

141
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PROTECCION CONTRA ROTAVIRUS CONFERIDA
POR INMUNOGLOBULINAS SERICAS ESPECIFICAS
ADMINISTRADAS POR VIA ORAL EN LECHONES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ANGEL MIRANDA ROMAN

ASESORES:

DR. HECTOR BARBOSA NAJERA
M. V. Z. ROBERTO MARTINEZ GAMBA

MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	19
DISCUSION Y CONCLUSIONES	20
CUADROS	22
GRAFICAS	25
FIGURAS	26
BIBLIOGRAFIA	29

RESUMEN

Miranda Román Angel. Protección contra rotavirus conferida por inmunoglobulinas séricas específicas administradas por vía oral en lechones. (Bajo la dirección de: Héctor Barbosa Nájera y Roberto Martínez Gamba)

En el presente trabajo se estudió el efecto de inmunoglobulinas específicas administradas en forma pasiva por vía oral a lechones convencionales, ante un reto controlado y cuantificado de rotavirus.

Para obtener las inmunoglobulinas se inmunizaron tres cerdos, inyectándoles 40 mg de rotavirus porcino en seis ocasiones, dando un estímulo cada 15 días. Ocho días después de la última inoculación se sacrificaron en el rastro obteniendo la sangre, separando el suero y posteriormente precipitando las inmunoglobulinas con sulfato de amonio, estas se conservaron en congelación hasta su utilización.

Para la producción de rotavirus necesario para el reto, a tres lechones recién nacidos y privados de calostro se les inoculó por vía oral 1 ml del virus, proveniente de un cultivo en células MA-104. A las 20-36 horas los lechones presentaron diarrea fluída la cual se colectó y después de confirmar la presencia de rotavirus, la diarrea se congeló para su posterior utilización.

Para el objetivo inicial, se utilizaron tres camadas de lechones convencionales, de las cuales la mitad de cada una se utilizó como experimental y la otra mitad como testigo; a los animales experimentales, diariamente durante los primeros cinco días de vida se les administraron cuatro gramos de inmunoglobulinas específicas contra rotavirus por vía oral; dos horas después de la última toma, se reto a todos los lechones con cinco mililitros de diarrea colectada de los animales previamente mencionados. Los lechones no presentaron signos de enfermedad por lo que a las 72 horas se procedió a tomar una muestra diaria de heces a todos los animales, en las cuales se comprobó por rotaforesis que el 21% de los animales experimentales eliminaron el virus, contra el 100% de los

testigos. Con estos resultados y de acuerdo a la información científica existente en referencia al rotavirus como agente etiológico causante de diarrea. Se puede pensar que el rotavirus porcino es poco virulento en cerdos convencionales no así en cerdos privados de calostro y/o gnotobióticos. Por la forma subclínica e irregular en que los lechones eliminaron el virus, se puede suponer que en una granja los animales se reinfectan uno a otro en forma subclínica, presentandose la enfermedad en forma clínica cuando se encuentre una población susceptible ó bien cuando se reúnan las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo.

INTRODUCCION

En los países en vías de desarrollo, los problemas clínicos más comunes durante las primeras etapas de vida son las diarreas, en este sentido tanto el niño como las especies pecuarias que interesan al hombre para la producción de alimentos son especialmente susceptibles (33).

En humanos se ha demostrado que el rotavirus, es el agente etiológico de casi el 20% de gastroenteritis infecciosas agudas en niños menores de 5 años de edad, aunque en países que tienen muy marcados los cambios estacionales se ha encontrado que el porcentaje de gastroenteritis por rotavirus puede aumentar hasta un 50% en los meses fríos del año (4, 10, 16, 17, 18, 39).

House (23) menciona que, en becerros el rotavirus es una de las principales causas de morbilidad; encontrándose que como agente único ocasiona un 5% de mortalidad, pero que cuando se asocia con otro agente infeccioso esta mortalidad se eleva a un 55% en rotavirus con E. coli, 75% en rotavirus con Salmonella y 35% rotavirus con coronavirus. Estas variables abarcan a las demás especies de animales domésticos y son muy similares entre ellas.

Ahora bien, dentro del marco carencial de proteínas de origen animal que padece nuestro país, merece especial atención la producción porcina, ya que la carne de cerdo es un excelente almacén de proteínas, vitaminas, minerales y grasas. Así mismo en la mayoría de los países latinoamericanos y de otras partes del mundo, forma parte importante en la dieta alimenticia constituyendo su consumo un hábito difícil de sustituir (9).

En México, la etapa más crítica en las explotaciones porcinas abarca el periodo del nacimiento de los lechones a su destete, durante el cual se presentan mortalidades hasta de un 23% en granjas de clima tropical y un 28.37% en granjas de clima templado (1).

La importancia del estudio de las enfermedades infecciosas radica en que la mortalidad de los lechones representa una de las principales pérdidas en las explotaciones porcinas llegando a un 25% del total de los lechones nacidos vivos. Dentro de las principales causas de mortalidad se encuentran los problemas entéricos y entre estas las causadas por rotavirus (51).

El género rotavirus se encuentra clasificado dentro de la familia reoviridae la cual se caracteriza por poseer ARN de doble cadena, compuesta de 11 segmentos con un peso molecular aproximado de 11×10^6 (24, 25).

El nombre de rotavirus, (del latín rota = rueda) se basa en la apariencia que presenta en el microscopio electrónico el borde externo de su cápside, que simula el aro que cubre a los rayos que emergen del centro parecido a un cubo de rueda. Las partículas tienen una cápside de doble envoltura y su diámetro es de aproximadamente de 60-70 nm. Las partículas virales de una sola envoltura en las que falta la cápside externa muestran bordes rugosos y tienen 50-60 nm, el centro de las partículas es de 33-40 nm de diámetro (1, 2, 3, 24, 25, 29).

De acuerdo al patrón de migración de los 11 segmentos de ARN de doble banda observados por electroforesis en geles de poliacrilamida es posible detectar de que especie se trata (24, 38, 40).

La presencia de partículas de rotavirus en muestras fecales diarréicas y en el epitelio intestinal pueden demostrarse por microscopía electrónica, así mismo para descubrir estos virus y sus anticuerpos se puede utilizar las siguientes técnicas: análisis enzimático ligado a inmunoabsorbentes (ELISA), cortes congelados de intestino delgado (ye-yuno), anticuerpos fluorescentes (FA), frotis fecales y rotaforesis (19, 27, 32, 36).

Todos los rotavirus comparten un antígeno común asociado con la cápside interna, demostrable mediante la prueba de fijación de complemento, anticuerpos fluorescentes, inmunodifusión y microscopía elec-

trónica utilizando anticuerpos contra rotavirus.

Para la replicación del virus in vivo se han utilizado lechones recién nacidos teniéndose problemas con estos debido a la transferencia de anticuerpos en el calostro y leche maternos y a la gran incidencia de diarreas de diferentes etiologías que afectan a éstos, prefiriéndose la utilización de lechones gnotobióticos o lechones privados de calostro (lechones cachados); para la replicación in vitro se utilizan células de riñón de cerdo (PK-15), y células de riñón de embrión de mono rhesus (MA-104), estos cultivos se utilizan principalmente la prueba de neutralización por anticuerpos y se ha visto que la administración al medio de pancreatina, tripsina, quimiotripsina y DEAE-dextran favorecen la replicación del virus ya que hay una mayor infección de las células (7, 8, 19, 34, 44, 46, 49, 50, 55).

Los virus son muy resistentes ya que soportan variables de PH de 3-9, en la materia fecal pueden resistir durante 30 minutos a 60 °C y de 7-9 meses a 18-20 °C, bajo condiciones de la granja los virus infectantes pueden estar presentes en las heces fecales, la desinfección aún no esta completamente clara aunque es probable que tenga éxito.

Los desinfectantes de hospitales tales como el etanol al 95% y un compuesto fenólico clorinado 0.05 por volumen son más efectivos que el formaldehído al 4% o 10% para la inactivación de SA-11. Una solución de hipoclorito de sodio conteniendo 11% de disponibilidad de cloro no fué efectivo en reducir la infección de rotavirus de los corderos.

Sin embargo en otro estudio desinfectantes a base de hipoclorito fueron efectivos para inactivar los rotavirus de humanos (25, 29).

También es resistente a desinfectantes a base de yodo, sin embargo es inactivado por medio de la pasteurización a 63 °C por 30 minutos (56).

Pueden presentarse las infecciones de especies cruzadas en inoculaciones experimentales, pero no se ha establecido si esto ocurre en la naturaleza (24).

La expansión del virus entre animales es a través de las heces fecales a la cavidad oral. El virus es resistente a los efectos del medio ambiente tales como el PH, enzimas proteolíticas, a las cuales se ha adaptado para sobrevivir en el intestino delgado. Se replica en el citoplasma de los enterocitos y alteran sus mecanismos de transporte, las células dañadas pueden descargar dentro de la luz intestinal una gran cantidad del virus los cuales aparecen en las heces. La diarrea causada por rotavirus puede deberse a la destrucción de manera selectiva de las células del extremo vellositario disminuyendo - así la absorción de sustancias tales como el fierro, grasas, glucosa y sodio, la deficiente absorción de estos elementos aunada a la de otros productos de la fermentación intensifican la fuerza osmótica atrayendo fluidos a la luz intestinal desarrollandose la diarrea (24, 25, 29, 31, 33, 47, 48, 56).

El periodo de incubación en terneros gnotobióticos inoculados - por vía oral es de una 20 horas, advirtiendose en un principio cierto grado de depresión, comen lentamente y tienen diarrea líquida amarillenta, los animales aparecen débiles, deshidratados y deprimidos 42-96 horas después del comienzo de la diarrea (23, 55).

La diarrea causada por rotavirus afecta principalmente a lechones de una a ocho semanas de edad y raramente ocurre en animales menores de una semana o mayores de ocho y adultos, siendo su presentación más común en condiciones de medio ambiente adversos como los meses fríos y en presencia de suciedad. Los signos clínicos que se presentan son: anorexia, diarrea acuosa o pastosa y blanca o amarillenta con duración de pocas horas a varios días, renuncia a moverse y ocasionalmente vómito además de una severa deshidratación la severidad de los signos - clínicos se puede modificar por la complicación de E. coli enteropatógena y el virus de la Gastroenteritis Transmisible (GET), los que con frecuencia se ven asociados a la diarrea rotaviral (14, 36, 47, 48, 55).

En otros estudios se menciona que los lechones enfermos no pierden el apetito y permanecen alertas durante las infecciones. A menudo los recién nacidos manifiestan infecciones subclínicas debido tal vez a la presencia de anticuerpos maternos (50).

El lechón al momento de nacer se ve expuesto a problemas de sobrevivencia por lo que tiene que haber una adaptación fisiológica al nuevo medio ambiente y tiene que evitar ser invadido por los microorganismos patógenos que pueden llegar a provocar enfermedad y muerte. Para evitar el acceso de estos patógenos cuenta con mecanismos de defensa los que pueden clasificarse en,

Mecanismos no inmunológicos

a) Revestimiento mucoso.- Las mucinas tienen una estructura molecular similar a los componentes del epitelio el cual actúa como receptor para microorganismos o sus toxinas. Las mucinas por lo tanto pueden reducir la adherencia al epitelio intestinal por inhibición competitiva de los receptores epiteliales (54).

b) Barrera gástrica.- La acidez gástrica puede inactivar a un gran número de microorganismos o sus toxinas antes de que alcancen la porción baja del intestino. Esto se corrobora en individuos con aclorhidria en los cuales se presenta un mayor número de enfermedades gastrointestinales (26, 54).

c) Enzimas proteolíticas y sales biliares.- Estos compuestos inhiben el crecimiento in vitro aunque en el tracto intestinal su papel de protección al huésped no está bien comprendido (26, 35, 54).

d) Peristaltismo.- La actividad peristáltica normal junto con otros factores que reducen la adherencia microbiana pueden ser considerados como un importante mecanismo de defensa para el huésped (54).

e) Flora bacteriana nativa.- La flora microbiana normal reduce el número de patógenos compitiendo por sustratos, alterando el microambiente y produciendo sustancias bactericidas tales como las colicinas producidas por *E. coli* saprófitas en contra de *E. coli* patógenas (26, 54).

f) Barrera hepática.- Ciertas moléculas como las endotoxinas pueden atravesar el intestino delgado y entrar a la circulación portal, en estos casos el hígado actúa como una segunda línea de defensa filtrando las moléculas de la circulación. En casos de destrucción hepática o paso de sangre a la circulación venosa esta barrera puede perderse dando lugar a un incremento en la frecuencia de enfermedades infecciosas (26, 35, 54).

Mecanismos Inmunológicos

- a) Respuesta inmune mediada por células.- Las células linfoides de la mucosa y de la lamina propia junto con los tejidos linfoides asociados al intestino, contienen los tipos celulares necesarios para montar una respuesta inmune mediada por células, y la circulación de los linfoblastos T hacia el intestino otorga un mecanismo para colocar a las células sensibilizadas en los lugares apropiados (35, 44).
- b) Anticuerpos como: IgA, esta inmunoglobulina se sintetiza en las células plasmáticas situadas en el epitelio de los órganos que están en contacto con el medio ambiente externo. De esta manera la IgA es la inmunoglobulina predominante en las secreciones de la glándula mamaria, glándulas salivales, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y tracto genito-urinario. La IgA secretoria actúa a nivel local en tracto gastrointestinal limitando la entrada de antígenos, una molécula antigénica relativamente pequeña que penetre a la luz intestinal producirá una estimulación para la síntesis de anticuerpos IgA locales, éstos formarán un complejo antígeno-anticuerpo, que debido a su tamaño no podrá atravesar el epitelio intestinal. De manera similar la inmunoglobulina A puede neutralizar toxinas o puede limitar la movilidad y penetración de patógenos potenciales de la superficie externa.

IgE, IgG, IgM.- Estas pueden ser producidas local o sistémicamente y pueden llegar al lumen intestinal por difusión de la corriente sanguínea o de los tejidos locales. En contraste con la IgA, éstas pueden atravesar las células epiteliales de las puntas de las vellosidades y no contienen el compuesto secretorio, de esta manera sufren la

digestión por lisozimas intracelulares y enzimas intraluminales. Por lo tanto sólo están presentes en el lumen en pequeñas cantidades, excepto en casos de inflamación de la pared intestinal, cuando se incrementa el exudado y resultan concentraciones potenciales para la protección en el lumen (11, 26, 35, 54).

La placentación de los porcinos es del tipo epitelio corial difusa, es decir que el epitelio uterino está yuxtapuesto sobre el corion fetal, el grosor de las paredes es notorio y la transferencia de moléculas grandes como lo son las inmunoglobulinas maternas es imposible (35).

Debido a esto el lechón nace sin niveles importantes de gamaglobulinas, es decir es agamaglobulinémico y casi no tiene resistencia a las infecciones mientras no ha ingerido calostro y absorbido cantidades de lactoglobulinas suficientes procedentes del calostro, es por eso necesaria la ingestión temprana y sostenida de este. El nivel último de inmunoglobulinas séricas alcanzado por el neonato depende de la masa total de inmunoglobulinas absorbidas, lo cual está en función de la concentración de estas en el calostro y el volumen total ingerido durante el período máximo de absorción (11, 44).

Por tal efecto los animales deben ser protegidos lo más pronto posible contra agentes infecciosos del medio ambiente. Los anticuerpos maternos no son capaces de atravesar la mucosa intestinal del neonato después de las 24-48 horas siguientes al parto, en tanto que las células epiteliales vacuoladas son reemplazadas por las células maduras que no permiten el paso de moléculas grandes como son la IgG y la IgM (35, 44).

Aunque la IgA calostrada no va a ser absorbida después, la cerda continuará elaborándola y permanecerá en la luz intestinal del neonato donde provee la protección de la mucosa.

La inmunidad pasiva artificial representa una alternativa para solucionar los problemas de gastroenteritis, se ha observado un incre

mento de gamaglobulinas en el suero de los lechones que recibieron suero sanguíneo de la madre por vía oral así como un incremento de peso al destete y una disminución de la mortalidad de los animales (20, 37, 44).

Estudios posteriores demostraron que la fracción del suero responsable de estos hechos era la de la gamaglobulina (37). La administración a lechones de calostro de vaca con anticuerpos contra rotavirus, produce una disminución en el número de muertes y en la severidad del cuadro clínico causado por el agente patógeno (8, 44).

La mayoría de los cerdos adultos tienen anticuerpos contra el rotavirus debido a que está ampliamente difundido en las granjas porcinas, esto puede explicar en parte la baja frecuencia de esta enfermedad en forma clínica en las primeras semanas de vida de los lechones (22).

Existe el interés de la vacunación activa para uso en humanos, dado que la presentación de la enfermedad ocurre con más frecuencia entre los 3-12 meses de edad, para lo cual se han probado las cepas RRV-1 de mono y la RIT-4237 de bovino las cuales han mostrado ser eficaces para conferir protección, cuando se usa en países desarrollados (5, 28, 52).

En Medicina Veterinaria dada la presentación de la enfermedad en recién nacidos, se persigue la inmunización de las madres con la finalidad de incrementar los anticuerpos en el calostro y leche. Los resultados han sido favorables en bovinos (12, 15, 42, 44).

Considerando que la infección por rotavirus es de vital importancia en recién nacidos tanto humanos como animales se plantean los siguientes objetivos.

- La producción de anticuerpos contra rotavirus
- El incremento de anticuerpos en la luz intestinal como protección

- Valoración de los anticuerpos administrados por vía oral para prevenir la presentación de las enfermedades, ante retos cuantificados conjuntamente con un grupo testigo.

MATERIAL Y METODOS

Diseño Experimental

Para estudiar el efecto de la administración por vía oral de anticuerpos específicos contra rotavirus ante retos cuantificados del agente patógeno en recién nacidos, se utilizaron tres camadas de lechones, cada camada se dividió en dos grupos: uno experimental y uno testigo.

A todos los animales experimentales se les administraron (fig. 1), 4 g de inmunoglobulinas específicas contra rotavirus por vía oral - diariamente durante los cinco primeros días de vida, dos horas después de la última toma se retaron con 5 ml de diarrea positiva a rotavirus, conteniendo 10^7 partículas virales por ml.

ESQUEMA DE DESAFIO

		Días de vida de los lechones										
Camada		1	2	3	4	5	6	7	8...	...	27	28.
1	a	I	I	I	I	IR						
	b	-	-	-	-	-R						
2	a	I	I	I	I	IR						
	b	-	-	-	-	-R						
3	a	I	I	I	I	IR						
	b	-	-	-	-	-R						

a = experimental

b = testigo

I = administración de inmunoglobulinas

R = reto dos horas después de la última administración de inmunoglobulinas

Diariamente a partir de las 72 horas después del reto, se tomó -

una muestra de heces a todos los lechones para la identificación del virus.

ANIMALES

Para la obtención del suero hiperinmune, se utilizaron tres cerdos de aproximadamente 60 Kg de peso, machos castrados de la raza - yorkshire-landrace, provenientes de la Granja Experimental Porcina Zapotitlán de la FMVZ de la UNAM. Estos cerdos fueron inmunizados en seis ocasiones administrando cada estímulo antigénico con intervalo de 15 días entre cada uno; las dos primeras inmunizaciones fueron con 40 mg de virus más Adyuvante Completo de Freud en volúmenes iguales y en las últimas solo se utilizaron los 40 mg del virus, las aplicaciones fueron por vía subcutánea detrás de la oreja cuando fueron con adyuvante e intramuscular cuando fueron sin este. Siete días después de la última aplicación los cerdos fueron llevados al rastro donde se sacrificaron y la sangre fue colectada para la obtención del suero, el cual se reunió en un solo lote y se precipitaron las inmunoglobulinas, las cuales demostraron ser específicas en una prueba de inmunoelectroforesis, donde se encuentra una banda nítida de precipitación, la que no existía antes del proceso de inmunización. Estas inmunoglobulinas también tienen capacidad neutralizante, dado que cuando se incuban - 4 mg/ml con 10^6 partículas virales por mililitro, disminuye el 50% de focos infecciosos.

Para la obtención de los lechones, se utilizaron tres cerdas gestantes primerizas de ocho meses de edad, híbridas de la raza yorkshire-landrace. Estas cerdas fueron trasladadas siete días antes del parto de la Granja Experimental Porcina Zapotitlán al Departamento de Producción animal: Cerdos, de la FMVZ de la UNAM. Se colocaron en aislamientos individuales que previamente fueron lavados con jabón y cepillo, después desinfectados con vapores de una mezcla de formaldehído con permanganato de potasio.

Los lechones hijos de las cerdas se manejaron de la siguiente manera, se atendieron los partos y a los lechones se les colocó en una cama con fuente de calor en las lechoneras, a los tres días de edad se les aplicaron 200 mg de hierro a cada lechón por vía intramuscular. Se permitió la lactancia libre y a partir del décimo día se les empezó a dar alimento concentrado. Las cerdas fueron alimentadas con alimentos para lactantes y la cantidad fue en relación con el tamaño de la camada, al finalizar el trabajo, estos animales fueron destinados para el abasto. Las camadas fueron en número de 10, 10 y 8 respectivamente, los lechones nacieron con peso adecuado excepto uno de ellos el cual murió de hipoglicemia, de tal manera que finalmente se trabajaron con 27 animales.

ADYUVANTE

Para la inmunización de los cerdos se utilizó Adyuvante Completo de Freud el cual se preparó mezclando ochenta y cinco partes de aceite mineral más quince partes de lanolina y cinco mg/ml de mycobacterium tuberculosis H 37 Rv esterilizado en autoclave y liofilizado.

ANTIGENO

La producción de antígeno suficiente para la inmunización de los cerdos y el desafío de los lechones, 1 ml de rotavirus se multiplicó en cultivo celular de la línea MA-104 utilizando la siguiente técnica para su cultivo: Se utilizaron tres botellas BEP con una monocapa completamente confluyente de células MA-104. Se incubó el virus en un tubo Eppendorf estéril con tripsina 10 ug/ml durante una hora a 37 °C. La tripsina se diluyó a partir de una concentración de 1% en Medio Mínimo Esencial (MEM) sin suero fetal bovino (SFB). Después de incubar el virus se lavaron las botellas BEP dos veces con PBS posteriormente se infectó cada botella con 0.4 ml del virus, se cerraron las botellas y se incubaron durante una hora a 37 °C, distribuyéndose el inóculo cada 15 minutos sobre la capa (moviendo las botellas), a continuación se aspiró el inóculo y se agregaron 3 ml de MEM, sin apre

tar la tapa de las botellas se incubaron a 37 °C y 5% de atmosfera de CO₂, se observaron diariamente al microscopio para ver el efecto citopático, a los 2-3 días y una vez que se observara la lisis de las células por la replicación viral en ellas se cosechó el virus agitando las botellas para el desprendimiento de las células y posteriormente se aspiró con vacío todo su contenido (16).

Con el virus obtenido se infectaron tres lechones recién nacidos privados de calostro " cachados ", se colectó la diarrea de estos durante tres días, con una parte de ella se purificó el virus por el método descrito por Bishop et al (6), con el se inmunizaron a los cerdos. La otra parte de la diarrea se conservó en congelación para la infección de los lechones en la prueba del desafío.

Para determinar el número de partículas virales se utilizó la técnica de Microfocos (43).

OBTENCION DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Para la obtención de las inmunoglobulinas se precipitó el suero con sulfato de amonio al 33% (5), se añadió lentamente al suero en agitación, una solución saturada de sulfato de amonio con PH de 8, de tal manera que al final el volumen añadido fué la mitad del total del suero, a continuación la mezcla se centrifugó a 7 000 G durante 20 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en agua destilada, se volvió a agregar sulfato de amonio y se centrifugó nuevamente esto se repitió hasta que el sobrenadante fué transparente. El precipitado obtenido finalmente se resuspendió en solución salina isotónica amortiguada con fosfatos de 0.01 M, PH de 7.4 (PBS). Posteriormente fué dializado contra la misma solución para eliminar el sulfato de amonio, esto se continuó durante 4 días, cambiando dos veces cada día la solución la cual estuvo en agitación. Una vez eliminado el sulfato de amonio las inmunoglobulinas se conservaron en congelación hasta su utilización.

Identificación de los anticuerpos.

Para la identificación de los anticuerpos producidos contra el virus se realizó la prueba de Inmunoelectroforesis, para ello se sañgraron a los cerdos el mismo día de cada inoculación, el sangrado se realizó en la vena marginal de la oreja y se extrajeron 5 ml. de sangre por cerdo ésta se dejó coagular a temperatura ambiente, se separó el coágulo de las paredes de los tubos y posteriormente se mantuvo en refrigeración durante 12 horas a 4 °C, luego se eliminó el coágulo y se centrifugó a 475 G durante 15 minutos a 4 °C para separar el suero. También se utilizaron inmunoglobulinas obtenidas del sangrado final para comprobar su funcionalidad.

La técnica de inmunoelectroforesis consiste en una electroforesis inicial del antígeno, utilizando agar al 1% en una solución amortiguadora de barbituratos 0.05 M, PH 8.6. El agar se disolvió por ebullición en baño maría; ya en forma líquida se colocó en portaobjetos y se dejó gelificar, se prepararon dos pozos y en ellos se colocó el antígeno, una vez realizada la electroforesis (dos horas a 1.5 miliamperes), se horadó un canal en medio de los dos pozos (a 6 mm aproximadamente de cada uno), y se colocó el suero posteriormente se dejó difundir durante 24 horas en una cámara húmeda a temperatura ambiente, a continuación las placas se colocaron en solución salina 0.85%, PH de 7.4 realizándose tres cambios de la solución uno cada 24 horas, se dejó posteriormente en agua destilada durante dos horas. Para su tinción las placas se secaron con papel filtro y se tiñeron con solución de negro de amido al 1% durante 15 minutos. Se retiró el exceso de colorante con agua destilada y después se agregó ácido acético al 1%.

Para cuantificar los anticuerpos presentes en la leche y calostro se utilizó la técnica de Microfocos (43).

ROTAFORESIS

Para la identificación del virus en las heces de los lechones de sañados, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se ha desarrollado una técnica de diagnóstico, la cual se basa en la identificación electroforetica de los 11 segmentos de ARN que carac-

terizan al virus, y se considera positivo al observarse por lo menos los cuatro primeros.

Para el desarrollo de la técnica, en nueve tubos de ensaye se colocaron 0.4 ml de solución acuosa A (diluída 0.8 ml de sol. A 5 X en 3.6 ml de agua destilada) a un décimo tubo se le agregaron 0.2 ml de solución A a los nueve primeros tubos se les agregaron una gota (0.05 ml) de la muestra de heces, en caso de que tuviese una consistencia sólida o semisólida, se añadía una gota de suspensión diluída al 50% en una solución fisiológica de cloruro de sodio (0.85). Al décimo tubo se le adicionó 0.2 ml de control positivo, hecho esto se agregaron a todos los tubos 0.2 ml de solución B, se agitaron vigorosamente y se añadieron 0.2 ml de cloroformo y se continuó con la agitación. Posteriormente se centrifugó a 475 G durante 10 minutos a 4 °C, obteniéndose dos fases y se tomaron tres gotas (0.05 ml) de la fase acuosa (superior) las cuales se colocaron en tubos limpios.

Se puso a fundir la solución C en baño de agua hirviendo durante 15 minutos, se tomaron de ella 0.05 ml y se depositaron en cada uno de los 10 tubos manteniendolos a 60 °C en baño maría. Con una pipeta se colocaron las muestras en los pozos de la placa de poliacrilamida, una vez solidificado el gel se puso en la cámara de electroforesis, de tal manera que los pozos quedaran hacia la terminal negativa de la cámara y se agregaron 50 ml de solución D (diluída 5 ml de sol. D 10 X en 45 ml de agua destilada). Una vez que el gel estaba totalmente cubierto por esta solución se conectaron los electrodos a una fuente de poder a 150 V, hasta que el colorante hubiese corrido en forma completa.

Una vez terminada la electroforesis, se colocó el gel en recipiente de vidrio y se lavó durante 30 minutos con solución E (diluída 5 ml de sol. E 10 X en 45 ml de agua destilada). Después de retirar completamente la solución E se lavó el gel durante 30 minutos con 50 ml de solución F (diluída 0.5 ml de sol. F 100 X en 50 ml de agua destilada, posteriormente se enjuagó dos veces con agua destilada y se agregaron 50 ml de solución G (diluída 0.4 ml de sol. G 125 X en-

50 ml de NaOH al 3%). Al aparecer las bandas en el control positivo se retiró la solución G y se detuvo la reacción con ácido acético - al 1%

RESULTADOS

Respuesta de los lechones al reto.

Los tres lechones privados de calostro que se utilizaron para la obtención del virus utilizado en el reto de los animales convencionales, mostraron 20-36 horas después de la inoculación de 10^6 partículas virales; diarrea profusa, líquida amarillenta de olor suigéneris, los animales se mostraron adinámicos sin embargo conservaron el apetito, la duración de la diarrea fué de 3 días causó deshidratación - y posteriormente los animales se recuperaron, no se presentaron muertes sin embargo su desarrollo fué lento en comparación con otros de su misma edad.

Las tres camadas de lechones convencionales utilizadas en el presente estudio por el contrario no mostraron signos de enfermedad, todos los animales antes y después del desafío se comportaron de manera normal, lactaron satisfactoriamente y llegaron al término de la lactancia con un peso normal (figura 2), al no presentarse sintomatología en los animales, después de 48 horas del desafío, se tomó -- una muestra de heces de cada una de los lechones y a cada muestra se le sometió a la prueba de rotaforesis, cuyos resultados en los cuadros 1, 2, y 3 muestran que los animales experimentales excretaron el virus de manera irregular, mientras que los testigos lo hicieron de manera más uniforme y prolongada, asimismo el tiempo que los animales excretaron el virus fué significativamente distinto en el grupo experimental comparativamente con el grupo testigo, a las 72 horas se detecta el virus en el 14.2% de los animales experimentales, contra un 84.6% en el grupo testigo, a las 96 horas la diferencia es de 7.1% contra 46.1% a las 120 horas 7.1% contra 38.4% a las 144 horas de 7.1% contra 15.3% y a partir de las 168 horas hasta las 240 no se detectó la presencia del virus en las muestras de heces colectadas (gráfica 1).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados en este estudio demuestran que el virus es patógeno aunque su virulencia aparentemente es baja en animales convencionales, dado que la dosis de 10^6 partículas virales causaron un cuadro clásico de diarrea en animales privados de calostro, en cambio los animales convencionales que si lactaron fueron retados con 5×10^7 partículas virales y permanecieron normales. Es importante mencionar que en muestras de heces provenientes de lechones de la Granja Experimental Porcina Zapotitlán de la FMVZ, se ha podido demostrar el virus -- por medio de rotaforesis, por lo cual se pensó que en las cerdas utilizadas en el estudio tuvieron anticuerpos en el calostro, y esto se pudo corroborar utilizando la prueba de microfocos.

En los cerdos, la mayoría de los trabajos reportan que en animales gnotobióticos se logra un 100% de morbilidad y arriba del 50% de mortalidad (45,49), lo mismo sucede en los lechones privados de calostro (41), pero realmente hay pocos estudios donde la enfermedad se -- reproduce en animales convencionales (13, 53).

En cambio cuando se reporta la morbilidad en granjas se encuentra que el virus rara vez se encuentra como agente único (21), y siempre se asocia con factores físicos como humedad, frío, suciedad, aún en -- estas estas condiciones la morbilidad es baja (7,21), al igual que la mortalidad.

Aunque no se pudo reproducir la enfermedad en los animales convencionales, no se puede decir que sea por perdida de virulencia por -- mantener la cepa viral en cultivo celular, puesto que el reto de los -- animales se hizo con 5 ml de diarrea colectada de los cerdos privados de calostro los cuales contenían 15 veces más partículas virales de la dosis de virus proveniente de cultivo con el cual se reprodujo la enfermedad en los animales privados de calostro.

Es interesante entonces, el hecho de que el presente trabajo demuestra que la presencia de anticuerpos, ya sea en el calostro o administrados artificialmente, pueden prevenir la presentación de la en-

fermedad, esto es dado independientemente del isotipo, ya que los anticuerpos utilizados pertenecen a la clase IgG.

Es importante también, que los resultados muestran la presencia del virus en forma irregular, lo cual puede deberse a reinfecciones de los lechones, dado que permanecieron en el mismo corral y entonces se puede teorizar que los animales se reinfectan en forma subclínica pasando el virus de un animal a otro, de manera que la enfermedad puede hacerse patente o desencadenarse una epidemia cuando se encuentra una población susceptible, o bien se reúnan las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo. Sin embargo hay que hacer notar que los análisis realizados, no muestran al virus en ningún animal después del séptimo día, lo cual implicaría que no quedan portadores sanos - aunque en este caso podemos discutir la sensibilidad de la prueba utilizada.

Con esto podemos concluir, que en los cerdos, la morbilidad de diarrea causada exclusivamente por rotavirus es baja (9, 21), el cuadro clínico descrito es ligero y repercute solamente en el incremento de peso o bien proporciona una vía de entrada para la instalación de otros agentes patógenos y que solo se registra mortalidad en animales gnotobióticos o bien lechones privados de calostro.

Cuadro No. 1 Tiempo de eliminación del rotavirus después de el desafío en la camada 1

		Horas después del desafío									
lechón No.		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
grupo experi- mental	1			-	-	-	-	-	-	-	-
	2			-	-	-	-	-	-	-	-
	3	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
	4			-	-	-	+	-	-	-	-
grupo testi- go	1			+	-	-	-	-	-	-	-
	2			+	+	-	-	-	-	-	-
	3	ND	ND	+	+	+	-	-	-	-	-
	4			+	+	+	+	-	-	-	-
	5			+	+	-	-	-	-	-	-

ND = no determinado

+ = positivo a rotavirus

- = negativo a rotavirus

Cuadro No. 2 Tiempo de eliminación del rotavirus después de el desafío en la camada 2

		Horas después del desafío									
techón No.		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
grupo experimental	1			+	+	-	-	-	-	-	-
	2			-	-	-	-	-	-	-	-
	3	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
	4			-	-	-	-	-	-	-	-
	5			-	-	-	-	-	-	-	-
	6			-	-	-	-	-	-	-	-
grupo testigo	1			+	-	+	-	-	-	-	-
	2			-	-	+	-	-	-	-	-
	3	ND	ND	+	+	-	-	-	-	-	-
	4			-	-	+	-	-	-	-	-

ND = no determinado

+ = positivo a rotavirus

- = negativo a rotavirus

Cuadro No. 3 Tiempo de eliminación del rotavirus después de el desafío en la camada 3

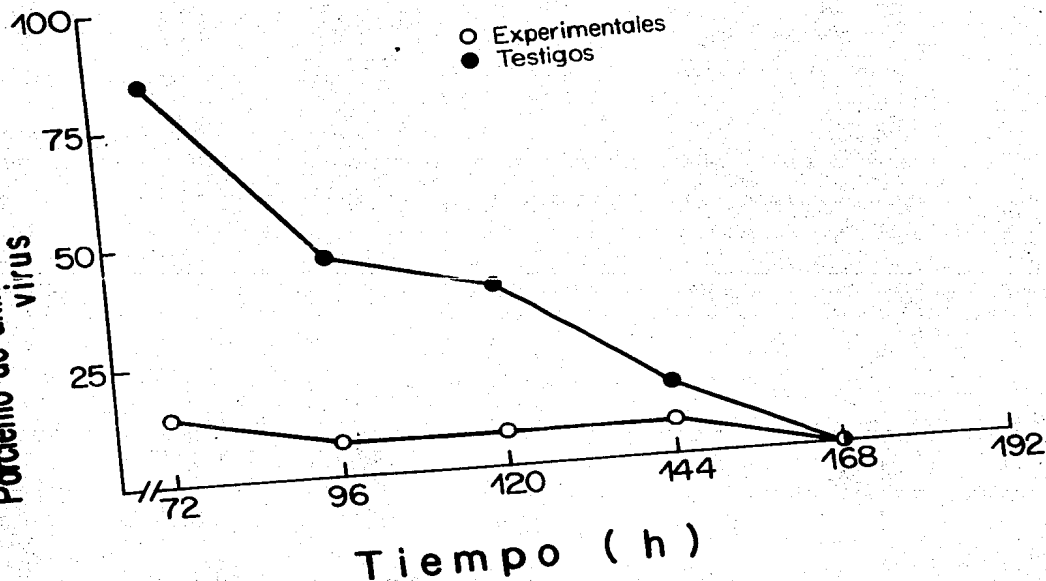
		Horas después del desafío										
		lechón No.	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
grupo experi- mental	1			-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2			+	-	+	-	-	-	-	-	-
	3	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4			-	-	-	-	-	-	-	-	-
grupo testi- go	1			+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2			+	-	-	+	-	-	-	-	-
	3	ND	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4			+	+	-	-	-	-	-	-	-

ND = no determinado

+ = positivo a rotavirus

- = negativo a rotavirus

Porcentaje de animales que eliminaron el virus



Gráfica 1.- Porcentaje de muestras de heces positivas en la prueba de rotaforesis. La diferencia entre el grupo experimental y el testigo es obvia en los primeros 5 días, sin embargo el tiempo último en el que se observó la eliminación de rotavirus fué de 6 días en ambos grupos.



Figura 1.- La administración de las inmunoglobulinas y el reto se hicieron por vía oral con la ayuda de una jeringa hipodérmica.



Figura 2.- Los animales antes y después del reto con la diarrea se comportaron de manera normal.



Figura 3.- Rotaforesis de diferentes muestras de heces 4 días después del reto, se incluyó un control positivo (cp).

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ambía, M. J.: Diarrea por rotavirus en lechones, estudio recapitulativo. Vet. Méx. 10: 171-179 (1979)
- 2.- Arias, F. C., López, S., Bell, R. J. and Strauss, H. J.: Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 os deduced from cDNA Seqyuence. Journal of Virology. 50: 657-661 (1984)
- 3.- Arias, F. C., Ballado, T., and Plebański, Magda.: Synthesis of - the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in -- Scherichia coli. Gene, 00 (1986) 000-000 en prensa.
- 4.- Banatvala, J. E., Chrystie, I. L., and Toterdell, B. M.: Rotaviral infection in human neonates. J. Am. Vet. med. Ass. 173: 527-530 (1978)
- 5.- Beker, E. L., et al.: Methods in immunology and immunochemistry. 3th ed. vol. 1 edited by: Williams, C. A. and Chose, M. N., -- Academic Press, New York and London. (1971)
- 6.- Bishop, R. F., Davidson, G. R., Holmes, J. H. and Rock, B. J.: Virus particles in epithelial cell of duodenal mucose from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet. 2: 1281-1283 (1973)
- 7.- Bohl, H. E., and Lecce, J. G.: Rotaviral diarrhea in pig. Pork - Industry handbook. University of Minnesota. St. Pool, Minnesota, 537: 1-4 (1978)
- 8.- Bridger, J. C. and Brown, J. F.: Developmen of inmunity to porci-ne rotavirus in piglets protected from disease by bovine calos--trum. Infec. Immun. 31: 906-910 (1981)
- 9.- Cruz, S. P. J.: Tiempo de protección contra rotavirus conferido por inmunoglobulinas séricas específicas administradas por vía - oral en lechones. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. UNAM. -- México, D. F. (1985)
- 10.- Chanock, R. M., Myatt, R. G. and Kapikian A. Z.: Immunization of infants and young children against rotaviral gastroenteritis prospects and problems. JAVMA. 173: 570-572 (1978)

- 11.- Childlow, J. W. and Porter, P.: Intestinal defence of the neonatal pig: Interrelationship of gut and mammary function providing surface immunity against colibacillosis. Vet. Rec. 104: 496-500 (1979)
- 12.- Dauvergne, M., Brun, A. and Soulebot, J. P.: Passive protection of newborn calves against rotavirus by vaccination of their dams. Develop. Biol. Standar. 53: 245-255 (1983)
- 13.- Davidson, P. G., Gall, G. D., Petric, M., Buther, G. D. and -- Hamilton, J. R.: Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. The Journal of Clinical Investigation. 60: 1402-1409 (1977)
- 14.- Durham, P. J. K., Stevenson, B. J. and Farquharson, B. C.: Rotavirus and coronavirus associated diarrhoea in domestic animals. N. Z. Vet. J. 27: 30-32 (1979)
- 15.- Lichorn, W., Bachmann, A. P., Baljer, G., Plank, P. and Schnieder, P.: Vaccination of cows with a combined rotavirus enterotoxigenic E.coli K99 vaccine to protect newborn calves against diarrhea. Develop. Biol. Standat. 53: 237-243 (1983)
- 16.- Espejo, T. R., Calderón, E., Gonzalez, N., Salomón, A., Martescell, A. and Romero, P.: Rotavirus gastroenteritis in hospitalized -- infants and young children in México City. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 20: 139-246 (1978)
- 17.- Espejo, T. R., Calderón, E., González, N., Salomón, A., Martescell, A. and Romero, P.: Presence of two distinct types rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in México City 1977. The Journal of Infection disease. 139: 474-477 (1979)
- 18.- Espinosa, I. E. L., Colorado, D. J., Padilla, F. R., Centina, S., Durán, L. G. y Ruiz, G.: Frecuencia de gastroenteritis infecciosas agudas por rotavirus en niños de diversas poblaciones de la República Mexicana. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 40: 188-191 -- (1983)
- 19.- Estes, M. K.: Identification of rotavirus of different origins by the plaque-reduction test. Am. J. Vet. Res. 41: 151-152 (1980)

- 20.- Guevara, M. R.: Inmunidad a Salmonella cholerasuis en lechones protegidos con inmunoglobulinas séricas administradas por vía oral. tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM. México, D. F. (1983)
- 21.- Hernandez, M. A.: Tratamiento de diarrea en lechones con inmunoglobulinas séricas específicas administradas por vía oral. tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM. México, D. F. (1986)
- 22.- Hess, R. G. and Bachmann, A. P.: Distribution of antibodies to rotavirus in serum and lacteal secretions of naturally infected swine and their suckling pigs. Am. J. Vet. Res. 42: 1149-1152 (1981)
- 23.- House, J. A.: Economic Impact of Rotavirus and neonatal disease agenst of animals. J. Am. Vet. Med. Ass. 173: 573-576 (1978)
- 24.-Jawets, E., Melnik, L. J., Adelberg, A. E.: Microbiología Médica. décima edición. Edit. El Manual Moderno. México, D. F. (1983)
- 25.- Kapikian, Z. A. and Chanock, M. R.: Rotaviruses. Virology. 37: 863-906 (1985)
- 26.- Krechmer, R. R.: Inmunidad en recién nacidos. Gaceta Med. Méx. 113: 133-138 (1977)
- 27.- Lecce, G. J., King, W. M. and Mock, R.: Reovirus-Like agent asso ciated with fatal diarrhea in neonatal pigs. Science and micro-biology. 14: 816-825 (1976)
- 28.- Lecce, G. J. and King, W. M.: The calf-reo-like virus (rotavirus) veccine: An ineffective immunization agent for rotaviral diarrhea of piglets. Can. J. Comp. Med. 43: 90-93 (1979)
- 29.- López, S., Arias, F. C., Bell, R. J., Strauss, H. J., Espejo, T. R.: Primary structure of the cleavage site associated with try-sin enhancement of rotaviral SA11 infectivity. Virology. 144: 11-19 (1985)
- 30.- Mc. Adaragh, J. P., Gergeland, M. E., Meyer, R. C., Johnsohay, M. S., Statz, I. J., Benfield, D. A. and Hommer, R.: Pathogenesis of rotaviral enteritisin gnotobiotics pigs. Amicroscopy study. Am. J. Vet. Res. 41: 1572-1581 (1980)
- 31.- Middleton, J. P.: Pathogenesis of rotaviral infection. J. Am. - Vet. Med. Ass. 173: 544-546 (1978)

- 32.- Mohanty, B. S., Dutta, K. S.: Virología Veterinaria. Ia. edición. Edit. Interamericana. México, D. F. (1983)
- 33.- Ocampo, C. L. y Sumano, L. H.: Fisiología de la diarrea. Porcicultura. 9: 11-13 (1984)
- 34.- Offit, A. P. and Clark, F.H.: Maternal antibody-mediated protection against gastroenteritis due to rotavirus in newborn mice is dependent on both serotype and titer antibody. The Journal of Infectious Diseases. 152: 1152-1153 (1985)
- 35.- Porter, P.: Intestinal defence in the young pig a review of the secretory antibody system and their possible role in oral immunization. Vet. Rec. 92: 658-664 (1973)
- 36.- Prozesky, L. and Theodoris, A.: Diarrhea in pig induced by rotavirus. Onderstepoort. J. Vet. Res. 44: 275-278 (1977)
- 37.- Quiroz, P. J. I., Olguín, R. F. y Garza, R. J.: Anticuerpos adquiridos pasivamente en relación con la mortalidad e incremento de peso de lechones. Vet. Méx. VI. 84-91 (1975)
- 38.- Rodger, S. M. and Holmes, I. H.: Comparison of the genomes of simian, bovine and human rotavirus by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. J. Virol. 30: 839-846 (1979)
- 39.- Ruiz-Gómez, J., Alvarez, M. T., Silva-Acosta, C., Espejo, R., Games, J., Palacios, J. y Juárez, G.: Rotavirus II. Virus relacionado con gastroenteritis aguda en el niño. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 12: 133-140 (1981)
- 40.- Ruiz-Gómez, J., Espinosa, L. E., Becerril, P., Muñoz, H. O., Chacón, G. A., Vargas, R. y Gutierrez, G.: Etiology of hospital-acquired infection diarrhea. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 213-218 (1982)
- 41.- Ruiz, M. A., Martínez, G. A., Espejo, T. R., Martell, D. M., Aguilar, S. A. y Morilla, G. A.: Rotavirus asociados a diarreas de los lechones en México. Vet. Méx. 17: 17-22 (1986)
- 42.- Saif, L. J., Smith, L. K., Landmeier, J. B., Bohl, H. E. and Theil, W. K.: Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. Am. J. Vet. Res. 45: 49-58 (1983)

- 43.- Shaw, R. D., Stoner-Ma, D. L., Estes, M. K. and Greenberg, H. - B.: Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. J. Clin. Microbiol. 22: 286-291 (1985)
- 44.- Snodgrass, D. R. and Well, P. W.: Passive immunity in rotaviral infection. J. Am. Vet. med. Ass. 173: 565-568 (1978)
- 45.- Snodgrass, D. R., Fahey, J. K., Wells, W. P., Campell, I. and - Whitelaw, A.: Passive immunity in calf rotavirus infections. Maternal vaccination increases and prolong immunoglobulin G1 antibody secretion in Milk. Infect. Immun. 28: 344-349 (1980)
- 46.- Theil, K. W., Bohl, H. E. and Saif, L. J.: Technique for rotaviral propagation. J. Am. Vet. Med. Ass. 173: 548-551 (1978)
- 47.- Theil, K. W., Bohl, H. E., Cross, R. F., Kohler, E. M. and Agnes, A. G.: Pathogenesis of rotaviral infection in experimentaly - inoculated gnotobiotic pigs. Am. J. Vet. Res. 39: 213-220 (1978)
- 48.- Theil, K. W., Saif, L. J., Bohl, H. E., Agnes, A. G. and Kholer, E. M.: Concurrent porcine rotaviral and transmissible gastroenteritis viral infections in a three-day-old conventional pig. Am. J. Vet. Res. 40: 719-721 (1979)
- 49.- Theil, K. W. and Bohl, H. E.: Porcine rotaviral infection of - cell culture: Effect of certain enzymes. Am. J. Vet. Res. 41: -- 140-143 (1980)
- 50.- Torres-Medina, A. and Underdahl, N. R.: Scanning electron mi-- croscopy of intestinale of gnotobiotic piglets infected with -- porcine rotavirus. Can. J. Comp. Med. 44: 403-411 (1980)
- 51.- Uruchurtu, A., Méndez, D., Doporto, J. M., Romero, R. M., López, A.J. y Sanchez, G. F.: Un estudio sobre la mortalidad de los lechones en México. Vet. Méx. 7: 111-123 (1976)
- 52.- Vesikari, T., Ruuska, T. B., Agaerst, H., Delem, A. and Andre, F.: Doseresponse study of RIT-4237 oral rotavirus vaccine in -- breast-fed and formula-fed infants. Pediatr. Infect. Dis. 4: -- (6): 622-5 (1985)
- 53.- Vonderfecht, L. S. and Osburn, I. B.: Immunity to rotavirus in conventional calves. Journal of Clinical microbiology. 16: 935-942 (1982)

- 54.- Welliver, R. C. and Ogra, P. L.: Importance of local immunity - in enteric infection. J. Am. Vet. med. Ass. 173: 560-564 (1978)
- 55.- Woode, G. N. and Crouch, C. F.: Naturally occurring and experimentally induced rotaviral infections of domestic and laboratory animals. J. Am. Vet. med. 173: 522-526 (1978)
- 56.- Woode, G. M. and Bohl, H. E.: Porcine rotavirus infections. In: Disease of swine. 5th ed. edited. by Iemen, A. D., Glock, R. D., Meryeling, W. L., Penny, R. H. C., Scholl, E. and Straw, B., -- 318-322, Iowa state University press. Ames, Iowa 1981