

2 E 11. 12



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

INVESTIGACION DE ROTAVIRUS EN NIÑOS CON DIARREAS

AGUDAS POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN COLUMNA

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

SERGIO D. RAMOS SANCHEZ



1984



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 esta 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.

I N D I C E

	PAG.
CAPITULO I. INTRODUCCION.	1
CAPITULO II. GENERALIDADES	
II.1. MONFOLOGIA.	4
II.2. COMPOSICION.	5
CAPITULO III. MATERIAL Y METODOS	
III.1. MATERIAL.	8
III.2. METODOS.	10
CAPITULO IV. RESULTADOS.	18
CAPITULO V. DISCUSION.	19
APENDICE I.	22
BIBLIOGRAFIA.	25

I. INTRODUCCION

Desde hace tiempo, se ha sospechado que la mayoría de las epidemias y casos esporádicos de gastroenteritis, -- son debidas a una infección viral y no a la bacteriana, ya que sólo en el 20% de éstas, fueron aislados agentes bacterianos. (1)

La Gastroenteritis Infecciosa Aguda (G.I.A.), en niños, ha sido siempre un problema importante en varias partes del mundo (2,3,4,5), incluyendo a nuestro país (6), causando epidemias graves que frecuentemente son de elevada -- mortalidad.

En 1973 Bishop y colaboradores, examinaron cortes -- ultra finos de biopsias de duodeno tomadas de nueve niños -- con G.I.A. y en seis de ellos encontraron que las células -- epiteliales contenían gran cantidad de partículas virales -- con morfología similar a la de los orbivirus. (7)

Flewett y colaboradores en Birmingham (8) y Middleton y colaboradores en Canadá (9), examinaron las heces de niños y adultos con gastroenteritis y encontraron particu-

las virales, las cuales eran morfológicamente idénticas a las del virus de la diarrea de las terneras (New born calf-virus, N.C.D.V.), comprobándose su relación antigénica mediante inmunomicroscopía electrónica y fijación de complemento. (10)

Debido a su identidad morfológica, relación serológica, así como a las diferencias que presenta en relación a orbivirus reovirus, Fleweti y colaboradores (11), propusieron el nombre de rotavirus para éste nuevo agente, incluyendo en un género separado dentro de la familia Reoviridae.

Diversas técnicas han sido empleadas para la detección de rotavirus, pero hasta el momento la microscopía electrónica, aunque sofisticada, continúa siendo la técnica más confiable además de que permite la detección de otros virus entéricos. Así pues, resultaría ventajoso disponer de otra técnica rápida, simple y casi tan confiable como la microscopía electrónica, que pueda ser empleada en el diagnóstico de rutina, permitiéndonos ampliar los estudios epidemiológicos y en el futuro la obtención de una terapéutica específica para las infecciones por rotavirus.

Ya que en nuestro país la incidencia de enteritis y enfermedades diarreicas ocupa el lugar preponderante entre las enfermedades notificadas, (con una tasa de morbilidad de 733.3/100 000 habitantes) (12), y siendo el rotavirus -- uno de los principales agentes etiológicos, creemos que este trabajo aportará un método útil en el diagnóstico y futuro tratamiento de estas enfermedades.

II. GENERALIDADES

II.1. Morfología.

Al ser observados por microscopía electrónica con tinción negativa de fosfotungstato, los rotavirus aparecen generalmente como esferas de 70 nm, de diámetro, formados por:

a). Una parte central llamada nucleoide ("core") de aproximadamente 35 a 40 nm. de diámetro en forma de icosaedro.

b). Una cápside interna, que rodea al nucleoide, -- que presenta una línea basal de la cual surgen proyecciones hacia la periferia dando a la partícula un diámetro de 65 nm.

c). Sobre estas proyecciones o capsómeros, se encuentra una segunda cápside lisa con un ancho de cuatro a cinco nm., dando así a las partículas completas un diámetro de 70 nm.

Los capsómeros internos dan a la partícula la apariencia de una rueda antigua (de donde deriva su nombre) y

esta corresponde a la proyección en un plano de la partícula tridimensional, formada por 32 subunidades mayores envueltas en una delgada cubierta, constituida por subunidades más pequeñas. (13)

La cápside externa se pierde frecuentemente, de tal manera que los rotavirus aislados de heces contienen mezclas de partículas con y sin la capa externa, o muchas veces sólo partículas sin la cápside externa.

En preparaciones purificadas de rotavirus humano, Rodger y colaboradores, encontraron que los dos tipos de partículas son separables por sus densidades boyantes al centrifugar en equilibrio en un gradiente de CsCl . Por microscopía electrónica se observó que las partículas obtenidas en el intervalo de densidad de $1.38 - 1.39 \text{ gr./cm}^3$, eran rotavirus sin cápside externa y las obtenidas a densidades de $1.29-1.30 \text{ gr./cm}^3$ eran una mezcla de partículas virales completas e incompletas. (14)

II.2 Composición.

El rotavirus humano, está compuesto por ocho o nueve polipéptidos con pesos moleculares entre 21 000 y 127 000

de los cuales tres corresponden a la cápside externa.

Los rotavirus animales, presentan nueve polipéptidos con pesos moleculares entre 14 000 y 133 000, perteneciendo cuatro de ellos a la cápside externa. (15)

Por medio de estudios de desnaturalización térmica y estudios analíticos del genoma viral, se observó la presencia de 11 segmentos de distintos tamaños y pesos moleculares de ácido ribonucleico de cadena doble. (16, 17)

Cada molécula de ácido ribonucleico, codifica -- probablemente una proteína y representa un gene. Así, se puede estimar que el genoma de los rotavirus está formado por 11 genes, nueve de los cuales codifican para proteínas que componen el virion y los otros dos probablemente para enzimas requeridas en la replicación del virus en el interior de la célula. (18)

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se han comparado los rotavirus humanos y animales, encontrándose patrones electroforéticos distintos, que permiten diferenciar las distintas especies.

Se han encontrado también, variaciones entre los rotavirus aislados de una sola especie y estas diferencias -- han permitido clasificarlos como pertenecientes a distintos tipos. (17,19,20)

Espejo y colaboradores han descrito dos tipos de rotavirus humano, que difieren principalmente en el peso molecular de los segmentos dos y cinco, por lo que han sido denominados tipo uno y tipo dos. Estas variaciones en el genoma de los rotavirus que infectan a una sola especie, dan diferencias en la movilidad electroforética de las proteínas estructurales del virus. (21)

III. MATERIAL Y METODOS.

III.I Material.

a) Muestras fecales:

Heces (de 2-5 gr.) de niños con gastroenteritis, de no más de cinco días de evolución. Estas muestras fueron obtenidas del Departamento de Urgencias del Hospital de Pediatría de el Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social.

b) Aparatos.

Cámara de electroforesis vertical.

Fuente de poder.

Lámpara de luz ultravioleta.

Agitador magnético.

Centrifuga.

Ultracentrifuga.

Potenciómetro.

Balanza analítica.

Pipetas automáticas de 10-100 microlitros.

c) Reactivos.

Fluorocarbón (Freón T.F.).

Folietilenglicol.

Sacarosa.

Lauril sulfato de sodio.

E.D.T.A. sal disódica.

2- Mercaptoetanol.

Glicerol.

Azul de bromofenol.

Trizma base.

Fosfato ácido de sodio.

Agarosa.

Bromuro de etidio. (c)

d) Material de vidrio.

Tubos de vidrio de 12cm. de largo y 0.5cm. de diámetro -
interno, con marca externa a 2cm. de uno de los extremos

Matraces Erlenmeyer de 50 ml.

Matraces aforados de 100 y 1000ml.

Pipetas 1,2 y 5ml.

Pipetas Pasteur.

Placa de vidrio de 20 x 20cm. para llenado de tubos.

Tubos de ensayo de 12 x 75 y 16 x 150.

Tubos de centrifuga de 14ml. graduados en 0.1 y 1.0ml.

Vasos de precipitados de 50, 250 y 500ml.

e) Varios.

Abatelenguas.

Cuadros de gasa de 2cm² aproximadamente.

Gradillas.

Parafilm.

Tuvo de hule de 5mm. de diámetro.

Tapones de hule con perforación de 0.5cm. de diámetro.

f) Soluciones (preparación apéndice I).

Buffer Loening 10x.

Buffer Loening 1x.

Solución disruptora (S.D.S.-M.E.).

Solución de bromuro de etidio.

Solución de glicerol-bromofenol.

Solución de agarosa al 2%.

Solución de polietilenglicol al 50%.

Solución de sacarosa al 45%.

III.2 Métodos.

Basados en el patrón electroforetico inconfundible-
del ácido ribonucleico, así como en la gran cantidad de par

tículas virales presentes en las heces en etapas tempranas de la gastroenteritis causada por rotavirus, se describen estas técnicas que pueden realizarse fácilmente en el laboratorio. (22)

III.2.1 Electroforesis.

2.1.1. Suspensión de heces.

- a) Pesar un matraz Erlenmeyer de 50ml., provisto de un abatelenguas.
- b) Agregar 2gr. de heces.
- c) Resuspender en 5ml. de agua.
- d) Agitar fuertemente hasta homogenizar.

2.1.2 Tratamiento con fluorocarbón.

- a) Añadir 5ml. de fluorocarbón y agitar en placa -- magnética durante 10 minutos.
- b) Pasar la mezcla a un tubo de centrifuga y centrifugar a 9 000 rpm durante 30 minutos. Concluido el lapso, extraer el sobrenadante (evitando tomar-

el material de la interfase), y colocarlo en un tubo de centrifuga graduado.

2.1.3 Precipitación con polietilenglicol.

a) Agregar, 0.19ml. de solución de polietilenglicol al 50% por cada mililitro de sobrenadante (inciso 2.1.2b).

b) Agitar hasta mezclar bien y guardar la muestra a 4°C, hasta el siguiente día. Pasado este tiempo, centrifugar a 6 000 rpm, durante 30 minutos; descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 2.5ml. de agua.

2.1.4 Ultracentrifugación.

a) A un tubo de ultracentrifuga, agregar un mililitro de solución de sacarosa al 45%.

b) Agregar la muestra (inciso 2.1.3b), al tubo que contiene el gradiente de sacarosa y ultracentrifugar a 40 000 rpm durante 75 minutos; descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 0.2ml. (aproximadamente 2 o 3 gotas).

2.1.5 Preparación de la muestra para electroforesis.

- a) En un tubo de 12 x 75, colocar 50 microlitros de muestra y 20 microlitros de solución S.D.S.-M.E. y se incuba durante una hora a 55°C, evitando la evaporación en exceso.
- b) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar una gota de solución de bromofenol-glicerol.

2.1.6 Electroforesis.

a) mientras se incuban las muestras, pesar 0.6 gr.- de agarosa y colocarla en un matraz Erlemeyer de 50ml. Agregar 3ml. de buffer Loening 10 x y 27ml. de agua destilada.

b) Calentar la suspensión de agarosa en baño maría, hasta que se disuelva completamente.

c) Con una jeringa provista de una aguja de hematocrito, agregar la suspensión de agarosa dentro de los tubos de vidrio (previamente colocados en una placa de vidrio, -- provista de tapones para poder cerrar un extremo), los tubos deben de estar verticales y con la marca en el extremo inferior. Llenar los tubos hasta aproximadamente 0.5cm. --

del extremo superior.

d) Una vez solidificada la agarosa, sacar el tubo de la placa de vidrio, colocarlo en posición horizontal y deslizar el gel hacia afuera, hasta que su extremo coincida con la marca. Cortar, cuidando de lograr un corte vertical.

e) Cubrir el extremo más lejano a la marca, con una gasa de 2cm^2 manteniéndola en posición con un anillo de hule.

f) Colocar los tubos en el aparato de electroforesis y llenar los recipientes superior e inferior con buffer Loening 1x.

g) Conectar a la fuente de poder (polo positivo al reservorio inferior y el polo negativo al superior). Asegurar, la obtención de una corriente de 8 a 10 mA. por gel, disminuyendo posteriormente el voltaje al mínimo y manteniéndolo así hasta terminar de colocar las muestras en los tubos.

h) Depositar las muestras, con una jeringa de tuberculina provista de un tubo delgado tygón, en lugar de aguja

Sumergir el tubo de la jeringa, hasta aproximadamente 0.5cm del gel y dejar caer suavemente la muestra, sobre la superficie de este.

i) Una vez colocadas todas las muestras, aumentar el voltaje hasta obtener nuevamente una corriente de 8 a 10 mA. por gel.

j) Después de aproximadamente tres horas, cuando todo el bromofenol haya salido, apagar la fuente de poder. De oatar el buffer del reservorio superior y dejar escurrir -- los geles (quitando la gasa) en tubos de 16 x150, conteniendo la solución de bromuro de etidio. Los geles deben quedar totalmente sumergidos en la solución.

k) Tapar los tubos con parafilm y guardar a 4°C por una noche.

l) Pasado este lapso colocar cada uno de los geles, sobre una lámpara de luz ultravioleta para su observación.- Considerandose positivos cuando se presente el patrón electroforético de rotavirus, consistente en once bandas, que representan las diferentes fracciones del ácido ribonucleico viral, aunque en muchas ocasiones sólo se observan nueve

segmentos, ya que los pesos moleculares y movilidad electroforética de los segmentos dos, tres y ocho, nueve con muy semejantes.

III.2.2 Coelectroforesis.

Esta prueba tiene por objeto, conocer a que tipo de rotavirus corresponden cada una de las muestras que hayan resultado positivas mediante electroforesis.

2.2.1 Muestras.

Las muestras seleccionadas, serán aquellas que resulten positivas por el método de electroforesis, descrito en los incisos 2.1.1 a 2.1.6.

2.2.2 Preparación de las muestras.

Se realizará con muestras que fueron tratadas para determinación electroforética, como se indicó en la fase descripta en el inciso 2.1.4b y se prepararán como se indica en el inciso 2.1.5.

2.2.3 Coelectroforesis.

a) El procedimiento para correr la coelectroforesis es el mismo que el descrito anteriormente para la electrofo

resis, salvo que para esta técnica, se corren simultanea - mente dos muestras que hayan resultado positivas por el mé todo de electroforesis en un mismo gel.

Así mismo, ambas muestras se corren por separado, - para efectuar posteriormente comparaciones entre los patro - nes electroforéticos individuales y el de la mezcla (20).-- (Esquema número 2).

b) Se correrá la prueba y posteriormente se realiza - rá la lectura de acuerdo a lo indicado en el inciso 2.1.6j.

IV. RESULTADOS.

De las 298 muestras estudiadas por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa, de el R.N.A. viral, se obtuvieron 44 casos positivos, que corresponden al 14.8%.

La distribución por edades de los casos positivos, se ilustra en la tabla # 1 y fué la siguiente: niños de uno a tres meses 22 casos, de tres a seis meses 10 casos, cinco casos entre seis y nueve meses, cuatro casos entre nueve y doce, un caso entre uno y dos años y dos entre tres y cuatro años.

Por lo que respecta a la distribución estacional de los casos positivos de gastroenteritis causada por rotavirus, se observó un marcado incremento de estos en los meses fríos (gráfica #2).

Así mismo, los casos positivos fueron estudiados -- por coelectroforesis, determinándose que 30 de estos correspondían a rotavirus tipo dos y los 14 restantes al tipo uno

Edad (Meses)	N° de Casos Totales	N° de Casos Positivos	% de Positividad
1-3	121	22	16.4
3-6	77	10	13.3
6-9	45	5	11.1
9-12	27	4	16.0
12-24	18	1	7.6
36-48	10	2	20.0
Total	298	44	14.8

**Tabla N° 1.- Distribución por edades
de casos positivos**

V. DISCUSION.

Los resultados obtenidos (gráfica 1), indican que la incidencia de casos de gastroenteritis infecciosa aguda causada por rotavirus, es baja si la comparamos con los resultados reportados por otros autores (1,2,8,11,23). Esto es debido probablemente, a que el tiempo en que se realizó el muestreo (Noviembre de 1977 a Agosto de 1979) no contuvo -- los tres periodos invernales, lo cual pudo contribuir a el descenso en el número de casos positivos, ya que la distribución estacional nos muestra un marcado aumento en la incidencia de casos positivos (gráfica 2). Esta distribución -- concuerda con lo indicado por otros autores (1,24,25,26).

Por lo que respecta a la frecuencia de casos de gastroenteritis relacionada con la edad de los pacientes, encontramos que los resultados (tabla 1 y gráfica 3), son semejantes a los reportados por Carr y colaboradores. (27)

En la prueba de coelectroforesis, se observó que el 62% de los casos correspondieron a rotavirus tipo dos y el 38% restante al tipo uno, indicándonos esto que la mayoría de las infecciones fueron causadas por rotavirus tipo dos.-

Este resultado es similar a lo encontrado por Yolken y colaboradores. (28)

Los resultados obtenidos, nos indican que la electroforesis del R.N.A viral en gel de agarosa, es sencilla y altamente específica para la detección de los distintos tipos de rotavirus.

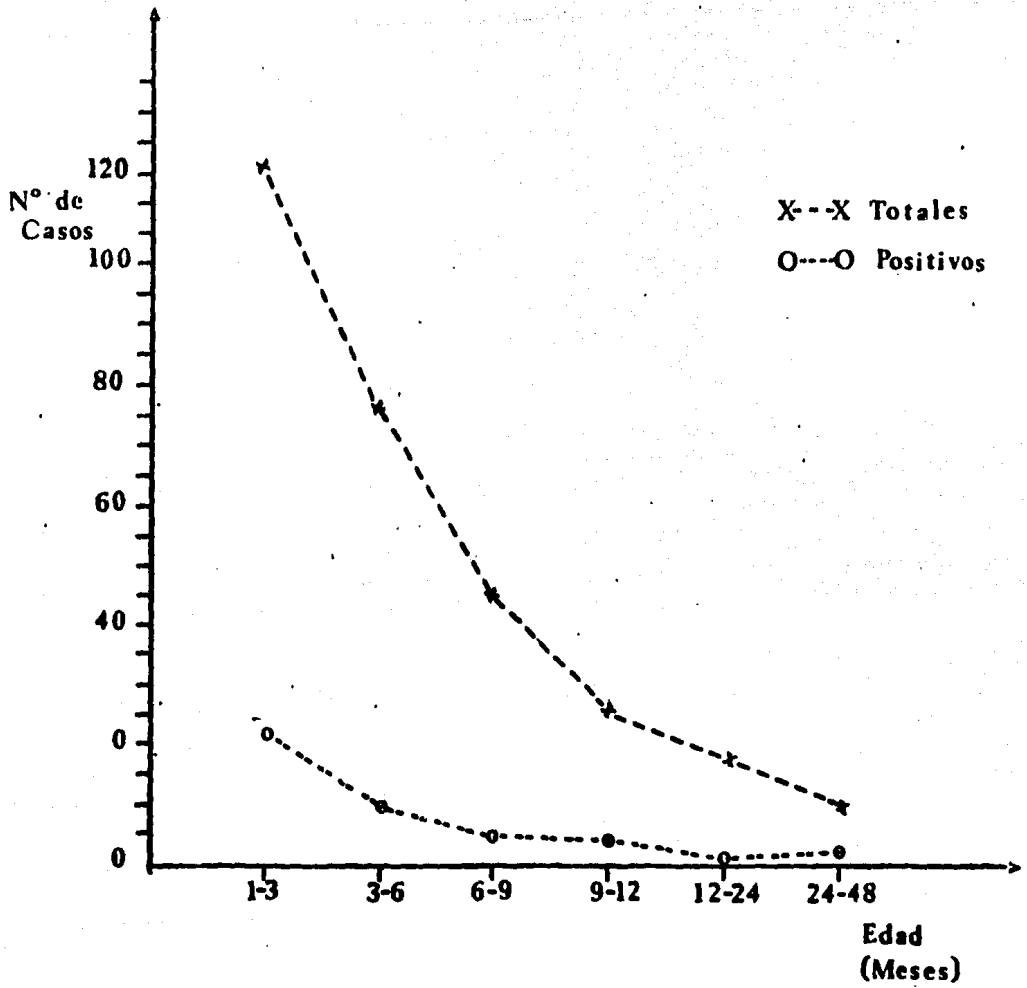
Por diversos estudios se ha encontrado que la especificidad de esta técnica, es mayor a la obtenida por medio de la microscopía electrónica, ya que por este método no se pueden identificar los diferentes tipos de rotavirus, ni estos de otros virus de la misma familia como reovirus y orbivirus.

La mencionada especificidad de la técnica de electroforesis del R.N.A. viral, se debe a dos factores primordiales:

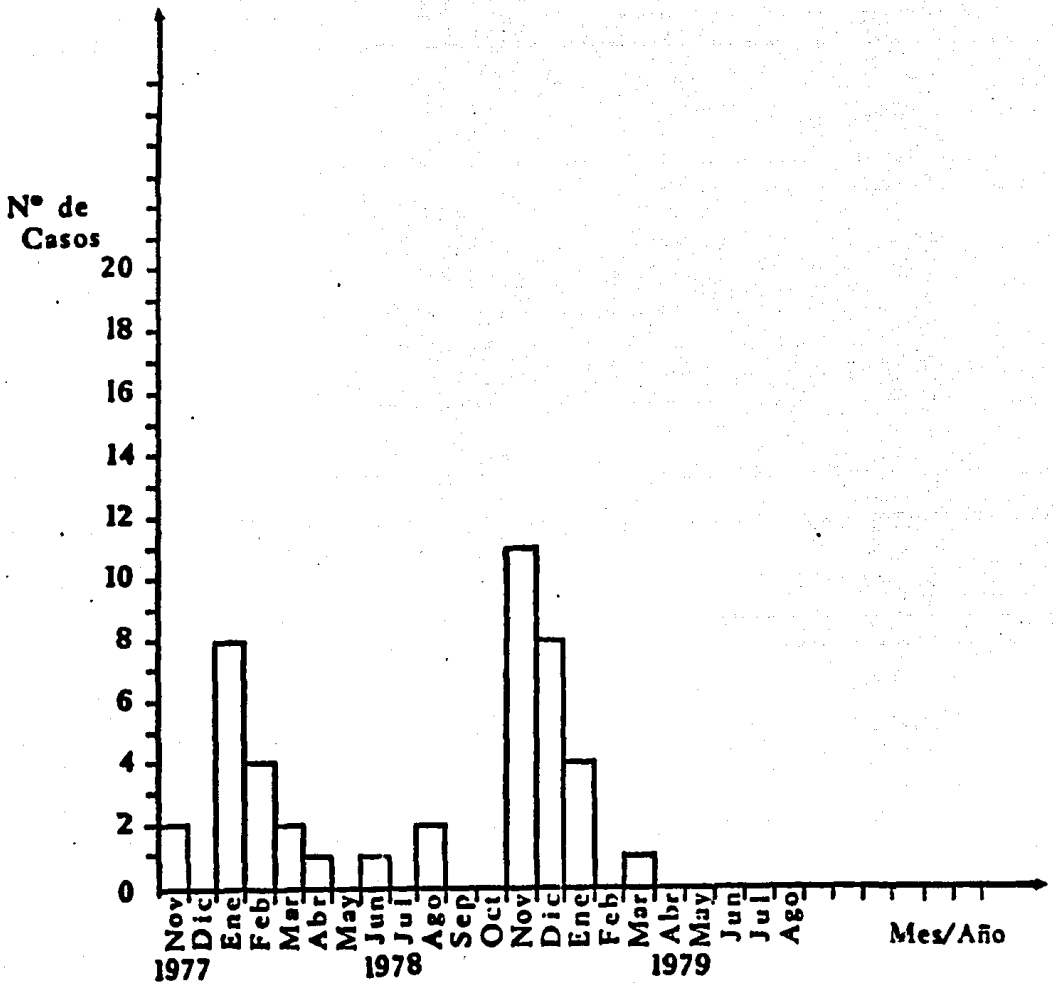
a) A la presencia de un patrón electroforético específico, mediante el cual se puede identificar fácilmente a los rotavirus de diversas especies.

b) La tinción con bromuro de etidio. Ya que al intercalarse el bromuro de etidio entre pares de bases adya-

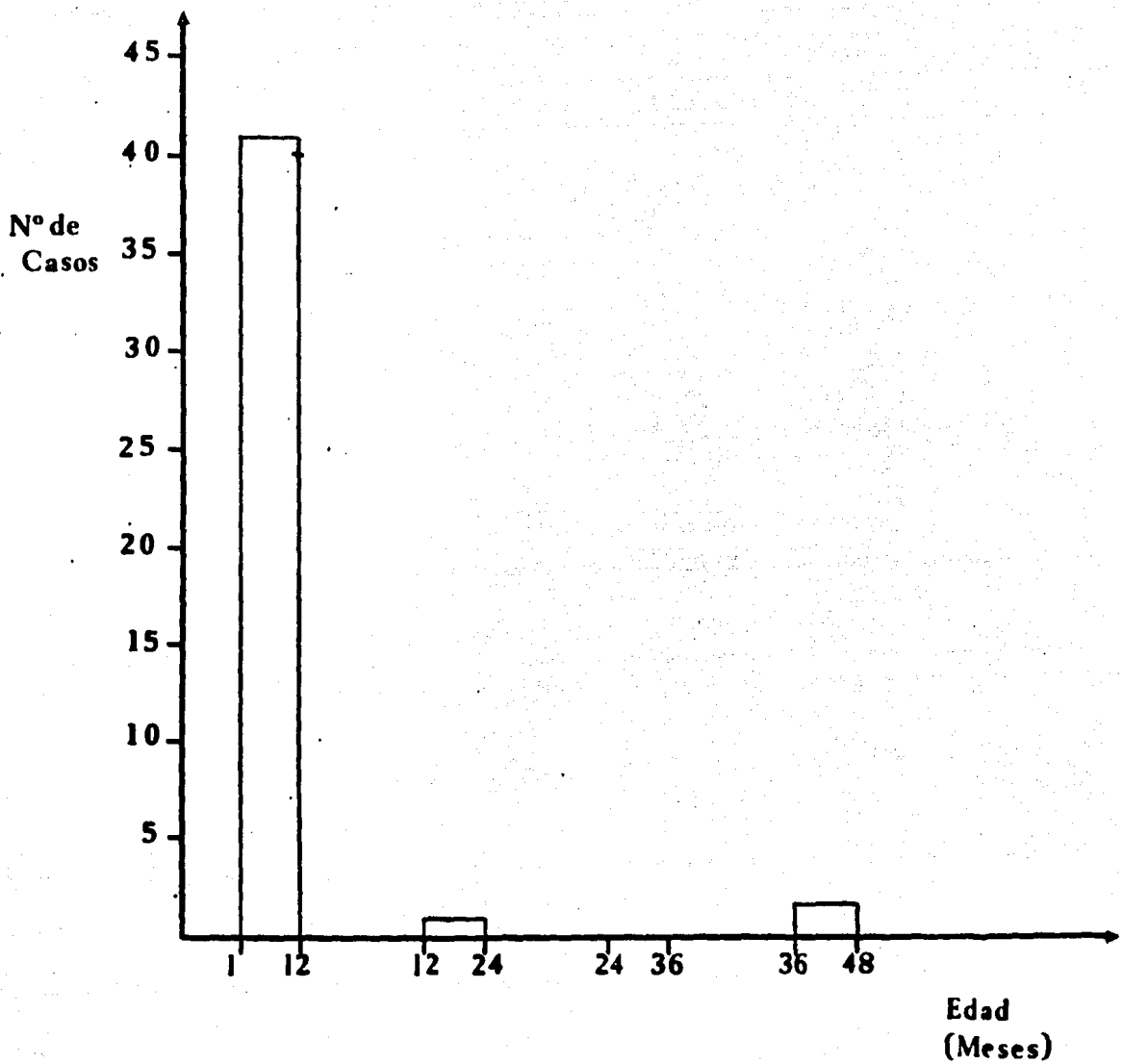
centes del R.N.A. de doble cadena, se obtiene un complejo - que al ser irradiado con luz ultravioleta fluoresce de 20 a 100 veces más que el bromuro de etidio libre (28) (esquema-3), permitiéndonos así una fácil observación del patrón - - electroforético de rotavirus.



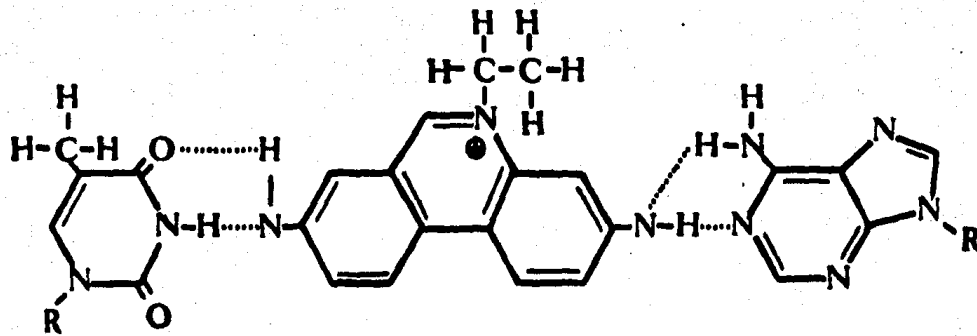
Gráfica Nº 1-Incidencia de G.I.A.



Gráfica Nº 2.- Distribución estacional de G.I.A. causada por Rotavirus



Gráfica Nº 3: Incidencia de G.I.A. por Rotavirus en relación a la edad



Esquema N°3.- Complejo de bromuro
de etidio y R.N.A.
viral

APENDICE I.

Buffer Loening 10x.

<i>Trizma base</i>	<i>0.36 M</i>	<i>43.5gr.</i>
<i>Fosfato ácido de sodio</i>	<i>0.30 M</i>	<i>41.39gr.</i>
<i>E.D.T.A. sal disódica</i>	<i>0.01 M</i>	<i>3.8gr.</i>
<i>Lauril sulfato de sodio</i>	<i>1.0% p/v</i>	<i>10.0gr.</i>

*Disolver en aproximadamente 750ml de agua destilada
ajustar a ph 7.8 y aforar a 1 000ml.*

Buffer Loening 1x.

*A partir de el buffer Loening 10x, preparar el bu--
ffer 1x de la siguiente forma:*

<i>Loening 10x</i>	<i>100ml.</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>900ml.</i>

Solución S.D.S.-M.E.

<i>Lauril sulfato de sodio</i>	<i>6.0 % p/v</i>	<i>0.6gr.</i>
<i>E.D.T.A. sal disódica</i>	<i>0.036 M</i>	<i>c.1368gr.</i>

2- Mercaptoetanol	0.06 % v/v	0.06ml.
Agua destilada cbp		10.0ml.

Disolver el E.D.T.A. y el lauril sulfato de sodio - en ocho ml. de agua destilada y ajustar el ph a 7.0 agregar el mercaptoetanol y aforar a 10ml.

Solución de Bromuro de Etidio.

Bromuro de etidio concentrado	1.0ml.
Agua destilada cbp	1 000ml.

Esta solución, se debe proteger de la luz directa.

Solición de Glicerol-Bromofenol.

Solución saturada de azul de bromofenol	1.0ml.
Glicerol	9.0ml.

Solución de Agarosa al 2 %.

Agarosa	2.0 % p/v	0.6gr.
Loening 10x	10.0 % v/v	3.0ml.
Agua destilada		27.0ml.

Solución de Polietilenglicol al 50 %.

<i>Polietilenglicol</i>	<i>50.0 % p/v</i>	<i>50.0gr.</i>
<i>Agua destilada cbp</i>		<i>100ml</i>

Solución de Sacarosa al 45 %.

<i>Sacarosa</i>	<i>45.0 % p/v</i>	<i>45.0gr.</i>
<i>Agua destilada cbp</i>		<i>100ml.</i>

VI. BIBLIOGRAFIA.

- 1) Flewett, T.H.: *Acute non-bacterial infections gastroenteritis an assay in comparative virology*. Edit. Watterson, A.P. vol. I. Edimburgo 1977, pp. 151-169.
- 2) Kapikian: Z.A.: *Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with winter gastroenteritis in hospitalized infants and young children*. *N. Engl. J. Med.* 294-965-968. 1976
- 3) Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davis, H. y Morris, C.A.: - *Epidemic viral enteritis in a long stay childrens ward* - *Lancet I*: 4-6. 1975
- 4) Bridger, J.C. y Wode, G.N.: *Virus of infantile gastroenteritis*. (letter). *Brit. Vet. J.* 131 :528-535. 1975.
- 5) Thorton, A. y Zuckerman, A.J. : *The virus of acute diarrhea*. *Nature* 254 : 557. 1975.
- 6) Calderon, J.E. y Espejo, T.R. : *Aspectos epidemiológicos de la gastroenteritis producida por rotavirus*. *Bol. Med. Hosp. Inf.* 34 : 217-224. 1977

- 7) Bishop, R.F., Davison, G.D., Holmes, I.H. y Ruck, B. J. -
*Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa -
from children with acute non-bacterial gastroenteritis. -
Lancet II : 1281-1283. 1973.*
- 8) Flewett, T.H., Bryden, A.S. y Davis, H. : *Virus parti---
cles in gastroenteritis. LancetII :1497-1500. 1973.*
- 9) Middleton, P.J., Saymanski, M.T., Abbot, G.D., Bortulu -
ssi, R. y Hamilton, J.R. : *Orbivirus acute gastroenteri-
tis of infancy. Lancet I :1241-1244. 1974*
- 10) Kapikian, Z.A., Kim, H.W., Wyatt, R.G., Rodriguez, W.J.
Ross, S., Cline, W.L., y Parrot, R.H. : *Reovirus-like -
agent in stools: association with infantile diarrhea --
and development of serologic test. Science 185 :1049-10
53. 1974*
- 11) Flewett, T.H., Bryden, A.S., Dacies, H., Woode, G.N. --
Bridger, J.V. y Derrick, J.M. : *Relation between viru--
ses from acute gastroenteritis of children and newborn-
calves. Lancet II : 61-63. 1974*
- 12) *Estadisticas vitales: Sal. Pub. Mex.XX (1): 113-114.1978*

- 13) Esparza, J. y Gil, F.A. : A study on the ultraestructure of human rotavirus. *Virology* 91 : 141-150. 1975.
- 14) Rodger, S.M., Schnagal R.D. y Holmes, I.H. : Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea virus of human and calf origin. *J. Virol.* 16 : 1229-1235. 1975
- 15) Rodger, S.M., Schnagal, R.D., y Holmes, I.H. : Further-biochemical characterization, including the detection - of surface glicoproteins, of human, calf, and simian ro_tavirus. *J. Virol.* 24 : 91-98. 1977.
- 16) Rodger, S.M. y Holmes, I.H. ; Comparison of the genomes of simian (SA-II), calf and human rotavirus by gel --- electrophoresis and the detection of genomic variation- amongst calf isolates. *J. Virol.* 14 : 225-229. 1979
- 17) Schnagal, R.D. y Holmes, I.H. : Characteristics of the- genome of human infantile enteritis virus (rotavirus) - *J. Virol.* 19 : 267-270. 1976
- 18) Espejo, T.R. : *Biología molecular de los rotavirus (co-municación personal).*

- 19) Kalica, R.A., Garon, F.C., Wyatt, G.R., Mebus, A.C., --
Vankirk, H.D., Chanock, M.R. y Kapikian, Z.A. : *Diferen-
tiation of human and calf reovirus-like agents associat-
ed with diarrhea using polyacrylamide gel electrofore--
sis of R.N.A. Virology 74 : 86-92 . 1976*
- 20) Kalica, R.A., Sereno, M.M., Wyatt, G.R., Mebus A.C., Cha-
nock, M.R. y Kapikian Z.A. : *Comparison of human and --
animal rotavirus strains by gel electroforesis of viral
R.N.A. Virology 87 : 247-255. 1978*
- 21) Espejo, T.R., Calderon, J.E. y González N. : *Reovirus-
like agents associated wiht acute gastroenteribis. J.-
of Clin. Microbiol. 6 ; 502- 506. 1977*
- 22) Espejo, T.R., Romero, P., Calderon, J.E. y González, N.
: *Diagnóstico de rotavirus por electroforesis del R.N.A
viral. Bol. Med. Hosp. Inf. 35 : 323-331. 1978*
- 23) Shepard, R.W., Truslaw, S., Wacker-Smith, J.A., Bird, -
R., Cutting, W., Darnell, R. y Barker, C.M. : *Infantile -
gastroenteritis : a clinical study of reovirus-like ---
agent infection. Lancet II : 1082. 1975*

- 24) Christopher, N.L. y Bayless, T.M. : Virus of infantile -- gastroenteritis. *Brit. Med, J.* 5 : 555. 1975
- 25) Bryden, A.S., Davies, H.A., Hadley, R.E., Flewett, T.H. Morris, C.A. y Oliver, P. : Rotavirus enteritis in the west midland during 1974. *Lancet II* : 241-243. 1975
- 26) Davidson, G. R., Bishop, R.F. , Toenley, R.R.W., Holmes I, H. y Ruck, B.J. : Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lance I* : 242-246. 1975
- 27) Carr, E.M., Donald, G., Mc Kendrick, W. y Spiridakis, T : The clinical features of infantile gastroenteritis -- due to rotavirus Scand, *J. Infect.* 8 : 241-243. 1976
- 28) Yolken, H.R., Wyatt, G.R., Zissis, G., Brandt, D. C., Rodriguez, W.J., Kim, H.W., Parrot, R.H., Urrutia, J.J. Mata, L., Greenberg, B.H., Kapikian, Z.A. y Chanock, M. R. : Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as - Studied by enzyme linked inmunosorbent assay. *N. Engl. J Med.* 229 : 1156-1161. 1978
- 29) Le Pecq, B.J. y Paoletti, C. : A fluorecent complex between etidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* - 27 : 87-106. 1967