

La ampliación del análisis propuesto por Holnson y colaboradores (3), tiene la ventaja de analizar tres factores a la vez y sus posibles interacciones, con lo cual se amplían los alcances de las conclusiones desde un punto de vista multifactorial. La metodología de análisis se puede ampliar para un arreglo factorial de tres factores, con relativa facilidad.

La prueba de la hipótesis entre las p variables respuesta tiene sentido únicamente, cuando la característica de interés se mide: en p diferentes sitios de una unidad experimental a la vez o en p diferentes períodos de tiempo dentro de un mismo experimento.

Una de las condiciones para que el análisis sea válido, es que $N \cdot t > p$, donde $N = rab$ es el número de datos y $t = ab$. Si la condición no se cumple, la solución es sumar pares de variables respuesta sin traslape, cuando se mide en p diferentes sitios de la unidad experimental, o eliminar algunas mediciones cuando se mide la variable en p diferentes períodos de tiempo. Lo anterior implica que el número de variables respuesta se resume o reduce, con la consecuente pérdida de información, lo cual puede redundar en el logro de los objetivos.

El problema planteado anteriormente no se presenta siempre que en la etapa de planeación del experimento se considere un número suficiente de repeticiones y/o tratamientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Graybill, F. A. 1976. Theory and application of the linear model. Duxbury Press, North Scituate, Mass.
2. Hanks, R. J.; Sesson, D. V.; Hurst, R. L.; Hubbard, K. G. 1980. Statistical analysis of results from irrigation experiments using the line-source sprinkler system. Soil Science Society of American Journal. 44:886-888.
3. Johnson, D. E.; Chaudhuri, U. N.; Kanfmasu, E. T. 1983. Statistical analysis of line-source sprinkler experiments and other Nonrandomized experiments using multivariate methods. Soil Science Society of American Journal. 47:309-312.
4. Morrison, D. F. 1976. Multivariate statistical methods. McGraw Hill, New York.
5. Searle, S. R. 1971. Linear models. John Wiley and Sons, Inc. New York.

MEDICINA VETERINARIA

ROTAVIRUS EN BOVINOS DE DOS REGIONES COLOMBIANAS

José Darío Mogollón G.; Gerzafín Rodríguez T.; Esperanza Cortés C.; Alba Lucía de Galvis*

RESUMEN

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 Llano, zonas ecológicas diferentes, dedicadas a la explotación lechera. El agente de la enfermedad buscado fue el rotavirus. Se usó la técnica de ELISA como prueba tamiz para detectar los Rotavirus. Los casos positivos por este método se examinaron con microscopio electrónico (ME) y se inocularon en células de riñón de mono (Línea MA-104), previo tratamiento del inóculo con tripsina. El aislamiento se confirmó por inmunofluorescencia directa o indirecta y por observación directa del virus al microscopio electrónico. En Ubaté, se encontró por la prueba de ELISA, Rotavirus en 14 de 117 vacas (12%) y en 18 de 123 terneros (15%); en el Piedemonte Llano, en 16 de 127 vacas (13%) y en 9 de 126 terneros (7%). De las 57 muestras positivas por ELISA sólo 14 (25%) fueron positivas al examen directo al microscopio electrónico con tinción negativa. El cultivo viral fue exitoso, en 46 (80.7%) de las muestras positivas por ELISA. La infección por Rotavirus no parece ser un problema mayor en las áreas examinadas y se presenta en los animales jóvenes y adultos, con y

* Médico Veterinario M.S., M.V.Sc., Sección Patología. Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias LIMV. Bogotá; Médico Patólogo INAS, Profesor Asociado del Departamento de Patología de la Universidad Nacional de Colombia; Bacterióloga M.S.; Bacterióloga. Programa de Microbiología, LIMV. A.A. 29743 Bogotá.

sin diarrea. El examen directo de las heces también permitió observar partículas virales redondas, pequeñas, coronavirus y estructuras virales dispuestas en cadena, cuyo significado patogénico no está definido.

Palabras Claves Adicionales: Aislamiento, ELISA, microscopía electrónica, rotavirus bovino.

ABSTRACT

Bovine rotavirus in two Colombian regions.

A survey to determine the main causes of neonatal diarrhea in calves under 28 days of age was carried out in two different ecological zones of Colombia: Valle de Ubaté and Piedemonte Llanero. Four hundred ninety three feces samples were collected from cows and their neonates with or without diarrhea in 85 farms. The samples were examined to detect the presence of Rotavirus. A commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used as screening test followed by studies with Electron Microscopy, and virus isolation on monkey MA-104 cells. Rotavirus were found in 14 cows (12%) and 18 calves (15%) in Ubaté and 16 cows (13%) and 9 calves (7%) in the Piedemonte Llanero. Virus was isolated from 46 (80.7%) positive samples to ELISA test. The results allowed to confirm a Rotavirus infection in dairy herds but not as a main cause of neonatal diarrhea in calves.

Additional Index Words: Bovine rotavirus, electron microscopy, ELISA, virus isolation.

El síndrome de diarrea neonatal bovina constituye un problema de salud animal por la mortalidad que puede ocasionar y por el retardo en el crecimiento y la disminución en la eficiencia de conversión de alimento que lo acompañan. Estudios preliminares estiman que hay diarrea en terneros en el 80% de las fincas lecheras de las diferentes regiones de Colombia (13).

Con este trabajo se intenta demostrar la presencia de Rotavirus en el complejo de diarrea neonatal bovina en dos zonas ecológicas diferentes: Valles de Ubaté y Piedemonte Llanero, como parte de un estudio global sobre la etiología de esta afección.

La asociación entre Rotavirus y diarrea en terneros, fue descrita por primera vez por Mebus y colaboradores (20) en 1969. Posteriormente se demostró que producen diarrea en niños, cerdos, potros, cabras, aves domésticas y otras especies (4,5,29,31). Se relacionan morfológica, bioquímica y antigénicamente, aunque no hay infección inter-específica corriente (19). Contienen ARN bicatenario, dispuesto en 11 segmentos, cubiertos por una cápside con doble hilera de capsómeros, cuya morfología ultraestructural con tinción negativa, semeja una rueda de carreta de donde proviene su nombre (19,34); miden 70 nanómetros de diámetro, se replican en el citoplasma de los enterocitos del duodeno y el yeyuno y pueden originar inclusiones (26).

Los Rotavirus conocidos, tienen un antígeno común asociado con la hilera interna de capsómeros lo que explica la relación serológica entre los virus productores de diarrea en ratones lactantes, lechones, potros y otros aislados de simios (33,34). El antígeno

específico está en la capa externa de la cápside (10, 19).

Probablemente el método de transmisión de los Rotavirus entre terneros se hace a través de: contacto directo, instrumentos contaminados, la mano de los operarios. La difusión de la infección dentro de un hato es rápida y la fuente de infección para los animales jóvenes, son los animales adultos (15,35). Una vez se establece una epizootia, la morbilidad alcanza frecuentemente 40 a 80%. La mortalidad puede llegar a un 5% y varía de acuerdo con factores ambientales y con la infección secundaria (35).

Los signos de la enfermedad aparecen generalmente en las primeras 96 horas de vida, aunque a veces, la diarrea se presenta dentro de las primeras 12 horas después del nacimiento; los terneros son más susceptibles durante los primeros 21 días de edad (15,18,24). El período de incubación varía entre 15 horas y 3 a 4 días. Los síntomas predominantes son depresión, anorexia y salivación. Se observa diarrea líquida amarillenta o café verdosa (15,20,32). La duración de la diarrea es de 2 a 7 días. Los animales presentan pelo hirsuto, la región perineal sucia, hay deshidratación y acidosis. Posteriormente toman posición decúbito y pueden morir por imbalance electrolítico o infección bacteriana secundaria (20,23).

La mayoría de la información acerca de los cambios patológicos causados por Rotavirus, proceden de estudios experimentales en animales (18,20) los cuales han demostrado que la infección se circunscribe al intestino delgado (22).

El diagnóstico de las infecciones por Rotavirus, basado en los signos clínicos y en las alteraciones anatomopatológicas no es preciso, puesto que diversos agen-

tes etiológicos pueden producir este síndrome; por ello es aconsejable recurrir al diagnóstico de laboratorio (32).

Al comparar varios métodos de diagnóstico, se encontró que la prueba de ELISA es el mejor método para demostrar el antígeno en las heces, le siguen la microscopía electrónica, la fijación del complemento, la inmunofluorescencia y la inmunoelectrosmoforesis (3,6,12,14,30). Se recomienda utilizar por lo menos dos tipos de pruebas diagnósticas, con el objeto de obtener resultados más confiables (32).

El aislamiento del virus se puede hacer utilizando cultivos celulares de riñón de bovino, riñón de mono (MA-104) y testículo bovino, aunque no crece fácilmente. La adición de tripsina al medio de cultivo facilita el aislamiento viral (1,2,21). Su posterior identificación se puede hacer mediante la prueba directa o indirecta de anticuerpos fluorescentes y, por microscopía electrónica (3,12).

En Colombia, el primer estudio sobre Rotavirus mostró que un 15.5% de las diarreas infantiles se asociaban con estos agentes (25). Un estudio más reciente realizado en un hospital pediátrico revela que los Rotavirus se asocian con un 50% de diarreas infantiles (16). La diarrea epizootica del ratón lactante es un problema endémico en algunos bioterios nacionales (27). En aves la diarrea producida por Rotavirus comienza a demostrarse en el país, según resultados de investigaciones recientes. Esta publicación es la primera en dar información sobre la presencia de Rotavirus Bovinos en Colombia. Paralela a tal investigación, el Instituto Nacional de Salud (INS) realizó una investigación sobre Rotavirus en niños.

MATERIALES Y METODOS

La muestra se obtuvo utilizando un modelo al azar recomendado por el Centro Panamericano de Zoonosis (9), según el cual se asumió una prevalencia límite de 7% de fincas afectadas para el Valle de Ubaté y de 8% para el Piedemonte Llanero, con un grado de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$). Se hicieron encuestas en 49 y 36 fincas, respectivamente. La muestra se distribuyó de acuerdo con el número de fincas registradas en los dos municipios, para las campañas de vacunación contra fiebre aftosa y brucelosis. En cada finca se recogieron entre dos y 10 muestras de heces de neonatos con o sin diarrea y de sus respectivas madres, para un total de 493 en las dos zonas (Tabla 1).

Las heces se depositaron en bolsas plásticas estériles con cierre hermético y se transportaron refrigeradas (-4°C) al Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias LIMV, donde se conservaron a -70°C . La recolección de las muestras se hizo en 1983, de febrero a junio para Ubaté y de julio a octubre para el Piedemonte Llanero.

Pruebas de Laboratorio

La técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA), se utilizó como prueba tamiz, de acuerdo con las instrucciones del producto comercial Rotazyme*. Los resultados se leyeron visual y espectrofotométricamente. Las muestras con una absorbencia mayor de 0.1, fueron consideradas positivas (según las indicaciones de uso del Kit).

TABLA 1. Detección e identificación de Rotavirus en bovinos del Valle de Ubaté y el Piedemonte Llanero.

Clase de Bovino	Número de Muestras	ZONA VALLE DE UBATE		Microscopía Electrónica de Fecal ELISA
		Positiva a ELISA Prueba Tamiz		
Vacas	117	14	12	4/14
Terneros	123	18	15	7/18
ZONA DE PIEDEMONTE LLANERO				
Vacas	127	16	13	0/16
Terneros	126	9	7	3/9
TOTAL	493	57	12	14/57

* Rotavirus Diagnostic Kit, Abbot Laboratories, North Chicago, RI 60064.

Microscopía Electrónica

De los casos positivos por ELISA, se prepararon suspensiones de heces al 10% en PBS, pH 7.2 y se centrifugaron a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos. El sobrenadante se dividió en dos alícuotas, una de las cuales se sometió a ultracentrifugación* a 50.000 rpm y el "Pellet" obtenido se observó en el microscopio electrónico de transmisión**, previa tinción con fosfotungstato de potasio al 1%, pH 6.5. La otra alícuota fue precipitada con sulfato de amonio (0.375 gm/ml) durante media hora a temperatura ambiente seguida de centrifugación a 10.000 rpm por diez minutos; el sedimento se suspendió en dos gotas de agua destilada y se observó en el microscopio electrónico, previa tinción negativa (24).

Aislamiento Viral

Las muestras positivas en la prueba de ELISA se inocularon en células de riñón de mono MA-104*** para aislamiento de Rotavirus. Se hizo una suspensión de heces al 10% en PBS 0.05 M, con 0.15 M de NaCl y Tween 20 al 0.05%. Para homogenizar la suspensión se adicionaron perlas de vidrio y se agitaron en un vortex; luego se centrifugó a 3.000 rpm y el sobrenadante se pasó a través de un filtro milliporo de 0.45 micras; un volumen del filtrado se trató con tripsina en concentración final de 10 microgramos por ml, durante media hora (1,2). Las células MA-104 con tres lavados sucesivos de medio sin suero se inocularon y se dejaron en adsorción durante una hora a 37° C. Después el inóculo se descartó y se adicionó el medio de mantenimiento Minimal Essential Medium (MEM + HEPES).

Los cultivos se observaron diariamente por cinco días para la detección de efecto citopático, luego se congelaron a -70° C. Antes de hacer el pase, cada muestra se congeló y descongeló tres veces. Las muestras que presentaron efecto citopático, se transfirieron a tubos Leygton con células MA-104 para la comprobación del aislamiento viral mediante las pruebas de inmunofluorescencia directa o indirecta. Los sobrenadantes de los cultivos, previa precipitación con sulfato de amonio, se observaron en el microscopio electrónico de transmisión, en igual forma como se procedió con las heces.

Anticuerpos Fluorescentes

Para la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) se utilizó suero antirotavirus bovino marcado

con isotiocianato de fluoresceína*. Para la prueba de inmunofluorescencia indirecta se utilizó el antisuero específico de referencia para rotavirus bovino SL 4474 y conjugado anti IgG bovino marcado con isotiocianato de fluoresceína**.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los animales positivos por ELISA se encontraron en 19 de las 49 fincas del Valle de Ubaté (38.7%) y en 10 de las 36 fincas del Piedemonte Llanero (27.7%).

Los resultados del análisis de 493 muestras de heces se presentan en la Tabla 1. Por la prueba de ELISA se demostró en Ubaté la presencia de antígeno de Rotavirus en las heces de 14 vacas (12%) y 18 terneros (15%), mientras que en el Piedemonte Llanero la prueba fue positiva en 16 vacas (13%) y 9 terneros (7).

De las 57 muestras positivas por ELISA sólo 14 (25%) fueron positivas al examen directo de las heces en microscopio electrónico (ME), indistintamente del método de concentración utilizado (Figura 1). El cul-

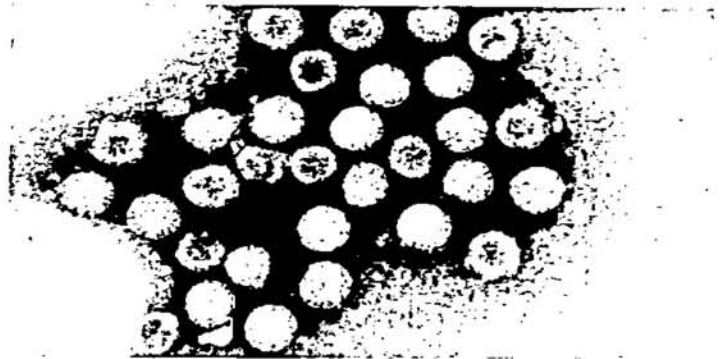


FIGURA 1. Rotavirus bovino. Heces de ternero; tinción negativa con fosfotungstato de potasio. 150.000X.

tivo viral fue positivo en 46 (80.7%) de muestras positivas por ELISA. Los aislamientos se lograron entre el primer y tercer pase, coincidiendo con las lecturas de ELISA más altas en la prueba de tamiz (Figura 2).

El aislamiento viral fue corroborado por microscopía electrónica (M.E.) y por inmunofluorescencia.

La microscopía electrónica (M.E.) en tinción negativa de las heces, reveló además, aunque en menor proporción, la presencia de coronavirus, virus pequeños redondos y partículas de morfología viral agrupadas en cadenas peculiares (Figuras 3 y 4).

El hallazgo más significativo del presente estudio es la demostración de Rotavirus en bovinos de dos áreas ecológicas colombianas diferentes, dedicadas a la explotación lechera.

* Rc-5 Superspeed Refrigerator Centrifuge Sorvall Dupont U.S.A.

** Electron microscope EM 109 Zeiss. West Germany.

*** Gentilmente proporcionadas por el Dr. W. Gary CDC Atlanta, Georgia U.S.A.

* Laboratorio Central de Diagnóstico Viroológico de Ames, Iowa, Estados Unidos.

** Suministrado por el Laboratorio Veterinario Central de Weybridge, Inglaterra.

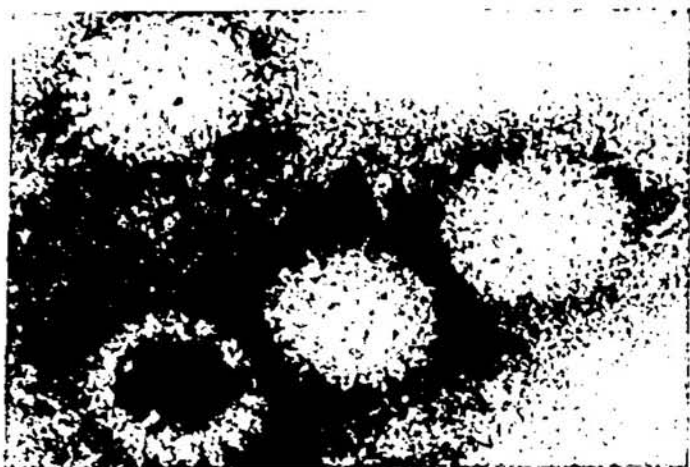


FIGURA 2. Rotavirus bovino. Tinción negativa con fosfotungstato de potasio de sobrenadante de cultivos celulares previa precipitación con sulfato de amonio. 500.000X.



FIGURA 3. Coronavirus bovino. Heces de ternero, tinción negativa con fosfotungstato de potasio. 75.000X.



FIGURA 4. "Estreptovirus". Heces de ternero, tinción negativa con fosfotungstato de potasio. 459.000X.

Los Rotavirus se encontraron en los terneros neonatos y en sus madres; éstas no tenían diarrea y en los neonatos, unos 17 animales, tenían diarrea y otros no la presentaban (10 animales). Sin embargo, se trataba de un muestreo y no de una observación clínica prolongada.

Los terneros sin diarrea y con excreción viral, pueden tener infección asintomática (18), análoga a la observada en niños, en los que la excreción viral asintomática puede llegar al 48% (7). El cuadro clínico, la excreción viral y la conversión serológica, se deben juzgar en conjunto para dilucidar la presencia de enfermedad, la infección asintomática o el simple transporte del virus (8). Este muestreo no incluyó análisis de la conversión serológica.

A diferencia de lo informado en otros lugares, el grado de infección demostrado no parece constituir un problema mayor, posiblemente esto se debe a que las madres y sus terneros disponen, en nuestro medio, de una área amplia para moverse, en cambio, en otros países el hacinamiento favorece la diseminación viral. El síndrome de diarrea neonatal está asociado con la presencia de madres y crías en el sitio de parición por períodos de 15 a 60 días (17), facilitándose así la diseminación del rotavirus de los adultos a los neonatos.

La persistencia del virus en el medio ambiente podría explicar en parte, la frecuencia de la infección por fincas en el Valle de Ubaté (38.7%) debido al sistema de manejo de los neonatos en salacunas y a su alimentación en baldes o cubos sin condiciones higiénicas adecuadas. En contraste, en el Piedemonte Llano la frecuencia es menor (27.7%) porque el sistema de manejo no acostumbra el uso de confinamiento (11).

En países con estaciones la mayor incidencia de diarrea por Rotavirus se presenta en el invierno (7,8, 19). En este estudio se encontró que la diseminación viral puede ocurrir posiblemente durante todo el año, dado que el muestreo se realizó durante ocho meses continuos, hallándose animales positivos en este período. Este hallazgo es similar a lo observado en el estudio realizado con niños en nuestro país, en los cuales se puede demostrar infección a través de todo el año, indistintamente de los cambios climatológicos (16).

La prueba de ELISA y la de ME tienen sensibilidad comparable en el diagnóstico de Rotavirus (14,27, 28). Sin embargo, la baja positividad obtenida con el ME en los casos positivos por el ELISA no es fácil de explicar, excepto por la posibilidad que tiene ELISA de medir antígeno viral, mientras la ME requiere partículas virales intactas identificables. La congelación y descongelación de las heces antes del estudio ultraestructural puede ser otro factor de error. Los errores de método fueron razonablemente controlados. Además en el ME se observaron otras partículas virales, algunas de tamaño más pequeño que los Rotavirus. En cambio, los cultivos con efecto citopático mostraron Rotavirus al examen con ME.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

La bondad de los tres métodos utilizados se hubiera podido analizar en forma más precisa si todas las 493 muestras se hubieran estudiado con cada uno de ellos, pero esto habría implicado demasiados costos. Por esta razón, se escogió la técnica de ELISA como prueba tamiz. Esta técnica es una prueba útil que emplea reactivos estables, permite procesar un buen número de muestras en un corto período de tiempo y tiene un buen grado de sensibilidad (27). Aunque en algunos estudios realizados por Krause y colaboradores citados por Hammond y colaboradores (14), esta prueba se ha cuestionado, la experiencia obtenida con este estudio muestra que es el método de elección más indicado para el diagnóstico de infecciones por Rotavirus.

El tratamiento de las heces con tripsina permitió realizar 46 aislamientos de rotavirus de los 57 animales positivos por ELISA. La práctica del cultivo es útil para: analizar el tipo de virus predominante en una zona según su genoma, determinar infecciones cruzadas entre especies, elaborar vacunas y principalmente, para disponer de antígenos propios para diagnóstico.

Finalmente, con la ayuda del ME se identificaron otros agentes virales como coronavirus, virus redondos pequeños y un "estrepto virus". El papel que desempeñan los coronavirus dentro del complejo de diarrea neonatal está bien definido (24,32) y su presencia abre la posibilidad de presentación en nuestro medio de diarreas causadas solamente por coronavirus o asociados con Rotavirus. Sin embargo, la distribución de la infección en las áreas estudiadas no se estableció; la significancia patógena de los otros dos tipos de virus encontrados, no está definida (23,32).

Este estudio permite concluir que el Rotavirus está presente en los bovinos de dos áreas diferentes del país, pero su asociación o no con el síndrome de diarrea neonatal, requiere de estudios clínicos, serológicos y epidemiológicos más detallados.

Agradecimientos a:

- Doctor W. Gary, CDC Atlanta, Georgia U.S.A.
- Laboratorio Central de Diagnóstico Viroológico, Ames Iowa, U.S.A.
- Laboratorio Veterinario Central de Weybridge, Inglaterra.
- Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

Por su colaboración para la realización de este estudio.

1. Almeida, J. D.; Hall, T.; Banatrála, J. E.; Totterdell, B. M.; Chrystie, I. L. 1978. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. *J. of Gen. Virol.* 40:213-218.
2. Babiuk, L. A.; Mohammed, K.; Spence, L.; Petro, R. 1977. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *J. of Clin. Microbiol.* 6:610-617.
3. Benfield, D. A.; Stotz, I. J.; Nelson, E. A.; Groom, K. S. 1984. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with electron microscopy, fluorescent antibody and virus isolation for the detection of bovine and porcine rotaviruses. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1.998-2.002.
4. Bishop, R. F.; Davidson, G. P.; Holmes, I. H.; Ruck, B. J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute gastroenteritis. *Lancet.* 2:1.281-1.283.
5. Bohl, E. H. 1979. Rotaviral diarrhea in pig: Brief review. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 174:613-615.
6. Brandt, C. D.; Whakim, H.; Rodríguez, W. J. 1981. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* 13:976-981.
7. Champsaur, H.; Questiaux, E.; Prevot, J.; Amar, H.; Goldszmidt D.; Bourjovane, M.; Bach, Ch. 1984. Rotavirus carriage, asymptomatic infection and disease in the first two years: virus shedding. *J. Infect. Dis.* 149: 667-674.
8. Champsaur, H.; Amar, H.; Goldszmidt, D.; Prevot, J.; Bourjovane, M.; Questiaux, E.; Bach, C. R. 1984. Rotavirus carriage, asymptomatic infection and disease in the first two years of life II. Serological Response. 149: 675-682.
9. Centro Panamericano de Zoonosis. 1979. Procedimientos para estudios de prevalencia de enfermedades crónicas por muestreo. Buenos Aires. (Nota Técnica No. 18, Revista 1).
10. Flewett, T. H.; Woode, G. N. 1978. The rotavirus, brief review. *Arch. of Virol.* 57:1-23.
11. Garzón, J. E.; Hernández, L. M.; Peña, N.; Mogollón, J. D. 1985. Epidemiología de la diarrea neonatal aguda indiferenciada (DNAI) en ganaderías del Piedemonte Llanero. Tesis de Grado Universidad Tecnológica de los Llanos.
12. Gibbs, E. P. J.; Smale, C. J.; Voyle, C. A. 1980. Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of viruses diseases of veterinary importance. *Vet. Rec.* 106: 451-458.
13. Griffiths, I. B.; Gallego, M. I.; Villamil, L. C. 1982. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche. Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá (Boletín Técnico No. 94).

14. Hammond, G.; Ahluwalia, G.; Klisko, B.; Hazelton, P. 1984. Human Rotavirus detection by counterimmuno electrophoresis versus Enzyme Immunoassay and Electron Microscopy after direct ultracentrifugation. *J. Clin. Microbiol.* 19:431-441.
15. Leeuw, de P. W.; Ellens, D. J.; Straver, P. J.; Balken, Van, J. A. A. M.; Moerman, A.; Baanvinger, T. 1980. Rotavirus infectious in calves in dairy herds. *Res. in Vet. Sci.* 29:135-141.
16. Leal, F. J.; Franco, G.; Sandoval, C. 1984. Agentes etiológicos de diarrea aguda en Bogotá. Premio AMES a la investigación en laboratorio clínico Bogotá.
17. López, A.; Peña, N.; Mogollón, J. D.; Rojas, J. 1985. Caracterización epidemiológica de la diarrea neonatal aguda indiferenciada (DNAI) en ganaderías lecheras del Valle de Ubaté. *Revista ICA (Material inédito)*.
18. McNulty, M. S.; McFerran, J. B.; Bruson, D. G.; Logan, E. F.; Curran, W. L. 1976. Studies on rotavirus infection and diarrhea in young calves. *Vet. Rec.* 99:229-230.
19. McNulty, M. 1978. Review article: Rotavirus. *J. Gen. Virol.* 40:1-13.
20. Mebus, C. A.; Underdahl, N. R.; Rhodes, M. B.; Twiehaus, M. J. 1969. Calf diarrhea (scours): Reproduced with a virus from a field outbreak. University of Nebraska (Research Bulletin 233).
21. Mebus, C. A.; Kono, M.; Underdahl, N. R.; Twiehaus, M. J. 1971. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can. Vet. J.* 12:69-72.
22. Mebus, C. A.; Stair, E. L.; Underdahl, N. R.; Twiehaus, M. J. 1971. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a Reo-like virus. *Vet. Path.* 8:490-505.
23. Moon, h. W.; McClurkin, A. W.; Isaacson, R. E.; Pohlenz, J.; Skartvedt, S. M.; Gillette, K. G.; Baetz, A. L. 1978. Pathogenic relationships of rotavirus, *Escherichia coli* and other agents in mixed infections in calves. *J. of Am. Vet. Med. Ass.* 173:577-583.
24. Norden Laboratories. 1973. Laboratory methods for detecting calf diarrhea viruses.
25. Rodríguez, G.; Boshell, J.; De Onatra, S.; Hernández, C.; Barbosa, E. 1978. Detection de duovirus en gastroenteritis infantil. *Consulta.* 5:12-14.
26. Rodríguez, G. 1980. Natural epizootic diarrhea of infant mice (EDIM) A light and electron microscope study. *Exp. and Mol. Path.* 32:241-252.
27. Simhon, A.; Amato, S.; Hernández, F.; Yolken R. Mata, L. 1976. Diagnóstico de rotavirus por microscopía electrónica y el ensayo inmunsorbente enzima conjugada (ELISA). *Bol. of Sanit Panam.* 86:391-396.
28. Rubenstein, A. S.; Miller, M. F. 1982. Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting rotavirus. *J. of Clin. Microbiol.* 15:938-944.
29. Scott, A. C.; Luddington, J.; Lucas, M.; Gilbert, F. R. 1978. Rotavirus in goat. *Vet. Rec.* 103.
30. Thouless, M. E.; Bryden, A. S.; Flewett, T. H.; Woode, G. N.; Bridger, J. C.; Snodgrass, D. R.; Herring, G. A. 1977. Serological relationships between rotaviruses from different species as studied by complement fixation and neutralization. *Arch. of Virol.* 53:287-294.
31. Tzipori, S.; Walker, M. 1978. Isolation of rotavirus from foals with diarrhea. *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 56:453-457.
32. Tzipori, S. 1981. The etiology and diagnosis of calf diarrhea. *Vet. Rec.* 108:510-514.
33. Woode, G. N.; Crouch, C. F. 1978. Naturally occurring and experimentally induced rotaviral infections of domestic and laboratory animals. *J. of Am. Vet. Med. Ass.* 173:522-526.
34. Woode, G. N.; Bridger, J. C.; Jones, J. M.; Flewett, T. H.; Bruden, A. S.; Davies, H. A.; White, G. B. B. 1976. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice, and foals. *Infect. and Imm.* 804-810.
35. Woode, G. 1978. Epizootiology of bovine rotavirus infection. *Vet. Rec.* 103:44-46.