

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES
MAESTRIA EN ENFERMEDADES TROPICALES



**DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE ROTAVIRUS BOVINO Y PORCINO EN
COSTA RICA**

José Luis Bonilla Espinoza

Heredia, Octubre del 2007

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales para optar al grado de *Magíster Scientiae* en Enfermedades Tropicales

DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE ROTAVIRUS BOVINO Y PORCINO EN COSTA RICA

José Luis Bonilla Espinoza

Tesis presentada para optar al grado de Magíster Scientiae en Enfermedades Tropicales cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.

Miembros del Tribunal Examinador

Margarita Silva, Presidenta SEPUNA

Sandra Estrada König, M.Sc
Coordinadora PCVET

Carlos Jiménez Sánchez, PhD
Tutor

Luis Nazario Araya, PhD
Lector

Gaby Dolz Wiedner, PhD
Lectora

José Luis Bonilla Espinoza
Sustentante

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios Padre TODOPODEROSO, por haberme concedido sabiduría, paciencia y fortaleza necesaria todo este tiempo para poder culminar mis estudios.

A mis Padres y hermanos, por brindarme su apoyo incondicional en todo el transcurso de mis estudios, demostrándome siempre que somos una unidad familiar.

Al Dr. Carlos Jiménez, por haber confiado en mi persona y llevar a cabo esta investigación que ha sido muy enriquecedora en mi carrera.

Al Dr. Luis Nazario, por concederme parte de su tiempo para ayudarme en las correcciones del trabajo.

A la Dra. Gaby Dolz, por colaborar con la cámara de electroforesis para realizar las pruebas y ayudarme en las correcciones del trabajo.

A la Dra. Lurys Bourdett, por su amistad y por haber dedicado parte de su tiempo para brindarme aportes importantes en ésta investigación.

A Lizbeth Ramírez, por su amistad incondicional y por haberme ayudado en la recolección de las muestras, lo cual representó una parte importante de la investigación.

Al Señor Rodolfo Pereira, por haberme brindado parte de su tiempo para realizar las giras de campo, parte esencial de la investigación.

Al Programa de Intercambio Académico Alemán, DAAD, por haberme dado la oportunidad de realizar ésta Maestría, que de lo contrario no hubiese sido posible ampliar mis conocimientos, logrando alcanzar una visión más amplia en el ámbito profesional y laboral.

DEDICATORIA

A Dios, por que me ha prestado vida y me ha permitido alcanzar mis metas propuestas.

A mi Abuelo, que en paz descanse, quien hizo de mi una persona de trabajo, de visión, inculcándome el valor de las cosas y de cómo poder alcanzarlas.

A mi Familia, quienes me brindan su apoyo incondicional, deseándome siempre éxitos para lograr mis objetivos sin mirar atrás.

ÍNDICE (DE CONTENIDOS)

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE (CONTENIDOS)	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Etiología	1
1.2. Rotavirus en terneros y lechones diarreicos	3
1.3. Diagnóstico	5
1.4. Control y prevención	6
1.5. Antecedentes de rotavirus bovino y porcino grupo A en Centroamérica	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. Tipo de estudio	10
2.2. Población y tamaño de muestra	10
2.3. Recolección y envío de muestras	11
2.4. Determinación del grupo A de Rotavirus mediante inmunocromatografía	11
2.5. Electroforesis del ARN de rotavirus en gel de poliacrilamida	11
2.6. Genotipificación de rotavirus grupo A mediante RT-PCR	12
2.6.1. La extracción del ARN	12
2.6.2. Desnaturalización y reversotranscripción	13
2.6.3. Amplificación del gen "G" (VP7) y "P" (VP4)	13
2.6.4. Genotipificación por reacción en cadena de la polimerasa anidado (nested-PCR)	14
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSIÓN	22
5. CONCLUSIONES	26
6. RECOMENDACIONES	27
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tamaño de muestra necesario de recolectar dentro de cada finca/granja para detectar animales con rotavirus (prevalencia 7% y nivel de confianza 99%).	10
Cuadro 2. Cebadores utilizados para la genotipificación G y P de rotavirus bovino y porcino grupo A.	15
Cuadro 3. Frecuencia de genotipos G y P en 25 y 17 cepas de rotavirus bovino identificados en fincas lecheras de Costa Rica en el 2006-2007, respectivamente.	17
Cuadro 4. Combinaciones de genotipos G y P observados en 16 aislamientos de rotavirus bovino en Costa Rica en el 2006-2007.	19
Cuadro 5. Modelos electroforéticos asociados a las distintas combinaciones de genotipos G y P de rotavirus bovino grupo A.	19
Cuadro 6. Distribución de los genotipos G y P de rotavirus bovino grupo A en las 17 fincas lecheras muestreadas en el año 2006-2007.	20

ÍDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Electroferotipos cortos y largos de rotavirus bovino grupo A determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida. A. Electroferotipo corto; B. Electroferotipo largo. 16
- Figura 2. Productos del RT-PCR multiplex. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones 274 bp, 500 bp y 714 bp de genotipos G de rotavirus bovino grupo A identificados en Costa Rica. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals); 5 y 6: genotipo G8; 7, 8 y 9: genotipo G10; 10: genotipo G6. 18
- Figura 3. Productos del RT-PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones 314 bp, 502 bp y 622 bp de genotipos P de rotavirus bovino grupo A identificados en Costa Rica. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals); 1, 2, 3, 8, 9, 14 y 15 genotipo P11; 10 y 12: infecciones mixtas P11 y P7; 11: genotipo P7; 13: genotipo P1. 18
- Figura 4. Genotipificación RT-PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando un amplicón de 780 bp de genotipos G de rotavirus porcino grupo A identificados en Costa Rica. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals); CP: controles positivos; 7 y 8: genotipo G5. 21
- Figura 5. Productos de RT-PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones 279 bp, 502 bp y 622 bp de genotipos P de rotavirus porcino grupo A identificados en Costa Rica. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals); CP: control positivo; 1, 3: infecciones mixtas de genotipos P6 y P7; 4: infecciones mixtas de genotipos P6 y P1; 2, 5, 6 y 10 genotipo P6. 21

RESUMEN

Treinta y ocho muestras fecales de bovinos con diarrea neonatal, positivas a rotavirus grupo A por inmunocromatografía y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) fueron analizadas mediante reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa múltiple anidada/ (nested multiplex/RT-PCR) para la identificación de genotipos G y P. Las muestras fueron colectadas en 17 fincas lecheras localizadas en Río Cuarto de Grecia, Pital, Poás, Zarcero, Sucre y Pacayas.

La genotipificación completa fue posible en 28 (74%) de 38 muestras fecales. En las muestras de origen bovino, el gen P pudo ser identificado en 17 (61%) muestras; mientras que el gen G fue identificado en 25 (89%) muestras. De las veintiocho muestras caracterizadas, 10 (40%) correspondieron al genotipo G10, 8 (32%) a G6 y 7 (28%) a G8, las cuales son cepas comúnmente encontradas en bovinos; mientras que en lo que respecta a los grupos P, 10 (58%) muestras correspondieron a P[11], 2 (12%) a P[1], y 1 (6%) a P[7]. Las infecciones mixtas se presentaron en el grupo P, en 4 (24%) muestras, correspondiendo a P[11]+P[1] con 2(12%) y P[11]+P[7] con 2(12%) de las muestras. Entre las combinaciones de los genotipos G y P se obtuvieron, 4 (26%) correspondientes a G8P[11], 4 (24%) a G6P[11], 3 (19%) a G8P[7], 2 (12%) a G10P[1], 3 (19%) a G10P[11], y 1 (6%) a G8P[1].

En las muestras de origen porcino 7 muestras fueron positivas por PCR de muestras colectadas en 5 granjas porcinas en Río Cuarto de Grecia. El gen P pudo ser identificado en 7 (14%) muestras; mientras que el gen G fue identificado únicamente en 2 (4%) muestras, los cuales correspondieron al genotipo G5, cepas comúnmente encontradas en porcinos; mientras que en los grupos P, 4 (57%) muestras correspondieron a P[6] y 3 (43%) correspondieron a infecciones mixtas encontrándose 1 muestra perteneciente a P[6]+P[1] y 2 muestras correspondientes a P[6]+P[7]. Entre las combinaciones de los genotipos G y P se obtuvieron 2 (28.6%) muestras correspondientes a G5P[6] y G5P[6]+P[1], siendo

esta última una combinación con una infección mixta junto con una cepa inusual como es P[1].

Esta investigación reporta por primera vez en Centroamérica la caracterización molecular de cepas de rotavirus asociadas a diarrea neonatal en terneros y porcinos.

Palabras claves: Diarrea, terneros, lechones, rotavirus, genotipos, RT-PCR.

ABSTRACT

Thirty-eight fecal samples from calves with neonatal diarrhea and positive for group A rotavirus by immunocromatography and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were analyzed by a nested multiplex reverse transcription/polymerase chain reaction (nested multiplex/RT-PCR) for identification of P and G genotypes.

Samples were collected from seventeen dairy cattle herds located in Río Cuarto de Grecia, Pital, Poas, Zarcero, Sucre and Pacayas. Complete genotyping was possible in 28 (74%) from 38 fecal samples. P gene could be identified in 17 (61%) of the samples. While the G gene was identified in 25 (89%) of samples. Of the twenty-eight characterized samples 10 (40%) corresponded to G 10, 8 (32%) to G6 and 7 (28%) to G8 genotypes, which are strains commonly found in cattle. Among the P genotypes 10 (58%) samples corresponded to P[11], 2 (12%) to P[1] and 1 (6%) to P[7]. Mixed infections were detected in the P genotype in 4 (24%) samples, 2 (12%) corresponding to P[11]+P[1] and 2 (12%) to P[11]+P[7]. Among the combinations of G and P genotypes found were 4 (26%) samples G8P[11], 4 (24%) samples G6P[11], 3 (19%) samples G8P[7], 2 (12%) samples G10P[1], 3 (19%) samples G10P[6] and 1 (6%) sample G8P[1].

In samples of porcine origin seven samples were positive by PCR of samples collected in five porcine farms in Río Cuarto de Grecia. The P gene could be identified in 7 (14%) samples. The G gene where identified in 2 (4%) samples only and corresponded to the G5 genotype, these are strains commonly found in porcine. Among the P genotype 4 (57%) samples corresponded to P[6]. Mixed infections were detected in 3 (43%) samples corresponding 1 to P[6]+P[1] and 2 samples to P[6]+P[7]. The combinations of G and P genotypes found in 2 (28.6%) samples corresponded to G5P[6] and G5P[6]+P[1], being the last one a combination between a mixed infection and an unusual strain (P[1]).

This molecular characterization of rotavirus strains associated to neonatal diarrhea in calves and porcine represents the first report in Central America.

Key words: Diarrhea, calves, pig, rotavirus, genotypes, RT-PCR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Etiología

Las diarreas se caracterizan por una alteración en el ritmo habitual de las evacuaciones, con un aumento en el volumen o la frecuencia y disminución de la consistencia de las deposiciones, deshidratación progresiva, acidosis y en casos severos, muerte en pocos días (Parashar et al., 1998; Murphy et al., 1999; Polanco et al., 2004).

En 1973, Bishop y colegas observaron por microscopía electrónica, en el epitelio duodenal de niños con diarrea, un virus llamado posteriormente *Rotavirus*, del Latín *rota* = rueda, debido a la apariencia de éste (Parashar et al., 1998; Murphy et al., 1999; Polanco et al., 2004).

Los Rotavirus conforman un género dentro de la familia *Reoviridae*. Los viriones miden aproximadamente 70 nm de diámetro, carecen de envoltura lipídica, y están compuestos de una triple cápside proteica, de simetría icosaédrica, que a su vez contiene una ARN polimerasa y el genoma viral (Parashar et al., 1998; Murphy et al., 1999; Polanco et al., 2004).

El genoma viral está compuesto por 11 segmentos de ARN doble cadena, cada uno codifica una proteína viral, de las cuales, seis son estructurales (VP) y cinco no estructurales (NS).

El ARN viral, acompañado de las proteínas VP1 y VP3, está envuelto por la cápside más interna o *core*, compuesta por la proteína VP2. Estas tres proteínas forman un complejo enzimático donde VP1 es la transcriptasa viral, VP2 posee la capacidad de unión al ARN, por lo que actuaría como proteína de empaquetamiento y VP3 posee actividad de guanidiltransferasa (Parashar et al., 1998).

La cápside media está constituida por unidades triméricas de la proteína estructural VP6. Esta proteína es altamente estable e inmunogénica, constituyendo el 50% de la masa total del virión y cumple un papel fundamental en la estabilidad estructural del mismo, dada su interacción con las proteínas de la cápside externa y el *core*. Los anticuerpos contra VP6 no poseen capacidad neutralizante *in vitro*, sin embargo, estudios realizados *in vivo* en ratones,

demuestran que IgA dirigida contra VP6 es capaz de neutralizar al virus en el ciclo viral (Parashar et al., 1998).

La superficie de la cápside externa de los rotavirus (RV) está formada por la glicoproteína VP7 y alrededor de 60 espículas constituidas por dímeros de la proteína VP4. La glicoproteína VP7 representa el 30% de la masa total del virión y constituye el principal antígeno neutralizante. La respuesta inmune contra VP7 en el huésped infectado se asocia con protección. La proteína VP4 constituye el 1,5% de la masa viral, presenta actividad de hemoaglutinina, incluye epitopos neutralizantes específicos y participa en la adsorción y penetración del virus a la célula. Durante la infección, esta proteína es cortada por enzimas proteolíticas presentes en el tracto gastrointestinal (pancreatina, tripsina), de modo que se generan dos péptidos estructurales VP5 y VP8. Se ha demostrado que este proceso aumenta la infectividad viral. Anticuerpos contra VP4 o VP8 neutralizan el virus *in vitro* y se ha observado que inducen inmunidad protectora en ratones, cerdos y bovinos (Clark et al., 1981; Liprandi et al. 1991).

Las partículas de rotavirus son altamente resistentes a la inactivación físico-química y permanecen estables dentro de un rango de pH 3 a 9; no se disuelven en solventes lipídicos (fluorocarbonos, éter, cloroformo, etc.) y conservan su infecciosidad durante meses en ambientes húmedos, temperaturas entre los 4 y 20 °C y en presencia de iones Ca^{2+} , que estabilizan la cápside externa. El virus sólo puede ser inactivado con compuestos fenólicos, sales de amonio cuaternario, formalina al 0,5% y betapropiolactona al 10% (Parashar et al., 1998; Murphy et al., 1999; Polanco et al., 2004).

Los rotavirus se clasifican en grupos, según la variación de un antígeno común presente en la proteína VP6. Este antígeno, es detectado principalmente mediante técnicas inmunológicas como enzima inmunoensayos (ELISA) e inmunofluorescencia y es compartido por todos los rotavirus integrantes de un mismo grupo, independientemente de la especie de origen. Hasta el momento se han descrito 7 grupos diferentes (A, B, C, D, E, F, y G) (Parashar et al., 1998).

Los rotavirus grupo A se clasifican mediante un sistema binario, según la variación genética y antigénica de dos proteínas superficiales (VP7 y VP4). Las

variantes de VP7 se denominan tipos G (Glicoproteína), y las de VP4 tipos P (Proteasa sensible). Hasta el momento se han reportado 14 tipos G y al menos 20 tipos P de rotavirus grupo A circulantes en humanos y animales (Parashar et al., 1998; Ramachandran et al., 1998; Murphy et al., 1999; Chang et al., 1999; Linhares and Bresee, 2000; Polanco et al., 2004). En este contexto se han descrito 10 tipos G y 9 tipos P, que afectan las poblaciones animales ocasionando grandes pérdidas económicas para los productores, debido a gastos en vacunación, tratamiento, pérdida de peso de los animales afectados y mortalidad.

1.2. Rotavirus en terneros y lechones.

La diarrea neonatal es una enfermedad multifactorial compleja que afecta a varias especies de animales domésticos. Su etiología es muy diversa y para su manifestación existen diversos factores predisponentes como el estado nutricional e inmune del huésped y las condiciones ecológicas del establecimiento, entre otros (Reinhardt et al., 1986). Otros factores de riesgo que contribuyen a la aparición de la enfermedad son: fallas en la transferencia de la inmunidad pasiva, especialmente observados en vaquillas; presencia de diarrea en temporadas previas (endemicidad); concentración de animales sobretodo de cerdos en las pariciones, que conlleva a una alta densidad de animales susceptibles en determinada época del año y genera una estacionalidad de las diarreas; falta de higiene en los sistemas de crianza artificial; fallas de manejo y presencia de partos distócicos, acarreado pérdidas económicas para los productores, debido a gastos de vacunación, tratamiento, pérdida de peso de los animales afectados y mortalidad (Liprandi et al. 1991; Teodoroff et al., 2005; Martella et al., 2005). Dentro de los agentes productores de diarrea, rotavirus es considerado el principal agente etiológico en animales jóvenes y niños en todo el mundo (Bern and Glass, 1994).

El Rotavirus bovino grupo A fue identificado, caracterizado y confirmado como agente causal de diarreas en terneros por primera vez por Mebus y col. en 1969 y actualmente se le considera el principal agente patógeno productor de diarreas en terneros menores de un mes de vida en todo el mundo. Dentro de los

rotavirus grupo A que circulan en bovinos se han reportado los tipos G1, G2, G3, G6, G8, G10, G11 y los tipos P[1], P[5] y P[11], siendo las cepas UK o IND (P[5]G6), NCDV-Lincoln (P[1]G6), y B223 (G10P[11]) los tipos predominantes a nivel mundial seguido por P[1]G8 que ha sido reportado recientemente en Europa y Japón (Clark et al., 1981; Nagesha et al., 1989; Liprandi et al. 1991; Falcone et al., 1999; O'Halloran et al., 2000; Dewey et al., 2003; Glass et al., 2006).

Se ha reportado la circulación de rotavirus grupo B y C en bovinos de Japón y Estados Unidos. Rotavirus grupo B ha sido detectado en terneros y esporádicamente asociado con diarrea neonatal, pero se encuentra especialmente involucrado en brotes de diarrea epizootica en ganado adulto. El rotavirus grupo C fue aislado por primera vez en un caso de diarrea en bovinos adultos en Japón (Clark et al., 1981; Liprandi et al. 1991; Falcone et al., 1999; Dewey et al., 2003).

En lo que respecta al Rotavirus porcino, las infecciones en granjas de suínos usualmente ocurren de manera enzoótica afectando a más del 60% de la población (Saif et al. 1994). La mayoría de las infecciones naturales por rotavirus porcino son subclínicas o asociadas con diarreas blandas. Sin embargo, muchas infecciones ocasionan una gastroenteritis que va de moderada a severa (Saif et al. 1994). El virus afecta a los animales entre la tercera y sexta semana de edad, con un período de incubación de uno a dos días, al cabo de los cuales se presenta pérdida del apetito, depresión y diarrea profusa, que puede prolongarse por tres a siete días. Los lechones muestran deshidratación severa y pueden presentar 30% de pérdida en el peso corporal y la mortalidad es usualmente de 10 por ciento (Hidalgo, 1995).

Los rotavirus porcinos se ubican en los grupos A, B y C, de acuerdo al antígeno grupo-específico de la cápside interna (Paul et al. 1993). Los rotavirus grupo A causan diarreas en cerdos antes y después del destete (Gatti et al. 1993), reportándose un 53% de diarrea en la etapa predestete y 44% en la etapa postdestete (Fitzgerald et al. 1998). Un reporte reciente atribuye un 89% de todas las diarreas por rotavirus en cerdos comerciales a rotavirus grupo A (Will et al. 1994).

Los principales tipos previamente identificados en cerdos son G3 (tipo CRW-8), G4 (tipo Gottfried), G5 (tipo OSU) y G11 (tipo YM). Los principales tipo P comunes en cerdos son P2[6] y P9[7]; sin embargo otros dos genotipos P porcinos P[14] (tipo MDR13) y P19 (tipo 4F) han sido reportados (Liprandi et al. 1991; Martella Vito et al., 2001; Dewey et al., 2003; Teodoroff et al., 2005; Martella et al., 2005).

1.3. Diagnóstico

Es importante la anamnesis, el cual nos permitirá valorar tanto las condiciones del hato como de la finca o granja en general, obteniendo información de la clínica y evolución de los individuos, sin embargo, se requerirá del diagnóstico laboratorial.

Los rotavirus pueden ser detectados en heces de individuos enfermos mediante microscopía electrónica e inmunomicroscopia electrónica. También, mediante pruebas inmunoenzimáticas como ELISA e inmunocromatografía o la aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos. Adicionalmente, los antígenos virales pueden ser detectados en tejido intestinal mediante la técnica de inmunofluorescencia (Parashar et al., 1998; Murphy et al., 1999; Polanco et al., 2004).

El aislamiento viral en cultivo de células puede resultar difícil; tedioso y caro, pero numerosos autores describen que la tripsina al ser incorporada al medio de cultivo (libre de suero) facilita la entrada del virus, pues permite el recorte proteolítico de la proteína de la cápside externa (VP4) y su posterior adhesión a la membrana plasmática. La mayoría de los rotavirus porcino, bovino y aviar no son citopáticos inicialmente; pero pueden serlo tras pasajes seriados en células epiteliales del intestino o células de riñón de mono (MA-104) (Dewey et al., 2003; Fodha et al., 2005; Glass et al., 2006).

Otras técnicas de diagnóstico de las infecciones por rotavirus incluyen la detección del genoma viral y la amplificación de algunos de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ARN genómico de los rotavirus puede ser fácilmente extraído de las partículas virales presentes en la materia

fecal, analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y visualizado por tinción argéntica. El patrón de migración de los segmentos de ARN en PAGE se denomina *electroferotipo*, el cual muestra una disposición 4, 2, 3, 2 de los segmentos de ARN en el gel, característico de los rotavirus grupo A, existiendo patrones cortos y largos. El patrón corto de migración está determinado por la movilidad del segmento de ARN 9, correspondiente al gen G (VP7). PAGE constituye una herramienta diagnóstica de rápida identificación de rotavirus, dado que son los únicos agentes virales conocidos con 11 segmentos de ARN que afectan a los mamíferos, y es una herramienta complementaria para su clasificación en grupos, dado que en general, cada grupo presenta una distribución de bandas característica (Liprandi et al. 1991; Hussein et al., 1993; Lee et al., 1998; Ramachandran et al., 1998; Murphy et al., 1999; Unicomb et al., 1999; Linhares and Bresee, 2000; Martella Vito et al., 2001; Bok et al., 2001; Fischer et al., 2002; Teodoroff et al., 2005; Martella et al., 2005).

Finalmente la técnica de PCR puede ser usada para amplificar el ARN viral extraído de las heces. El ARN es purificado y luego usado como un “template” para la reverso transcripción y amplificación por la polimerasa usando cebadores apropiados para el grado de especificidad deseado. Hoy en día la técnica de RT-PCR es utilizada como herramienta diagnóstica en la epidemiología molecular de rotavirus siendo la más aceptada por los investigadores en estudios dirigidos a explorar las frecuencias de los distintos genotipos de rotavirus del grupo A circulantes tanto en humanos como en animales (Eiden et al., 1991; Liprandi et al. 1991; Rosen et al., 1992; Hussein et al., 1993; Lee et al., 1998; Kim et al., 1999; Falcone et al., 1999; Winiarczyk and Gradzki, 1999; O’Halloran et al., 2000; Martella Vito et al., 2001; Bok et al., 2001; Palombo, 2002; Winiarczyk et al., 2002; Bacellar et al., 2004; Fernández et al., 2004; Fukai et al., 2004; Fodha et al., 2005; Martella et al., 2005).

Las pruebas de neutralización utilizando un anticuerpo policlonal apropiado pueden ser utilizadas para determinar el serotipo de rotavirus aislado (Rosen et al., 1992; Murphy et al., 1999; Falcone et al., 1999; Dewey et al., 2003; Fodha et al., 2005; Glass et al., 2006).

1.4. Control y prevención

Como en otras infecciones virales, no existe un tratamiento específico para las infecciones por rotavirus en bovinos y porcinos. En general se recomienda suspender la ingesta de leche durante 24-48 horas, situación que sólo es practicable en terneros alimentados artificialmente; pero no hay que dejar a un lado la importancia que tiene el consumo adecuado de calostro. Según el grado de deshidratación, se recomienda la administración de fluidos y electrolitos por vía oral en caso de diarrea leve o parenteral en diarreas severas. La aplicación de terapias de rehidratación oral ha resultado efectiva en el tratamiento de la enfermedad, probablemente por el correcto funcionamiento del transporte de glucosa asociado al sodio en zonas no infectadas del epitelio (Parreño, 2007).

Además se deben controlar los diversos factores que predisponen a la enfermedad, tales como: higiene ambiental, hacinamiento, mezcla de edades, etc., teniendo presente, que la ruta de transmisión es fecal-oral.

Teniendo en cuenta el impacto económico que genera esta enfermedad a nivel productivo, se han aplicado medidas de prevención y control basadas en dos estrategias de inmunización (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

La primera estrategia se basa en estimular la respuesta inmune activa en los terneros neonatos mediante el uso de vacunas vivas atenuadas administradas por vía oral en las primeras horas de vida. Esta estrategia resultó poco efectiva en cuanto a la respuesta inmune y protección conferida y a su vez es una herramienta poco práctica, especialmente en cuanto a su aplicación en las fincas ganaderas (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

La segunda estrategia, se basa en la utilización de vacunas inactivadas destinadas a potenciar la inmunidad pasiva a través de la inmunización de las madres en el último tercio de gestación. Si bien la implementación de programas de vacunación ha demostrado una disminución progresiva de la morbilidad en hatos endémicamente infectados, el grado de eficacia de esta estrategia es variable, influyendo otros factores como la vía de inmunización, la dosis, la

concentración del antígeno, el tipo de adyuvante utilizado y el proceso de inactivación, así como también, la implementación de adecuadas prácticas de manejo (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

En la actualidad se dispone de varias vacunas comerciales para la prevención de las diarreas neonatales en terneros, que presentan grados de eficacia variables. Estos inmunógenos contienen suspensiones de rotavirus bovino (RVB) inactivado por métodos químicos, correspondientes a los serotipos prevalentes P[5]G6; P[1]G6 y P[11]G10, emulsionados en adyuvantes oleosos y en general en forma de formulaciones polivalentes, acompañados de otros patógenos intestinales como *E. coli* y Coronavirus (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

Dado que rotavirus es considerado el principal agente causal de diarreas neonatales, no sólo en animales sino también en humanos, numerosos grupos de investigación dedican sus esfuerzos al desarrollo de nuevas estrategias de inmunización. Por ejemplo se ha investigado en roedores (ratones y/o conejos) el uso de vacunas de subunidades, utilizando genes o proteínas virales (VP6, VP7, VP4 y NSP4) obtenidas por expresión en sistemas recombinantes y plantas transgénicas (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

De todas estas estrategias, se ha investigado en bovinos únicamente el uso de vacunas de subunidades conteniendo la proteína VP8 y partículas virales sintéticas (VLP) homólogas y heterólogas. Se inmunizaron vacas gestantes por vía intramuscular con 2 dosis de vacuna oleosa formulada con la proteína VP8 recombinante de RVB obtenida por expresión en *E coli*, generando un incremento del título de anticuerpos neutralizantes contra RVB en calostro, similar al observado en vacas inmunizadas con una vacuna a virus completo inactivado. Adicionalmente, dada las características estructurales de este virus se logró la producción de partículas virales sintéticas (VLP) construidas a partir de baculovirus recombinantes, que expresan las proteínas virales de una cepa de rotavirus de simio (cepa heteróloga) o cepa de rotavirus bovino, las cuales fueron

administradas vía intramuscular o intramamaria resultando ser altamente inmunogénicas e induciendo mayores niveles de anticuerpo en suero, calostro y leche que una vacuna inactivada. Finalmente, terneros alimentados con leche suplementada con 1% de calostro de vacas vacunadas con VLP heterólogas fueron protegidos totalmente frente al desarrollo de diarrea luego del desafío oral con RVB (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

Un mejor conocimiento del desarrollo de la respuesta inmune frente a la infección por rotavirus en terneros, especialmente a nivel de mucosas y su modulación mediada por los anticuerpos adquiridos pasivamente, resulta muy importante para optimizar el desarrollo de nuevas estrategias de inmunización aplicadas al control y prevención de la rotavirus bovina (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006).

1.5. Rotavirus bovino y porcino grupo A en Centroamérica y el mundo.

Hasta el momento no existe reporte sobre las diferentes cepas de rotavirus involucradas en los procesos diarreicos que afectan a los animales domésticos a nivel de Centroamérica, específicamente en bovinos y porcinos. Sin embargo, en lo que respecta a infecciones por rotavirus en animales domésticos en Costa Rica, se ha documentado su presencia, asociada a diarrea neonatal en bovinos y porcinos. El primer aislamiento del agente se realizó a partir de heces de terneras enfermas con diarrea (Jiménez et al., 1993). Posteriormente, se logró aislar una cepa de rotavirus a partir de lechones afectados por diarrea (Jiménez et al., 1997) y finalmente se investigó, mediante un estudio de caso-control, el papel de varios agentes infecciosos, incluido rotavirus, en la presentación de la diarrea neonatal bovina en los cantones de Poás y Tilarán (Pérez et al., 1998).

A pesar de que en todos los casos se detectó rotavirus mediante el ensayo inmunoenzimático en papel de nitrocelulosa (Dot-ELISA) y se logró el aislamiento de varias cepas en línea celular de riñón de mono verde (MA-104), no se realizó hasta la fecha estudio alguno que permitiera conocer el patrón electroforético y genotipo de las cepas circulantes involucradas. Otro trabajo realizado por Cruz,

M., (2005) identificó animales domésticos (bovinos, porcinos y perro) positivos a rotavirus, pero tampoco logró caracterizar los genotipos involucrados.

Existen numerosos estudios de rotavirus en otros países (Argentina, Brasil, Irlanda y Japón), en los que se logró caracterizar los genotipos circulantes y que han demostrado la importancia en el estudio de la ecología molecular, ya que datos recientes reportan el potencial zoonótico de ciertas cepas de rotavirus encontradas en diferentes especies domésticas (Falcone et al., 1999; O'Halloran et al., 2000; Dewey et al., 2003; Glass et al., 2006).

En el presente estudio se pretendió Identificar y caracterizar los genotipos G y P de rotavirus bovino y porcino presentes en fincas lecheras especializadas y granjas porcinas de crianza intensiva de algunas localidades de Costa Rica, estableciendo además el patrón electroforético de ARN.

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de estudio

El tipo de estudio del presente trabajo fue observacional-descriptivo, se pretendió evidenciar la presencia o ausencia de rotavirus en bovinos y porcinos con problemas de diarrea en el primer mes de vida, además identificar los genotipos circulantes en algunas localidades de Costa Rica.

2.2. Población y tamaño de muestra

La población de estudio fueron todos los teneros y lechones menores de 1 mes de edad de fincas lecheras especializadas y granjas porcinas de crianza intensiva con diarrea de etiología desconocida.

Las muestras fueron colectadas en 17 fincas lecheras y 5 granjas porcinas localizadas en Río Cuarto de Grecia, Pital, Poás, Zarcero, Sucre y Pacayas. El tamaño de muestra se obtuvo utilizando la fórmula de Cannon y Roe (1982). La fórmula es $n = (1-(1-p)^{1/d}) \times (N-(d-1)/2)$; donde n= tamaño de muestra, p= probabilidad de encontrar un caso, d= prevalencia estimada, N= tamaño de la población. Para detectar el rotavirus se calculó con el programa (*Win Episcopo 2.0*) donde el tamaño de muestra necesario de recolectar dentro de cada finca/granjas se estimó tomando una prevalencia aproximada de un 7% (Jiménez et al. 1998), con un nivel de confianza del 99% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tamaño de muestra necesario de recolectar dentro de cada finca/granja para detectar animales con rotavirus (prevalencia 7% y nivel de confianza 99%).

Animales < 1 mes dentro de cada finca/granja	Tamaño de muestra a analizar
25	23
35	32
55	37
75	44
95	45
125	49

2.3. Recolección y envío de muestra

Las muestras fecales fueron colectadas directamente del recto del animal y depositadas en recipientes de plástico debidamente etiquetadas (identificación del animal, edad, fecha de recolección), transportadas en termos conteniendo hielo y/o refrigerante al Laboratorio de Virología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA, Heredia para su posterior análisis.

2.4. Determinación del grupo A de rotavirus mediante inmunocromatografía.

Todas las muestras de heces de terneros se analizaron para determinar la presencia de rotavirus mediante la técnica de inmunocromatografía (Coris BioConcept, Bélgica). Este ensayo comercial utiliza un sistema homogéneo inmunocromatográfico a base de partículas de oro. La muestra fecal debe diluirse en el tampón de dilución previsto. Una membrana de nitrocelulosa ha sido sensibilizada con anticuerpos dirigidos contra el rotavirus. La especificidad se debe a un anticuerpo monoclonal conjugado con partículas de oro y específico de los antígenos VP6 del grupo A de rotavirus. El ensayo se realizó según el protocolo recomendado por la casa comercial.

En el caso de los cerdos no se realizó la inmunocromatografía sino que las muestras de heces se analizaron directamente por RT-PCR.

2.5. Electroforesis del ARN de rotavirus en gel de poliacrilamida

Este método se realizó únicamente a aquellas muestras bovinas que resultaron positivas en el ensayo inmunocromatográfico, para rotavirus grupo A y a todas las muestras porcinas.

Procedimiento de extracción de ARN

El método de extracción de la doble cadena de ARN (dsARN) de rotavirus se realizó con fenolcloroformo. Se mezclaron 250 µl de materia fecal con 5 µl de proteinasa K (1 mg/ml) y 50 µl de buffer A (10 mM Tris 1.211 g; 10 mM NaCl 0.4 g; 10 mM EDTA 2.92 g; SDS 0.5% 5 g; pH 8) y se incubó inmediatamente a 37°C por 30 minutos, luego se le agregó 250 µl de fenolcloroformo. Posteriormente se

centrifugó a 14000 rpm por 3-4 minutos y se extrajo el sobrenadante, el cual se mezcló con 250 µl de fenol saturado (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8) y 250 µl de cloroformo-isoamil-alcohol; se centrifugó otra vez a 14000 rpm por 3-4 minutos y se extrajo el sobrenadante.

Electroforesis en gel de archilamida y tinción

La separación del ARN se realizó en gel de poliacrilamida (PAGE) al 8% utilizando un gel continuo de 5cm de longitud y 0.75 mm de ancho (Mini-protean II electroforesis, Bio-Rad, USA) la separación se realizó a 160 V por 90min, depositando 20 µl de muestra y 10 µl de sample buffer (Svensson, 1986).

La detección de las bandas en el gel se efectuó con lactato de plata según la técnica descrita por Svensson (1986). El gel se fijó en 100 ml de solución de fijado (Etanol 35%, ácido acético 10%) se agitó por 30 minutos; luego se reemplazó con la solución lactato de plata al 0.175%, se agitó por 20 minutos; se enjuagó tres veces con agua destilada y se reemplazó con la solución de revelado descrita por Svensson (1986).

2.6. Genotipificación de rotavirus grupo A mediante RT-PCR

Este método se realizó a las muestras bovinas que resultaron positivas al ensayo inmunocromatográfico y a todas las muestras porcinas.

La genotipificación se basa en cuatro aspectos, la extracción de ARN; la desnaturalización y reversotranscripción, utilizando una enzima específica *transcriptasa reversa* (Revert Aid™ M-MuLV 200u/µl, Fermentas); la amplificación del gen “G” (VP7) y “P” (VP4), con los “cebadores” Beg9-End9 y Con3-Con2 (Invitrogen) respectivamente y finalmente la amplificación de los genotipos con los cebadores específicos (Invitrogen).

2.6.1. La extracción del ARN

Se realizó utilizando el reactivo Trizol LS (Gibco BRL# 10296-028) utilizando 750 µl de la solución y 250 µl de materia fecal, se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente previa agitación en el vortex; luego se agregó 200 µl de cloroformo frío se volvió a agitar en el vortex y se dejó incubando 5 minutos a

temperatura ambiente; luego se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, se transfirió la parte acuosa en un Eppendorf conteniendo 5 µl de acarriador (polyacril carrier) y se precipitó con 500 µl de alcohol isopropílico (2-propanolol) incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos; posteriormente se realizó otra centrifugación a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante; se lavó el botón de ARN con 1 ml de etanol (70%) frío, se incubó durante 2-4 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C. El botón que contiene el ARN se resuspendió en 10-25 µl de agua DEPC (0.1% diethyl pyrocarbonato, SIGMA) y se guardó a -80°C hasta su posterior análisis.

2.6.2. Desnaturalización y reversotranscripción

Para esto se tomaron 5 µl del ARN extraído y se mezcló con 5 µl de una solución que contiene 1 µl cebador iniciador Beg9 (20 pmol) (Invitrogen) y 5 µl de agua libre de ARNasas (Fermentas), esta mezcla se incubó a 97°C por 5 minutos en el termociclador. Una vez terminada la incubación se agregaron 4 µl de buffer (5x reaction buffer for M-MuLV RT, Fermentas), 2 µl de dNTP (10mM, Fermentas), 0.5 µl de inhibidor de ARNasas (Riboloc 4 u/µl, Fermentas), 1.5 µl de agua libre de ARNasas (Fermentas) y 1 µl de enzima transcriptasa reversa (Revert Aid™ M-MuLV 200u/µl, Fermentas) y se desnaturalizó a 42°C por 60 minutos y 94°C por 5 minutos en el termociclador (modelo 2720, Applied Biosystem).

2.6.3. Amplificación del gen “G” (VP7) y “P” (VP4)

Para amplificar el gen G y P en el primer PCR se tomaron 5 µl del ADN copia y se mezcló con 45 µl de la solución madre conteniendo 25 µl de Master Mix 2x (Fermentas), 0.5 µl del cebador reverso End9(UK) (20 pmol, Invitrogen) para el caso de bovinos, en cerdos el reverso es End9(crw8) (20 pmol, Invitrogen) y 19.5 µl de agua libre de ARNasas (Fermentas) para un volumen final de reacción de 50 µl y se corrió el programa en el termociclador a 30 ciclos en 94°C por 1 minuto, 42°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto y al final una extensión de 72°C por 7 minutos, para obtener un producto de 1062 bp correspondiente a los tipos G y se reveló en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, para amplificar el gen P se

realizó la misma mezcla, sin embargo se utilizó el iniciador Con3 (20 pmol, Invitrogen) y Con2 (20 pmol, Invitrogen) como reverso, obteniendo un producto de 887 bp que fue revelado en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

2.6.4. Genotipificación por reacción en cadena de la polimerasa anidado (nested-PCR)

Para la genotipificación se tomaron 2 µl del producto del primer PCR y se mezcló con 48 µl de una solución conteniendo 25 µl de Master Mix 2x (Fermentas), 5 µl de una mezcla de cebadores, G5(FT5), G6(DT6), G8(HT8), G10(ET10) y G11(YM) en concentraciones de 10 pmol (Invitrogen), 1 µl de cebador End9(UK) para el caso de bovinos y End9(CRW8) para porcinos a 10 pmol (Invitrogen) y 17 µl de agua libre de ARNasas (Fermentas) y se corrió el programa a 25 ciclos, 94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto y una extensión de 72°C por 7 minutos para obtener las amplificaciones correspondientes al tipo identificado (Cuadro 2). Para el caso de la genotipificación del grupo P, se utilizaron los cebadores P1(pNCDV), P5(pUK), P6(pGott), P7(pOSU) y P11(pB223) (Gouvea et al., 1994) y cebadores propuestos por Gentsch et al., (1992) P4(2T-1), P6(3T-1), P8(1T-1), P9(4T-1) y P10(5T-1) utilizando 30 ciclos con una temperatura de 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto y una extensión de 72°C por 7 minutos. Los productos de la amplificación de los genotipos G y P se observaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

Cuadro 2. Cebadores utilizados para la genotipificación G y P de rotavirus bovino y porcino grupo A.

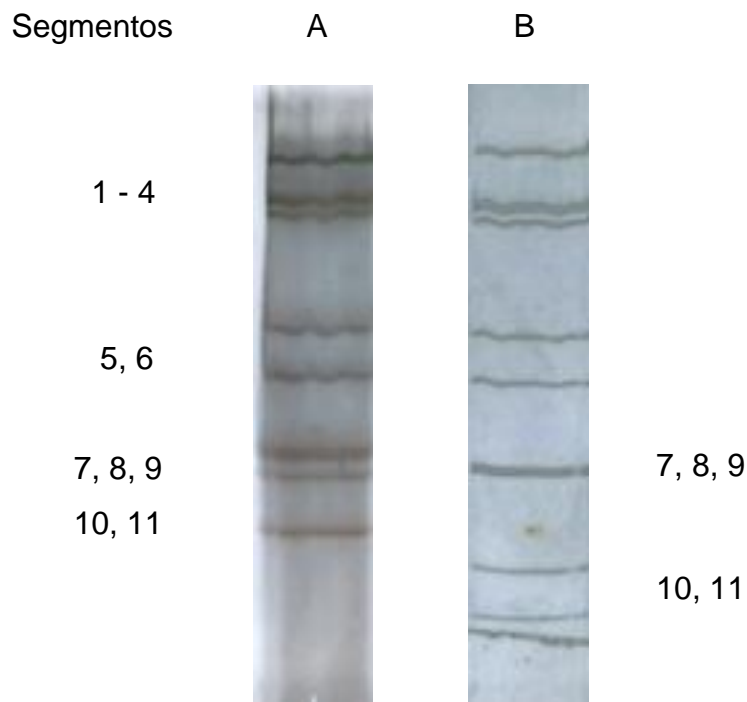
Primer	Secuencia 5´- 3´	Amplicón	cita
Con3	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	887 bp	Gouvea et al., 1994
Con2	ATTTTCGGACCATTATAACC	887 bp	Gouvea et al., 1994
P1(pNCDV)	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	622 bp	Gouvea et al., 1994
P4 (2T-1)	CTATTGTTAGAGTTAGAGTC	483 bp	Gentsch et al 1992
P5 (pUK)	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	555 bp	Gouvea et al., 1994
P6 (3T-1)	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	279 bp	Gentsch et al 1992
P6 (Pgott)	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	423 bp	Gouvea et al., 1994
P7(pOSU)	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	502 bp	Gouvea et al., 1994
P8 (1T-1)	TCTACTTGGATAACGTGC	345 bp	Gentsch et al 1992
P9 (4T-1)	TGAGACATGCAATTGGAC	391 bp	Gentsch et al 1992
P10 (5T-1)	ATCATAGTTAGTAGTCGG	583 bp	Gentsch et al 1992
P11(pB223)	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	314 bp	Gouvea et al., 1994
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTTC	1062 bp	Gouvea et al., 1994
End9(UK)	GGTCACATCATACAACCTCTAATCT	1062 bp	Gouvea et al., 1993
End9(CRW8)	GGTCACATCTTACAGCTTTAACCT	1062 bp	Gouvea et al., 1993
G5 (FT5)	CATGTA CTGTTGTTACGTC	780 bp	Gouvea et al., 1994
G6 (DT6)	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	500 bp	Gouvea et al., 1994
G8 (HT8)	CGGTTCCGGATTAGACAC	274 bp	Gouvea et al., 1994
G10 (ET10)	TTCAGCCGTTGCGACTTC	715 bp	Gouvea et al., 1994
G11 (YM)	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	337 bp	Gouvea et al., 1994

3. RESULTADOS

En el presente estudio se lograron coleccionar 200 muestras fecales de terneros menores de 1 mes de edad de 17 fincas lecheras especializadas en diferentes localidades del país. En el caso de los cerdos se coleccionaron 50 muestras fecales de lechones menores de un mes de edad de 5 granjas porcinas localizadas en Río Cuarto de Grecia.

Del total de muestras bovinas coleccionadas, 38 resultaron positivas a rotavirus bovino grupo A por inmunocromatografía y 25 dieron positivas por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) resultando 10 muestras con electroferotipos largos y 15 muestras con electroferotipos cortos en la disposición 4, 2, 3, 2, característico de rotavirus bovino grupo A presentando diferencias en la movilidad del segmento 9 y 11 (Figura 1).

Figura 1. Electroferotipos cortos y largos de rotavirus bovino grupo A determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida. A. Electroferotipo corto; B. Electroferotipo largo.



En el RT-PCR la genotipificación completa fue posible en 28 muestras fecales de terneros de las 38 muestras positivas por inmunocromatografía. El gen G fue identificado en 25 (89%) muestras fecales; mientras que el gen P fue identificado en 17 (61%) muestras fecales. De las 25 muestras caracterizadas como genotipos G, 10 (40%) correspondieron al genotipo G10 (ET10), 8 (32%) a G6 (DT6), y 7 (28%) a G8 (HT8); mientras que en los grupos P, 14 (56%) muestras correspondieron a P11 (pB223), 4 (16%) a P1 (pNCDV), y 3 (12%) a P7 (pOSU). Las infecciones mixtas se presentaron en el grupo P, en 4 (16%) muestras (Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia de genotipos G y P en 28 y 17 cepas de rotavirus bovino identificados en fincas lecheras de Costa Rica en el 2006-2007, respectivamente.

	n(%)
Serotipo G	
G10	10(40)
G6	8(32)
G8	7(28)
Total	25(100)
Serotipo P	
P[11] (pB223)	10(58)
P[1]	2(12)
P[7]	1(6)
P[11]+P[1]	2(12)
P[11]+P[7]	2(12)
Total	17(100)

n= número de muestras positivas

%= porcentaje de muestras positivas

En las figuras 2 y 3 se muestran los gels de agarosa con los amplicones de los genotipos G y P de rotavirus bovino grupo A.

Figura 2. Productos del RT-PCR multiplex. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones 274 bp, 500 bp y 715 bp de genotipos G de rotavirus bovino grupo A identificados en Costa Rica. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals)); 5 y 6: genotipo G8; 7, 8 y 9: genotipo G10; 10: genotipo G6.

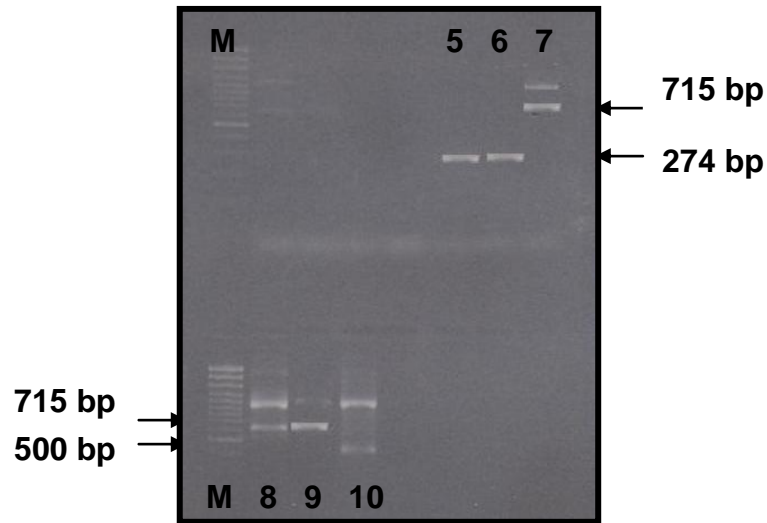
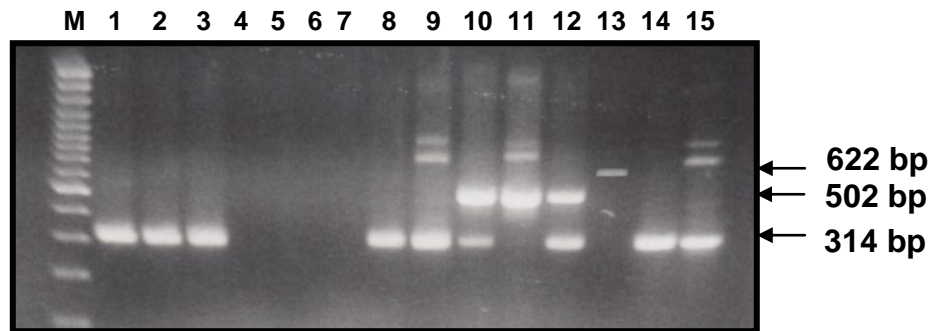


Figura 3. Productos del RT-PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones 314 bp, 502 bp y 622 bp de genotipos P de rotavirus bovino grupo A identificados en Costa Rica. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals)); 1, 2, 3, 8, 9, 14 y 15 genotipo P11; 10 y 12: infecciones mixtas P11 y P7; 11: genotipo P7; 13: genotipo P1.



En las combinaciones de los genotipos G y P se obtuvieron, 4 (26%) correspondientes a G8P[11], 4 (24%) a G6P[11], 3 (19%) a G8P[7], 2 (13%) a G10P[1], 3 (19%) a G10P[11], y 1 (6%) a G8P[1] (Cuadro 4).

Cuadro 4. Combinaciones de genotipos G y P observados en 16 muestras de rotavirus bovino en Costa Rica en el 2006-2007.

Serotipo	No. (%) de positivos (n = 16)					Total
	P[11] (pB223)	P[11]+P[7]	P[7]	P[1]	P[11]+P[1]	
G8	2(13)	2(13)	3(19)	1(6)	0	8(51)
G6	4(24)	0	0	0	0	4(24)
G10	2(13)	0	0	1(6)	1(6)	4(25)
Total	8(50)	2(13)	3(19)	2(12)	1(6)	16(100)

Los modelos electroforéticos de las diferentes cepas identificadas se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Modelos electroforéticos asociados a las distintas combinaciones de genotipos G y P de rotavirus bovino grupo A.

Combinación de genotipos G y P	Electroferotipo
G6P11	Corto
G10P11	Largo
G10P1+P11	Largo
G8P11	Corto
G8P7	Largo
G8P1	Largo
G8P11+P7	Largo

La distribución de los genotipos G y P de rotavirus bovino grupo A en las fincas lecheras de las diferentes localidades de Costa Rica se muestran en el cuadro 6, G10 fue el genotipo más prevalente en la zona de Poás, Zarcero y Sucre, mientras que el genotipo G6 prevaleció en las zonas de Río Cuarto de

Grecia, Poás y Pital de San Carlos. Finalmente G8 se identificó principalmente en la zona de Pacayas, Poás, Cedral de San Carlos y Zarcero. En los P tipos se identificó a P11 como principal genotipo en Río Cuarto de Grecia, Pital de San Carlos, Poás, Cedral de San Carlos y Pacayas; P7 se encontró únicamente en Río Cuarto de Grecia; mientras que P1 fue identificado en Zarcero y Sucre. Las infecciones mixtas fueron identificadas en Pacayas y Poás.

Cuadro 6. Distribución de los genotipos G y P de rotavirus bovino grupo A en las 17 fincas lecheras muestreadas en el año 2006-2007.

Finca	Localidad	Muestras colectadas	Muestras positivas	Tipo G	Tipo P
1	Río Cuarto de Grecia	22	6	G6	P[11]
2	Poas	21	7	G6 y G10	P[11]
3	Pital, San Carlos	11	2	G6	P[11]
4	Poas	13	0		
5	Poas	8	1	G8	
6	Poas	7	0		
7	Poas	9	0		
8	Poas	8	0		
9	Poas	7	2	G10	P[11] y P[1]
10	Poas	10	1		P[11] y P[1]
11	Poas	8	0		
12	Pacayas, Cartago	18	4	G8	P[11] y P[7]
13	Cedral, San Carlos	5	1	G8	P[11]
14	Zarcero	10	1	G8	P[1]
15	Sucre	16	1	G10	P[1]
16	Zarcero	12	1	G10	
17	Sucre	15	1	G10	
Total		200	28		

En el caso de los cerdos no fue posible visualizar los electroferotipos; por lo que se procesaron únicamente por RT-PCR logrando identificar 7 muestras positivas de 50 muestras analizadas. El gen P pudo ser identificado en 7 (14%) muestras; mientras que el gen G fue identificado únicamente en 2 (4%) muestras, las cuales correspondieron al genotipo G5. Entre las muestras que dieron positivas al gen P, 4 (57%) correspondieron a P6 y 3 (43%) a infecciones mixtas encontrándose 1 muestra positiva a P6+P1 y 2 a P6+P7. En las combinaciones de

los genotipos G y P se obtuvo una muestra G5P6 y una muestra G5P6+P1. Todas las muestras analizadas provenían de Cuarto de Grecia.

En las figuras 4 y 5 se muestran los geles de agarosa con los amplicones de los genotipos G y P de rotavirus bovino grupo A.

Figura 4. Genotipificación RT-PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando un amplicón de 780 bp de genotipos G de rotavirus porcino grupo A identificados en Costa Rica. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals)); CP: controles positivos; 7 y 8: genotipo G5.

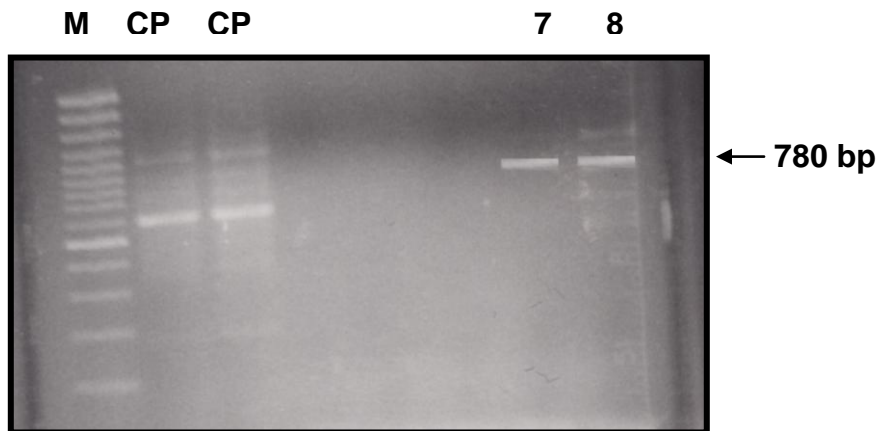
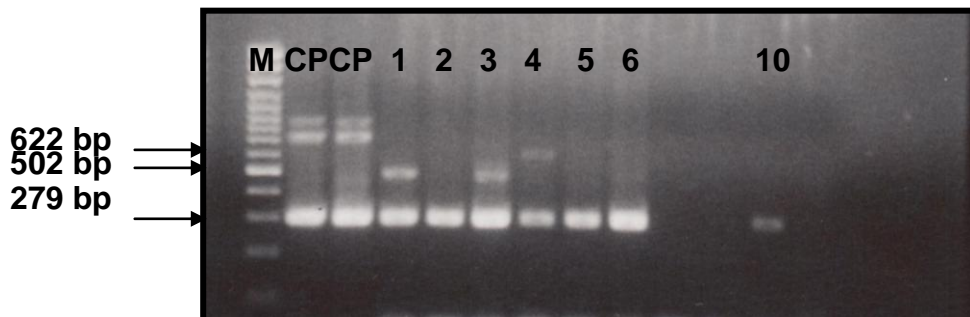


Figura 5. Productos de RT-PCR. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones 279 bp, 502 bp y 622 bp de genotipos P de rotavirus porcino grupo A identificados en Costa Rica. (M: Marcador 100 bp (Roche Biochemicals)); CP: control positivo; 1, 3: infecciones mixtas de genotipos P6 y P7; 4: infecciones mixtas de genotipos P6 y P1; 2, 5, 6 y 10 genotipo P6.



4. DISCUSIÓN

La presente investigación reporta por primera vez en Costa Rica y Centroamérica, la caracterización molecular de cepas de rotavirus grupo A asociadas a diarrea neonatal en terneros y porcinos.

La variación de los electroferotipos cortos o largos de migración del ARN está determinado por la movilidad del segmento 9 correspondiente al gen G (Fodha et al. 2005; Reidy et al. 2006). En este contexto se identificaron ambos patrones para el caso de terneros correspondiendo a G6P11 y G8P11 con un electroferotipo corto y G10P11, G8P7, G8P1 con un electroferotipo largo, lo que concuerda con estudios realizados en Irlanda por Reidy et al. 2006 donde muestras de rotavirus bovino G10 mostraron electroferotipos largos; no así para G6 que también se observó con electroferotipo largo difiriendo de nuestro estudio, aunque si describen la misma disposición de los genes 4, 2, 3, 2. Otro estudio realizado en Túnez por Fodha et al. 2005, únicamente reportó un electroferotipo largo con su patrón característico 4, 2, 3, 2 en rotavirus bovino grupo A.

Las diferencias en los modelos electroforéticos largos y cortos se refieren a que eventualmente representan genotipos diferentes de rotavirus, lo cual son corroborados con la realización de la tipificación de las cepas.

Para el caso de los porcinos no fue posible establecer el electroferotipo, posiblemente debido a la cantidad de ARN extraído que no fue lo suficiente para observar un patrón de migración, dado que según autores estiman que el número de partículas de rotavirus que son detectados por mililitro en las siguientes técnicas es de: 10^4 (PCR) y 10^{11} (PAGE); también cabría la posibilidad que los lechones ya no se encontraran en la fase de eliminación de partículas virales en grandes cantidades, lo cual no sería suficiente para ser detectados por PAGE (Argüelles et al. 2000; Araujo et al. 2001).

La determinación de los genotipos de las cepas de campo y consecuentemente, la disponibilidad de herramientas diagnósticas fiables hoy en

día llegan a ser la relevancia primaria para el desarrollo de sistemas apropiados de vigilancia y control epidemiológico de infecciones por rotavirus porcino y bovino. En este contexto, las limitaciones de pruebas serológicas existentes son también reconocidas como el echo de usar varios monoclonales para cada serotipo G para cubrir variantes intratípicas o la ausencia de un suministro adecuado de anticuerpos confiables anti-tipos P (Parashar et al., 1998), mientras que las técnicas moleculares, tal como las prueba de PCR, ha quedado ampliamente aceptada como la prueba de elección para la rápida y completa caracterización de aislados de campo (Hussein et al. 1993).

Existen reportes en la literatura de infecciones en bovinos causadas por varios genotipos de rotavirus grupo A, tales como G1, G2, G3, G6, G8, G10 y G11, sin embargo, los más predominantes han sido G1, G6, G8 y G10. En el presente estudio se identificaron los genotipos G6, G8 y G10, predominando el genotipo G10, el cual fue identificado en 10 muestras, seguido de G6 y G8 identificadas en 8 y 7 muestras fecales, respectivamente. Nuestros hallazgos coinciden al menos parcialmente, con los reportes de otras latitudes que muestran al tipo G6 como el más común en diarrea neonatal en bovinos encontrado reportado en Irlanda en 75 de 93 muestras positivas, seguido del tipo G10 que se encontró en 6 de 93 muestras positivas (Reidy et al., 2006). En Argentina se identificó al tipo G6 como el más prevalente con un 60% sobre el resto de los genotipos (Garaicoechea L. et al. 2006). En Brasil, el G6 fue el serotipo más común con un 42% (Fernández A. et al. 2004), y en Suecia el tipo G10 se ha encontrado como segundo más prevalente, siendo G6 la cepa de mayor presencia (Klingerberg et al. 1999).

En base a los resultados encontrados y a los reportados en otros estudios, muestra que los genotipos se han mantenido constante, es decir, que no se ha reportado otro genotipo diferente a los ya mencionados, lo que muestra mucha importancia en la vigilancia epidemiológica de rotavirus.

Los genotipos P bovinos descritos frecuentemente en la literatura son P1, P5 y P11. En este trabajo, el genotipo P11 fue el más frecuente y fue identificado en 10 de 17 muestras positivas, seguido de P1 identificada en 2 de 17 muestras

positivas y P7 en 1 de 17 muestras positivas; además se identificaron infecciones mixtas correspondientes a P11+P1 y P11+P7 detectados en 4 de las 17 muestras positivas. Sin embargo estudios realizados por Parwani et al. (1993) identifica al genotipo P5 como el genotipo más frecuente en diarrea neonatal bovina en Estados Unidos. Brito (1998), encontró P11 como el genotipo más frecuente en diarreas de terneros en el estado de Goiás, Brasil, lo cual confirmó en estudios posteriores (Brito et al. 2000). El hallazgo de infecciones mixtas tiene mucha importancia desde el punto de vista epidemiológico, dado que los animales afectados por un tipo de cepa pueden ser infectados con otra cepa distinta o estar afectado por dos cepas distintas a la vez, lo cual dificulta aun más el control de la enfermedad.

Dentro de los hallazgos encontrados en las diferentes localidades del país reflejan una variación de grupos P; pero a pesar de la variedad de los grupos P encontrados en las diferentes localidades del país, éstos son similares a los descritos en otras partes del mundo.

Dentro de las diferentes asociaciones de genotipos bovinos se identificó a G6P11 como la más frecuente detectado en 4 de las 16 muestras positivas, G8P7 fue la segunda combinación más frecuente identificada en 3 de las 16 muestras positivas, seguido de G8P11 y G10P11 encontradas en 2 muestras; G8P1 y G10P1 se identificó en una muestra. Nuestros hallazgos difieren parcialmente de las asociaciones de genotipos G6P[5] y G10P[11] reportadas como las más frecuentes en algunos estudios (Parwani et al., 1993; Suzuki et al., 1993; Brüssow et al., 1994; Ishizaki et al., 1996; Fukai et al., 1999). Es probable que los mecanismos de cambios genéticos puedan contribuir a la evolución y epidemiología de los rotavirus, dando como resultado una diversidad de genotipos (Desselberger, U. 1989). Aunque también hay que tomar en cuenta el manejo de los animales enfermos, es decir, terneros con diarreas que se ponen en contacto con otros que también presentan diarreas; pero que probablemente posean genotipos diferentes pueden tener infecciones cruzadas. También hay que tomar

en cuenta la estacionalidad de las diarreas, el cual podrían encontrarse mayormente en épocas de invierno.

A pesar de la gran variabilidad de los rotavirus, debido a las múltiples combinaciones que pueden existir entre los genotipos G y P, en la actualidad se dispone de varias vacunas comerciales para la prevención de las diarreas neonatales en terneros que han presentado grados variables de eficacia como se mencionó anteriormente. Estas vacunadas son fabricadas con los genotipos más frecuentemente encontrados y reportados en diferentes partes del mundo como son P5G6, P1G6 y P11G10, el cual son formulaciones polivalentes acompañados de otros patógenos intestinales como E.coli y Coronavirus (Saif et al., 1983; Hodgins et al., 1999; Bacellar et al., 2004; Nguyen et al., 2005; Nguyen et al., 2006). En este contexto a pesar de que en el presente estudio se describen las cepas más frecuentemente encontradas a nivel mundial es conveniente primero realizar una investigación más amplia para estar seguro de que son las cepas que están circulando en el país, y aún así habría que tomar en cuenta la gran variabilidad del virus, dado a su capacidad de mutar; además de tomar en cuenta que los rotavirus no son el único agente infeccioso involucrado en los procesos de diarrea. De lo expuesto, es posible que la aplicación de una vacuna con los genotipos encontrados en las diferentes fincas de un buen resultado; pero la pregunta sería cuánto demorará la protección de dicha vacuna dentro del hato, sabiendo las particularidades del virus en sus cambios genéticos; por lo que sería más conveniente realizar un monitoreo más extenso para saber si los genotipos encontrados se mantienen en todo el país.

Es importante mencionar que en el presente estudio no se logró genotipificar el 100% de las muestras positivas, es decir, que de 38 muestras bovinas positivas por inmunocromatografía 28 fueron las que se lograron caracterizar, esto pudo ser debido a que varias muestras dieron débilmente positivas en el ensayo inmunocromatográfico, por lo que pudo haber existido falsos positivos en la prueba. También hay que tomar en cuenta la integridad del ARN, ya que al estar mucho tiempo almacenado el ARN puede irse degradando por enzimas ARNasas lo mismo que sucedería al congelar y descongelar

repetidas veces las muestras fecales. Otra de las causas podría ser en el método de extracción del ARN, donde pudo existir problemas de contaminación. Además de las 28 muestras que se lograron caracterizar por completo únicamente en 25 muestras se logró identificar el gen G, por lo que 3 muestras resultaron ser cepas no tipificables y en el caso del gen P, 11 muestras fueron no tipificables. Estos hallazgos resultan de mucha importancia desde el punto de vista epidemiológico y también han sido reportados por otros autores como Santos y Hoshino, 2005 que en una revisión global más reciente de estudios de tipificación, describen la distribución temporal y geográfica de los tipos P y G revisando estudios de 52 países en cinco continentes con muestras colectadas entre 1973 y 2003 y encontró un 20% de muestras no tipificables, de ahí la importancia de mantener un monitoreo sobre la ecología del virus. Para el caso de las muestras que no lograron tipificarse es conveniente realizar una secuenciación para saber si son nuevos genotipos o están relacionados con otros.

La identificación de rotavirus porcino grupo A se llevó a cabo únicamente por RT-PCR, el cual, a pesar de que se colectaron pocas muestras se obtuvieron resultados interesantes, ya que reflejan los tipos G y P más comúnmente identificados en otros países, como se muestra en estudios realizados en Polonia y Estados Unidos por Winiarczyk et al., (2002), donde reportó a G5 como el tipo más prevalente en cerdos con diarrea. En un estudio realizado en Argentina G5 fue el principal serotipo identificado en cerdos de uno a cuarenta y cinco días de edad con diarreas (Mattion et al. 1989). Dentro de los distintos grupos P porcinos descritos en la literatura los genotipos P6 y P7, son los más frecuentes (Liprandi et al. 1991; Martella Vito et al., 2001; Dewey et al., 2003; Teodoroff et al., 2005; Martella et al., 2005). En la presente investigación se logró demostrar los genotipos P7, P1 y P6, siendo P1 un hallazgo inusual en cerdos. Si se considera el reducido número de muestras de origen porcino analizadas y el hecho de que todas provenían de la misma localidad, es de esperar una mayor diversidad de genotipos presentes en el país. Esto podrá demostrarse en futuras investigaciones que incluyan un número mas elevado de muestras y que abarquen otras zonas geográficas.

5. CONCLUSIONES

- La técnica de inmunocromatografía, empleando el kit comercial Coris BioConcept, permitió establecer una prevalencia de Rotavirus del 19% en las muestras de origen bovino.
- Empleando la técnica de PCR se logró constatar una prevalencia de Rotavirus del 14% en las muestras fecales de origen porcino.
- El electroferotipo de rotavirus se logró establecer de manera parcial, ya que únicamente pudo ser identificado en bovinos, encontrándose patrones de migración corto y largo con la disposición característica 4, 2, 3, 2 de rotavirus grupo A.
- La caracterización molecular de 28 muestras permite establecer que los genotipos de rotavirus bovino (G6, G8, G10, P11, P1, P7, P11+1, P11+7) y las combinaciones (G6P11, G10P11, G10P1+11, G8P11, G8P7, G8P1, G8P11+7) están presentes en Costa Rica.
- Por otro lado, la caracterización molecular de 7 muestras permite establecer que los genotipos de rotavirus porcino (G5, P6, P6+7, P6+1) y las asociaciones (G5P6, G5P6+1) se encuentran presentes en Costa Rica.
- En 8 muestras, 3 de origen bovino y 5 de origen porcino, no fue posible identificar el genotipo G involucrado. Adicionalmente, en 11 casos de origen bovino el genotipo P resultó “no tipificable”.
- En 9 muestras, 6 de origen bovino y 3 de origen porcino, se constataron infecciones mixtas.

6. RECOMENDACIONES

- Ampliar la investigación de los genotipos de Rotavirus que afectan bovinos y porcinos en Costa Rica considerando un mayor número de muestras y una mayor representatividad de zonas pecuarias.
- Completar el estudio de los genotipos presentes en el país mediante la técnica de secuenciación, en particular a aquellas muestras consideradas como no tipificables.
- Algunas investigaciones recientes demuestran la existencia de relación interespecie en cepas de rotavirus humano y animal, donde cepas de rotavirus en niños han incorporado genes de virus proveniente de animales, como rotavirus canino o bovino; por lo que sería de mucho interés llevar a cabo un estudio dirigido a poblaciones rurales de Costa Rica que permita evaluar esta posibilidad.
- Dado a que se han reportado la circulación de rotavirus bovino y porcino B y C en Japón y Estados Unidos, sería conveniente incluir estos grupos en futuras investigaciones.
- Difundir los resultados obtenidos, especialmente a los médicos veterinarios practicantes en especies mayores y a los productores de bovinos y suínos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bacellar M., Fernandes A., Médict K., Leite J., and Alcindo A., 2004. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. *Journal of Veterinary Medicine B*, 51: 104-109.
- Bern, C., Glass, R.I., 1994. Impact of diarrheal diseases worldwide. In: Kapikian, A.Z. (Ed.); *Viral infections of the gastrointestinal tract*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, pp. 1–26.
- Bok K., Palacios G., Sijvarger K., Matson D., and Gómez J., 2001. Emergence of G9 P[6] human rotaviruses in Argentina: phylogenetic relationships among G9 Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11): 4020-4025.
- Brito, W.M.E.D., 1998. Caracterização sorológica e molecular de amostras de rotavirus bovino do estado de Goiás. Tese de Doutorado. Instituto de ciencias biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil, 211 pp.
- Brito, W.M.E.D., Munford, V., Villaça, A.M., Caruzo, T.A.R., Rácz, M.L., 2000. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. *Journal of Microbiology*, 31, 140–145.
- Brüssow, H., Rohwedder, A., Nakagomi, O., Sidoti, J., Eichhorn, W., 1994. Bovine rotavirus V1005 a P5, not a P12, type like all viruses in a Germany survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2876–2879.

- Chang K., Nielsen P., Ward L., and Saif L., 1999. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-Like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *Journal of Virology*, 73(11): 9284-9293.
- Clark S., Roth J., Clark M., Barnett B., and Spendlove R., 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: Mechanism of enhancement. *Journal of Virology*, 39(3): 816-822.
- Desselberger, U. 1989. Molecular epidemiology of rotaviruses, p. 55-65. In M. J. C. Farthing (ed.), *Viruses and the gut*. Swan Press, London.
- Dewey C., Carman S., Pasma T., Josephson G., and McEwen B., 2003. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. *Canadian Veterinary Journal*, 44: 649-653.
- Eiden J., Wilde J., Firoozmand F., and Yolken R., 1991. Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3): 539-543.
- Falcone E., Tarantino M., L. Di Trani, Cordioli P., Lavazza A., y Tollis M, 1999. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:3879-3882.
- Fernández A., Alcindo A., Bacellar M., Gagliardi Leite J., and Richtzenhain L., 2004. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. *Veterinary Microbiology*, 99:167-173.
- Fischer T., Steinsland H., and Valentiner-Branth P., 2002. Rotavirus particles can survive storage in environment tropical temperature for more than 2 months. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12): 4763-4764.

- Fitzgerald GR, Barker T, Welter MW, Welter C.J., 1998. Diarrhea in young pigs: comparing the incidence of the five most common infectious agents. *Veterinarian Medicine Food Animal Practice*, 1:80–86.
- Fodha I., Boumaiza A., Chouikha A., Dewar J., Armah G., Geyer A., Trabelsi A., and Steele A. D., 2005. Detection of group A rotavirus strains circulating in calves in Tunisia. *Journal of Veterinary Medicine*, 52:49-50.
- Fukai K., Saito T., Inoue K., and Sato M., 2004. Molecular characterization of novel P[14], G8 bovine group A rotavirus, Sun9, isolated in Japan. *Virus Research*, 105: 101-106.
- Garaicoechea L., Bok K., Jones L. R., Combessies G., Odeón A., Fernandez F., and Parreño V., 2006. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994–2003). *Veterinary Microbiology*, 118:1-11.
- Gatti MS, Ferraz M.M, Racz M.L, de Castro A.F, 1993. Rotavirus excretion in naturally infected pigs with and without diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 37:187–190.
- Genstch, J.R., R. I.Glass, P.Woods, V.Gouvea, M.Gorziglia, J. Flores, B.K.Das, and M.K.Bhan, 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1365–1373.
- Gouvea V., Santos N., and Timenetsky M., 1994. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5): 1338-1340.

- Glass R., Parashar U., Bresee J., Turcios R., Fischer T., 2006, Widdowson M., Jiang B., and Gentsch J.. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet*, 368: 323-332.
- Hidalgo, M., 1995. Diarrea por rotavirus en lechones. FONAIAP-Instituto de Investigaciones Veterinarias. Laboratorio de Virología. Maracay. Volumen No. 49.
- Hodgins D., Kang S., DeArriba L., Parreño V., Ward L., Yuan L., To T., and Saif L., 1999. Effects of maternal antibodies on protection and development of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs. *Journal of Virology*, 73(1): 186-197.
- Hussein H.A., Parwani A.V., Rosen B.I., Lucchelli A., y Saif L.J., 1993. Detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3, and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction-derived cDNA probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:2491-2496.
- Ishizaki, H., Sakai, T., Shirahata, T., Taniguchi, K., Urasawa, T., Urasawa, S., Goto, H., 1996. The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. *Veterinary Microbiology*, 48, 367–372.
- Jiménez, C., J. A. Morales, F. Hueckmann, G. Dolz, & R. Cortés, 1993. Aislamiento de rotavirus y coronavirus asociados a diarrea neonatal de los terneros. VIII Congreso nacional de medicina veterinaria, San José, Costa Rica.
- Jiménez, C., L. A. Estrada, & R. Cortés, 1997. Aislamiento de rotavirus porcino en Costa Rica. X congreso nacional de medicina veterinaria pp. 12, San José, Costa Rica.

- Kim Y., Chang K., Straw B., and Saif L., 1999. Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5): 1484-1488.
- Klingerberg, V.K., Nilsson, M., Svensson, L., 1999. Rotavirus G-type restriction, persistence and herd type specificity in swedish cattle herds. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 6, 181–185.
- Lee J., Yoo D., Redmond M., Attah-poku S., Van den Hurk J., and Babiuk L., 1998. Characterization of the interaction between VP8 of bovine rotavirus C486 and cellular components on MA-104 cells and erythrocytes. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62: 56-62.
- Linhares A., and Bresee J., 2000. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Panamerican Journal Public Health*, 8(5): 305-331.
- Liprandi F., Rodriguez I., Piña C., Larralde G., and Gorziglia M., 1991. VP4 monotype specificities among porcine rotavirus strains of the same VP4 serotype. *Journal of Virology*, 65(3): 1658-1661.
- Martella Vito, Pratelli Annamaria, Greco Grazia, Tempesta Maria, Ferrari Maura, Losio Marina Nadia, y Buonavoglia Canio, 2001. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8:129-132.
- Martella V., Ciarlet M., Baselga R., Arista S., Elia G., Lorusso E., Ba'nyai K., Terio V., Madio A., Ruggeri F.M., Falcone E., Camero M., Decaro N., Buonavoglia C., 2005. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology*, 337:111-123.

- Mattion M., Bellinzoni R., Blackhall J., La Torre J., and Scodeller E., 1989. Antigenic characterization of swine rotaviruses in Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(4):795-798.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P., Horzinek, M. C., and Studdert, M. J., 1999. *Reoviridae*. In: *Veterinary virology*, 3a. ed., ACADEMIC PRESS, USA. p. 391-404.
- Nagesha H., Brown L., and Holmes I., 1989. Neutralizing monoclonal antibodies against three serotypes of porcine rotavirus, *Journal of Virology*, 63(8): 3545-3549.
- Nguyen T., Yuan L., Azevedo M., Jeong K., Gonzalez A., Iosef C., Lovgren-Bengtsson K., Morein B., Lewis P., and Saif L., 2005. Low titer maternal antibodies can both enhance and suppress B cell responses to a combined live attenuated human rotavirus and VLP-ISCOM vaccine. *Vaccine*, 24: 2302-2316.
- Nguyen T., Yuan L., Azevedo M., Jeong K., Gonzalez A., Iosef C., Lovgren-Bengtsson K., Morein B., Lewis P., and Saif L., 2006. High titers of circulating maternal antibodies suppress effector and memory B-cell responses induced by an attenuated rotavirus priming and rotavirus-Like particle-immunostimulating complex boosting vaccine regimen, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(4): 475-485.
- O'Halloran F., Lynch M., Cryan B., O'shea H., y Fanning S., 2000. Molecular characterization of rotavirus in Ireland: Detection of novel strains circulating in the population. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:3370-3374.
- Palombo E., 2002. Genetic of group A rotavirus: Evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes*, 24(1): 13-20.

- Parashar U., Bresee J., Gentsch J., and Glass R., 1998. Rotavirus, Centers for disease control and prevention, Atlanta, Georgia, USA, 4(4): 561-570.
- Parreño V., 2007, Complejo diarreico neonatal del ternero. Instituto de Virología. Circulo de médicos veterinarios del sur de santa fe.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2010–2015.
- Paul PS, Lyoo YS. Immunogens of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, 1993; 37:299–317.
- Pérez, E., A. Kummeling, M. M. H. Jannssen, C. Jiménez, R. Alvarado, M. Caballero, P. Donado, & R. H. Dwinger, 1998. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilarán, Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine*, 33: 195-205.
- Polanco G., González M., Manzano L., Cámara J., and Puerto M., 2004. Rotavirus in asymptomatic animals: Detection and antigenic classification. *Archives Medicine Veterinary*, 36(1): 65-70.
- Rácz M., Kroeff S., Munford V., Thabata A. R., Durigon E., Hayashi Y., Gouvea V., and Palombo E., 2000. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: Characterization of an atypical genotype G[9] strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6):2443-2446.
- Ramachandran M., Gentsch J.R., Parashar U.D., Jin S., Woods P.A., Holmes J.L., Kirkwood C.D., Bishop R.F., Greenberg H.B., Urasawa S.,

- Gerna G., Coulson B.S., Taniguchi K., Bresee J.S., Glass R.I., and the national rotavirus strain surveillance system collaborating laboratories, 1998. Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:3223-3229.
- Reidy N., Lennon G., Fanning S., Power E., and O'Shea H., 2006. Molecular characterization and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002–2004. *Veterinary Microbiology*, 117:242-247.
 - Reinhardt, G., Riedemann, T., Polette, M., Aguilar, M., Niedda, M., 1986. Diarrhoea neonatal. Infection in bovine and porcine by rotavirus. *Archived of Medicine Veterinary*, 18, 23–27.
 - Rodák L., Smíd B., Nevoránková Z., Smítalová R., y Valíček L., 2004. Verification of sensitivity and specificity of group A rotavirus detection in piglets faeces with monoclonal blocking ELISA methods. *Journal of Veterinary Medicine*, 51:160-165.
 - Rosen B., Parwani A., Gorziglia M., Larralde G., and Saif L., 1992. Characterization of full-length and polymerase chain reaction-derived partial-length Gottfried and OSU gene 4 probes for serotypic differentiation of porcine rotaviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10): 2644-2652.
 - Saif L., Redman D., Smith K., and Theil K., 1983. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows. *Infection and Immunity*, 41(3): 1118-1131.
 - Santos N., and Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and

implementation of an effective rotavirus vaccine. *Review Medicine Virology*, 15:29-56.

- Suzuki, Y., Sanetaka, T., Sato, M., Tajima, K., Matsuda, Y., Nakagomi, O., 1993. Relative frequencies of G (VP7) and P (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotavirus isolated in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 3046–3049.
- Snodgrass, D.R., Fitzgerald, T., Campbell, I., Scott, F.M., Browning, G.F., Miller, D.L., Herring, A.J., Greenberg, H.B., 1990. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *Journal Clinical Microbiology*. 28, 504–507.
- Teodoroff T., Tsunemitsu H., Okamoto K., Katsuda K., Kohmoto M., Kawashima K., Nakagomi T., and Nakagomi O, 2005. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3): 1377-1384.
- Unicomb L., Podder G., Gentsch J., Woods P., Hasan K., Faruque A., Albert M., and Glass R., 1999. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: Emergence of type G9 in 1995. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6): 1885-1891.
- Winiarczyk S., and Gradzki Z., 1999. Comparison of polymerase chain reaction and dot hybridization with enzyme-linked immunoassay. Virological examination and polyacrylamided gel electrophoresis for the detection of porcine rotavirus in faecal specimens. *Journal of Veterinary Medicine B*, 46: 623-634.

- Winiarczyk S., Paul P., Mummidi S., Panek R., and Gradzki Z., 2002. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. *Journal of Veterinary Medicine B*, 49: 373-378.
- Will LA, Paul PS, Proescholdt TA, et al. 1994. Evaluation of rotavirus infection in diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*; 6:416–422.