

OCURRENCIA Y DISTRIBUCION DE INFECCION POR ROTAVIRUS Y CORONAVIRUS EN BECERROS LECHEROS DEL ESTADO BARINAS (VENEZUELA)

Occurrence and distribution of rotavirus and coronavirus infection
in Barinas State dairy calves (Venezuela)

César Obando R.¹

Carlos Pedrique^{**}

José Obregón H.^{*}

^{*} Instituto de Investigaciones Veterinarias
FONAIAP.

^{**} Estación Experimental Portuguesa
FONAIAP.

RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar la frecuencia y distribución de infección por rotavirus (RV) y coronavirus (CV) en los becerros de la ganadería lechera del Estado Barinas. Para ello muestras de heces de 229 becerros seleccionados al azar, se recolectaron y procesaron mediante el ensayo inmuno enzimático tipo ELISA. Los resultados se analizaron mediante las pruebas de X^2 , Z y Análisis de Varianza, tomando en consideración las variables edad, características de las heces, supervisión o no del consumo de calostro, tipo de becerra e higiene. Los hallazgos indicaron que la infección por RV y CV ocurre en los becerros de las explotaciones lecheras del Estado, siendo significativamente mayor en becerros durante la primera semana de vida ($P < 0.05$). Su detección, fue independiente de las características de las heces ($F = 0.366$). a pesar de que los resultados muestran una tendencia a mayor frecuencia de RV en heces acuosas y pastosas, 9,3% y 6,5% respectivamente. en comparación con heces normales (3,3%), lo que pudiera sugerir que este virus tiene alguna participación en la diarrea neonatal bovina. Contrario es para CV, cuya prevalencia fue bastante baja. La infección por RV y CV resultó independiente del consumo de calostro ($Z = 1.429$), y el efecto del tipo de becerra no pudo ser determinado. En las becerras colectivas, la higiene regular o mala no varió, en forma significativa. las proporciones de becerros infectados por ambos virus, 8,9% y 7% respectivamente ($X^2 = 0,160$). Sin embargo, la ausencia de becerros infectados donde la higiene fue buena, a pesar del bajo número de animales, pudiera sugerir su importancia como medida de prevención.

Palabras claves: Diarrea neonatal bovina, rotavirus, coronavirus.

ABSTRACT

A study was carried out to determine the occurrence and distribution of rotavirus (RV) and coronavirus (CV) infection in Barinas state dairy calves. Two hundred and twenty nine feces samples from calves randomly selected were collected and studied by means of ELISA test. Results were analyzed by X^2 , Z and variance analysis test taking into consideration the differences in age, characteristics of the feces, supervision or non supervision of calostrum consumption, calf hutch type and hygiene. These results indicated that RV and CV infections occur in state dairy farm calves and have a significantly higher incidence during the first week of life ($P < 0.05$). The infection was detected regardless of the characteristics of the feces ($F = 0,366$), although the results show a tendency toward greater frequency of RV in watery and pasty feces. 9.3% and 6.5% respectively, in comparison to normal feces 3.3%. This could suggest that RV is a contributing factor in neonatal calf diarrhea. Just the opposite was true for CV infection which had a rather low prevalence. Rotavirus and coronavirus infection appeared regardless of supervision of calostrum consumption ($Z = 1.429$) and any effect caused by the type of hutch used could not be determined. In collective hutches regular hygiene practices or poor ones did not vary significantly the incidence of infected calves with either RV or CV. 8.9% and 7% respectively ($X^2 = 0.160$). However there were no infected calves where hygienic measures were enforced and in spite of the small number of animals, this could suggest the importance of good hygienic practices as a preventive measure.

Key words: Neonatal calf diarrhea, rotavirus, coronavirus.

INTRODUCCION

La diarrea neonatal bovina es una de las causas frecuentes de pérdidas de becerros durante los primeros meses de vida. Berschneider y Robert^[2], señalan que los

agentes infecciosos que frecuentemente **est**an asociados con la etiologia de la diarrea pueden dividirse en: bacterianos, **virales**, parasitarios y micoticos.

Mebus y col.^[17], demostraron que los virus actúan como agentes etiologicos primarios de diarrea. al ocasionar enteritis y diarrea en becerros **reci**en nacidos privados de calostro. como consecuencia de la inoculaci3n de filtrados **fecales** libres de bacterias procedentes de casos naturales de enteritis. Los rotavirus (**RV**) y coronavirus (**CV**), est

La mayona de las **diarreas** por **R V** ocurren durante los primeros diez **d**ías de edad. con pico de incidencia de 5 a 7 **d**ías. Sin embargo. se ha diagnosticado en becerros hasta de 3 a 4 meses. asi como en animales adultos^[16,24]. La difusi3n de los RV en la poblaci3n bovina normal es alta. existiendo encuestas serol3gicas que indican que la prevalencia es elevada.

Algunos RV atipicos. conocidos como pararotavirus. han sido aislados de bovinos^[6]. Ellos son **morfol3gicamente** similares a los **RV**, pero no poseen el antígeno **com**ún de grupo. En consecuencia. no pueden ser detectados por pruebas serologicas basadas en la **detec**ci3n de dicho antígeno como la inmunofluorescencia o **ELISA**^[19]. Las infecciones por coronavirus usualmente ocurren en becerros de 5 a 20 **d**ías de edad^[10,18], aunque epizootias de diarrea coronaviral han sido reportadas en bovinos adultos^[20]. La tasa de mortalidad oscila entre 5 a 10% en infecciones no complicadas o ser mayor cuando **existen** infecciones secundarias con otros virus o bacterias. especialmente Escherichia coli **enteropat3gena**^[23].

Infecciones mixtas por ambos virus pueden ocurrir en un rebaño o en un mismo animal, con o sin presencia de Escherichia coli **enteropat3gena**^[8]. Algunos investigadores consideran que la diarrea **neonatal** bovina. causada por estos virus. debe ser considerada en contexto como una diarrea aguda indiferenciada. ya que raramente un brote **sería** causado por un solo virus. Hay evidencia de que la infecci3n subclinica es común. Encuestas **serol3gicas** sobre estos virus indican que el 90% o mas de los bovinos tienen anticuerpos y que becerros clinicamente normales. con altos niveles de anticuerpos, pueden excretar el **virus**^[25].

En Venezuela. a pesar de que no se encuentra publicado un estudio con suficiente rigor cientifico. se sabe que la mortalidad de becerros **es** elevada. Datos no publicados de un estudio realizado en el Estado Portuguesa. indican que la **mayoría** de los becerros mueren antes de los 30 **d**ías de nacidos, siendo los primeros 10 **d**ías los mas criticos. estudio este que señala a la diarrea **neonatal** entre las causas mas frecuentes de fallecimientos. Sin embargo. no se ha investigado cuales son los agentes primarios mas prevalentes. que desencadenan esta patologia. particularmente en lo que se refiere a agentes **virales** tales como rotavirus y coronavirus.

MATERIALES Y METODOS

Procedimiento experimental

El presente trabajo contempló la detecci3n de RV y CV en heces recolectadas de becerros. en una muestra representativa del Estado Barinas. considerando las variables: edad. caracteristica de las heces. supervisi3n o no **del** consumo de calostro y condiciones de manejo.

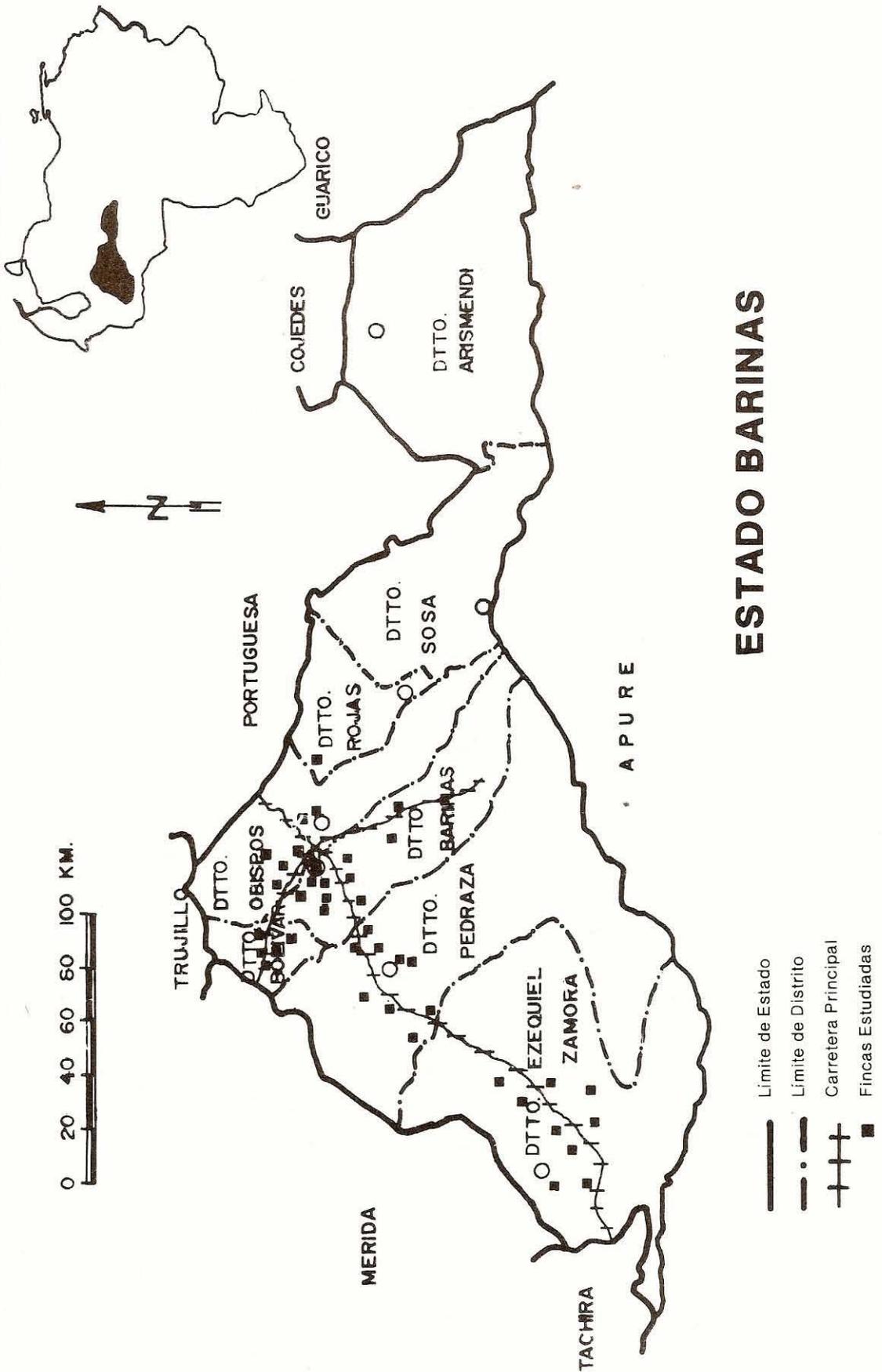
Para ello se registraron todas las fincas lecheras accesibles a ambos **lados** de las principales vías que recorren el Estado y se seleccionaron 40 fincas al azar. quedando distribuidas por distritos en el siguiente orden: Barinas 10, Bolívar 5, Pedraza 9, Obispos 6, Ezequiel Zamora 9 y Rojas 1 (ver Figura). Se estableció como edad limite de muestreo 60 **d**ías, en raz3n de las caracteristicas epidemiologicas de estas entidades **virales**. En cada finca se incluyo. además de los becerros con diarrea, un número **proporcional** de animales aparentemente sanos.

Para la detecci3n de RV y CV se utilizo el ensayo **inmunoenzimático** tipo ELISA. en raz3n de su sensibilidad y especificidad. Gerna y col.^[12] **señalan** que esta tecnica permite hacer detecci3n en muestras con una **concentraci3n** de viriones 10 veces menor en comparaci3n con la microscopia electr3nica. En **relaci3n** a la electroforesis del ácido ribonucleico viral en **geles** de poliacrilamida. sus resultados son similares, siendo la ELISA más rápida y menos laboriosa^[9].

Detecci3n de antígenos de RV y CV en muestras de heces, mediante la tecnica de ELISA

Se utilizaron placas de microtecnica marca Nunc. con el objeto de fijar anticuerpos monoclonales contra RV o CV. mediante buffer carbonato bicarbonato 0,05 M. pH 9.6 y almacenadas a 4°C hasta el análisis. Inicialmente las placas fueron lavadas tres veces. con **soluci3n salina buferada** contentiva de 0.05% de Tween 20 (PBS-T). Cada muestra de heces suspendida en 10% de PBS-T. se agrego en seis celdillas. en **volúmenes** de 100 ul y se dejo en incubaci3n a 37° C, por 1 hora. Seguidamente se lavaron las placas con PBS-T y se agrego bloqueante positivo y negativo (policlonal anti-RV y anti-CV), dos celdillas para cada uno y PBS-T en las otras dos celdillas, siempre en volúmenes de 100 ul. **Después** de una incubaci3n de 1 hora a 37° C. se lavaron las placas con PBS-T y se agrego. según el caso, 100 ul de IgG anti-RV o anti-CV purificada y elaborada en **conejo**. Transcurrida 1 hora de incubaci3n y lavadas las placas se **añadió** 100 ul de IgG anti-**conejo** elaborada en cabra. coniugada con peroxidasa y se incubaron por 1 hora mas. Finalmente. se lavaron de nuevo las placas-y se agrego 100 ul de soluci3n **sustrato** (0,8 mg 0 - Pheylenediamine/ml, 0,02 M ácido citrico. 0.05 M fosfato y 0.08% de H₂ O₂). **Después** de 10 minutos. se freno la reacci3n con 50 ul de 2 M H₂ SO₄.

FIGURA
UBICACION GEOGRAFICA DE LAS FINCAS ESTUDIADAS



ESTADO BARINAS

- Limite de Estado
- - - Limite de Distrito
- + + + Carretera Principal
- Fincas Estudiadas

Interpretación

La muestra es positiva cuando la densidad óptica (D.O.) en las celdillas con bloqueante negativo y PBS es $> 0,1$, y la D.O. de las celdillas con bloqueante positivo se reduce al menos en un 50%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las inferencias estadísticas se realizaron mediante las pruebas de Ji cuadrado, Z y Análisis de Varianza, con un nivel de confiabilidad de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el estudio realizado se recolectaron 229 muestras de heces de becerros, de las cuales resultaron positivas 14 (6,1%) por RV, 2 (0,8%) por CV y 1 (0,4%) por ambos virus. Hallazgos similares a los obtenidos en un estudio preliminar realizado en becerros con diarrea en el Estado Portuguesa (datos no publicados), señalan una prevalencia mayor de RV que de CV.

Al hacer un análisis de los resultados, tomando en consideración la edad de los becerros en el momento del muestreo, se halló que de 33 que se encontraban en la primera semana de vida, 7 (21,2) tenían infección por RV, 1 (3,0%) por CV y 1 (3,0%) por ambos virus. De los 36 becerros que se encontraban en la segunda semana de vida, 1 (2,7%) resultó positivo a RV y 1 (2,7%) a CV. Con edades comprendidas en la tercera semana se muestrea-

ron 59, de los cuales 5 (8,4%) resultaron infectados a RV y ninguno a CV. Todos los becerros muestreados entre la cuarta y novena semana, 101 en total, resultaron negativos a ambos virus a excepción de uno, de ocho semanas, en el que se detectó infección por RV, TABLA I. El análisis estadístico mostró, de manera significativa, que la mayoría de las infecciones por estos virus ocurrieron durante la primera semana en comparación con las de la segunda y tercera semana ($Z = 3,605$ y $Z = 3,438$, respectivamente), hallazgo que está estrechamente relacionado con el hecho de que la mayoría de las diarreas ocasionadas por estos virus se presentan mayormente en la primera semana^[13, 15, 16, 23].

Bridger y Woode^[4] sostienen que los becerros usualmente se infectan entre 5 y 7 días, a consecuencia de que la inmunidad lactogénica para ese momento, ha disminuido significativamente. Llama la atención que, después de una disminución del total de becerros infectados por estos virus, en la segunda semana, se observó un ligero incremento hacia la tercera semana. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre las proporciones de becerros infectados entre la segunda y la tercera semana, 5,5% y 8,4% respectivamente ($Z = 0,787$).

La infección por RV en un becerro de ocho semanas de edad concuerda con hallazgos previos realizados por otros investigadores donde se ha detectado este virus en becerros de hasta cuatro meses^[16, 24].

La TABLA II, muestra la distribución de los resultados en relación a la variable característica de las heces, observándose en primer lugar, que en los 3 becerros que para el momento del muestreo tenían heces con sangre, no había infección por estos virus. No así en los 43 becerros con heces clasificadas como acuosas donde 4 (9,3%) mostraron estar infectados por RV, mientras que en ninguno hubo evidencia de infección por CV. En los 123 becerros cuyas heces eran de consistencia pastosa, 8

TABLA I
DISTRIBUCION ETARIA DE BECERROS INFECTADOS
POR ROTAVIRUS (RV) Y CORONAVIRUS (CV)

Edad (Semanas)	INFECTADOS			Total (%)	No Infectados	Total
	RV (%)	CV (%)	RV y CV (%)			
1	7 (21,2)	1 (3,0)	1 (3,0)	9 (27,2)	24	33
2	1 (2,7)	1 (2,7)	—	2 (5,5)	34	36
3	5 (8,4)	—	—	5 (8,4)	54	59
4	—	—	—	—	16	16
5	—	—	—	—	34	34
6	—	—	—	—	10	10
7	—	—	—	—	14	14
8	1	—	—	1 (9,0)	10	11
9	—	—	—	—	16	16
Total	14 (6,1)	2 (0,8)	1 (0,4)	17	212	229

TABLA II
DISTRIBUCION DE BECERROS INFECTADOS POR RV Y CV
DE ACUERDO A LAS CARACTERISTICAS DE LAS HECES

Caract. (heces)	INFECTADOS			Total (%)	No infectados	Total
	RV (%)	CV (%)	RV y CV (%)			
Acuosas con sangre						
Acuosas	4 (9,3)	—	—	4 (9,3)	39	43
Pastosas	8 (6,5)	2 (1,6)	1 (0,8)	11 (8,9)	112	123
Normal	2 (3,3)	—	—	2 (3,3)	58	60
Total	14	2	1	17	212	229

(6,5%) fueron positivos a RV, 2 (1,6%) a CV y 1 (0,8%) a ambos virus. Finalmente, de 60 becerros con heces normales al momento del muestreo sólo 2 (3,3%) resultaron infectados, ambos con RV.

A pesar de que los resultados muestran una mayor proporción de infección por RV y CV en becerros con heces acuosas y pastosas, 9,3% y 8,9% respectivamente, en comparación con los que tenían heces normales (3,3%), el análisis estadístico no reveló diferencia significativa entre el número de becerros infectados que tenían heces acuosas, pastosas y normales, indicando que la presencia de estos virus en las heces es independiente de que exista o no diarrea ($F = 0,366$). Acres y col.^[1] detectaron RV en becerros antes, durante y después del inicio de la diarrea. Además, la manifestación clínica como consecuencia de la infección por RV, puede variar desde diarrea severa hasta infección subclínica^[8,22,24], dependiendo de la edad, estado inmune de la madre, absorción de anticuerpos calostrales, grado de exposición viral y presencia de otros enteropatógenos, así como del grado de virulencia, el cual varía entre cepas^[5].

En razón a lo anterior y tomando en consideración que la diarrea rotaviral permanece de 1 a 2 días, si no hay complicaciones bacterianas^[15], y que la excreción de RV continúa entre 2 y 7 días^[14]; estos hallazgos podrían

sugerir que el RV juega un papel en la diarrea neonatal bovina de la ganadería lechera del Estado Barinas.

En cuanto a la infección por CV, solo hubo positividad en becerros con heces pastosas, y en un escaso número de ellos, por lo que se podría pensar que este virus no tiene mayor implicación en la etiología de la diarrea neonatal bovina, en los animales estudiados.

En relación a la supervisión o no del consumo de calostro, inmediatamente después del parto, se encontró que de los 187 becerros muestreados con ingestión de calostro supervisado, 12 (6,4%) tenían infección por RV, 2 (1%) resultaron infectados por CV y en 1 (0,5%) se detectó infección por ambos virus; mientras que de los 42 becerros por consumo de calostro no supervisado, 2 (4,7%) resultaron positivos a RV y ninguna a CV. TABLA III, lo cual indica que la infección por estos virus es independiente de que se supervise o no el consumo de calostro ($Z = 1,45$).

Por último la TABLA IV, presenta los hallazgos de la infección por RV y CV en relación con la variable: condiciones de manejo, en la cual se incluyeron el tipo de becerreras y la higiene de las mismas. Se puede observar, que de los 44 becerros criados en becerreras individuales y de los 185 criados en becerreras colectivas, se detectó infección por estos virus en 4 (9%) y 13 (7%) respectiva-

TABLA III
DISTRIBUCION DE BECERROS INFECTADOS POR RV Y CV
DE ACUERDO A LA SUPERVISION O NO DEL CONSUMO DE CALOSTRO

Consumo de Calostro	INFECTADOS			Total (%)	No infectados	Total
	RV (%)	CV (%)	RV y CV (%)			
Supervisado	12 (6,4)	2 (1)	1 (0,5)	15 (8,02)	172	187
No supervisado	2 (4,7)	—	—	2 (4,76)	40	42
Total	14 (6,1)	2 (0,8)	1 (0,4)	17	212	229

TABLA IV
DISTRIBUCION DE BECERROS INFECTADOS POR RV Y CV,
DE ACUERDO AL TIPO DE BECERRERA E HIGIENE

Tipo de Becerrera	Higiene	INFECTADOS				No Infectados	Total
		RV (%)	CV (%)	RV y CV (%)	Total (%)		
Individuales	A	2				35	39
	B	—	—	—	—	5	5
	C	—	—	—	—		
	Total	2(4,5)	1(2,2)	1(2,2)	4(9,0)	40	44
Colectivas	A	—				16	16
	B	5(8,9)	—		5(8,9)	51	56
	C	7(6,1)	1(0,8)		8(7,0)	105	113
	Total	12(6,4)	1(0,5)		13(7,0)	172	185
Total		14			17	212	229

A = Bueno RV : Rotavirus
B = Regular CV: Coronavirus
C = Malo

mente, lo que no permitió analizar si la infección por estos virus es dependiente o no del tipo de becerrera, en razón del escaso número de fincas que se encontraron con becerrerías individuales.

En relación a la higiene, refiriéndonos únicamente a los resultados de los becerros criados en becerrerías colectivas (tipo de instalación predominante en la ganadería lechera del Estado Barinas), se encontró que ninguno de los 16 becerros mantenidos en buenas condiciones de higiene tenía infección por estos virus, mientras que de los 56 mantenidos con higiene regular y de los 113 con higiene mala, resultaron con infección a estos virus 5 (8,9%) y 8 (7%), respectivamente. Sin embargo, debido a que solo tres fincas fueron encontradas con buena higiene los datos obtenidos no permitieron hacer un análisis comparativo entre las frecuencias de infección por RV y CV en becerros bajo estas condiciones y las frecuencias de infección de los becerros criados bajo condiciones regulares y malas de higiene. En relación a estas últimas, los resultados indican que no hay diferencia significativa entre las frecuencias de infección por estos virus, en becerros criados bajo condiciones regulares y malas de higiene ($X^2 = 0,160$).

No obstante el hecho de que ninguno de los 16 becerros criados en buenas condiciones de higiene resultase infectado por RV o CV, pudiera interpretarse en favor de la importancia del ambiente en la prevención de la diarrea causada por estos virus, señalada por Torres y col.^[23], ya que la infección transplacentaria aparentemente no sucede^[7], siendo la ruta más común de infección

a través de la ingestión de alimentos contaminados con heces infectadas.

CONCLUSIONES

En las explotaciones lecheras del Estado Barinas las infecciones por RV y CV, ocurren en los becerros, siendo más prevalentes en aquellos que se encuentran en la primera semana de vida.

La detección de estos virus resultó ser independiente de las características de las heces, a pesar de que los hallazgos mostraron la tendencia a una mayor frecuencia de RV en heces acuosas y pastosas, que le sugieren algún grado de implicación en la diarrea neonatal bovina.

La frecuencia de infección por RV y CV, resultó ser independiente de la supervisión del consumo de calostro.

El reducido número de fincas encontradas con becerrerías individuales no permitió sacar conclusiones acerca del efecto del tipo de becerrera sobre la infección por RV y CV.

Las frecuencias de infección por RV y CV, en animales criados en becerrerías colectivas, no difieren significativamente bajo condiciones regulares o malas de higiene. Sin embargo, la no detección de becerros infectados donde la higiene fue buena, a pesar del escaso número de observaciones, aboga en favor de la buena higiene como medida de prevención.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Acres. S.D., Laing, C.J. Saunders. J.R. and Fiadostits, O.M. Acute Unidifferentiated Neonatal Diarrhea in Beef Calves I. Occurrence and Distribution of Infectious Agents. *Can. J. Com. Med.* 39 (2): 116-132, 1975.
- [2] Berschneider. H.M. and Robert. A. A pathobiological approach to the treatment of infections diarrhea in neonatal calf and pig. *Iowa State University Veterinarian*, 44: 66-76. 1982.
- [3] Blood. D.C. and Radostits, O.M. *Veterinary Medicine*. 7th Edition. Bailliere Tindall - W B. Saunders London pg: 864-872, 1989.
- [4] Bridger, J. and Woode. G. Neonatal calf diarrhea: Identification of reovirus like (rotavirus) agente in feaces by immunofluorescence and immune electron microscopy. *Br. Vet. J.* 13 (5): 528-535.
- [5] Carpio, M., Bellamy, J.E.C. and Babiuk. L.A. Comparative virulence of different bovine rotavirus isolates. *Can. J. Comp. Med.* 45 (1): 38-42, 1981
- [6] Chasey, D. and Davies, P. Atypical rotaviruses in pigs and cattle *Vet. Rec.* 114 (1): 16-17, 1984.
- [7] Dagenais, L., Patoret, P. Massip, A. and Kaeckenbeeck. A. Failure to isolate rotavirus from bovine meconium. *Vet. Rec.* 108 (1): 11-13, 1981.
- [8] Dea, S., Begin, M.E., Archambault. D., Elazhary. M.A.S. and Roy, R.S. Distinct rotaviruses isolated from asymptomatic calves. *Cornell Vet.* 75 (2): 307-318, 1985.
- [9] Dolan, K., Twist. F., Horton-Slight, P., Forrer, C., Bell, L., Plotkin, S. y Clak, H. Epidemiology of rotavirus electrophoretotypes determined by a simplified diagnostic technique with R.M.A. analysis. *J. Clin. Microbiol.* 21: 753-758, 1985.
- [10] Dubourguier, H.C., Couet, P.H., Mandard, O. Scanning electron microscopy of abomasum and intestine of gnotoxenic calves infected either with rotavirus, coronavirus or enteropathogenic *Escherichia coli* or with rotavirus and *E. coli*. *Ano. Rech. Vet.* 9: 441-451. 1978.
- [11] Flewett. T.A. and Woode. G.N. The rotaviruses: Brief review. *Arch. Virol.* 57: 1-23, 1978.
- [12] Gerna, G., Sarasini, A., Passarini. N., Torsellini. M., Parea, y Battaglia, M. Comparative evaluation of a commercial enzyme-linked immunosay and solid phase immune electron microscopy for rotavirus detection in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1137-1139. 1987.
- [13] Langpap, T.J., Bergeland, M.E. and Reed, D.E. Coronaviral enteritis of young calves; Virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. *Am. J. Vet. Res.* 40 (10): 1476-1478. 1979.
- [14] Logan, E.F. Pearson, G. and McNulty, M. Quantitative observations of experimental reovirus (rotavirus) infection in calostrum deprived calves. *Vet. Rec.* 104 (10): 206-209. 1978.
- [15] McNulty, M.S. Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 40: 1-18. 1978.
- [16] McNulty, M. y Logan. E. Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. *Vet. Rec.* 113: 333-335, 1983.
- [17] Mebus, E., Underdahl. N., Rhodes, M. y Twiehaus. M. Calf diarrhea (scours): Reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ. of Nebraska Res. Bull.* 233: 1-16. 1969.
- [18] Mebus, C.A., Stair, E.L., Rhodes. M.B. Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus like agent. *Am. J. Vet. Res.* 34: 145-150, 1973.
- [19] Reynolds, D.J., Chasey, E. Scott, A.C. and Bridger. J.C. Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine feces. *Vet. Res.* 114(16): 397-401, 1984.
- [20] Saif, J. Linda. A Review of evidence implicating Bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows. An enigma resolved. *Cornell Vet.* 80 N° 4: 303-311, 1990.
- [21] Smith, A.W., Mattson, D.E., Skilling, D.E. and Schmitz, J.A. Isolation and partial characterization of a calicivirus from calves. *Am. J. Vet. Res.* 44 (5): 851-855, 1983.
- [22] Snodgrass. D.R. and Wells. P.M. Passive immunity in rotaviral infection *J.A.V.M.A.* 173: 565-568.
- [23] Torres. A., Schlafer, D. and Mebus, C. Rotaviral and coronaviral diarrhea. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 1 (3): 471-493, 1985.
- [24] Woode, G.N. and Bridger. J. Viral enteritis of calves. *Vet. Rec.* 96. 85-88. 1975.
- [25] Woode, G.M. Epizootiology of bovine rotavirus infection. *Vet. Rec.* 103 (3): 44-46, 1978.