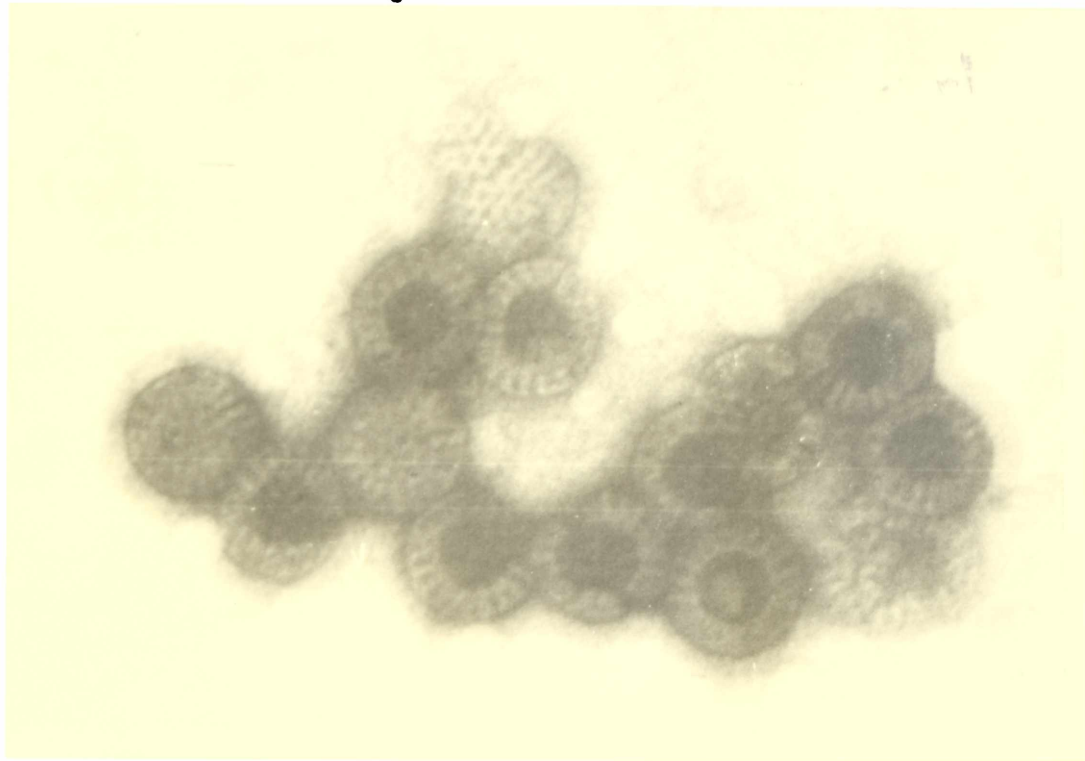


Figura 10: Rotavirus Bovino: Viriones purificados en CLCs, observados al M.E. (aumento 200.000x).

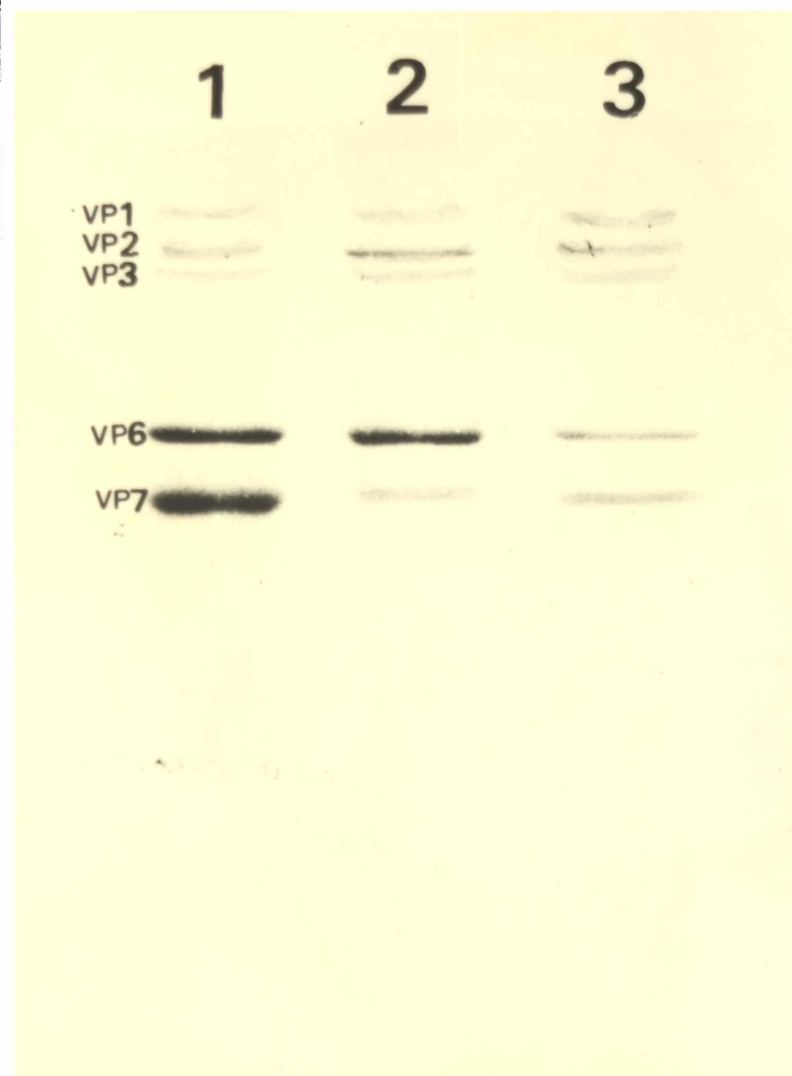


Figura 11: Rotavirus bovino; perfil polipéptidico obtenido a partir de viriones purificados de M.F. (electroforesis realizada en un gel de poliacrilamida al 12%. Visualización obtenida con azul de Coomasie).

calle 1: rotavirus bovino aislado en Tandil.  
 calle 2: rotavirus bovino aislado en Rauch.  
 calle 3: rotavirus bovino aislado en Ayacucho.

VP: Proteína viral.

#### 4.1.6 Estudio de la patogenicidad de algunas cepas de rotavirus aisladas en la Provincia de Buenos Aires.

Para estudiar la patogenicidad in vivo de algunas de las cepas aisladas, se inocularon terneros con el virus salvaje T82, cuyo electroferotipo se muestra en la figura 5 línea 2A y cuyas proteínas se analizaron en la figura 11 calle 1. Como se puede apreciar, la banda correspondiente a VP7 en esta muestra es mucho más intensa, lo que indica la existencia de una buena cantidad de partículas con las dos cubiertas completas. Este dato fue corroborado mediante ME.

Los 5 terneros fueron inoculados a los siete días de vida como se indica en materiales y métodos. La tabla 8 muestra el período de incubación de la enfermedad y duración de la misma. Se infectaron sólo 4 de los 5 inoculados, el virus comenzó a eliminarse en la MF a las 48 y 96hs post-inoculación, y la diarrea apareció generalmente el mismo día en que se inició la eliminación viral o el día siguiente. Los animales infectados eliminaron virus durante 5 a 7 días. En 3 de ellos la diarrea duró alrededor de 5 días y en el restante tuvo un curso de 14 días, produciendo finalmente la muerte del animal. El mismo fue hidratado y tratado con antibióticos y antidiarreicos. Mediante la prueba del PAGE, se pudo comprobar que el patrón electroforético del genoma de los virus eliminados en materia fecal, correspondía al del inóculo original.

Tabla 8. Inoculación experimental de terneros con rotavirus grupo A aislado en Pcia. de Bs. Aires.

Animales	1			2			3			4			5			(x) 6			(x) 7		
	D	EV	AN	D	EV	AN	D	EV	AN	D	EV	AN	D	EV	AN	D	EV	AN	D	EV	AN
-----																					
Días post inoculación																					
-----																					
0	-	-																			
1	-	-																			
2	+	-	X							X	X										
3	++	X	X		X	X	+	X	X		+	X									
4	+++	X		+	X	X	+	X	X		++	X									
5	+++	X		++	X		+++	X		+++	X		+								
6	+++	X		+++	X		++	X		+++	X										
7	+++			++	X		+	X		+++	X										
8	+++	X		++	X					+	X										
9	+++			+	X																
10	+++																			X	
11	+++																	++	X		
12	+++		X															+++	X		
13	+++		X															++	X		
14	+++		X															+	X		
15	muerto																				

D: diarrea

+++ : abundante y líquida

EV: eliminación vírica

++ : moderada, semilíquida

AN: anorexia

+ : leve, pastosa

(x): los animales 6 y 7 fueron controles no inoculados

En el día inicial de la diarrea las deposiciones fecales fueron copiosas, de consistencia pastosa y color amarillo; al día siguiente la materia fecal tomó consistencia líquida y aumentó el volumen de materia fecal eliminada apapreciendo sucia la zona perineal y la cola del ternero.

En los cuadros que remitieron, luego del segundo día, la materia fecal eliminada mostró nuevamente la consistencia normal y fue disminuyendo la frecuencia de deposiciones hasta normalizarse el cuadro alrededor del 5to. día. El animal que murió presentó diarrea líquida desde el segundo día del inicio de la enfermedad y fue abundante hasta el día 13, cuando murió. El apetito en los 3 terneros que no murieron apareció disminuído el día anterior al inicio de la diarrea y al día siguiente, normalizándose luego. En el ternero que presentó un cuadro grave, el apetito apareció disminuído al iniciar el cuadro y al día 11 de iniciada la diarrea, mostrando decaimiento general y permaneciendo inmóvil en el piso desde el día 12 hasta su muerte. La figura 12 muestra al ternero en pleno episodio diarreico.

Uno de los terneros inoculados no mostró signos de diarrea ni eliminó virus en ningún momento.

De los dos controles, uno de ellos permaneció normal durante el experimento y el otro presentó inesperadamente diarrea el día 11 de comenzada la experiencia, la misma duró 4 días durante los cuales eliminó rotavirus. Al PAGE se comprobó que el patrón electroforético correspondía al virus inoculado, esto indica que dicho animal se contagió de los





Figura 12: Síndrome diarreico en un ternero inoculado experimentalmente con una cepa de rotavirus, aislada en Argentina, (Pcia. de Bs. Aires).

inoculados a pesar de estar en un lugar distante unos 100 metros de este grupo.

## 4.2 Rotavirus en cerdos de Brasil y Argentina.

### 4.2.1 Detección de rotavirus en lechones con diarrea en San Pablo, Brasil.

De las 302 muestras obtenidas de lechones con diarrea, en enero de 1985, en 19 criaderos de cerdos (ubicados en 8 distritos del Estado de San Pablo), 62 (20,58%) fueron positivas (20,5%) a la prueba de ELISA Y 55 (18,2%) cuando fue analizado el ARN genómico mediante el PAGE. El virus fue detectado en 16 de los 19 criaderos. En las 200 muestras de lechones aparentemente sanos sólo hubo 3 positivos (1,5%) (ver tabla 9).

La figura 13 muestra la localización geográfica de los distritos estudiados. En la tabla 10 se puede observar el índice de infección a rotavirus en los distintos grupos etarios. El grupo más afectado resultó el de 7 a 21 días de vida.

Cincuenta y uno de las 55 muestras PAGE (+) mostraron una migración electroforética de su ARN genómico con un reagrupamiento de segmentos correspondiente al descrito para el grupo A, con variantes de menor importancia en la migración de cada segmento (figura 14). La presencia de electroferotipos mezclados fue clara en algunas muestras (calles 1,8,10).

Tres muestras PAGE (+) fueron ELISA (-) y presentaron un electroferotipo similar al descrito para el grupo B de rotavirus (Pedley et al. 1983). Un patrón de este tipo fue también detectado mezclado con un electroferotipo

Tabla 9. Frecuencia de infección a rotavirus en lechones de Brasil. Datos comparativos entre animales con diarrea y sin diarrea.

	No MUESTRAS	ELISA (+)	PAGE (+)	ELISA (+)	PAGE (-)	ELISA (-)	PAGE (+)
ANIMALES C/DIARREA	302	62	55	7			3
ANIMALES S/DIARREA	200	3	3	0			0



- 1 JUNDIAÍ
- 2 PIRASSUNUNGA / ANALÂNDIA
- 3 CAPIVARI
- 4 BRAGANÇA PAULISTA
- 5 LEME
- 6 TIETÊ
- 7 SÃO JOSE DOS CAMPOS / JAMBEIRO
- 8 VINHEDO

### FIGURA 13

Rotavirus en cerdos de Brasil.

Localización Geográfica de los distritos estudiados en el Estado de San Pablo.

Tabla 10. Frecuencia de infección a rotavirus relacionada con la edad en lechones de Brasil.

EDAD(días)	(ELISA +) POSITIVOS	
	No de casos	%
0-7	3	5
7-21	35	56
21-35	19	30
* mas de 35 días	5	9
TOTAL	62	100

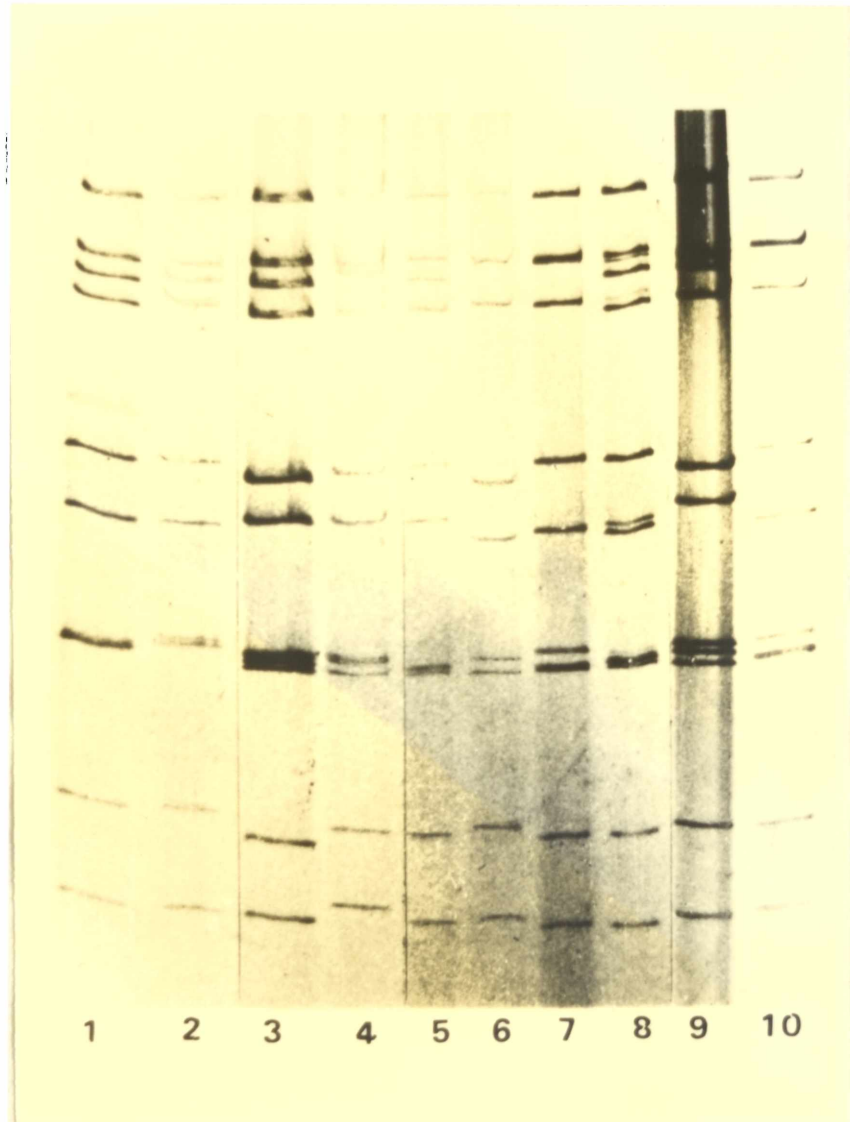


Figura 14: Diferentes electroferotipos del genoma de rotavirus porcinos grupo A, detectados en Brasil.

característico para el grupo A. Esta muestra resultó positiva a la prueba de ELISA.

Estos rotavirus atípicos fueron detectados en cuatro de los diecinueve lugares estudiados (21,1%), ubicados entre 100 a 200 km uno de otro. Ellos representan el 6,2% de los 65 animales positivos detectados por los 2 métodos ya mencionados.

La figura 15 muestra los perfiles de los electroferotipos atípicos comparados con los electroferotipos grupo A de diferentes especies. Se pueden observar algunas diferencias entre los patrones tipo B. Cada uno de estos electroferotipos pertenecen a un lugar diferente. En todos los criaderos donde se hallaron virus tipo grupo B, fueron también aislados rotavirus grupo A.

Cuando las muestras con rotavirus atípico fueron analizadas nuevamente por PAGE algunas semanas después, se observó que la cantidad de ARN viral había disminuído notablemente y, después de un tiempo, las muestras fueron totalmente negativas. En la figura 16, se puede ver la imagen de partículas víricas correspondientes a rotavirus atípicos, en donde se puede observar que algunas partículas virales aparecen en vías de degradación.

En agosto de 1985, se estudiaron nuevamente tres establecimientos estudiados en enero, y en los cuales se habían aislado los rotavirus atípicos.

De sesenta y ocho muestras procesadas, trece fueron ELISA positivas y veintiuna PAGE positivas. Nuevamente se



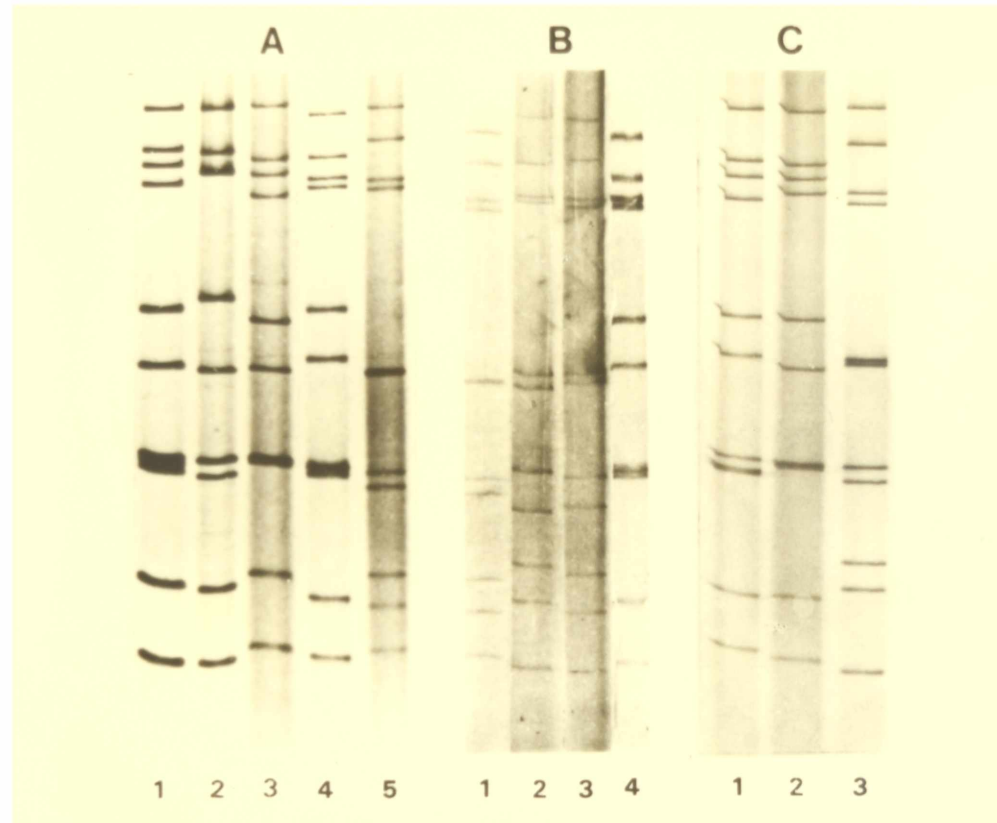


Figura 15: Electroferotipos del genoma de rotavirus atípicos hallados en cerdos de Brasil, comparados con electroferotipos de rotavirus grupo A.

Panel A: calle 1. rotavirus bovino (grupo A).  
 calle 2. rotavirus equino (grupo A).  
 calle 3. rotavirus porcino (grupo A).  
 calle 4. rotavirus simio SA11 (grupo A).  
 calle 5. rotavirus porcino atípico.

Panel B: calle 1 a 3. rotavirus porcinos atípicos.  
 calle 4. rotavirus simio SA11 (grupo A).

Panel C: calles 1 y 2. rotavirus porcino (grupo A)  
 calle 3. rotavirus porcino atípico obtenido 6 meses después del primer hallazgo (Panel B).

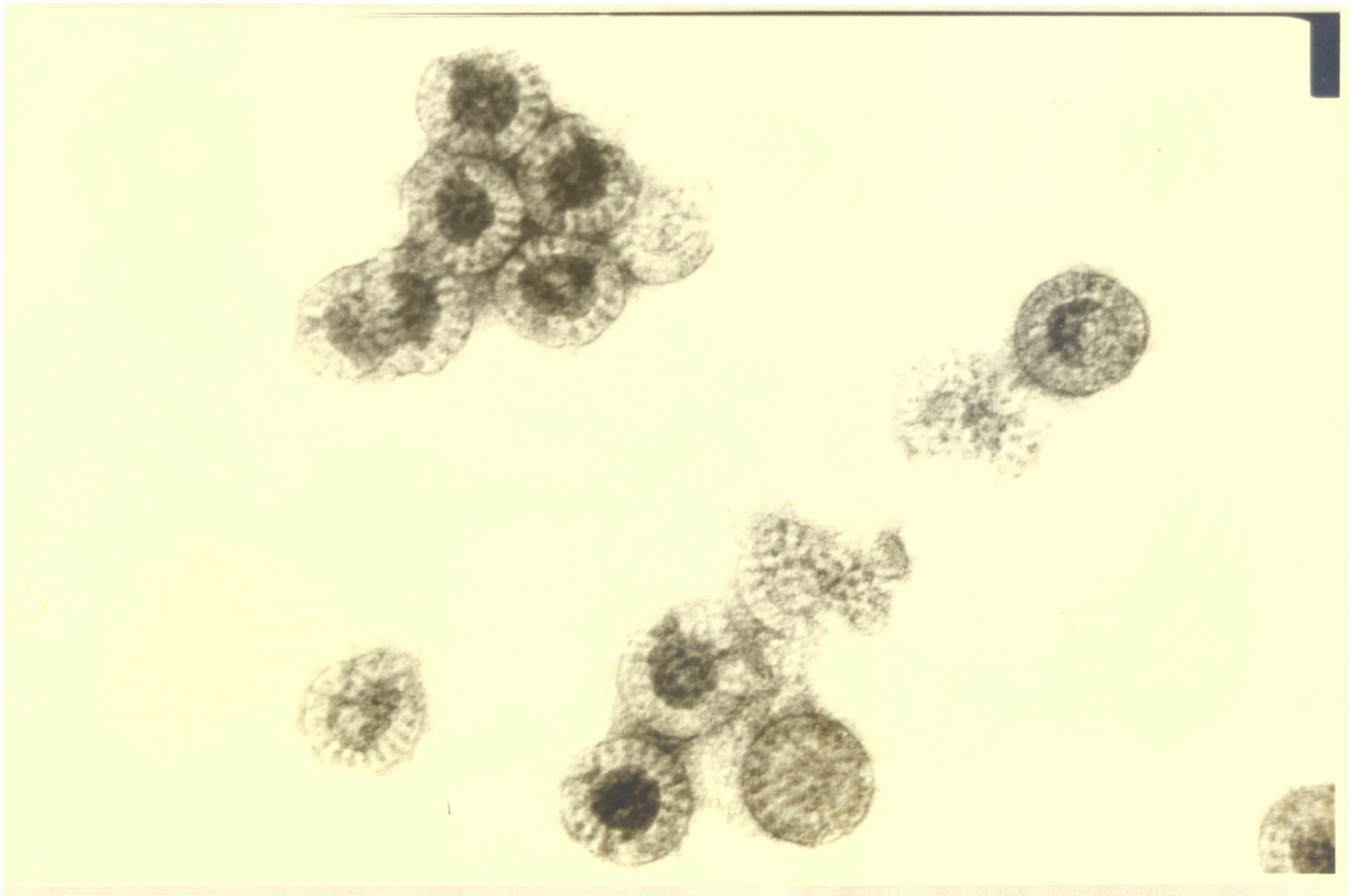


Figura 16: Observación al M.E. de partículas víricas de un rotavirus atípico hallado en cerdos de Brasil. (aumento 200.000x).

encontró rotavirus grupo A en los tres criaderos. Virus de una muestra de un establecimiento y ocho de otro, fueron identificados como rotavirus atípico con un electroferotipo similar al de los aislados en enero en el mismo lugar (figura 15 panel C calle 3).

#### 4.2.1.1 Infección experimental en lechones con rotavirus atípicos aislados en Brasil.

En este caso se inocularon 8 lechones de los cuales 5 desarrollaron diarrea a partir de las 48 y 120 horas post-inoculación. La materia fecal fue al principio pastosa y en pocas horas se tornó líquida, color amarillo brillante. En los dos primeros días luego de iniciado el cuadro, el apetito estuvo levemente disminuído y posteriormente se normalizó. Dos de los lechones murieron al 4to. día de iniciada la diarrea, mientras que el resto mostró signos de mejoría entre el 4to. y 5to. día del curso de la enfermedad.

Los dos lechones que murieron, a la necropsia, sólo se observó un cuadro severo de deshidratación por intensa hiperemia de yeyuno e íleon.

Los lechones que enfermaron iniciaron la eliminación de virus el día antes, durante o el día después de comenzar con la diarrea. La eliminación de virus en todos los casos duró e de aproximadamente 5 días. En todas las heces de lechones infectados se mantuvo el electroferotipo atípico siendo siempre ELISA negativas.

Uno de los lechones que no presentó diarrea eliminó virus desde las 96 hs hasta las 144 hs post-inoculación.

Los viriones eliminados por estos animales también mostraron la misma fragilidad que los de las muestras originales provenientes de Brasil, y las muestras obtenidas no fueron efectivas para intentar nuevas inoculaciones.

#### 4.2.2 Detección de rotavirus en criaderos de cerdos del SE de la provincia de Buenos Aires.

Se estudiaron dos establecimientos, uno ubicado en la ciudad de B. Juárez y el otro en la ciudad de Tandil.

##### 4.2.2 .1 Estudio longitudinal en un criadero de cerdos de B. Juárez, Bs. Aires.

En este lugar se estudiaron los brotes de diarrea que se produjeron en lechones desde septiembre de 1985 a junio de 1986. Este establecimiento presentaba problemas de diarreas en lechones de hasta 20 días de vida desde hacía unos tres años. El criadero poseía unas 60 madres que parían en jaulas y en ese lugar permanecían con sus lechones durante 35 a 40 días, fecha en que se producía el destete. El piso de la maternidad era de concreto y las condiciones higiénicas del lugar eran buenas.

En septiembre de 1985 se produjo un brote de diarrea afectando un 20% de las camadas, con una morbilidad dentro de cada una de ellas oscilante entre un 80 a 100%. La mortalidad varió entre el 2 y el 5%. Se tomaron 7 muestras de lechones con diarrea de 4 a 10 días de vida. Todas las muestras resultaron positivas a las pruebas de PAGE y ELISA.

Se encontraron dos electroferotipos diferentes. En un caso, el segmento once estaba ausente en el perfil electroforético del ARN y aparecía una banda adicional entre los segmentos de ARN 6 y 7 (figura 17 panel A calle 3). Los otros patrones son los mostrados en la figura 17 panel A calles 2 y 4 en los que se observan perfiles electroforéticos correspondientes a mezclas de virus.

La particularidad descrita anteriormente motivó el interés de estudiar ese lugar con más detalle. Durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 1985 y junio de 1986 se realizaron muestreos adicionales. La tabla 11, muestra los datos correspondientes.

Hasta diciembre de 1985 la situación sanitaria del establecimiento fue similar a la de septiembre y se encontró rotavirus en el 100% de las muestras diarreicas tomadas.

Un total de 28 muestras positivas fueron analizadas y, en todos los casos, se encontró un patrón electroforético anormal del ARN viral, el cual fue descrito anteriormente y, en todos los casos, las muestras fueron ELISA positivas indicando que estos rotavirus pertenecían al grupo A. En junio de 1986, sólo una muestra fue positiva al PAGE de 12 provenientes de lechones con diarrea, y la misma fue negativa al ELISA mostrando un electroferotipo genómico similar al descrito para el grupo E (Pedley et al. 1986).

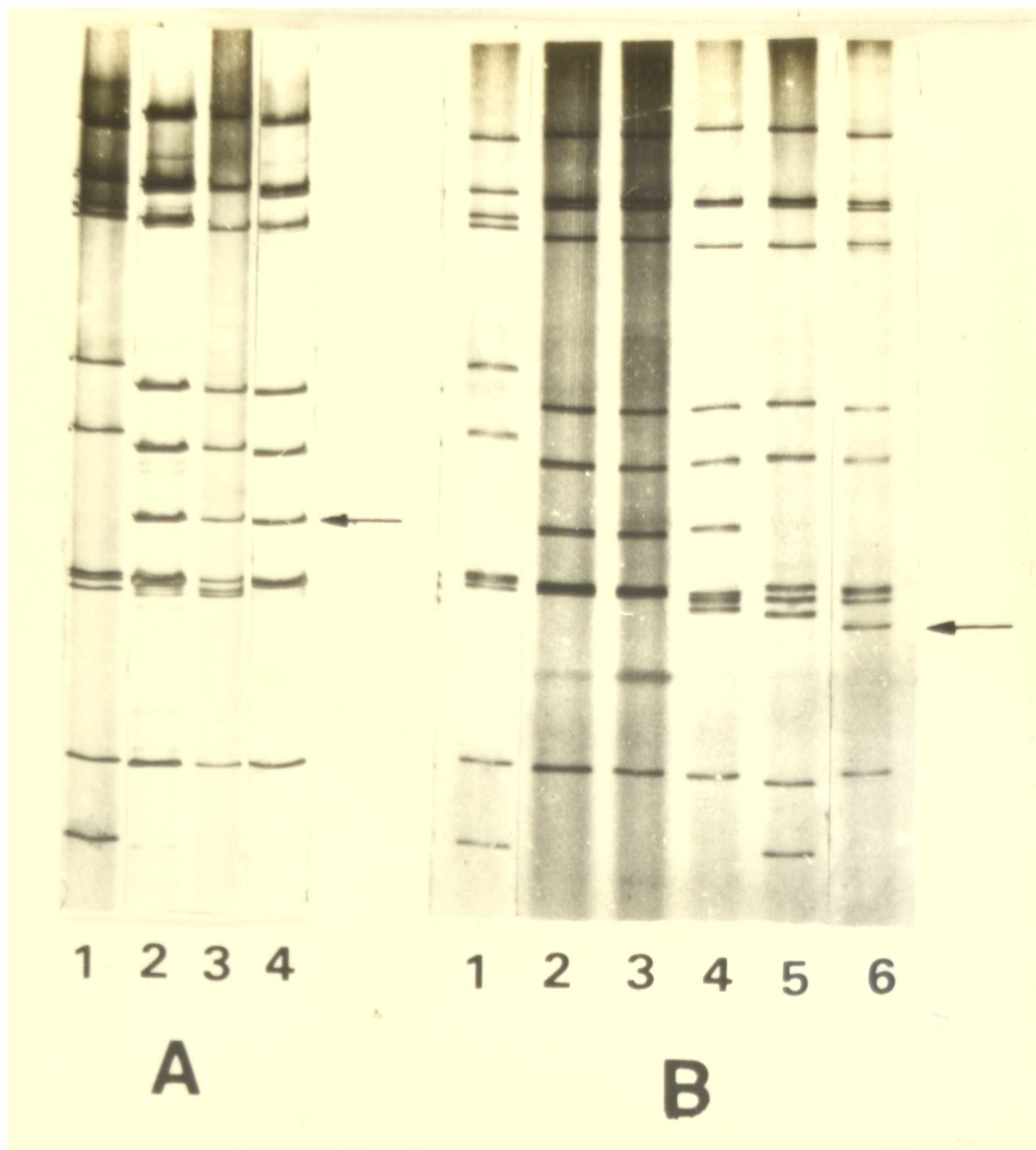


Figura 17: Rearreglo genómico en rotavirus porcinos grupo A de la R. Argentina. Perfil electroforético en geles de poliacrilamida al 10%, teñidos con nitrato de plata.

**Panel A-calle 1:**

rotavirus simio SA11 (prototipo).

**calle 2 a 4:**

rotavirus porcino con rearreglo genómico del segmento 11; (flecha); (muestra de MF obtenida de cerdos con diarrea en B. Juárez Pcia. de Bs. Aires)

**Panel B-calle 1:**

rotavirus simio SA11 (prototipo).

**calle 2 a 4:**

rotavirus porcinos con rearreglo genómico luego de haberse adaptado a crecer en células MA104.

**calle 5:**

rotavirus porcino con electroferotipo normal aislado en Tandil.

**calle 6:**

rotavirus porcino con rearreglo genómico del segmento 11 (flecha) aislado en Tandil. (Bs. Aires-Argentina).

Tabla 11. Estudio longitudinal de la presencia de rotavirus en un criadero de cerdos de B. Juarez, Pcia. de Bs. As., Argentina.

FECHA DE MUESTREO	ANIMALES MUESTREADOS	POSITIVOS		NEGATIVOS		% CAMADAS C/DIARREA	MORTALIDAD %
		C/D	S/D	C/D	S/D		
Set/85	7	7	-	-	-	20	2
Oct/85	9	8	-	-	1	20	3
Nov/85	24	7	-	-	17	40	5
Dic/85	6	6	-	-	-	20	5
Jun/85	12	1 (2)		4	7	25	5

C/D con diarrea

S/D: sin diarrea

(1): PAGE y ELISA

(2): PAGE (+) ELISA (-)

#### 4.2.3 Estudio de la presencia de rotavirus en un criadero de la ciudad de Tandil.

Este lugar está situado a unos 100 km del descripto anteriormente. El mismo estaba compuesto por 160 madres y las condiciones de alojamiento fueron similares, aunque higiénicamente estos se encontraban en peores condiciones.

El primer muestreo se efectuó en julio de 1986. En ese momento había un 20% de camadas con diarrea y los índices de morbilidad y mortalidad en las camadas afectadas fueron de 100 y 80% respectivamente. En cuatro de 12 muestras de lechones con diarrea de 4 a 10 días de vida se detectó rotavirus. Las cuatro muestras fueron ELISA y PAGE positivas. El PAGE reveló dos electroferotipos diferentes. Tres muestras poseían el patrón normal para el grupo A (figura 17, panel B calle 5) y una mostró un perfil del ARN anormal, en donde faltaba el segmento 11 y mostraba una banda adicional migrando cerca del segmento 9 (figura 17, panel B, calle 6). Quince días después se obtuvieron 15 muestras más y se encontraron dos muestras PAGE y ELISA positivas. En ambos casos se encontró el electroferotipo anormal descripto en el primer muestreo.

#### 4.2.4 Adaptación de rotavirus porcinos a cultivos celulares (células MA-104).

Utilizando los mismos métodos empleados en la adaptación de rotavirus bovinos, se intentó adaptar las cepas porcinas. A todas las muestras positivas se les efectuó una prueba de



IPA para determinar la cantidad de partículas infectivas que poseía cada una.

#### 4.2.4.1 Determinación de la infectividad por medio de la prueba de IPA.

A todas las muestras obtenidas se les efectuó la prueba de IPA. Las obtenidas en Benito Juárez mostraron de 60 a 200 unidades IPA por campo 100x y las muestras obtenidas en Tandil, entre 50 a 100 unidades IPA por campo 100x.

#### 4.2.4.2 Infección de células MA-104 con rotavirus porcinos aislados en B. Juárez.

Se eligieron 4 cepas aisladas en B. Juárez para ser adaptadas a cultivos celulares. Estas cepas produjeron ECP al 2do. ó 3er. pasaje en células MA-104. Tres de ellas conservaron el electroferotipo anormal, dos poseían un patrón similar (segmentos 7, 8 y 9 juntos) y la otra uno diferente con los segmentos 7, 8 y 9 separados, (figura 17B calles 3 y 4 respectivamente).

La otra muestra varió su electroferotipo al adaptarse, mostrando un perfil característico del grupo A. Probablemente esto se debió a la existencia de una cepa con electroferotipo normal mezclada con el virus atípico siendo preferentemente seleccionada durante su replicación "in vitro". Se efectuó un PAGE comparativo de esta cepa con los virus que se manejaban en el laboratorio para descartar una contaminación y se observó que el patrón electroforético de su genoma no correspondía a ningún otro rotavirus, por lo que se confirmó que se trataba de una nueva cepa.

Las cepas que conservaron el perfil atípico, mostraron un comportamiento anormal en células MA-104 cuando se efectuaron pasajes a baja multiplicidad. En diluciones mayores que  $10^{-1}$  no produjeron ECP evidente hasta el 5to. día post-infección, momento en que se le efectuó a la placa una prueba de IPA observándose células con antígeno viral hasta en una dilución de  $10^{-4}$  (figura 18). Esto indica una dificultad de los viriones para egresar de la célula infectada y amplificarse.

La figura 19 muestra células MA-104 a las 48 horas de ser infectadas con una dilución del inóculo original de  $10^{-1}$ .

Esta particularidad en el comportamiento en cultivos celulares se observó hasta en el pasaje No. 7, con el que se intentó titular y clonar los virus. Todas las cepas con perfil electroforético normal, tanto las de bovino como las de cerdo, no mostraron esta característica.

#### 4.2.4.3 Infección de células MA-104 con rotavirus porcinos aislados en Tandil, Buenos Aires.

Se replicaron en células MA-104 dos cepas con perfil de ARN normal y 3 con perfil atípico. En los primeros 3 pasajes se logró adaptar las 2 cepas con perfil normal, y de las 3 que poseían perfil atípico sólo se logró adaptar una, la que en su análisis posterior por PAGE mostró que poseía un perfil idéntico a las otras 2 adaptadas con perfil electroforético normal. Esto fue una evidencia de que estaban mezcladas y que en los cultivos celulares se

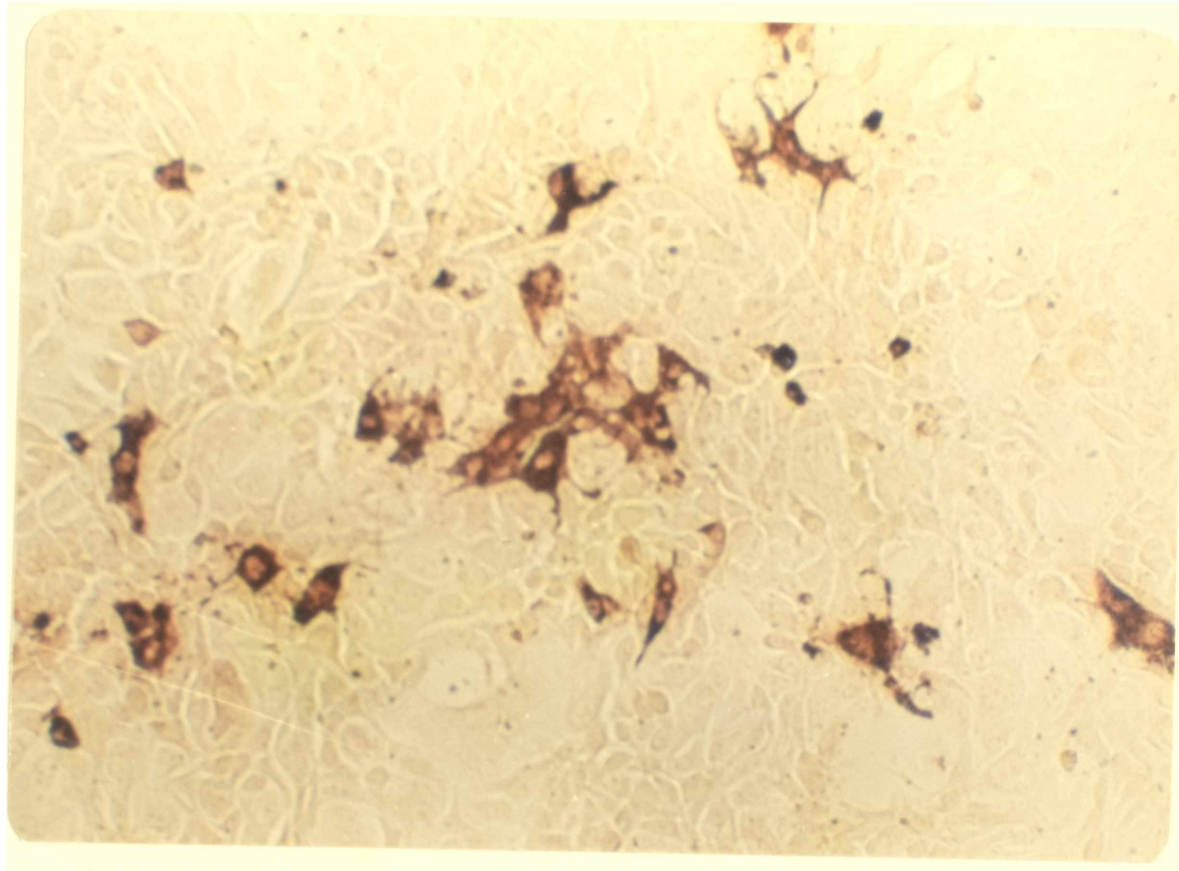


Figura 18: Ensayo de inmunoperoxidasa sobre células MA104 infectadas a baja multiplicidad, con un rotavirus porcino que presentaba rearrreglo del segmento genómico No 11. (5to. día post-infección).

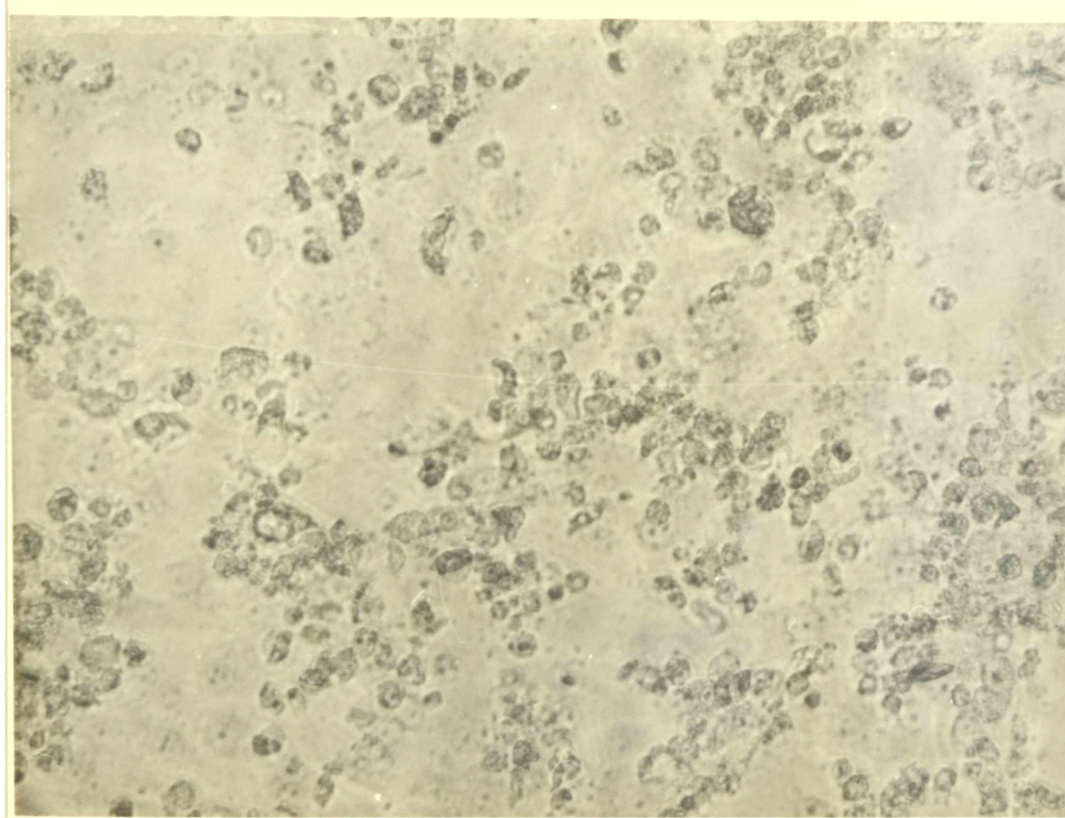


Figura 19: Monocapa de células MA104 a las 48hs. de haber sido infectada con un rotavirus porcino grupo antigénico A, que presentaba rearreglo del segmento genómico No 11.

seleccionó la cepa con perfil normal, aunque la misma no era visible en el PAGE de la muestra original.

Se tomó una de las tres muestras originales con perfil atípico y se inocularon tres lechones de diez días de vida que se encontraban separados de su madre y alimentados con leche de vaca. Todos los lechones desarrollaron diarrea entre las 48 y 120 hs post-inoculación, coincidiendo con el inicio de eliminación de virus en sus heces; todos eliminaron virus durante aproximadamente 5 días, y el perfil electroforético del ARN fue idéntico al de la muestra original (atípico). Con muestras provenientes de este pasaje por lechones, se intentó nuevamente adaptar esta cepa a células MA-104, logrando producir ECP al 3er. pasaje, conservando el electroferotipo atípico.

En la figura 19B líneas 5 y 6 se muestra el perfil normal y atípico respectivamente del ARN genómico de estas cepas.

#### 4.2.5 Infección experimental en lechones con cepas de rotavirus porcinos grupo antigénico A, con perfil genómico atípico en el PAGE.

En este experimento fueron inoculados 5 animales. La diarrea comenzó entre las 48 y 96 horas post-inoculación y al iniciarse el cuadro, pudo observarse anorexia y dolor abdominal. Enfermaron los cinco animales inoculados y todos presentaron el mismo cuadro: la diarrea en las primeras horas se caracterizó por deposiciones copiosas y materia fecal de consistencia cremosa, color blanco-amarillento; más

tarde las deposiciones se hicieron líquidas y de color amarillo brillante. A los tres días de iniciada la diarrea los lechones mostraron signos de deshidratación y entre el 4to. y 5to. día murieron 4 de los 5 animales. El restante fue observado durante 10 días adicionales y pese a que al 6to. día la diarrea remitió su estado general no mejoró, y murió a los 30 días de edad. Los hallazgos de la necropsia fueron similares a los descritos en la inoculación experimental realizada con virus atípicos de Brasil.

Los 4 lechones que murieron eliminaron virus desde el día anterior al inicio del cuadro diarreico hasta el día de su muerte. El restante eliminó virus hasta 7 días después del comienzo de la diarrea. En todos los casos los viriones que eliminaron los animales poseían el genoma con el patrón electroforético atípico, característico de la muestra original. Se observaron muestras en ME no detectándose partículas víricas diferentes a rotavirus. Los controles no mostraron signos de enfermedad mientras duró el experimento (20 días).

Posteriormente, se inocularon otros tres lechones con los mismos inóculos. Los animales fueron sacrificados a las 24, 48 y 72 hs post-inoculación respectivamente y se tomaron muestras para microscopía óptica (MO) y ME de intestino. Al MO pudieron observarse lesiones principalmente en intestino delgado anterior y medio. Las mismas se caracterizaron por disminución del espesor del epitelio de absorción y aparición de vacuolas en su interior, adherencia entre vellosidades e

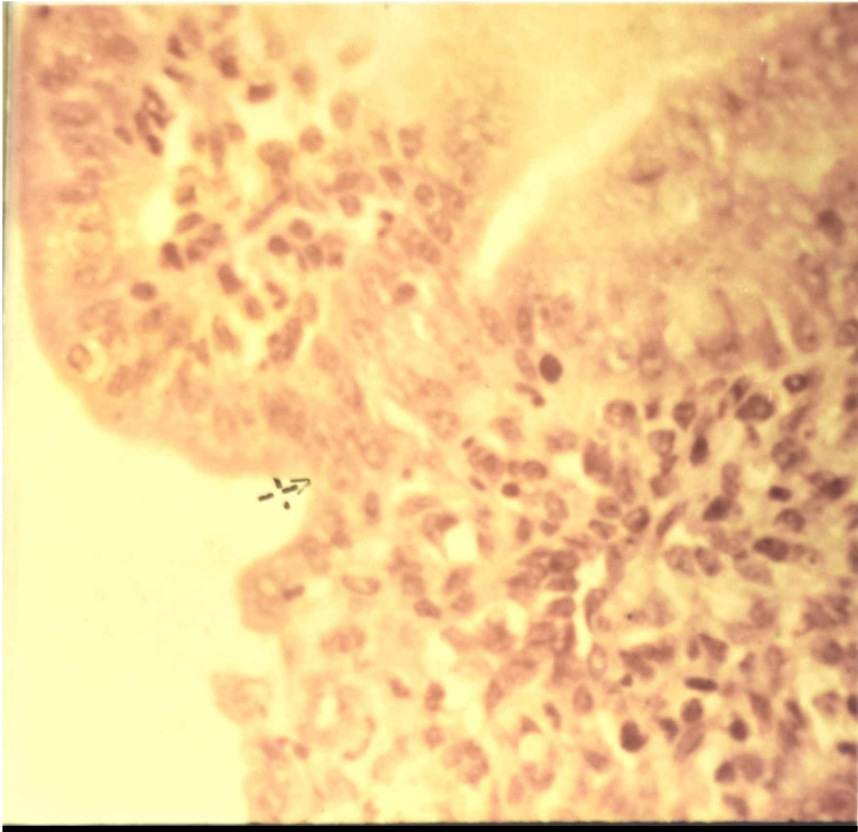
infiltración linfocitaria de la lámina propia (fig.20 A y B).

En la figura 21 se puede observar a nivel ultraestructural una célula intestinal infectada por rotavirus

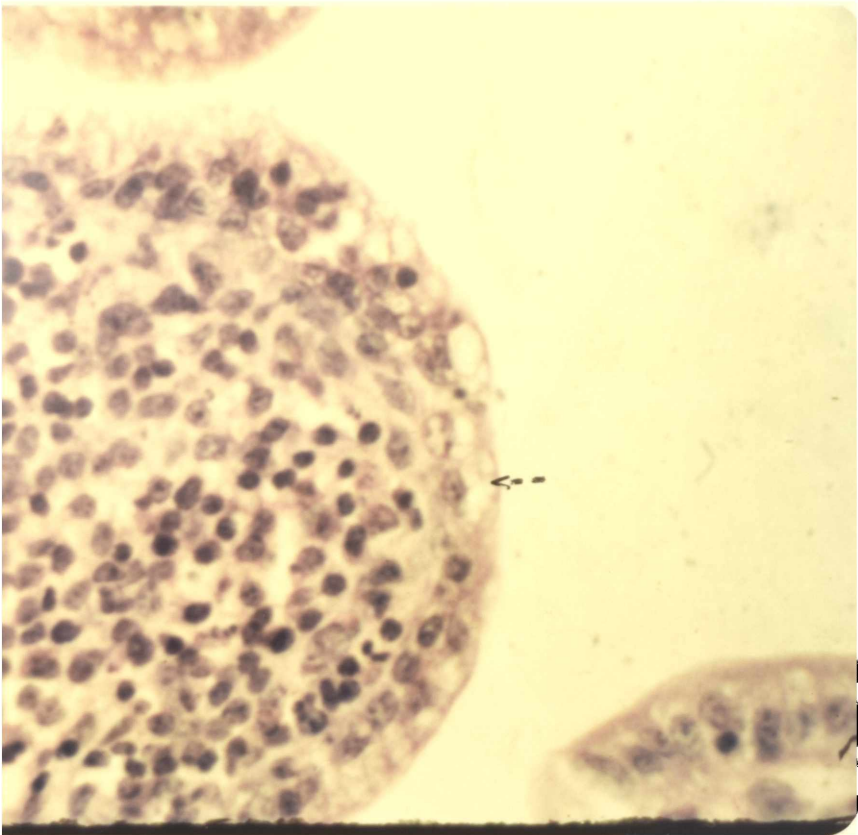
#### 4.2.5.1 Infección experimental de lechones con una cepa de rotavirus grupo A con perfil genómico normal.

Se inocularon 10 animales quedando 3 como control. De los animales inoculados, 8 enfermaron iniciándose la diarrea entre las 24 y 96 horas post-inoculación. En los dos primeros días mostraron disminución del apetito y signos de dolor abdominal. En 4 animales, presentaron diarrea severa y murieron entre el 4to. y 6to. día del curso de la enfermedad. Los otros cuatro, mostraron mejoría al 3er. día del comienzo de la diarrea, aunque luego presentaron cuadros intermitentes de diarrea y retardo en el crecimiento hasta el final del experimento (día 20 post-inoculación). Las características del cuadro diarreico fueron las mismas que las descritas en la inoculación con las cepas de perfil genómico atípico. Los animales que enfermaron y murieron, eliminaron virus desde el 2do. y 3er. día post-inoculación hasta el 5to. y 6to. día; a partir de los cuales no se pudo detectar nuevamente virus.

Las muestras fueron analizadas por PAGE y el patrón electroforético del ARN de los viriones eliminados por los lechones fue idéntico al del inóculo. A la observación por ME no se detectaron otros virus.



A. Adherencia entre vellosidades intestinales. (flecha).



B. Disminución del espesor del epitelio de absorción y vacuolización. (flecha). Infiltración de la lámina propia.

Figura 20: Cortes histológicos de yeyuno en un cerdo infectado experimentalmente con un rotavirus porcino con rearreglo genómico, aislado en Benito Juárez Pcia. de Bs. Aires. Coloración H. y E. (400x)



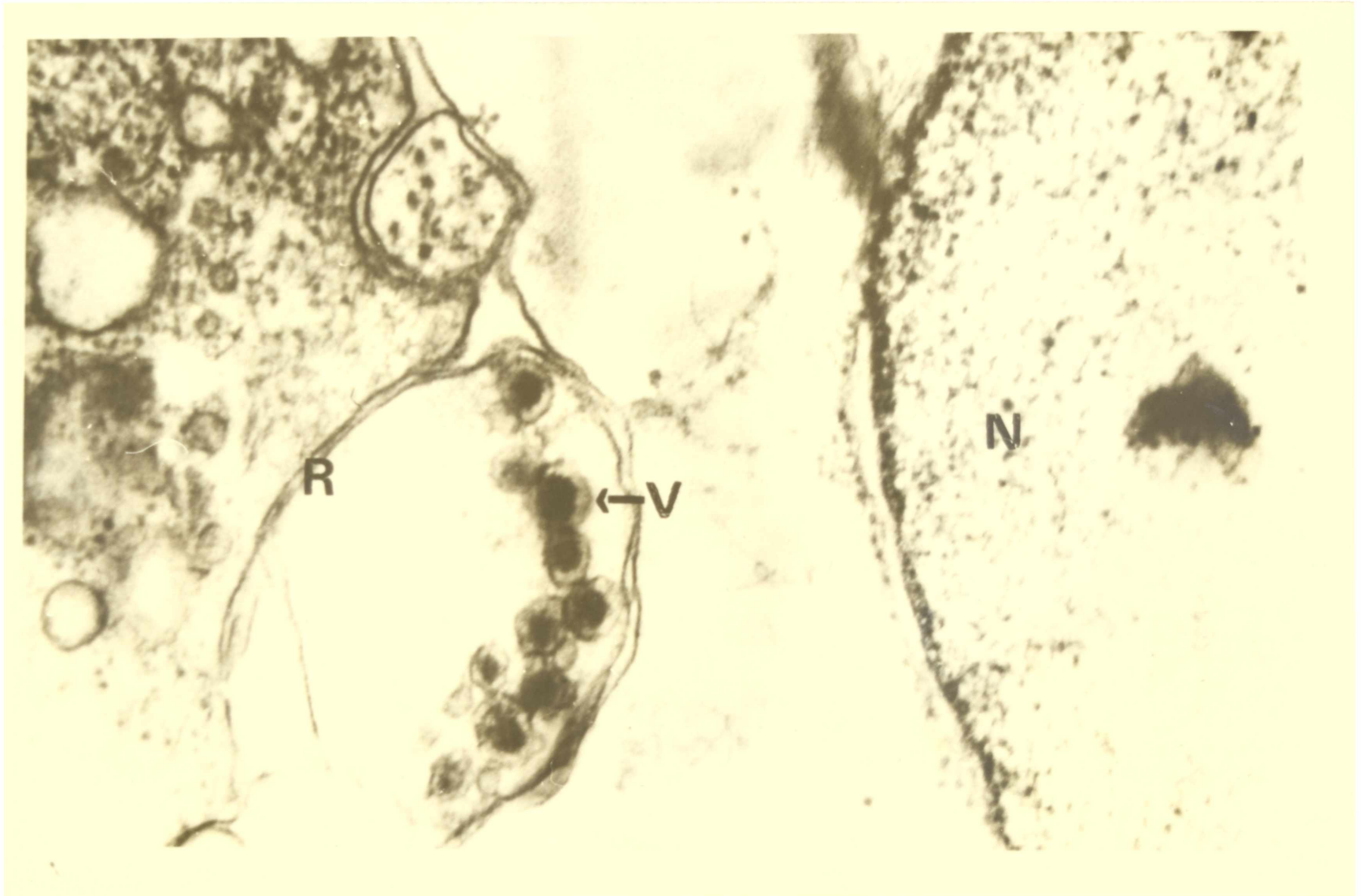


Figura 21: Observación ultraestructural de un corte de intestino medio, de un cerdo de 10 días de vida a las 24 horas de haber sido inoculado con un rotavirus porcino aislado en Benito Juárez-Pcia. de Bs. Aires.

Dicho virus poseía un rearreglo en el segmento 11 de su genoma .

Aumento (40.000X).

N: Núcleo. R: cisterna del retículo endoplasma.

V: viriones (aún conteniendo envoltura lipídica)

Dos lechones del grupo inoculado, y los tres controles permanecieron sin síntomas a lo largo del experimento y no eliminaron viriones en su materia fecal.

Las observaciones de necropsia no variaron de las descritas en las otras inoculaciones experimentales.

#### 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.

En este caso los virus fueron replicados en células MA-104 y marcados con  $S^{32}$  metionina según la técnica descrita en 3.10. En la figura 22 se observan los péptidos virales totales y los péptidos inmunoprecipitados (panel A). En la misma se puede apreciar que no hay variación en la migración de los distintos polipéptidos virales entre las cepas atípicas (grupo A) y la cepa patrón grupo A Ohio State University (OSU) de E.E.U.U. Vercalles 1 y 2 donde se analizan los péptidos totales.

La migración de estos péptidos muestra algunas diferencias con la cepa UK bovina.

En las cepas grupo A con perfil atípico no se observa la falta de ningún péptido en su perfil electroforético.

Se puede observar que la cepa porcina que luego de adaptada a cultivo celular, mostró un perfil genómico normal a pesar de provenir de una cepa de una cepa con patrón electroforético atípico, muestra una migración de

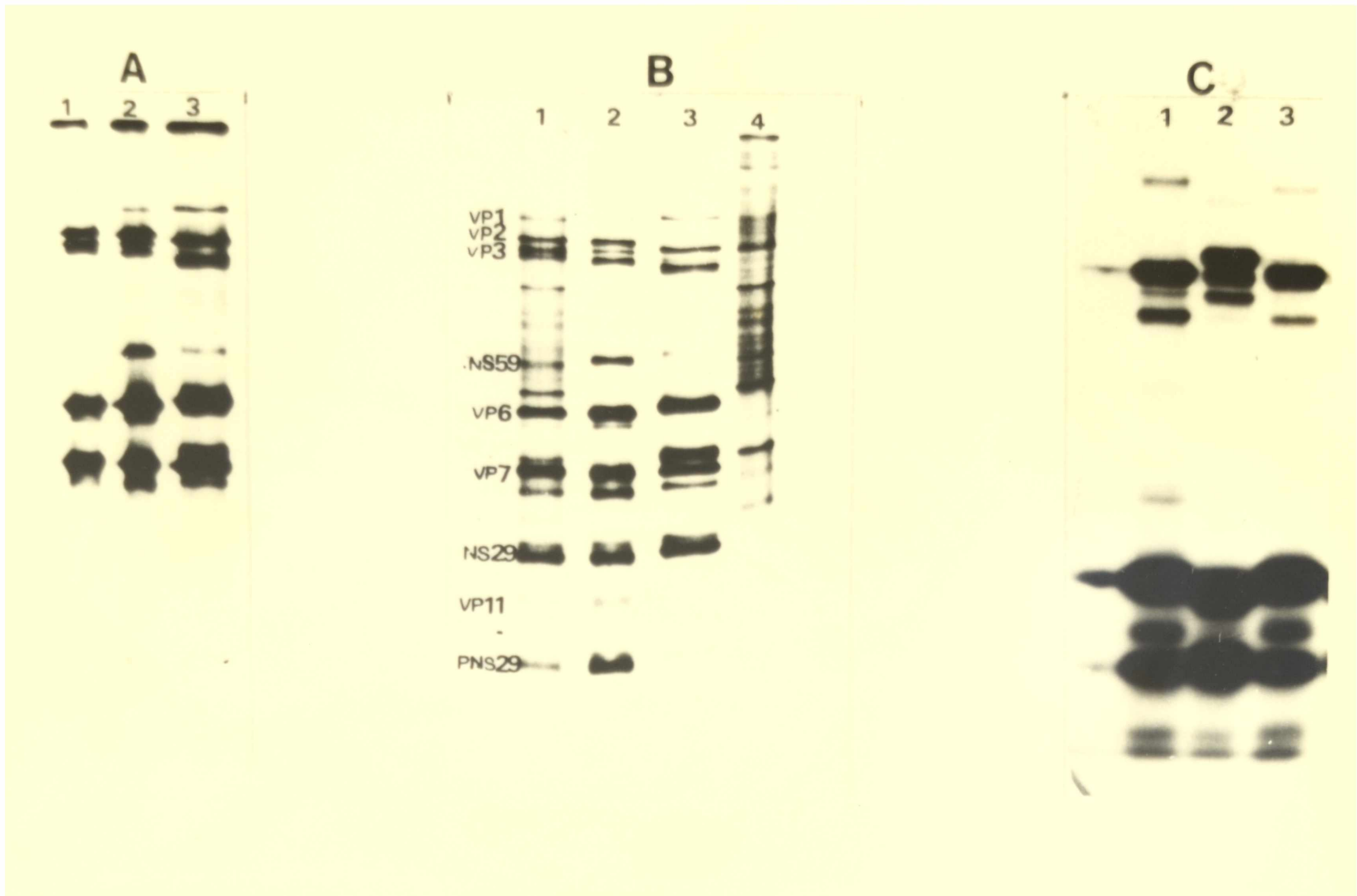


Figura 22: Péptidos virales marcados con metionina 35S, corridos electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10%.

Panel A. Inmunoprecipitado

calle 1: Rotavirus porcino con rearreglo genómico.

calle 2: Rotavirus porcino OSU (prototipo).

calle 3: Rotavirus bovino UK (prototipo).

Panel B. Lisado celular

calle 1 a 3: idem a panel A.

calle 4: Células MA 104 sin infectar.

Panel C. Inmunoprecipitado

calle 1: Rotavirus bovino UK.

calle 2: Rotavirus porcino con rearreglo genómico.

calle 3: Rotavirus porcino grupo A (normal) aislado en B. Juarez-Pcia.Bs.Aires.

polipéptidos muy similar a la cepa bovina UK (ver figura 22 panel C calle 3).

#### 4.3 Hallazgo de rotavirus grupo A y atípicos en niños de Argentina.

De las 22 muestras analizadas por PAGE y ELISA cuatro fueron positivas a ambas técnicas y una fue solo positiva la PAGE, mostrando un perfil electroforético atípico del ARN. Esta muestra fue observada por ME y las partículas fueron no diferenciables de los rotavirus típicos grupo A. Una de las muestras ELISA + mostró el electroferotipo descrito como corto, característico de algunos rotavirus humanos.

La muestra PAGE(+) y ELISA(-) mostró un patrón electroforético de su genoma similar al descrito para el grupo C (Pedley et al, 1983). La misma fue obtenida en Resistencia (Chaco). La figura 23 muestra los electroferotipos del genoma de los rotavirus humanos.

#### 4.4 Rotavirus aislados en pollos de la República Argentina.

Se efectuó un estudio longitudinal en un solo establecimiento y en el mismo se pudo comprobar la presencia de rotavirus con un perfil genómico atípico en el PAGE, los cuales fueron negativos a la prueba de ELISA (figura 24). Por ME estas partículas fueron idénticas a los rotavirus de otras especies, observándose gran cantidad de partículas en proceso de destrucción (figura 25).

De 36 muestras de heces diarreicas analizadas, 10 fueron positivas al PAGE, todas mostraron el mismo electroferotipo, aunque hubo diferencias menores entre algunos segmentos.

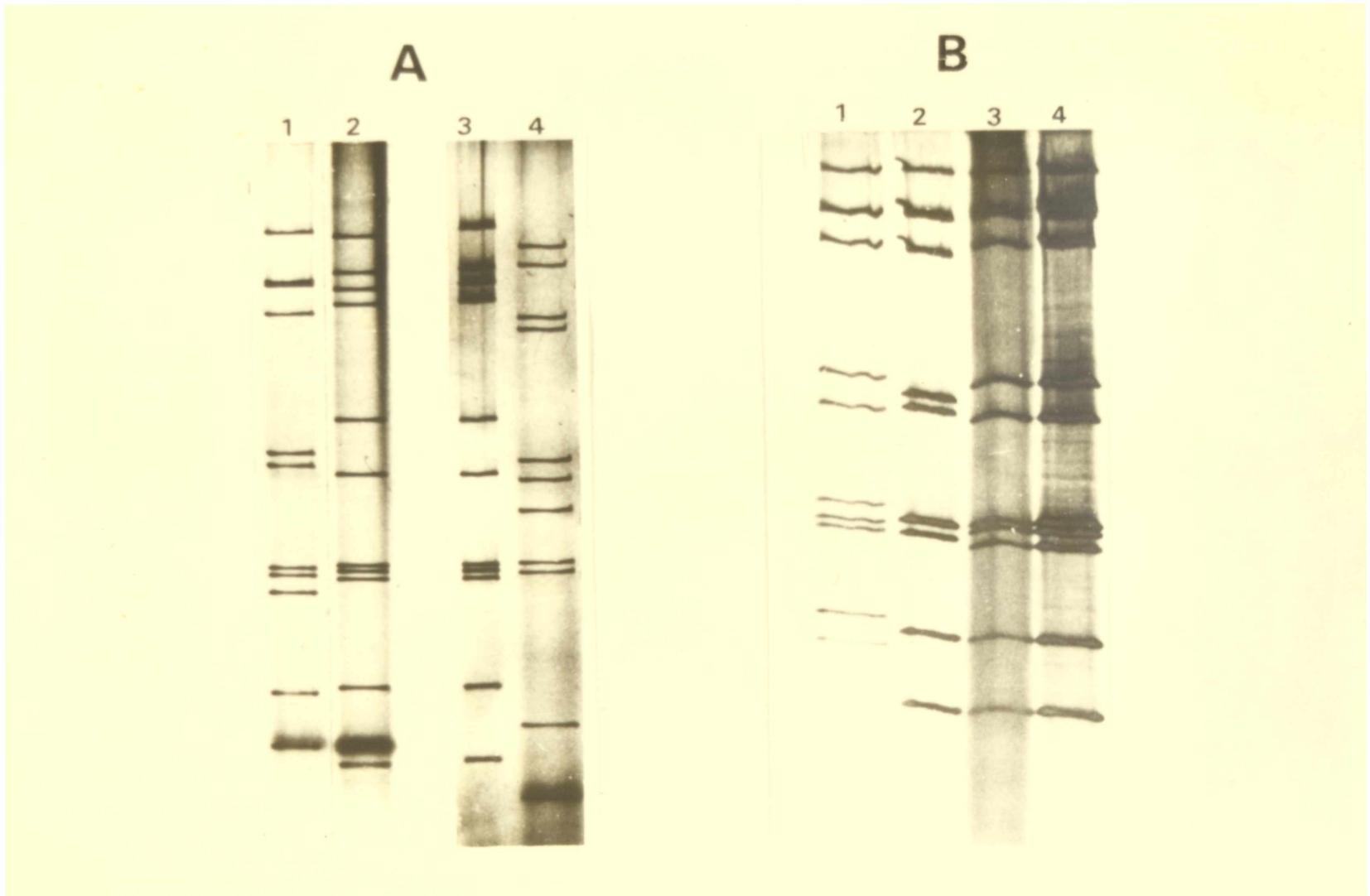


Figura 23: Electroferotipos del genoma de rotavirus humanos de Argentina.

- Panel A. calle 1: rotavirus humano grupo A.  
 calle 2: rotavirus bovino grupo A.  
 calle 3: rotavirus bovino grupo A.  
 calle 4: rotavirus humano atípico.
- Panel B: calle 1: rotavirus humano grupo A  
 (patrón electroforético corto).  
 calles 2 a 4: rotavirus humanos grupo A  
 (patrón electroforético largo)

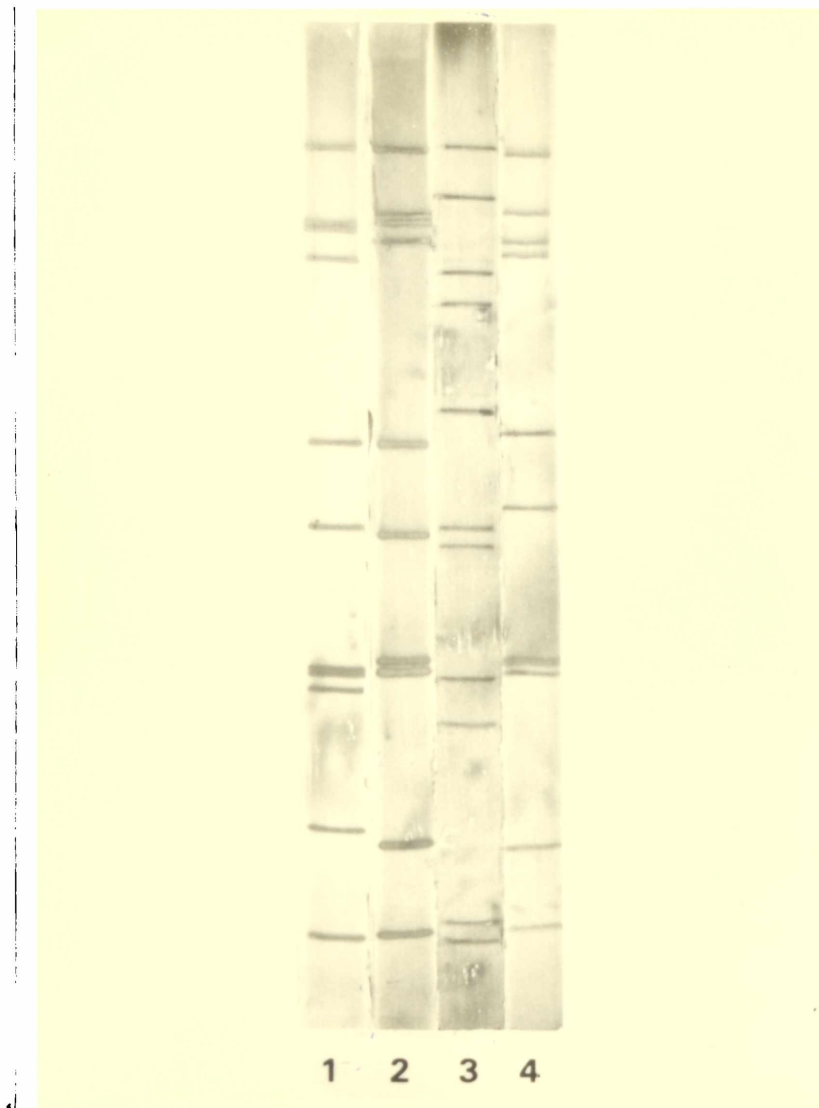
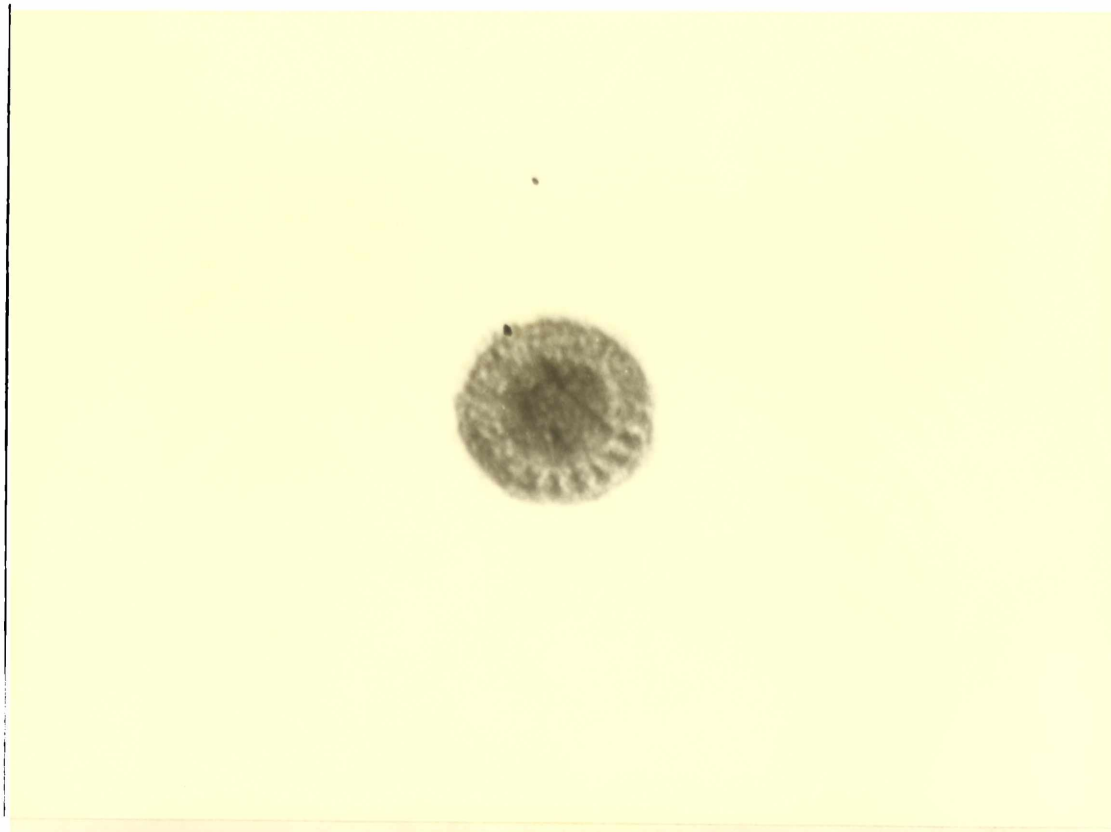


Figura 24: Rotavirus atípico en pollos.  
Electroforesis del genoma en un gel de poli-  
acrilamida y tinción con nitrato de plata.

- calle 1: Rotavirus bovino grupo A.
- calle 2: Rotavirus bovino grupo A cepa UK.
- calle 3: Rotavirus atípico pollo.
- calle 4: Rotavirus simio SA11.

A



B

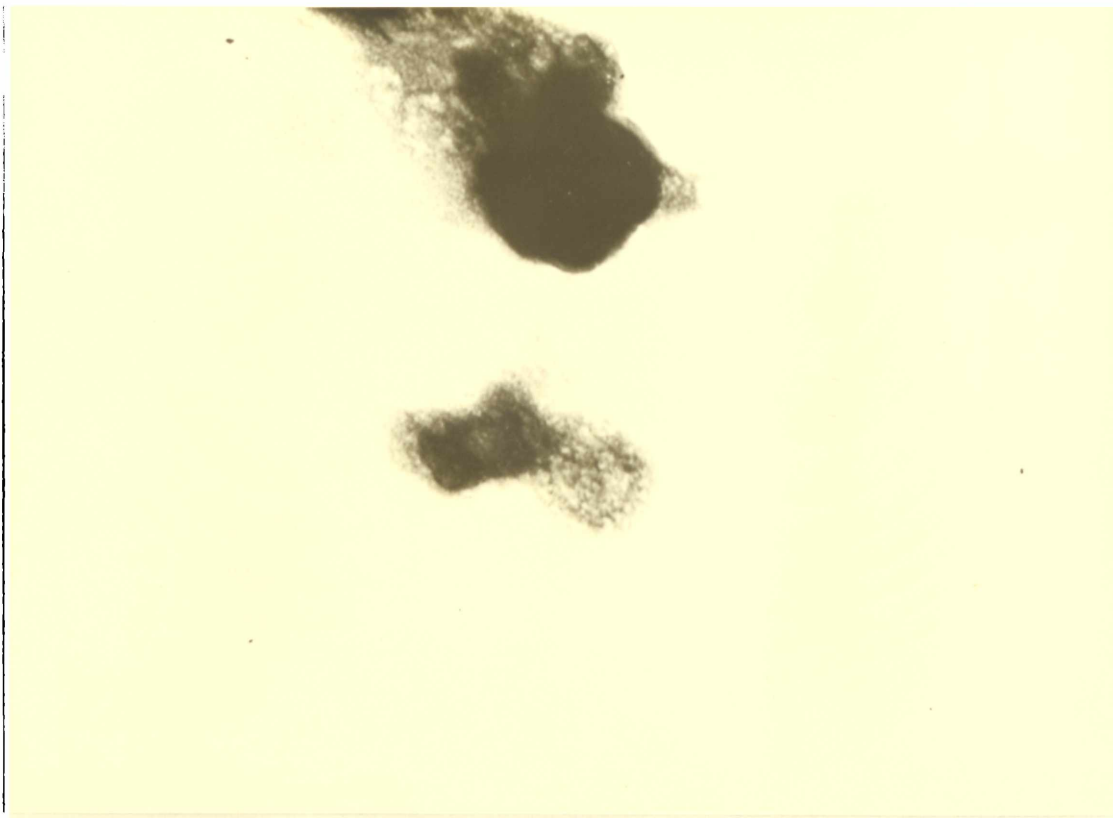


Figura 25: Rotavirus atípico hallado en M.F. de pollos con diarrea en Argentina; Bs. Aires. 60000x.

A: partícula intacta.

B: partícula en proceso de destrucción.

Ninguna muestra fue positiva al ELISA. El patrón electroforético del ARN de estas cepas fue muy similar al que presenta el serogrupo 3 descrito por Mc Nulty et al. (1984) en Irlanda.

Se intentó reproducir experimentalmente la infección en 20 pollitas de 7 días de vida. Cada una fue inoculada con 200ul de una suspensión al 20% en MEM de materia fecal proveniente de una muestra positiva a rotavirus. Los animales no presentaron diarrea ni se detectó virus en MF hasta los 15 días post-inoculación.

El hallazgo del rotavirus en este establecimiento coincide con un brote de diarrea en pollitas de 7 a 10 días de vida con un 15% de morbilidad. Los animales enfermos eran tratados con antibióticos.



## CAPITULO V

### Discusión

#### 5.1 Estudio del rotavirus como agente causal de diarreas neonatales en bovinos de la provincia de Buenos Aires (Argentina).

##### 5.1.1 Presencia de rotavirus en rodeos de cría de la provincia de Buenos Aires.

La zona estudiada es una de las de mayor relevancia, en lo que respecta a producción de ganado bovino en el país.

El presente trabajo es uno de los primeros estudios de incidencia de rotavirus que se han efectuado en rodeos bovinos de países latinoamericanos y la situación epidemiológica de los rodeos afectados fue similar a la descrita en otros países (Woode 1978, Torres-Medina 1985). El porcentaje de terneros con diarrea afectados por rotavirus (53%) es muy similar al descrito por otros autores (Snodgrass et al. 1982(B), de Leeuw et al. 1980(B), Woode et al. 1976). No obstante el número de terneros sin diarrea que portaban virus en sus heces (7%) fue más bajo que el observado por Snodgrass et al. en Gran Bretaña (12%) (Snodgrass et al. 1982).

El porcentaje de establecimientos infectados por rotavirus (89%) también fue similar al observado en otros lugares del mundo [Moerman et al. 1982, Snodgrass et al. 1982(B)].

En 2 establecimientos en donde no fueron detectados rotavirus, el índice de animales con diarrea fue sensiblemente más bajo (entre 3 y 40%) que en aquellos en donde se lo detectó (65 a 95%).

El relevamiento de rotavirus llevado a cabo en bovinos adultos, mostró una incidencia extremadamente baja (1 de 35), por Dagenais et al. en Bélgica (Dagenais et al. 1980) no lograron detectar a este agente causal en animales adultos.

La edad de mayor susceptibilidad fue de 10 a 30 días de vida tal como lo describieron (Woode 1978, Kurstak et al. 1981).

No se estudiaron otros agentes enteropatógenos, por lo que no se puede dar información sobre su existencia o sobre infecciones combinadas entre diferentes agentes.

#### 5.1.2 Análisis de la variabilidad genómica de los rotavirus aislados en bovinos.

La variabilidad genómica se estudió únicamente por medio de la electroforesis del genoma viral en geles de poliacrilamida (PAGE). Todos los electroferotipos correspondieron al patrón descrito por Lourenco et al. (1981), los que Pedley et al. (1983) definen como el patrón electroforético típico del genoma de los rotavirus grupo A, dato que se confirmó con la prueba de ELISA.

La variabilidad observada en estos patrones electroforéticos fue similar a la ya descrita por otros autores (Rodger and Holmes 1979, Ojeh et al 1984). El hecho

de que en cada brote haya un electroferotipo genómico predominante indica la utilidad de este método (PAGE), para seguir brotes de la enfermedad (Estes et al. 1984).

Es interesante el hallazgo de electroferotipos genómicos idénticos en lugares distantes; esto mismo ha sido observado por Rodger and Holmes (1979).

En algunos pocos lugares se pudo observar más de un electroferotipo genómico en el mismo brote, e incluso se observaron muestras que poseían electroferotipos mezclados. Sabara et al. [1982(B)] describen esta característica y encuentran una alta frecuencia de infecciones producidas por varias subpoblaciones de virus con variantes genómicas. Para este estudio, Sabara empleó geles de poliacrilamida de alta concentración 17%, los que no fueron utilizados en este caso. Es probable por lo tanto, que la variabilidad genómica sea aún mayor que la reflejada en este estudio.

Las variaciones genómicas registradas en algunos lugares de un año a otro, indican que existen condiciones que hacen que el patrón electroforético predominante varíe.

El hecho de que no se hayan detectado en este estudio rotavirus bovinos con electroferotipos atípicos, pertenecientes a otros grupos antigénicos, es acorde con la poca casuística registrada en bovinos en otros lugares del mundo [Snodgrass et al. 1984(A), Chasey and Davis 1984].

Cuando se compararon los electroferotipos de los diferentes serotipos detectados, se comprobó que los virus que no pertenecían al serotipo 1 ó 2 mostraban una marcada

separación de los segmentos de ARNdc 7,8 y 9 (figura 8 calles 2 a 6).

### 5.1.3 Análisis de la variabilidad antigénica de los rotavirus bovinos.

Todos los rotavirus bovinos aislados pertenecieron al grupo antigénico A. En el caso de dos muestras que fueron positivas al PAGE y negativas a ELISA, se consideró la posibilidad de su degradación, dado que luego de dar negativas con esta técnica, se repitió el análisis genómico no pudiendo detectarse el virus. Además el patrón genómico observado en el primer análisis electroforético, era el típico del grupo A.

La serotipificación de 17 muestras adaptadas a células MA-104 mostró una situación similar a la descrita por Woode et al. (1983), Murakami et al. (1983) y Ojeh et al. (1984) en EEUU, Japón y Gran Bretaña respectivamente. Se detectó un alto porcentaje (70%), de cepas pertenecientes al serotipo 1 bovino y un porcentaje bajo (30%), de otro u otros serotipos diferentes.

Todos los serotipos que diferían con el predominante fueron aislados en el mismo establecimiento y poseían un mismo electroferotipo.

Tres cepas mostraron frente al suero hiperinmune anti-rotavirus "cepa UK" un título marcadamente más bajo que la cepa homóloga, aunque se las clasificó como serotipo 1 porque la diferencia de título no llegó a ser mayor de 20 veces respecto del título homólogo.

#### 5.1.4 Características biológicas de las diferentes cepas de rotavirus bovinos.

La relación entre cantidad de focos IPA positivos observados en las monocapas infectadas con inóculos originales provenientes de materia fecal y el éxito de la adaptación posterior de las cepas fue directa (tabla No. 6).

Las muestras que diferían del serotipo 1, mostraron tener poco poder citopático en las células donde se replicaron y además sus títulos no superaron los  $10^{4.7}$  DICC 50%, a pesar de realizarse hasta 10 pasajes.

Bohol et al. (1984) al serotipificar cepas de rotavirus porcinos, describen que las cepas pertenecientes al serotipo predominante muestran gran facilidad en adaptarse a cultivos celulares y que las cepas diferentes pertenecen a un grupo que muestra dificultad en su adaptación.

Pese a que esto no se ha descrito para rotavirus bovinos, Woode et al (1983), observan que la cepa prototipo del serotipo 2 (cepa B223) no logra superar un título de  $10^5$  DICC 50%. No obstante esta cepa posee una alta capacidad para producir ECP en células MA-104.

La cepa seleccionada para comprobar el poder patógeno de los virus de campo correspondía a un serotipo que difería parcialmente del serotipo 1. El cuadro clínico que desencadenó en los animales inoculados fue similar al que se encontró en los brotes naturales de campo. Sin embargo al no poder trabajar con animales libres de gérmenes, las conclusiones que se sacan relacionadas con la patogenicidad

de estos agentes son limitadas, aunque la forma constante con que se reprodujeron los resultados permite sugerir que la cepa empleada posee un buen poder patógeno, ya que en todos los casos desencadenó un cuadro clínico de importancia.

## 5.2 Estudio del rotavirus como agente causal de diarreas en cerdos de Argentina y Brasil.

### 5.2.1 Relevamiento de la incidencia de rotavirus en cerdos de San Pablo (Brasil): variabilidad genómica y antigénica de las cepas aisladas.

Los datos epidemiológicos recogidos en general son acordes con los descritos en Venezuela por Utrera et al. (1984).

La presencia de rotavirus en los animales con diarrea fue mucho más alta (20,5%) que en los que no presentaron la enfermedad (1,5%).

Cuatro muestras mostraron electroferotipos genómicos atípicos similares al descrito por Pedley et al. (1983) para el grupo antigénico B. Tres de ellas fueron negativas a la prueba de ELISA y una dió positiva al ELISA pero en el perfil electroforético de su ARN se observó que junto con el patrón electroforético atípico migraban bandas que se correspondían con el patrón común al grupo antigénico A. De esto se deduce que existía una infección mixta con un rotavirus grupo A y otro grupo B.

Los rotavirus atípicos se encontraron en el 21,1% de los lugares estudiados, y el porcentaje de atípicos sobre el

total de muestras analizadas (5%) fue similar al descrito por Chasey y Davis(1984) en Inglaterra y Gales.

Se detectó variabilidad en el perfil electroforético del genoma de las diferentes cepas de rotavirus atípicos aislados. Este tipo de variabilidad ha sido ya ampliamente descrito para los rotavirus grupo A (Lourenco et al. 1981, Rodger and Holmes 1979).

Los rotavirus atípicos fueron detectados nuevamente en los mismos lugares 6 meses después de su primer aislamiento y uno de los perfiles electroforéticos descrito se mantuvo idéntico (figura 15 pared B y C).

Los rotavirus atípicos nunca se detectaron como únicos agentes en un establecimiento, y en todo los casos, aparecieron junto a los rotavirus grupo A.

Los rotavirus atípicos aquí descritos mostraron bastante fragilidad, aunque no se detectaron partículas tipo "cores" descritas por otros autores [Theil et al. 1985(B)]. El almacenamiento de las muestras se efectuó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y con el transcurso de unos meses, se pudieron observar en el ME muchas partículas en destrucción(figura 16).

Los rotavirus grupo A de cerdos también mostraron mayor grado de fragilidad comparados con los rotavirus grupo A de bovinos. Es probable que la diferente composición de las heces pueda tener influencia.

5.2.2 Relevamiento de la incidencia de rotavirus en cerdos del SE de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

En el estudio que se efectuó en dos establecimientos del SE de esta provincia, se pudo comprobar una situación epidemiológica similar a la descrita en Brasil, destacándose aquí también la importancia de los rotavirus como agentes etiológicos de diarreas en animales jóvenes. Se estudiaron dos establecimientos, y en uno de ellos se detectó una cepa de rotavirus atípico muy similar al que Pedley et al. (1986) describieron como grupo E. Este sería el primer hallazgo de un rotavirus atípico de origen animal descrito en nuestro país.

En los perfiles genómicos observados al PAGE se pudieron detectar muchas infecciones mixtas (patrones electroforéticos de ARN, mezclados) que sugerían la existencia de más cepas atípicas (figura 17 líneas 2 y 4).

Un detalle interesante que surge del análisis genómico efectuado en las cepas de ambos establecimientos es la existencia de rotavirus pertenecientes antigénicamente al grupo A (ELISA positivos) pero que muestran al PAGE perfiles genómicos atípicos, que se caracterizan por la variación en la velocidad de migración al segmento 11 de  $ARN_{dC}$ . En un caso el mismo migra entre los segmentos 6 y 7 y desaparece la banda del lugar que correspondería al segmento 11. Un caso muy similar describen Pedley et al. (1984) en niños con inmunodeficiencia congénita y Besselaar et al. (1986) en neonatos humanos de Sudáfrica. Dolan et al. (1985) describen un caso parecido, pero el segmento alterado es el No. 8.



Este autor también describe este hallazgo, al igual que Pedley (Pedley et al. 1984) en niños inmunodeficientes.

El caso descrito en este trabajo es el primero registrado en animales y los mismos aparentemente no mostraban alteraciones en su sistema inmune.

Además se pudo comprobar que el virus permaneció en la población sin variar estas características por lo menos desde septiembre hasta diciembre de 1985.

En el otro caso, el segmento 11 también desaparece de su lugar normal de migración electroforética y aparece una banda extra, por debajo y muy cerca del segmento genómico número 9. Este perfil es sumamente parecido al que describieron Hasegawa et al. (1984) en niños de Indonesia y que Matsuno et al. (1985) describen como candidato a un nuevo serotipo humano.

Este patrón genómico es, de alguna manera, similar al patrón "corto" que presentan algunos rotavirus humanos pertenecientes al subgrupo 1 (Estes et al. 1983). Por este motivo Hasegawa et al. (1984) lo denominaron super-corto.

El lugar donde se halló esta cepa, fue analizado nuevamente 15 días más tarde, encontrándose nuevamente cerdos con diarrea portadores de rotavirus con estas características genómicas.

Utilizando sondas moleculares genómicas obtenidas por Burrone y col. del Instituto Campomar (Capital Federal, Argentina), se pudo comprobar que las bandas "extras" poseían secuencias del segmento de ARN<sub>DC</sub> 11. Con esto se

confirma la hipótesis de que es el segmento 11 el que varía su migración electroforética. Pedley et al. (1984) sugieren que este fenómeno se debe a que el segmento de ARN<sub>dc</sub> 11 forma uniones concatémicas aumentando de ese modo su tamaño, lo que determina una alteración en su velocidad de migración.

El problema provocado por la diarrea de los lechones fue considerable en ambos lugares, en el establecimiento donde se encontró el patrón genómico "super-corto" la mortalidad fue alta en algunas camadas, 80% aproximadamente con una morbilidad del 100%; debe considerarse que las condiciones sanitarias de este lugar eran pobres. En el otro establecimiento la mortalidad no fue tan elevada. Un detalle llamativo fue la alta frecuencia de lechones con diarrea en los que se detectó virus que en algunos lugares fue del 100%. En los brotes de diarrea por rotavirus, cuando se muestrean animales con diarrea sólo el 20-50% son positivos por las técnicas aquí empleadas.

### 5.2.3 Adaptación a cultivos celulares de cepas de rotavirus porcinos.

Ninguna de las cepas aisladas en Brasil pudo ser adaptada a cultivos celulares.

Cepas de virus aislada de los dos establecimientos argentinos se pudieron adaptar sin dificultad.

Las cepas con electroferotipo atípico grupo A a pesar de su rápida adaptación y de que se mantenían en sucesivos pasajes, mostraron un comportamiento atípico debido a que

cuando se las replicaba a baja multiplicidad prácticamente no producían ECP y no lograban alcanzar el título original.

Este comportamiento está indicando dificultad en el poder de amplificación (dificultad para egresar de la célula infectada e infectar otras).

Cuando se efectuó una cuidadosa observación de las monocapas infectadas con distintas diluciones de inóculo, se pudieron observar alteraciones morfológicas en las células (figura 19) pero nunca se produjo el ECP clásico con total desprendimiento de monocapa.

También se adaptaron cepas con patrones electroforéticos normales de su genoma y su comportamiento en los cultivos celulares fue el comunmente descripto. En algunos de los intentos se rescataron luego cepas con genoma normal, lo que evidencia infecciones producidas por varias subpoblaciones virales, habiendo algunas que no presentan cantidades detectables de ARNdc en el análisis por PAGE pero con buena capacidad de crecimiento en células MA-104.

Los estudios efectuados en los polipéptidos virales marcados con metionina  $S^{35}$  no detectaron diferencias entre las cepas de rotavirus grupo A con genomas atípicos y las comunes, por lo que la variante genómica y biológica observada no se pudo relacionar con alguna alteración de los polipéptidos virales.

#### 5.2.4 Análisis comparativo de la inoculación experimental de cerdos con rotavirus aislados en Argentina y Brasil.

La tabla 12 muestra los datos recogidos en estas experiencias. Los rotavirus no pertenecientes al grupo A son aparentemente los menos patógenos, otros autores también han observado la baja patogenicidad de estos virus [Theil et al. 1985(B)].

Se debe tener en cuenta que no se pudo cuantificar adecuadamente la descarga efectuada en los lechones dado que los inóculos no estuvieron adaptados a cultivos celulares razón por la que no se los pudo titular.

Las otras dos cepas estudiadas, una con genoma atípico pero antigénicamente grupo A de Benito Juárez y otra, normal grupo A de Tandil, fueron debidamente tituladas y se pudo medir la descarga. La cepa atípica de Benito Juárez mostró ser más patógena, dato que se relaciona con la severa diarrea que presentaron en el lugar algunas camadas de lechones.

### 5.3 Búsqueda de rotavirus en aves y humanos de Argentina.

El relevamiento efectuado en estas especies permitió detectar por primera vez rotavirus en pollos en la Argentina, los mismos poseían características muy similares a las del serogrupo 3 descrito por Mc Nulty et al. (1984) en Irlanda.

En humanos fue importante el hallazgo de un rotavirus atípico con patrón electroforético de su genoma, similar a los que Pedley et al. (1983) clasifican como pertenecientes al grupo C, estos virus fueron descritos por Nicolas et al.

Tabla 12. Inoculación experimental con diferentes cepas de rotavirus porcinos.

	Grupo A normal Argentina	Grupo A atípico Argentina	Atípico grupo no A Brasil
Período de incubación.	24-96 hs	48-96 hs	48-120 hs
Curso de la enfermedad.	4-5 días	5-6 días	4-5 días
Porcentaje Morbilidad.	80%	100%	62%
Porcentaje Mortalidad	40%	80%	25%
Cuadro subclínico (1) %	-	-	12%

(1) Elimina virus sin presentar diarrea

(1983), Pereira et al. (1983) y Snodgrass et al. (1984(A)). Este es el primer caso descrito en Argentina.

Por otro lado la aparición de patrones electroforéticos del genoma viral, "cortos" y "largos", en lugares distantes de los grandes centros urbanos (Tandil), es un indicio que en estos lugares el virus además de estar presente muestra un importante índice de variabilidad.

#### 5.4 Análisis comparativo de las cepas aisladas de distintas especies.

Las dos especies mejor estudiadas aquí son la bovina y la porcina. El relevamiento efectuado en aves y humanos fue mucho menos importante, no obstante los pocos datos obtenidos son similares a los descriptos en distintos lugares del mundo.

Los rotavirus bovinos mostraron ser genética y antigénicamente más estables que los porcinos. Todos los aislamientos correspondieron al grupo antigénico A y presentaron características genómicas que al PAGE respondían al esquema de Lourenco et al. (1981), y que Pedley et al. (1983) describieron como típico del grupo A. En la mayoría de los brotes que se estudiaron las cepas que se aislaron respondieron en su mayoría a un determinado electroferotipo genómico. El análisis de los diferentes serotipos de rotavirus bovinos permitió observar un serotipo predominante. Estas características de los rotavirus bovinos son similares a las descriptas por otros investigadores (Woode et al. 1983, Ojeh et al. 1984). El

análisis de los polipéptidos virales también mostró una composición similar en todos los aislamientos estudiados.

Los rotavirus porcinos, mostraron una variabilidad mucho mayor que los aislados en bovinos. Se pudo observar presencia de grupos antigénicos diferentes al grupo A, en muchos de los lugares estudiados (21,1% de los establecimientos positivos de Brasil y en uno de Argentina). Esta variabilidad antigénica fue claramente reflejada en la variabilidad genómica. Asimismo estos rotavirus no pertenecientes al grupo A, mostraron entre ellos variabilidad en sus patrones genómicos. En los brotes estudiados, siempre se observó más de un electroferotipo del genoma de las cepas aisladas. Los virus no pertenecientes al grupo A siempre aparecieron en lugares donde se encontró rotavirus grupo A. En esta especie fue mucho más frecuente el hallazgo de electroferotipos genómicos que mostraban infecciones mixtas (diferentes subpoblaciones de rotavirus).

Se detectaron en Argentina, cepas de rotavirus que antigénicamente respondían al grupo A, pero con genomas que presentaron patrones migratorios anormales. Cuando se estudiaron los polipéptidos virales de cepas pertenecientes al grupo A con genomas normales y anormales se observó similitud entre ellos. Una cepa que multiplicó en células MA-104 con un genoma normal (en un intento de adaptación de un virus con genoma atípico) mostró un perfil migratorio en la electroforesis de sus polipéptidos, muy parecido al de las cepas bovinas. Esto indicaría la existencia de una cepa

bovina no detectada en la materia fecal de ese cerdo infectado también con una cepa porcina grupo A atípica. Posiblemente durante su adaptación a cultivo celular la cepa bovina se amplificó notablemente por sobre la cepa porcina.

Según se ha descrito, los patrones genómicos no permiten diferenciar virus provenientes de diferentes especies, con algunas excepciones, como los patrones genómicos cortos, exclusivos de los humanos, y como algunos electroferotipos de las cepas eviaries (Estes et al. 1983, Todd and Mc Nulty 1986). El hallazgo en este trabajo de electroferotipos donde el segmento 11 migra mucho más lento, sugiere que habría que revisar el concepto que señala los electroferotipos "cortos" como exclusivos de los humanos y analizar profundamente el rango de huéspedes de estas cepas porcinas cuyos patrones genómicos han sido descritos sólo en humanos (Pedley et al. 1984, Besselaar et al. 1986).

De este estudio se desprende que sería mucho más factible encontrar en los cerdos cepas de rotavirus potencialmente patógenas para otras especies. Estudios efectuados en Panamá no encontraron relación entre las infecciones producidas por rotavirus en ganado bovino y en las personas que estaban en contacto con ellos (Ryder et al. 1986). No existen estudios similares efectuados en cerdos.

El relevamiento efectuado en aves y humanos fue efectuado en un bajo número de muestras, por lo que los estudios comparativos que se puedan hacer son limitados estadísticamente. No obstante esto, el hecho de haber



hallado en humanos un rotavirus atípico no perteneciente al grupo A, con un electroferotipo genómico parecido al que poseen los virus pertenecientes al grupo C (Pedley et al. 1983) aporta una valiosa información por ser éste el primer hallazgo descrito en el país. Rotavirus atípicos con estas características genómicas ha sido también aislados en cerdos [Snodgrass et al. 1984(A)].

En pollitos todos los rotavirus fueron atípicos, y todos poseían un electroferotipo similar al que describieron Mc Nulty et al. (1984), como pertenecientes al serogrupo 3.

Mc Nulty et al. (1984) describieron una cepa clasificada como serogrupo 4, que presentó un electroferotipo muy parecido al grupo B descrito en humanos, cerdos, ovinos y bovinos [Snodgrass et al. 1984(A)] y descrito en este trabajo en cerdos de Brasil y Argentina.

Por los datos aquí discutidos se puede sugerir que las especies aviar y porcina son hasta el momento las que más expectativas crearían, ante la posibilidad que los rotavirus produzcan espontáneamente infecciones inter-especies. Esto tendría una gran importancia por el impacto epidemiológico que puedan tener en la salud humana.

## CAPITULO 6

### Conclusiones

#### 6.1 Los rotavirus como agentes etiológicos de diarreas en terneros.

- Los rotavirus fueron detectados en un alto porcentaje de terneros diarreicos y en la mayoría de los establecimientos que sufrían el problema.
- El porcentaje de detección de rotavirus en terneros sin diarrea y bovinos adultos fue muy bajo.
- Todos los aislamientos antigénica y genómicamente correspondieron al grupo A.
- La producción de focos o unidades IPA positivas en células MA-104 con inóculos preparados a partir de MF, indican una alta posibilidad de que esa cepa pueda adaptarse posteriormente a crecer "in vitro".
- Se detectaron 2 ó más serotipos, y de ellos uno predominó ampliamente; el mismo correspondió antigénicamente al serotipo bovino 1, representado por la cepa Lincoln (NCDV) de E.E.U.U. y la cepa UK de Inglaterra.
- La distribución de estos serotipos fue similar a las descritas en Estados Unidos, Japón e Inglaterra.
- Los virus que no respondieron al serotipo 1 tampoco lo hicieron con el serotipo 2 de E.E.U.U. representado por la cepa B223 aislada en Iowa.

- Las cepas pertenecientes al serotipo 1 mostraron mayor facilidad para adaptarse a los cultivos celulares que el resto.
- El perfil electroforético de cepas no pertenecientes a los serotipos 1 y 2 mostró diferencias en el triplete de segmentos ARNdc 7,8, y 9.
- Una cepa aislada que pertenecía al serotipo 1 mostró en inoculaciones experimentales la capacidad de producir un cuadro clínico parecido al que se presentaba espontáneamente en el rodeo.

#### 6.2 Los rotavirus como agentes etiológicos de diarrea en lechones de Brasil y Argentina.

- En un alto porcentaje de lechones con diarrea, se detectó rotavirus en sus heces.
- Se detectó rotavirus en la mayoría de los establecimientos que tenían problemas de diarrea en lechones.
- En lechones sin diarrea prácticamente no se detectó rotavirus.
- La mayoría de las cepas aisladas en ambos países respondían antigénicamente al grupo A.
- En ambos países se detectaron cepas no pertenecientes al grupo A. Estas no se caracterizaron antigénicamente, pero por sus perfiles genómicos se puede suponer que las aisladas en Brasil pertenecerían al grupo B y la aislada en Argentina al grupo E.

- Las cepas de Brasil no pertenecientes al grupo A se mantuvieron presentes en los lugares donde se las detectó durante por lo menos 6 meses.
- La incidencia de rotavirus no pertenecientes al grupo A fue similar a la descrita en Inglaterra por otros autores (6,2% del total de positivos).
- Los perfiles genómicos observados en las muestras positivas, mostraron una alta frecuencia de mezcla de subpoblaciones virales.
- En Argentina se aislaron cepas de rotavirus que antigénicamente pertenecían al grupo A, pero que poseían patrones electroforéticos de su ARN atípicos , siendo éste uno de los primeros casos registrados en animales hasta el momento.
- Los dos perfiles genómicos atípicos registrados en rotavirus porcinos grupo A poseen similitud con casos registrados en humanos en Inglaterra, Sudafrica y Estados Unidos.
- Las cepas grupo A genómicamente atípicas mostraron un comportamiento anormal en los cultivos celulares.
- Las pruebas de patogenicidad efectuadas con cepas grupo A normales, grupo A atípicas y cepas antigénicamente diferentes al grupo A, muestran que probablemente las cepas grupo A atípicas son las más patógenas, seguidas por las grupo A normales y las más leves serían las cepas que no pertenecen al grupo A (probable grupo B).

- El perfil electroforético de polipéptidos virales obtenidos en cultivos celulares, no pudo mostrar diferencias entre las cepas grupo A normales y las atípicas.

### 6.3 Los rotavirus en aves y humanos de Argentina.

- Se detectaron rotavirus antigénicamente diferentes al grupo A en pollitos con diarrea.

- El perfil electroforético del ARN fue similar al que describen para el serogrupo 3 aviar en Irlanda. Es éste el primer hallazgo efectuado en Argentina.

- No se detectó rotavirus pertenecientes al grupo A en aves.

- Se describió un rotavirus antigénicamente diferente al grupo A en un niño de la provincia de Chaco, el electroferotipo es similar al de los virus del grupo C. Esta es la primer observación de este tipo de virus efectuada en el país.

- Se detectaron rotavirus grupo A con electroferotipos del ARN largos y cortos, en niños del partido de Tandil.

### 6.4 Comparación entre los rotavirus aislados de diferentes especies.

- Los rotavirus bovinos mostraron mayor estabilidad antigénica y genética que los porcinos.

- Una cepa aislada de cerdos, en cultivos celulares, mostró un perfil polipeptídico diferente al de las cepas porcinas, y muy parecido al de las cepas bovinas.

- A través de los estudios genómicos efectuados en las cepas de rotavirus humanos y aviares no se pudo establecer relación con cepas aisladas de otras especies.

## 6.5 Consideraciones finales.

Por los estudios efectuados hasta el momento se sabe que los rotavirus poseen distribución mundial y afectan a un gran número de especies. De este trabajo se puede concluir que la situación en nuestro país es similar a la descrita en otras partes del mundo.

Se puede observar que estos agentes serían responsables, en gran medida, de las diarreas de lechones de Argentina y Brasil y terneros de Argentina. En consecuencia deberán ser tenidos en cuenta ante cualquier intento de desarrollo de vacunas para las diarreas en estas especies.

Para la elaboración de vacunas en bovinos se deberá tener en cuenta que si bien existe un alto porcentaje del serotipo bovino 1, ya descrito en otros lugares del mundo, existen serotipos que no se corresponden con este ni con el serotipo 2 descrito en E.E.U.U.

Es necesario efectuar mayores estudios en cerdos en donde hay un mayor índice de variabilidad genética.

Del análisis comparativo entre rotavirus de diferentes especies y de los datos recogidos por otros investigadores en diferentes partes del mundo, se puede concluir que en los cerdos, aves y humanos es donde se registra mayor variabilidad antigénica y genómica, y por lo tanto es donde mayor posibilidad habría de hallar cepas de rotavirus que pueden infectar a más de una especie en forma espontánea.

El hecho que haya tanta variabilidad en las cepas que infectan estas especies estaría indicando una gran

posibilidad de que se produzcan espontáneamente cepas mutantes y recombinantes.

Se sugiere que los cerdos y aves serían los más apropiados para iniciar estudios tendientes a hallar en animales cepas de rotavirus patógenas para el hombre, debido al alto grado de variabilidad mostrado por las cepas de rotavirus que infectan estas especies.

## Abreviaturas.

ARN: ácido ribonucleico

ADN: ácido desoxiribonucleico

ARN sc: ARN simple cadena

ARN dc: ARN doble cadena

ARN m: ARN mensajero

CF: fijación de complemento

oC: grado centígrado

Da: dalton

DICC 50%: dosis infectiva para cultivo celular 50%

ECP: efecto citopático

EDIM: epizootic diarrhea infant mice virus

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EGTA: Acido etilenglicobis n n'tetrácético

ELISA: enzimo inmunoensayo

G: Gottfried

g: gramo

HA: hemaglutinación

HAI: inhibición de la hemaaglutinación

IEM: inmunoelectromicroscopía.

IF: inmunofluorescencia.

IG: inmunoglobulina.

IgG: " G.

IgA: " A.

IM: intramuscular.

IPA: inmunoperoxidasa.

IV: intravenoso



Kda: kilodalton  
Kg: kilogramo.  
Km: kilometro.  
M: molar.  
ME: microscopía electrónica.  
ml: mililitro.  
mM: milimolar.  
mA: miliamper.  
Mf: materia fecal.  
MEM: medio mínimo de Eagle.  
mg: miligramo.  
MO: microscopía óptica.  
u: micrón.  
uci: microcurie.  
ul: microlitro.  
ug: microgramo.  
NCDU: Nebraska calf diarrhea virus.  
ng: nanogramo.  
nm: nanómetro.  
NS: proteína no estructural.  
OSU: Ohio State University.  
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida.  
PM peso molecular.  
rpm: revolución por minuto.  
S: coeficiente de sedimentación.  
SDS: duodecilo sulfato de sodio.  
ti: titanio.

TNMC: calcio, magnesio, y sodio en buffer triclorhídrico.

U: unidad.

UK: United Kingdom.

VP: péptido viral.

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se determinó la presencia de rotavirus en diferentes especies animales tales como bovinos, porcinos, aves y humanos mediante el uso de las técnicas de ELISA y electroforesis del ARN viral en geles de poliacrilamida (PAGE). En el caso particular de terneros y lechones se realizó un estudio comparativo entre grupos de animales sanos y otros con síntomas clínicos de gastroenteritis. Se detectaron rotavirus en ambos grupos de animales pero con mucho mayor frecuencia en el grupo de enfermos. En un estudio realizado en porcinos en el estado de Sao Paulo, Brasil, se obtuvieron resultados similares.

Se desarrollaron pruebas de caracterización genómica (electroforesis del ARN viral en geles de poliacrilamida), antigénica (determinación del antígeno común de grupo por la prueba de ELISA y determinación de serotipos mediante pruebas de neutralización viral) y biológica (inoculaciones experimentales para determinar virulencia).

Con estas técnicas se realizó un análisis comparativo entre cepas aisladas en diferentes especies, observándose que las cepas aisladas de cerdos y aves mostraron una mayor variabilidad genómica y antigénica.

Se discute la hipótesis que de estas especies puedan surgir cepas capaces de producir infecciones cruzadas en otras especies.

## Summary.

In this study the presence of rotavirus in calves, piglets, chickens and children was assayed by means of ELISA test and by polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) of the genomic RNA of the different isolates.

Calves and piglets with clinical symptoms of gatroenteritis showed a significantly higher frequency of rotavirus infection than healthy animals. Similar results were obtained in an study with piglets performed in Sao Paulo, Brazil.

Genomic, antigenic and biological characterization of isolates from species were performed, using PAGE, ELISA, neutralisation assay and experimental inoculations in different animals.

Comparative studies between strains isolated from different species showed that swine and avian strains exhibited higher genomic and antigenic variability than viruses isolated from other species.

The possibility that these avian or swine strains could produce cross infection in other species is discussed.

## Agradecimientos.

Al Dr. Eduardo Scodeller, por todo lo que aprendí de él durante este tiempo, científica y humanamente.

A mi director en este trabajo el Dr. José La Torre, por la confianza y libertad que me dio en todo momento.

A mis compañeros de trabajo, Nora Mathion, Jorge Blackhall y Andrés Bellinzoni por toda la amistad y ayuda que recibí.

A todo el personal del CEVAN por el indispensable apoyo que significó el trabajo de cada uno de ellos.

A la Facultad e Ciencias Veterinarias de Tandil; por la desinteresada colaboración que siempre recibí ya sea del personal docente como no docente. Al Dr. E. Esteban y al laboratorio de la F.C.V. de Tandil por haberme facilitado todo el material necesario siempre que realicé experimentos en ese lugar.

Al Dr. Nestor Auya por los consejos, amistad y colaboración recibida.

Al Dr. Osvaldo de la Canal por la confianza y apoyo conferidos en mis primeros años de veterinario.

Al Dr. Adolfo Casaro y personal del INTA Balcarce por la colaboración prestada.

A todos los veterinarios "de campo" que siempre colaboraron en forma desinteresada y confiaron en mi trabajo sin la ayuda de quienes hubiera sido imposible realizarlo.

A los Dres. Lidoro Vallejos, Adrián Sorrentino, Sigolo de San Juan, Cristina Bellinzoni e Irma Galufa por el envío de las muestras fecales de aves, cerdos y niños.

A los miembros del jurado de esta tesis por su cordialidad y buena voluntad ofrecida en todo momento.

1. ACHA, P.N. and SZYFRES, C. Zoonosis and communicable diseases common to man and animals. Pan American Health Organization, Washinton, D.C., pp700, 1980.

2.ACRES, S.D. and RADOSTITIS, O.M. The prevention and control of epidemics of acute undifferentiated diarrhea of beef calves. III Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias. 1:268-275, 1980.

3. ALMEIDA, J.D. and HALL, T. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. J.Gen. Virol. 40:213-218, 1978.

4. ALLEN, A.M. and DESSELBERGER, V.Reassortmente of human rotaviruses carrying rearranged genomes with bovine rotavirus. J.Gen. Virol. 66:2703-2714, 1985.

5. ANDRAL,B., TOQUIN, D., HARIDON, R.L., JESTIN, A., METZ, M.H., et ROSE, R. Les diarrhées du dindonneau: en bilan des recherches virales effectuées (Rotavirus, Reovirus, Adenovirus, Pseudopicornavirus). Avian Pathology 14:147-162, 1985.

6. ARIAS, C., LOPEZ, S. and ESPEJO, R.T. Gene protein of SA11 rotavirus genome. J.Virol. 41:42-50, 1982.

7.BALDACCI, E.R., GANDEIAS, J.A.N., BREVIGLIERI, J.C. and GRISI, S.J. Etiologie viral e bacteriana de casos de

gastroenterite infantil: Uma caracterizacao clinica. Rev. Saude Publ. S. Paulo 13:47-53, 1979.

8. BANATVALA, J.E., TOTTERDELL, B., CHRYSTIE, I.L. and WOODE, G.N. In vitro detection of human rotaviruses. Lancet 2:821, 1975.

9. BASSELAAR, T.G., ROSENBLATT, A. and KIDD, A.H. Atypical rotavirus from South African neonates. Arch. Virol. 87:327-330, 1986.

10. BEARDS, T.G., PILFOLD, J.N., THOULESS, M.E. and FLEWETT, T.H. Rotavirus serotypes by serum neutralization. J. Med. Virol. 5:231-237, 1980.

11. BEARDS, G.M. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. Arch.Virol. 74:65-70, 1980.

12. BEARDS, G.M., CAMPBELL, A.D., COTTRELL, N.R., PEIRIS, J.S.M., REES, N., SANDERS,R.C., SHIRLEY, J.A.,WOOD,H.C. and FLEWETT, T.H. Enzyme-linked immunoabsorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. J.Clin.Microbiol. 19:248-254. 1984.

13. BENFIELD, D.,STOTZ, I.J., NESON,E.A. and GROON, K.S. Comparison of a commercial enzyme-linked immunoabsorbent

assay with electron microscopy, fluorescent antibody, and virus isolation for the detection of bovine and porcine rotavirus. *Am.J.Vet.Res.* 45:1998-2002. 1984.

14. BIRCH, C.J., LEWIS, F.A. and KENNET, M.L. A study of the prevalence of rotavirus infection in children with gastroenteritis admitted to an infectious disease hospital. *J.Med.Virol* 1:69-77. 1977.

15. BISHOP, R.F., DAVIDSON, G.P., HOLMES, I.H. and RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* ii, 1281-1283. 1973.

16. BISHOP, R.F., BARNES, G.L., CIPRIANI, E. and LUND, J.S. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N.Engl.J. Med* 309:72-76. 1983.

17. BOHOL, E.N., GUPTE, P.K., ALQUIN, F.M.W. and SAIF, L.J. Antibody responses in serum, colostrum and milk of swine infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infect.Immun.* 6:289. 1972.

18. BOHOL, E.H., KOHLER, E.M., SAIF, L.J., CROSS, R.F., AGNES, A.G. and THEIL, K.W. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. *JAVMA* 172:458-463. 1978.



19. BOHOL, E.H., SAIF, L.J., THEIL, K.W., AGNES, A.G. and CROSS, R.F. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J.Clin.Microbiol.* 15:312-319. 1982.
20. BOHOL, E.H., THEIL, K.W. and SAIF, L.J. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J.Clin.Microbiol.* 19:105-111. 1984.
21. BRIDGER, J.C. Detetction by electron microscopy of calicivirus, estrovirus and rotavirus-like particles in the feces of piglets with diarrhea. *Vet.Res.* 107:532-533. 1980.
22. BRIDGER, J.C., CLARKE, I.N. and Mc CRAE, M. Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus. *Inf. Imm.* 35:1058-1062. 1982.
23. BRIDGER, J.C. and BROWN, J.F. Antigenic and pathogenic relationships of three bovine rotaviruses and a porcine rotavirus. *J.Gen.Virol.* 65:1151-1158. 1984.
24. BRYDEN, A.S., THOULES, M.E. and FLEWETT, T.N. A rabbit rotavirus. *Vet. Rec* 99:323. 1976.

25. BRYDEN, A.S., DAVIES, H.A., THOULESS, M.E., FLEWETT, T.H. Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. J.Med.Microbiol 10:121-125. 1977.
26. BULGIN, M.S., ANDERSON, B.C., WARD, A.C. and EVERMANN, J.F. Infectious agents associated with neonatal calf disease in south western Idaho and eastern Oregon. J.A.V.M.A. 180:1222-1226. 1982.
27. BYWATER, R.J. Pathophysiology and treatment of calf diarrhea. XIIth W. Congr. Dis. Cattle Netherlands 1:291-297. 1982.
28. CASTRUCCI, G., FRIGER, F., FERRARI, M., CILLI, V., ALDROVANDI, V., CALEFFI, F. and GATTI, R. Comparative study of rotavirus strains of bovine and rabbit origin. Comp. Immun. Infect. Dis. 7:171-178. 1984.
29. CEVENINI, R., FALCIERI, E., RUMPIANESI, F. and DONATI, M. An electron microscope study of wild human rotavirus replication in cell cultures. Microbiologic 1:45-53. 1983.
30. CLARK, S.M., ROTH, J.R., BARNETT, B.B. and SPENDLOVE, R.S. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanisms of enhancement. J. Virol. 39:816-822. 1981.

31. CLARKE, I.N. and Mc CRAE, M.A. A rapid sensitive method for analysing the genome profiles of field isolates of rotavirus. *J. Virol. Meth.* 2:203-209. 1981.
32. COOPERS launches. New scours vaccine in the UK. *Animal. Pharm.* 108:16. 1986.
33. CROUCH, C.F. Vaccination against enteric rota and coronaviruses in cattle and pigs.: enhancement of lactogenic immunity. *Vaccine* 3:284-291. 1985.
34. CUKOR, G. and BLACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 48:157-179. 1984.
35. CHAN, W.K., PENARANDA, M.E., CRAWFORD, S.E. and ESTES, M.K. Two glycoproteins are produced from the rotavirus neutralization gene. *Virol.* 151:243-252. 1986.
36. CHASEY, D. Different particle types in tissue culture and intestinal epithelium infected with rotavirus. *J.Gen. Virol.* 37:443-451. 1977.
37. CHASEY and BANKS. The commonest rotaviruses from neonatal lamb diarrhea in England and Wales have atypical electropherotypes. *Vet. Rec.* 115:326-327. 1984.

38. CHASEY and DAVIES. Atypical rotaviruses in pigs and cattle. Vet.Rec. 114:16-17. 1984.

39. CHASEY, D. and BANKS, J. Replication of atypical bovine rotavirus in small intestine and cell culture. J. Gen. Virol. 67:567-576. 1986.

40. CHIDLOW, J.W. and PORTER, P. Intestinal defence of the neonatal pig: inter-relationships of gut and mammary function providing surface immunity against colibacillosis. Vet.Rec. 104:496. 1979.

41. DAGENAIS, L., PASTORET, P.P., SCHWERS, A., KAECKENBEECK, A., LANSIVAL, B., ANTOINE, H., JOASSIN, L., CEEBERG-BACK, C.M., JACQUEMIN, E. Epizootiologie de la diarrhée a rotavirus chez les bovins. Ann. Med. Vet. 124:565-575. 1980.

42. DEA, S., BEGIN, M.E., ARCHAMBAULT, D., ELAZHARY, M.A.S.Y. and ROY, R.S. Distinct rotaviruses isolated from asymptomatic calves. Cornell. Vet. 75:307-318. 1985.

43. DEA, S., ARCHAMBAULT, D., ELAZHARY, M.A.S.Y. and ROY, R.S. Genomic variations and antigenic relationships among cytopathic rotavirus strains isolated in Quebec Dairy Herds. Can. J. Vet. Res. 50:126-129. 1986(A).

44. DEA, S., ELAZHARY, M.A.S.Y. and ROY, R.S. Distinct serotypes of porcine rotavirus associated with diarrhea in suckling piglets in southern Quebec. Can. J. Vet. Res. 50:130-132. 1986(B).

45. DEARLOVE, J., LATHAM, P., DEARLOVE, B., PEARL, K., THOMPSON, A. and LEWIS, I.G. Clinical range of neonatal rotavirus gastroenteritis. Br. Med. J. 286:1473-1475. 1983.

46. DELEM, A., LOBMAN, M. and ZYGRAICH, N. A bovine rotavirus developed as a candidate vaccine for use in humans. J. Biol. Stand. 12:443-445. 1984.

47. de LEEUW, P.W., ELLENS, D.J., TALMAN, F.P. and ZIMMER, G.N. Rotavirus infection in calves: efficacy of oral vaccination in endemically infected herds. Vet. Sci. 29:142. 1980(A).

48. de LEEUW, P.W., ELLENS, D.J., STRAVER, P.J., VAN BALKEN, J.A.M., MOERMAN, A. and BAANVINGER, T. Rotavirus infections in calves in dairy herds. Res. Vet. Sc. 29:135-141. 1980(B).

49. DERBYSHIRE, J.B. and WOODE, G.N. Classification of rotaviruses: report from the World Health Organization/Food and Agriculture Organization. Comparative Virology Programs. J.A.V.M.A 173:519-521. 1978.

50. DIMITROV, D.H., ESTES, M.K., RANGELOVA, S.M., SHINDAROV, L.M., MELNICK, J.L. and GRAHAM, D.Y. Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants. *Infect. Imm.* 41:523-526. 1983.

51. DIMITROV, D.H., GRAHAM, D.Y. and ESTES, M.K. Detection of rotaviruses by nucleic acid hybridization with cloned DNA of Simian rotavirus SA11 Genes. *J. Inf. Dis.* 152:293-299. 1985.

52. DOERN, G., HERRMANN, J.E., HENDERSON, P., STOBBS-WALRO, D., PERRON, D.M. and BLACKLOW, N.R. Detection of rotavirus with a new polyclonal antibody enzyme Immunoassay (Rotazyme II) and a commercial Latex Agglutination Test (Rotalex): comparison with a monoclonal antibody enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 23:226-229. 1986.

53. DOLAN, K.T., TWIST, E.M., HORTON-SLIGHT, P., FORRER, C., BELL, L.M., PLOTKIN, J.R.S.A. and CLARK, N.F. Epidemiology of rotaviruses electropherotypes determined by a simplified diagnosis technique with RNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 21:753-758. 1985.

54. DYALL-SMITH, M.L. and HOLMES, H.L. Gene coding assignments of rotavirus double stranded RNA segments 10 and 11. *J. Virol.* 38:1099-1103. 1981.

55. ERICSON, B.L., GRAHAM, D.Y., MASON, B.B. and ESTES, M.K. Identification synthesis and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells. J. Virol. 42:825-839. 1982.
56. ERICSON, B.L., PETRIE, B.L., GRAHAM, D.Y., MASON, B.B. and ESTES, M.K. Rotavirus code for two types of glycoprotein precursors. J. Cel. Biochem. 22:151-160. 1983.
57. ESPEJO, R.T., LOPEZ, C.. and ARIAS, C. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. J. Virol. 37:156-160. 1981.
58. ESPEJO, R.T., MARTINEZ, E., LOPEZ, S. and MUÑOZ, G. Different polypeptide composition of two human rotavirus types. Infect. Imm. 28:230-237. 1980.
59. ESPEJO, R.T., PUERTO, F., SOLER, C. and GONZALEZ, N. Characterization of a human pararotavirus. Infect. Immun. 44:112-116. 1984.
60. ESTES, M.K. and GRAHAM, D.Y. Identification of rotaviruses of different origins by the plaque reduction test. Am. J. Vet. Res. 41:151-152. 1980.

61. ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y., GERBA, C.P. and SMITH, E.M. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. J. Virol. 31:810-815. 1981(A).

62. ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y. and MASON, B.B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. J. Virol. 39:879-888. 1981(B).

63. ESTES, M.K., PALMER, E.L. and OBIJESKI, J.F. Rotaviruses: a review. Curr. Pop. Microbiol. Immunol. 105:123-184. 1983.

64. ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y. and DIMITROV, D. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. Progr. Med. Virol. 29:1-22. 1984.

65. ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y. and PETRIE, B.L. Antigenic structure of rotaviruses. Immunochemistry of viruses the basis for serodiagnosis and vaccines. Elsevier Science Publishers. B.V. (Biomedical Division) Chapter 21: 390-405. 1985.

66. EYDELLOTH, R.S., VONDERFECHT, S.L., SHERIDAN, J.F., ENDERS, L.D. and ROBERT, H.Y. Kinetics of viral replication and local and systemic immune response in experimental rotavirus infection. J. Virol. 50:947-950. 1984.



67. FAULKNER-VALLE, G.P., CLAYTON, A.V. and Mc CRAE, M.A. Molecular biology of rotaviruses III. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of bovine rotavirus. J. Virol. 42:669-677. 1982.
68. FERRARI, M. and GUALANDI, G.L. A serologic survey of rotavirus infection in pigs. Microbiologica 9:29-32. 1986.
69. FERNELIUS, A., RITCHIE, A.E., CLASSICK, L.G., NORMAN, J.B., MERBUS, C.A. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhoea from a field outbreak in Nebraska. Arch. Ges. Virus Forsch. 37:114-130. 1972.
70. FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S. and DAVIES, H.A. Virus particles in gastroenteritis. Lancet ii:1497. 1973.
71. FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S. and DAVIES, H. Virus diarrhoea in foals and other animals. Vet. Rec. 96:477. 1975(A).
72. FLEWETT, T.H. and WOODE, T.N. The rotaviruses. Arch. Virol. 57:1-23. 1978.
73. FLORES, J., PURCELL, R., PEREZ, I., WYATT, R., BOEGEMANN, E., SERENO, M., WHITE, L., CHANOCK, R.M. and

KAPIKIAN, A.Z. A dot hybridisation assay for detection of rotavirus. *Lancet* ii:555-559. 1983.

74. FLORES, J., HOSHINO, Y., BOEGGEMAN, E., PURCELL, R., CHANOK, R.M. and KAPIKIAN, A.Z. Genetic relatedness among animal rotaviruses. *Arch. Virol.* 87:273\_285. 1986.

75. GAUL, S.K., SIMPSON, T.F., WOODE, T.N. and FULTON R.W. Antigenic relationships among some animal rotaviruses: virus neutralization in vitro and cross-protection in piglets. *J. Clin. Microbiol.* 16:495-503. 1982.

76. GERNA, G., BATTAGLIA, M., MILENESI, G., PASSARINI, N., PERCIVALLE, E. and CATTANEO, E. Serotyping of cell culture adapted subgroup 2 human rotavirus strains by neutralization. *Inf. Imm.* 43:722-729. 1984.

77. GLASS, R.I., KEITH, J., NAKAGOMI, O., NAKAGOMI, T., ASKAA, J., KAPILIAN, A., CHANOCK, R. and FLORES, J. Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: comparison with homologous genes from four strains of human and animal Res. *J. Virol.* 141:292-298. 1985.

78. GOMBOLD, J.L. and RAMIG, R.F. Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. *J. Virol.* 57:110-116. 1986.

79. GRAHAM, D.Y. and ESTES, M.K. Rotavirus-like agent, rats and man. Lancet @ 886-887. 1985.
80. GROM, J. and BERNARD, S. Virus enzyme linked cell immunoassay (VELCIA): detection and titration of rotavirus antigen and demonstration of rotavirus neutralizing and total antibodies. J. Virol. Meth. 10:135-144. 1985.
81. GREENBERG, H., WYATT, R., KAPIKIAN, A.Z., KALICE, A.R., FLORES, J. and JONES, R. Rescue and serotypic characterization of noncultivable human rotavirus by gene reassortment. Inf. Imm. 37:104-109. 1982.
82. GREENBERG, H., Mc AULIFFE, V., VALDESUSO, J., WYATT, R., FLORES, J., KALICA, A., HOSHINO, Y. and SUIGH, N. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. Inf. Imm. 39:91-99. 1983.
83. GUANG-MU, C., TAO, H., BRIDGER, J.C. and Mc CRAE, M.A. Chinese adult rotavirus is a group B rotavirus. Lancet @@:1123-1124. 1985.
84. GUNN, P.R., SATO, F., POWELL, K.F.H., BELLAMY, A.R., NAPIER, J.K., HARDING, D.R.K., HANCUCK, W.S., SIEGMAN, L.H. and BOTH, G.W. Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic

determinants investigated by sequence and peptide synthesis.

J. Virol. 54:791-797. 1985.

85. GURWITH, M., WENMAN, W., HINDE, D., FELTHAM, S. and GREENBERG, H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. J. Infect. Dis. 144:218-224. 1981.

86. HESEGAWA, A., INOUE, S., MOTSUNO, S., YAMAOKA, K., EKO, R. and SUHARYONO, W. Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from Indonesia. Microbiol. Immunol. 28:719-722. 1984.

87. HESS, R.G., BACHMANN, P.A., BALGER, J., MAYR, A., POSPISCHILL, A. and SCHMID, G. Synergism in experimental mixed infections of newborn (colostrum deprived) calves with bovine rotavirus and enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). Zbl. Vet. Med. 31:585-596. 1984.

88. HERRING, A.J., INGLIS, N.F., OJEH, C.K., SNODGRASS, D.R. and MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. J. Clin. Microbiol. 16:473-477. 1982.

89. HOLMES, I.N., RUCK, B.J., BISHOP, R.F. and DAVIDSON, G.P. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. J. Virol. 16:937-943. 1975.

90. HOLMES, I. Viral gastroenteritis. Progr. Med. Virol. 25:1-36. 1979.
91. HUNDLEY, F., BIRYAHWAHS, B., GOW, M. and DESSELVERGER, V. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. Virol. 143:88-103. 1985.
92. IMAGAWA, H., WADA, R., KAMADA, M., KUMANOMIDO, T., FUKUNAGA, Y. and HIRASAWA, K. Experimental infection of equine rotavirus in foals. Bull. Equine Res. Inst. 21:65-71. 1984.
93. JASHES, M., SANDINO, A.M., FAUNDEZ, G., AVENDAÑO, L.F. and SPENCER, E. In vitro transcription of human pararotavirus. J. Virol. 57:183-190. 1986.
94. KALICA, A.R., GREENBERG, H.B., ESPEJO, R.T., FLORES, J., WYATT, R.G., KAPIKIAN, A.Z. and CHANOCK, R.M. Distinctive ribonucleic acid pattern of human rotavirus subgroups 1 and 2. Infect. Immun. 33:958-961. 1981.
95. KALTER, S.S., HEBERLING, R.L., RODRIGUEZ, A.R. and LESTER, T.L. Infection of baboons ("Papio cynocephalus") with rotavirus SA11. Int. Simp. Enteric Inf. Man & Animals: Stand. Immunol. Proc. Ireland. 53:257-261. 1983.

96. KAPIKIAN, A.Z., KALICA, A.R., SHIH, J.W., CLINE, W.L., THORNHILL, T.S., WYATT, R.G., CHANOCK, R.M., HIM, H.W. and GERIN, J.L. Buoyant density in cesium chloride of the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis by ultracentrifugation, electron microscopy and complement fixation. *Virology* 70:564-569. 1976.

97. KAPIKIAN, A.Z., MIDTHUN, K., HOSHINO, Y., FLORES, J., WYATT, R.G., GLASS, R., ASKAA, J., NAKAGOMI, O., NAKAGOMI, T. and CHANOCK, R.M. Rhesus rotavirus: a candidate vaccine for prevention of human rotavirus disease. *Vaccines* 6:357-367. 1985.

98. KIRSTEIN, C.G., CLARKE, D.A. and LECCE, J.G. Development of resistance of enterocytes to rotavirus in neonatal, agammaglobulinemic piglets. *J. Clin. Microbiol.* 55:567-573. 1985.

99. KONNO, T., SUZUKI, H., IMAI, A. and ISHIDA, N. Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in Japanese infants. Fecal shedding and serologic response. *J. Infect. Dis.* 135:259-266. 1977.

100. KRAFT, L.M. Studies on the etiology and transmission of epidemic diarrhoea of infant mice. *J. Exp. Med.* 106:743-755. 1957.

101. KURSTAK, E., KURSTAK, C., VAN DER HURK, J. and MORISSET, R. Animal rotaviruses. Chapter 3. Comparative diagnosis of viral gastroenteritis U.S.A. Academic Press, vol IV:105-147. 1981.

102. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685. 1970.

103. LIN, M., IMAI, M., BELLAMY, A.R., IKEGAMI, N., FURIUCHI, Y., SUMMERS, D., NUSS, D.L. and DEIBEL R. Diagnosis of rotavirus infection with cloned cDNA copies of viral genome segments. J. Virol. 55:509-512. 1985.

104. LOPEZ, S., ARIAS, C.F., BELL, J.R., STRAUSS, J.H. and ESPEJO, R.T. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. Virol. 144:11-19. 1985.

105. LOURENCO, M.H., NICOLAS, J.C., COHEN, J., SCHERRER, R. and BRICOUT, F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. Ann. Virol. 132:161-173. 1981.

106. MALHERBE, H.H., STRICKLAND-CHOLMEY, M. Simian virus SA11 and the related "O" agent. Arch. Virol. 22:235-245. 1967.

107. MASON, B.B., GRAHAM, D.Y. and ESTES, M.K. In vitro transcription and translation of simian rotavirus SA11 gene products. J. Virol. 33:1111-1121. 1980.

108. MATSUVO, S., INOUYE, S. and KONO, R. Plaque assay of neonatal calf diarrhoea virus and the neutralizing antibody in human sera. J. Clin. Microbiol. 5:1-4. 1977.

109. MATSUVO, S. and INOUYE, S. Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea virus and preparation of its antisera. Inf. Imm. 39:155-158. 1983.

110. MATSUNO, S., HASEGAWA, A., MUKOYAMA, A. and INOUYE, S. A candidate for a new serotype of human rotavirus. J. Virol. 54:623-624. 1985.

111. Mc CRAE, M.A., Mc COQUODALE, J.G. Molecular biology of rotavirus II. Identification of the protein coding assignments of calf rotavirus genome RNA species. Virol. 117:435-443. 1982.



112. Mc NULTY, M.S., ALLAN, G.M., PEARSON, G.R., Mc FERRAN, J.B., CURRAN, W.L. and Mc CRACKEN, R.M. Reovirus-like agent (rotavirus) from lambs. *Inf. Imm.* 14:1332-1338. 1976(A).

113. McNULTY, M.S., PEARSON, G.R., Mc FERRAN, J.B., COLLINS, D.S., ALLAN, G.M. A reovirus-like agent (rotavirus) associated with diarrhoea in neonatal pigs. *Vet. Microbiol.* 1:55-63. 1976(B).

114. Mc NULTY, M.S., ALLAN, G.M. and STUART, J.C. Rotavirus infection in avian species. *Vet. Rec.* 103:319-320. 1978.

115. Mc NULTY, M.S. Etiopathogenesis and control of viral diarrhoea in calves. III Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias 1:262-267. 1980.

116. Mc NULTY, M.S., ALLAN, G.M., TODD, D., Mc FERRAN, J.B. and Mc CRACKEN, R.M. Isolation from chickens of a rotavirus lacking the rotavirus group antigen. *J. Gen. Virol.* 55:405-413. 1981.

117. Mc NULTY, M.S., TODD, D., ALLAN, G.M., Mc FERRAN, J.B. and GREENE, J.A. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups. *Arch. Virol.* 81:113-121. 1984.

118. MEBUS, C.A., UNDERDAHL, N.R., RHODES, M.B., and TWIEHAUS, M.J. Calf diarrhoea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. Bull. Neb. Agric. Exp. Statn. 233:1-16. 1969.

119. MEBUS, C.A., KONO, M., UNDERDAHL, N.R. and TWIEHAUS, M.J. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhoea (scours) virus. Can. Vet. J. 12:69-72. 1971(A).

120. MEBUS, C.A., STAIR, E.L., UNDERDAHL, N.R. and TWIEHAUS, M.J. Pathology of neonatal calf diarrhoea induced by a reo-like virus. Vet. Pathol. 8:490. 1971(B).

121. MEBUS, C.A., WHITE, R.G., STAIR, E.L., RHODES, M.B. and TWIEHAUS, M.J. Neonatal calf diarrhoea: results of a field trial using a reo-like virus vaccine. Vet. Med. Small Anim. Clin. 67:173. 1972.

122. MEBUS, C.A., WYATT, R., SHARPEE, R., SERENO, M., KALICA, A.R., KAPIKIAN, A. and TWIEHAUS, M.J. Diarrhoea in gnotobiotic calves caused by the reovirus-like agent of human infantile gastroenteritis. Inf. Imm. 14:471-474. 1976.

123. MEBUS, C.A. Infectious enteric viruses of neonatal animals. Am. J. Clin. Nutr. 30:1851-1856. 1977.

124. MIDDLETON, P.J., SZYMAUSKI, M.T., ALBOTT, G.D.,  
BARTOLUSSI, R., HAMILTON, J.R. Orbivirus acute  
gastroenteritis of infancy. Lancet i:1241-1244. 1974.

125. MIDDLETON, P., PETRIC, M. and SZYMAUSKI, M. Propagation  
of infantile gastroenteritis virus (Orbi-group) in  
conventional and germfree piglets. Inf. Imm. 12:1276-1280.  
1975.

126. MIDTHUN, K., GREENBERG, N., HOSHINO, Y., KAPIKIAN,  
A.Z., WYATT, R.C. and CHANOCK, R. Reassortment rotaviruses  
as potential live rotavirus vaccine candidates. J. Virol.  
53: 949-954. 1985.

127. MOERMAN, A., VAN ZIJDERVELD, F.G., BAANVINGER, T. and  
TIESSINK, J.W.A. Prevalence and significance of viral  
enteritis in dutch dairy calves. XIIth W. Congr. Dis.  
Cattle. Netherlands. 1:228-235. 1982.

128. MOON, H.W., CLURKIN, A.W., ISAACSON, R.E., POHLEZ,  
J., SKARTVEDT, S.M., GILLETTE, K.G. and BAETZ, A.L.  
Pathogenic relationships of rotavirus, Escherichia coli, and  
other agents in mixed infections in calves. JAVMA 173:577-  
583. 1978.

129. MUCHINIK, K.G., GRISTEIN, S. and PLAZA, A. Rotavirus infection in children hospitalized for diarrhoea in Argentina. *Annals of Tropical Poediatrics* 1:167-173. 1981.

130. MURAKAMI, Y., NISHIOK, N., HASIGUCHI, Y. and KONIYASU, C. Serotypes of bovine rotaviruses distinguished by serum neutralization. *Inf. Imm.* 40:851-855. 1983.

131. NAKATA, S., ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y., LOOSLE, R., TAO, H., SHUSHENG, W., SAIF, L.H. and MELNICK, J.L. Antigenic characterization and ELISA detection of human group B rotaviruses: adult diarrhoea rotaviruses (ADRVs). *J. Inf. Dis.* In press.

132. NEWMAN, F.S., MYERS, L.L., FIRCHAMEER, B.D. and CATLIN, J.E. Licensing and use of the calf scours vaccine. Part II analysis of scours-reo. In: *Proceedings of the 77th Annual Meeting N.S. Animal Health Association* 59-64. 1973.

133. NEWMAN, J.F.E., BROWN, F., BRIDGER, J.C. and WOODE, G.N. Characterization of a rotavirus. *Nature* 258:631-633. 1975.

134. NICOLAS, J.C., COHEN, J., FORTIER, B., LOURENCO, M.H. and BRICOUT, F. Isolation of an human pararotavirus. *Virol.* 124:181-184. 1983.

135. NOVO, E. and ESPARZA, J. Composition and topography of structural polypeptides of bovine rotavirus. J. Gen. Virol. 56:325-335. 1981.

136. ODEON, A.C. Diarrea neonatal de los terneros en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina): aspectos epidemilógicos, etiológicos, inmunológicos y patológicos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias; U.N.L.P. 1980.

137. OFFIT, P.A., CLARK, H.F., and PLOTKIN, S.A. Response of mice to rotavirus of bovine or primate origin assessed by radioimmunoassay, radioimmunoprecipitation, and plaque reduction neutralization. Infect. Immun. 42:293-300. 1983.

138. OFFIT, P.A., CLARK, H.F., KARNSTEIN, M.J. and PLOTKIN, S.A. A murine model for oral infection with a primate rotavirus (simian SA11). J. Virol. 51:233-236. 1984.

139. OFFIT, P.A. and CLARK, H.F. Protection against rotavirus. Induced gastroenteritis in a murine model by passively acquired gastrointestinal but not circulating antibodies. J. Virol. 54:58-64. 1985.

140. OFFIT, P.A., BLAVATT, G., GREENBERG, H.B. and CLARK, F.N. Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. J. Virol. 57:46-49. 1986(A).

141. OFFIT, P.A. and BLAVAT, G. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. J. Virol. 57:376-378. 1986(B).

142. OFFIT, P.A., SHAW, R.D. and GREENBERG, H.B. Passive protection against rotavirus induced diarrhoea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. J. Virol. 58:700-703. 1986(C).

143. OJEH, C.K., SNODGRASS, D.R. and HERRING, A.J. Evidence for serotypic variation among bovine rotaviruses. Arch. Microbiol. 79:161-171. 1984.

144. PEDLEY, S., BRIDGER, J.C., BROWN, J.F. and Mc CRAE, M.A. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. J. Gen. Virol. 64:2093-2101. 1983.

145. PEDLEY, S., HUNDLEY, F., CHRYSTIE, I., Mc CRAE and DESSELBERGER, U. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. J. Gen. Virol. 65:1141-1150. 1984.

146. PEDLEY, S., BRIDGER, J.C., CHASEY, D. and Mc CRAE, M.A. Definition of two groups of atypical rotaviruses. J. Gen. Virol. 67:131-137. 1986.

147. PELESE, P. The genes of influenza virus. Cell 10:1-10. 1977.
148. PEREYRA, H.G., LEITE, J.P.G., AZEREDO, R.S., FARIAS, V. and SUTMOLLER, F. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 78:245-250. 1983.
149. PEREYRA, H.G., AZAREDO, R.S., LEITE, J.P., ANDRADE, Z. and DE CASTRO, L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). J. Virol. Meth. 10:21-28. 1985.
150. PETRIC, M., SZYMANSKI, S.T., MIDDLETOM, P.J. Purification and preliminary characterization of infantile gastroenteritis virus (Orbivirus group). Intervirology 5:233-238. 1975.
151. PETRIE, B., GRAHAM, D.Y. and ESTES, M.K. Identification of rotavirus particle types. Intervirology 16:20-28. 1981.
152. PETRIE, B., ESTES, M.K. and GRAHAM, D.Y. Effects of tunicamycin on rotavirus morphogenesis and infectivity. J. Virol. 46:270-274. 1983.
153. REYNOLDS, D.J., CHASEY, D. SCOTT, A.C. and BRIDGER, J.C. Evaluation of ELISA and electron microscopy for

detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces.  
Vet. Rec. 114:397-401. 1984.

154. RIEPENHOFF-TALTY, M., LEE, P.C., CARMODY, P.J, BARRETT, H.J. and OGRA, P.L. Age dependent rotavirus-enterocyte interactions. Proc. Soc. Exp. Biol. and Medic. 170:146-154. 1982.

155. RODGER, S.M., CRAVEN, J.A. and WILLIAMS. Demonstration of reovirus-like particles in intestinal contents of pplets with diarrhoea. Aust. Vet. J. 51:536. 1975(A).

156. RODGER, S.M., SCHNAGE, R.D. and HOLMES, H.I. Biochemical and biophysical characteristics of diarrhoea viruses of human and calf origin. J. Virol. 16:1226-1235. 1975(B).

157. RODGER, S.M., BISHOP, R.F., BIRCH, C., Mc LEAN, B. and HOLMES, H.I. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. J. Clin. Microbiol. 13:272-278. 1981.

158. RODGER, S.M., BISHOP, R.F. and HOLMES, I.H. Detection of a rotavirus like agent associated with diarrhoea in an infant. J. Clin. Microbiol. 16:724-726. 1982.



159. RUBINSTEIN, A.S. and MILLER, M.F. Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting rotavirus. J. Clin. Microbiol. 15:934-938. 1982.

160. RYDER, R.W., YOLKEN, R.H., REEVES, W.C. and SACK, R.B. Enzootic bovine rotavirus is not a source of infection in panamanian cattle ranchers and their families. J. Inf. Dis. 153:1139-1143. 1986.

161. SABARA, M., BABIUK, L.A., GILCHRIST, J. and MISRA, V. Effect of tunicamycin on rotavirus assembly and infectivity. J. Virol. 43:1082-1090. 1982(A).

162. SABARA, M., DEREGT, D., BABIUK, L. and VISKRAM, M. Genetic heterogeneity within individual bovine rotavirus isolates. Virol. 44:813-822. 1982(B).

163. SABARA, L. and BABIUK, L.A. Identification of a bovine rotavirus gene and gene product influencing cellular attachment. J. Virol. 51:489-496. 1984.

164. SABARA, M., BARRINGTON, A. and BABIUK, L.A. Immunogenicity of a bovine rotavirus glycoprotein fragment. J. Virol. 56:1037-1040. 1985(A).

165. SABARA, M., GILCHRIST, J.E., HUDSON, G.R. and BABIUK, L.A. Preliminary characterization of an epitope involved in

neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. J. Virol. 53:58-66. 1985(B).

166. SAIF, L.J. and BOHL, E.H. Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin classes of milk after oral/intranasal inoculation of sows with a live low cell culture passaged virus. Am. J. Vet. Res. 40:115. 1979.

167. SAIF, L.J., BOHOL, E., THEIL, K.W., CROSS, R.F. and NOUSE, J.A. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23 nm virus like particles associated with diarrhoea in young pigs. J. Clin. Microbiol. 12:105-111. 1980.

168. SAIF, L.J., REDMAN, D.R., SMITH, K.L. and THEIL, K.W. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows. Infect. Immun. 41:1118-1131. 1983.

169. SAIF, L.J., SAIF, Y.M. and THEIL, K.W. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. Avian Dis. 29:798-811. 1985.

170. SANFORD, S.E. and JOSEPHSON, G.K.A. Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in forty two scouring neonatal calves. Can. Vet. J. 23:343-347. 1982.

171. SATO, K., IRABA, Y., SHINOZAKI, T, FUJII, R. and MATUMOTO, M. Isolation of human rotavirus in cell cultures. Arch. Virol. 69:155-160. 1981.

172. SHIRLEY, J.A., BEARDS, G.M., THOULESS, M.E., FLEWETT, T.H. The influence of divalent cations on the stability of human rotavirus. Arch. Virol. 67:1-9. 1981.

173. SCHERS, A., DAGENAIS, L., CHAPPUIS, T., PASTORET, P.P. and GALBERG-BACQ, C.M. Propagation of bovine rotavirus by young dogs. Vet. Rec 93:135-141. 1983.

174. SELB, B., BAUMEISTER, H.G., MAASS, T. and DOERR, H.W. Detection of human rotavirus by nucleic acid analysis in comparison to enzyme-linked immunoassay and electron microscopy. Eur. J. Clin. Microbiol. 4:41-45. 1985.

175. SMITH, E.M, ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y. and GERBA, C.P. A plaque assay for the simian rotavirus SA11. J. Gen. Virol. 43:513-519. 1979.

176. SNODGRASS, D.R. and HERRING, J.A. The activity of deinfectants on lamb rotavirus. Vet. Rec. 101:81. 1977.

177. SNODGRASS, D.R., STEWART, J., TAYLOR, J., KRAUTIL, F.L. and SMITH, M.L. Diarrhoea in dairy calves reduced by feeding

colostrum from cows vaccinated with rotavirus. Res. Vet. Sc. 32:70-73. 1982(A).

178. SNODGRASS, D.R., TERZOLO, N.R., SHERWOOD, D., CAMPBELL, I., MENZIES, Y.D. and SYNGE, B.A. A field survey of the aetiology of neonatal calf diarrhoea. Proc. XII W. Cong. Dis. Cattle. The Netherlands World Assoc. Buiatrics, Utrecht. The Netherlands 1:380-384. 1982(B).

179. SNODGRASS, D.R., HERRING, A.J., CAMPBELL, I., INGLIS, J.M. and HARGREAVES, F.D. Comparison of atypical rotaviruses from calves., piglets, lamb and man. J. Gen. Virol. 65:909-914. 1984(A).

180. SNODGRASS, D.R., OJEH, C.K., CAMPBELL, I. and HERRING, A.J. Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization. J. Clin. Microbiol. 20:342-346. 1984(B).

181. SNYDER, J.D. and MERSON, M.H. Bull. Wld. Hlth. Org. 60:605. 1982.

182. TAO, H., CHANGEN, W., ZHAOYING, F., ZINYI, C., XUEJIAN, C., XIAOQUANGS, R., GUANGMU, C., HENLI, Y., TUNGXIN, C., WEINK, Y., SHUASEN, D. and WEICHENG, C. .Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. Lancet ii:1140-1142. 1984.

183. THEIL, K.W., BOHL, E.H., CROSS, R.F., KOHLER, E.M. and AGNES, A.G. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. Am. J. Vet. Res. 39:213-220. 1978.

184. THEIL, K.W. and SAIF, L.J. In vitro detection of porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus) and its antibodies. J. Clin. Microbiol. 21:844-846. 1985(A).

185. THEIL, K.W., SAIF, L.J., MOORHEAD and WHITMOYER, R.E. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. J. Clin. Microbiol. 21:340-345. 1985(B).

186. THEIL, K.W., REYNOLDS, D.L. and SAIF, Y.M. Isolation and serial propagation of turkey rotaviruses in a fetal Rhesus Monkey kidney (ma-104) cell line. A. Dis. 30:93-104. 1986.

187. THOULESS, M.E., BEARDS, G.M. and FLEWETT, T.H. Serotyping and subgrouping of rotavirus strains by the ELISA test. Arch. Virol. 73:219-230. 1982.

188. TODD and Mc NULTY. Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gels. Avian Pathology 15:149-159. 1986.

189. TORRES-MEDINA, A., WYATT, R.G., MEBUS, C.C., UNDERDAHL, N.R. and KAPIKIAN, A.Z. Patterns of shedding of human reovirus-like agent in gnotobiotic newborn piglets with experimentally induced diarrhea. Intervirology 7:250-255. 1976.

190. TORRES-MEDINA, A., SHLAFER, D.H. and MEBUS, A. Rotaviral and coronaviral diarrhea. Vet. Clin. N. America: F. An. Pract. 1:471-493. 1985.

191. TWIEHAUS, M.J., MEBUS, C.A. and BASS, E.P. Survey of the field efficacy of reoviral calf diarrhoea vaccine. Vet. Med. Small Anim. Clin. 24:23. 1975.

192. TZIPORI, S., CAPLE, I.W. and BUTLER, R. Isolation of a rotavirus from deer. Vet. Rec. 99:398. 1976.

193. TZIPORI, S., SMITH, M., HALPIN, C., MAKIN, T. and KRAUTIL, F. Intestinal changes associated with rotaviruses and enterotoxigenic Escherichia coli infection in calves. Vet. Microbiol. 8:35-43. 1983.

194. URASAWA, T., URASAWA, S., TANIGUCHI, K. Three human rotavirus serotypes demonstrated by plaque neutralization of isolated strains. Infect. Imm. 38:781-784. 1982.

195. UTRERA, V., MAZZALI DE ILJA, R., GORZIGLIA, M. and ESPARZA, J. Epidemiological aspects of porcine rotavirus in Venezuela. Res. Vet. Sc. 36:310-315. 1984.

196. WALKER, P.J., MANSBRIDGE, J.N. and GORMANB, B.M. Genetic analysis of orbivirus by using RNase T, oligonucleotide fingerprints. J. Virol. 34:583-591. 1980.

197. WANG, S., CAI, R., CHEN, J., LI, R. and JIANG, R. Etiologic studies of the 1983 and 1984 outbreaks of epidemic diarrhea in Guanxi. Intervirology 24:140-146. 1985.

198. WARD, R.L., KNOWLTON, D.R. and PIERCE, M.J. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. J. Clin. Microbiol. 19:748-753. 1984.

199. WELLS, P.W., SNODGRASS, D.R., HERRING, J.A. and DAWSON, Mc L. Antibody titres to lamb rotavirus in colostrum and milk of vaccinated ewes. Vet. Rec. 103:46-48. 1978.

200. WOODE, G.N., BRIDGER, J.C., HALL, G.A. and DENNIS, M.J. The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum deprived calves in Great Britain. Res. Vet. Sci. 16:102-105. 1974.

201. WOODE, G.N. and BRIDGER, J.C. Viral enteritis of calves. Vet. Rec. 96:85-88. 1975.

202. WOODE, G.N. Epizootiology of bovine rotavirus infection. Vet. Rec. 103:44-46. 1978.

203. WOODE, G.N. Etiology of enteric viral infections of calves: pathological and clinical aspects. XIIth W. Congr. Dis. Cattle. Netherlands 1:201-208. 1982.

204. WOODE, G.N., KELSO, N.E., SIMPSON, T.F., GAUL, S.K., EVANS, L.E. and BABIUK, L. Antigenic relationships among some bovine rotaviruses: serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. J. Clin. Microbiol. 18:358-364. 1983.

205. ZORATTI de VERONA, A., TERZOLO, H.R. y CASERO, A.P. Estudio etiológico preliminar de la diarrea neonatal de los terneros en la República Argentina. Rev. Med. Vet. 61:467-474. 1980.