

26534



Reg. 63812

Centro de Documentación
CEISA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE ROTAVIRUS DE
ORIGEN PORCINO Y SU SIGNIFICADO
EPIDEMIOLOGICO**

**BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA**

25 ENE. 1999

CAROLINA VALENCIA FERNANDEZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS -PROGRAMA DE POSGRADO
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.-COLOMBIA**

1995

CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS DE ROTAVIRUS DE ORIGEN
PORCINO Y SU SIGNIFICADO
EPIDEMIOLOGICO

TESIS DE GRADO

**“Presentada como requisito parcial para optar
el título de Magister en Microbiología”**

CAROLINA VALENCIA FERNANDEZ

Directores:

MARIA FERNANDA GUTIERREZ

JOSE DARIO MOGOLLON.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS-PROGRAMA DE POSGRADO
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.-COLOMBIA

1995

Centro de Documentación
SEISA



Dr CARLOS CORREDOR P.

Decano Académico de la Facultad de Ciencias


Pontificia Universidad Javeriana.



Dra. MARIA FERNANDA GUTIERREZ F.

Directora del Programa de Posgrado y Directora de tesis

Facultad de Ciencias - Pontificia Universidad Javeriana



Dr. JOSE DARIO MOGOLLON

Director de Tesis

Programa de Salud Animal CORPOICA

Lois Jerabek

Doctora Lois Jerabek

Jurado

Fernando Ariza

Doctor Fernando Ariza

Jurado

Francisco Bustos

Doctor Francisco Bustos

Jurado

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA - CEISA, por la colaboración prestada tanto humana, como técnica y económica para la realización de este trabajo.

En especial, agradezco a mi director el Doctor José Darío Mogollón y a los Doctores Fernando Ariza y José Barrera por sus aportes científicos y técnicos, ya que sin su ayuda no hubiese sido posible llevar a feliz término este trabajo.

Del mismo modo a la Doctora María Fernanda Gutiérrez, por su invaluable colaboración e incondicional apoyo durante el transcurso de este trabajo.

Igualmente agradezco a la Pontificia Universidad Javeriana y a todas las personas que de una u otra forma permitieron el desarrollo de ésta investigación.

“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones anotadas son responsabilidad sólo del autor, y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana.”

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado y de investigación, Agosto de 1989.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCION	
1. REVISIÓN DE LITERATURA	3
1.1 Morfología	3
1.2 Clasificación	4
1.3 Estructura del genoma	5
1.4 Proteínas virales	6
1.5 Epidemiología	8
1.6 Patogénesis	9
1.7 Morbilidad y mortalidad	10
1.8 Inmunidad	12
1.9 Inmunoprofilaxis	13
2.0 DIAGNOSTICO	15
2.1 Cultivo celular	19
2.2 Técnicas de biología molecular en el diagnóstico viral	20
3.0 MATERIALES Y METODOS	32
3.1 Toma de muestras	32
3.2 Cepas de referencia	33
3.3 Cultivos celulares	33

3.4	Extracción ARN viral	35
3.5	Análisis electroforético	37
3.6	Detección del antígeno viral por ensayo inmunoenzimático	39
4.0	RESULTADOS	41
4.1	ANTIOQUIA	42
4.1.1	Granja Tecni-Agro	42
4.1.2	Granja La Vitrina	47
4.2	CUNDINAMARCA	47
4.2.1	Granja La Carolina	47
4.2.2	Granja Lider	52
4.2.3	Granja Santandercito	53
4.2.4	Granja La Pas	55
4.3	TOLIMA	57
4.3.1	Granja El Triunfo	57
4.3.2	Granja El Placer	57
4.4	SANTANDER	59
4.4.1	Granja Los Porkys	59
4.5	Comparación entre los electroferotipos observados en las diferentes granjas analizadas	61
4.6	Detección del antígeno viral por ensayo inmunoenzimático	63
5.0	DISCUSION	66
6.0	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	74

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Prueba X^2 , para establecer el grado de relación que existe entre la técnica y el resultado en el diagnóstico de Rotavirus.	63
Tabla 2. Comparación entre la técnica de Electroforesis y BioDot Rota para evaluar Co-positividad y Co-negatividad entre ellas.	64
Tabla 3. Comparación entre las técnicas de Electroforesis y Rotazyme II, con el fin de evaluar el grado de Co-positividad y Co-negatividad entre ellas	64
Tabla 4. Comparación entre los dos métodos ELISA (BioDot Rota y Rotazyme II), con el fin de establecer el grado de Co-positividad y Co-negatividad entre ellas	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Perfiles genómicos presentados por las cepas de referencia de Rotavirus bovino tipo Compton y porcino tipo Bohl's.	44
Figura 2 Comparación entre los electroferotipos de las cepas de Rotavirus aisladas de dos granjas del departamento de Antioquia.	46
Figura 3. Comparación de los electroferotipos encontrados de las cepas aisladas en la Granja La Carolina.	49
Figura 4 Comparación entre los electroferotipos encontrados en la Granja La Carolina.	51
Figura 5. Comparación entre los electroferotipos de la cepas aisladas en la Granja Lider	54
Figura 6. Comparación de los electroferotipos de cepas de Rotavirus, aisladas en la Granja Santandercito y la Granja la Pas.	56
Figura 7. Comparación de los electroferotipos de las cepas aisladas de la Granja el Placer.	58

Figura 8. Comparación de los electroferotipos de cepas aisladas de la Granja Los Porkys.

RESUMEN

El propósito de la presente investigación fué caracterizar por medio de la técnica de electroforésis, cepas de Rotavirus presentes en heces de lechones entre dos y cuatro semanas de edad con enfermedad diarreica.

Un total de 204 muestras fecales fueron colectadas de diferentes granjas porcícolas ubicadas en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Santander y Tolima.

Las muestras fecales fueron sometidas a un proceso de extracción de ARN, por medio de una mezcla de Guanidina-Tiocianato-Fenol-Cloroformo, seguido por una precipitación con etanol; posteriormente, el ARN extraído, fué analizado utilizando un sistema de electroforésis unidimensional discontinuo en geles de poliacrilamida (PAGE).

Después de la electroforésis, los geles fueron sometidos a una tinción con nitrato de plata; la interpretación de los resultados consistió en el exámen visual de los perfiles electroforéticos de las cepas virales.

Solamente, 33 cepas virales del total de muestras examinadas, fueron halladas positivas para ARN genómico de Rotavirus, que fueron agrupadas en siete electroferotipos diferentes; en donde seis de ellos, fueron compatibles con el electroferotipo característico que presenta el Rotavirus del grupo A; el otro perfil, mostró un patrón de migración compatible con el de una cepa de Rotavirus atípica (Grupo B).

Todos los perfiles electroforéticos fueron clasificados como patrón corto, tomando como base la movilidad de los segmentos 10 y 11 del genoma. No se encontraron electroferotipos con patrón largo.

Las variaciones genómicas que presentaron los electroferotipos diferentes se localizaron con mayor énfasis en los segmentos del genoma que conforman los grupos I y III.

De otro lado, las muestras fecales tanto positivas como negativas para la técnica de electroforésis, fueron analizadas mediante dos pruebas de ELISA comerciales dirigidos a la identificación del Rotavirus grupo A, encontrándose una correlación entre los resultados obtenidos por ambas técnicas.

Este estudio permitió establecer la variabilidad genómica, que presentan los electroferotipos de las cepas de Rotavirus que circulan en las granjas porcícolas analizadas.

INTRODUCCION

La infección por Rotavirus en lechones, constituye un problema de importancia económica, debido al impacto sobre la producción y productividad de la pira. La diarrea neonatal ocasiona una alta mortalidad y también un severo retraso en el crecimiento de los lechones que se recuperan.

Desde el descubrimiento de los Rotavirus como causantes de la diarrea en terneros en 1969, estos virus han sido reconocidos como agentes etiológicos de la enfermedad diarrea en neonatos de varias especies animales.

Las primeras investigaciones encaminadas al diagnóstico de Rotavirus, fueron dirigidas al establecimiento de técnicas que permitieran evaluar la infección, ya sea determinando la presencia del antígeno viral ó a la medición de una respuesta serológica.

Una de las técnicas mas usadas para detectar el antígeno viral en materia fecal ha sido la de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), la cual ofrece ventajas sobre otros ensayos del mismo género.

Se han generado métodos de biología molecular tales como Electroforésis, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) e Hibridización, que permiten el análisis del genoma de las cepas de Rotavirus (27,145).

Mediante la electroforésis (PAGE), se ha logrado separar exitosamente el genoma de los Rotavirus, el cual esta conformado por 11 segmentos de ARN bicatenario,

generando así, un patrón de bandas característico conocido como electroferotipo (132).

El propósito de esta investigación fué determinar la presencia de cepas de Rotavirus en lechones con diarrea de diferentes granjas porcícolas del país, mediante el análisis del ARN viral en geles de poliacrilamida y establecer las variaciones electroforéticas entre estas cepas, con el fin de conocer sí en las granjas examinadas circulaban una ó más cepas virales.

Además, se utilizaron dos pruebas de ELISA comerciales empleadas para determinar la presencia de Rotavirus del grupo A, con el fin de comparar los resultados obtenidos en la técnica de Electroforésis.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 MORFOLOGIA

Desde el descubrimiento de los Rotavirus como causa de diarrea en terneros en 1969, estos han sido reconocidos como un agente etiológico en la enfermedad diarreica en neonatos de varias especies animales incluyendo a los cerdos (9,15,20,63,65).

A partir de 1973, se han realizado numerosos estudios de caracterización bioquímica, molecular y antigénica de los Rotavirus, que han llevado a un entendimiento detallado de su estructura, replicación, patogénesis y epidemiología de la infección (38,55,81).

El término Rotavirus es derivado del latín "Rota", debido a la forma circular bien definida de la cápside externa, dando la apariencia de rueda radiada; son partículas sin envoltura de 70 nm de diámetro con una doble cápside proteica icosaédrica compuesta de una cubierta interna y externa. La cubierta interna es el nucleocápside y contiene 11 segmentos de ARN bicatenario; la partícula completa es lisa debido a que el borde exterior de la cápside externa tiene una apariencia uniforme bien definida.

Las partículas con una sola cubierta miden 55nm de diámetro y son designadas rugosas por la ausencia de la cubierta externa y los capsómeros de la cápside interna se proyectan hacia la periferia dando una apariencia de círculo erizado; el nucleocápside se muestra hexagonal en la cubierta externa y mide 37 nm de diámetro (30,69,149).

Se han encontrado estructuras tubulares de 54-100 nm de ancho y de longitud variada; éstas estructuras por inmuno electro-microscopía, han mostrado estar antigénicamente relacionadas con la cubierta interna del virión, esto sugiere, que puede ser el resultado de un ensamblaje aberrante del material de la cubierta viral (135).

1.2 CLASIFICACION

Los Rotavirus se clasifican como miembros de la familia Reoviridae, esta familia contiene seis géneros distintos: Reovirus, Orbivirus, Rotavirus, Phytoreovirus, Eijirus, y Cypovirus (69).

Los Rotavirus son además clasificados serológicamente por un esquema que permite la presencia de múltiples grupos (serogrupos) y la existencia de serotipos con cada grupo. Los serotipos son designados con números arábigos y los subgrupos con números romanos (19,21,80).

Los estudios iniciales demostraron que todos los Rotavirus estaban antigénicamente relacionados entre sí. El antígeno común de grupo está contenido en la proteína viral estructural VP6 que está localizada en la cápside interna, sin embargo, se han encontrado cepas de Rotavirus que carecen de esta característica (7,8,83).

Los Rotavirus que comparten este antígeno de grupo son clasificados como grupo A, y los que no lo comparten son designados como Rotavirus grupo no A; estos Rotavirus grupo no A, también son conocidos como Para-Rotavirus, Rotavirus-like, Rotavirus-novel o Rotavirus antigénicamente distintos (17,60)

Existen hasta el momento seis grupos de Rotavirus antigénicamente distintos designados con letras mayúsculas A-F, de los cuales cuatro afectan a los cerdos A,B,C,y E (10,13).

El grupo A, es el más comúnmente relacionado con enteritis aguda en el hombre y en animales; en cerdos la infección por éste grupo es muy frecuente y se ha asociado con el síndrome de la diarrea de leche, diarrea blanca, o diarrea de tres días en lechones de dos a seis semanas de edad. Este es el único grupo que se ha clasificado en dos diferentes subgrupos denominados I y II según los antígenos adicionales en la proteína interna de la cápside VP6 (47).

Dentro del grupo A, los serotipos están dados por dos proteínas de superficie VP4 y VP7 las cuales contienen antígenos neutralizantes que pueden ser compartidos tanto en cepas de origen animal como de origen humano (4,24,42,44,78,127).

Las glicoproteínas VP7, son designadas como tipo G y las VP4 como tipo P, estas proteínas son sensibles a las proteasas. Se han descrito en Rotavirus porcino al menos cinco serotipos G y dos P (19,49,54,56).

El grupo B, también llamado Rotavirus atípico o Rotavirus like, ha sido detectado en lechones, bovinos, y humanos (129). El grupo C, también designado como Pararotavirus, sólo se ha detectado en lechones y humanos (61). El grupo E, ha sido aislado únicamente en lechones en el Reino Unido y los Rotavirus de los grupos D y F en pollos y patos (63,65).

1.3 ESTRUCTURA DEL GENOMA

El genoma de los Rotavirus contienen 11 segmentos de ARN bicatenario con un peso molecular de 2×10^5 - 2.2×10^6 Daltons. Las partículas virales contienen una enzima ARN-polimerasa y otras enzimas capaces de transcribir cada segmento de ARN en ARN mensajero activo. Los 11 segmentos génicos codifican los distintos polipéptidos que conforman la partícula viral (68).

Las secuencias de diferentes cepas de Rotavirus han revelado características generales sobre la estructura de cada segmento del genoma; cada segmento de ARN inicia con una guanidina en la posición 5', seguida por un grupo de secuencias conservadas que son parte de las secuencias no codificables 5'; cuando se inicia la lectura de un segmento termina al detenerse en el siguiente codón y después se encuentra otro grupo de secuencias no codificables que contiene un subgrupo de secuencias conservadas en la citidina de la región.

La secuencia específica interna, esta presente en los segmentos de la cepas de Rotavirus grupo A, pero aún no se ha encontrado en los Rotavirus grupo no A. La longitud de las secuencias no codificables varían en diferentes genes y no hay señal de poliadenilación en la posición final 3' de cada gen. La fuerte conservación de las secuencias terminales en los segmentos del genoma, sugieren que contiene señales importantes para la transcripción, replicación o ensamblaje de los segmentos del genoma viral (25,48).

Para conocer cual gen codifica determinado polipéptido, se han establecido diferentes formas: Correlación de fenotipo y genotipo durante el rearrreglo de genes en la coinfección con dos Rotavirus distintos; análisis de la reacción de anticuerpos monoclonales con el producto de varios genes; aislamiento de segmentos de ARN con posterior traducción In- vitro de la fracción de ARN denaturada y análisis del polipéptido producido seguido por la traducción de segmentos de ARN transcrito por la polimerasa viral, e identificación del producto. (117).

1.4 PROTEINAS VIRALES

Se ha designado una nomenclatura para las proteínas que conforman la partícula viral; las proteínas estructurales son designadas como proteína viral (VP), la cual va seguida de un número esta de acuerdo a su peso molecular, es así que la proteína de más alto peso es denominada como VP1. Las proteínas que son generadas por el clivaje de un

gran precursor son indicadas con un asterisco, es el caso de la VP4 que es clivada para producir VP5* y VP8* (76,32).

Los segmentos 1,2,3,6, codifican para los polipéptidos de la cápside interna VP1, VP2, VP3 y VP6 respectivamente; segmentos 4 y 9 codifican para los polipéptidos de la cápside interna, VP4 (antiguamente designada como VP3 pero se llamó VP4 cuando se encontró que el segmento 3 de ARN codificaba para una proteína estructural) y VP7 respectivamente; esta última es la proteína mas abundante en el virión y es la responsable de la especificidad de serotipo, que es determinado por técnicas de neutralización con anticuerpos hiperinmunes (44,93,94).

La proteína VP4, es clivada por enzimas proteolíticas como la tripsina para producir dos péptidos con pesos moleculares de 60.000 Daltons y 20.000 Daltons; el rompimiento proteolítico de este polipéptido potencia la infectividad mejorando la penetración de este virus a las células, además, se considera que la VP4 es una proteína multifuncional debido a que es responsable de la hemaglutinación de ciertos Rotavirus y desempeña un importante papel en la virulencia de Rotavirus heterólogos de ratones e inductora de anticuerpos neutralizantes que pueden proteger de la enfermedad causada experimentalmente por Rotavirus (95).

El segmento 11, codifica para un polipéptido de localización incierta, pero puede ser el precursor de la proteína VP9 ó para una proteína no estructural. Los segmentos 5,7,8 y 10 codifican para proteínas no estructurales (25).

Se conoce que el gen 6 codifica para la proteína VP6, considerada altamente antigénica e inmunogénica, pero aún no es claro si ésta interviene en la inducción de anticuerpos protectores (28).

1.5 EPIDEMIOLOGIA

El Rotavirus porcino, es la mayor causa de infección enzoótica en las granjas porcinas; la transmisión de este agente viral ocurre por la vía oro-fecal, al diseminarse el virus en la paja (67).

Los niveles más altos de la diseminación del Rotavirus se presentan en los estados agudos de la infección, donde el Rotavirus porcino grupo A se excreta en las heces durante 14 días, en cambio el grupo B, es excretado en menores cantidades y en un período de duración más corto; sin embargo, en infecciones recurrentes por Rotavirus porcino se ha detectado su presencia en excreciones intermitentes, éstas infecciones posiblemente representan virus con serotipos o serogrupos diferentes (66,118).

Generalmente se ha encontrado que las madres no excretan el virus, no obstante, pueden diseminarlo ocasionalmente cerca a sus críos, generando una fuente de infección para éstos (10,39,71).

Usualmente, los lechones entre 7 y 41 días de edad son más susceptibles a la infección por Rotavirus, pero es menos frecuente en lechones menores de 7 días; esto, posiblemente es debido a la protección que le confiere los anticuerpos presentes en el calostro (146).

El período de incubación de la enfermedad diarreica por Rotavirus en porcino, ha sido estimada entre 12 a 24 horas; posteriormente los lechones presentan anorexia y ocasionalmente vómito. La diarrea es severa y profusa, generalmente se inicia entre la primera y cuarta hora después de presentarse los síntomas; las heces son acuosas o cremosas y entre blancas o amarillentas. Esta sintomatología diarreica tiene una duración entre 3 a 5 días y las heces recobran su consistencia entre los 7 y 14 días siguientes(137).

1.6 PATOGENESIS

La patogénesis de la infección por Rotavirus, se ha estudiado en cerdos gnotobióticos (libres de gérmenes), inoculados oralmente con una cepa de campo de Rotavirus porcino (10,84).

La replicación del virus ocurre en las células epiteliales de las vellosidades intestinales, las cuales son importantes en la absorción de nutrientes. La lisis y descamación de las células infectadas causa atrofia en las vellosidades y el grado de atrofia varía dependiendo de la edad del lechón, siendo un factor determinante en la severidad de la enfermedad clínica (77,138).

Los Rotavirus generalmente penetran por endocitosis a la célula y son liberados directamente dentro de vesículas que al fusionarse con los lisosomas primarios constituyen el fagolisosoma, en el cual es removida la cápside externa resultando partículas de 55nm de diámetro, lo cual activa la ARN polimerasa endógena del virus; de dicha actividad se produce la síntesis de ARN mensajero viral de proteínas virales y el ARN de doble cadena, los cuales se acumulan en el citoplasma de las células epiteliales en forma de viroplasma, lo que se observa a las seis horas post-infección; los Rotavirus también pueden entrar a las células directamente, a través de las membranas citoplasmáticas (62,107).

El ARN se va empaquetando en el nucleocápside, y las proteínas se van ensamblando a su alrededor, formando partículas de una sola cápside que migran hacia las vesículas dilatadas del retículo endoplasmático rugoso, en el paso a través de la membrana citoplasmática, se cree que adquiere su cápside externa, convirtiéndose en forma infecciosa, el mecanismo de liberación es por lisis (84).

Se han reportado en algunos casos, la presencia de viriones dentro de las crestas mitocondriales, las cuales se encuentran hinchadas o rotas (128).

La infección causa alteraciones en la integridad celular, especialmente entre la octava y doceava hora post-infección, las células epiteliales comienzan a mostrar granulaciones en el citoplasma, que van progresando hasta producirse el desprendimiento celular. La membrana nuclear se presenta discontinua, con una marcada dilatación en algunas áreas de las cisternas perinucleares. Entre las doce y trece horas post-infección, la eucromatina se presenta agregada o en la periferia del núcleo (86).

El establecimiento de la diarrea, se produce por la destrucción de los enterocitos y por la disminución en el nivel de disacaridasas presentes en las células entericas inmaduras; estas enzimas son retenidas en el lumen intestinal y el exceso produce una hiperosmolaridad en el contenido intestinal causando la diarrea (133).

La duración de la diarrea esta determinada por el tiempo necesario para la restauración de un número adecuado de vellosidades de las células epiteliales (143).

La patogénesis de los Rotavirus grupos B, C y E en lechones, han sido menos estudiadas que el grupo A, sin embargo, la atrofia de las vellosidades es más severa en los grupos A y C. De otro lado, se han estudiado infecciones combinadas de Rotavirus con otros enteropatógenos (E. Coli enterotoxigénica) y el resultado es una diarrea mucho más severa que cuando es infectado por un sólo agente (133).

1.7 MORBILIDAD Y MORTALIDAD

Esta enfermedad viral causa una elevada tasa de morbilidad, que puede alcanzar entre un 80% a un 90%. En los lechones se produce una baja de peso y un severo retraso en el crecimiento, lo que genera grandes pérdidas económicas en la industria porcina (59).

La mayor causa de muerte es la deshidratación que puede llegar a ser del 10%, sin embargo, la tasa de mortalidad disminuye con el incremento en la edad del lechón.

En un estudio epidemiológico retrospectivo, realizado en una población porcina en el estado de Iowa, durante un año (1987-1988); uno de los objetivos planteados fué, comparar el papel del Rotavirus en la enfermedad diarreica con otros agentes etiológicos reportados en los cerdos; los resultados indicaron que los lechones con infección por Rotavirus no presentaron enfermedad diarreica severa a menos de una coinfección por *Escherichia coli* ó *Isospora suis*; además, se encontró una alta incidencia de infección por Rotavirus en lechones entre 3 a 6 semanas de edad y una rápida disminución en la enteritis rotaviral y no rotaviral en lechones de 2 a 3 semanas de edad. El nivel más alto de presencia de diarrea fue en el mes de febrero y moderado en Agosto y Septiembre. A raíz de este estudio los autores sugieren una mayor participación del laboratorio para el diagnóstico veterinario en investigaciones epidemiológicas con el fin de obtener un mayor control en la enteritis porcina (144).

De otro lado, en Colombia se han realizado algunas investigaciones sobre Rotavirus en animales domesticos. Mogollón y colaboradores (87), llevaron a cabo un estudio para determinar las causas principales de la diarrea neonatal en terneros; se examinó la materia fecal de 493 animales con y sin diarrea en 49 fincas del Valle de Ubaté y 36 del Piedemonte Llanero; se empleó la técnica ELISA como prueba tamiz para detectar los Rotavirus, los casos positivos se examinaron por microscopio electrónico y se inocularon en células de riñon de mono (MA-104).

La presencia de cepas de Rotavirus fueron encontradas en terneros neonatos y en sus madres; éstas no tenían diarrea, en los neonatos, algunos presentaron diarrea y otros no. Se encontró que la diseminación viral puede ocurrir posiblemente durante todo el año ya que el muestreo se realizó durante 8 meses; los investigadores atribuyeron la persistencia del virus en el medio ambiente, al manejo de los neonatos en salacunas y a

su alimentación en baldes sin condiciones higiénicas adecuadas, sin embargo, se concluyó que la infección por Rotavirus no parece ser un problema mayor en las áreas examinadas.

Otra investigación fue la realizada por Gonzalez y colaboradores (47), los cuales, en una piara de manejo convencional semintensiva, estudiaron nueve camadas en el transcurso de 10 meses del año. Durante ese lapso, el 87% de los lechones de ocho de las camadas, presentaron diarrea de variada intensidad y el 17% de los lechones de tres días, excretaron el virus, el cual se diagnosticó por medio de un ELISA comercial dirigido para detectar Rotavirus grupo A; también, se demostró la presencia del virus en cerdas de reproducción y aparentemente no hubo influencia sobre la presentación de la infección en su descendencia.

En este estudio se concluyó, que la infección en los lechones, se originó por la persistencia del virus en el medio ambiente y no a partir de las madres; además condiciones medio ambientales como la temperatura y humedad, que predisponen a la enfermedad.

1.8 INMUNIDAD

Los estudios serológicos muestran un alto porcentaje (77-100%) de cerdos adultos seropositivos para los grupos A, B y C de Rotavirus. Parece existir una relación entre la edad con la incidencia serológica, los niveles más bajos de anticuerpos para los grupos B y C, son encontrados en lechones de 3 a 8 semanas de edad, en cambio todos los lechones de esta edad tienen anticuerpos para el grupo A de Rotavirus; igualmente se han detectado anticuerpos para el grupo C en un 100% para los cerdos adultos, 50% para cerdos destetos y 86% para lechones lactantes (28,60,96).

La inmunidad pasiva es transmitida al lechón a través del calostro y la leche, los niveles de anticuerpos específicos para Rotavirus en ambas secreciones disminuyen

dramáticamente en los primeros días de la lactancia. Generalmente, la protección inmunológica se correlaciona con la presencia de anticuerpos en las secreciones; en el lumen intestinal, los anticuerpos cubren las vellosidades de las células epiteliales protegiéndolas de la infección por Rotavirus.

La inmunoglobulina A secretora, es más efectiva que la inmunoglobulina G y la M, además la IgA, es más resistente a la degradación proteolítica en el tracto intestinal. Los anticuerpos séricos no confieren protección permanente contra la infección por Rotavirus (120,124).

1.9 INMUNOPROFILAXIS

La contaminación del medio ambiente, juega un papel muy importante en la permanencia del Rotavirus en la granja; el Rotavirus porcino es estable a condiciones extremas y resistente al uso de desinfectantes comunes. No obstante, entre las medidas preventivas están: desinfección permanente de las granjas, especialmente en donde se encuentran las crías, además, evitar el contacto entre lechones susceptibles a contraer la infección de cerdos adultos, los cuales son probables diseminadores del virus.

De otro lado, no existe un tratamiento específico para la infección por Rotavirus porcino, generalmente, se suministran soluciones electrolíticas para minimizar la deshidratación y pérdida de peso, también se recomienda la administración de antibióticos para contrarrestar infecciones bacterianas secundarias (141)

También se han logrado desarrollar vacunas que permiten prevenir la gastroenteritis aguda producida por este agente, en neonatos de diferentes especies.

Una vacuna efectiva, depende en gran parte en la habilidad para estimular la inmunidad local tipo IgA, en el intestino. Se han aplicado varias estrategias para el desarrollo de

una vacuna óptima; inicialmente se utilizó la inmunización oral con cepas de Rotavirus vivas y atenuadas tanto de origen animal como humano, pero no se obtuvo el resultado esperado, debido a la baja inmunogenicidad producida en animales experimentales (6,43).

Se han logrado obtener vacunas a partir de proteínas recombinantes expresadas en vectores tales como la *Escherichia coli*, virus de la Vaccinia, Baculovirus, *Salmonella typhi*, capaces de producir una replicación no virulenta en los animales a los cuales se les ha suministrado el inóculo; sin embargo, la utilización de vectores recombinantes es de uso limitado por ser poco práctico en la vacunación (109).

De otro lado, se han empleado péptidos sintéticos que abarcan casi toda la secuencia de aminoácidos del gen que codifica para la VP7; no obstante, ha sido muy pobre la estimulación en la formación de anticuerpos neutralizantes cuando son suministrados a animales de experimentación (3).

2. DIAGNOSTICO

En lechones neonatos de 1 a 8 semanas de edad en donde la causa de diarrea es el Rotavirus, son ideales las muestras fecales en la fase aguda de la enfermedad para ser sometidas a un examen por el laboratorio; esto se debe a que las cantidades más altas de partículas virales son eliminadas durante las primeras 12 a 24 horas de iniciación de la diarrea.

Un gran número de métodos han sido empleados para la detección de Rotavirus, en donde se incluyen: Microscopía electrónica, Inmuno electro-microscopía, ELISA, Aglutinación en latex, y el aislamiento del virus en cultivos celulares.

La microscopía electrónica, es una técnica que permite el análisis de agregados de alto peso molecular como son los virus, ribosomas o sustancias de tipo fibroso (colágeno, microtúbulos, microfilamentos, ácidos nucleicos). Los especímenes investigados son puestos sobre una rejilla y cubiertos con una gota de Acetato de Uranilo o Fosfotungstato de Potasio, haciendolas electrónicamente más densas; logrando ser observadas por un brillo relativo en la pantalla fluorescente, esta metodología es conocida como tinción negativa y es particularmente adecuada para la detección de Rotavirus porcino (12,35,91).

La Inmuno electro microscopía, puede identificar todos los grupos de Rotavirus causantes de diarrea en varias especies, ofrece una buena especificidad, aunque está condicionada a un número suficiente de partículas virales, un bajo número de éstas

puede impedir un óptimo resultado (115); éste problema se puede obviar si la muestra es incubada con suero inmune específico de grupo, en donde el anticuerpo se une al grupo específico del Rotavirus y concentra el agente viral; de esta forma ésta técnica permite la caracterización de Rotavirus porcino antigénicamente distintos.

La técnica de ELISA, es otro método que permite la detección de antígeno de Rotavirus en muestras fecales, se considera el de escogencia por muchos laboratorios dada su eficiencia y el no requerimiento de equipo sofisticado para su desarrollo. La ELISA y la Microscopía electrónica, han sido comparadas para determinar la presencia de Rotavirus, encontrándose un alto grado de concordancia en los resultados obtenidos (23,33).

Un estudio comparó una técnica basada en Aglutinación en latex con la de ELISA, utilizando la microscopía electrónica como la técnica de referencia; la técnica en latex, reportó la más alta especificidad y la ELISA la más alta sensibilidad; sin embargo, la ELISA tiene como gran inconveniente la incapacidad de detectar Rotavirus de todos los grupos, además presenta una alta rata de resultados falsos positivos (26,36,64). Existen kits diagnósticos que son usados para la detección de Rotavirus porcino grupo A en materia fecal por ésta técnica (46)

Los Rotavirus grupo B son idénticos morfológicamente pero antigénica y genéticamente diferentes del típico Rotavirus grupo A. La prevalencia y significancia de estos Rotavirus no ha sido firmemente establecida, esto es dado por las dificultades en la obtención de reactivos que estén bien caracterizados, y de amplia disponibilidad; adicionalmente, éste Rotavirus grupo B, no ha sido adaptado a cultivos celulares (14,139).

De otro lado, el Rotavirus porcino grupo C ha sido cultivado en líneas celulares de riñón de mono Rhesus (MA-104) y detectado por inmuno electro microscopía, usando

un antisuero policlonal contra el virus purificado. Recientemente, se ha producido un anticuerpo monoclonal (Mab), contra una proteína del Rotavirus grupo C, existe una ELISA que utiliza este anticuerpo monoclonal unido a un sistema biotina-streptovidina, que reporta una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de Rotavirus grupo C (37,97).

La caracterización y producción de anticuerpos monoclonales neutralizantes contra diferentes serotipos de Rotavirus, han generado la disposición de reactivos útiles para la serotipificación de Rotavirus porcino (88).

El radioinmunoensayo (RIA), se ha usado exitosamente en la detección de Rotavirus, sin embargo, tiene inconvenientes como son el equipo sofisticado y el material radiactivo que requiere (111).

La Inmunofluorescencia (IF), es una técnica usada para teñir células excretadas en materia fecal de animales infectados con Rotavirus; el problema de la fluorescencia es no ser específica y ha impedido que sea utilizada a nivel humano; sin embargo, esto puede ser solucionado si el antígeno viral es primero separado por precipitación inmune antes de la coloración; no obstante, este método es dispendioso (124)

La Hemaglutinación Pasiva Reversa, constituye otra técnica que permite evaluar la presencia de Rotavirus en muestras fecales con una sensibilidad semejante al método de electroforésis en geles de poliacrilamida (PAGE); sin embargo, su mayor limitación esta dada por la presencia de factores hemaglutinantes no específicos; no obstante, pueden ser obviados por una o más adsorciones de la muestra con globulos rojos de oveja (90).

De otro lado, la Inmunofluorescencia, Inhibición de la Hemaglutinación, Fijación de Complemento, ELISA y Neutralización, también son empleadas para la medición de anticuerpos.

Inicialmente, el antígeno usado para la técnica de Fijación de Complemento fué el Rotavirus humano, obtenido de un extracto fecal pero fué reemplazado por Rotavirus bovino adaptado a cultivo celular. Una limitación de esta técnica, es que no distingue entre anticuerpos de especies de diferente origen (70)

La Inmunodifusión radial (ID), constituye otro método simple y de bajo costo para la detección de anticuerpos de Rotavirus específicos de grupo, utiliza concentrados ultracentrifugados de materia fecal como antígeno contra suero de niños y animales convalescientes.

La Inmunofluorescencia, ha sido usada para evaluar títulos de anticuerpos séricos contra Rotavirus; esta prueba es muy sensible y tiene la ventaja de ser adaptable a la medición de clases específicas de inmunoglobulinas. La IgA, ha sido también medida por esta técnica; del mismo modo pruebas como la Inhibición de la Hemaglutinación (IH), se han desarrollado para la detección de anticuerpos contra Rotavirus porcino (85).

La Fijación de Complemento, Inmunofluorescencia, Inmunodifusión radial e Inmuno electro microscopía, han permitido demostrar que los Rotavirus tienen un antígeno común que esta asociado con la cápside interna de la partícula viral; sin embargo, no hay aún un sustituto para el método de neutralización, cuando se requiere evaluar el anticuerpo específico para serotipo. En este caso el ensayo de reducción en placa es más sensible que la neutralización en tubo para la detección de anticuerpos, aunque este último es un poco más eficiente para la detección de una respuesta sérica (88).

2.1 CULTIVO CELULAR

Después de identificar el Rotavirus como una causa importante de gastroenteritis aguda, se han realizado grandes esfuerzos para poder ser cultivado In- vitro: Tanto los Rotavirus humanos como los animales, no crecen fácilmente en los cultivos celulares y por tanto se requiere de condiciones especiales en la fase inicial de la infección celular, para poder llevar a cabo la propagación de grandes cantidades de estos virus que permitan estudios comparativos y de caracterización (2,29,130).

Numerosos estudios se han realizado con diferentes tipos de células de riñón, incluyendo líneas continuas y células primarias, con el fin de encontrar las mejores condiciones que permitan la propagación de estos virus en cultivos (1,142)

Inicialmente, los Rotavirus porcinos fueron adaptados a cultivos celulares primarios de riñón de mono, con pretratamiento de los viriones con enzimas proteolíticas, posteriormente, fueron propagados en la línea celular MA-104 de riñón de mono Rhesus (72).

Varias cepas del grupo A de Rotavirus porcino se han cultivado satisfactoriamente en ésta línea celular, en donde los viriones han sido inicialmente tratados con tripsina en una concentración de 10µg/ml durante 30 minutos a 37°C; seguidamente, éste inóculo se adiciona a la monocapa celular durante una hora a 37°C con agitación cada 10 minutos para lograr de esta forma una óptima adsorción, es indispensable que el medio de mantenimiento no contenga suero fetal bovino (130,131,134).

Las cepas de Rotavirus adaptadas a cultivo celular, producen un efecto citopático caracterizado por el oscurecimiento y redondeamiento de las membranas celulares, las cuales se agrupan para un posterior desprendimiento de la superficie y por último lisis celular (131)

Recientemente, una línea celular obtenida a partir de intestino de porcino, ha sido exitosamente utilizada para la propagación de la cepa C/Cowden y la cepa Iowa C/IA-850 del grupo C del Rotavirus(Proescholdt y Paul 1991, citado por Paul y Stevenson 1992)(102).

El método del cultivo celular, se ha considerado como prerequisite básico para el estudio de propiedades genéticas y antigénicas de las diferentes cepas de Rotavirus aisladas, además, para la preparación de antígenos y sueros inmunes para el posterior diagnóstico de Rotavirus (134).

2.2 TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR EN EL DIAGNOSTICO VIRAL

En los últimos años se han empleado técnicas de biología molecular aplicadas a la identificación de agentes infecciosos que afectan a diferentes especies animales.

Debido a las bondades ofrecidas por estas técnicas, se han empleado en estudios epidemiológicos a nivel de medicina veterinaria, las más empleadas son las Electroforésis, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y Dot-Hibridización.

La base de las técnicas en biología molecular, consiste en una buena extracción y purificación de los ácidos nucleicos de los diferentes materiales biológicos. Recientemente se han descrito procedimientos que permiten la extracción de ARN del Rotavirus a partir de muestras fecales. Generalmente, se selecciona un método que proporcione una buena calidad del ARN con una efectiva desproteínización sin degradarlo (116).

El método más comúnmente empleado, es la extracción con fenol, el cual disocia las proteínas de ácidos nucleicos formando dos fases después de una centrifugación:

una fase inferior orgánica con fenol que contiene proteínas, restos celulares y otros sólidos; la fase acuosa que contiene el ARN; además, se utiliza una mezcla de fenol-cloroformo con el fin de obtener una mayor eficiencia en la extracción de los ácidos nucleicos (140).

La alta densidad mejora la separación de las dos fases, facilitando la remoción de la fase acuosa con muy poca contaminación de material orgánico.

Generalmente, se adiciona alcohol isoamílico a la mezcla de fenol-cloroformo para evitar la formación de espuma; se han realizado apropiadas modificaciones al método de extracción con fenol, utilizando agentes denaturantes más efectivos como lo es el Tiocianato de Guanidina.

Cox y colaboradores, 1968 (citado por Chomczynski y colaboradores 1987), fueron los primeros en emplear el Tiocianato de Guanidina como un agente desproteinizante ya que inicialmente era utilizado como un fuerte inhibidor de ribonucleasas. Existe un procedimiento en el cual se combina este agente desproteinizante con una mezcla de fenol-cloroformo, para procesar un gran número de muestras en poco tiempo con buena recuperación de ARN de la muestra (18).

De otro lado, la precipitación con etanol, es probablemente el método más versátil para concentrar los ácidos nucleicos; su uso es frecuente en la recuperación de ADN ó ARN después de la extracción con fenol, generalmente, esta precipitación va acompañada de bajas temperaturas (-20°C o más baja) (140).

En el pasado, el aislamiento de ARN era realizado en presencia de altas concentraciones de sal con el fin de reducir el efecto de las ribonucleasas endógenas, pero no se obtenían los resultados esperados; sin embargo, hoy en día ya se disponen de inhibidores de ribonucleasas más efectivos, siendo el más usado el Dietil Pirocarbonato (DEPC)(116).

La secuenciación del ARN ha proporcionado datos invaluable acerca de la organización del material genético, su evolución y función; basándose en esta técnica se ha logrado establecer que muchos Rotavirus humanos y animales comparten antígenos comunes. Un estudio realizado por Glass y colaboradores (44), en donde a partir de una copia de cADN del gen que codifica para la glicoproteína VP7 de una cepa de referencia de Rotavirus bovino (Nebraska), fué secuenciada con el fin de comparar la distribución de aminoácidos, con la de cuatro cepas de Rotavirus humano de diferente serotipo (G1,G2,G3,G6) y establecer similitudes entre ellas. Se encontró un grado de homología del 75-86% especialmente en las regiones hidrofílicas de los aminoácidos, ya que pueden corresponder a regiones en donde se ubican determinantes antígenicos comunes para Rotavirus de diferentes especies.

Del mismo modo, la identificación molecular de Rotavirus porcinos por Hibridización del ARN-ARN dentro de estrictas condiciones, hace posible el estudio de las relaciones génicas entre los Rotavirus humano y animal. El término genogrupo ha sido utilizado para describir cepas de Rotavirus que pueden ser ubicadas como similares con base en la homología génica (117).

El compartir un genogrupo, por dos cepas de Rotavirus derivadas de diferentes animales podría ser interpretado como una secuencia de transmisión interespecie de un Rotavirus animal a otro, como resultado de poseer un ancestro (origen) en común. Así por ejemplo, Nakagomi y colaboradores (89), utilizaron la técnica de hibridización ARN-ARN y demostraron que la cepa AU228 de Rotavirus humano aislado de un niño sintomático con una historia de contacto con un gato, estaba estrechamente relacionada genéticamente con la cepa de Rotavirus felino FRV-1.

Se han llevado a cabo investigaciones que utilizan la técnica de Hibridización con el fin de determinar el grupo de cepas de Rotavirus, para lo cual se emplean sondas obtenidas de copias de cADN de un gen específico (89).

Sondas obtenidas a partir de clones del gen 3 de la cepa de referencia de Rotavirus grupo B (IDIR), las cuales tienen la capacidad de detectar cantidades en nanogramos de ARN, fueron preparadas con el fin de identificar por Hibridización Rotavirus del grupo B, en seis muestras fecales de terneros; de las cuales cinco de ellas fueron positivas para ésta técnica. Una muestra fecal obtenida de un paciente infectado con una cepa de Rotavirus de diarrea en adultos (Grupo B), también fué positiva para éste ensayo, además, especímenes fecales no infectados por Rotavirus de humanos, terneros y ratas, como también muestras que contenían Rotavirus grupo A, no hibridizaron con la sonda, confirmando la especificidad de ésta (27,98,99).

El uso de sondas a partir de cADN, también han sido empleadas con el fin de determinar el serotipo (P y G) de cepas de Rotavirus, por ensayos de hibridización (100).

En el estudio realizado por Rosen y colaboradores (112), en el cual se emplearon sondas derivadas de los genes 9 y 4 de las cepas Gottfried y OSU también de Rotavirus porcino YM (G11) y humano Wa (G1) que fueron amplificadas por PCR con el fin de establecer Rotavirus grupo A con especificidad tipo P y G en 52 muestras fecales de lechones con diarrea en los Estados Unidos y Canadá. Sólo 11 de las muestras analizadas hibridizaron con la sonda YM (G11), siendo la primera vez en que se reporta la presencia de Rotavirus G11 en los Estados Unidos. Un gran número de muestras positivas para Rotavirus que no reaccionaron con las sondas Gottfried y OSU, sugiere que Rotavirus con otra especificidad P y G podrían estar presentes en los lechones.

Otro método molecular, es la técnica del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que originalmente fué descrita para la ampliación de segmentos de ADN, fué adaptada para obtener la amplificación de ARN de Rotavirus, obtenido directamente de materia fecal y de esta forma lograr el diagnóstico viral (145,147).

Del mismo modo, esta técnica ha permitido la tipificación de cepas de Rotavirus con serotipos de importancia veterinaria (G1, G5, G10 y G11), basándose en la especificidad antigénica viral VP7 o serotipo G, además, cepas de Rotavirus tipo G6 y G8 que no habían sido previamente reconocidas en lechones, fueron identificadas en cepas de campo de origen porcino, es así como ésta técnica constituye una alternativa para monitorear la presencia y distribución de cepas de Rotavirus tipo G en diferentes poblaciones animales (50,52)

Igualmente, la diversidad antigénica VP4 o serotipo P, también ha sido determinada por PCR en cepas de Rotavirus de origen bovino (NCDV, UK, B223) y porcino (OSU y Gottfried). De la información de la frecuencia y distribución de serotipos individuales puede depender el desarrollo de una vacuna eficiente contra Rotavirus (41,53).

Por medio del método molecular PCR se han generado clones de ADN a partir de los cuales se preparan sondas radiomarcadas que permiten la detección y caracterización serotípica de cepas de Rotavirus de animales. Las sondas de ácido nucleico son preparadas de segmentos génicos de Rotavirus que codifican para VP7 y son caracterizadas en ensayos de dot blot hibridización; éstas sondas pueden detectar 1 ng de ARN viral. La serotipificación obtenida usando sondas VP7 es similar a la lograda usando ensayos serológicos (100,101,106).

De otro lado, la mayoría de estudios de epidemiología molecular de Rotavirus a nivel veterinario, se han analizado utilizando la técnica de electroforesis, debido a que ésta

proporciona características específicas para una cepa viral dada, además de ser reproducible(57,75,82,92)

La electroforésis es considerada como una técnica que permite la separación y el fraccionamiento de las proteínas. Existen diversas variaciones de las técnicas electroforéticas, pero todas dependen de la capacidad migratoria de las moléculas cargadas en solución, cuando se les coloca en un campo eléctrico (74). La distancia a la cual migra una proteína depende de su peso molecular y de su carga, la cual depende del pH del medio; también, detergentes como el SDS, le confiere cargas negativas a todas las proteínas y solo se separan según el tamaño de cada péptido.

Esta técnica, también se usa ampliamente en la separación de los ácidos nucleicos de diversos pesos moleculares; es decir de diferente longitud de nucleótidos. Cuando el ARN o las moléculas de ADN son de una longitud relativamente corta, aproximadamente de unas mil pares de bases, por lo general pueden ser separadas por electroforésis.

Todas las moléculas de ácidos nucleicos independientemente de su longitud tienen una densidad de carga semejante; entre mayor sea el peso de la molécula de ARN o ADN más lento es el desplazamiento que sufre a través del gel.

La sensibilidad de la electroforésis en gel es tan grande que las moléculas de ADN o ARN que difiere por un sólo nucleótido pueden separarse entre sí, lo cual constituye una característica que da gran valor a éste método para la secuenciación de ácidos nucleicos.

Posterior a la electroforésis, las bandas de ARN pueden ser visualizadas con luz ultravioleta después de una tinción con bromuro de etidio o con tinción de nitrato de

plata (16,58). La autoradiografía, también ha sido usada para detectar segmentos de ARN marcado con P32 radiactivo (31)

El orden de migración y separación de los segmentos es característico para una cepa viral y esto se conoce con el nombre de patrón electroforético o electroferotipo (34,103,104,136).

Existe un esquema para caracterizar y clasificar los electroferotipos de las cepas de Rotavirus, el cual fué propuesto por Lourenco y colaboradores 1981 (citado por Estes y Col 1984); este esquema divide los 11 segmentos en 4 grupos. Las bandas de 1-4 de los segmentos de ARN son denotados como grupo I, bandas 5 y 6 como grupo II, bandas 7-9 como grupo III y las bandas 10 y 11 como grupo IV. Las diferencias en la migración de los fragmentos genómicos son identificados con letras minúsculas del alfabeto (31,119)

Los estudios recientes, no utilizan el esquema anterior de clasificación para identificar los 11 segmentos de ARN de Rotavirus; generalmente los segmentos son numerados de 1 a 11 y ésta numeración se ubica al lado izquierdo del perfil electroforético. A cada electroferotipo se le asigna una letra mayúscula del alfabeto ubicada en la parte superior de éste, también se han utilizado números arábigos en lugar de letras(51,123)

Existe otra clasificación que va a depender de la migración de los segmentos 10 y 11 produciéndose dos patrones; es denominado patrón corto cuando la migración de los segmentos 10 y 11 es más corta que la distancia de migración del segundo patrón denominado patrón largo (5).

El patrón corto (Short) es designado con la letra S y el patrón largo (Long) con la letra L (40,113); también existe un patrón super-corto (Super-short) en el cual la

velocidad de migración de los segmentos 10 y 11 es más lenta que en el patrón corto (1,125)

De otro lado Tom y colaboradores 1986 (citado por Rasool y Col 1989) adoptó otro sistema de clasificación en el cual se utilizan números romanos, el patrón largo fué designado con el número II y el corto con el número I (108)

Se ha descrito una asociación entre el serogrupo de una cepa de Rotavirus con su patrón electroforético, lo cual ha sido utilizado como una ayuda indirecta para la clasificación del Rotavirus (114). Este esquema agrupa los 11 segmentos del genoma en cuatro regiones; el Rotavirus del grupo A. presenta una movilidad característica, segmentos 1,2,3,4 región I, segmentos 5 y 6 región II, segmentos 7,8,9 región III y bandas 10 y 11 región IV.

El Rotavirus B, tiene como patrón la siguiente migración de las bandas 1,2,3,4, región I, bandas 5 y 6 región II, bandas 7,8 región III y bandas 9,10,11 como región IV. El Rotavirus C presenta una movilidad característica: Bandas 1,2,3,4, región I, bandas 5,6,7, región II, bandas 8,9 región III, bandas 10 y 11 región IV.

En el grupo E, el patrón electroforético es similar al descrito por el grupo B, excépto la migración de los segmentos 7 al 11 ya que lo hacen de una forma equidistante el uno del otro; de esta forma se hablaría de una correlación entre electroferotipo y serogrupo, sin embargo, se hace necesaria la realización de ensayos serológicos debido a que son más confiables (102,110).

No existe un esquema de clasificación que pueda ser aplicado en todos los análisis de patrones electroforéticos, por lo general, se emplean diferentes convenciones ya sean números o letras dependiendo de la clasificación que crea conveniente el investigador.

Los electroferotipos de cepas de Rotavirus obtenidos a partir de materia fecal de cerdos, revelan una gran diversidad en los Rotavirus que afectan a una porcícola convencional, de esta forma se ha logrado establecer una relación entre la variabilidad genética con factores tales como el clima, temperatura, edad y susceptibilidad del lechón(11,45,75,121,122

En contraste, variaciones genómicas entre los electroferotipos de cepas de Rotavirus bovino, fueron analizados en distintos hatos lecheros en Argentina; en este estudio sólo se detectó un electroferotipo en cada una de ellas y persistieron casi por un año. De acuerdo al patrón de migración de estas cepas fueron clasificadas como grupo A, solo ocurrió una infección dual y por tanto la presencia de otro electroferotipo en una de las fincas. Los autores concluyeron que cuando una cepa dominante de Rotavirus es introducida a una comunidad susceptible causa una epidemia y persiste con una aparente estabilidad genómica durante un largo período de tiempo (34,73).

En Colombia, se realizó un estudio con 20 muestras de materia fecal de pollitos de engorde y de pollitas de reemplazo, cuya edad osciló entre 1-35 días, los cuales presentaron diarrea. Las muestras fueron examinadas mediante microscopía electrónica, prueba de ELISA y electroforésis encontrándose una cepa de Rotavirus atípica, la cual fue negativa por ELISA.

El patrón electroforético fué similar al denominado 132 detectado en Irlanda del Norte, aunque los segmentos 4,5,8,9, presentaron una mayor separación. Los resultados de este estudio sugieren la presencia simultánea de Rotavirus típicos y atípicos en algunos planteles avícolas del país (15)

En una investigación realizada en el Reino Unido, se aislaron dos cepas de Rotavirus atípicos, las cuales fueron obtenidas de 900 muestras fecales, adquiridas de lechones con diarrea; los perfiles genómicos de estas dos cepas contenían 11 segmentos de

ARN que no correspondían al electroferotipo característico del grupo A, por no presentar la tripleta que conforman los segmentos 7,8 y 9. Sin embargo, los perfiles electrofóreticos eran distintos a los presentados por otros grupos atípicos de Rotavirus porcino, ya que estos mostraron una migración equidistante de los segmentos 7,8,9,10,y 1 (17).

En un estudio posterior, fueron colectadas 156 muestras fecales de cerdos con enfermedad diarreica en diferentes pías localizadas en las dos principales áreas porcícolas de Argentina; entre las muestras, 60 fueron positivas para Rotavirus, por medio de la técnica de electroforésis y 55 por un inmunoensayo específico para Rotavirus grupo A (ELISA).

Todas las muestras que fueron positivas por electroforésis y negativas por ELISA, presentaron electroferotipos semejantes a los grupos B y C; además, estas cepas virales fueron subgrupadas al ser analizadas con anticuerpos monoclonales y se encontró que 13 cepas pertenecían al subgrupo I, dos cepas al subgrupo II, dos cepas mostraron tener ambos subgrupos y 15 no presentaron ningún subgrupo. Diez de estos virus fueron adaptados a cultivo celular, clonados y serotipificados por medio de técnicas de neutralización (83).

De otro lado, se llevó a cabo en México, un estudio cuyo objetivo fué determinar la presencia de Rotavirus en granjas porcinas del estado de Yucatán. Desde febrero de 1992 hasta la primera semana de Mayo de ese mismo año, se analizaron 170 muestras de heces de lechones con diarrea entre 1 a 4 semanas de edad, procedentes de 15 granjas porcícolas, donde las medidas de bioseguridad eran mínimas.

Las muestras fueron estudiadas por electroforésis en geles de poliacrilamida; en los resultados se encontraron diferencias en los patrones electroforéticos con respecto al

número de bandas; sin embargo, todas las cepas fueron clasificadas dentro del grupo A de Rotavirus.

De las 15 granjas muestreadas, solo en seis de ellas se encontró la presencia de Rotavirus con un bajo porcentaje de muestras positivas, lo cual no se esperaba ya que la literatura reporta un 42% para marranas excretoras de Rotavirus antes y después del parto infectando así a las crías; sin embargo, el porcentaje encontrado en las granjas se consideró alto, teniendo en cuenta que las medidas de bioseguridad son mínimas (106).

Investigadores en el Reino Unido, han encontrado un virus con la morfología del Rotavirus, pero antígenicamente distinto a las cepas de Rotavirus porcino previamente descritas. Esta partícula viral midió 75 nm de diámetro con su cubierta externa y 63 nm sin ella; el análisis del genoma indicó que estaba compuesto de 11 segmentos de ARN de doble cadena, pero con una migración diferente a la presentada por el Rotavirus grupo A ya que los segmentos 5 y 6 migraron mucho más cerca el uno del otro; la tripleta conformada por los segmentos 7,8 y 9, fue reemplazada por una dupla, además, dos bandas se ubicaron en la posición de la banda 10 del grupo A (13).

Otro estudio epidemiológico realizado con muestras fecales de terneros en el Sur de Africa, se hizo con el fin de analizar las distintas cepas de Rotavirus que afectaban a los terneros de dos fincas en un periodo de un año (1988-1989).

Las 143 muestras obtenidas fueron procesadas por electroforésis y encontrándose cuatro electroferotipos distintos que compartían la característica de ser patrón largo; sólo un perfil fue identificado en las fincas durante 1988, pero dos se encontraron a principios de 1989 uno en cada finca, estos electroferotipos diferían en la migración de los fragmentos genómicos 2,5,8 y 9 (21).

No obstante, se llevo a cabo una investigación en Gran Bretaña en donde las muestras fecales fueron obtenidas de 43 terneros infectados por Rotavirus que presentaban enfermedad subclínica. Las cepas virales fueron estudiadas de acuerdo a los perfiles electrofóreticos obtenidos, se encontraron ocho patrones genómicos, en uno de los cuales la variación se presentó como la ausencia del fragmento 11 y la aparición de una banda entre el fragmento 6 y 7 .

Estos ocho perfiles electroforéticos indicaron ser grupo A al reaccionar con una ELISA específica para este grupo; los otros perfiles presentaron 11 bandas, sin embargo, uno de ellos mostró cuatro bandas extras lo que sugirió una infección dual en uno de los terneros; con base a este resultado es posible que otras variantes genómicas en las cepas estuvieran presentes pero no fueron detectadas, por lo cual se hacen necesarios otros estudios como la inoculación en animales y clonación entre otras (105).

En Colombia se desconocen muchos aspectos epidemiológicos de la enfermedad diarreica causada por Rotavirus en lechones. En los estudios realizados, las cepas virales sólo han sido identificadas por técnicas inmunoenzimáticas obteniéndose resultados limitados sobre el comportamiento del Rotavirus (38,87).

Existe la necesidad de aplicar técnicas de biología molecular, con el fin de obtener una caracterización genética del Rotavirus, entre ellas la separación electroforética del genoma del Rotavirus porcino, que ha permitido a diversos investigadores conocer las diferencias y similitudes en el ARN de cepas de Rotavirus extraídas de las heces de lechones con enfermedad diarreica.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras estudiadas en el presente trabajo fueron obtenidas de lechones con diarrea entre dos y seis semanas de edad, de diferentes granjas porcícolas ubicadas en distintas zonas geográficas del país.

Se recogieron un total de 204 muestras fecales, de las cuales 12 provenían del departamento de Santander, Granja Los Porkys; 34 muestras se obtuvieron de Antioquia, ocho de la Granja La Vitrina y las otras 26 de la Granja Tecni-Agro. En el Tolima, se tomaron 27 muestras , 23 de ellas de la Granja El Placer y cuatro de La Granja El Triunfo; en Cundinamarca, se obtuvo el mayor número de muestras (131), provenientes de distintas localidades: 27 de la población de Sylvania, Granja El Líder, 84 en la Granja La Carolina (Sopó), 14 en la Granja Santandercito y seis en la Granja La PAS.

La toma de muestras se realizó durante un periodo de siete meses a partir de Mayo 1994 a Noviembre 1994 y fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

3.2 CEPAS DE REFERENCIA

Se utilizaron como cepas de referencia para el presente estudio, la cepa de Rotavirus bovino tipo Compton del Laboratorio Central Veterinario de Weybridge, Inglaterra y la cepa de origen porcino tipo Bohl's, obtenida del Laboratorio Central Veterinario AMES Iowa U.S.A

3.3 CULTIVOS CELULARES

Las dos cepas fueron cultivadas en la línea celular MA-104 (riñón de feto de mono Rhesus), obtenida del departamento de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS) de la ciudad de Santafé de Bogotá.

A partir de la monocapa celular, se realizaron sucesivos pases en Kimax de 75 cm² con el fin de replicar la monocapa hasta obtener la suficiente cantidad, para infectar con cada una de las cepas de referencia.

Para la realización de los pases, inicialmente se efectuó un lavado de la monocapa con diluyente tripsina (40gr NaCL, 2gr KCL, 0,24gr Na₂HPO₄anhidro, 0,300gr KH₂PO₄, 2.5gr Glucosa, 500 ml de agua destilada). Posteriormente fueron adicionados 2.0 ml de tripsina pH 8.5, la cual se dispersó por toda la monocapa, se incubó a 37°C por 5 minutos, pasado este tiempo se observó al microscopio de luz invertida el desprendimiento de las células. Luego se adicionaron 2.0 ml de una suspensión de MEM Eagle, suero fetal bovino 10 %, L-glutamina 2%, aminoácidos no esenciales 1%, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 mg/ml), con el fin de detener el efecto de la tripsina.

Posteriormente, se colocó una pipeta de vidrio contra el fondo del Kimax y se succionó 3 ó 4 veces hasta lograr la disgregación de las células. Luego, se pasó todo el contenido al medio de crecimiento (MEM Eagle, suero fetal bovino 10 %, L-

glutamina 2%, aminoácidos no esenciales 1%, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 mg/ml)), y se llevó a incubación a 37°C.

Una vez que se logró estabilizar la monocapa, se procedió a infectarla; para esto se preparó un stock de tripsina con una concentración 634 mg/ml (0,317gr tripsina, 0,125gr EDTA, 50 ml sales para tripsina, agua destilada 500ml). Posteriormente se realizó una dilución (9.7 ml de MEM-Eagle más 0.3 ml de tripsina 634 µml) para obtener una concentración de 20 µg/ml. Seguidamente, se enfrentó 1ml de la solución anterior con 1ml del virus y se incubó 30 minutos a 37°C en baño maría.

Pasado este tiempo, se lavó la monocapa con diluyente tripsina , posteriormente, fué adicionado el inóculo, el cual cubrió toda la monocapa; se incubó 1 hora a 37°C y cada 10 minutos se agitó el Kimax, con el fin de que el inóculo cubriera toda la monocapa. Luego, se descartó el inóculo y se adicionaron 10 ml de medio MEM-Eagle suplementado con medio hepes 1%, L-glutamina 2%, aminoácidos no esenciales 1%, penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml y se llevó nuevamente a 37°C.

Las monocapas inoculadas se observaron diariamente hasta evidenciar el efecto citopático. El resultado del efecto citopático consistió en: oscurecimiento y agrupamiento de las membranas celulares que tomaron forma redondeada; luego ocurrió el desprendimiento celular y por último lisis (31)

Como control negativo se utilizó un inóculo que consistió de 1ml de MEM-Eagle más 1ml de la dilución de tripsina 20 µg/ml.

Finalmente, después de la aparición del efecto citopático, los cultivos se congelaron y descongelaron tres veces para lisar las células y liberar los virus, luego se centrifugó a

2500 g. durante 15 minutos. El sobrenadante de cada cepa fué alicuotado y congelado a -70°C .

3.4 EXTRACCION DEL ARN VIRAL

Inicialmente, se utilizó un protocolo semejante al descrito por Herring y Colaboradores (58) el cual fué realizado a partir de las heces y del sobrenadante obtenido de los cultivos de las cepas de referencia.

Se resuspendieron 300 mgr de materia fecal en 1.2 ml de buffer 20mM tris-HCL pH 7.8, se centrifugó a 14.000 g. en una microcentrifuga (Eppendorf), 10 minutos a 4°C ; se tomaron 200 uL del sobrenadante y se adicionó una cantidad igual de una solución 1M CILi, 2% SDS, 20mM EDTA pH 7.8; luego se agitó y se incubó a 55°C por 15 minutos; seguidamente se agregaron 400 uL de una mezcla de partes iguales de fenol equilibrado-cloroformo, se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 15 minutos.

Nuevamente se centrifugó a 14.000 g. en una microcentrifuga refrigerada, siendo luego depositada la fase superior acuosa en otro tubo Eppendorf. Posteriormente se agregaron 2 volúmenes de etanol-frio (-20°C) a la fase superior para precipitar el ARN, y se conservó a -70°C por 2 horas; más tarde se centrifugó a 14.000 g. durante 15 minutos a 4°C . El sobrenadante fué descartado invirtiendo el tubo en forma brusca y el pellet fué resuspendido en 20 μL de agua tridestilada con DEPC (Dietil pirocarbonato), acompañado de 5 μL de buffer de siembra.

Esta técnica no mostró mucha sensibilidad y el ARN se obtuvo con muchas impurezas, debido a esto se decidió cambiar por un método más sensible y una extracción más pura del ARN; en consecuencia se utilizó el protocolo descrito por Chomczynski (18), el cual incluye el uso de una mezcla de Guanidina Tiocianato-fenol-cloroformo. Este protocolo fué diseñado originalmente para trabajar con tejido mamario de rata, por lo

cual fué necesario ajustar algunos parámetros para adaptarlo a los estudios en heces de lechones.

Inicialmente, fueron homogenizadas 2 gr de materia fecal en tubos Corex con 1ml de solución denaturante (25 gr de Tiocianato de Guanidina, Citrato de Sodio 25 mM pH 7.0, Sarcosyl 0.5%, 2-Mercaptoethanol 0.1 M). Posteriormente, se adicionaron 0.5 ml de Cloruro de Litio 1M; EDTA 20 mM; pH 7.8 y se agitó en vortex durante 20 segundos.

Después, se agregaron 1.5 ml de una mezcla de fenol-cloroformo-isoamil (24:24:1), nuevamente se agitó en vortex durante 20 segundos; la suspensión final fué puesta en hielo por 15 minutos; seguidamente se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C, después de la centrifugación el ARN estaba en la fase acuosa y en la fase de fenol e interfase quedaron el ADN y las proteínas.

La fase acuosa fué transferida a otro tubo Corex, y se mezcló con 1 ml de isopropanol a -20°C por 1 hora, para precipitar el ARN, se centrifugó a 10.000 g por 20 minutos; el sobrenadante se descartó y el pellet fué disuelto en 0.5 ml de solución denaturante; esto se transfirió a un tubo Eppendorf con 1 volumen de isopropanol y se conservó a -20°C durante 1 hora.

Posteriormente se centrifugó a 14.000 g. por 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante invirtiendo el tubo en forma brusca y el pellet se resuspendió en etanol 75%, luego se secó a 37°C y fué disuelto en 50 uL de agua destilada con DEPC (Dietil pirocarbonato).

3.5 ANÁLISIS ELECTROFORETICO

El ARN viral, fué analizado, por medio del sistema de electroforésis unidimensional en gel de poliacrilamida utilizando un sistema discontinuo (Leammli) en condiciones no desnaturalizantes libre de SDS (74).

Se utilizó un gel superior (stacking gel), para permitir la concentración del ARN viral (5% de poliacrilamida) y un gel inferior separador (separating gel), de las bandas de ARN (8% de poliacrilamida). El gel de separación fué preparado en buffer Tris-HCL 0.375M pH8.8 y el de concentración en Tris-HCL 0.125M pH6.8; ambos geles fueron polimerizados químicamente con TEMED y persulfato de amonio, luego de degasificar la solución del gel utilizando una camara de anaerobiosis con vacio, durante 5 minutos.

Finalmente, la solución fué vertida en medio de dos láminas de vidrio ($16\text{cm}^2 \times 18\text{cm}^2 \times 0.8\text{mm}$ de volumen interno), colocados verticalmente en el soporte del equipo de electroforésis. La parte del gel fué cubierta con agua hasta una altura de 2mm y el gel fué dejado a temperatura ambiente durante 30 minutos; una vez concluída la polimerización, la superficie del gel de separación fué lavada con agua destilada, aplicándose luego la solución del gel de concentración, seguido de la colocación inmediata de la peineta. Se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos, hasta completar la polimerización.

El buffer de corrido consistió en Tris 0.25M, glicina 0.192M, posteriormente se adicionaron 5ul de buffer de siembra (Azul Bromofenol 0.05%, Sucrosa, EDTA 0.1M, SDS 0.5%) a las muestras y controles; luego fueron colocadas cuidadosamente en los pozos del gel de concentración con una jeringa hamilton.

La electroforésis fué realizada a 120 V constantes durante 14 horas en una cámara marca Hoefer LKB, modelo S-161 (U.S.A.).

Después de la electroforesis los geles fueron sometidos a una tinción con nitrato de plata y se utilizó una modificación de la metodología descrita por Sammons y colaboradores 1981. (citado por Herring y col 1982) esta consistió en: primero los geles fueron tratados con una solución de etanol 10% y ácido acético 0.5% durante 30 minutos, luego pasaron a una solución de nitrato de plata 0.011M por 30 minutos, (NaOH; Formaldehído). Inmediatamente se visualizaron las bandas, se descartó el revelador y se adicionó una solución de ácido acético 5% ,con el fin de detener la reacción (58).

Los geles teñidos por este método presentaron un intenso contraste (background), e impidió una buena visualización de las bandas, por lo cual fué necesario utilizar una tinción que permitiera un óptimo desarrollo de la imagen .

Se utilizó posteriormente, el protocolo descrito por Caetano-Anolles y Gyeshoff (16), el cual consistió en: fijar los geles con ácido acético 7.5% durante 30 minutos, con el fin de prevenir la difusión de las bandas y para remover sustancias indeseadas. Luego se realizaron 3 lavados de 2 minutos cada uno con agua desionizada, después fueron pasadas a una solución de plata (1.5g/l AgNO_3 , 0.056% Formaldehído) durante 45 minutos. La presencia del Formaldehído en esta solución, mejoró la sensibilidad y el contraste de la imagen.

Pasado este tiempo los geles fueron lavados nuevamente con agua desionizada, por 30 segundos, e inmediatamente fué adicionada la solución reveladora (30 g/l Na_2CO_3 , 0.056%, Formaldehído, 400 $\mu\text{g/l}$ Tiosulfato de Sodio) a 8 °C; cuando se obtuvo la imagen deseada, se descartó el revelador y la reacción fué detenida, con ácido acético 7.5% a 4 °C por cinco segundos.

Todos los pasos anteriores fueron realizados en agitación constante. Posteriormente cada uno de los geles fueron fotografiados, con una película en color asa 400.

Todas las soluciones y el material de vidrio utilizado fué cuidadosamente preparado y autoclavado con una solución de agua tridestilada más DEPC (Diethyl pirocarbonato), al 0.1% con el fin de inhibir enzimas ARN asas.

La interpretación de los resultados consistió en el examen visual de los perfiles electroforéticos de las cepas virales encontradas en cada granja; la posición de las bandas se compararon entre cepas y con las cepas de referencia. Las 11 bandas fueron divididas en cuatro grupos, según el método descrito por Lourenco y colaboradores, 1981 (citado por Estes y Col 1984), (31): Bandas 1,2,3,4, grupo I, bandas 5,6, grupo II, bandas 7,8,9, grupo III y bandas 10,11 grupo IV.

3.6 DETECCION DEL ANTIGENO VIRAL POR ENSAYO INMUNOENZIMATICO

Se utilizaron dos inmunoensayos para el análisis de 46 muestras de materia fecal tomadas al azar de 204 muestras examinadas previamente por electroforésis, con el propósito de comparar los resultados entre los procedimientos.

Las dos pruebas inmunoenzimáticas, detectan antígenos de Rotavirus grupo A, en las muestras fecales. Se empleó Rotazyme II Abbott (U.S.A.) y BioDot Rota de Heber Biotec (Cuba). Los procedimientos de ELISA fueron realizados de acuerdo a los procedimientos descritos en los incertos de cada técnica (Laboratorios Comerciales).

Con el propósito de establecer, si existe una relación entre la técnica (Electroforésis. BioDot Rota, Rotazyme II), que se escoge y el resultado obtenido para el diagnóstico

de Rotavirus en materia fecal, se aplicó el análisis estadístico Ji Cuadrado (X^2), en donde se planteó la siguiente hipótesis:

H Nula: No hay asociación entre la técnica y el resultado (son independientes).

H Alterna: Hay asociación entre la técnica y el resultado (son dependientes).

De otro lado, se evaluó el grado de co-positividad y co-negatividad de los resultados, con el fin de conocer que porcentaje de muestras positivas y negativas no eran compartidas por las tres técnicas al ser comparados en tablas de dos por dos en las que se analizaron de la siguiente forma:

- _ Electroforésis vs BioDot Rota
- _ Electroforésis vs Rotazyme II
- _ BioDot Rota vs Rotazyme II

Se debe tener en cuenta que para poder llevar a cabo este tipo de evaluación, no fué posible analizar el mismo número de muestras por los tres métodos, ya que no se disponía de la totalidad del Kit de Rotazyme II Abbott, además, no hubo una prueba de referencia, que permitiera determinar cual de ellas presentaba mejor sensibilidad y especificidad (36).

4. RESULTADOS

Como se mencionó en este estudio, se colectaron muestras provenientes de diferentes granjas porcícolas ubicadas en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Santander y Tolima.

De las 204 muestras examinadas por electroforésis para detectar la presencia de ARN de Rotavirus, en 33 (16.1%) de ellas se visualizó la migración característica de los 11 segmentos genómicos del Rotavirus.

Una vez analizado el perfil electroforético presentado por las muestras se logró determinar la presencia de seis patrones o electroferotipos distintos. Tomando como base la movilidad de los fragmentos 10 y 11 se determinó que presentaban un patrón corto, ninguna de las cepas virales presentó el denominado patrón largo.

Inicialmente, se evaluó la variabilidad genómica de los virus presentes en cada una de las granjas muestreadas y posteriormente se compararon los perfiles electroforéticos entre las regiones analizadas, con el fin de establecer diferencias o similitudes entre ellos.

A continuación se describen las observaciones realizadas en cada granja(s), de cada una de las zonas geográficas bajo estudio.

4.1 ANTIOQUIA

4.1.1. Granja Tecni-Agro.

De las 26 muestras examinadas por electroforésis, tres (11.5%), fueron positivas para electroferotipos de ARN compatibles con el patrón característico de ARN de Rotavirus.

A medida que se fué realizando el tamizaje de las muestras, se fueron seleccionando las muestras positivas, descartando las negativas, del mismo modo se iban adaptando las mejores condiciones que permitieran una buena resolución de las bandas de ARN; para lograr este objetivo fueron utilizados cuatro geles de poliacrilamida.

Posteriormente, las muestras positivas fueron de nuevo examinadas por electroforésis junto con la cepa de referencia porcina Bohl's y la cepa de referencia bovina Compton con el fin de establecer diferencias y similitudes entre sus patrones electroforéticos y de esta forma poder determinar los electroferotipos representativos de esta granja.

La movilidad electroforética de estas cepas de Rotavirus, mostraron un patrón compatible al del grupo A, el cual se caracteriza por presentar los segmentos genómicos distribuidos en cuatro regiones: Segmentos 1,2,3,4, región I, segmentos 5,6, región II, segmentos 7,8,9 región III y segmentos 10 y 11 región IV.

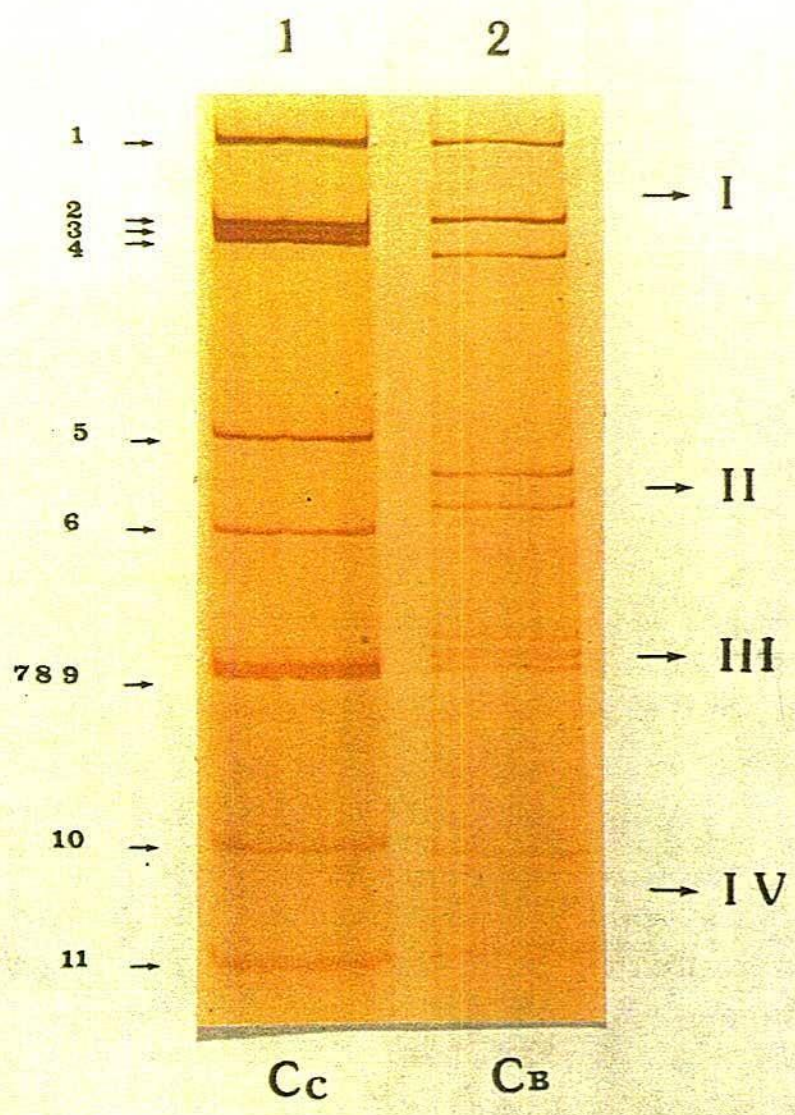
La cepa de referencia Compton presentó una movilidad en sus bandas de ARN, representada de la siguiente forma: Bandas 1,2,3,4, región I en donde las tres últimas migraron conjuntamente; bandas 5, 6 región II; bandas 7,8,9, región III las cuales se desplazaron con velocidad similiar, observándose una sola banda para este grupo, bandas 10 y 11 región IV; constituyéndose de esta forma un electroferotipo característico para esta cepa viral (Figura 1 carril 1).

De otro lado, el electroferotipo de la cepa de referencia Bohl's, se caracterizó por mostrar una migración de sus bandas distribuidas así: bandas 1,2,3,4, grupo I en donde dos de estas bandas migraron con una velocidad semejante y se visualizaron en un sólo fragmento; bandas 5,6, grupo II; bandas 7,8,9, grupo III para el cual el segmento 8 migró con mayor velocidad ubicándose más cerca del segmento 9 que del segmento 7; bandas 10 y 11 grupo IV (Figura 1 carril 2).

Tanto la cepa de referencia Compton como la cepa Bohl's, compartieron la característica de ser patrón corto dada por la movilidad de los segmentos de la región IV.

Con respecto a las tres cepas virales presentadas por esta granja, se encontraron dos electroferotipos, uno de ellos compartido por dos cepas, el cual tuvo para los segmentos 2 y 3 del grupo I, una migración muy cercana lo cual los hace ver representados en un sólo segmento; además el grupo III se caracterizó por presentar una movilidad en dupleta, constiuyéndose de esta forma un electroferotipo denominado S1, con la característica de ser patrón corto, dada por la movilidad de los segmentos 10 y 11 del grupo IV (Figura 2 carril 3).

FIGURA 1. Perfiles genómicos presentados por las cepas de referencia de Rotavirus bovino tipo Compton (C_C) y porcino tipo Bohl's (C_B) Carriles 1 y 2 respectivamente. Nótese las diferencias en la migración de los segmentos de ARN en cada una de ellas.



En el otro electroferotipo presentado por una de las cepas virales, se apreció que los segmentos 1,2,3,4, del grupo I, migraron de una forma individual, además, los segmentos 7,8,9, del grupo III, se desplazaron con una velocidad similar observándose una sola banda, de esta forma se conformó un segundo electroferotipo designado como S2, el cual presentó también la característica de ser patrón corto (Figura 2 carril 3).

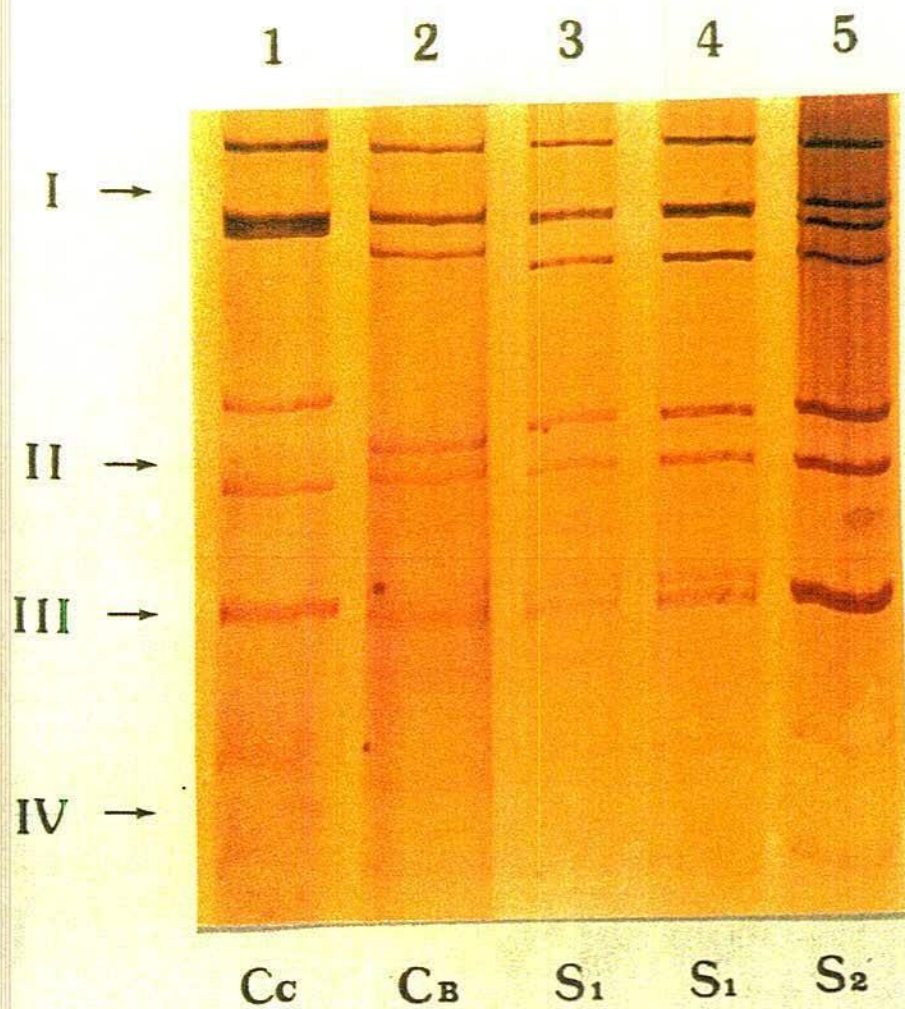
Los dos electroferotipos descritos como S1 y S2, fueron comparados con la cepa de referencia Bohl's y se observó que el S1, comparte una migración electroforética similar para todos sus grupos; sin embargo, el fragmento IV, migró un poco más rápido en este electroferotipo que el mismo fragmento en la cepa Bohl's; del mismo modo, el fragmento 5 del grupo II, tuvo un desplazamiento mas lento que el fragmento correspondiente en la cepa de referencia Bohl's (Figura 2 carriles 2,3).

De otro lado, cuando el electroferotipo S1 fué comparado con la cepa Compton, sólo se logró determinar similitudes en la migración de los segmentos del grupo IV (Figura 2 carriles 1,3).

El electroferotipo S2, al ser comparado con la cepa de referencia Bohl's mostró una migración diferente de los fragmentos genómicos del grupo I, en donde se visualiza el desplazamiento de las cuatro bandas en este electroferotipo; contrario a esto en la cepa de referencia Bohl's, sólo se observaron tres bandas para ese mismo grupo. El grupo II presentó la misma diferencia que la observada en el electroferotipo S1.

El grupo III del electroferotipo S2, mostró una migración de los segmentos 7,8,9, como una sola banda, en cambio la cepa Bohl's lo hizo en tripleta. Por último las bandas del grupo IV migraron de una forma semejante tanto para este electroferotipo como para la cepa Bohl's (Figura 2 carriles 2,5).

FIGURA 2. Comparación entre los electroferotipos de las cepas de Rotavirus aisladas de dos granjas del departamento de Antioquia. Carriles 3 y 5 (patrón S1 y S2 respectivamente) granja Tecni-Agro; carril 4 (patrón S1) granja La Vitrina. Carriles 1 y 2 cepas de referencia Compton y Bohl's (C_C , C_B), respectivamente. Obsérvese las diferencias de los electroferotipos entre las cepas de campo y las de referencia.



El mismo electroferotipo fué comparado con la cepa Compton y se encontraron similitudes en la migración de los grupos III y IV (Figura 2 carriles 1,5).

4.1.2. Granja La Vitrina.

Fueron examinadas ocho muestras, de las cuales una (12.5%), fué positiva para ARN de Rotavirus; al analizar el electroferotipo dado por estas muestras se clasificó como del grupo A, con la característica de ser patrón corto.

El electroferotipo reportado por ésta cepa viral, fué comparado en un mismo gel con los presentados por la granja Tecni-Agro y se estableció que compartía las características de migración electroforética para todos los grupos con el electroferotipo S1; dada esta similitud se clasificó como S1 (Figura 2 carril 4)

4.2 CUNDINAMARCA

4.2.1. Granja La Carolina

En esta porcícola, se encontró un total de 11(13.1%), muestras positivas para el análisis de ARN de Rotavirus de 84 muestras investigadas por electroforésis, en once geles de poliacrilamida.

El patrón reportado por diez de estas cepas de Rotavirus, las clasifica como del grupo A, debido a la movilidad electroforética de los fragmentos genómicos que constituyen las cuatro regiones características de este grupo; no obstante, una cepa de Rotavirus obtenida a partir de una muestra colectada en el último periodo de éste estudio, mostró un patrón diferente al del grupo A, su movilidad electroforética es compatible con la migración característica de los Rotavirus que pertenecen al grupo B (atípicos), el cual presenta una distribución de las bandas de la siguiente forma: Bandas 1,2,3,4, región I, bandas 5,6, región II, bandas 7,8, región III, bandas 9,10,11, región IV. Todos los electroférotipos pertenecientes al grupo A, presentaron la característica de

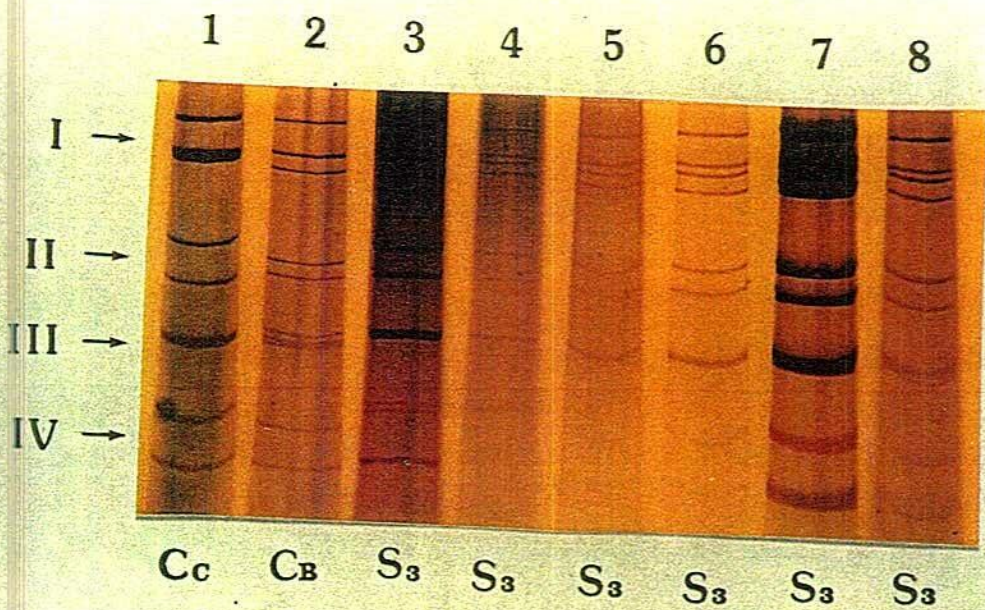
ser patrón corto. Los perfiles electroforéticos que presentaron las cepas de referencia Compton y Bohl's, fueron muy similares a las descritas en la figura 1.

Al analizar los patrones electroforéticos que mostraron las cepas virales aisladas en ésta granja, se estableció un electroferotipo para nueve de ellas, el cual se caracterizó por la migración de los segmentos 7,8, y 9 del grupo III en una sola banda y se denominó como S3 (Figura 3 carriles 3,4,5,6,7,8).

Este electroferotipo, fué comparado con la cepa de referencia Compton, con el cual compartió las mismas características de migración con los grupos II, III y IV; no obstante, el fragmento cinco del grupo II, se desplazó con mayor velocidad en el electroferotipo S3 que en el mismo fragmento correspondiente al electroferotipo presentado por la cepa de referencia (Figura 3 carriles 1,3,4,5,6,7,8).

De otro lado, el electroferotipo S3, también se comparó con la cepa de referencia Bohl's, en donde el grupo I presentó un desplazamiento independiente de sus cuatro fragmentos genómicos, contrario a lo observado en el perfil electroforético de la cepa Bohl's en donde dos de sus fragmentos migran en forma simultánea visualizándose solamente tres bandas para éste grupo. Con respecto al grupo II, el fragmento cinco migró de una forma más lenta que el perfil presentado por la cepa Bohl's para el mismo fragmento.

FIGURA 3. Comparación de los electroferotipos encontrados de las cepas aisladas en la granja La Carolina. Carriles 3,4,5,6,7,8, Patrón S3; carriles 1 y 2 cepas de referencia Compton y Bohl's (C_C , C_B), respectivamente. Nótese la diferencias de los electroferotipos entre las cepas de campo y las de referencia.



BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

El grupo III, mostró una marcada diferencia ya que los segmentos 7,8,9, migran en una sola banda y en la cepa Bohl's lo hacen en forma de tripleta y en el grupo IV, el segmento diez se desplazó más lento que el mismo segmento en la cepa Bohl's (Figura 3 carriles 2,3,4,5,6,7,8).

Con respecto al electroferotipo que presentó la cepa de Rotavirus atípica, mostró variaciones en el grupo I, en el cual se observan sólo tres bandas y en el grupo II una única banda; su migración electroforética fué compatible con la del Rotavirus grupo B (Figura 4 carril 2).

Al comparar éste electroferotipo con la cepa de referencia Compton, no se encontraron entre estos dos perfiles, similitudes en la migración electroforética de las bandas de los cuatro grupos (Figura 4 carriles 1, 2).

Al mismo tiempo que se reportó la cepa de Rotavirus atípica, también se encontró un tercer electroferotipo presente en esta misma granja, con un patrón genómico semejante al del grupo A; sin embargo, su diferencia con respecto a los otros electroferotipos del mismo grupo se estableció en la región III en donde los segmentos 7,8,9, se desplazaron en forma de tripleta donde el segmento ocho presentó una menor migración, encontrándose, más cerca del segmento siete que del segmento nueve; éste electroferotipo fué denominado como S4 (Figura 4 carril 3).

Este último electroferotipo (S4), fué comparado con la cepa de referencia Compton, en donde las bandas del grupo I migraron de forma independiente contrario a lo observado en la cepa Compton; en el grupo II la banda cinco se desplazó de una forma más rápida que esta misma en la cepa de referencia.

FIGURA 4. Comparación entre los electroferotipos encontrados en la granja La Carolina. Carril 2, electroferotipo presentado por una cepa atípica (Grupo B); carril 3, electroferotipo S4; carril 1 cepa de referencia Compton, (C_C). Obsérvese las diferencias de los perfiles electroforéticos entre las cepas de campo y la cepa de referencia.

Las bandas 7,8,9, que constituyen el grupo III aunque en ambos electroferotipos migraron en forma de tripleta en el S4, el segmento ocho se desplazó de una forma más lenta, ubicándose más cerca del segmento siete que del nueve, en cambio en la cepa Compton el segmento ocho migró mas cercano al segmento nueve, por último las bandas del grupo IV migraron en forma similar para las dos cepas (Figura 4 carriles 1,3)

4.2.2. Granja Lider (Silvania)

De un total de 27 muestras examinadas por electroforésis, se detectó la presencia de ARN de Rotavirus en 4 (14.8%) muestras, las cuales fueron compatibles con el patrón de migración de las cepas de Rotavirus del grupo A.

Al comparar los electroferotipos hallados en ésta granja, se establecieron dos patrones que sólo diferían en la movilidad de los segmentos del grupo III, en donde uno de ellos la movilidad del segmento ocho fué mayor por lo tanto se ubicó más cerca del segmento nueve que del segmento siete, éste electroferotipo fué llamado S5 (figura 5 carriles 3,4,5). El otro electroferotipo encontrado se caracterizó por una movilidad en forma equidistante de los segmentos 7,8,9, constituyéndose el electroferotipo S6 (Figura 5 carril 6).

Los dos electroferotipo (S5 y S6), compartieron la característica de ser patrón corto de acuerdo a la movilidad de los segmentos 10 y 11 del grupo IV.

El patrón electroforético S5, fué comparado con la cepa de referencia Compton, observándose que sólo compartían la movilidad de los segmentos 10 y 11 del grupo IV (Figura 5 carriles 1 3,4,5).

Con la cepa de referencia Bohl's, se encontró que los segmentos que conforman el grupo I migran de una forma independiente uno del otro, diferente a lo que se observó en la cepa de referencia en donde dos segmentos lo hacen unidos, presentándose tres bandas para ese grupo; los segmentos que conforman el grupo II se desplazaron en forma más lenta comparados a los mismos segmentos en el perfil de la cepa de referencia.

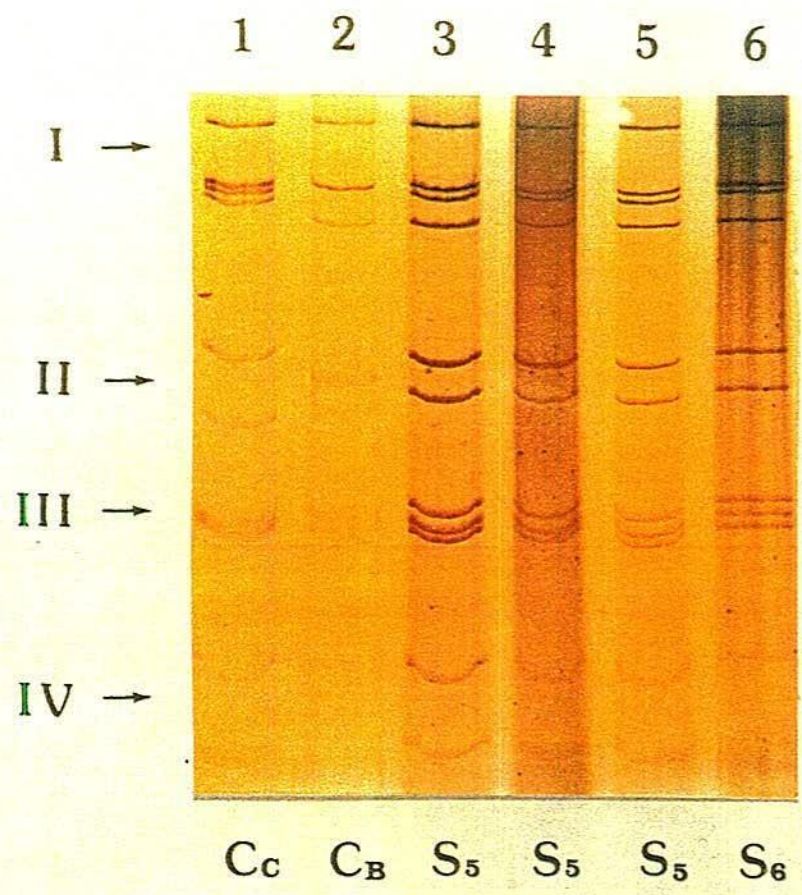
Con respecto a los segmentos que conforman el grupo III, cuya movilidad se hizo en forma de tripleta corresponde a la misma observada en la cepa Bohl's; del mismo modo el grupo IV presentó un desplazamiento similar para estos dos electroferotipos (Figura 5 carriles 2,3,4,5).

El electroferotipo S6, también fué comparado con las cepas de referencia Compton y Bohl's, en donde se presentaron las mismas diferencias que las establecidas para el electroferotipo S5; sin embargo, con la cepa de referencia Bohl's, difieren en la movilidad de las bandas del grupo III ya que en el patrón S6 migraron en una forma equidistante (Figura 5 carriles 2,6).

4.2.3. Granja Santandercito

En esta granja porcícola se analizaron 14 muestras fecales por medio de la técnica de electroforésis de las cuales 2 (14.3%), presentaron ARN de Rotavirus. Estas dos muestras comparten el mismo patrón electroforético, constituyéndose así un sólo electroferotipo para esta granja denominado S7.

FIGURA 5. Comparación entre los electroferotipos de las cepas aisladas en la Granja Lider. Carriles 3,4,5, patrón S5; carril 6, patrón S6; carriles 1 y 2 cepas referencia Compton y Bohl's (C_c , C_B) respectivamente. Nótese las diferencias de los electroferotipos entre las cepas de campo y las cepas de referencia.



Este perfil electroforético (S7), mostró una migración semejante al del grupo A, además fué patrón corto; su característica fundamental se halló en la movilidad de las bandas del grupo III, las cuales se desplazaron en forma de dupleta (Figura 6 carril 1).

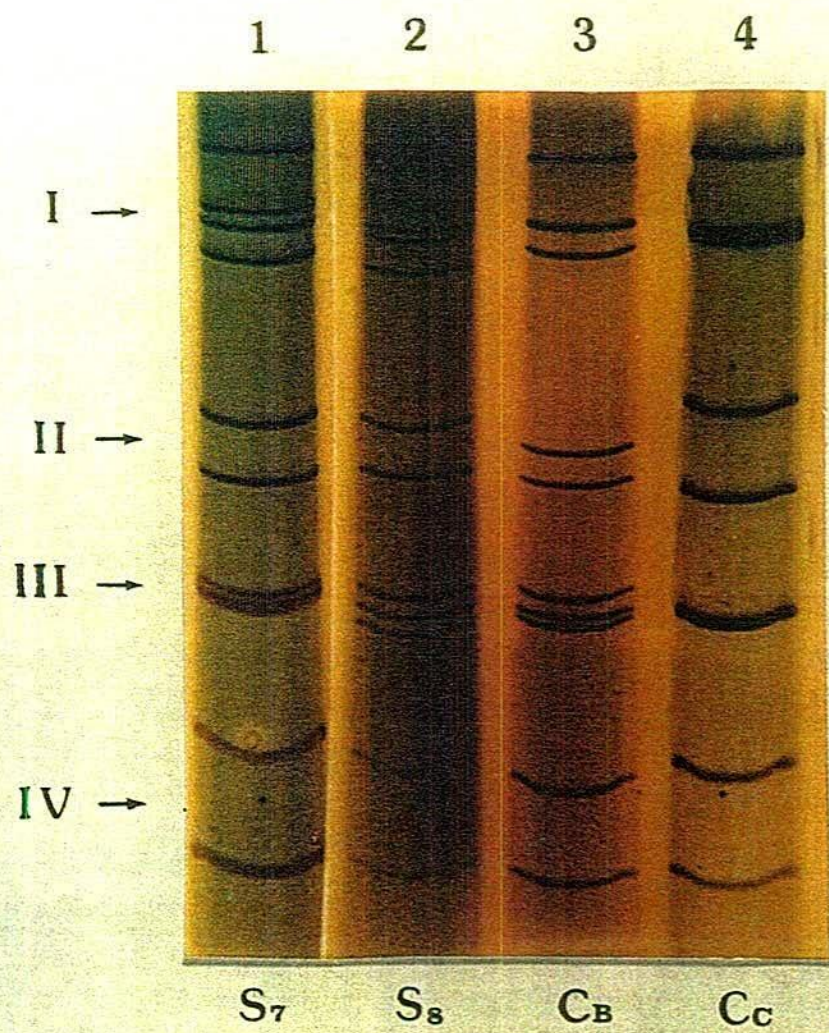
El único electroferotipo hallado en esta granja, fué comparado con la cepa de referencia Compton y se observó que solo compartieron la migración de los segmentos 10 y 11 del grupo IV (Figura 6 carriles 1,4).

De otro lado éste electroferotipo, también fué comparado con la cepa de referencia Bohl's y se encontró que en el grupo I, los segmentos que lo constituyen se desplazan de una forma individual observándose cuatro bandas, lo cual para la cepa de referencia se presentó en tres bandas; el grupo II mostró una menor migración del segmento cinco que el mismo segmento en la cepa Bohl's; en el grupo III la migración de los segmentos se presentó en forma de dupleta contrario a los observados en la cepa de referencia, cuya migración es en forma de tripleta; el segmento 10 del grupo IV se desplazó con menor velocidad que el segmento correspondiente en la cepa Bohl's, en cambio el segmento 11 de ambos perfiles migraron en forma semejante (Figura 6 carriles 1,3).

4.2.4. Granja La PAS

De las seis muestras colectadas en esta granja, solamente 1 (16.7%), reportó un perfil electroforético compatible con el del grupo A, con la característica de ser patrón corto. Este electroferotipo fué denominado como S8, el cual se caracterizó por la movilidad equidistante de los fragmentos que conforman la tripleta del grupo III (Figura 6 carril 2).

FIGURA 6. Comparción de los electroferotipos de cepas de Rotavirus, aisladas en Santandercito y Granja La Pas. Carril 1 patrón S7, carril 2 patrón S8; carriles 3 y 4 cepas de referencia Bohl's y Compton (C_B , C_c) respectivamente Obsérvese, las diferencias de los electroferotipos entre las cepas de campo y las de referencia.



Al comparar éste electroferotipo (S8), con las cepas de referencia Compton y Bohl's, se determinaron las mismas observaciones halladas para el electroferotipo S7, excepto en la movilidad de los segmentos del grupo III ya que en éste migraron en forma equidistante.(Figura 6 carriles 2,3,4).

4.3. TOLIMA

4.3.1. Granja El Triunfo

Se colectaron cuatro muestras fecales, las cuales fueron examinadas por electroforésis y en ninguna de ellas se encontró el genoma de Rotavirus.

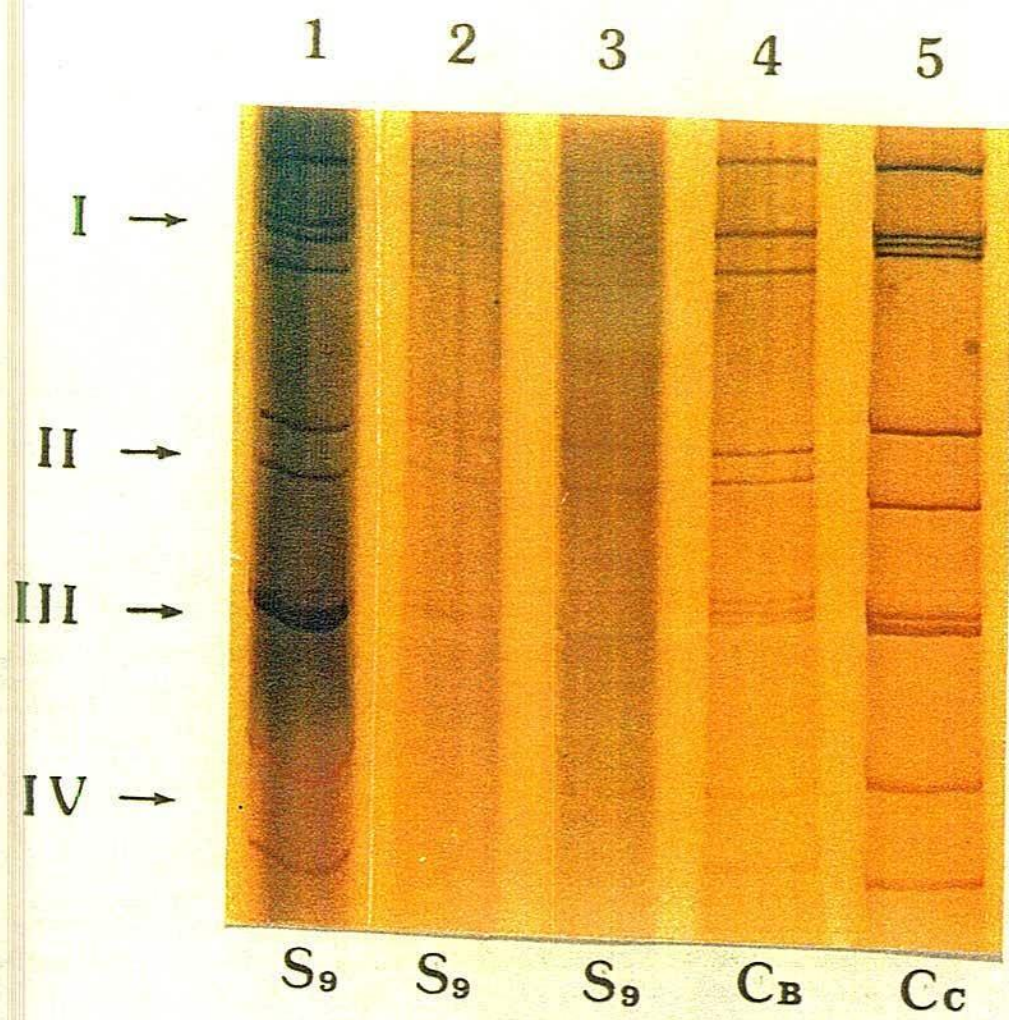
4.3.2. Granja El Placer

De esta granja se analizaron un total de 23 muestras de lechones con diarrea, con el fin de detectar ARN de Rotavirus por medio de la técnica de electroforésis y solamente en 5 (21.7%) de ellas fueron positivas para este análisis.

Estas cinco cepas virales compartieron el mismo electroferotipo, el cual es semejante al del grupo A, en donde la región III, presentó un desplazamiento en dupleta y la movilidad de los segmentos 10 y 11 lo definió como patrón corto, este electroferotipo fué llamado S9 (Figura 7 carriles 1,2,3).

Este perfil electroforético fue comparado con las cepa de referencia Compton encontrándose que compartieron la movilidad de los segmentos del grupo IV (Figura 7 carriles 1,2,3,5).

FIGURA 7. Comparación de los electroferotipos de las cepas aisladas de la Granja El Placer. Carriles 1,2,3, Patrón S9; carriles 4, 5 cepas de referencia Bohl's y Compton (C_B , C_c) respectivamente. Nótese, las diferencias de los electroferotipos entre las cepas de campo y las de referencia.



El mismo electroferotipo (S9), fué comparado con el perfil electroforético de la cepa de referencia Bohl's y se observó que el grupo I, presentó una movilidad independiente de los cuatro segmentos que lo conforman, contrario a lo observado en la cepa de referencia Bohl's. En el grupo II, se estableció para el segmento cinco una velocidad de migración menor con respecto al mismo fragmento en la cepa Bohl's; el grupo III se desplazó en forma de dupleta, diferente a lo observado en la cepa de referencia el cual lo hizo en forma de tripleta; por último los segmentos 10 y 11 que conforman el grupo IV, se desplazaron en forma semejante para los dos perfiles electroforéticos (Figura 7 carril 1,2,3,4).

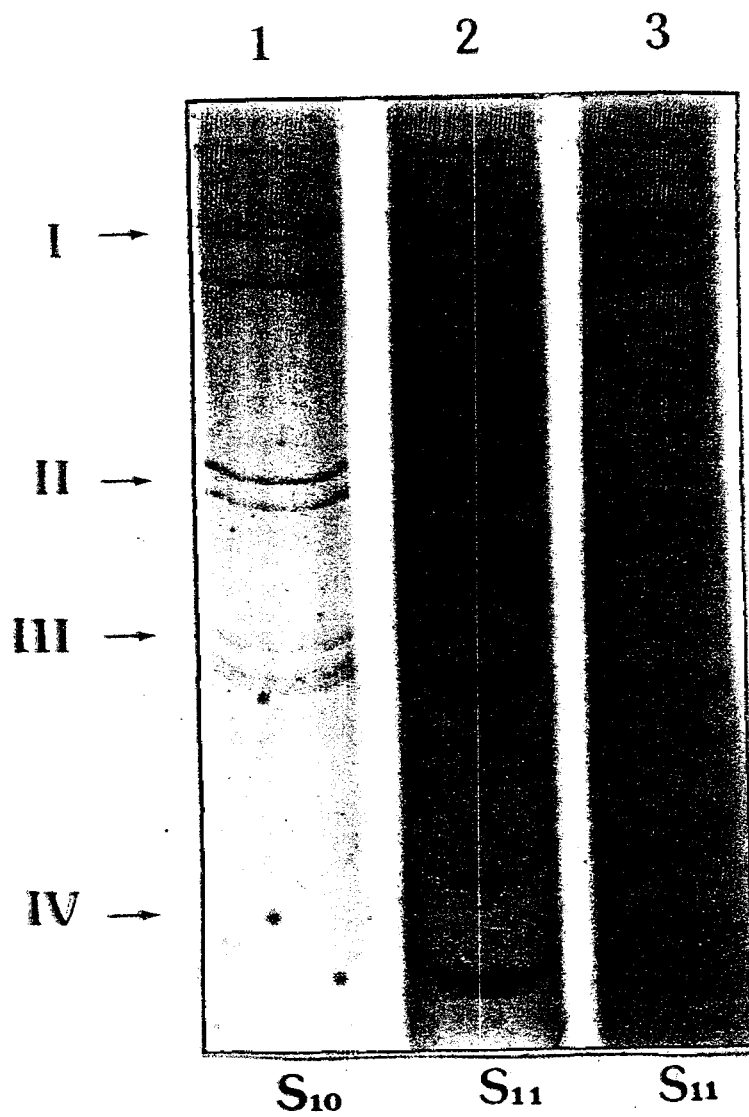
4.4. SANTANDER

4.4.1. Granja Los Porkys

De un total de 12 muestras obtenidas en esta granja, las cuales fueron examinadas por electroforésis, 6 (50%) de ellas eran positivas para la determinación de ARN de Rotavirus. Estas cepas virales de acuerdo a su patrón electroforético de ARN se incluyeron en el grupo A; adicionalmente, con respecto a la movilidad de los segmentos del grupo IV fueron descritas como patrón corto.

Estas cepas virales presentaron dos electroferotipos cuyas diferencias se basaron en la movilidad de los fragmentos genómicos que constituyen el grupo III. En uno de ellos el desplazamiento fué en forma de tripleta en donde el fragmento ocho migró con mayor velocidad, ubicándose más cerca del fragmento nueve que del siete; en el otro electroferotipo en este mismo grupo los fragmentos 7,8,9, migraron en un sólo segmento. Estos electroferotipos fueron denominados como S10 y S11 respectivamente (Figura 8 carriles 1,2,3).

FIGURA 8. Comparación de los electroferotipos de cepas aisladas de la Granja Los Porkys. Carril 1, electroferotipo S10; carriles 2, 3, electroferotipo S11. Nótese la diferencia entre los electroferotipos de las cepas de campo



4.5 COMPARACION ENTRE LOS ELECTROFEROTIPOS OBSERVADOS EN LAS DIFERENTES GRANJAS ANALIZADAS

Los 11 electroferotipos hallados en las granjas investigadas, se compararon con el fin de establecer si realmente correspondían a patrones diferentes ó compartían características electroferotípicas entre ellos; sin embargo, las muestras no pudieron ser de nuevo sometidas al proceso de extracción de material genómico ya que la cantidad era insuficiente, por lo tanto los perfiles electroforeticos reportados por las ocho granjas no fueron comparados en forma simultánea en un mismo gel.

Los resultados descritos a continuación, fueron obtenidos al inferir sobre las características más notables de los patrones electroforéticos hallados en este estudio. Para éste análisis, los electroferotipos reportados por las granjas, se compararon entre si y luego se unificaron los patrones con movilidad electroforética semejante a los cuales les fué asignado en forma arbitraria letras mayúsculas **U, V, W, X, Y, Z**.

De esta forma, se logró determinar que el patrón electroforético S1 reportado por las cepas de Rotavirus de las Granjas Tecni-Agro y La Vitrina, ubicadas en el departamento de Antioquia, el cual se caracterizó por presentar los segmentos del grupo I en tres bandas; además la movilidad de los segmentos del grupo III fué en forma de dupleta. Este perfil electroforético, se denominó “U”, siendo exclusivo de ésta zona geográfica.

El patrón S2, encontrado en la Granja Tecni Agro, que presentó una movilidad en un sólo segmento de los fragmentos 7,8,9, de la región III fué similar al reportado por la Granja La Carolina (Cundinamarca) como S3 y por la Granja Porkys (Santander) como S11; de esta forma éste electroferotipo fué descrito como el mismo para estas tres granjas y designado como “V”.

De otro lado, el electroferotipo S4, hallado en la Granja La Carolina, en donde el desplazamiento del segmento ocho de la región III, fué más lento ubicándose más cerca del fragmento 7 que del 9. Este perfil solamente se observó en esta granja y se le llamó “W”.

La Granja Lider mostró dos electroferotipos, en donde el S5, se caracterizo por la migración más rápida del segmento 8 del grupo III quedando más cerca del segmento 9 que del segmento 7; este perfil también lo presentó la Granja Los Porkys (Santander) como S10, por lo tanto al compartir esta movilidad electroforética a este patrón se le asignó la letra “X”.

El otro perfil electroforético (S6), también lo presentó la Granja La Pas (Cundinamarca), como S8, en el cual los fragmentos que conforman el grupo III tuvieron un desplazamiento equidistante, éste perfil genómico se denominó “Y”.

Por último, la Granja Santandercito (Cundinamarca), compartió su electroferotipo S7 con el patron electroforético S9 que presentó la Granja El Placer (Tolima), caracterizado por presentar los segmentos genómicos del grupo III en forma de dupleta; este electroferotipo fué designado como “Z”.

En resumen se encontraron seis electroferotipos diferentes los cuales, se denominaron así: U(S1), V(S2 ,S3 ,S11), W(S4), X(S5, S10), Y(S6, S8), Z(S7, S9), y un electroferotipo compatible con el de una cepa de Rotavirus atípica (Grupo B).

4.6. DETECCION DEL ANTIGENO VIRAL POR ENSAYO INMUNO ENZIMATICO

Un total de 46 muestras, que habían sido previamente analizadas por la técnica de electroforesis de las cuales 29 eran negativas y 17 positivas para la detección de ARN genómico en geles de poliacrilamida (PAGE); fueron también evaluadas por dos inmunoensayos enzimáticos (ELISA), que determinaban la presencia del antígeno de Rotavirus grupo A.

Se empleó el ensayo BioDot Rota de Heber Biotec (Cuba), para 46 muestras que se escogieron dependiendo de la cantidad que aún había de ellas ya que habían sido procesadas para análisis electroforético. Del total de muestras examinadas por ésta técnica, se encontraron 29 negativas y fueron identificadas 17 muestras positivas para Rotavirus grupo A.

El otro inmunoensayo utilizado fué, Rotazyme II Abbott (U.S.A), por medio del cual sólo se analizaron 24 muestras de las 46 ya analizadas por el inmunoensayo anterior, esto debido a que no se disponía de toda la capacidad del Kit. Del total de muestras examinadas, se hallaron 15 negativas y fueron identificadas 9 muestras positivas para Rotavirus grupo A.

Tabla 1. Prueba X^2 , para establecer el grado de relación que existe entre la técnica y el resultado en el diagnóstico de Rotavirus

	Positivo	Negativo	Total
ELECTROFORESIS	17	29	46
ROTAZYME II	9	15	24
BIODOT ROTA	17	29	46
TOTAL	43	73	116

$$X^2 = 0$$

Al analizar la prueba de X^2 , se encontró, que la frecuencia positiva y negativa era estadísticamente igual, no hubo asociación entre la técnica y el resultado por lo tanto se acepta la hipótesis nula es decir que son independientes. ($p < 0.05$).

De otro lado, se determinó el grado de co-positividad y co-negatividad entre las técnicas para evaluar la correspondencia entre los resultados obtenidos por cada una de ellas.

Tabla 2. Comparación entre la técnicas de Electroforesis y BioDot Rota para evaluar Co-positividad y Co-negatividad entre ellas.

ELECTROFORESIS	BIODOT ROTA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	15	3	18
Negativo	2	26	28
Total	17	29	46

En la Tabla 2, se pudo apreciar que de un total de 46 muestras las dos técnicas compartieron 15 muestras positivas y 26 muestras negativas. Esto indica que aunque no hay un total de correspondencia en los resultados, si existe entre ellos una buena correlación.

Tabla 3. Comparación entre las técnicas de Electroforesis y Rotazyme II, con el fin de evaluar el grado de Co-positividad y Co-negatividad entre ellas.

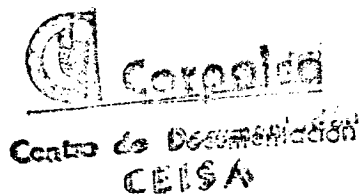
ELECTROFORESIS	ROTAZYME II		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	7	0	7
Negativo	2	15	17
Total	9	15	24

En la tabla 3, se pudo observar que un total de 24 muestras, fueron positivas siete y 15 negativas por ambas técnicas, sin embargo, dos muestras fueron negativas para Electroforésis y positivas para el ELISA; se encontró entre estas dos técnicas una mayor correlación en los resultados, no obstante, el número de muestras evaluadas fue menor que el realizado por el ELISA BioDot Rota.

Tabla 4. Comparación entre los dos métodos ELISA (BioDot Rota y Rotazyme II), con el fin de establecer el grado de Co-positividad y Co-negatividad que presentaron entre ellas.

BIODOT ROTA	ROTAZYME II		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	8	0	8
Negativo	1	15	16
Total	9	15	24

Estos resultados, muestran una buena correlación entre las muestras positivas (8) y negativas (15) para ambas técnicas, no obstante, una muestra fue negativa para BioDot Rota y positiva para Rotazyme II.



5. DISCUSION

El presente estudio, reveló la presencia de seis electroferotipos distintos pertenecientes al Rotavirus grupo A y uno con la característica de migración del grupo B (atípico). Estos electroferotipos se obtuvieron del análisis del genoma de 33 (16.1%), cepas virales, detectadas en 204 muestras fecales de lechones entre 2-4 semanas de edad con sintomatología diarreica.

La electroforésis del genoma de cepas de Rotavirus, obtenidas de heces de lechones con diarrea permitió reconocer un polimorfismo genético en los Rotavirus presentes en las granjas porcícolas estudiadas, puesto que se detectaron diferencias en el genoma a nivel molecular entre las cepas virales examinadas.

Numerosos investigadores, han demostrado la bondad del análisis del genoma viral mediante ésta técnica, utilizando geles de poliacrilamida (PAGE), procedimiento que ha sido valioso para la identificación de cepas de campo de Rotavirus, tanto de origen humano como de origen porcino (57,60).

Las variaciones observadas en la migración de los segmentos de los diferentes electroferotipos encontrados en este estudio, estuvieron dadas por diferencias que se limitaron casi en su totalidad a los segmentos de la región III, cuya movilidad se presentó en una sola banda (patrón "V"), en dupleta (patrón "Z"), y en tripleta (patrón W,X,Y); solamente un electroferotipo (patrón "U") estableció sus diferencias tanto en la región III como en la región I en la cual dos fragmentos migraron en una sola banda, observandose tres bandas y no cuatro como es lo usual.

Además, se ha descrito que según la movilidad de los segmentos 10 y 11 que conforman el grupo IV, las cepas de Rotavirus pueden ser clasificadas como patrón largo ó patrón corto; por lo tanto, los electroferotipos encontrados en este estudio de acuerdo a esta característica fueron considerados como pertenecientes al patrón corto (5).

En general, las cepas de Rotavirus de campo estudiadas presentaron diferencias con la cepa de referencia Bohl's, aunque las cepas de Antioquia con patrón "U", fueron muy similares. Con respecto a las cepa de referencia Compton, se encontraron mayores diferencias que las establecidas con la cepa anterior, no obstante, es de aclarar que este comportamiento posiblemente es debido a su origen diferente (bovino).

El electroferotipo se ha tratado de correlacionar con algunas propiedades inmunológicas del virus, en donde diferencias en los perfiles genómicos no siempre se correlacionan con variaciones antigénicas ni con la secuencia de nucleótidos; cambios en una sola base de un segmento del genoma, pueden producir variaciones detectables en el desplazamiento de ese segmento, no obstante, segmentos con distintas secuencias de nucleótidos podrian presentar movilidades electroforéticas similares (60).

De otro lado, se ha encontrado una asociación entre el serogrupo de una cepa de Rotavirus, el cual esta dado por un antígeno común de grupo contenido en la proteína viral estructural VP6, con su patrón electroforético lo cual ha sido de gran ayuda para la clasificación de las cepas de campo de Rotavirus; éste esquema de clasificación agrupa los 11 segmentos del genoma, como ya se mencionó en cuatro regiones designadas con números romanos, en donde el grupo A presenta una movilidad electroforética característica: Segmentos 1,2,3,4, región I, segmentos 5, 6, region II, segmentos 7,8,9, región III, segmentos 10,11 región IV (21).

En la presente investigación se pudo determinar ésta asociación, en donde el patrón de migración de las cepas de Rotavirus identificadas, excepto una cepa, fueron compatibles con el característico grupo A, además estas cepas se reconfirmaron con dos ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), dirigidos a la detección de Rotavirus grupo A.

La cepa que presentó características que no le permitieron ser clasificada en este grupo A, fué de acuerdo a su patrón electroforético denominada como cepa atípica, cuya movilidad estuvo definida así: Segmentos 1,2,3,4, región I, segmentos 5,6 región II, segmentos 7,8, región III, segmentos 9,10,11 región IV; patrón electroforético que según estudios ya descritos ha sido designado como Rotavirus grupo B. Infecciones experimentales con una cepa que presenta un electroferotipo similar producen un cuadro entérico similar al descrito para Rotavirus típico (10,17).

De acuerdo a los resultados obtenidos por el presente estudio, se logró establecer que el 97% de las cepas asociadas con infecciones por Rotavirus en lechones de 2-6 semanas eran causadas por Rotavirus grupo A y sólo un 3% tuvo como causa Rotavirus atípicos (Grupo B); en contraste, en un estudio realizado por Janke y colaboradores (60), en donde se evaluó la prevalencia de cepas de Rotavirus típicos y atípicos en lechones con diarrea en una granja porcícola convencional, se encontró en lechones lactantes Rotavirus grupo A y en cerdos destetos de cinco semanas de edad, Rotavirus grupo B y C, concluyendo, que la presencia de Rotavirus atípicos es tan común como la de Rotavirus típicos siendo los Rotavirus atípicos una causa frecuente de diarrea en lechones destetos.

Los análisis epidemiológicos descritos en la literatura, han hecho énfasis en descripciones detalladas para la identificación del serotipo específico, de cada una de las cepas de Rotavirus de campo, el cual está dado por las proteínas de superficie VP4

y VP7 y se puede determinar utilizando un inmunoensayo enzimático que emplea un anticuerpo monoclonal dirigido al serotipo específico (19,88).

Generalmente, ésta identificación va asociada con el perfil electroforético, en donde algunos autores coinciden en que cepas que presentan el mismo electroferotipo podrían corresponder al mismo serotipo; sin embargo, otros investigadores han encontrado casos esporádicos de cepas del mismo electroferotipo con distinto serotipo (78).

Esto sugiere que la electroferotipificación por sí misma, no es un método confirmatorio para establecer correlaciones antigénicas entre cepas; no obstante, se considera muy útil para complementar estudios epidemiológicos de serotipificación al permitir inferir el serotipo de aquellas cepas no serotificables por carecer de la cápside externa viral (78).

De igual forma, existen técnicas de biología molecular que de manera específica permiten determinar el serotipo de una cepa viral, tales como PCR (Reacción en Cadena Polimerasa) e Hibridización utilizando sondas específicas que identifican porciones del gen VP4 y VP7 (112).

En el caso de los Rotavirus humanos, las cepas con serotipo G1, G3, G4, han sido asociadas con el patrón electroforético largo, y el serotipo G2 con el patrón corto; con base en esta descripción se podría pensar que las cepas de Rotavirus porcino halladas en este estudio posiblemente podrían pertenecer al serotipo G2, puesto que mostraron un patrón corto (8,42).

Se ha demostrado además que las cepas con patrones electroforéticos largos ó cortos pertenecen a familias genéticas diferentes, debido a que cepas representativas de los

dos grupos difieren prácticamente en todos sus genes al ser analizados por técnicas de hibridización (80).

Del mismo modo, estudios previos han permitido establecer la relación entre cepas de Rotavirus humanos con electroferotipos cortos y supercortos con el subgrupo I, mientras que las cepas con electroferotipo largo se asocian con el subgrupo II (1,125); aunque estas observaciones fueron hechas con Rotavirus humanos, se podría sugerir que lo mismo ocurre con cepas de Rotavirus porcino, por lo cual se asume que los electroferotipos analizados en este estudio podrían pertenecer al subgrupo I ya que todos mostraron patrón corto

Los estudios epidemiológicos han establecido que las infecciones por Rotavirus porcino en las piaras son de carácter endémico y generalmente esta asociado a una sola cepa viral, la cual es predominante en la granja (106). En contraste, en el presente estudio se encontró que aunque hubo un electroferotipo (patrón "W") exclusivo para una granja, simultáneamente se pudo determinar la presencia de otras cepas virales en la misma.

Los otros electroferotipos encontrados (patrón U,V,X,Y,Z), fueron compartidos por algunas de las granjas; de este modo no hubo exclusividad de un único electroferotipo para las otras granjas, lo cual indica la circulación de más de una cepa viral dentro de una misma granja.

Además, se destaca el hallazgo de una misma cepa de Rotavirus en zonas (granjas) distantes geográficamente; esta observación se basa en la detección de un mismo patrón electroforético, hecho que podría implicar la diseminación de cepas de una región a otra mediante la movilización de animales adultos, los cuales son la fuente de infección para los lechones (46).

De otro lado, se debe tener en cuenta que en la presente investigación no se tomaron las variaciones climáticas como referencia para el análisis de los electroferotipos; sin embargo, las muestras fueron colectadas durante un período de 7 meses (Febrero - Agosto 1994), época en la cual hubo períodos secos y lluviosos y el virus fué detectado en éste período.

Hallazgos similares fueron reportados por Utrera y colaboradores (137), en un estudio realizado en Venezuela, durante Noviembre de 1980 a Noviembre de 1981 en donde se evaluó la prevalencia de Rotavirus porcino por medio de la técnica de Electroforésis, determinando la presencia de cepas virales con electroferotipos diferentes a lo largo del estudio, los investigadores atribuyen este hecho a la ausencia de estaciones climáticas en un país tropical como lo es Venezuela. ya que períodos secos y lluviosos durante el año posiblemente facilitan la propagación de aerosoles, que pueden favorecer la diseminación del virus en el polvo de superficies contaminadas facilitando la infección de huéspedes susceptible

Con respecto a los resultados presentados por las tres técnicas (Electroforésis, BioDot Rota, Rotazyme II), en donde se evaluó la asociación entre el método y el resultado obtenido se podría sugerir que la escogencia de una técnica diagnóstica de tamizaje para la determinación de un proceso infeccioso como lo es la enfermedad diarreica producida por el Rotavirus es muy importante a nivel de medicina veterinaria debido al impacto en la economía de la industria porcina.

Es necesario reconocer que la electroforésis posee una alta sensibilidad ya que tiene la posibilidad de detectar todos los grupos de Rotavirus típicos (grupo A) y Rotavirus atípicos (B,C,D,E,F,G), pero esta característica depende de la cantidad de ARN viral presente en la muestra a examinar, mientras que las pruebas de ELISA poseen gran sensibilidad pero su especificidad lleva a que sólo sean detectados ciertos grupos virales como en éste caso los Rotavirus grupo A (36).

presente en la muestra a examinar, mientras que las pruebas de ELISA poseen gran sensibilidad pero su especificidad lleva a que sólo sean detectados ciertos grupos virales como en éste caso los Rotavirus grupo A (36).

Es importante anotar que la muestra que presentó el electroferotipo compatible con una cepa atípica, no fué analizada por los kits de ELISA, debido a que se procesó por electroforésis al final del estudio y ya se habían empleado los kits.

Al observar los resultados de la tabla 2, (6.5%%), los casos de Electroforésis positivo y BioDot Rota negativo, son tomados como falsos positivos, la razón se desconoce ya que los Rotavirus contienen el antígeno común de grupo en la cubierta interna en donde también se encuentra el genoma y si presentaron un electroferotipo compatible con el grupo A, existía en la muestra partículas virales con el nucleocápside, por tanto no se encontró una explicación para este resultado. Por otra parte, casos de Electroforésis negativo y BioDot Rota positivo 4.3% (Tabla 2), pueden ser debido a la poca sensibilidad de la prueba, lo que implicaría que dos de 46 muestras tenían posiblemente un bajo contenido de antígeno viral o probablemente, el ARN se pudo degradar por la acción de enzimas ARNasas presentes en la materia fecal y persistir aún el antígeno viral en la muestra.

Al comparar los resultados de Electroforésis negativo y Rotazyme II positivo 8.3% (Tabla 3), es decir dos muestras de un total de 24, podría ser debido a las mismas razones expuestas que en el caso anterior.

Por último la comparación de las dos técnicas de ELISA mostró resultados muy similares con sólo 4.2% (Tabla 4) de diferencia con una muestra positiva para Rotazyme II y negativa para BioDot Rota, lo cual indica que diferentes parátopes sobre el anticuerpo monoclonal podría llegar a alterar la especificidad del Kit diagnóstico.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 1, no hay asociación entre la técnica y el resultado, por lo tanto no se determinó cual prueba es mejor ya que todas son buenas; sin embargo, si es planteado un problema de escogencia, la decisión depende fundamentalmente de las necesidades que requiera el investigador o el laboratorio; si se busca un mayor rango de grupos sin estar sujetos a la sensibilidad, podría escogerse la Electroforésis no antes teniendo en cuenta el alto costo, no sólo en reactivos y equipos sino en personal capacitado para su realización.

Si lo que se busca es sensibilidad por considerar que el Grupo A es el de mayor prevalencia en la población porcina, se escogería el ELISA, que además es de fácil ejecución y no requiere de gran equipo ni personal con gran capacitación para su elaboración.

Finalmente, la existencia de diferentes cepas de Rotavirus en la población porcina en Colombia, dificulta el diagnóstico y control de la infección.

CONCLUSIONES

- Se pudo confirmar que la electroforésis (PAGE), constituye una herramienta confiable para el análisis del genoma del Rotavirus.
- Se observó que la extracción de ARN viral, a partir de materia fecal es un método rápido y eficaz.
- Se encontró que la tinción con nitrato de plata es muy sensible y permite una buena visualización de las bandas de ARN.
- Se pudo determinar la cocirculación de siete electroferotipos distintos obtenidos de 33 cepas de Rotavirus.
- Se estableció que el patrón de migración de todos los electroferotipos encontrados era compatible con el característico que presenta el Rotavirus grupo A, excepto uno, que mostró ser compatible con el de un Rotavirus atípico (Grupo B).
- Todos los perfiles electroforéticos hallados fueron clasificados como patrón corto de acuerdo a la movilidad electroforética de los segmentos 10 y 11 del grupo IV.
- Las variaciones electroforéticas que permitieron identificar los diferentes electroferotipos, ocurrieron básicamente en la movilidad de los fragmentos genómicos que constituyen los grupos I y III.

- Se pudo determinar que existe una variabilidad genómica en las cepas de Rotavirus encontradas en éste estudio.
- Se encontró la presencia de la infección por Rotavirus durante todo el período en que se realizó éste estudio, sin embargo, ésta no fue tan alta como se esperaba.
- Se pudo demostrar que tanto el método ELISA como el de Electroforésis ofrecen ser buenas alternativas para el diagnóstico de Rotavirus.
- Se pudo establecer que el Rotavirus grupo A, fué el que mas predominó en las granjas porcícolas estudiadas.

12 de Diciembre de 2015

RECOMENDACIONES

- Se debe tener en cuenta que todo el material de vidrio y soluciones a utilizar deben ser preparadas con DEPC, con el fin de inhibir enzimas ARNasas.
- Evitar repetidos procesos de congelamiento y descongelamiento de las muestras fecales, identificadas como positivas para Rotavirus, para evitar la degradación del ARN viral.
- Es indispensable el uso de una cámara de electroforésis que permita una buena resolución de las bandas en un corto período de tiempo.
- Para la electroforésis es necesario que se mantenga un voltaje constante que permitan mantener las características de corrido.
- En el proceso de tinción de los geles con nitrato de plata, se deben usar las soluciones previamente refrigeradas, además, adicionar el formaldehído y tiosulfato a la solución reveladora, segundos antes de ser utilizado.

SUGERENCIAS

- En un posterior estudio con similares objetivos, se debería ampliar el área geográfica a investigar.
- Es de importancia conocer, de una forma más amplia datos epidemiológicos que permitan una mejor correlación de los resultados obtenidos.
- Un estudio que involucre períodos de tiempo más largos y consecutivos, permitirían conocer si persiste o no una estabilidad genómica en las cepas de Rotavirus que afectan la población porcina.

Emplear técnicas moleculares específicas que permitan conocer el nivel de subespeciación al que pertenecen las cepas virales aisladas.

Extender la colección de las muestras a lechones mayores de cinco semanas, con el fin de incrementar la incidencia de Rotavirus atípicos, como lo sugiere la literatura.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALBERT, M.I.; Leanne, E.U.; Bishop, R.F. 1987. Cultivation and characterization of human rotaviruses with "super short" RNA patterns . J. Clin. Microbiol. 25: 183-185.
2. BACHMANN, P.A.; Hess, R.G. 1981. Routine isolation and cultivation of bovine rotaviruses in cell culture. Am. J. Vet. Res. 42: 2149-2150.
3. BEARDS, G.M.; King, J.A.; Mazhar, S.; Landon, J.; Desselberger, U. 1993. Homotypic and heterotypic immune responses to group A rotaviruses in parenterally immunized sheep. Vaccine. 11: 262-266.
4. BEZEK, D. 1994. Rotavirus enteritis in food animals. Food animal. 16: 391-404.
5. BINGAN, F.; Unicomb, L.E.; Guangli, T.; Ali, A.; Rahim, M.Z.; Tzipori, S. 1991. Cultivation and characterization of novel human group A rotaviruses with long RNA electropherotype, subgroup II specificities, and serotype 2 VP7 genes. J. Clin. Microbiol. 29: 2224-2227.

6. BISHOP, R.F. 1993. Development of candidate rotavirus vaccines. *Vaccine*. 11:247-253.
7. BLACKLOW, N.R.; Cukor, G. 1981. Viral gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 304: 397-406.
8. BOHL, E.H.; Theil, K.W.; Saif, L.J. 1984. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 19: 105-111.
9. BOHL, E.H.; Kholer, E.M.; Saif, L.J.; Cross, R.F.; Agnes, A.G.; Theil, K.W. 1978.. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. *JAVMA*. 172: 458-462.
10. BOHL, E.H.; Saif, L.J.; Theil, K.W.; Agnes, A.G.; Cross, R.F. 1982. Porcine pararotavirus: Detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 15: 312-319.
11. BRANDT, C.D.; Kim, H.W.; Rodriguez, W.J.; Arrobio, J.O.; Jeffries, B.C.; Parrot, R.H. 1982. Rotavirus gastroenteritis and weather. *J. Clin. Microbiol.* 16: 478-482.
12. BRIDGER, J.C. 1980. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhea. *Vet. Rec.* 107:532-533.
13. BRIDGER, J.C.; Clarke, I.N.; McCrae, M.A. 1982. Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus. *Infect. Immun.* 35: 1058-1062.

14. BURNS, J.W.; Welch, S.W.; Nakata, S.; Estes, M.K. 1989. Characterization of monoclonal antibodies to human group B rotaviruses and their use in an antigen detection Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* 27:245-250.
15. BUSTOS,F.; Acosta, O.; Rodriguez, G.; Mossos, N.A.; Navas, Y. 1987. Rotavirus típicos y atípicos en pollitos con sintomatología diarreaica. Estudios preliminares. *Revista ICA.* 22: 37-42.
16. CAETANO, G.A.; Gresshoff, P.M. 1993. Staining nucleic acids with silver an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes* 45: 13-18
17. CHASEY, D.; Bridger, J.C.; McCrae, M.A. 1986. A new type atypical rotavirus in pigs. *Arch Virol.* 89: 235-243.
18. CHOMCZYNSKI, P.; Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
19. CIARLET, M.; Liprandi, F. 1994. Serological and genomic characterization of two porcine rotaviruses with serotype G1 specificity. *J. Clin.Microbiol.* 32: 269-272.
20. CONNER, M.E.; Graham, D.Y. 1988. Rabbit model of rotavirus infection. *J. Virol.* 62: 1625-1633.
21. COSTA, V.M.; Beer, M.; Peenze, Y.; Steele, A.D. 1993. Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in South African calves. *J. Clin Microbiol.* 31: 3333-3334.

22. DAS, B.K.; Gentsch, J.R.; Cicirello, H.G.; Woods, P.A.; Gupta, A.; Ramachandran, M.; Kumar, R.; Bhan, M.K.; Glass, R.I. 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1820-1822.
23. DENNEHY, P.H.; Schutzbank, T.E.; Thorne, G.M. 1994. Evaluation of an automated immuno-diagnostic assay, VIDAS rotavirus, for detection of rotavirus in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 32: 825-827.
24. DI MATTEO, A.; Sarasini, A.; Scotta, M.S.; Parea, M.; Licardi, G.; Gerna, G. 1989. Nosocomial outbreak of infant rotavirus diarrhea due to the appearance of a new serotype 4 strain. *J. Med. Virol.* 27: 100-104.
25. DYALL - SMITH, M.L.; Holmes, I. H. 1981. Gene-coding assignments of rotavirus double stranded RNA segments 10 and 11. *J. Virol.* 38: 1099-1103.
26. EDWARDS, S.; Chasey, D.; Napthine, P.; Banks, J.; Hewitt-Taylor, C.; Cranage, M.P. 1987. A comparison of three rapid diagnostic methods for the detection of rotavirus infection in calves. *Vet. Microbiol.* 13: 19-25.
27. EIDEN, J. J.; Wilde, J.; Firoozmand, F.; Sato, S.; Vonderfecht, S.L.; Yin, F.Z.; Yolken, R.H. 1989. Detection of group B rotavirus in fecal specimens by dot hybridization with a cloned cDNA probe. *J. Clin. Microbiol.* 27: 422-426.
28. EIDEN, J. J.; Mouzinho, A.; Lindsay, D. A.; Glass, R.I.; Fang, Z.Y.; Taylor, J.L. 1994. Serum antibody response to recombinant major inner capsid protein following human infection with group B rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1599-1603.

29. ESPARZA, J.; Garziglia, M.; Gil, F.; Romer, H. 1980. Multiplication of human rotavirus in cultures cells an electron microscopic study. *J. Gen. Virol.* 47: 461-472.
30. ESTES, M.K. 1990. Rotaviruses and their replicaton in: *Virology* 2a edition. Edited by B. M. Fields.; D.M. Knipe et al Raven Press. New York p. p 1329-1352.
31. ESTES, M.K.; Graham, D.Y.; Dimitrov, D.M. 1984. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.* 29:1-22.
32. FANG, Z.Y.; Glass, R.I.; Peñaranda, M.; Dang, H.; Monroe, S.S.; Wen, L.; Eiden, J.; Yolken, R.H.; Saif, L.; Gouvea, V.; Hung, T. 1989. Purification and characterization of adult diarrhea rotavirus: Identification of viral structural proteins. *J. Virol.* 63: 2191-2197.
33. FANG, Z.Y.; Ye, Q.; Ho, M.S.; Dong, H.; Quing, S.; Peñaranda, S.; Hung, T.; Wen, L.; Glass, R. I. 1989. Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. *J. Infect. Dis.* 160: 948-953.
34. FIJTMAN, N.L.; Barrandeguy, M.E., Cornaglia, E.M.; Schudel, A.A. 1987. Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. *Arch. Virol.* 96: 275-281.
35. FLEWETT, T.H. 1978. Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. *JAVMA.* 173: 538-543.
36. FORRER, C.B.; Jeanine, M.S.; Rodden, M.; Clark, F.; Friedman, H. 1988. Discrepant rotavirus results in two laboratories using enzyme immunoassay. *Am. Clin. Pathol.* 91: 85-87.

37. FUJII, R.; Kuzuya, M.; Hamano, M.; Yamada, M.; Yamasaki, S. 1992. Detection of human group C, rotaviruses by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1307-1311.
38. FRANCO, G.; Leal, F.J.; Sandoval, C.I. 1985. Evaluación de la enfermedad diarreica aguda por rotavirus en Bogotá . Colombia. *Revista Pediatría.* 21: 240-249.
39. GAGGERO, A.; Avendaño, L.F.; Fernandez, J.; Spencer, E. 1992. Nosocomial transmission of rotavirus from patients admitted with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3294-3297.
40. GATHERUI, Z.; Kobayashi, M.; Adachi, N.; Chiba, S.; Muth, J.; Ogaja, P.; Nyangao, J.; Kiplagat, E.; Tukei, P.M. 1993. Characterization of human rotavirus strains causing gastroenteritis in Kenya. *Epidemiol. Infect.* 110: 419-423.
41. GENTSCH, J.R.; Glass, R.I.; Woods, P.; Gouvea, V.; Gorziglia, M.; Flores, J.; Das, B.K.; Bhan, M.K. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polimerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1365-1373.
42. GERNA, G.; Sarasini, A.; Parea, M.; Arista, S.; Miranda, P.; Brussow, H.; Hoshino, Y.; Flores, J. 1992. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. *J. Clin. Microbiol.* 30: 9-16.
43. GLASS, R.I.; Gentsch, J.; Smith, J.C. 1994. Rotavirus vaccines: Success by reassortment. *Science.* 265: 1389-1390.

44. GLASS, R.I.; Keith, J.; Nakagomi, O.; Nakagomi, Y.; Askaa, J.; Kapikian, A.Z.; Chanock, R.M. Flores, J. 1985. 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 rotaviruses. *Virology*. 141: 292-298.
45. GOMWALK, N.E.; Umoh, U.J.; Gosham, L.T.; Ahmad, A.A. 1993. Influence of climatic factors on rotavirus infection among children with acute gastroenteritis in Zaria northern Nigeria. *J. Trop. Pediatrics*. 39: 293-297.
46. GONZALEZ, G.; Torres, M.; Mogollón J.E.; Gómez, A. 1992. Características del rotavirus porcino aislado en Colombia. Informe veterinario CEISA. pg 1-7.
47. GONZALEZ, G.; Torres, M.; Sabogal, R. 1991. Rotavirus grupo A en lechones lactantes en una granja porcina convencional. Investigación básica medicina porcina. ICA-CEISA. pg 1-10.
48. GORZIGLIA, M.; Green, K.; Nishikawa, K.; Taniguchi, K.; Jones, R.; Zapikian, A.Z.; Chanock, R.M. 1988. Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virol*. 62: 2978-2984.
49. GORZIGLIA, M.; Nishikawa, K.; Hoshino, Y.; Taniguchi, K. 1990. Similarity of the outer capsid protein VP4 of the Gottfried-strain of porcine rotavirus to that of asymptomatic human rotavirus strains. *J. Virol*. 64: 414-418.
50. GOUVEA, V.; Glass, R.I.; Woods, P. 1990. Polymerase chain reaction and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol*. 28: 276-282.

51. GOUVEA, V.; Ho, M.S.; Glass, R.; Woods, P.; Forrester, B.; Robinson, C.; Ashley, R.; Riepenhoff-Talty, M.; Taniguchi, K.; Meddix, E.; Mckellar, B.; Pickering, L. 1990. Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989. *J. Inf. Dis.* 162: 362-367.
52. GOUVEA, V.; Santos, N.; Carmo Timenetsky, M. 1994. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1338-1340.
53. GOUVEA, V.; Santos, N.; Carmo Timenetsky, M. 1994. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1333-1337.
54. GREEN, K.Y.; Hoshino, Y.; Ikegami, N. 1989. Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. *Virology.* 168: 429-433.
55. GUERRERO, C.A.; Moreno, L.P.; Peñaranda, J.; Acosta, O. 1994. Caracterización electroferotípica de rotavirus aislados de infantes con gastroenteritis en la ciudad de Bogotá. *Rev. Facultad de Medicina Univ. Nal.* 42: 203-208.
56. GUANASENA, S.; Nakagami, O.; Isegawa, Y.; Kaga, E.; Nakagami, T.; Steele, A.D.; Flores, J.; Veda, S. 1993. Relative frequency of VP4 gene alleles among human rotaviruses recovered over a 10 year period (1982-1991) from Japanese children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2195-2197.
57. HASEGAWA, A.; Inoye, S.; Matsuno, S.; Yamoaka, K.; Eko, R.; Suharyono, W. 1984. Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from Indonesia. *Microbiol. Immunol.* 28: 719-722.

58. HERRING, A.J.; Inglis, M.F.; Ojeh, C.K.; Snodgrass, D.R.; Menzies, J.D. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16: 473-477.
59. HOUSE, J.A. 1978. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *JAVMA.* 173: 573-576.
60. JANKE, B.H.; Nelson, J.K.; Benfield, D.A.; Nelson, E.A. 1990. Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 308-311.
61. JIANG, B.M.; Saif, L.J. 1992. In vitro transcription and translation of genomic RNA from a porcine group C rotavirus. *Arch. Virol.* 124: 181-185.
62. KALJOT, K.T.; Shaw, R.D.; Rubin, D.H.; Greenberg, H.B. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cells membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62: 1136-1144.
63. KAMINJOLO, J.S.; Adesiyun, A.A. 1994. Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. *Br. Vet. J.* 150: 293-299.
64. KANG, S.Y.; Nagaraja, K.B.; Newman, J.A. 1984. Rapid coagglutination test for detection of rotaviruses in turkeys. *Avian Diseases.* 29: 640-648.
65. KANG, S.Y.; Nagaraja, K.B.; Newman, J.A. 1988. Physical, chemical, and serological characterization of avian rotaviruses. *Avian Diseases.* 32:195-203.

66. KAPIKIAN, A.Z.; Kim, H.W.; Wyatt, R.G.; Cline, W.L.; Arrobio, J.O.; Brandt, C.D.; Rodriguez, W.J.; Sack, D.A.; Chanock, R.M.; Parrot, R.H. 1976. Human reovirus like agent as the major pathogen associated with in hospitalized infants and young children . N. Engl. J. Med. 294:965
67. KAPIKIAN, A.Z.; Wyatt, R.G.; Levine, M.M.; Yolken, R.H.; VanKirk.D.H.; Dolin, R.; Greenberg, H.B.; Chanock, R.M. 1983. Oral administration of human rotavirus to volunteers: Induction of illness and correlates of resistance. J. Infect. Dis. 147: 95-106.
68. KAPIKIAN, A.Z.; Chanock, R.M. 1990. Rotaviruses in: Virology 2a edition. Edited by B.M. Fields. D.M. Knipe et al Raven Press. New York p.p. 353-387.
69. KAPIKIAN, A.Z.; Chanock, R.M. 1991. Viral gastroenteritis in: Viral infectious humans. third edition. Edited by Evans Plenum Medical et al Raven Press. New York p.p. 145-165.
70. KAPIKIAN, A.Z.; Lam, S.K.; Madeley, C.R.; Mathan, N. 1980. Rotavirus and other diarrheas. Bolletin of the World Health Organization. 58: 183-198
71. KIM, H.W.; Brandt, C.D.; Kapikian, A.Z.; Wyatt, R.G.; Arrobio, J.O.; Rodriguez, W.J.; Chanock, R.M.; Parrot, R.H. 1977. Human Reovirus-like agent infection. Ocurrence in adult contacts of pediatrics patients with gastroenteritis. JAMA. 238: 404-407.
72. KONNO, T.; Kutsuzawa, T.; Suzuki, H. 1983. In vitro cultivation of human rotavirus in MA-104 cells. Acute diarrhea its nutritional consequences in children. Nestle Vevey / Raven Press New York p.p. 31-37.

73. KONNO, T.; Sato, T.; Suzuki, H.; Kitaoka, S.; Katsushima, N.; Sakamoto, M.; Yasaki, N.; Ishida, N. 1984. Changing RNA patterns in rotaviruses of human origin: Demonstration of a single dominant pattern at the start of an epidemic and various patterns thereafter. *J. Infect. Dis.* 149: 683-687.
74. LAEMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
75. LeBARON, C.W.; Lew, J.; Glass, R.I.; Weber, J.N.; Ruiz-Palacios, J.M. 1990. Annual rotavirus epidemic patterns in North America. Results of a 5-year retrospective survey of 88 centers in Canada, Mexico, and United States. *JAMA.* 264: 983-988.
76. LI, B.; Gorziglia, M. 1993. VP4 serotype of the Gottfried strain of porcine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3075-3077.
77. LITTLE, L.M.; Shaddock, J.A. 1982. Pathogenesis of rotavirus infection in mice. *Infect. Immun.* 38: 755-763.
78. LOPEZ, S.; Padilla-Noriega, L.; Arias, S.F. 1993. Correlación entre serotipo y electroferotipo de rotavirus aislados en dos poblaciones de México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 50: 736-740.
79. LU, W.; Duhamel, G.E.; Benfield, D.A.; Grotelueschen, D.M. 1994. Serological and genotypic characterization of group A rotavirus reassortants from diarrheic calves born to dams vaccinated against rotavirus. *Vet. Microbiol.* 42: 159-170.

80. MASENDY CZ, P.J.; Unicomb, L.E.; Kirkwood, C.D.; Bishop, R.F. 1994. Rotavirus serotypes causing severe acute diarrhea in young children in six Australian cities, 1989 to 1992. *J. Clin Microbiol.* 32: 2315-2317.
81. MATSUMOTO, K.; Hatano, M.; Kobayashi, K.; Hasegawa, A.; Yamasaki, S.; Nakata, S.; Chiba, S.; Kimura, Y. 1989. An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *J. Infect. Dis.* 160: 611-615.
82. MATSUNO, S.; Nakajima, K. 1982. RNA of rotavirus: Comparison of RNAs of human and animal rotaviruses. *J. Virol.* 41: 710-714.
83. MATTION, N.M.; Bellinzoni, R.C.; Blackhall, J.O.; La Torre, J.L.; Scodeller, E.A. 1989. Antigenic characterization of swine rotaviruses in Argentina. *J. Clin. Microbiol.* 27: 795-798.
84. McADARAGH, J.P.; Bergeland, M.E.; Meyer, R.C.; Johnshoy, M.W.; Stotz, I.J.; Benfield, D.A.; Hammer, R. 1980. Pathogenesis of rotaviral enteritis in gnotobiotic pigs: A microscopic study. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1572-1581.
85. McNULTY, M.S. 1978. Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40 :1-18.
86. MIDDLETON, P.J. 1978. Pathogenesis of rotaviral infection. *JAVMA.* 173: 544-547.
87. MOGOLLON, J.D.; Rodriguez, G.; Cortés, E.; Galvis, A.L. 1985. Rotavirus en bovinos de dos regiones colombianas. *Revista ICA.* 20: 244-250.

88. NAGESHA, H.S.; Brown, L.E.; Holmes, I.H. 1989. Neutralizing monoclonal antibodies against three serotypes of porcine rotavirus. *J. Virol.* 63: 3545-3549.
89. NAKAGOMI, O.; Ohshima, A.; Aboudy, Y.; Shif, Y.; Mochizuki, M.; Nakagomi, Y.; Gotlieb-Stematsky, T. 1990. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J. Clin. Microbiol.* 28 :1198-1203.
90. NAKAGOMI, O.; Mochizuki, M.; Aboudy, Y.; Shif, Y.; Silberstein, Y.; Nakagomi, T. 1991. Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for transmission of animal rotaviruses to humans. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1011-1013.
91. NAKATA, S.; Petrie, B.L.; Calomeni, E.P.; Estes, M.K. 1987. Electron microscopy procedure influences detection of rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1902-1906.
92. NICOLAS, J.C.; Pothier, P.; Cohen, J.; Lourenco, M.H.; Thompson, R.; Guimbaud, P.; Chenon, A.; Dauvergne, M.; Bricout, F. 1984. Survey of human rotavirus propagation as studied by electrophoresis of genomic RNA. *J. Infect. Dis.* 149: 688-693.
93. NISHIKAWA, K.; Hoshino, Y.; Taniguchi, K.; Green, K.Y.; Greenberg, H.B.; Kapikian, A.Z.; Chanok, R.M.; Gorziglia, M. 1989. Rotavirus VP7 neutralization epitopes of serotype 3 strains. *Virology.* 171: 503-515.
94. NOEL, J.S.; Beards, G.M.; Cubitt, W.D. 1991. Epidemiology survey of human rotavirus serotypes and electropherotypes in young children admitted to two children's hospitals in Northeast London from 1984 to 1990. *J. Clin. Microbiol.* 29:2213-2219.

95. OFFIT, P.A.; Blavat, G.; Greenberg, H.B.; Clark, H.F. 1986. Molecular basis of rotavirus virulence : Role of gene segment 4. *J. Virol.* 57: 46-49.
96. OFFIT, P.A.; Clark, H.F.; Blavat, G.; Greenberg, H.B. 1986. Reassortant rotaviruses containing structural proteins, VP3 and Vp7 from different parents induce antibodies protective against each parental serotype. *J. Virol.* 60: 491-496.
97. OJEH, C.K.; Tsunemitsu, H.; Simkins, R.A.; Saif, L.J. 1992. Development of a biotin-streptavidin-enhanced Enzyme-Linked Immunosorbent Assay wich uses monoclonal antibodies for detection of group C rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1667-1673.
98. OJEH, C.K.; Parwani, A.V.; Jiang, B.M.; Theil, K.W.; Rosen, B.I.; Saif, L.J. 1993. Characterization of field isolates of porcine groupo C rotaviruses using gene 5 (VP6) and gene 8 (VP7) cDNA probes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 434-438.
99. OLIVE, D.M.; Sethi, S.K. 1989. Detection of human rotavirus by using and alkaline phosphatase-conjugated synthetic DNA probe in comparison with Enzyme-Linked Immuno Assay and polyacrylamide gel analysis. *J. Clin. Microbiol.* 27: 53-57.
100. PARWANI, A. V.; Rosen, B.I.; Flores, J.; McCrae, M.A.; Gorziglia, M.; Saif, L.J. 1992. Detection and differentiation of bovine group A rotavirus serotypes using polymerase chain reaction-generated probes to the VP7 gene. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 148-158.

101. PARWANI, A.V.; Hussein, H.A.; Rosen, B.I.; Lucchelli, A.; Navarro, L.; Saif, L.J. 1993. Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type-specific cDNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2010-2015.
102. PAUL, P.S.; Stevenson, G.W. 1992. Rotavirus and Reovirus in: *Diseases of swine 7a edition*. Iowa State University Press, Ames U.S.A p.p. 331-348.
103. PEDLEY, S.; Bridger, J.C.; Brown, J.F.; McCrae, M.A. 1983. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J. Gen. Virol.* 64: 2093-2101.
104. PEDLEY, S.; Bridger, J.C.; McCrae, M.A. 1983. Molecular analysis of rotavirus isolates that lack the group antigens. *Science.* 23: 157-163.
105. POCOCK, D.H. 1987. Characterization of rotavirus isolates from sub-clinically infected calves by genome profile analysis. *Vet. Microbiol.* 13:27-34.
106. PUERTO, M.; Puerto, F.I.; Polanco, G.G.; Gonzalez, M.R.; Alvarez, M.; Rodriguez, J.C. 1994. Detección de rotavirus en lechones lactantes de granjas localizadas en el estado de Yucatán. *Vet. Méx.* 25: 69-71.
107. QUAN, C.M.; Doane, F.W. 1983. Ultrastructural evidence for the cellular uptake of rotavirus by endocytosis. *Intervirology.* 20: 223-231.
108. RASOOL, N.; Othman, R.Y.; Adenan, M.I.; Hamzah, M. 1989. Temporal variation of Malaysian rotavirus electropherotypes. *Am. Soc. Microbiol.* 27: 785-787.

109. REDMOND, M.J.; Ijaz, M.K.; Parker, M.D.; Sabara, M.I.; Dent, D.; Gibbons, E.; Babiuk, L.A. 1993. Assembly of recombinant rotavirus proteins in virus-like particles and assesment of vaccine potential. *Vaccine*. 11: 273-281.
110. REGUERA, J.I.; Ortiz de Lejarazu, R.; Eirós, J.M.; Bratos, M.A.; Gonzalo, M.P.; González, Z.; Pérez-Pascual, P.; Rodriguez, A. 1993. Estudio de 3 años de los patrones de electroforésis de ARN de rotavirus en Valladolid. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 11: 309-313.
111. RICHARDSON, S.C.; Grimwood, K.; Bishop, R.F. 1993. Analysis of homotypic and heterotypic serum immune responses to rotavirus proteins following primary rotavirus infection by using the radioimmunoprecipitation technique. *J. Clin. Microbiol*. 31: 377-385.
112. ROSEN, B.I.; Parwani, A.V.; Lopez, S.; Florez, J.; Saif, L.J. 1994. Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP7 and human and porcine VP7 genes. *J. Clin. Microbiol*. 32: 311-317.
113. RUGGERI, F.M.; Marziano, M.L.; Tinari, A.; Salvatori, E.; Donelli, G. 1989. Four-year study of rotavirus electropherotypes from cases of infantile diarrhea in Rome. *J. Clin. Microbiol*. 27: 1522-1526.
114. RUIZ, A.M.; López, I.V.; López, S.; Espejo, R.T.; Arias, C.F. 1988. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus Y.M, a possible new rotavirus serotype. *J. Virol*. 62: 4331-4336.

115. SAIF, L.J.; Bohl, E.h.; Theil, K.W.; Cross, R.F.; House, J.A. 1980. Rotavirus-like, Calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.* 12: 105-111.
116. SANTOS, N.; Gouvea, V. 1994. Improved method for purification of viral RNA from fecal specimens for rotavirus detection. *J. Virol. Methods.* 46: 11-21.
117. SANTOS, N.; Riepenhoff-Talty, M.; Clark, H.F.; Offit, P.; Gouvea, V. 1994. VP4 genotyping of human rotavirus in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 32: 205-208.
118. SESTAK, K.; Musilova, J. 1994. Isolation of rotavirus strains from naturally infected piglets. *Acta Virologica.* 38. 27-30.
119. SHATKIN, A.J.; Sipe, J.D.; Loh, P. 1968. Separation of ten reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Virol.* 2: 986-991.
120. SHERIDAN, J.F.; Eydelloth, R.S.; Vonderfecht, S.L.; Aureliano, I. 1983. Virus-specific immunity in neonatal and adult mouse rotavirus infection. *Infect. Immun.* 39: 917-927.
121. SHIF, I.; Silberstein, I.; Aboudy, Y.; Mendelson, E.; Mattes, A.; Gotlieb-Stematsky, T. 1992. Uniformity of serotype and electropherotype in local human rotavirus isolates during each of three successive cold seasons. *Int. J. Epidemiol.* 21: 399-405.
122. SPENCER, E.; Avendaño, F.; Araya, M. 1983. Characteristics and analysis of electropherotypes of human rotavirus isolated in Chile. *J. Infect. Dis.* 148: 41-48.

123. STEELE, A.D.; Mnisi, Y.N.; Williams, M.M.; Bos, P.; Aspinall, S. 1993. Electrophoretic typing of nosocomial rotavirus infection in a general paediatric unit showing the continual introduction of community strains. *J. Med. Virol.* 40: 126-132.
124. STEINHOFF, M.S. 1980. Rotavirus: The first five years. *J. Pediatrics.* 96: 611-622.
125. SUKUMARAN, M.; Gowda, K.; Maiya, P.P; Srinivas, T.P.; Kumar, M.S.; Aijaz, S.; Reddy, R.R.; Padilla, L.; Greenberg, H.B.; Rao, C.D. 1992. Exclusive asymptomatic neonatal infections by human rotavirus strains having subgroup I specificity and "Long" RNA electropherotype. *Arch. Virol.* 126: 239-251.
126. SUZUKI, Y.; Sanekata, T.; Sato, M.; Tajima, K.; Matsuda, Y.; Nakagomi, O. 1993. Relative frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotype determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3046-3049.
127. TABASSUM, S.; Shears, P.; Hart, C.A. 1994. Genomic characterization of rotavirus strains obtained from hospitalized children with diarrhea in Bangladesh. *J. Med. Virol.* 43: 50-56.
128. TEKTOFF, J.; Dauvergne, M.; Durafour, M. 1980. Morphogenesis of bovine rotavirus in heterologous cells and behaviour of the infected cell mitochondria. *Electron Microscopy.* 2: 506.
129. THEIL, K.; Saif, L.J.; Moorhead, P.D.; Whitmoyer, R.E. 1985. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): Characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 21: 340-345.

130. THEIL, K.W.; Bohl, E.H.; Saif, L.J. 1978. Techniques for rotaviral propagation. *JAVMA*. 173: 548-551.
131. TIETZOVA, J.; Petrovicova, A. 1994. Isolation of group A human rotaviruses from faecal specimens in monkeys MA-104 cells. *Acta virologica*. 38: 47-50.
132. TODD, D.; McNulty, M.S.; Allan, G.M. 1984. The use of polyacrylamide gel electrophoresis of virus RNA in the study of rotavirus infections. *Recent advances in virus diagnosis*. 9: 125-135.
133. TORRES, A. 1984. Effect of rotavirus and/or *Escherichia coli* infection on the aggregated lymphoid follicles in the small intestine of neonatal gnotobiotic calves. *Am. J. Vet. Res.* 45: 652-660.
134. TSUNEMITSU, H.; Saif, L.J.; Jiang, D.; Shimizu, M.; Hiro, M.; Yamaguchi, H.; Ishiyama, T.; Hirai, T. 1991. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA-104). *J. Clin. Microbiol.* 29: 2609-2613.
135. UISSMANS, H.; Els, H.J. 1979. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology*. 92: 397-406.
136. UNICOMB, L.E.; Bishop, R.F. 1989. Epidemiology of rotavirus strains infecting children throughout Australia during 1986-1987. A study of serotype and RNA electropherotype. *Arch. Virol.* 106: 23-34.
137. UTRERA, V.; Mazzali de Ilja, R.; Gorziglia, M.; Esparza, J. 1984. Epidemiological aspects of porcine rotavirus infection in Venezuela. *Res. Vet. Scien.* 36: 310-315.

138. VONDERFECHT, S.L.; Huber, A.C.; Eiden, J.; Mader, L.C.; Yolken, R.H. 1984. Infectious diarrhea of infant rats produced by a rotavirus-like agent. *J. Virol.* 52: 94-98.
139. VONDERFECHT, S.L.; Lindsay, D.A.; Eiden, J.J. 1994. Detection of rat, porcine, and bovine group B rotavirus in fecal specimens by solid-phase enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1107-1108.
140. WALLACE, D.M.; 1987. Large and small-scale phenol extractions in: *Methods in enzymology* by Academic Press. 152: 33-83.
141. WARD, R.L.; Bernstein, P.I.; Knowlton, D.R.; Sherwood, J.R.; Young, E.C.; Cusack, T.M.; Rubino, J.R.; Schiff, J.M. 1991. Prevention of surface-to-human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1991-1996.
142. WARD, R.L.; Knowlton, D.R.; Pierce, M.J. 1984. Efficiency of human rotavirus propagation in cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* 19: 748-753.
143. WHIPP, S.C. 1978. Physiology of diarrhea-small intestines. *JAVMA.* 173: 662-666.
144. WILL, L.A.; Paul, P.S.; Proescholdt, T.A.; Aktar, S.N.; Flaming, K.P.; Janke, B.H.; Sacks, J.; Lyoo, Y.S.; Hill, H.T.; Hoffman, L.J.; Wu, L.L. 1994. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 416-422.

145. WILDE, J.; Van, R.; Pickering, L.; Eiden, J.; Yolken, R. 1992. Detection of rotaviruses in the day care environment by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 166: 507-511.
146. WOODE, G.N.; Crouch, C.F. 1978. Naturally occurring and experimentally induced rotaviral infections of domestic and laboratory animals. *JAVMA.* 173: 522-526.
147. XU, L.; Harboud, D.; McCrae, M.A. 1990. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotavirus in faeces. *J. Virol. Methods.* 27: 29-38.
148. YAP, K.L.; Wong, Y.H.; Khor, C.M.; Ooi, Y.E. 1992. Rotavirus electropherotypes in Malaysian children. *Can. J. Microbiol.* 38: 996-999.
149. YEAGER, M.; Dryden, K.A.; Olson, N.H.; Greenberg, H.B.; Baker, T.S. 1990. Three dimensional structure of Rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell. Biol.* 110: 2133-2144.

 **Corpoica**
Centro de Documentación
CEISA

**BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA**