

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE REACTIVIDAD CRUZADA EN CERDAS VACUNADAS CONTRA ROTAVIRUS PORCINO CEPA OSU

Detection of Cross-reactive Antibodies in Sows Vaccinated Against Porcine Rotavirus Strain OSU

Mayra Hidalgo¹, Juan Aponte¹, Pedro Ramos¹ y Ferdinando Liprandi²

¹Laboratorio de Virología, Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP-FONAIAP, Apdo. 70. Maracay 300, Edo. Zulia, Venezuela.

²Laboratorio de Biología de Virus, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC, Apartado 21827 Caracas 1020-A, Edo. Zulia, Venezuela.

RESUMEN

Los rotavirus son los principales agentes virales productores de diarrea en lechones entre 3 a 6 semanas de edad, por lo que una de las principales estrategias para controlar la enfermedad es la vacunación de las madres antes del parto, con el fin de incrementar el efecto protector de los anticuerpos calostrales. En el presente trabajo se evaluó la respuesta inmunitaria contra cepas de rotavirus porcino (138, Gottfried, OSU, 253) y no porcino (WA, DS-1, RRV, NCDV) de diferentes serotipos P y G, en calostros y sueros sanguíneos de cerdas inmunizadas por vía parenteral, con una vacuna experimental oleosa monovalente contenida de la cepa porcina OSU (P9,G5). Mediante pruebas de neutralización por reducción de focos infecciosos (NRFI) se demostró que la vacunación fue capaz de estimular la producción de anticuerpos contra los serotipos porcinos y no porcinos, de una manera eficiente y que esta respuesta puede estar dirigida contra los antígenos VP4 y/o VP7.

Palabras clave: Rotavirus, vacunación, inmunidad cruzada.

ABSTRACT

Rotavirus are the principal cause of viral diarrhea in piglets of 3 to 6 weeks of age, because of that one strategie to control infection is vaccination of pregnant sows in order to increase the passive protection through calostrual antibodies. In the present study it was evaluated the antibody response to porcine (138, Gottfried, OSU, 253) and non-porcine (WA, DS-1, RRV, NCDV) rotaviral strains belonging to different P and G serotypes in calostrum and serum of sows immunized parenterally with an experimental monovalent oil-vaccine based on the porcine strain OSU

(P9,G5). Neutralization by focus reduction assays showed that the vaccine induced high titer of neutralizing antibodies against the porcine and non-porcine serotypes by efficient way and this response could be directed against VP4 and/or VP7 antigens.

Key words: Rotavirus, vaccination, cross-reactive immunity.

INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis rotaviral es una enfermedad que afecta principalmente a niños y a individuos jóvenes de una gran variedad de especies animales [9]. Los rotavirus de origen porcino están distribuidos a nivel mundial; en Venezuela, el primer reporte de enfermedad rotaviral en cerdos fue realizado en 1984 [22] y se conoce que son los agentes causales del 20-30% de los casos de diarrea en lechones en edades comprendidas entre las 3 a 6 semanas [16]. Los signos clínicos en los lechones lactantes son menos severos que en los de mayor edad, en lechones destetados la severidad de la diarrea por rotavirus se incrementa.

Los rotavirus poseen dos proteínas de cápside externa VP4 y VP7, que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes de manera independiente; en base a estas dos proteínas, dichos virus se han clasificado en serotipos P por la VP4 y serotipos G por la VP7 [21].

Muchos estudios experimentales en animales muestran que la inmunización con rotavirus vivo o inactivado, o con proteínas rotavirales específicas, inducen en la producción de calostro y de leche, un nivel de anticuerpos neutralizantes tal que protege pasivamente contra la diarrea [4, 18]. Los anticuerpos maternos presentes en el calostro y la leche, probablemente protegen contra la diarrea severa bajo condiciones de infección natural [14].

Dada la importancia del calostro para conferir inmunidad a los lechones y debido a la complejidad antigénica de los rotavirus (VP4 y VP7) se planteó como objetivo, determinar la especificidad de anticuerpos neutralizantes contra cepas de diferentes serotipos de rotavirus porcinos y no porcinos, en sueros y calostros de cerdas controles y vacunadas con una vacuna experimental monovalente contra rotavirus cepa OSU(P9,G5).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de sueros y calostros

Se recolectaron 22 muestras de suero sanguíneo y calostros de cerdas adultas, vacunadas o no contra rotavirus. 10 animales fueron inoculados con una vacuna experimental oleosa, conteniendo como antígeno la cepa de rotavirus porcino OSU, perteneciente al serotipo P9 por VP4 y G5 por VP7 (P9,G5), utilizando como adyuvante aceite mineral marcol al 30% y como emulsificante montanide 800 al 30%. El esquema de inmunización fue de una vacunación, aproximadamente a las 6 y 2 semanas antes del parto, con 5 ml de la suspensión por vía intramuscular, conteniendo $1,3 \times 10^7$ unidades formadoras de placa por ml (ufp/ml). Se dejaron 12 cerdas sin inocular para ser utilizadas como controles de la prueba. Las muestras de los animales vacunados y controles fueron tomadas al momento del parto, se inactivaron a 56°C por 30 minutos y se congelaron a -20C hasta su procesamiento.

Seroneutralización por reducción del número de focos infecciosos (NRFI)

Para determinar el título neutralizante de los anticuerpos (Ac) contra rotavirus presentes en los sueros y calostros, se siguió el protocolo de Gerna y cols. [11]. En una placa de 96 pozos se hicieron diluciones dobles de suero o calostro, en un medio de mantenimiento (Eagle-MEM), desde 1:50, por duplicado. Se agregó un volumen igual de la dilución viral que contenía aproximadamente 100 unidades formadoras de foco fluorescente en 0,1 ml (100 ffu/0,1 ml) y se incubó dicha mezcla por 2 horas a 37°C, en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Las cepas de rotavirus utilizadas en el ensayo fueron: Porcinas: Gottfried (P2b,G4), 138 (P9,G3), OSU (P9,G5), 253 (P9,G11). Humanas: Wa (P1A,G1), DS-1 (P1B,G2), Simia RRV (P5,G3) y Bovina NCDV (P6,G6).

Una vez cumplido el tiempo de incubación se inocularon 100 µl de esta mezcla en una placa de 96 pozos, sembrada con células MA-104 (línea celular de riñón de mono Rhesus), la cual fue previamente lavada con buffer fosfato salino (PBS). En la primera fila de la placa se inocularon 100 µl por pozo de la dilución establecida de virus (control de uff). Se incubó por 16 a 24 horas a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂.

Al día siguiente, se descartó el inóculo y se lavaron las placas con PBS. Se agregaron 50 µl de metanol helado por pozo y se dejó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se la-

varon las células con PBS y se agregaron 50 µl/pozo de suero hiperinmune producido en conejo contra rotavirus porcino cepa OSU, a una dilución 1:500. Se incubaron las placas a 37°C por una hora, luego se lavaron con PBS y se agregaron 50 µl de inmunoglobulina anti-conejo conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Immunochemical) a una dilución 1:100. Se incubaron a 37°C por 2 horas, al cabo de las cuales se contaron las células teñidas para obtener las unidades infecciosas en 0,1 ml.

El título neutralizante del suero o calostro se expresó como el recíproco de la mayor dilución en la que hubo $\geq 66\%$ de reducción en el número de focos infecciosos con relación a los controles de virus. El valor de corte se escogió para la dilución 1:100, por lo tanto un suero o calostro que neutraliza un determinado serotipo de rotavirus a la dilución 1:100, se considera positivo.

Análisis estadístico

Prueba no paramétrica de U de Mann y Whitney para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de anticuerpos de los sueros y los calostros [20].

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de neutralización para los sueros de las cerdas controles mostraron, que la mayoría tenía anticuerpos neutralizantes (AcN) pre-existentes contra las cepas porcinas de rotavirus: 55% para la cepa Gottfried, 82% para la cepa 253, 100% para 138 y OSU, TABLA I. El porcentaje de seroreactores contra las cepas de rotavirus no porcinas se distribuyó de la siguiente manera: 18% para RRV, 55% para Wa y 77% para NCDV. Ninguno de los animales tuvo anticuerpos contra la cepa humana DS-1.

Para las hembras vacunadas, se determinó que el 100% de los animales tienen anticuerpos séricos contra los cuatro serotipos porcinos y el 100% responden a cada una de las cepas no porcinas Wa, DS-1 y NCDV, un 90% de ellas seroconvierten a la cepa simia RRV.

Con relación a la respuesta de anticuerpos en calostro, TABLA II, se observó que el 100% de los animales controles tuvieron anticuerpos contra los rotavirus porcinos y no porcinos, a excepción de un 92%, que no responden a la cepa simia RRV. El 100% de los calostros de las hembras vacunadas, tienen anticuerpos contra las cepas porcinas y no porcinas.

La TABLA III muestra la especificidad de la respuesta inmunitaria (cuántas cepas son neutralizadas por el suero de cada animal), se encontró que en los animales controles: 7 hembras tienen AcN contra 3 cepas y 4 contra las 4 cepas porcinas utilizadas en el ensayo. No se encontraron controles adultos negativos para los rotavirus porcinos. En relación a la especificidad de la respuesta sérica en las hembras controles

TABLA I
PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA DIFERENTES CEPAS DE ROTAVIRUS EN SUEROS DE CERDAS ADULTAS

	Porcentaje de sueros que neutralizan* la cepa de RV indicada								
	Rotavirus Porcinos					Rotavirus No Porcinos			
	N	138	GOTT	OSU	253	WA	DS-1	RRV	NCDV
	P9,G3	P2b,G4	P9,G5	P9,G11	P1A,G1	P1b,G2	P5,G3	P6,G6	
CONT	11	100	55	100	82	55	0	18	77
VAC	10	100	100	100	100	100	100	90	100

* Un suero se consideró neutralizante si a la dilución 1/100 reduce $\geq 66\%$ de los focos infecciosos en el ensayo de NRFI.

TABLA II
PRESENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA DIFERENTES CEPAS DE ROTAVIRUS EN CALOSTROS DE CERDAS ADULTAS

	Porcentaje de calostros que neutralizan* la cepa indicada								
	Rotavirus Porcinos					Rotavirus No Porcinos			
	N	138	GOTT	OSU	253	WA	DS-1	RRV	NCDV
	P9,G3	P2b,G4	P9,G5	P9,G11	P1A,G1	P1B,G2	P5,G3	P6,G6	
CONT	13	100	100	100	100	100	100	92	100
VAC	9	100	100	100	100	100	100	100	100

* Un calostro se consideró neutralizante si a la dilución 1/100 reduce $\geq 66\%$ de los focos infecciosos en el ensayo de NRFI.

TABLA III
ESPECIFICIDAD DE AcN CONTRA ROTAVIRUS EN SUEROS DE CERDAS ADULTAS

	n	N° de sueros que neutralizan el N° de cepas * indicado									
		RV porcinos					RV no porcinos				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
CONT	11	0	0	0	7	4	2	4	3	2	0
VAC	10	0	0	0	0	10	0	0	0	1	9

*Un suero se consideró positivo cuando a la dilución 1/100 neutraliza $\geq 66\%$ de los focos infecciosos en el ensayo de NRFI.

contra las cepas no porcinas se observó que 2 animales no mostraron anticuerpos contra ninguna de las cepas utilizadas en el ensayo, 4 respondieron a una sola cepa, 3 tienen anticuerpos contra 2 cepas, 2 contra 3 cepas y ninguna presentó anticuerpos contra las 4 cepas.

En cuanto a la especificidad de la respuesta en las hembras vacunadas, se encontró que los 10 animales tienen anticuerpos contra las cuatro cepas porcinas. Para las cepas no porcinas, hubo 9 animales con anticuerpos contra las cuatro cepas y un animal con anticuerpos contra tres cepas.

La especificidad de la respuesta a nivel de calostro, TABLA IV, indicó que todos los animales, vacunados y controles, tienen anticuerpos contra las cuatro cepas porcinas y las cuatro no porcinas, a excepción de un animal que responde a tres cepas no porcinas.

Las FIGS. 1 y 2 muestran los títulos de AcN detectados en suero y calostro de cerdas controles y vacunadas, para las diferentes cepas utilizadas en el ensayo.

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de AcN en sueros y calostros se realizó la prueba U de Mann-Whitney [20]. Los resultados se señalan en las TABLAS V y VI, observándose un incremento importante de los niveles de AcN por efecto de la vacunación, el cual se evidencia principalmente a nivel del calostro.

DISCUSIÓN

La inmunidad lactogénica provee protección pasiva a los lechones contra las infecciones intestinales producidas por rotavirus y por otros patógenos entéricos [13]. Los lechones nacen aganmaglobulinémicos y absorben las inmunoglobulinas del calostro a través de las células epiteliales del intestino delgado. Una gran proporción de anticuerpos específicos contra rotavirus que están presentes en el calostro, son transportados al sistema circulatorio de los lechones recién nacidos, resultando en una correlación entre el nivel de anticuerpos séricos de los neonatos y el nivel de anticuerpos calostrales [10].

TABLA IV
ESPECIFICIDAD DE AcN CONTRA ROTAVIRUS EN CALOSTROS DE CERDAS ADULTAS

		N° de calostros que neutralizan el N° de cepas* indicado									
		RV porcinos					RV no porcinos				
	n	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
CONT	13	0	0	0	0	13	0	0	0	1	12
VAC	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9

* Un suero se consideró positivo cuando a la dilución 1/100 neutraliza $\geq 66\%$ de los focos infecciosos en el ensayo de NRFI.

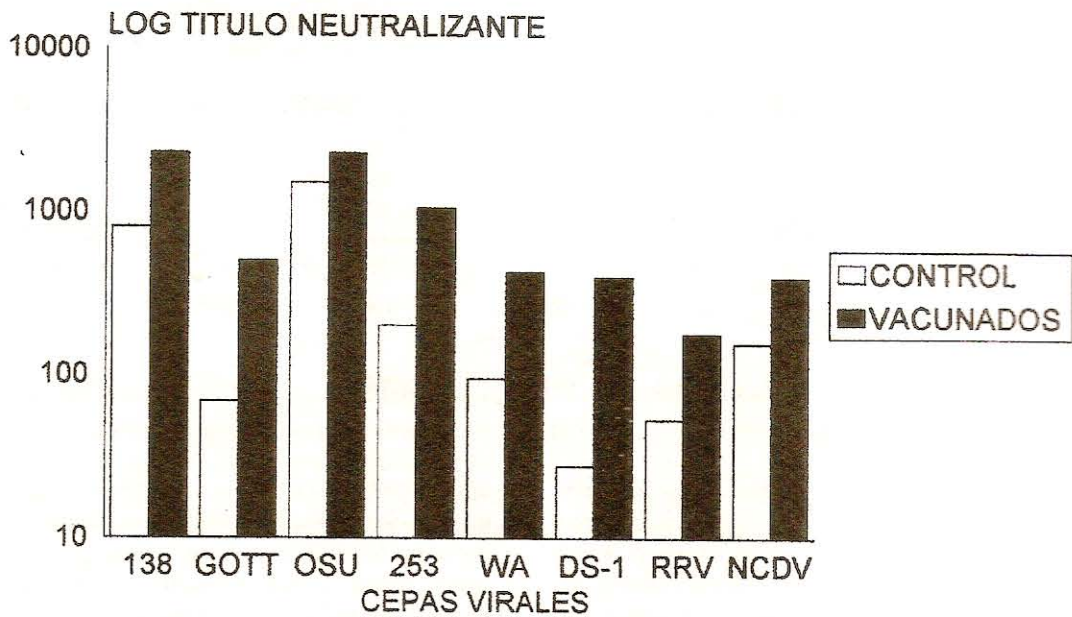


FIGURA 1. TÍTULOS DE AcN EN SUEROS DE CERDAS VACUNADAS CON ROTAVIRUS OSU.

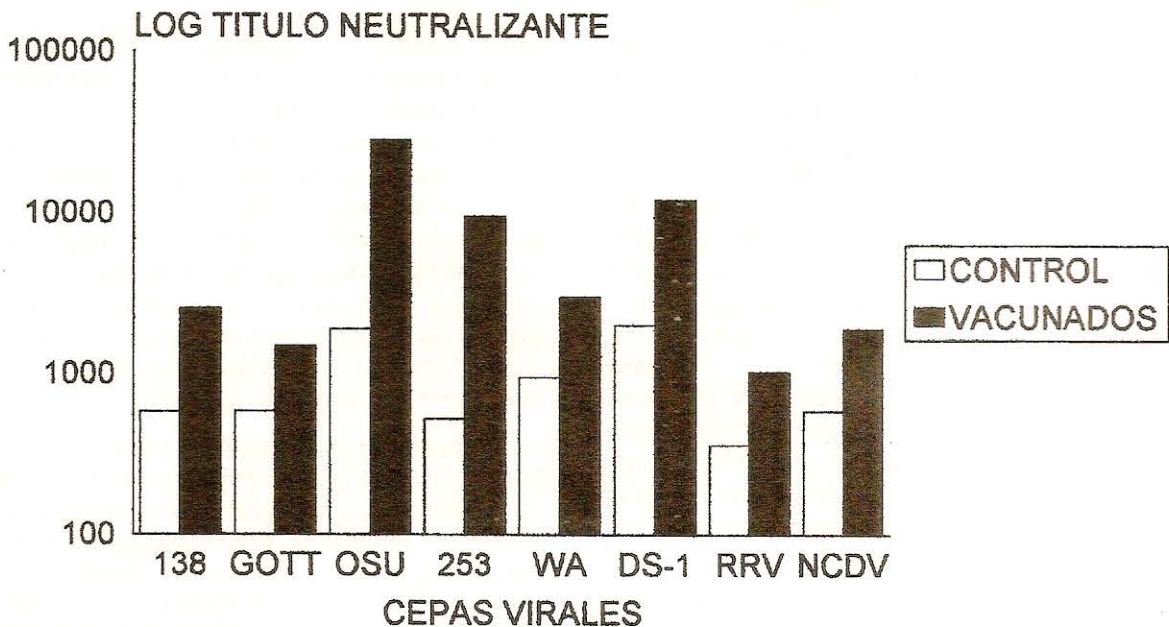


FIGURA 2. TÍTULOS DE AcN EN CALOSTROS DE CERDAS VACUNADAS CONTRA ROTAVIRUS OSU.

TABLA V
NIVELES DE AcN EN SUEROS DE CERDAS VACUNADAS CONTRA ROTAVIRUS CEPAS OSU. TEST DE MANN-WHITNEY

		Medianas															
		Cepas Porcinas						Cepas No Porcinas									
NIVEL	n	138	p	GOTT	p	OSU	p	253	p	Wa	p	DS-1	p	RRV	p	NCDV	p
CONT	11	1600		100		1600		200		100		0		50		100	
			*		***		ns		**		*		***		**		***
VAC	10	3200		600		3200		1600		600		200		150		600	

ns. No significativa * : significativo P< 0,05 ** : muy significativo P<0,01 ***: extremadamente significativo P< 0,001.

TABLA VI
NIVELES DE AcN EN CALOSTROS DE CERDAS VACUNADAS CONTRA ROTAVIRUS CEPAS OSU. TEST DE MANN-WHITNEY

		Medianas															
		Cepas Porcinas						Cepas No Porcinas									
NIVEL	n	138	p	GOTT	p	OSU	p	253	p	Wa	p	DS-1	p	RRV	p	NCDV	p
CONT	13	800		800		1200		200		800		1600		400		800	
			**		ns		***		***		ns		**		*		*
VAC	9	3200		1600		51200		6400		3200		25600		1600		1600	

ns. No significativa * : significativo P< 0,05 ** : muy significativo P<0,01 ***: extremadamente significativo P< 0,001.

Aunque los neonatos tengan altos niveles de anticuerpos séricos específicos contra rotavirus, la cantidad de anticuerpos calostrales protectores presentes en la luz del intestino, es de gran importancia para prevenir las infecciones por estos agentes. Las pruebas de neutralización, en el caso de rotavirus, detectan anticuerpos contra las dos proteínas de cápside externa VP4 y VP7, las mismas son responsables de manera independiente, de las especificidades de neutralización.

En relación al análisis de los anticuerpos neutralizantes contra rotavirus en sueros y calostros de cerdas adultas controles, se observó que el 100% mostró anticuerpos neutralizantes, lo cual puede explicarse por las infecciones sucesivas con estos agentes a lo largo de toda la vida. En pruebas de neutralización y ELISA en varias especies animales, se ha comprobado que el 100% de los individuos adultos muestran evidencia serológica de infecciones naturales por rotavirus [1,2,10]. Los resultados obtenidos muestran además, que hay mayor respuesta contra los serotipos G3 y G5, que predominan en las cepas aisladas en cerdos de granjas en Venezuela [7], otra posibilidad es, que la respuesta observada sea contra la VP4 común P9, compartida por las cepas 138, OSU y 253. Zaberezhny y col. [23], reportaron que el serotipo P9 es bastante común dentro de los rotavirus cultivables, en los rotavirus que producen infección natural y en los rotavirus asociados con diarreas en cerdos.

La respuesta simultánea de anticuerpos contra las cepas porcinas sugiere que los cuatro serotipos están presentes en la granja, o que las exposiciones repetidas de los animales

con un serotipo de rotavirus, estimule la aparición de anticuerpos de reactividad cruzada contra cepas porcinas de diferente serotipo. Además se conoce que las proteínas VP4 y VP7 contienen regiones que estimulan la producción de anticuerpos serotipo específicos y de reactividad cruzada [7].

El hecho de encontrar anticuerpos neutralizantes contra cepas no porcinas, sugiere la producción de anticuerpos de reactividad cruzada por exposición a cepas porcinas o la existencia de cepas pertenecientes a estos serotipos, que aún no se han aislado en cerdos. En 1994, Ciarlet y Liprandi [8] caracterizaron dos cepas porcinas aisladas en Argentina, del serotipo G1, que se suponía agrupaba cepas que afectaban únicamente a humanos. Por esta razón, no se debe excluir la posibilidad de que existan cepas porcinas de los serotipos G2 y G6 que todavía no se hallan reportado. La infección de cerdos con una cepa humana, simia o bovina es una explicación poco probable para estos resultados, ya que en la mayoría de los casos, la infección es especie específica. La prevalencia para serotipos heterotípicos ha sido reportada con anterioridad para otras especies animales [3, 5, 6, 12].

En relación a las hembras vacunadas, hubo un importante incremento en los niveles de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus, que se pone de manifiesto principalmente en el calostro. En cerdos, la infección por rotavirus ocurre en la mayoría de los casos en lechones, entre 3 y 6 semanas de edad, presentándose poco en lechones menores de 10 días. Esta situación se explica por la presencia de anticuerpos maternos en el intestino, los cuales los protegen contra las infec-

ciones rotavirales durante las primeras semanas de vida [14]. Es por ello que la vacunación de las cerdas antes del parto se utiliza como estrategia efectiva para incrementar los niveles de anticuerpos específicos contra rotavirus en el calostro y la leche, para de esta manera, mantener a los lechones lactantes protegidos durante un mayor tiempo. Además, por inoculación parenteral de las cerdas, se logra que el nivel de anticuerpos heterotípicos o de reactividad cruzada, sea mayor que con la inoculación oral, lo que ha sido demostrado por varios investigadores [15,19]. En el presente trabajo, la vacunación amplió e hizo más eficiente el espectro de respuesta de los anticuerpos neutralizantes contra los serotipos no porcinos. Presumiblemente, la capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes contra VP4 y/o VP7, depende de la cantidad de antígeno disponible para el sistema inmune, ya que por vía oral los rotavirus pueden inactivarse por los ácidos estomacales, y también depende de la forma en la cual el antígeno es inicialmente presentado al sistema inmune por las células presentadoras de antígeno peritoneales o intestinales [17].

CONCLUSIONES

El análisis de los anticuerpos séricos y calostrales en los animales vacunados demostró, que la vacunación con una sola cepa de rotavirus porcino es capaz de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes contra serotipos porcinos y no porcinos de una manera eficiente. Esta respuesta puede estar dirigida contra VP7 y/o VP4.

RECOMENDACIONES

Establecer un programa de vacunación de las hembras gestantes a fin de incrementar la inmunidad lactogénica.

Programa de vacunación de los lechones destetados, para estimular la inmunidad activa contra rotavirus.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARCHAMBAULT, D.; MORIN, G.; ELAZHARY, Y.; ROY, R.; JONCAS, J. Immune response of pregnant heifers and cows to bovine rotavirus inoculation and passive protection to rotavirus infection in newborn calves fed colostrum antibodies or colostrum lymphocytes. **Am. J. Vet. Res.** 49:1084-1091. 1988.
- [2] BEARS, G.; KING, J.; MAZHAR, S.; LANDON, J.; DESSELBERGER, U. Homotypic and heterotypic immune responses to group A rotaviruses in parenterally immunized sheep. **Vaccine.** 11: 262-266. 1993.
- [3] BEARS, G.; XU, L.; BALLARD, A.; DESSELBERGER, U.; MCCRAE, M. A serotype 10 human rotavirus. **J. Clin. Microbiol.** 30: 14322-1435. 1992.
- [4] BOTH, G.; LOCKETT, L.; JANARDHANA, V.; EDWARDS, S.; BELLAMY, A.; GRAHAM, F.; PREVEC, L.; ANDREW, M. Protective immunity to rotavirus-induced diarrhoea is passively transferred to newborn mice from naive dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7sc. **Virology.** 193:940-950. 1993.
- [5] BRUSSOW, H.; EICHHORN, W.; ROHWEDDER, A.; SNODGRASS, D.; SIDOTI, J. Cattle develop neutralizing antibodies to rotavirus serotypes which could not be isolated from faeces of symptomatic calves. **J. Gen. Virol.** 72:1559-1567. 1991.
- [6] BRUSSOW, H.; WALTHER, I.; FRYDER, V.; SIDOTI, J.; BRUTTIN, A. Cross-neutralizing antibodies induced by single serotype vaccination of cows with rotavirus. **J. Gen. Virol.** 69:1647-1658. 1988.
- [7] CIARLET, M.; HIDALGO, M.; LIPRANDI, F. Cross-reactive, serotype- and monotype-specific neutralization epitopes on VP7 of serotype G3 and G5 porcine rotavirus strains. **Arch. Virol.** 141:601-614. 1996.
- [8] CIARLET, M.; LIPRANDI, F. Serological and genomic characterization of two porcine rotavirus with serotype G1 specificity. **J. Clin. Microbiol.** 32:269-272. 1994.
- [9] ESTES, M. Rotaviruses. In: **Virology**, Chapter 544. 3ª ed. B.N. Fields; D.M. Knipe; R.M. Howley (ed), Raven Press, New York: 1625-1708. 1996.
- [10] FU, Z.; HAMPTON, D. Transfer of maternal antibody against group A rotavirus from sows to piglets and serological response following natural infection. **Vet. Sci.** 48: 365-373. 1990.
- [11] GERNA, G.; BATTAGLIA, M.; MILENESI, G.; PASARINI, N.; PERCIVALLE, E.; CATTANEO, E. Serotyping of cell culture-adapted subgroup 2 human rotavirus strains by neutralization. **Infection Immunity.** 43:722-729. 1984.
- [12] GERNA, G.; SARASINI, A.; PAREA, M.; ARISTA, S.; MIRANDA, P.; BRUSSOW, H.; HOSHINO, Y.; FLORES, J. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. **J. Clin. Microbiol.** 30:9-16. 1992.
- [13] HESS, R.; BACHMANN, P. Distribution of antibodies to rotavirus in serum and lacteal secretions of naturally infected swine and their suckling pigs. **Am. J. Vet. Res.** 42: 1149-1159. 1981.
- [14] HIDALGO, M.; CIARLET, M.; LUDERT, J.; LIPRANDI, F. Respuesta inmunitaria humoral en lechones contra rotavirus. **Revista Científica.** Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. 6(2):117-123. 1996.
- [15] LECCE, J.; LEARY, H.; CLARE, D.; BATEMA, R. Protection of agammaglobulinemic piglets from porcine rotavi-

- rus infection by antibody against simian rotavirus SA-11. **J. Clin. Microbiol.** 29:1382-1386. 1981.
- [16] LIPRANDI, F.; GARCÍA D.; BOTERO, L.; GORZIGLIA, M.; CAVAZZA, M.; PÉREZ-SCHAEL, I.; ESPARZA, J. Characterization of rotaviruses isolated from pigs with diarrhoea in Venezuela. **Vet. Microbiol.** 13:35-45. 1987.
- [17] OFFIT, P. Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease. **Advances in Virus Research.** 44:161-202. 1994.
- [18] SAIF, L.; REDMAN, D.; SMITH, K.; THEIL, K. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized and unimmunized cows. **Infection Immunity.** 41:1118-1131. 1983.
- [19] SCHALLER, J.; SAIF, L.; CORDLE, C.; CANDLER, E.; WINSHIP, T.; SMITH, K. Prevention of human rotavirus-induced diarrhea in gnotobiotic piglets using bovine antibody. **J. Infect. Dis.** 165:623-630. 1992.
- [20] SIEGEL, S. El caso de dos muestras independientes. Cap. VI. In: **Estadística no paramétrica aplicada a las Ciencias de la Conducta.** 2ª Edición. 7ª Reimpresión. Editorial Trillas, México. 344 pp. 1982.
- [21] TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S. Species specificity and interspecies relatedness in VP4 genotypes demonstrated by VP4 sequence analysis of equine, feline and canine rotavirus strains. **Virology.** 200:390-400. 1994.
- [22] UTRERA, V.; MAZZALI, R.; GORZIGLIA, M.; ESPARZA, J. Epidemiological aspects of porcine rotavirus infection in Venezuela. **Res. Vet. Sci.** 36:310-315. 1984.
- [23] ZABEREZHNY, A.; LYOO, Y.; PAUL, P. Prevalence of P type among porcine rotavirus using subgenomic VP4 gene probes. **Vet. Microbiol.** 39:97-110. 1994.