

## **ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN DE LA VP4 DE LA CEPA DE ROTAVIRUS BOVINO TIPO P[5] AISLADA DE BECERROS EN EL ESTADO YARACUY**

### ***Molecular Analysis of the VP4 Genes of Bovine Rotavirus Strain type P[5] isolated from Calves in Yaracuy State***

José A. López\*,<sup>1</sup>, Maite Mendoza\*, Zoleida Bastidas\*, Karis Pirez\* y Erick Ramón\*

*\*Laboratorio de Virología Animal. Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", 3023, Cabudare*

**Correo-E: joseagustinlopez@ucla.edu.ve**

Recibido: 01/10/12 - Aprobado: 28/01/13

#### **RESUMEN**

La diarrea neonatal bovina indiferenciada es una enfermedad multifactorial que afecta a una alta proporción de becerros (50% o más) causando hasta un 40% de mortalidad en los primeros 30 d de vida. Entre los agentes causales se incluyen muchos enteropatógenos (bacterias, virus, protozoarios), con predominio de infecciones combinadas. Entre los virus, los rotavirus constituyen los principales agentes causales de gastroenteritis aguda en diferentes especies animales. Su genoma, de 11 segmentos de ARN de doble cadena, puede rearrreglarse genéticamente en coinfecciones de diferentes cepas, produciendo una progenie viral con un nuevo fenotipo. En la ganadería bovina venezolana, se han descrito los rotavirus con una prevalencia de 20-30% en animales con cuadros de diarrea entre 2-6 sem de edad. Los serotipos G6 y el genotipo P1 se han reportado con mayor frecuencia en becerros de la región central de Venezuela. Cepas de rotavirus bovino del grupo A fueron detectados por inmunoensayo enzimático (ELISA) y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), en 32 de 280 (11,43%) muestras de heces de becerros de 15 fincas del estado Yaracuy, Venezuela. La secuencia nucleotídica se logró para una de las variantes detectadas (A610). En el análisis comparativo de las secuencias de la

#### **ABSTRACT**

The undifferentiated neonatal bovine diarrhea is a multifactorial disease that affects a high proportion of calves (50% or more) causing up to 40% of mortality in the first 30 d of life. Among the infectious agents known to cause diarrhea in calves are the rotavirus and coronavirus. Rotaviruses are the major causative agents of acute gastroenteritis in different animal species. Their 11-segment genome of double ARN chain can genetically rearrange different strains, producing a viral progeny with new or atypical phenotype. Rotaviruses have been described in the bovine Venezuelan cattle, with a prevalence of 20-30% in animals between 2-6 weeks of age, with episodes of diarrhea. The serotypes G6 and the genotype P1 have been reported with higher frequency in calves from the central region of Venezuela. In this investigation, rotavirus strains of cattle from Group A were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in 32 of 280 (11.43%) stool samples of calves in 15 farms in the State of Yaracuy, Venezuela. The nucleotide sequence was obtained for one of the variants detected (A610) and the comparative analysis of the sequences of the VP8\* (the VP4 fragment) corresponded to the P [5] genotype. These data constitute the first

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

VP8\* (fragmento de la VP4) mostró corresponder al genotipo P[5]. Estos datos constituyen el primer reporte de una cepa de rotavirus bovino genotipo P[5], que circula en las fincas del estado Yaracuy, Venezuela, pudiendo servir de apoyo para la incorporación de este grupo viral en las vacunas que se utilizan en el país.

**(Palabras clave:** Análisis, genotipos, proteínas, diarrea, rotavirus bovino, técnicas, VP4, Yaracuy)

report of a strain of bovine rotavirus genotype P[5], which circulates in the States of Yaracuy, Venezuela, and can serve as a support for the inclusion of this viral group to the vaccines that are being used in the country.

**(Key words:** Analysis, genotypes, proteins, diarrhea, bovine rotavirus, techniques, VP4 Yaracuy)

## INTRODUCCIÓN

Según Kapikian y Chanock (1996) las enfermedades diarreicas agudas son un significativo problema de salud pública a nivel mundial. Uno de los factores más importantes en cualquier unidad de producción lo constituye el buen manejo de planes sanitarios, ya que las pérdidas de animales conllevan a mermas económicas para el productor. Por tanto, con la implementación de un adecuado plan sanitario se podría mejorar la situación de los becerros al nacimiento, los cuales son los más susceptibles de padecer enfermedades como las diarreas indiferenciadas. Las diarreas neonatales, son enfermedades multifactoriales complejas que afectan a los becerros recién nacidos; generalmente se presenta desde las 12 h posparto hasta los primeros 35 d de vida y se caracteriza por excreción de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis y en casos severos, muerte, especialmente cuando existen infecciones bacterianas primarias o secundarias. La incidencia promedio de las diarreas neonatales en becerros se estima en un 60% y su mortalidad hasta 20%, lo que implica tratamientos veterinarios, demanda de tiempo y mano de obra, así como retraso en el desarrollo corporal de los animales afectados (Margueritte et al., 2005).

Las principales causas de diarreas en nuestras fincas están relacionados con virus, dentro de los que se destacan los rotavirus, coronavirus, calicivirus, enterovirus, pestivirus y astrovirus, los cuales son géneros relacionados a las diarreas neonatales en becerros (Parreño et al., 2004). Los rotavirus (RV) son los agentes etiológicos más importantes asociados a gastroenteritis agudas en humanos, así como en otras especies de mamíferos y aves (Kapikian et al., 1986; Kapikian, 1993; 1994; Bern y Glass, 1994). Estos

virus se han aislado de diversas especies animales tales como: ratón, identificado como causantes de la diarrea epizootica del ratón lactante (EDIM, por sus siglas en inglés) (Adams y Kraft, 1967), de becerros denominado *Nebraska Calf Diarrhea Virus* (NCDV) (Mebus et al., 1969), de potros (Flewett et al., 1975), de las ovejas (Mc Nulty et al., 1976), de los pollos y pavos (Mc Nulty et al., 1978; 1979), y cerdos (Lecce et al., 1976; Woode et al., 1976; Bohl et al., 1984). En humanos, están claramente identificados como agentes asociados a diarreas (Kapikian et al., 1976a; 1976b; Yolken et al., 1977; Brandt et al., 1979). Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*, su material genético está organizado en 11 segmentos de ARN de cadena doble, los cuales se observan fácilmente en geles de poliacrilamida. Seis de esos segmentos codifican para proteínas estructurales, tres de las cuales son detectables por métodos clásicos de laboratorio (ELISA y electroforesis), conocidas como proteínas VP6, VP7 y VP4. La proteína VP6 da a los RV la especificidad de grupo, de tal manera que existen hasta la fecha siete grupos nombrados de la A a la G y de ellos el RV del grupo A es el más frecuente (Lu et al., 1995; Maes et al., 2003; Fernandes Alfieri et al., 2004; Parreño et al., 2004; Fodha et al., 2005).

La técnica más utilizada para el diagnóstico de este virus es la prueba de ELISA que utiliza anticuerpos contra la proteína VP6 del RV del grupo A. Sin embargo, también existen pruebas de ELISA para la proteína VP7 que utiliza anticuerpos monoclonales para determinar las variantes serológicas de la proteína conocida como proteína G. De esta proteína, existen al menos 15 variantes conocidas como G1 a G15. Mientras que en el humano predominan los RV G1 a G4 (Ciarlet y Liprandi, 1994; Santos et al., 1999; Raéz et al., 2000); en el ganado vacuno

predominan los serotipos G6 y G10 (Estes, 1996). La prevalencia del serotipo G8 ha sido variable (Gouvea *et al.*, 1994; Ciarlet *et al.*, 1997; Martella *et al.*, 2001; Okada y Matsumoto, 2002; Adah *et al.*, 2003; Fernandes Alfieri *et al.*, 2004; Fodha *et al.*, 2005). A través de ensayos de hibridación de ARN-ARN y análisis de secuencias de las VP4 de varios rotavirus humanos (HRV) y animales, se han definido la existencia de por lo menos 26 grupos distintos de genes (Taniguchi *et al.*, 1989; Qian y Green, 1991; Hoshino y Kapikian, 1994; Sereno y Gorziglia, 1994). Se consideran dentro de un mismo genotipo por VP4, aquellos virus que presentan homología en sus secuencias de aminoácidos >89% (Gorziglia *et al.*, 1988; Rao *et al.*, 2000; Hoshino *et al.*, 2002; Liprandi *et al.*, 2003; McNeal *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2003, 2006). Los tipos predominantes de rotavirus bovino (BRV) en el campo son G6, G8, G10, P[1], P[5] y P[11] (Taniguchi *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 2000; Martella *et al.*, 2005).

En Venezuela, se ha detectado rotavirus bovino (BRV) en varios estados, entre ellos Lara, Zulia y Aragua (Ciarlet *et al.*, 1997; Hoet y Boscán, 2005) con prevalencias entre 18%, 40,7% y 30%, respectivamente. Los rotavirus del Grupo A son los más comúnmente aislados en Venezuela, especialmente los del tipo G6 y G10, debido a esto la vacuna deberá tener dicho serogrupo y varios serotipos de este en su constitución (Hoet y Boscán, 2005).

En un estudio epidemiológico realizado por Hurtado (1990) en dos fincas del Municipio Torres del estado Lara, la infección por BRV arrojó un 18% en becerros menores de tres meses de edad con síndrome diarreico. La detección del BRV fue realizada por los métodos de ELISA y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), durante el lapso enero-diciembre de 1988, evidenciándose frecuencias altas de infección durante los meses de escasa precipitación pluvial. Otro estudio (Hurtado *et al.*, 1996), reporta rotavirus pertenecientes al serotipo G6 (33%) y al serotipo G10 (28%), en heces de becerros diarreicos y no diarreicos, de fincas de los estados Lara, Portuguesa, Cojedes y Trujillo, utilizando ELISA con anticuerpos específicos. Un estudio realizado en la región central de Venezuela, arrojó que de 171 muestras de heces diarreicas provenientes de becerros de dos fincas distintas, resultaron positivas

a BRV 20 (11,7%) de estas muestras. Dos serotipos diferentes fueron identificados en cada finca (G6 y G10) usando anticuerpos monoclonales específicos, y un único genotipo P[1], al analizar la comparación de las secuencias (Ciarlet *et al.*, 1997).

En este estudio, se presenta el primer reporte de la detección de BRV del grupo A genotipo P[5] en poblaciones ganaderas del estado Yaracuy, en Venezuela. Se analiza el gen 4, específicamente la región que codifica para el fragmento VP8\* de la VP4 de RV bovina, de una cepa llamada A610 y se realiza un análisis comparativo de secuencias para estudiar la diversidad viral y sus relaciones con otras cepas de RV del mundo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestra*

Las muestras para la realización de este estudio fueron tomadas en 15 fincas de los Municipios Bolívar y Manuel Monje, en el estado Yaracuy, Venezuela. Se recolectaron 280 muestras de materia fecal de terneros menores de 40 d de nacidos. Posteriormente, las muestras se conservaron a -40°C, hasta el momento de su análisis.

### *Preparación de las muestras*

Las muestras de heces se prepararon para el ELISA en clarificados fecales al 10%, en buffer fosfato salino (PBS; 80g de NaCl, 2 g de KCl, 1,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9,1 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1000 mL de agua bidestilada). Al clarificado se le agregó igual volumen de Freón (1.1.2-tricloro - 1.2.2-trifluoroetano, Dupont, Wilmington, EUA), y se agitó hasta homogeneizar la muestra. El sobrenadante que contenía las partículas virales se recuperó centrifugando la muestra a 10.000 x g durante 5 min.

### *Detección de BRV*

El BRV del grupo A se determinó mediante un estuche comercial de ELISA (RIDASCREEN® Rotavirus, R-Biopharm AG, Alemania) que emplea anticuerpos monoclonales contra las proteínas de la cápside de los Rotavirus (VP6), común para los RV del grupo A, en un procedimiento tipo sandwich (Maes *et al.*, 2003). El ELISA se llevó a cabo según las especificaciones del fabricante y la lectura de resultados se realizó a 492 nm, en un lector óptico

para ELISA (TECAN Sunrise™, Männedorf, Suiza).

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)**

Para confirmar la identidad de las muestras que resultaron positivas al ELISA, se realizó extracción de ARN utilizando TRIZOL® LS (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas de ARN fueron separadas, usando un gel de corrida al 10% con un gel de apilamiento al 6%. A las muestras de ARN se les añadió igual volumen de solución disociadora para ARN [Tris 0,5 M pH 6,8 (8 mL), glicerina (2 mL), SDS (1g) y azul de bromofenol (10 mg)], fueron hervidas durante 1 min y enfriadas en hielo hasta cargarlas en los pozos del gel. La corrida se realizó a 300 V, 60 mA por 6 h. Luego de la corrida, el gel de poliacrilamida se fijó con una solución de etanol al 10% y ácido acético al 0,1% en agua bidestilada, durante 30 min y se tiñeron con una solución de AgNO<sub>3</sub> al 0,18% (Merck Millipore) durante 1 h. Las bandas fueron visualizadas al incubar el gel con una solución de NaOH 0,75 M y formaldehído 0,76% v/v, hasta la aparición de las bandas. El revelado fue interrumpido eliminando la solución reveladora, lavando con H<sub>2</sub>O bidestilada, y agregando una solución de ácido acético (Merck Millipore) al 5% para fijar el revelado.

### **Reacción de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT - PCR)**

Los oligonucleótidos cebadores para la PCR, llamados con 3 (5'-TGGCTTCGCCATTTLATAGACA-3') y con 2 (5'-ATTTTCGGACCATTTATAACC-3') se escogieron de regiones conservadas en la VP8\* de rotavirus de diferentes especies animales. Para la reacción de RT-PCR se utilizó un kit comercial (ACCESS RT-PCR SYSTEM® Corporación Promega, EUA). La mezcla se preparó de acuerdo a la metodología descrita por el fabricante. El volumen final de esta mezcla fue de 50 µL y se sometieron a 40 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 30 seg, 68°C por 1 min, utilizando un termociclador (MasterCycler® Ep, Eppendorf, Hamburgo-Alemania).

### **Análisis de las secuencias**

La secuenciación automatizada se realizó en el servicio del Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN), ubicado en el Centro

de Microbiología y Biología Celular del IVIC (Altos de Pipe, Edo. Miranda Venezuela). El alineamiento de las secuencias se realizó comparando la secuencia obtenida con las diferentes variantes rotavirales reportadas en el banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Dicho alineamiento se llevó a cabo con el programa CLUSTAL W (Feng et al., 1984), las distancias fueron calculadas con el método de dos parámetros Kimura y los árboles filogenéticos se elaboraron con el método de inferencia *Neighbour joining*. Todo esto se realizó con ayuda del programa MEGA 3.01. La significación estadística del árbol construido fue estimada aplicando un *bootstrap* de 750 réplicas (Felsenstein, 1985). Las secuencias incluidas son BRV de diferentes serotipos y genotipos, aislados de diferentes regiones geográficas (61A, 678, UK, WC3, A5, C486, NCDV, 993-83, A44, B223).

## **RESULTADOS**

De 280 muestras obtenidas de becerros, 32 (11,43%) de ellas resultaron positivas para RV por ELISA con el estuche comercial (Ridascreen). El electroferotipo de las muestras, corroboró el origen grupo A rotaviral de estas muestras (datos no mostrados). La secuencia nucleotídica deducida para una de las variante (A610) y el estudio filogenético de las secuencias sugieren que esta cepa pertenece al genotipo P[5], con una homología del 93% con las cepas homólogas, cepas UK, 61A y 678, todas de origen bovino (Tabla 1). La variante A610 mostró homología del 65 y 42% con las cepas A5, C486, NCDV y 993-83, A44 y B223, respectivamente. En el árbol del gen de VP8\*, la cepa A610 se agrupa con un sólido valor (*Bootstrap* del 100%) con la cepa UK, pero lejana a la cepa WC3 del mismo genotipo (Figura 1). El mayor porcentaje de identidad lo mostró la variante A610 con las cepas BRV del genotipo P5 (UK, 61A, 678 y WC3), presentando homología de 98,9% con la cepa BRV UK (Tabla 1). El árbol filogenético claramente muestra las diferencias entre los genotipos de BRV.

## **DISCUSIÓN**

El RV bovino es la principal causa de diarrea en becerros entre una y tres semanas de nacidos. Los reportes epidemiológicos muestran prevalencias de 18% (Hurtado, 1990), 40,7% (Ciarlet et al., 1997),

**Tabla 1.** Porcentaje de homología de la secuencia de nucleótidos de la cepa A610 con respecto a las cepas incluidas en el estudio

Nombre	N° GenBank	Origen	Autor	Genotipo	Homología (%)	Consultado
61A	D13396	Bovino	Taniguchi, K	P[5]	92,1	Diciembre 2011
678	D32054	Bovino	Kaga, E	P[5]	94,1	Diciembre 2011
UK	M22306	Bovino	Kantharidis, P	P[5]	98,9	Diciembre 2011
v1005	X79795	Bovino	Brussow, H	P[5]	91,6	Diciembre 2011
WC3	AY050271	Bovino	Ciarlet, M	P[5]	91,3	Diciembre 2011
C486	Y00127	Bovino	Potter, A.A	P[1]	65,6	Diciembre 2011
NCDV	AB119636	Bovino	Homma, S	P[1]	66,3	Diciembre 2011
A5	D13395	Bovino	Taniguchi, K	P[1]	64,5	Diciembre 2011
993-83	D16352	Bovino	Isegawa, Y	P[17]	44,2	Diciembre 2011
A44	D13392	Bovino	Taniguchi, K	P[11]	46,8	Diciembre 2011
B223	D13394	Bovino	Taniguchi, K	P[11]	48,3	Diciembre 2011

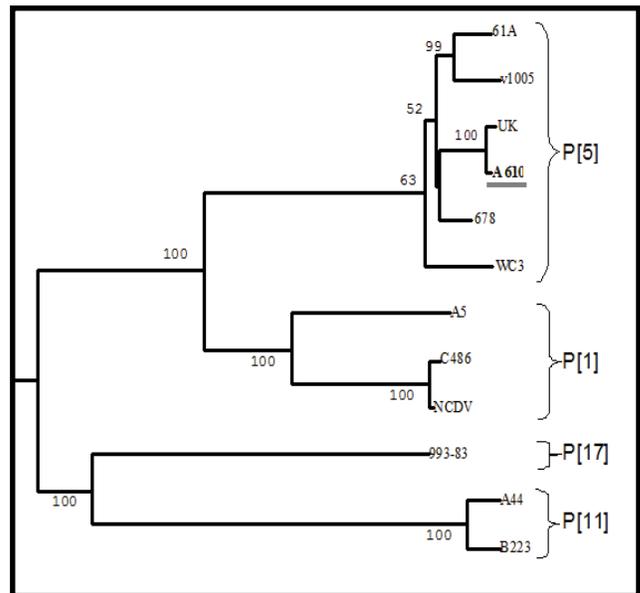
30% (Hoet y Boscán, 2005), en Venezuela. Los resultados obtenidos en las muestras probadas en este estudio, revelan un porcentaje de positividad de 11,43%, lo cual es bajo para lo esperado. Esto puede ser atribuido a que estas muestras no fueron recolectadas de becerros que presentaban diarrea, sino simplemente en becerros que se encontraban en los predios visitados.

Las cepas P[1] son los genotipos más frecuentemente reportados, que infectan bovinos en Venezuela; es por esto que seleccionar por azar una cepa con genotipo P[1], era bastante probable y parecería ser un prototipo frecuente dentro de lo esperado (Ciarlet *et al.*, 1997; Hoet y Boscán, 2005).

El estuche comercial utilizado para la detección viral es ampliamente usado en clínica humana para determinar RV del grupo A, en muestras diarreicas de niños en muchos hospitales en el mundo. Este estuche ha sido diseñado para detectar RV humano basado en determinantes antigénicos de la proteína VP6, que es la que clasifica a los RV en sus correspondientes grupos. Teniendo en cuenta que los determinantes antigénicos de los RV del grupo A son compartidos entre cepas humanas y animales, este método de diagnóstico puede ser utilizado para este ensayo en muestras animales (Maes *et al.*, 2003), lo cual ha sido confirmado en estudios previos con caninos, caprinos, ovinos y porcinos (Datos no publicados).

El análisis filogenético aplicado en este trabajo permitió determinar la relación filogenética de la cepa

A610 con el genotipo P[5], utilizando el alineamiento de la secuencia producto de una PCR, evidenciándose el RV bovino identificado, no está relacionado con ninguna región geográfica específica. Esto se puede afirmar por la poca similitud de la cepa A610 con cepas asiáticas (B223) y la relación con cepas europeas (UK) y americanas (61A). En caso de que existiera relación de las cepas con la localización geográfica,



**Figura 1.** Análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos de rotavirus de varias especies animales. El árbol filogenético fue construido por el método de *Neighbour joining*, al cual se le aplicó un bootstrap de 750 repeticiones. Se muestra subrayada la cepa de rotavirus bovino A610

la similitud de la A610 se haría evidente al formar agrupaciones (*clusters*) con cepas de regiones cercanas o al menos con regiones relacionadas entre ellas y no tan distantes como son las americanas y las europeas.

Con la herramienta filogenética usada en este trabajo no logramos determinar la dinámica evolutiva de la cepa A610, pues para esto sería necesario secuenciar uno o varios genes más del mismo virus y buscar diferentes comportamientos de cada uno de los genes estudiados. A nivel del RV, los otros genes con los que se llevan a cabo estos estudios, son los que codifican para VP7, NSP4 y NSP5, principalmente.

Los estudios de detección de virus en una población son la base para comprender el impacto epidemiológico del agente sobre la población afectada y generar estrategias para su eliminación y control, como es el caso de poder incluir las cepas detectadas en el desarrollo de vacunas que se utilizan en el país. Para darle mayor impacto y veracidad al 11,43% de positividad reportado en esta población de becerros, deben continuarse estudios epidemiológicos que amplíen el rango de muestreo y aumenten el número de resultados de los cuales se pueda obtener un dato que pueda ser atribuido a toda la población de becerros de la región. Los estudios filogenéticos son herramientas clave para determinar el origen, la relación con el huésped, la capacidad zoonótica y el desplazamiento del agente patógeno, de tal manera que estudios epidemiológicos deben estar asociados a estudios filogenéticos para lograr un conocimiento más sólido del problema de salud que afecta a individuos de cualquier especie, en cualquier parte del mundo.

Los resultados obtenidos constituyen el primer reporte de una cepa de rotavirus bovino genotipo P[5], que circula en las fincas del estado Yaracuy- Venezuela, y puede servir de apoyo para la incorporación de este grupo viral a las vacunas que se utilizan en el país.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del Laboratorio Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), y del Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSSAN) del IVIC. Este estudio se llevó a cabo con financiamiento del CDCHT-UCLA.

## REFERENCIAS

- Adah, M.; Nagashima, S.; Wakuda, M. y Taniguchi, K. 2003. Close relationship between G8-serotype bovine and human rotavirus isolated in Nigeria. *J. Clin. Microbiol.*, 41:3945-50.
- Adams, W.; Kraft L. 1967. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of etiologic agent. *Science*, 141:359-360.
- Bern, C.; Glass, R.I. 1994. Impact of diarrheal diseases worldwide En: AZ Kaplikian ed. *Viral Inf. Gastrointest. Tract.*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker. Inc. 1-26 p.
- Bohl, E.; Theil, K.; Saif, L. 1984. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 19:105-111.
- Brandt, C.; Kim, H.; Yolken, R. 1979. Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. *Am. J. Epidemiol.*, 110:243-254.
- Ciarlet, M.; Liprandi, F. 1994. Serological and genomic characterization of two porcine rotaviruses with serotype G1 specificity. *J. Clin. Microbiol.*, 32:269-272.
- Ciarlet, M.; Piña, C.; García, O.; Liprandi, F. 1997. Identification of bovine rotavirus in Venezuela: antigenic and molecular characterization of a bovine rotavirus strain. *Res. Virol.*, 148:289-97.
- Estes, M. 1996. Rotaviruses and their Replication. En: *Virology* (BN Fields et al. eds), 2nd ed. Raven Press, New York. Pp. 1329-1352.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Feng, D.F.; Johnson, M.S.; Doolittle, R.F. 1984. Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. *J. Mol. Evol.*, 21:112-25.
- Fernandes, Alfieri, A.; Alcindo Alfieri, A.; Bacellar Barreiros, M.; Gagliardi, Leite, J.; Richtzenhain, L. 2004. G and P genotype of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Vet. Microbiol.*, 167-73.
- Flewett, T.H.; Bryden, A.S.; Davies, H. 1975. Virus diarrhea in foals and other animals. *Vet. Rec.*, 97:477. (Abstr.)
- Fodha, I.; Boumaiza, A.; Chouikha, A.; Dewar, J.; Aamah, G.; Dgeyer, A.; Trabelsi, A.; Steele, D. 2005. Detection of group A rotavirus strains circulating in calves in Tunisia. *J. Vet. Med. B. Infect Dis. Vet. Public Health*, 52:49-50.
- Gozziglia, M.; Green, K.; Nishikawa, K.; Taniguchi, K.; Jones, R.; Kapikian, A.Z.; Chanock, R.M. 1988.

- Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. *J. Virol.*, 62:2978-2984.
- Gouvea, V.; De Castro, L.; Timenetsky, M.C.; Greenberg, H.; Santos, N. 1994. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.*, 32:1408-1409.
- Hoet, A.E.; Boscán, A. 2005. Complejo Diarreico Bovino. Manual de Ganadería Doble Propósito. Cátedra de Enfermedades Infecciosas. División de Estudios para Graduados. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. pp. 340-347.
- Hoshino, Y.; Kapikian, A.Z. 1994. Prospects for development of a rotavirus vaccine for the prevention of severe diarrhea in infants and young children. *Trends in Microbiol.*, 2:242-249.
- Hoshino, Y.; Jones, R.W.; Kapikian, A.Z. 2002. Characterization of neutralization specificities of outer capsid spike protein VP4 of selected murine, lapine, and human rotavirus strains. *Virology*, 299:64-71.
- Hurtado, De O. 1996. Frecuencia de serotipos G6 y G10 de rotavirus bovino grupo A detectados mediante ELISA. Memorial del III Congreso de Ciencias Veterinarias. Pp.19. (Resumen).
- Hurtado, De O. 1990. Aspectos epidemiológicos de infección por rotavirus en becerros con síndrome diarreico. XL Conv. Anual de ASOVAC. 28 p.
- Kapikian, A.Z.; Kim, H.W.; Wyatt, R.G. 1976a. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N. Engl. J. Med.*, 294:965-972.
- Kapikian, A.Z.; Kalica, A.R.; Shih, J.W. 1976b. Bouyant density in cesium chloride of the human reovirus – like agent of infantile gastroenteritis by ultracentrifugation, electro microscopy and complement – fixation. *Virology*, 70:564-569.
- Kapikian, A.Z.; Flores, J.; Hoshino, Y. 1986. Rotavirus: the major etiologic agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a "Jennerian" approach to vaccination. *J. Infect. Dis.*, 153:815-822.
- Kapikian, A.Z. 1993. Viral gastroenteritis. *J. Am. Med. Assoc.*, 269:627-630.
- Kapikian, A.Z. 1994. Rhesus rotavirus – based human rotavirus vaccines and observations on some non-"Jennerian" approaches to rotavirus vaccination. In: Kapikian AZ, ed. *Viral Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 443-470.
- Kapikian, A.Z.; Chanock, R.M. 1996. Rotaviruses. En: *Virology* (BN Fields *et al.* eds), 2nd ed. Raven Press, New York. Pp. 1329–1352.
- Leece, J.G.; King, M.W.; Mock, R. 1976. Reovirus-like agent associated with fatal diarrhea in neonatal piglets. *Infect. Immun.*, 14:816-825.
- Liprandi, F.; Gerder, M.; Bastidas, Z.; López, J.A.; Pujol, F.; Ludert, J.E.; Joellsson, H.; Ciarlet, M. 2003. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virology*, 315:373-380.
- Lu, W.; Duhamel, G.; Hoshino, Y.; Benfield, D.; Nelson, E.; Hesse, R. 1995. Characterization of the bovine group A rotavirus strain neonatal calf diarrhea virus-cody (NCDV-Cody). *J. Clin. Microbiol.*, 33:990-994.
- Maes, R.; Grooms, D.; Wise, A.; Han, C.; Ciesicki, V.; Hanson, L.; Vickers, M.; Kanitz, C.; Holland, R. 2003. Evaluation of a human group rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.*, 41:290-294.
- Margueritte, J.; Mattion, N.; Blackhall, J.; Fernández, F.; Parreño, V.; Vagnozzi, A. 2005. Diarrea neonatal en terneros: Su prevención y tratamiento. Dirección: <http://www.vet-uy.com/articulos/bovinos/050/0023/bov023.htm>. [Consulta: 11 de noviembre de 2011].
- Martella, V.; Pratelli, A.; Greco, G.; Tempesta, M.; Ferrari, M.; Losio, M.N.; Buonavoglia, C. 2001. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8:129-132.
- Martella, V.; Ciarlet, M.; Camarda, A.; Pratelli, A.; Tempesta, M.; Greco, G.; Cavalli, A.; Elia, G.; Desario, M.; Terio, V.; Bozzo, G.; Camero, M.; Buonavoglia, C. 2003. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapin rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology*, 314:358-370.
- Martella, V.; Ciarlet, M.; Baselga, R.; Arista, S.; Elia, G.; Lorusso, G.; Banyal, E.; Terio, V.; Madio, A.; Ruggeri, M.; Falcone, E.; Camero, M.; Desario, M.; 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.
- Martella, V.; Ciarlet, M.; Banyal, E.; Lorusso, G.; Cavalli, A.; Corrente, M.; Elia, G.; Arista, S.; Camero, M.; Desario, C.; Desario, M.; Lavazza, A.; Buonavoglia, C. 2006. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology*, 346:301-311.
- McNeal, M.; Sestak, K.; Choi, A.; Basu, M.; Cole, M.; Aye, P.; Bohm, R.; Ward, R. 2005. Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. *J. Virol.*, 79:944–954.
- Mc Nulty, M.S.; Allan, G.M.; Curran, W.L.; McFerron,

- J.B. 1976. Comparison of methods for diagnosis of rotavirus infection of calves. *Vet. Rec.*, 98:463-464.
- Mc Nulty, M.S.; Allan, G.M.; Stuart, J.C. 1978. Rotavirus infection in avian species. *Vet. Rec.*, 103:319-320.
- Mc Nulty, M.S.; Allan, G.M.; Todd, D.; McFerron, J.B. 1979. Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens. *Arch. Virol.*, 61:13-21.
- Mebus, C.A.; Underdahl, N.R.; Rhodes, M.B.; Twiehaus, M.J. 1969. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ. Nebraska Res. Bull.*, 233:1-16.
- Parreño, V.; Bok, K.; Fernández, F.; Gómez, J. 2004. Molecular characterization of the first isolation of rotavirus in guanacos (*Lama guanicoe*). *Arch. Virology*, 149:2465-2471.
- Qian, Y.; Green, K.Y. 1991. Human rotavirus strain 69M has a unique VP4 as determined by amino acid sequence analysis. *Virology*, 182:407-412.
- Okada, N.; Matsumoto, Y. 2002. Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. *Vet. Microbiol.*, 84:297-305.
- Raéz, M.L.; Kroeff, S.; Munford, V.; Caruzo, T.; Durigon E.; Hayashi, Y.; Gouvea, V.; Palombo, E. 2000. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. *J. Clin. Microbiol.*, 38:2443-2446.
- Rahman, M.; Matthijssens, M.; Nahar, S.; Podder, G.; Sack, D.A.; Azim, A.T. 2005. Characterization of a novel P[25], G11 human group A rotavirus. *J. Clin. Microbiol.*, 43:3208-12.
- Rao, C.D.; Gowda, K.; Reddy, B.S. 2000. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology*, 276:104-113.
- Santos, N.; Lima, C.; Nozawa, C.; Linhares, E.; Gouvea, V. 1999. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine reassortment. *J. Clin. Microbiol.*, 37:2734-2736.
- Sereno, M.M.; Gorziglia, M. 1994. The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain EB represents a tentative new P type. *Virology*, 199:500-504.
- Taniguchi, K.; Nishikawa, K.; Urasawa, T.; Urasawa, S.; Midthun, K.; Kapikian, A.Z.; Gorziglia, M. 1989. Complete nucleotide sequence of the gene encoding VP4 of a human rotavirus strain (strain K8) which has unique VP4 neutralization epitopes. *J. Virol.*, 63:4101-4106.
- Taniguchi, K.; Urasawa, T.; Pongsuwanna, M.; Choontanom, C.; Jayavas, C.; Urasawa, S. 1991. Molecular and antigenic analyses of serotypes 8 and 10 of bovine rotaviruses in Thailand. *J. Gen. Virol.*, 72:2929-2937.
- Woode, G.N.; Bridger, J.C.; Jones, J.M. 1976. Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect Immun.*, 14:804-810.
- Yolken, R.H.; Kim, H.W.; Clem, T. 1977. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus – like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet*, 2:263-267.