ELECTROFEROTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE ROTAVIRUS DE ORIGEN PORCINO COLOMBIANAS

Carolina Valencia F., Bact., MSc.; Fernando Ariza B., M.V., MSc.; María F. Gutiérrez F., Bact., MSc.; José del C. Barrera V., M.V., Ph.D.; José D. Mogollón G., M.V., Ph.D.*

RESUMEN

Mediante la técnica de electroforesis (PAGE) se analizaron 204 muestras fecales de lechones diarreicos entre dos y seis semanas de edad, de diferentes granjas porcícolas del país, con el fin de analizar los electroferotipos del ARN de rotavirus. Para la extracción del ARN viral se empleó tiocianato de guanidina y la electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida. Sólo 33 muestras (16.1%) fueron positivas al ARN de rotavirus. Las variaciones genómicas observadas en los diferentes electroferotipos se ubicaron con mayor énfasis en los segmentos que conforman los grupos I y III del genóma, lo cual permitió agruparlos en siete electroferotipos, uno de ellos compatible con rotavirus atípicos (Grupo B); los otros seis, con rotavirus típicos (Grupo A); además, fueron clasificados como pertenecientes al patrón corto. Este estudio permitió establecer la variabilidad genómica presentada por los perfiles electroforéticos de las cepas de rotavirus existentes en las granjas analizadas.

Palabras Claves Adicionales: Rotavirus - lechones, PAGE, electroferotipos.

* Programas de Salud y Biotecnología Animal. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA; Centro Nacional de Referencia Diagnóstica, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Apartado Aéreo 29743, y Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.

ABSTRACT

VARIATION OF THE COLOMBIAN SWINE ROTAVIRUS ELECTROPHEROTYPES

In order to examine the rotavirus electropherotypes present in Colombian swine farms, a total of 204 faeces samples were collected from diarrheic piglets aged between 2 and 4 weeks old. Viral RNA was extracted by thicianate guanidine method and the electropherotype was generated on SDS-PAGE gels; 33 samples (16.1%) were positive to rotavirus RNA, and a genomic variation was detected among them. Those variations were located in the groups I and III of the genome. In general, seven electropherotypes were identified; one of them was compatible with rotavirus type B (atypical electropherotype), and the other six may belong to rotavirus group A and they had short pattern. This study allowed to establish a genomic variations among 33 rotavirus electropherotypes analyzed, which may are circulating within the differents pig raising areas in Colombia.

Additional Index Words: Rotavirus, piglets, page, electropherotypes.

Desde el descubrimiento de los rotavirus como causa de diarrea en terneros en 1969, estos virus han sido reconocidos como un agente etiológico en la enfermedad diarreica en neonatos de varias especies animales, incluyendo a los cerdos, según Bohl et al. (1978) y Kaminjolo y Adesiyun (1994).

Los rotavirus son miembros de la famlia *Reoviridae* que poseen un genoma compuesto de 11 segmentos de ARN de doble cadena, los cuales se pueden separar por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), generando un perfil electroforético llamado electroferotipo. Hasegawa et al. (1984), Herring et al. (1982) y Pocock (1987).

Los rotavirus que presentan el antígeno común de grupo localizado en la proteína estructural VP6, son denominados rotavirus grupo A o rotavirus típicos y son los que con mayor frecuencia afectan a humanos y animales (Costa et al., 1993). Los rotativus que no presentan este antígeno son conocidos como atípicos (B, C, D, E, F) (Pedley et al., 1983); los porcinos son afectados tanto por los rotavirus típicos como por los atípicos (Theil et al., 1985; Tsunemitsu et al., 1991).

BIBLIOTECA AGRO

Todos estos grupos pueden ser identificados por electroforesis, al presentar cada uno un patrón electroforético único que les permite diferenciarse entre sí (Todd et al., 1984). Existe un esquema para clasificar los electroferotipos de las cepas de rotavirus, propuesto por Lourenco et al. (1981), (citado por Estes et al., 1984), el cual divide los 11 segmentos en cuatro regiones.

Los rotavirus del grupo A presentan una movilidad característica cuyos segmentos 1,2,3 y 4 conforman la región I; los segmentos 4, 5 y 6, la región II; los segmentos 7,8 y 9, la región III y los segmentos 10 y 11, la región IV. Además, con base en las diferencias de movilidad de los segmentos 10 y 11 del genoma, los rotavirus A pueden presentar patrón largo, corto o supercorto (Dyall Smith y Holmes, 1981). El rotavirus B tiene como patrón electroforético la migración de las bandas 1,2,3 y 4, región I; bandas 5 y 6, región II; bandas 7 y 8 región III y bandas 9,10 y 11 región IV (Janke et al., 1990).

De otro lado, los serotipos están dados por las proteínas estructurales VP4 y VP7, que son designadas como P y G, respectivamente. Los genes que codifican estas proteínas comúnmente sufren rearreglos genómicos, expresándose distintos serotipos (Li y Gorziglia, 1993; Parwani et al., 1993; Rosen et al., 1994).

Estudios epidemiológicos en humanos han permitido establecer la relación entre cepas de rotavirus con electroferotipos cortos y supercortos con el subgrupo I, mientras que las cepas con electroferotipo largo se asocian con el subgrupo II. También han sido asociados con el serotipo y se ha encontrado que las cepas de rotavirus con serotipos G1, G3 y G4, presentan un patrón largo y con el serotipo G2, un patrón corto (Ciarlet y Liprandi, 1994; Green et al., 1989). No obstante, existen técnicas más específicas para determinar el subgrupo y serotipo de una cepa viral, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridización y los anticuerpos monoclonales (Gouvea et al., 1994).

La coexistencia de cepas de rotavirus con electroferotipos diferentes en una explotación porcícola convencional revela una gran variabilidad genómica y en estudios de epidemiología molecular se ha asociado con factores tales como el clima, la temperatura, el área geográfica y la edad del lechón (Puerto et al.,1994).

En este estudio se describen las variaciones genómicas entre los perfiles electroforéticos de rotavirus que afectan a los lechones con diarrea, en diferentes granjas porcícolas ubicadas en distintas zonas geográficas del país.

MATERIALES Y METODOS

En nueve granjas porcícolas de Antioquia, Cundinamarca, Tolima y Santander se tomaron 204 muestras fecales de lechones con diarrea y de dos a seis semanas de edad, durante un período de siete meses (mayo de 1994 a noviembre de 1994). Las muestras fueron almacenadas a -20°C, hasta su procesamiento. (Tabla 1).

TABLA 1
Muestras fecales de lechones diarreicos por granja y por departamento

Sitios de muestreo		
Departamentos	**No. de granjas**	**Muestras fecales**
Antioquia	1	8
	2	26
Cundinamarca	3	27
	4	84
	5	14
	6	6
Tolima	7	23
	8	4
Santander	9	12
	Total	204

Cepas de Referencia

Se utilizaron dos cepas de referencia: la cepa de rotavirus bovino tipo Compton obtenida del Laboratorio Central Veterinario de Weybridge, Inglaterra y la cepa de origen porcino tipo Bohl's, obtenida del Laboratorio Central

Veterinario AMES Iowa, USA. Las dos cepas fueron cultivadas en la línea celular MA-104, obtenida en el departamento de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS), de la ciudad de Santafé de Bogotá.

Para infectar la monocapa celular, se preparó el inóculo con una dilución cuyo contenido era de 20 µg/ml (9.7 ml MEM-Eagle más 0.3 ml de tripsina 634 µg/ml); se enfrentó 1 ml de esta dilución con 1 ml del virus y se incubó durante 30 min. a 37°C en baño de María. Posteriormente se adicionó el inóculo a la monocapa celular y se incubó por 1 hora a 37°C; pasado este tiempo se descartó el inóculo y se adicionaron 10 ml de medio MEM-Eagle suplementado con hepes al 1%, L-Glutamina 2%, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml), y nuevamente se llevó a 37°C.

El efecto citopático consistió en oscurecimiento y agrupamiento de las membranas celulares que tomaron forma redondeada; luego sobrevino desprendimiento celular y por último, lisis celular. Los cultivos se congelaron y descongelaron tres veces para lisar las células y liberar los virus; después se centrifugó a 2.500 g durante 15 min y el sobrenadante fue fraccionado en cantidades de 1 ml y congelado a -70°C.

Extracción del ARN Viral

Se empleó el protocolo utilizado por Chomezynski y Sacchi (1987), con algunas modificaciones. Inicialmente, se homogeneizaron 2 gm de materia fecal con 1 ml de solución denaturante (25 g de tiocianato de guanidina, citrato de sodio 25 mM pH 7.0, sarcosyl 0.5%, 2 mercaptoethanol 0.1M). Posteriormente se adicionaron 0.5 ml de cloruro de litio 1M; EDTA 20 mM, pH 7.8 y se agitó en vortex durante 20 seg. Después se agregaron 1.5 ml. de una mezcla de fenol-cloroformo-isoamil (24:24:1); nuevamente se agitó en vortex por 20 seg y la suspensión final fue puesta en hielo por 15 min; en seguida se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 4°C; después, la fase acuosa que contenía el ARN fue transferida a otro tubo corex y se mezcló con 1 ml de isopropanol a -20°C por 1 hora, y para precipitar el ARN, se centrifugó a 10.000 g por 20 min. El sobrenadante se descartó y el pellet fue disuelto en 0.5 ml de solución denaturante, el cual se transfirió a un tubo eppendorf con un volumento de isopropanol y se conservó a -20°C, durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 g por 15 min a 4°C; se descartó el sobrenadante en forma brusca y el pellet se suspendió con etanol de 75%. Finalmente se secó a 37°C y se disolvió en 50 µl de agua destilada con DEPC (dietil pirocarbonato).

Análisis Electroforético

El genoma viral fue evaluado por electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando el sistema discontinuo de Leammli (1970), en condiciones no desnaturalizantes, libre de SDS. Se utilizó un gel de concentración de 5% de poliacrilamida y uno de resolución de 8% de poliacrilamida. El buffer de corrido consistió en Tris 0.025M, glicina 0.192M, pH. 8.3. La electroforesis fue realizada a 120 V constantes durante 14 horas en una cámara Hoefer, modelo S-161.

El gel fue teñido con nitrato de plata, utilizando el protocolo descrito por Caetano y Gresshoff (1993). Inicialmente se fijó con ácido acético al 7.5% por 30 min; luego se realizaron tres lavados de dos min cada uno con agua desionizada; después se colocó una solución de plata (1.5g/l Ag NO3, 0.056% formaldehído) durante 45 min.; nuevamente se lavó el gel con agua desionizada por 30 seg e inmediatamente fue adicionada la solución reveladora (30g/l NaCO3, 0.056% formaldehído, 400µg/l tiosulfato de sodio) a 8°C. Cuando se obtuvo la imagen deseada, se descartó el revelador y la reacción fue detenida con ácido acético al 7.5% a 4°C por cinco seg. La imagen de los geles fue fotografiada con una película Kodak-color de asa 400.

RESULTADOS

De las 204 muestras examinadas por electroforesis solamente 33 fueron identificadas como positivas al ARN genómico de rotavirus. Inicialmente los electroferotipos fueron analizados por cada granja y luego se compararon con el fin de establecer diferencias o similitudes. Finalmente se agruparon en siete electroferotipos diferentes, de los cuales uno de ellos mostró un perfil compatible con el patrón de migración de un rotavirus atípico (Grupo B). Los otros electroferotipos presentaron una migración compatible con rotavirus del grupo A. Además, tomando como base la movilidad de los segmentos 10 y 11, se clasificaron como dentro del patrón corto.

Las cepas de referencia presentaron electroferotipos característicos. La cepa Compton de origen bovino mostró una movilidad diferente en los fragmentos de ARN de la región I; migraron conjuntamente los tres últimos y los fragmentos 7,8 y 9, región III, se desplazaron con velocidad similar, observándose una sola banda para este grupo (Figura 1, carril 1). El electroferotipo de la cepa Bohl's de origen porcino se caracterizó por presentar tres segmentos en la región I, y el segmento 8 de la región III se ubicó más cerca del segmento nueve que del siete (Figura 1, carril 2).

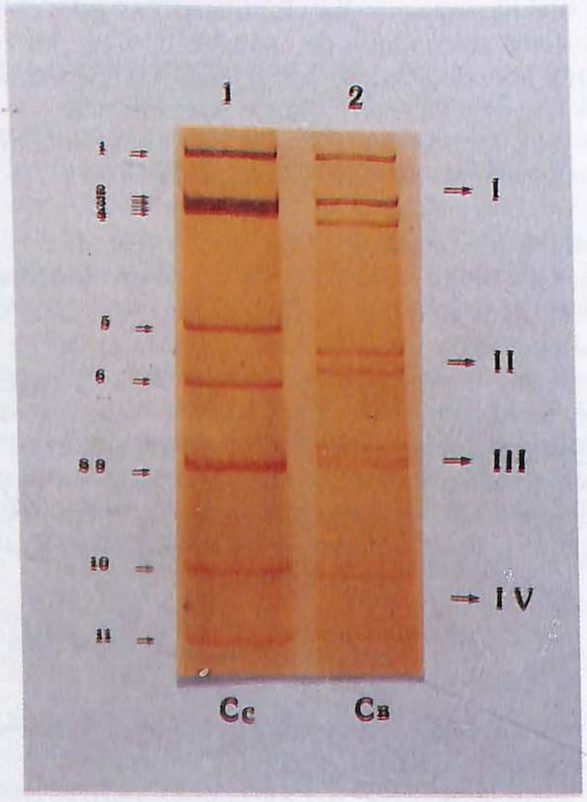

FIGURA 1. Perfiles genómicos presentados por las cepas de referencia de rotavirus bovinos tipo Compton (Cc) y porcino tipo Bohl's (Cb), carriles 1 y 2, respectivamente. Nótense las diferencias en la migración de los segmentos de ARN en cada una de ellas.

El electroferotipo S1 se caracterizó por presentar los segmentos del grupo 1 en tres bandas; además, la movilidad de los segmentos del grupo III se efectuó en forma de dupleta. Este patrón electroforético sólo se logró determinar en la región de Antioquia (Figura 2, carriles 3, y 4); el electroferotipo S2, cuyos segmentos 7,8 y 9 migraron en un solo segmento, se encontró en Cundinamarca (granja 1) y Santander (granja 9) (Figura 2 ,carril 5). Estos dos perfiles se compararon con las cepas de referenci y el patrón S1 resultó similar al presentado por la cepa Bohl's, pero ambos mostraron mayores diferencias con el electroferotipo de la cepa Compton.

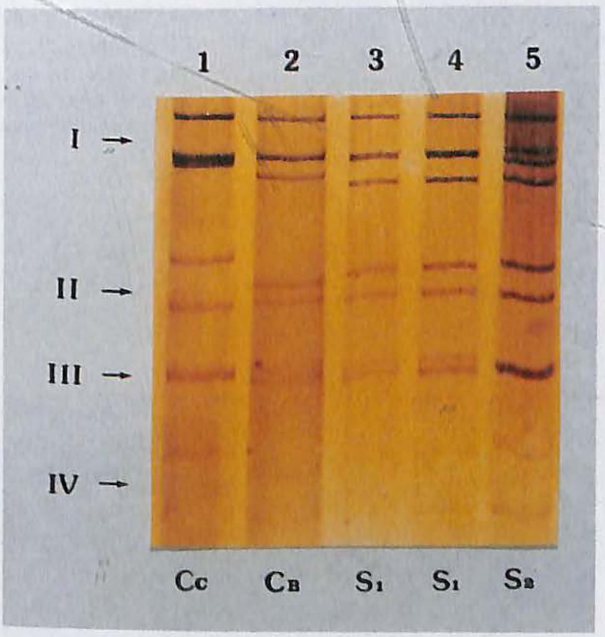

FIGURA 2. Comparación entre los electroferotipos de las cepas de rotavirus aisladas de dos granjas del departamento de Antioquia; carriles 3 y 4, patrón S1; carril 5, patrón S2, presentado por las granjas 1 y 9; carriles 1 y 2, cepas de referencia Compton y Bohl's (Cc, Cb), respectivamente. Obsérvense las diferencias de los electroferotipos entre las cepas de campo y las de referencia.

En la granja 4 se encontró un electroferotipo compatible con el de una cepa de rotavirus atípica (Grupo B), pero mostró variaciones en el grupo I, en el cual sólo se observaron tres bandas y en el grupo II, una (Figura 3, carril 2). En esta misma granja se presentó el patrón S4 que se caracterizó por una movilidad en tripleta en la región III, en donde el segmento ocho migró más lentamente, ubicándose más cerca del segmento siete que del nueve (Figura 3, carril 3).

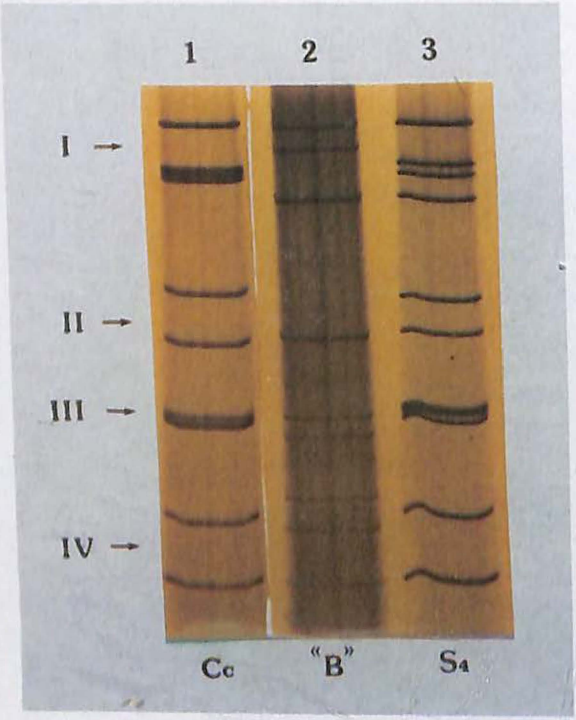

FIGURA 3. Comparación entre los electroferotipos encontrados en la granja 4; carril 2, electroferotipo presentado por una cepa atípica (Grupo B); carril 3, electroferotipo S4; carril 1, cepa de referencia Compton (Cc). Obsérvense las diferencias de los perfiles electroforéticos entre las cepas de campo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

El electroferotipo S5 se caracterizó por la migración más rápida del segmento ocho del grupo III, quedando más cerca del segmento nueve que del segmento siete; este perfil lo presentaron la granja 3 (Cundinamarca) y la granja 9 (Santander) (Figura 4, carriles 3,4 y 5).

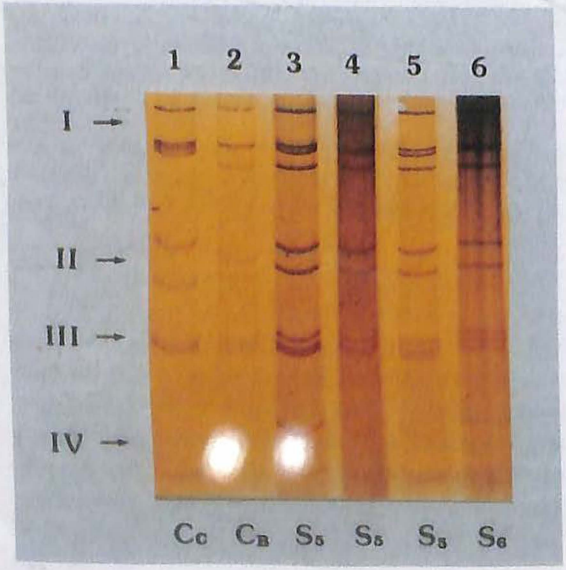

FIGURA 4. Comparación entre los electroferotipos de las cepas de rotavirus de las granjas 3 y 9; carriles 3, 4 y 5, patrón S5; carril 6, patrón S6, granjas 3 y 6; carriles 1 y 2, cepas de referencia Compton y Bohl's (Cc Cb), respectivamente. Nótense las diferencias de los electroferotipos entre las cepas de campo y las cepas de referencia.

El perfil denominado S6 se encontró en las granjas 3 y 6 (Cundinamarca), en el cual los fragmentos que conforman el grupo III tuvieron un desplazamiento equidistante (Figura 4, carril 6), el electroferotipo S7, cuyos segmentos del grupo III se desplazaron en forma de dupleta, se halló en la granja 5 (Cundinamarca) y en la granja 7 (Tolima). (Figura 5, carril 1).

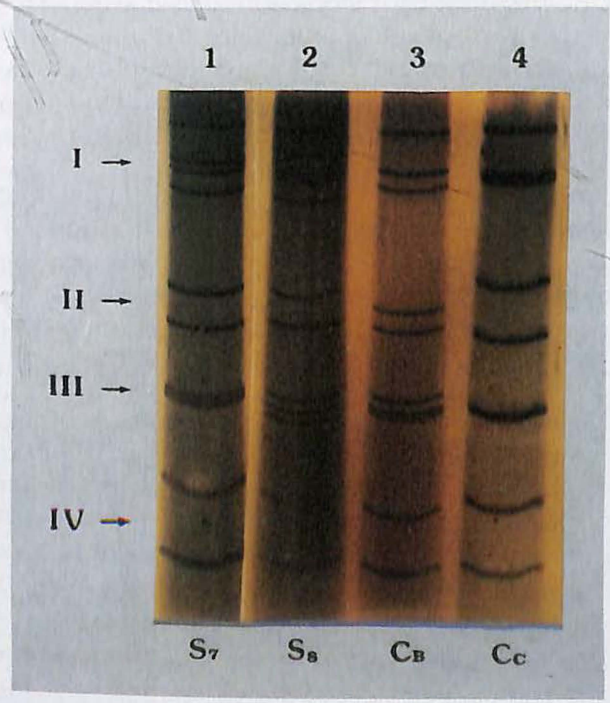

FIGURA 5. Comparación de los electroferotipos de cepas de rotavirus, aisladas en las granjas 5 y 7; carril 1, patrón S7; carril 2, patrón S8 idéntico al patrón S6; carriles 3 y 4, cepas de referencia Bohl's y Compton (Cb Cc), respectivamente. Obsérvense las diferencias de los electroferotipos entre las cepas de campo y las de referencia.

DISCUSION

El presente estudio reveló la presencia de seis electroferotipos distintos pertenecientes al rotativurs del grupo A y uno con la característica de migración del grupo B (atípico). Estos electroferotipos se obtuvieron del análisis del genoma de 33 cepas virales detectadas (16.1%) en 204 muestras fecales de lechones, entre 2 y 6 semanas de edad con sintomatología diarreica.

La electroforesis del genoma de cepas de rotavirus, obtenidas de heces de lechones, permitió reconocer un polimorfismo genético en los rotavirus presentes en las granjas porcícolas investigadas, puesto que se detectaron diferencias en la movilidad de los fragmentos genómicos del ARN entre las cepas virales examinadas.

Numerosos investigadores han demostrado la bondad del análisis del genoma viral mediante esta 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 (Hasegawa et al., 1984; Janke et al., 1990).

En general, los electroferotipos de las cepas de rotavirus de campo estudiadas presentaron diferencias con la cepa de referencia Bohl's, aunque el patrón S1, exclusivo de la región de Antioquia, resultó similar. Con respecto a la cepa de referencia Compton, se observaron mayores diferencias que las establecidas con la cepa anterior; no obstante, debe aclararse que este comportamiento se debe a su origen diferente (bovino).

De acuerdo con resultados obtenidos en este estudio y con algunos reportes de la literarura (Masendeyez et al., 1994; Nagesha et al., 1989), posiblemente se podría sugerir que las cepas de rotavirus analizadas pertenecen al subgrupo I y al serotipo G2, ya que los electroferotipos mostraron ser de patrón corto. La electroferotipificación de cepas de rotavirus es muy útil para complementar estudios epidemiológicos de serotipificación, al permitir inferir el serotipo de aquellas cepas no serotipificables mediante técnicas específicas por carecer de la cápside externa viral (López et al., 1993).

Así mismo, este estudio permitió establecer que el 97% de las cepas asociadas con infecciones en lechones menores de seis semanas de edad, dichas infecciones habían sido causadas por rotavirus del grupo A; solamente el 3% fueron ocasionadas por atípicos del grupo B. En contraste, Janke et al. (1990), en su estudio para evaluar la prevalencia de rotavirus típicos y atípicos en lechones con diarrea, en una granja porcícola convencional, encontraron rotavirus del grupo A en lechones lactantes y rotavirus de los grupos B y C en cerdos destetos de cinco semanas de edad. Se concluye que la presencia de rotavirus atípicos es tan común como la de los rotavirus típicos, siendo los atípicos una causa frecuente de diarrea en lechones destetos.

Diferentes estudios epidemiológicos han establecido que las infecciones por rotavirus en porcinos, dentro de las piaras, son de carácter endémico y por lo general están asociadas a una sola cepa viral, predominante en la granja

(Puerto et al., 1994; Fitjman et al., 1987). Sin embargo, en este trabajo se estableció que, aunque hubo tres electroferotipos (patrones S1, S4 y B) exclusivos para dos granjas, simultáneamente se pudo determinar la presencia de otras cepas virales en las mismas.

Los otros electroferotipos detectados, (patrones S2, S5, S6 y S7), fueron compartidos por algunas de las granjas, lo cual indica la presencia 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 las cepas de una región a otra mediante la movilización de animales adultos, los cuales son la fuente de infección para los lechones (González et al., 1992).

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 tomadas durante un período de siete meses (mayo a noviembre de 1994), época en la cual hubo períodos secos y lluviosos, y el virus fue detectado durante todo el período de estudio. Hallazgos similares han reportado Utrera et al. (1984), quienes en un estudio realizado durante un año en Venezuela determinaron la presencia de cepas virales con electroferotipos diferentes a lo largo del análisis. Estos investigadores atribuyen el 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 favorecen la diseminación del virus, facilitando así la infección en lechones susceptibles. Finalmente, la existencia de diferentes cepas de rotavirus en la población porcina colombiana dificulta el diagnóstico y el control de la infección.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **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. J. Am. Vet. Med. Ass. 172: 458-462.

2. **Caetano, C.A.; Gresshoff, P.M.** 1993. Staining nucleic acids with silver and alternative to radioisotipic and fluorescent labeling. Promega Notes. 45: 13-18.

3. **Ciarlet, M.; Liprandi, F.** 1994. Serological and genomic characterization of two porcine rotaviruses with serotype G1-specificity. J. Clin. Microbiol. 32: 269-272.

4. **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.

5. **Chomezynski, P.; Sacchi, N.** 1987. Single-step method of ARN isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159.

6. **Dyall-Smith, M.L.; Holmes, I.H.** 1981. Gene-coding assignements of rotavirus double standed RNA segments 10 and 11. J. Virol. 38: 1099-1103.

7. **Estes, M.K.; Graham, D.Y.; Dimitrov, D.M.** 1984. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. Prog. Med. Virol. 29: 1-22.

8. **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.

9. **Fitjman, N. L.; Barrandeguy, M. E.; Cornaglia, Em.M.; Schudel, A.A.** 1987. Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. Ach. Virol. 96: 275-281.

10. **González, G.; Torres, M.; Mogollón, J.D.; Gómez, A.** 1992. Características del rotavirus porcino aislado en Colombia. Informe Veterinario CE \. pp. 1-7.

11. **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.

12. **Green, K.Y.; Hoshino, Y.; Ikegami, N.** 1989. Sequence analysis of the gene encoding the serotype-specific glyucoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. Virology. 168: 429-433.

13. **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.

14. **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.

15. **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.

16. **Kaminjolo, J. S.; Adesiyun, A.A.** 1994. Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. Br. Vet. J. 150: 293-299.

17. **Leammli, U.K.** 1970. Cleave of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

18. **Li, B.; Gorziglia, M.** 1993. VP4 serotype of the Gottfried strains of porcine rotavirus. J. Clin. Microbiol. 31: 3075-3077.

19. **López, S.; Padilla, L.; Arias, S.F.Z.** 1993. Correlación entre serotipo y electroferotipo de rotavirus aislados en dos poblaciones humanas de México. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 50: 736-740.

20. **Masendeyez, P.J.; Unicomb, L.E.; Kirkwood, C.D.; Bishop, R.F.** 1994. Rotavirus serotypes causing severe acute diarrhea in joung children in six Australian cities, 1989 to 1992. J. Clin. Microbiol. 32: 2315-2317.

21. **Nagesha, H.S.; Brown, L.E.; Holmes, I.H.** 1989. Neutralizing monoclonal antibodies against three serotypes of porcine rotavirus. J. Virol. 63: 3545-3549.

22. **Parwani, W.V.; Hussein, H.A.; Rosen, B.I.; Luchelli, 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.

23. **Pedley, S.; Bridger, J.C.; Mccrae, M.A.** 1983. Molecular analysis of rotavirus isolates that lack the group antigens. Science. 23: 157-163.

24. **Pocock, D.H.** 1987. Characterization of rotavirus isolates from sub-clinically infected calves by genome profile analysis. Vet. Microbiol. 13: 27-34.

25. **Puerto, M.; Puerto, F.I.; Polanco, G.G.; González, M.R.; Alvarez, M.; Rodríguez, J.C.** 1994. Detección de rotavirus en lechones lactantes de granjas localizadas en el estado de Yucatán. Vet. Mex. 25: 69-71.

26. **Rosen, B.I.; Parwani, A.V.; López, S.; Flórez, I.; 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.

27. **Theil, K.; Saif, L.J.; Moorhead, P.D.; Whitmoyer, R.W.** 1985. Porcine rotavirus like virus (group B rotavirus): Characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. J. Clin. Microbiol. 21: 340-345.

28. **Todd, D.; Mcnully, 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.

29. **Tsunemitsu, H.; Saif, L.J.; Jiang, D.; Shimizu, M.; Hiro, M.; Yanaguchi, 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.

30 **Utrera, V.; Mazzali De Ilja, R.; Gorziglia, M.; Esparza, J.** 1984. Epidemiological aspects of porcine rotavirus infection in Venezuela. Res. Vet. Sci. 36: 310-315.