

Epidemiología molecular de subgrupos y serotipos de rotavirus en niños menores de cuatro años de la ciudad de Maracaibo con síndrome diarreico.

Diana Callejas-M.^{}, Jesús Estévez^{**}, Linda Blitz-Dorfman^{*}, Doris García^{***}*

^{*}Cátedra de Virología, Escuela de Bioanálisis y Laboratorio de Referencia Viroológica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. ^{**}Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. ^{***}Instituto de Biomedicina, Hospital Vargas, Caracas.

Palabras claves: rotavirus, subgrupo, serotipos, diarreas.

Resumen: Entre noviembre de 1989 y enero de 1991, se recolectaron 200 muestras de heces de niños menores de cuatro años hospitalizados con síndrome diarreico. Sesenta muestras de heces provenientes de niños aparentemente sanos con el mismo rango de edades fueron utilizadas como controles. La infección por rotavirus fue diagnosticada en 28 (14%) especímenes a través de dos inmunoensayos enzimáticos (uno del Lab. Abbot y uno con anticuerpos monoclonales). PAGE, ELISA y PCR fueron utilizados para determinar los electroferotipos, subgrupos y serotipos respectivamente. El estudio de electroferotipos detectó dos patrones de migración: uno corto (SGI), en 4 (14,3%) muestras y un patrón largo (SGII), en 16 casos (57,1%). Estos resultados fueron verificados a través de un ELISA con anticuerpos monoclonales subgrupo-específicos. La reacción en cadena de la polimerasa mostró que el serotipo 1 estaba presente en 46.7% de las muestras positivas, mientras que los serotipos 3 y 4, fueron detectados en el 3,6% y 7,4% de los especímenes analizados, respectivamente. El serotipo 2 no fue detectado y un 42,8% no pudo ser serotipificado. La mayor incidencia de rotavirus fue observada en el sexo masculino y en edades comprendidas entre los 0 y los 12 meses. No pudo determinarse ningún tipo de correlación entre la excreción de un subgrupo o serotipo determinado con respecto a una edad en particular. Todas las variantes genéticas detectadas circularon en niños menores de 2 años.

Recibido: 29-11-93. Aceptado: 25-04-94.

INTRODUCCION

La gastroenteritis por rotavirus es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en los niños de los países desarrollados y subdesarrollados, así como también de una gran variedad de mamíferos y especies de aves (1, 3, 5, 6, 7, 12).

Estudios epidemiológicos nacionales e internacionales han puesto de manifiesto la importancia de las diarreas producidas por este agente (14, 26, 28, 35).

Los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae. Presentan una doble cápside de 65 a 75 nm que rodea al núcleo en cuyo interior se encuentra el genoma viral que consiste en 11 segmentos de ARN de doble cadena. Cada gen codifica una proteína, con excepción del gen 11 que codifica para dos, sin embargo sólo 6 de ellas forman parte de la estructura viral; la Vp1, Vp2, Vp3 y Vp6, codificadas por los genes 1, 2, 3 y 6, forman la cápside interna del virión, mientras que la cápside externa está formada por las proteínas Vp4, y la Vp7, codificadas por los genes 4, 8 ó 9 respectivamente (5).

La proteína Vp6, es el componente más antigénico y más abundante. Presenta antígenos comunes de grupo y carece de actividad neutralizante y es la responsable de la especificidad de subgrupo. Esta especificidad antigénica ha permitido la clasificación de los rotavirus dentro de dos distintos subgrupos: I (SGI) y II (SGII) (12). El descubri-

miento de los anticuerpos monoclonales contra estas proteínas subgrupo-específicas, ha permitido su identificación y caracterización. El análisis electroforético de los 11 segmentos del ARN genómico, ha proporcionado una valiosa información epidemiológica. A pesar de la diversidad de electroferotipos existentes, se han podido diferenciar dos patrones de migración de los segmentos 10 y 11 del genoma viral; un patrón corto de migración lenta (SG I), y un patrón largo de migración rápida (SG II) (2, 11, 15, 19, 22, 23, 30, 33). Sin embargo, recientemente, ha sido reportado el hallazgo de rotavirus pertenecientes al subgrupo I con un patrón electroforético largo, como es el caso de la cepa AU-1 (23).

La clasificación de serotipos está basada en la presencia de las proteínas de superficie Vp7 y Vp4, denominándose serotipos G y serotipos P, según la respectiva proteína detectada. Los serotipos G1 al G4 son los más frecuentemente involucrados en los cuadros diarreicos de los niños menores de 2 años. Por ende, su estudio y clasificación han sido realizados de manera extensiva. Mientras que los serotipos P, solo recientemente se ha tratado de esclarecer su papel antigénico (21, 31), por lo que en los estudios de población se ha utilizado en forma preferencial los serotipos G (12).

El desarrollo de técnicas de anticuerpos monoclonales, hibridación de ácidos nucleicos y técnicas de biología molecular han permiti-

do una mejor caracterización de los mismos (22, 37, 16).

La importancia de los serotipos de rotavirus circulantes como causa de graves afecciones en la población infantil, se ha estudiado en diferentes áreas geográficas, demostrándose variaciones en la circulación de los mismos, incidiendo estos resultados en los ensayos de elaboración de vacunas y en los estudios de inmunizaciones dirigidos a lograr estrategias de vacunación adecuadas (1, 4, 8, 10, 24, 26, 32, 34).

El presente trabajo describe la diversidad genética de los rotavirus humanos en base al estudio de los serotipos relacionándolos con la edad, el sexo y la circulación epidemiológica. Los resultados aquí presentados constituyen el primer estudio en la epidemiología molecular de los rotavirus humanos en el Estado Zulia, donde la gastroenteritis causada por dicho agente es típicamente endémica, aportando información críticamente importante para el desarrollo de estrategias efectivas de vacunación.

MATERIALES Y METODOS

Durante el período de noviembre de 1989 a enero de 1991 se recolectaron al azar 200 muestras de heces en una población de niños menores de cuatro años de edad, de ambos sexos con enfermedad diarreica de variada sintomatología y severidad; que se encontraban en el área de consulta externa, hidrata-

ción y observación, en diferentes hospitales de la ciudad de Maracaibo. Como grupo control, se seleccionaron 60 muestras de heces de niños asintomáticos, con un distribución similar en cuanto a sexo y edad, que asistieron a las emergencias hospitalarias por una causa distinta a las diarreas.

Todos los pacientes fueron examinados y se les elaboró una encuesta que investigó: historia de la enfermedad, características clínicas y epidemiológicas, factores de riesgos de infección y nivel socioeconómico del grupo familiar.

Previo análisis de las características macroscópicas de los especímenes fecales (consistencia, color, presencia o ausencia de moco y sangre), se preparó una suspensión de la muestras al 10% en PBS, pH 7,4, siendo almacenadas a -70°C para su posterior análisis.

Detección de rotavirus

La presencia de rotavirus se determinó utilizando inicialmente una prueba de inmunoensayo enzimático (Rotazyme II ABBOTT Laboratories, Diagnostic Division, USA), y aquellas muestras que resultaron positivas fueron confirmadas con un ELISA con anticuerpos monoclonales según el método descrito por Liprandi y col. (22).

Análisis del ARN viral

El ARN viral fue extraído de la suspensión fecal con una mezcla de fenol-cloroformo y posterior precipitación con etanol (29), para luego ser corrido en un sistema disconti-

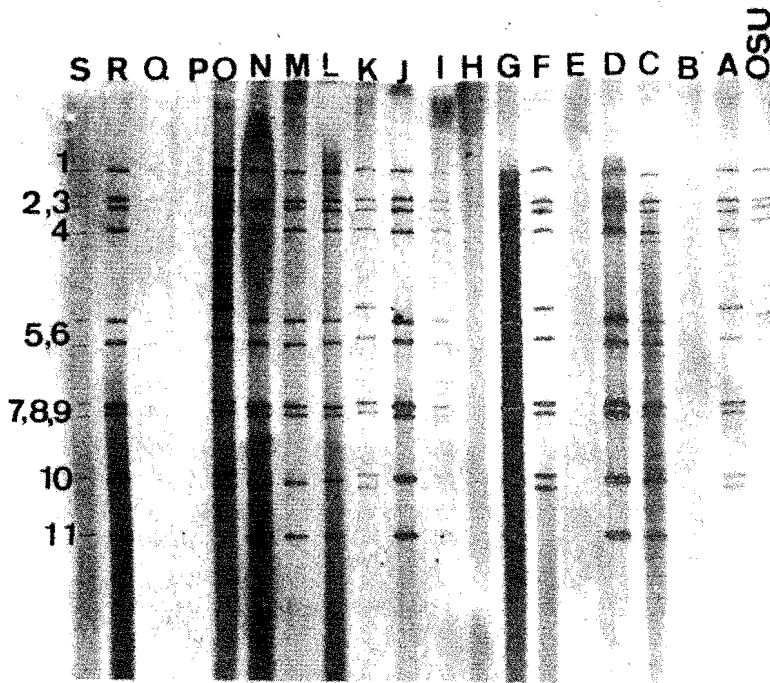


Fig. 1. Frecuencia de los patrones de migración electroforética de ARN de rotavirus humano en geles de poliacrilamida al 10%. A, F, K, O subgrupo I (patron corto); C, D, E, G, I, J, L, M, N, Q, R, S subgrupo II (patron largo); B, H no migraron.

nuo en geles de poliacrilamida al 10 y 4% según el método de Laemmli (20). La tinción de los geles se realizó utilizando el nitrato de plata como colorante, de acuerdo a la técnica de Herring y col. (18). Las variaciones en la migración del ARN viral fue demostrada mediante su comparación con patrones corridos sobre el mismo gel correspondiente a la cepa porcina OSU (Fig. 1) (22).

Determinación de subgrupos y serotipos

A las muestras positivas para rotavirus, tanto del análisis por ELISA como por PAGE, se les realizó la determinación de subgrupos utilizando el método de Greenberg con anticuerpos monoclonales subgrupo específicos (15). Estos monoclonales reconocen rotavirus de subgrupos I (hibridoma 255/60) y rotavirus subgrupos II (hibridoma 631/9). Se utilizó como cepa con-

TABLA I
 FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA ROTAVIRUS
 POR ELISA CONFIRMATORIO EN NIÑOS MENORES DE CUATRO AÑOS
 NOVIEMBRE 1989 - ENERO 1991

Casos estudiados	Pacientes	%	Control	%
Positivos	28	14	4	6,7
Negativos	172	86	56	93,3
Total	200	100	60	100

trol, las cepas OSU para subgrupo I y la Gottfried para subgrupo II (22).

El análisis de los serotipos se realizó, mediante la hibridación del ARN de las muestras a sondas radioactivas, generadas utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Termoestable (P.C.R). Estas sondas marcadas con P^{35} son de una región hiperdivergente (nucleótidos 51-392) del gen del rotavirus que codifica a la proteína viral Vp7 y que reconocen secuencias específicas para los serotipos 1, 2, 3 y 4 según la metodología descrita por Flores y col (13). ARN de cadena simple obtenido por transcripción in vitro y, ARN de doble cadena obtenido de nucleocápsidas purificadas de cepas de laboratorio bien caracterizadas fueron utilizados como controles.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de Chi-Cuadrado, con la corrección de Yates en los casos necesarios, con el fin de relacionarlos con las variables de interés epidemiológico.

RESULTADOS

De un total de 200 casos, 28 resultaron positivos para el agente viral (14%). De las 60 muestras seleccionadas como grupo control, sólo en cuatro de ellas se determinó la presencia de rotavirus (6.7%) (Tabla I).

Basándose en la migración de los segmentos 10 y 11, se observó la presencia de dos electroferotipos; el subgrupo I de migración corta y el subgrupo II de migración larga (Fig. 1). No se observaron variaciones de movilidad en el resto de los

TABLA II
FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS PARA ROTAVIRUS CON
RESPECTO AL SEXO EN NIÑOS MENORES DE CUATRO AÑOS
NOVIEMBRE 1989 - ENERO 1991

Sexo	Casos Estudiados	%	Casos Positivos	%
Masculino	120	60	20	16,7
Femenino	80	40	8	10,0
Total	200	100	28	14,0

segmentos que pudiesen significar otras variaciones genéticas.

Estos resultados coincidieron con los obtenidos mediante la prueba de inmunoensayo enzimático con anticuerpos monoclonales subgrupos específicos.

En el estudio de los subgrupos se demostró que un total de 4 muestras (14,29%) contenían subgrupo I; mientras que el subgrupo II fue identificado en las 16 restantes (57,14%). Ocho muestras (28,5%) que resultaron positivas para rotavirus con anticuerpos monoclonales, no migraron electroforéticamente considerándose como indeterminadas.

En la distribución por edades, la mayor incidencia estuvo comprendida en los grupos de 0 a 12 meses, encontrándose que de 0 a 6 meses resultaron 13 casos (46,42%); de los cuales solo uno corresponde al SGI (25%) y 10 al SGII (62,5%). Entre los 7 y 12 meses

se obtuvieron 12 casos (42,86%) de donde 2 fueron para SGI (50%); y 5 (31,25%) para SGII.

La partícula viral del rotavirus se aisló con mayor frecuencia en los meses de febrero-marzo y octubre-noviembre, observándose variaciones temporales durante el muestreo, siendo el subgrupo predominante el subgrupo II.

En la Tabla II se observa que de las 28 muestras rotavirus positivas, 20 correspondieron al sexo masculino, y las 8 restantes al sexo femenino.

La Tabla III muestra la distribución de los serotipos de rotavirus según la edad. Del total de muestras serotipificadas durante el período de estudio, 13 correspondieron al serotipo 1 (46,4%); 1 para el serotipo 3 (3,6%) y 2 para el serotipo 4 (7,4%). El serotipo 2 no fue detectado. Se conoció de un caso que expresó tanto el serotipo 1 como el 4. El resto no pudieron ser serotipi-

TABLA III
 INCIDENCIA DE SEROTIPOS DE ROTAVIRUS POR GRUPOS ETARIOS
 NOVIEMBRE 1989 - ENERO 1991

Serotipos	No. de Casos	Distribución Etaria (meses)			
		0-6	7-12	13-24	>24 m
S ₁ (WA)	13(46,4) ^a	9(69,2) ^b	3 (23,2)	1(7,6)	-
S ₂ (DS ₁)	-	-	-	-	-
S ₃ (P)	1(3,6)	-	1(100)	-	-
S ₄ (ST ₃)	2(7,4)	-	2(100)	-	-
Indeterm.	12(42,8)				
Total	28				

^a Los números entre paréntesis en esta columna representan el porcentaje de casos con respecto al total general.

^b Los números entre paréntesis en los grupos etarios representan el porcentaje de casos con respecto al total de casos de cada serotipo.

ficados para un 42,8% de indeterminados.

La distribución por edad de los niños afectados con diarrea por cada uno de los serotipos encontrados, muestra que la mayoría de ellos estaban en edades comprendidas de 0 a 12 meses. Los serotipos predominantes fueron el serotipo 1 y el serotipo 4. Se encontró un niño de 2 años el cual presentó serotipo 1, así como también un niño de un año el cual excretó serotipo 3.

Los serotipos 1, 3 y 4 estuvieron agrupados en el subgrupo II, patrón electroforético largo; el serotipo 2 el cual no fue detectado está clasifi-

cado dentro del subgrupo I, patrón electroforético corto.

La relación entre el sexo y serotipo se describe en la Tabla IV; el serotipo 1 estuvo presente en su mayoría en niños del sexo masculino (90,0%), junto al serotipo 3 (9,9%). Las niñas excretaron serotipo 1 y 4 para un 60 y 40% respectivamente.

La distribución anual de los serotipos se muestra en la Fig. 2; la circulación de ellos resultó de tipo heterogénea con un aparente carácter estacional, donde el serotipo 1 fue el más detectado durante el muestreo, siendo los picos de ma-

TABLA IV
RELACION DE SEROTIPOS DE ROTAVIRUS
CON RESPECTO AL SEXO
NOVIEMBRE 1989 - ENERO 1991

Sexo	Casos est.	%	Serotipos					
			S ₁	%	S ₃	%	S ₄	%
Masc.	11	68,8	10	90,9	1	9,9	-	-
Fem.	5	31,3	3	60,0	-	-	2	40,0
Total	16	100,0						

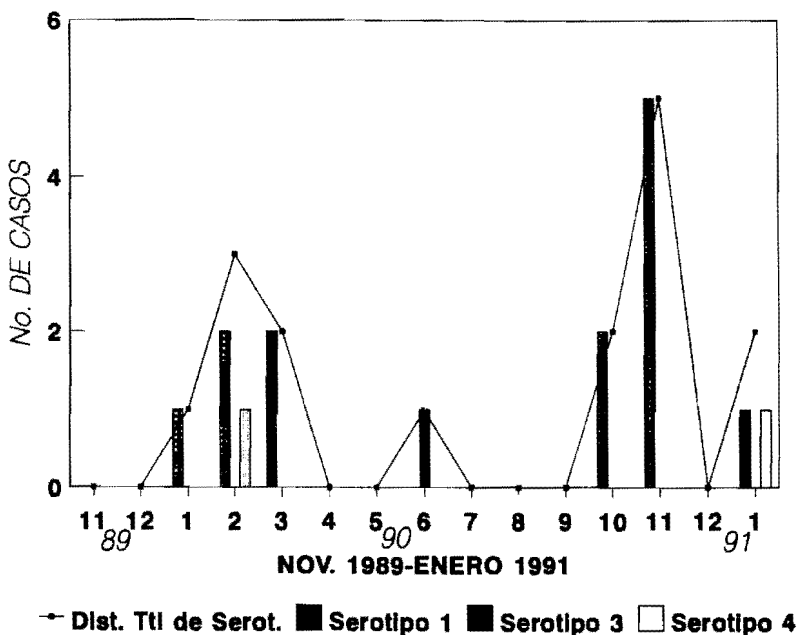


Fig. 2. Distribución epidemiológica de serotipos de rotavirus desde noviembre de 1989 a enero 1991.

yor incidencia en los meses de febrero-marzo y octubre-noviembre. El serotipo 4 circuló en los meses de febrero y el serotipo 3 con un solo caso en el mes de junio.

DISCUSION

Los rotavirus son los causantes de la mayoría de los cuadros de gastroenteritis en niños menores de 4 años de edad (1, 2, 5, 12, 14). Sin embargo, en nuestra región los patrones de circulación epidemiológicos no han sido estudiados exhaustivamente, ya que se requiere del análisis a gran escala y de largos períodos de tiempo para su evaluación. El presente estudio muestra una serie de datos que relacionan el aislamiento de rotavirus, sus variantes electroforéticas y la caracterización de subgrupos y serotipos antigénicos encontrados durante un período de 15 meses.

A través de la técnica de ELISA (Rotazyme II) se determinó inicialmente un porcentaje de positividad del 25%. Resultados que fueron confirmados con el mismo método pero utilizando anticuerpos del tipo monoclonal, obteniéndose solamente 28 muestras positivas para un 14%. Estos últimos resultados difieren de los encontrados en estudios anteriores realizados en nuestra región, donde la positividad a rotavirus oscilaba entre 41 y 47% (14, 17). La baja especificidad del test de Elisa utilizado en los estudios señalados, ha sido demostrada por el trabajo de Yolken en

1983 (36), por lo que podría considerarse como posibles falsos positivos, las discrepancias observadas en los resultados entre estos estudios y el nuestro. Las muestras controles en el presente estudio tuvieron un porcentaje de positividad del 6,7%. Esta positividad es posiblemente debida a una circulación silenciosa del virus, en niños cuyos cuadros infecciosos, presentan poca o ninguna sintomatología. Ha sido ya demostrado, tanto en Australia como en Venezuela, que este tipo de infección parece inducir cierto grado de protección inmunológica (4, 26), por lo que actualmente se está trabajando en diversas vacunas utilizando cepas atenuadas (12, 26, 27).

Los patrones de migración electroforéticos estuvieron asociados a la especificidad de SGI y SGII, no encontrándose otros polimorfismos que pudiesen hacer pensar en alguna diversidad genética existente entre los rotavirus, bien sea la ocurrencia de mutaciones (drift), cambios por reasociación genético (shift) y de reordenamientos en el genoma (12). Aunque estas variaciones son posibles, ya que diversos estudios a nivel mundial han podido encontrarlas en los electroferotipos pertenecientes a un subgrupo en particular (9), los porcentajes de incidencia de las mismas son mínimos (23, 27), por lo que nuestro ensayo se corresponde con otros autores que tampoco han determinado variaciones genéticas en sus muestras (27).

En lo que respecta a la distribu-

ción de los subgrupos demostrada en este estudio, existen reportes donde se describe la misma frecuencia para ambos subgrupos, o aparición de un subgrupo específico sin la aparición del otro en una determinada época del año, lo cual se refleja en una variación de la inmunidad de la población a riesgo (4, 6, 23). Estas variaciones temporales en la diversidad genética de electroferotipos y subgrupos en los rotavirus tienen implicaciones importantes para el diagnóstico y la epidemiología de los rotavirus.

De las muestras positivas analizadas, 8 de ellas no migraron electroforéticamente, indicando esto la presencia de antígenos virales a pesar de que el ARN y la cápside viral pudiesen no estar completos (25).

La distribución por edad de los rotavirus estuvo comprendida entre 0 a 24 meses, resultados que concuerdan con los obtenidos por otros autores latinoamericanos y nacionales, aún cuando se han descrito reportes en niños de mayor edad (7, 8, 14). La aparición de una elevada susceptibilidad en niños menores de 6 meses puede deberse a que los anticuerpos maternos transmitidos por vía placentaria o cualquier otra vía, no confieren inmunidad hacia la infección. Además el serotipo predominante en un área determinada puede cambiar frecuentemente a lo largo de los años, como lo demostró el estudio de White y col. en 1991 (35), esto implicaría que los anticuerpos maternos pueden no corresponder con el serotipo predominante en el tiem-

po de nacimiento del niño. Es necesario, por lo tanto, profundizar los estudios inmunológicos y determinar el papel que juegan las inmunoglobulinas en la protección contra los rotavirus (17, 32).

Con respecto a la relación de casos positivos de acuerdo al sexo, nuestros resultados concuerdan con los de Gaskin y col. (14), donde se determinó una ligera diferencia, no significativa estadísticamente, entre ambos sexos.

Se han descrito cambios temporales en la circulación de serotipos en diferentes partes del mundo, como Australia, Japón, Indonesia y Bangkok (4, 28, 33); en Caracas, Venezuela durante los años 1979 a 1989, se observaron cambios en la distribución de los mismos, variando en estos años del serotipo 4 en los años 88 y 89, al serotipo 1 en el 90 y 91 (10, 35). Esto último coincide con el estudio realizado en nuestro Estado, en el que predominó el serotipo 1. La aparición de estas variaciones están estrechamente relacionadas con el desarrollo de inmunidad serotipo-específica, de allí la importancia que tiene el conocer la circulación de estas variantes en una determinada área geográfica, y el desarrollo de una inmunidad producida por el serotipo predominante. Las implicaciones epidemiológicas de estos cambios antigénicos son de gran importancia en la obtención de una vacuna altamente reactiva contra los cuatro serotipos antigénicos de mayor circulación (35). Varias de las vacunas que se están probando

actualmente inducen inmunidad contra algún serotipo en particular; por ejemplo, la vacuna RIT 4237, da una buena protección contra el serotipo 1; aunque en Gambia resultó ser menos efectiva contra el serotipo 2, el cual circulaba mayormente en ese momento. De igual forma la vacuna RRV indujo una sustancial protección solo contra procesos diarreicos severos causados por su serotipo homólogo, es decir el serotipo 3 (24).

Se han descrito numerosos electroferotipos muchos de los cuales se han caracterizado como pertenecientes a los cuatro serotipos de mayor circulación, así como también se ha podido encontrar muestras que presentaban idénticas migraciones electroforéticas pero que no pertenecen al mismo serotipo (24, 32). Al analizar en nuestros resultados la correlación existente entre los subgrupos, serotipos y patrones de migración del ARN viral, se encontró una estrecha relación entre el patrón de migración largo correspondiente al subgrupo II y la presencia de serotipos 1, 3 y 4; mientras que el patrón de migración corto que corresponde al subgrupo I, no exhibió el serotipo 2. Estos resultados y los estudios realizados con anterioridad en diversas partes del mundo, nos indican que no se pueden tomar los patrones de migración electroforéticos por sí solos para la identificación de un serotipo en particular (26).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y numerosos estudios previos, demuestran que pue-

den ocurrir cambios repentinos en la prevalencia de un determinado serotipo. Este hecho es el factor causal de que los ensayos de inmunización realizados con vacunas experimentales produjeran respuestas homotípicas, o heterotípicas con una respuesta inmunogénica no mayor del 50% para cada serotipo empleado (26), repuesta que resulta insuficiente para promover una adecuada protección de los individuos inmunizados. Por ello es necesario la continuación y ampliación de los programas de investigación extensos que determinen con precisión la diversidad genética del virus, la causa de la misma, y se aboquen a crear, en función de estos conocimientos, vacunas cuadrivalentes o de tipo similar, que agrupen a los serotipos humanos más extendidos permitiendo con ello una serorespuesta efectiva en las poblaciones a inmunizar.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto de investigación ha sido subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES).

El estudio de los subgrupos y electroferotipos de rotavirus fue posible gracias a la colaboración prestada por el Dr. Ferdinando Liprandi del Laboratorio de Biología de Virus del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

ABSTRACT

Molecular epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in children under four years of age with diarrheic syndrome. Callejas, D. (Catedra de Virología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado Postal 15165, Maracaibo 4001-A, Edo. Zulia, Venezuela), Estévez, J., Blitz-Dorfman, L., García, D. *Invest Clin* 35(1): 3 - 18, 1994.

Key words: rotavirus, serotypes, subgroups, diarrhea.

Between november 1989 and january 1991, two hundred stool samples were obtained from children under 4 years of age, hospitalized with diarrhea. Sixty stool samples from apparently healthy children were used as controls. Rotavirus infections were diagnosed in 28 (14%) specimens using two enzyme immunoassays, (Abbott Laboratories' kit and monoclonal antibodies). PAGE, ELISA and PCR were used to determine electropherotypes, subgroups and serotypes respectively. The study of electropherotypes detected two migration patterns: a short one in 4 samples (14.3%) and a long pattern in 16 cases (57.1%). These results were verified by a specific subgroup monoclonal antibodies ELISA. The polymerase chain reaction showed that serotype 1 accounted for 46.4% of positive samples, while serotypes 3 and 4 present in 3.6% and 7.4% of the specimens respectively. Serotype 2 was not detected

and 42.8% samples were untypable. Males between 0 and 12 months of age were the most affected. There was no correlation between human rotavirus serotypes, subgroups and electropherotypes, and age of the patients. All detected genetic variants were present in children under two years of age.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BEARDS G. M., DESSLBERG U., FLEWETT T. H.: Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes 1983 to 1988. *J Clin Microbiol* 27 (12): 2827-2833, 1989.
- 2- BINGNAN F., UNICOMB L.E., GUANGLI T., ALI A., MALEK A., RAHIM Z., TZIPORI S. Cultivation and characterization of novel human group A rotavirus with long RNA electropherotypes, subgroup II specificities, and serotype 2 VP7 genes. *J Clin Microbiol* 29 (10): 2224-2227, 1991.
- 3- BISHOP R.F., DAVIDSON G.P., HOLMES I.H., RUCK B.J.: Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281-1283, 1973.
- 4- BISHOP R.F., UNICOMB L.E., BARNES G.L.: Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. *J Clin Microbiol* 29(5): 862-868, 1991.
- 5- BLACKLOW N., GRENNBERG H.B.: Viral gastroenteritis, Review Article. *New England J Med* 325: 252-264, 1991.

- 6- BRANDT C.D., RODRIGUEZ W.J.: Viral gastroenteritis during eight years of study. *J Clin Microbiol* 18(1): 71-78, 1983.
- 7- ESPARZA J., VIERA DE TORRES B., PIÑERO A., CARMONA F.O., MAZZALI DE ILJA R.: Rotavirus in venezuelan children with gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg* 26: 148-151, 1977.
- 8- ESPEJO R., CALDERON E.: Rotavirus gastroenteritis in hospitalized infants and young children in Mexico City. *Rev Lat Amer Microbiol* 20: 239-246, 1978.
- 9- ESTES M.K., COHEN J.: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53: 410-449, 1989.
- 10- FLORES J., TANIGUCHI K., GREEN K., PEREZ-SCHAEL I., GARCÍA D., SEARS J., URASAWA S., KAPIKIAN A.Z.: Relative frequencies of rotavirus serotypes 1, 2, 3 and 4 in venezuelan infants with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 26: 2092-2095, 1988.
- 11- FLORES J., GREEN K.Y., GARCÍA D., SEARS J., PEREZ-SCHAEL I., AVENDANO L.F., RODRIGUEZ W.B., TANIGUCHI K., URASAWA S., KAPIKIAN A.Z.: Dot hybridization assay for distinction of rotavirus serotypes. *J Clin Microbiol* 27(1): 29-34, 1989.
- 12- FLORES J., KAPIKIAN A.Z.: Vaccines against viral diarrhea. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 4(3): 675-693, 1990.
- 13- FLORES J., SEARS J., PEREZ-SCHAEL I., WHITE L., GARCIA D., LANATA C., KAPIKIAN A.Z.: Identification of human rotavirus serotype by hybridization to polymerase chain reaction-generated probes derived from a hyperdivergent region of the gene encoding outer capsid protein Vp7. *J Virol* 64(8): 4021-4024, 1990.
- 14- GASKIND., SOTO A.: Los rotavirus como agentes etiológicos de la gastroenteritis en el Estado Zulia. *Invest Clin* 21(4): 259-275, 1980.
- 15- GREENBERG H., McAULIFFE V., VALDESUSO J., WYATT R., FLORES J., KALICA A., HOSHINO Y., SINGH N.: Serological analysis of subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 39: 91-99, 1983.
- 16- GUNASEDA S., NAKAGOMI O., ISEGAWA Y., KAGA E., NAKAGOMI T., STEELE D., FLORES J., VEDA S.: Relative frequency of Vp4 gene alleles among human rotaviruses recovered over 10-year period (1982-1991) from japanese children with diarrhea. *J Clin Microbiol* 30(8): 2195-2197, 1993.
- 17- HERNÁNDEZ H., PEREZ-SCHAEL I., SOTO-ESCALONA A.: Estudio seroepidemiológicos de rotavirus en una población infantil venezolana. Relación entre lactancia materna y seropositividad. *Bol Med Hosp Infant Mex* 41(11): 580-584, 1984.
- 18- HERRING A.J., INGLIS N.F., OJEH C.K., SNODGRASS D.R., MENZIES J.D.: Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 16: 473-477, 1982.

- 19- KRAUSE P., HYMS I., MIDDLETON P., FLORES J.: Unireability of Rotazyme ELISA test in neonatos. *J Pediat* 10: 259-262, 1983.
- 20- LAEMMLI U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 21- LI B., GORZIGLIA M.: VP4 serotype of the Gottfried strain of porcine rotavirus. *J Clin Microbiol* 31(11): 3075-3077, 1993.
- 22- LIPRANDI F., BRITO B., PALENCIA L., ESPARZA J.: Derivation of a monoclonal antibody against the group specific antigen of rotaviruses and its use in a diagnostic enzymatic immunoassay. *Acta Cient Venez* 37(4): 432-436, 1986.
- 23- NAKAGOMI T., KATSUSHIMA N., NAKAGOMI O.: Relative frequency of human rotavirus subgroups I and II in relation to short and long electropherotypes of viral RNA. *Ann Inst Pasteur/Virol* 139: 295-300, 1988.
- 24- NOEL J.S., BEARDS G.M., CUBITT W.D.: Epidemiological survey of human rotavirus serotypes and electropherotypes in young children admitted to two children's hospital in Northeast London from 1984 to 1990. *J Clin Microbiol* 29(10): 2213-2219, 1991.
- 25- OLIVE D.M., SETHI S.K.: Detection of human rotavirus by using an alkaline phosphatase-conjugated synthetic DNA probe in comparison with enzyme-linked immunoassay and polyacrylamide gel analysis. *J Clin Microbiol* 27(1): 53-57, 1989.
- 26- PEREZ-SCHAEI I., GARCÍA D., WHITE L., BLANCO M., GONZALEZ R., URBINA G., BOHER Y., CUNTO W., MENDEZ M., PEREZ M., DAOUD N., SOTO DE SANABRIA I., VIANA G., KAPIKIAN A., FLORES J.: Pruebas de campo de una vacuna anti-rotavirus realizadas en Venezuela (1985-1989). *Arch Ven Pueric Ped* 53(Sup 2): 29-35, 1990.
- 27- PEREZ-SCHAEI I., ROJAS MAZ-ZEI A.M., FLORES J.: Desarrollo de una vacuna anti-rotavirus pruebas de campo en Venezuela. *Acta Cient Venez* 42: 296-312, 1991.
- 28- PIPITTAJAN P., KASEMPI-MOLPORN S., IKEGAMI N., AKATANI K., WASI C., SINARACHATANANT P.: Molecular epidemiology of rotavirus associated with pediatric diarrhea in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol* 29(3): 617-624, 1991.
- 29- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.: Rapid isolation of total RNA from mammalian cells. en: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 7. Extraction purification and analysis of messenger RNA eukaryotic cells. p. 7.10-7.11, 2da. ed. Foord N. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 30- STEELE A.D., BOS P., ALEXANDER J.J.: Clinical features of acute infantile gastroenteritis associated with human rotavirus subgroup I and II. *J Clin Microbiol* 26(12): 2647-2649, 1988.
- 31- STEELE A.D., GARCIA D., SEARS J., GERNA G., NAKAGOMI O., FLORES J.: Distribution of VP4 gene alleles in human rotaviruses by using probes to the hyperdivergent region

- of the VP4 gene. *J Clin Microbiol* 31(7): 1735-1740, 1993.
- 32- TOTTERDELL B.M., CHRYSTIE I.L., BANATVALA J.E.: Milk antibodies in neonatal rotavirus infection, *Br Med J* (22): 819-830, 1980.
- 33- WARD R.L., CLEMENS J.D., SACK D.A., KNOWLTON D.R., McNEAL M.M., M.M., HUDA N., AHMED F., RAOM., SCHIFF G.M.: Culture adaptation and characterization of group A rotavirus causing diarrheal illnesses in Bangladesh from 1985 to 1986. *J Clin Microbiol* 29(9): 1915-1923, 1991.
- 34- WHITE L., PEREZ I., PEREZ M., URBINA G., GREENBERG H., KAPIKIAN A., FLORES J.: Relative frequency of rotavirus subgroups 1 and 2 in Venezuelan children with gastroenteritis as assayed with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 19: 516-520, 1984.
- 35- WHITE L., GARCÍA D., BOHER Y., BLANCO M., PEREZ M., ROMER H., FLORES J., PEREZ-SCHAEL I.: Temporal distribution of human rotavirus serotypes 1, 2, 3 and 4 in Venezuelan children with gastroenteritis during 1979-1989. *J Med Virol* 34: 79-84, 1991.
- 36- YOLKEN R.H.: Use of monoclonal antibodies for viral diagnosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 104: 177-195, 1983.
- 37- YOLKEN R.H., WYATT R.G., ZISSIS G., BRANDT C.D., RODRIGUEZ W.J., KIM H.W., PARROT R.H., URRUTIA J.J., MATA L., GREENBERG H.B., KAPIKIAN A.Z., CHANOCK R.M.: Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *N Engl Med* 299(21): 1156-1161, 1978.