

Identificación de Genotipos de Rotavirus Bovino Prevalcientes en México como Herramienta par el Desarrollo de una Vacuna Recombinante

William A. Rodríguez-Limas, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura A. Palomares,
Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa Cuernavaca, Mor. 62210, México.
E-mail: laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: Diarrea neonatal bovina, Rotavirus, Pseudopartículas virales, Vacuna recombinante

Keywords: Neonatal Calf Diarrhea, Rotavirus, Virus-like particles, Recombinant vaccine

RESUMEN

Existe una gama diversa de enfermedades asociadas al ganado, dentro de las cuales aparece la diarrea en la que las principales víctimas son las crías de bovinos, porcinos, ovinos y caprinos. La infección por rotavirus es la principal causa de enfermedad diarreica en neonatos de bovinos y porcinos. A pesar de que existen vacunas con virus atenuados o inactivados, éstas son frecuentemente ineficientes e inseguras, pueden contener contaminantes patógenos para los animales a inmunizar y presentar reversión de la atenuación o una deficiente inactivación, lo que desencadena el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, en muchos casos no contienen los genotipos presentes en la región. Este artículo muestra la incidencia de rotavirus en el ganado bovino y presenta herramientas útiles para el diseño de una vacuna veterinaria que sea eficiente en el territorio mexicano.

ABSTRACT

The cattle industry is often affected by neonatal diarrhea, mostly caused by rotavirus, of which calves, piglets, young ovines, and goats are victims. This disease causes serious economic losses. Although vaccines based on attenuated or inactivated virus are available, they often are inefficient and unsafe, as they may revert to virulent forms, be inefficiently inactivated, contain pathogens, or lack of the relevant genotype in the region of interest. In Mexico, the rotavirus genotypes relevant for bovine cattle are unknown, which impedes the design of an efficient vaccine. This paper reviews the importance of rotavirus in bovines, and presents useful tools for the design of an efficient veterinary vaccine for Mexico.

DIARREA NEONATAL BOVINA

La diarrea neonatal es una enfermedad multifactorial compleja de los terneros. Clínicamente suele presentarse desde las 12 h posparto hasta los primeros 35 días de vida y se caracteriza por excreción de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis y, en casos severos, muerte en pocos días (Fig. 1).



Fig. 1. Becerro muerto por diarrea

En Latinoamérica, la diarrea neonatal de los terneros es grave y frecuente, provocando importantes pérdidas económicas por morbilidad y mortalidad. La repercusión económica es importante ya que su elevada incidencia (superior al 60%) implica tratamientos veterinarios, demanda de tiempo y mano de obra. Además, los porcentajes de mortalidad pueden llegar a ser importantes (hasta el 20%), así como el retraso en el desarrollo corporal que manifiestan los animales afectados (Odeón, 2001).

Los agentes etiológicos involucrados son variados, siendo los virus los más importantes. La acción de los virus suele actuar como factor predisponente para infecciones bacterianas secundarias. Los virus causan destrucción y atrofia de las células intestinales, provocando disfunción intestinal y mala absorción de nutrientes, con acumulación de leche parcialmente digerida en la luz intestinal y aumento de la presión osmótica que favorece el proceso diarreico.

Entre los agentes virales, el **rotavirus bovino Grupo A** se encuentra ampliamente distribuido, habiéndose demostrado como el principal agente causal de diarrea neonatal en ranchos de cría (Reynolds *et al.*, 1986; Parwani *et al.*, 1994; Saif & Fernández, 1996). El diagnóstico etiológico de la diarrea neonatal bovina se basa en la detección del agente en materia fecal de terneros diarreicos y/o a partir de muestras de intestino obtenidas en necropsias.

En un estudio realizado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina, INTA, se encontró que el 44.6% de las crías enfermas estaban afectadas por rotavirus tipo A y que éste participaba en coinfecciones con *Cryptosporidium* y *Salmonella* spp. (Fig. 2).

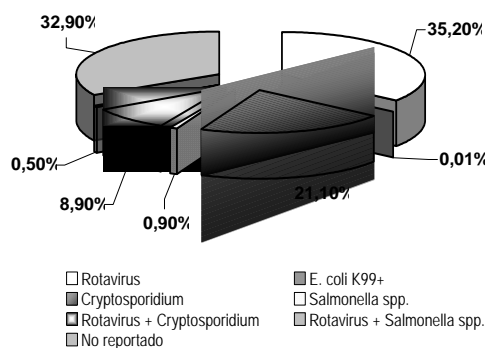


Fig. 2. Agentes etiológicos asociados a la diarrea neonatal bovina. Datos tomados de: www.inta.gov.ar

ROTAVIRUS

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y posee 11 segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). Estructuralmente está formado por dos capas proteicas internas VP2 (102 kDa) y VP6 (44 kDa) y dos proteínas de cápside exteriores, VP4 (88 kDa) y VP7 (38 kDa), además de VP1 y VP3 que están unidos al dsRNA (Fig. 3) (Estes, 1996).

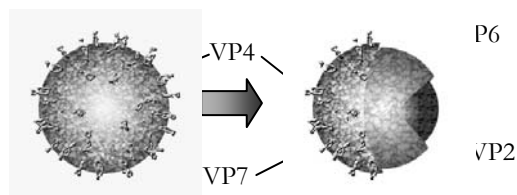


Fig. 3. Esquema estructural del rotavirus.

Las propiedades antigénicas del rotavirus (grupo, subgrupo y serotipo) están determinadas por las proteínas de cápside VP6, VP7 y VP4. La especificidad de grupo y subgrupo está determinada por la proteína VP6, la cual clasifica los rotavirus en siete grupos (A a G); de éstos el grupo A es de importancia patológica. Los grupos A, B y C han sido aislados tanto en humanos como en animales, pero muy pocos rotavirus de grupos diferentes al A han podido propagarse en cultivo celular (Shinosaki *et al.*, 1996; Estes, 1996).

Para los rotavirus del grupo A se han definido diferentes subgrupos (SG). Dicha clasificación se basa en la presencia o ausencia de distintos epítopos de VP6 inmunoreactivos frente a determinados anticuerpos monoclonales. Se conocen así el SG I, SG II, SG I+II, SG no-I y no-II, según sean reactivos o no a anticuerpos monoclonales específicos. El SG II es el más frecuente entre las cepas humanas mientras que el SG I es más frecuente entre las cepas de origen animal (López *et al.*, 1994).

Las proteínas virales de la cápside externa VP7 y VP4 definen los serotipos G y P, respectivamente. VP4 es una proteína sensible a proteasa, mientras que VP7 es una glicoproteína. Así, la clasificación de los rotavirus es un sistema binario que distingue distintos serotipos de las proteínas VP7 y VP4 y son determinados por reactividad con antisueros policlonales o monoclonales (Estes, 1996).

La poca disponibilidad de anticuerpos y antisueros que reconocieran los serotipos de la proteína VP4 llevó a la necesidad del estudio de sus propiedades basándose en la secuencia nucleotídica del segmento 4 del genoma de rotavirus. Así pues, la genotipificación es una alternativa que se ha preferido para sustituir la serotipificación. Hasta la fecha, se han caracterizado 15 genotipos G y 26 genotipos P de rotavirus (Cardoso *et al.*, 2000; Estes, 1996; Liprandi *et al.*, 2003; Martella *et al.*, 2003; Martella *et al.*, 2006; Mc Neal *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2000; Sereno *et al.*, 1994). De los 26 genotipos P conocidos, solo 16 corresponden a serotipos conocidos. En cambio, para el caso de VP7 existe una relación muy clara entre genotipo y serotipo.

Dentro de cada serotipo G, la homología a nivel de secuencias de aminoácidos es bastante alta (91-100%). En cambio, entre cepas de diferentes serotipos es bastante menor, llegando a encontrarse homologías entre el 55 y 82%. En el caso del gen de VP4, el grado de homología existente entre secuencias nucleotídicas pertenecientes al mismo genotipo es superior al 89%. (Cao *et al.*, 1999; Estes, 1996; Gentsch *et al.*, 1996; Sereno *et al.*, 1994).

La mayoría de los genotipos de rotavirus parecen estar restringidos entre especies, pero también se han encontrado transmisiones inter-especies (Khamrin *et al.*, 2006). El virus completo puede ser transferido de animales a humanos y viceversa, pero en raras ocasiones produce manifestaciones clínicas severas en el nuevo huésped (Rahman *et al.*, 2005). En el caso de rotavirus A en bovinos, se han identificado por lo menos 10 genotipos G (G1-G4, G6-G8, G10, G11 y G15) y 5 genotipos P (P1, P5, P11, P17 y P21). De acuerdo a informes previos, los genotipos G6 y G10 y más recientemente los genotipos G8, P1, P5 y P11 han sido frecuentemente encontrados en las muestras fecales de terneros con diarrea a través del mundo (Alfieri *et al.*, 2004; Barreiros *et al.*, 2004; Falcone *et al.*, 1999; Fukai *et al.*, 2002; Gulati *et al.*, 1999; Suzuky *et al.*, 1993; Wani *et al.*, 2004). Sin embargo, se desconocen cuales son los genotipos bovinos prevalentes en México.

GENOTIPIFICACIÓN DE ROTAVIRUS

Estudios epidemiológicos realizados alrededor del mundo han demostrado que los genotipos G y P de

rotavirus bovino presentan distribuciones geográficas y temporales diversas. De allí se deriva la importancia de realizar una vigilancia epidemiológica de las cepas de rotavirus presentes en el ganado, que suministre información importante para el desarrollo e implementación de una vacuna de rotavirus bovino y que sea efectiva para el ganado mexicano. A continuación se resumen algunas estrategias utilizadas para genotipificación de rotavirus bovino.

El primer paso consiste en la identificación de muestras donde el rotavirus tipo A se encuentre presente. Para ello se realizan muestreo de animales con síntomas de diarrea, cuyas edades oscilen entre las 12 horas y 35 días posparto. Las muestras pueden ser obtenidas de materia fecal o a partir de muestras de intestino extraídas en necropsias. La detección de rotavirus tipo A se realiza por diferentes metodologías, entre las que se encuentran la hemaglutinación con látex, las pruebas de ELISA y los inmunoensayos cromatográficos (Fig. 4).



Fig. 4. Dispositivo comercial para detección de Rotavirus A

A las muestras positivas para rotavirus tipo A se les extrae el RNA viral utilizando métodos químicos (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico) o *kits* de extracción de RNA viral, los cuales utilizan columnas de sílica gel para capturar el RNA y dejar pasar los contaminantes de la muestra. La concentración de dsRNA de rotavirus puede ser determinada por absorbancia a 260 nm y se utiliza para cuantificar la cantidad de RNA que será usada en el proceso de genotipificación.

Para identificar los genotipos G de las muestras obtenidas en la etapa anterior, se realizan tres pasos: i) Transcripción reversa del RNA genómico aislado, utilizando un par de *primers* genéricos (Bov9Com5 y

Bov9Com3) ii) Primera amplificación por PCR del gen de VP7 y iii) Segunda amplificación por PCR (*Multiplex* PCR), utilizando un *primer* genérico (Bov9Com5) y un cóctel de *primers* de tipificación específicos (G6, G8 y G10) (Tabla 1). Ya que los *primers* específicos utilizados se localizan a diferentes distancias del extremo 5' del gen, el tamaño de los productos del segundo PCR indican el genotipo G de cada una de las muestras analizadas. Los tamaños de cada uno de los productos de la segunda amplificación se esquematizan en la Fig. 5. Los productos amplificados deben ser identificados por electroforesis en geles de agarosa.

Tabla 1. *Primers* usados para amplificar el gen completo de VP7 y para genotipificación tipo G de rotavirus (Isegawa *et al.*, 1993)

<i>Primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>
Bov4Com5	5'>TTCATTATTGGGACGATTCACA< 3'
Bov4Com3	5'>CAACCGCAGCTGATATATCATC< 3'
P1	5'>TTAAATTCATCTCTTAGTTCTC< 3'
P5	5'>GGCCGCATCGGATAAAGAGTCC< 3'
P11	5'>TTCAGCCGTTGCGACTTC< 3'
Con3	5'>TGGCTTCGCTCATATACAGACA< 3'
Con2	5'>ATTTTCGGACCATTTATAACC< 3'
Con(P1)	5'>CGAACGCGGGGTGGTAGTTG< 3'
Con(P5)	5'>GCCAGGTGTCGCATCAGAG< 3'
Con(P11)	5'>GGAACGTATTCTAATCCGGTG< 3'

una combinación de las dos metodologías. La primera estrategia denominada estrategia BOV usa un juego de *primers* genéricos (Bov4Com5 y Bov4Com3) que amplifica un fragmento de 856 pb del segmento 4 del genoma de rotavirus y un juego de tres *primers* de tipificación para P1, P5 y P11. La segunda estrategia, denominada estrategia CON, utiliza como *primers* genéricos Con2 y Con3 y como *primers* de tipificación los *primers* Con(P1), Con(P5) y Con(P11) (Tabla 2). Una tercera estrategia propuesta por nuestro grupo (HIBR) utiliza simultáneamente los *primers* genéricos Bov4Com3 y Con3, que amplifican un segmento de 1919 pb y los *primers* de tipificación de la estrategia CON. Los productos esperados de las amplificaciones de las tres estrategias se esquematizan en la Fig. 6.

Tabla 2. *Primers* usados para amplificar un fragmento del gen de VP4 y para genotipificación tipo P de rotavirus (Gouvea *et al.*, 1994, Isegawa *et al.*, 1993)

<i>Primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>
Bov9Com5	5'>TGTATGGTATTGAATATACCAC< 3'
Bov9Com3	5'>TCACATCATACTAATCT< 3'
G6	5'>CTAGTTCCTGTGTAGAATC<3'
G8	5'>CGGTTCCGGATTAGACAC<3'
G10	5'>TTCAGCCGTTGCGACTTC< 3'

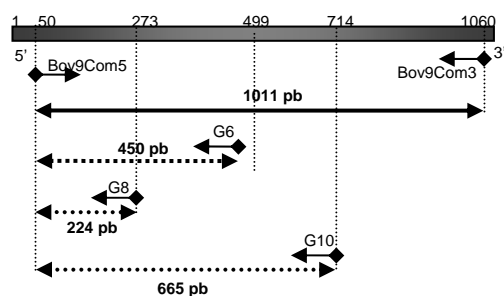


Fig. 5. Esquema del segmento 9 del genoma de rotavirus. Se observan las posiciones de los *primers* y los tamaños esperados de los productos de la amplificación.

Para la genotipificación P, se realizan básicamente los mismos tres pasos descritos para los genotipos G. Se han reportado dos estrategias en la literatura para genotipificación del segmento 4 de rotavirus (Gouvea *et al.*, 1994; Isegawa *et al.*, 1993) y se ha propuesto hacer

CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS POR ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Para corroborar los resultados obtenidos en el proceso de genotipificación, los productos del multiplex PCR de cada uno de los genotipos encontrados deben secuenciarse para confirmar que los productos de amplificación correspondan al gen que se está analizando. El análisis de datos de las secuencias obtenidas se puede realizar visualizando las secuencias con diferentes tipos de *software*. El paquete Chromas (Technelysium Pty, Ltd) se encuentra disponible en línea y puede ser utilizado para dicho fin. Para observar homologías de secuencia se realiza un análisis de similitud de secuencias “BLAST” (Altschul *et al.*, 1997).

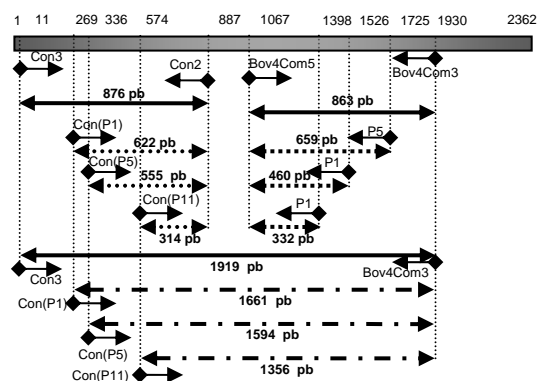


Fig. 6. Esquema del segmento 4 del genoma de rotavirus. Se observan las posiciones de los primers y los tamaños esperados de los productos de la amplificación.

VACUNAS CONTRA ROTAVIRUS BOVINO

Las dificultades presentadas por la aplicación de vacunas con genotipos no presentes en la zona radica en que la protección entre genotipos puede ser deficiente o incluso nula (www.usda.gov).

Una vez que se conocen los genotipos presentes en la región, es posible desarrollar una vacuna *ad hoc* para la zona de interés.

A pesar de que existen vacunas para rotavirus producidas de manera tradicional, estas son frecuentemente ineficientes e inseguras. Desde el punto de vista de obtención a gran escala, la producción de virus puede constituir un riesgo. Primero, la infraestructura necesaria para producir virus potencialmente patógenos es muy compleja y requiere de un estricto control. Además, el producto terminado no está exento de riesgos, ya que existe la posibilidad de reversión de los virus atenuados o de una deficiente inactivación, lo que puede resultar en la transmisión de la enfermedad. Otro problema es la contaminación con otros virus que pueden estar presentes en el sistema de producción. Un ejemplo es la contaminación con pestivirus, causantes de enfermedades graves en cerdos, ovejas, vacas y cabras (Organización Mundial de Sanidad Animal, www.oie.int).

En bovinos se han administrado vacunas comerciales que contienen la cepa de rotavirus NCDV (P1, G6) a vacas gestantes para proveer inmunidad a los terneros recién nacidos (Barreiros *et al.*, 2004). Aunque algunos autores describen protección heterotípica, en la práctica,

la diarrea provocada por rotavirus del grupo A ocasionalmente ocurre en terneros cuyas madres habían sido vacunadas. (Barreiros *et al.*, 2004). Además, las vacunas tradicionales puede presentar alta reactogenicidad y estar asociadas a casos de invaginación intestinal, lo que repercute en retraso en el desarrollo de los animales (Holland, 1990).

En la actualidad, en México se utiliza la vacuna Scourguard® (Pfizer), la cual es utilizada en los ranchos para la producción de carne y leche. Esta vacuna es de tipo multipropósito y contiene cepas inactivadas de rotavirus, coronavirus y *E. coli* K99, además está formulada con toxoide de *C. Perfringens* tipo C y gentamicina como conservador. (www.scourguard.com).

LAS PSEUDOPARTÍCULAS VIRALES (PPV) COMO ALTERNATIVA DE VACUNACIÓN

Las PPV han sido utilizadas para inmunizar contra otros virus. Ensayos clínicos han demostrado que PPV ensambladas de la proteína estructural L1 del papilomavirus (VPH) pueden reducir la incidencia de la infección del VPH y el cáncer cervical (Koutsky *et al.*, 2002; Villa *et al.*, 2005), siendo la vacuna Gardasil® (Merck & Co. Inc.), la primera vacuna recombinante humana basada en pseudopartículas virales aprobada por la FDA (8 de junio de 2006, <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEW/2006/NEW01385.html>). Otras enfermedades que son objetivo de las vacunas basadas en PPV incluyen gastroenteritis, hepatitis C y malaria (Pattenden *et al.*, 2005).

Para el caso de rotavirus, las PPV son producidas al expresar las proteínas estructurales del virus en un sistema recombinante, generalmente usando el sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV). Estudios previos han demostrado que la estructura tridimensional de las PPV logra una excelente respuesta inmune humoral y celular de forma segura (Jiskoot *et al.*, 1997). Para el caso de PPV de rotavirus bovino se ha demostrado que los títulos de anticuerpo que se obtienen en calostro o leche después de vacunar a vacas preñadas son incluso mayores que aquellos obtenidos al vacunar con virus inactivados (Fernández *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). Otra ventaja adicional es que pueden obtenerse estructuras polivalentes, que protejan simultáneamente

contra varios genotipos, de forma versátil y sencilla (Kim *et al.*, 2002).

SISTEMA CÉLULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS (CI-BV)

La producción de PPV para rotavirus requiere la expresión simultánea de varias proteínas virales y el complejo proceso de ensamble para formar la estructura viral. Dentro de los sistemas más utilizados se encuentra el sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV), que consiste en infectar un cultivo de células de insecto con un baculovirus recombinante que contenga el gen o genes de interés, usualmente bajo el promotor *polh* (Palomares *et al.*, 2006). Este sistema tiene varias ventajas: es un sistema eucariótico superior altamente productivo, capaz de producir proteínas muy similares a las de los mamíferos, y la construcción de nuevos vectores recombinantes es sencilla. Sin embargo, el cultivo *in vitro* de células de insecto tiene limitaciones importantes ya que las células de insecto, al igual que otras células de eucariotes superiores, son muy frágiles, son sensibles a metabolitos generados en los cultivos y tienen requerimientos nutricionales complejos (Palomares *et al.*, 2002).

En el sistema de CI-BV es posible obtener diferentes estructuras de PPV de rotavirus, dependiendo de las proteínas expresadas. Estas estructuras pueden ser de una sola capa (expresión de VP2) o multicapa (VP2/VP6, VP2/VP6/VP7, VP2/VP6/VP7/VP4) (Crawford *et al.*, 1994; Labbé *et al.*, 1991), pero pueden obtenerse estructuras incompletas o con diferente morfología. Dentro de los estudios de ensamblaje, se ha encontrado que la formación de la primera esfera de proteína constituida por VP2 es un paso importante para la formación de partículas estables. Luego, debe ensamblarse VP6, que es indispensable para la unión de VP7 y VP4. VP4 puede unirse a la estructura VP2/VP6 sin necesidad de VP7 y viceversa (Crawford *et al.*, 1994).

Uno de los parámetros más determinantes en el sistema CI-BV es la multiplicidad de infección (MDI) la cual se define como el número de partículas infecciosas que se adiciona por célula de insecto en el cultivo. Una MDI de 1 ufp/cél significa que se adicionó una partícula infecciosa por cada célula de insecto del cultivo. Al realizar manipulación de la MDI de cada baculovirus y

hacer diferentes combinaciones de las MDI, se puede optimizar y manipular la composición de las PPV. Es necesario coexpresar las diferentes proteínas con una relación estequiométrica correcta, ya que un exceso o sobreexpresión de una o más proteínas sería económica y energéticamente ineficiente.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han conllevado a encontrar condiciones de expresión de VP2 y VP6 a diferentes MDI que pueden ser utilizadas como punto de partida para el análisis del ensamblaje de las PPV completas (Palomares *et al.*, 2002; Mena, 2004; Mena *et al.*, 2006). Es necesario conocer el comportamiento de VP4 y VP7 de los genotipos escogidos, a fin de establecer los mecanismos y condiciones adecuadas para dar una composición y arquitectura consistentes de las PPV de la futura vacuna. Esta arquitectura será el principio activo de la vacuna que se pretende formular y la cual podrá proteger eficientemente al ganado bovino mexicano, mejorando la calidad de vida de los animales y las ganancias económicas de los productores.

AGRADECIMIENTOS

Apoyo en muestreo de campo por la compañía BIOZOO S.A. de C.V. Apoyo técnico por Vanessa Hernández. Apoyo económico proyecto 2004-c01-103 financiado por SAGARPA-CONACyT.

REFERENCIAS

- Alfieri AF, Alfieri AA, Bacellar MA, Gagliardi JP & Richtzenhain LJ (2004) G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Vet. Microbiol.* 99: 167-173.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.
- Barreiros MA, Alfieri AF, Médici KC (2004) G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. *J. Vet. Med.* B51: 104-109.
- Cao XR, Akihara S, Fang ZY, Nakagomi O & Ushijima H (1999) Genetic variation in the VP4 and NSP4

- genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan. *Microbiol. Immunol.* 43: 171-175.
- Cardoso DDP, Soares CMA, Azevedo MPS, Leite JPG, Munford V & Racz ML (2000) Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *J. Health. Popul. Nutr.* 18: 39-43.
- Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou Y-J & Estes MK (1994) Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 68: 5945-5952.
- Estes MK (1996) Rotaviruses and their replication. In: Fields virology. Knipe DM & Howley PM (eds). Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, pp. 1747-1785.
- Falcone E, Tarantino M, Di Trani L, Cordioli P, Lavazza A & Tollis M (1999) Determination of Bovine Rotavirus G and P Serotypes in Italy by PCR. *J. Clin. Microb.* 37: 3879-3882.
- Fernández FM, Conner ME, Hodgins DC, Parwani AV, Nielsen PR, Crawford SE, Estes MK & Saif LJ (1998) Passive immunity in newborn calves supplements from with recombinant to bovine rotavirus fed colostrum cows immunized SAll rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine* 16: 507-516.
- Fukai K, Maeda Y, Fujimoto K, Itou T & Sakai T (2002) Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrhoeic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. *Vet. Microbiol.* 86: 343-349.
- Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, Kumar R, Bhan MK & Glass RI (1996) Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 174: S30-S36.
- Gouvea V, Santos N & Timenetsky MC (1994) VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1333-1337.
- Gulati B, Nakagomi O, Koshimura, Nakagomi T & Pandey R (1999) Relative frequencies of g and p types among rotaviruses from Indian diarrheic cow and buffalo calves. *J. Clin. Microb.* 37: 2074-2076.
- Holland RE (1990) Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microb. Rev.* 3: 345-375.
- Isegawa Y, Nakagomi O, Nakagomi T, Ishida S, Uesugi S & Ueda S (1993) Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. *Molec. Cell. Probes*, 7: 277-284.
- Jiskoot J, Kersten GA & Beuvery EC (1997) Vaccines. In: Pharmaceutical Biotechnology. Crommelin DJA & Sindelar RD (Eds). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 255-275.
- Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S & Ushijima H (2006) Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J. Med. Virol.* 78: 986-994.
- Kim Y, Nielsen PR, Hodgins D, Chang KO & Saif LJ (2002) Lactogenic antibody response in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccine. *Vaccine* 20: 1248-1258.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM & Jansen KV (2002) A controlled trial of a human papillomavirus tipe 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 347: 1645-1651.
- Labbé M, Charpiliene A, Crawford S, Estes MK & Cohen J (1991) Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 65: 2946-2952.
- Liprandi F, Gerder M, Bastidas Z, Lopez JA, Pujol H, Ludert JH, Joelsson DB & Ciarlet MA (2003) Novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virol.* 315: 373-380.
- López S, Espinosa R, Greenberg HB & Arias CF (1994) Mapping the subgroup epitopes of rotavirus protein VP6. *Virol.* 204: 153-162.
- Martella V, Ciarlet M, Camarda A, Pratelli A, Tempesta M, Greco G, Cavalli A, Elia G, Decaro N, Terio V, Bozzo G, Camero M & Buonavoglia V (2003) Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virol.* 314: 358-370.
- Martella V, Ciarlet M, Bányai K, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S, Camero M, Desario C, Decaro N, Lavazza A & Buonavoglia V (2006) Identification of

- a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology*. 346: 310-311.
- McNeal MM, Sestak K, Choi AHC, Basu M, Cole MJ, Aye PP, Bohm RP & Ward RL (2005) Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. *J. Virology*. 79: 944-954.
- Mena JA (2004) Estudio del ensamble de pseudopartículas virales de rotavirus en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mena JA, Ramírez OT & Palomares LA (2006) Designing infection strategies for the simultaneous production of two proteins by insect cells: A flow cytometry study. *J. Biotechnology*. (Sometime).
- Odeón A (2001) Diarrea neonatal de los terneros. Etiopatología, tratamiento y control. http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_dig/diarreaneon.htm
- Okada J, Urasawa T, Kobayashi N, Taniguchi K, Hasegawa A, Mise K & Urasawa S (2000) New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J. Med. Virology*. 60: 63-69.
- Palomares LA & Ramírez OT (2002) Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 635-644
- Palomares LA, Estrada S & Ramírez OT (2006) Principles and applications of the insect cell baculovirus expression vector system. *In: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications* (Ozturk SS & Hu WS (eds). Taylor and Francis, New York, pp. 627-692.
- Parwani AV, Tsunemitsu H & Saif LJ (1994) Current research in bovine groups A and C rotaviruses. *Curr. Top. Vet. Res.* 1: 115-32.
- Pattenden LK, Middelberg APJ, Nielbert M & Lipin DI (2005) Towards the preparative large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotech.* 23: 523-529.
- Rahman M, Matthijssens, J, Nahar S, Podder G, Sack DA, Azim T & Ranst MV (2005) Characterization of a novel P[25], G11 human Group A rotavirus. *J. Clin. Microb.* 43: 3208-3212.
- Rao CD, Gowda K & Reddy BS (2000) Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology*. 276: 104-113.
- Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N, Jones PW, Bridger JC, Debney TG & Bunch KJ (1986) Microbiology of calf diarrhoea in Southern Britain. *Vet. Rec.* 119: 34-39.
- Saif LJ & Fernández FM (1996) Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 174: S98-S106.
- Sereno MM & Gorziglia MI (1994) The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. *Virology*. 199: 500-504.
- Shinosaki K, Yamanaka T, Tokieda M, Shirasawa H & Shimizu, B (1996) Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in a cell line (CaCo-2). *J. Med. Virology*. 48: 48-52.
- Suzuki Y, Sanekata T, Sato M, Tajima k, Matsuda Y & Nakagomi O (1993) Relative Frequencies of G (VP7) and P (VP4) Serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotaviruses isolated in cell culture. *J. Clin. Microb.* 31: 3046-3049.
- Villa LL, Costa R, Petta C, Andrade R, Ault K, Giuliano A, Wheeler C, Koutsky L, Malm C & Lehtinen M (2005) Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6: 271-278.
- Wani SA, Bhat MA, Ishaq SM & Ashrafi MA (2004) Determination of bovine rotavirus G genotypes in Kashmir, India. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 23: 931-936